

**Untersuchungen zur spurenanalytischen
Erfassung von photochemischen und mikrobiellen
Oxidationsprodukten des Benzo(a)pyren
(in Lebensmitteln)**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Konstantinos Christoglou
aus Katerini/Griechenland

Hauptberichter: Prof. Dr. O. Müller
Mitberichter: Prof. Dr. J. Stezowski
Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1989

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung
der Universität Stuttgart

1989

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPURENANALYTISCHEN
ERFASSUNG VON PHOTOCHEMISCHEN UND MIKROBIELLEN
OXIDATIONSPRODUKTEN DES BENZO A PYREN
(IN LEBENSMITTELN)

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
genehmigte Dissertation

Vorgelegt von
Konstantinos Christoglou
aus
Katerini/Griechenland

Hauptberichter: Prof.Dr.O.Müller
Mitberichter : Prof.Dr.J.Stezowski
Tag der mündlichen Prüfung: 26.Juni 1989

Institut für Organische Chemie, Biochemie
und Isotopenforschung der Universität Stuttgart

1989

Diese Arbeit wurde aus Mitteln des Ministeriums für
Umwelt Baden-Württemberg finanziert, wofür an dieser
Stelle gedankt werden soll

Meinen Eltern gewidmet

Ich danke

Herrn Professor Dr. O. Müller für die Überlassung des
Themas und das große Interesse, das er meiner Arbeit
stets entgegengebracht hat, sowie allen Kollegen am
Institut für die gute Zusammenarbeit

	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>Seite</u>
	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	<u>EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG</u>	7
1.1	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe: Entstehung, Vorkommen und Biologische Bedeutung	7
1.2	Aufgabenstellung	19
2.	<u>THEORETISCHER TEIL</u>	22
2.1	Nomenklatur der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe	22
2.2	Biochemische Bildung von Benzo[a]pyren	25
2.3	Effekt der Sonnenbestrahlung an BaP	28
2.4	Mechanistische Übersicht der BaP-Oxidation	30
2.5	Kanzerogenität des Benzo[a]pyrens und seiner Oxidationsprodukte	37
2.6	Rußschwarz, Aktivkohle	42
2.7	Trennmethode von BaP aus der Matrix und von den anderen PAH	45
2.7.1	Flüssigchromatographie (LC)	45
2.7.2	Dünnschichtchromatographie (TLC)	47
2.7.3	Gaschromatographie (GC)	50
2.7.3.1	Gepackte Säulen	50
2.7.3.2	Kapillarsäulen	51
2.7.4	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	52
2.8	Gewinnung der BaP-dione durch Bestrahlung mit simuliertem Tageslicht in wässrigen Systemen	56
2.8.1	Extraktion und Reinigung der Dione	57

		<u>Seite</u>
2.9	Stabilitätsüberprüfungen des BaP und der BaP-dione in organischen Lösungsmitteln	59
2.10	Probenvorbereitung und Anreicherung von BaP und BaP-dionen aus pflanzlichen Materialien	61
2.10.1	Extraktion	61
2.10.2	Vorreinigung und Trennung	62
2.10.3	Trennung und Bestimmung der Benzo[a]pyren-dione mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	66
2.10.4	Gelverteilungschromatographische Isolierung von BaP	68
2.10.5	Trennung und Bestimmung von BaP mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	70
2.10.6	Extraktion und Anreicherung aus Bodenproben	74
2.11	Probenvorbereitung und Anreicherung von BaP und BaP-dionen aus geräucherten Fleischwaren (Rauchfleisch)	75
2.11.1	Extraktion	75
2.11.2	Vorreinigung und Trennung	76
2.12	Stabilitätsüberprüfung von Benzo[alpyren	78
2.12.1	Bestrahlung von BaP auf Pflanzen	78
2.12.2	Bestrahlungsversuche von BaP an Rauchfleischproben unter simuliertem Tageslicht und unter UV-Bestrahlung	81
2.13	Stabilität von BaP und BaP-dionen unter den Bedingungen der alkalischen Verseifung	84
2.14	Derivatisierung der BaP-dione	85
2.14.1	Derivatisierung der BaP-dione mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin	86
2.14.2	Verwendung, Vorteile und Trennung	101

		<u>Seite</u>
2.15	Nachweisgrenzen der verschiedenen Methoden	103
2.15.1	Benzo[a]pyren-Bestimmung	103
2.15.2	Benzo[a]pyren-dione	104
2.15.3	Monohydrazone	104
2.16	Analysenergebnisse und Diskussion	106
2.16.1	Analysenergebnisse bezogen auf Benzo[a]pyren	106
2.16.2	Analysenergebnisse bezogen auf die BaP-dione (BaP-6,12-, BaP-1,6-, BaP-3,6-dion)	111
2.17	Mikrobiologische Abbauverfahren	114
2.17.1	Bakterielle Abbauversuche	116
2.17.2	Allgemeines	117
2.17.3	Stammführung, Probenvorbereitung, Extraktion und Aufarbeitung	119
2.17.4	Stamm NCIB 9816	121
2.17.5	Stamm NCIB 10353	122
2.17.6	Stamm NCIB 12092	123
2.17.7	Abbauversuche mit den BaP-dionen	125
3.	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	126
3.1	Allgemeines zur Arbeitstechnik der spuren- analytischen Bestimmungen	126
3.2	Substanzen, Lösungsmittel, Trennmaterialien	127
3.3	Entsorgung von Abfällen, Handhabung von Pro- dukten	130
3.4	Radioaktivitätsmessungen	130
3.5	UV/Vis-Spektren	131
3.6	Bestrahlungsanordnung	131

	<u>Seite</u>	
3.7	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	131
3.7.1	HPLC-Trennung der PAH	132
3.7.2	HPLC-Trennung der BaP-dione	133
3.7.3	HPLC-Trennung der Monohydrazone	133
3.8	Infrarot-Spektren	134
3.9	Säulenchromatographie an Niederdruckanlagen	134
3.9.1	Gelchromatographie mit Sephadex LH-20	134
3.9.2	Gelverteilungschromatographie an Sephadex LH-20	135
3.10	Wässrige Systeme	137
3.11	Pflanzliche Proben	138
3.12	Rauchfleischproben	139
3.13	Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhy- drazin (2,4-DNPH)	140
3.14	Mikrobiologische Methoden	142
3.14.1	Sterilisation	142
3.14.2	Nähragar	143
3.14.3	Komplett-Medium	143
3.14.4	Glucose-Medium	143
3.14.5	Phosphat-Puffer 20-fach (500 mM)	143
3.14.6	Salze 100-fach	143
3.14.7	Schwermetall-Lösung (SL 6) nach Pfennig	144
3.14.8	Führung auf Naphthalin	144
3.14.9	Führung auf Benzo[a]pyren	144
3.14.10	Aluminiumoxid-Säule	144
4.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	145

		<u>Seite</u>
5.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	147
6.	<u>LEBENS LAUF</u>	157

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APM	Airborne Particulate Matter
BaP	Benzo [a] pyren
BaA	Benzo [a] anthrazen
BeP	Benzo [e] pyren
BbFLT	Benzo [b] fluoranthen
BkFLT	Benzo [k] fluoranthen
BghiPER	Benzo [ghi] perylen
IPYR	Indeno [1,2,3-cd] pyren
BaP-6,12-dion	6,12-Dihydrobenzo [a] pyren-6,12-dion
BaP-1,6-dion	1,6-Dihydrobenzo [a] pyren-1,6-dion
BaP-3,6-dion	3,6-Dihydrobenzo [a] pyren-3,6-dion
t-BME	tertiär-Butylmethylether
BMF	Bakterienfeuchtmasse
DBF	Dibenzofuran
2,4-DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
PAH	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
ppb	1 Teil von 10 ⁹ Teile
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
Upm	Umdrehungen pro Minute

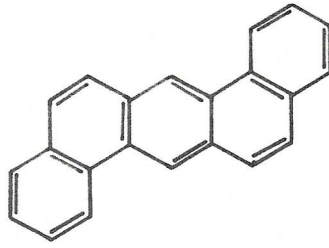
1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

1.1. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe: Entstehung, Vorkommen und Biologische Bedeutung

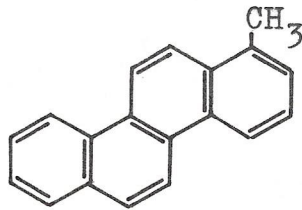
Als Erster (1761) beobachtete der Physiker John Hill den Zusammenhang von Nasenkrebs und der intensiven Anwendung von Schnupftabak. Percival Pott (1775) berichtete von krebs-erregenden Eigenschaften des Rußes aufgrund von Hautkrebs-erkrankungen bei Schornsteinfegern in England. In den Jahren 1915 bis 1922 konnte der experimentelle Nachweis der Karzinogenität vom Ruß und Steinkohlenteer erbracht werden. Auf der Suche nach karzinogenen Inhaltsstoffen des Teers konnte eine Reihe mehrkerniger Aromaten isoliert werden, die auf die Haut von Mäusen und Ratten injiziert, bösartige Tumoren erzeugten. Als erster karzinogener polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff wurde 1930 das Dibenz[a,h]anthrazen (1,2,5,6-Dibenzanthrazen) identifiziert. Es folgte die Identifizierung von 9,10-Dimethylbenzo[a]anthrazen sowie 1-Methylchrysen mit ebenfalls starken karzinogenen Eigenschaften, wobei deren Grundkörper nur schwache Karzinogenität (Benzo[a]anthrazen) oder keine biologische Aktivität (Chrysen) zeigten. Die bis zu diesem Zeitpunkt gefundenen Polycyclen konnten noch nicht befriedigend die stark krebserregende Wirkung des Steinkohlenteers erklären. Cook ⁽¹⁾ auf der Suche nach einem stärkeren Karzinogen, konnte im Jahr 1933 das Benzo[a]pyren (3,4-Benzopyren) identifizieren. Damit konnte in der halben Zeit, im Vergleich zu Dibenz[a,h]anthrazen, bei Mäusen Tumoren erzeugt werden.

Als im selben Jahr Cook die noch stärkere Karzinogenität des Methylcholanthrens entdeckte, gewann die Stoffklasse der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (im Englischen polycyclic aromatic hydrocarbons -kurz PAH-), zunehmend an analytischem Interesse.

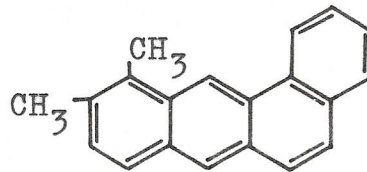
1) Dibenz[a,h]anthrazen:



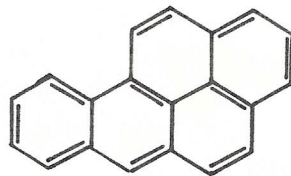
2) 1-Methylchrysen:



3) 9,10-Dimethylbenzo[a]anthrazen:



4) Benzo[a]pyren:



5) 3-Methylcholanthren:

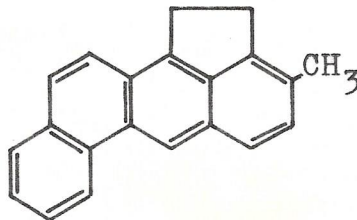


Abbildung 1: Molekülstrukturen karzinogener PAH

Fast gleichzeitig (1937) erschienen erste Berichte (2,3), die sich mit der Toxizität photooxidativer Folgeprodukte von Benzo[a]pyren befassten.

Versuche mit Materialien, die PAH enthielten, bestätigten die karzinogene Wirkung dieser Substanzklasse (Extrakte aus Gummistopfen (1952); Lampenrußextrakt (1954) (4,5)).

Bei Experimenten mit Lampenrußextrakt, die von Steiner (4) mittels subkutaner Injektion an Mäusen durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, daß nur bei Injektionen des im Lösungsmittel Tricaprylin gelösten Extraktes Tumoren auftraten, nicht jedoch bei Implantationen von Pillenpreßlingen aus Lampenruß. Die Folgerung hieraus ist, daß in der Haut kein geeignetes System besteht, welches PAH in Lösung bringt und dem metabolischen Stoffwechselweg zuführt.

Die subkutane Injektion bzw. epikutane Bepinselung mit den gelösten Substanzen ist auch heute noch eine Methode, mit der Stoffe auf ihre Karzinogenität geprüft werden.

Es wurde von Grimmer (6,7) über die Ergebnisse von Versuchen an Mäusehaut berichtet, mit denen festgestellt werden konnte, welche Substanzgruppe in Zigarettenrauch- bzw. Kraftfahrzeugabgaskondensat karzinogen wirkt.

Die Ergebnisse zeigten, daß die gesamte karzinogene Wirkung der Kondensate durch die Fraktion der PAH repräsentiert wird, wobei die übrigen Fraktionen der flüssig/flüssig Verteilungen (1.System: Methanol/Wasser/Cyclohexan; 2.System: Nitromethan/Cyclohexan) keine krebserregende Wirkungen zeigten. Durch Rekombination der einzelnen Phasen konnte die Karzinogenität des Ausgangsmaterials wiederhergestellt werden.

Zur Beurteilung der Wirkung dieser Substanzklasse beim Menschen werden in neuerer Zeit Gewebekulturen verwendet, die allerdings nur eine Aussage über die Mutagenität ermöglichen.

In der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich etwa 130 Milliarden Zigaretten geraucht (8). Aufgrund von Untersuchungen über die Tumorfrequenz von Rauchern und Nichtrauchern (6,9), die in den USA und England durchgeführt

wurden, gelang es, das Krebsrisiko statistisch zu beurteilen: Die Wahrscheinlichkeit an Lungenkrebs zu erkranken, liegt für männliche Nichtraucher bei 14 je 100.000 und Jahr, für mäßige Raucher (1-19 Zigaretten) bei 73 und erreicht schließlich bei starken Rauchern (über 20 Zigaretten) die 204 je 100.000. Eine Kumulierung der Substanzen konnte nicht beobachtet werden. Die Lungenkrebshäufigkeit kehrt nach 5 bis 7 Jahren, nachdem das Rauchen aufgegeben wurde, auf das Nichtraucher-niveau zurück. Die Luftverschmutzung stellt für Lungenkrebs einen zusätzlichen Risikofaktor dar: Nichtraucher in Städten haben ein etwa 2 bis 4 fach höheres Lungenkrebsrisiko als die Nichtraucher auf dem Land. Das wäre dadurch zu erklären, daß 70 bis 90 Prozent der im Luftstaub enthaltenen PAH an Aerosol-Partikel von $<5 \mu\text{m}$ Durchmesser gebunden sind und inhaliert werden können (10).

Nahrungsmittel können karzinogene PAH enthalten, wobei deren Kontamination auf dem Weg der Haltbarmachung, der Zubereitung oder durch atmosphärische Deposition erfolgt. Geräucherte Nahrungsmittel weisen, wegen des Räuchervorgangs, gewisse Mengen an PAH auf. Daß der häufige Verzehr von geräucherten Lebensmitteln nicht unbedenklich ist, konnte am Beispiel einer Gruppe baltischer Fischer gezeigt werden (11), die in größeren Mengen geräucherten Fisch essen. Deren Magenkrebshäufigkeit lag viermal höher als bei einer Vergleichsgruppe von im Inland lebenden Städtern.

Die Mechanismen der Bildung von PAH während der Pyrolyse bzw. der unvollständigen Verbrennung von organischen Materialien sind noch nicht vollständig erforscht.

Organische Verbindungen, die vollständig halogeniert sind, erzeugen im Rauchgas der Verbrennung keine nachweisbaren PAH. Bei der Verbrennung von organischen Materialien, die C-H-Bindungen enthalten, ist dagegen die Entstehung von PAH nachgewiesen (12).

Die Voraussetzung für eine vollständige Verbrennung ist eine gute Durchmischung des Brennstoffs mit ausreichenden Mengen

an Sauerstoff bzw. Luft. Dies kann bei Gasen als Brennstoff nahezu verwirklicht werden. Bei der Verbrennung von staubförmigen oder flüssigen Brennstoffen entstehen aber immer Bereiche mit Sauerstoffdefizit, in denen die Pyrolyse des Brennstoffs erfolgt. Daneben findet die vollständige Verbrennung zu CO_2 und H_2O statt.

Bei der Entstehung der PAH sind zwei Reaktionsschritte von Bedeutung. Die Pyrolyse: Bildung von Spaltprodukten, und die Pyrosynthese: Rekombination dieser Spaltprodukte.

Bei Temperaturen über 700°C werden organische Verbindungen in kleinere, instabile Moleküle (meist Radikale) gespalten, welche zu PAH rekombinieren. Die relativ größere Stabilität der aromatischen Ringe gegenüber den aliphatischen C-C-Bindungen ermöglicht die Bildung von kondensierten Ringstrukturen. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen konnten verschiedene Theorien von Synthesewegen aufgestellt werden:

In der Diffusionsflamme eines Ölzerstäubungsbrenners ist der Brennstoff hohen Temperaturen ausgesetzt und unterliegt deshalb Crack- und Pyrolysebedingungen ⁽¹³⁾. Mit der Regelung des Luftüberschusses läßt sich die Bildung von höhermolekularen Verbindungen zwar steuern, kann aber nie ganz verhindert werden. Denn mit der Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit wird auch die Verweilzeit der Substanzen in der heißen Zone kleiner, mit der Folge, daß nur ein unterer Grenzwert an Ruß und unverbrannten Produkten erreicht werden kann ⁽¹⁴⁾. Aus Ergebnissen von Untersuchungen der längs der Achse einer Diffusionsflamme auftretenden Substanzen kann geschlossen werden, daß Ethylen und Acetylen, über Alkylnradikale gebildet, bei der Entstehung höhermolekularer Aromaten als Schlüsselverbindungen angesehen werden können ^(14, 15). Durch Trimerisierung von Acetylen wird Benzol gebildet, an das weitere Acetylenradikale anlagern können, wobei aus den Seitenketten durch Kondensations- und Polymerisierungsreaktionen mit anschließender Dehydrierung höhere PAH entstehen.

Unter Pyrolysebedingungen (nach Badger) ^(16, 17, 18, 19) bilden

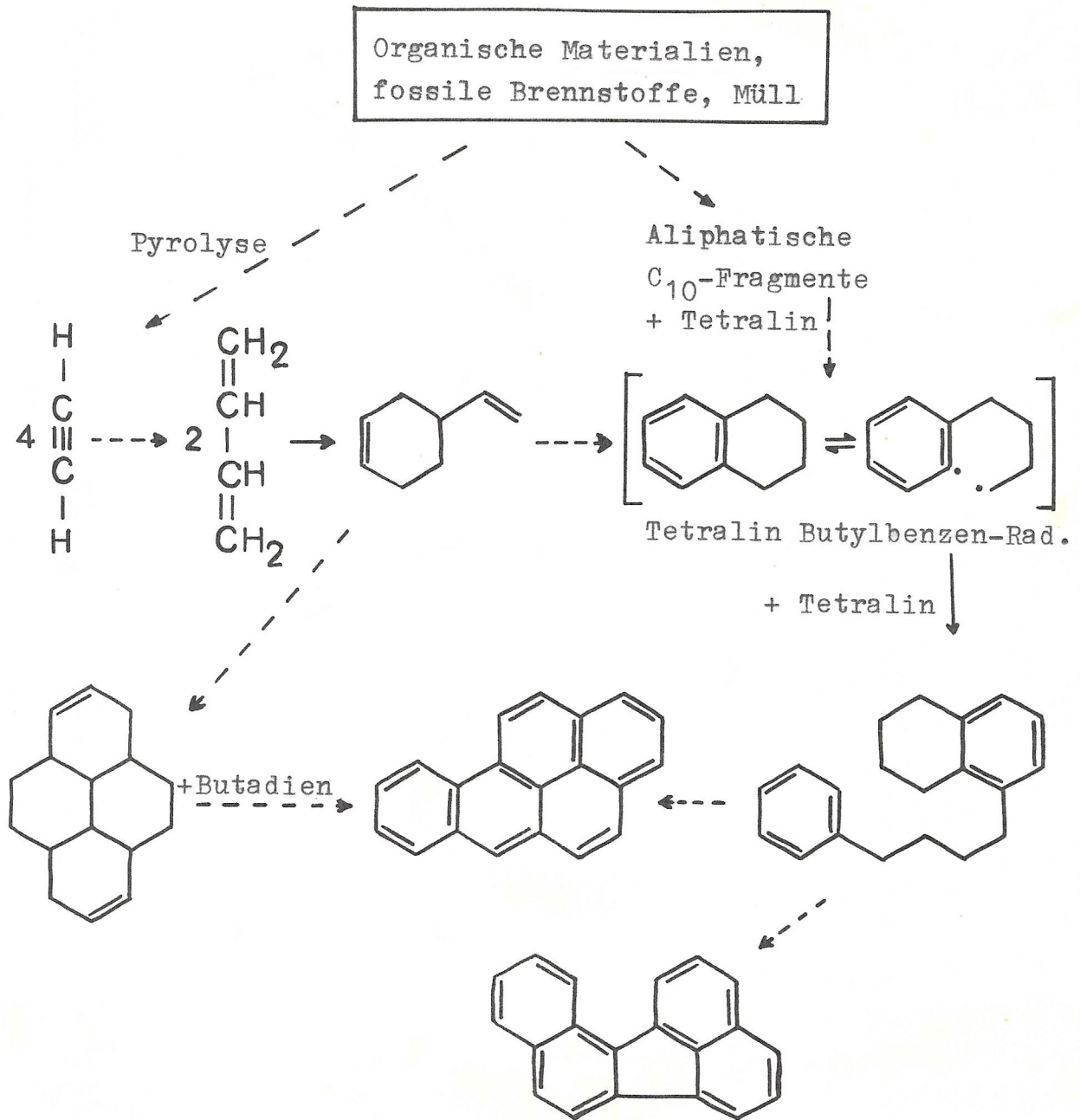


Abb. 2: Pyrolytische Bildung von Benzo[a]pyren und Benzo-[j]fluoranthen aus organischen Materialien nach Badger (17)

Acetylen und Butadien zunächst Vinylcyclohexan und dann Tetralin. Die C-C-Einfachbindungen des Tetralins werden dann zu einem n-Butylbenzenradikal gespalten, welches mit einem weiteren Molekül Tetralin zu 1-Phenyl-4-(1,2,3,4-tetrahydro-5-naphthyl)-butan reagiert. Nach Ringschluß und Dehydrierung erhält man Benzo[a]pyren und Benzo[j]fluoranthren (siehe Abb.2). Crittenden und Long (20) nahmen an, daß die Bildung von Benzo[a]pyren eher über Dihydronaphthalin als über Tetralin führt.

Die Umweltbelastung an emittiertem Benzo[a]pyren stammt hauptsächlich aus Verbrennungsvorgängen. Aus Emissionswerten schätzte Suess (21) die weltweite, durch Pyrolyse, BaP-Emission auf 5044 t/Jahr (bezogen auf 1966-69). Die Verteilung auf die einzelne Verbrennungsquellen setzt sich wie folgt zusammen (Tab. 1).

Emissionsquelle	BaP-Emission in t/Jahr
<u>Energieerzeugung aus:</u>	
Kohle	2376
Öl	5
Gas	3
Holz	220
<u>Industrielle Prozesse:</u>	
Koksproduktion	1032
Kat. Cracken	12
<u>Müllverbrennung und offene Feuer:</u>	
1.geschlossene Anlagen	
Industrielle Verbrennung	69
Andere	33
2.offene Feuer	
Kohleabbrand	680
Land- und Forstwirtschaft	420
Andere	148

Tabelle 1: Weltweite BaP-Emission nach Suess (21)

Emissionswerte von Benzo[a]pyren, die in den USA gemessen wurden (22), ergeben folgende Verteilung (Tab. 2):

Emissionsquelle	t/Jahr	%
KFZ-Verkehr (Benzin,Diesel)	22	1,7
Heizungen (Kohle,Öl,Gas,Holz)	475	38
Abfallverbrennung	563	45
Industrieanlagen	200	16

Tabelle 2: Die Gesamtemission von BaP in den USA beträgt ca. 1260 t/Jahr

Aus den Arbeiten von Grimmer (12) wird der Nachweis erbracht, daß die PAH im Verlauf des Verbrennungsprozesses entstehen. Bei der Verbrennung unterschiedlicher Substanzen unter identischen Bedingungen, entstehen identische oder sehr ähnliche PAH-Profile. Dieses Ergebnis wird auch von den Untersuchungen an Autoabgasen bestätigt: Das PAH-Profil in Kraftfahrzeugabgasen ist unabhängig vom Aromaten- und Olefingehalt des Treibstoffes (23, 24). Wenn man das im Kraftstoff enthaltene PAH-Profil mit dem PAH-Profil von Verbrennungsabgasen vergleicht, zeigen sich zwei grundsätzliche Unterschiede:

- a) Obwohl das PAH-Isomerenverhältnis in den Abgasen von gleicher Größenordnung ist, dominiert im Mineralöl immer ein Isomer (12).
- b) Es werden fünfiringhaltige Polycyclen nachgewiesen, die im Abgas nicht angetroffen werden (12).

Die BaP-Konzentration in der Atmosphäre ist:

- a) im Winter 5-10 mal höher als im Sommer
- b) in Städten 5-20 mal höher als auf dem Land
- c) in der BRD 5-10 mal höher als in den USA

Der in der BRD als "Orientierungsmarke" vorgeschlagene Übergangswert liegt bei 10 ng BaP/m³ Luft (Jahresmittelwert).

Für den Menschen, der in der Atmosphäre mit 10 ng BaP pro m³ Luft lebt, läßt sich berechnen, daß er im Laufe von 60 Jahren etwa 3 mg BaP inhaliert (25).

Eine Abschätzung der jährlich mit der Nahrung aufgenommenen BaP-Mengen wurde im Jahre 1971 von Fritz vorgenommen (26).

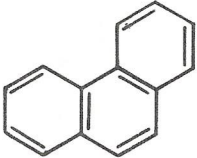
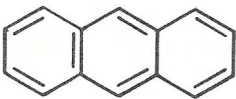
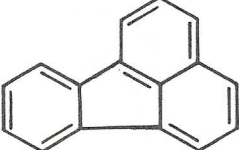
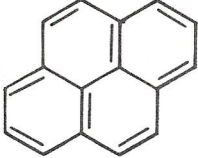
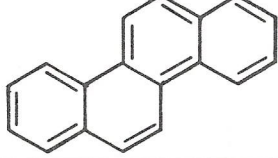
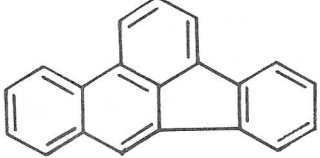
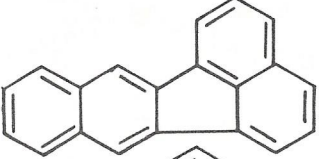
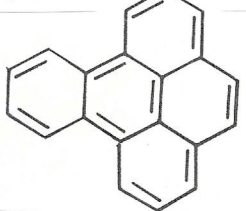
Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 70 Jahren würde ein Bewohner der DDR zwischen 24 und 85 mg BaP aufnehmen (siehe Tab. 3). Für die BRD läßt sich eine ähnliche Aufnahme berechnen.

<u>Brotgetreidemehl</u>	
unbehandelt industriefern	4,7
unbehandelt industrienahe	14,2
direkt getrocknet	28,4
<u>Gemüse</u>	
industriefern	8,4
industrienahe	41
<u>Obst</u>	
industriefern	1,1
industrienahe	7
Margarine	5,3
Pflanzl.Öle/Fette	1,4
Bohnenkaffee	0,05
Trinkwasser	0,5
Räucherwaren	1,9
Holzkohle gegrillte Produkte	0,3

Tabelle 3: Geschätzte pro Kopf mit der Nahrung aufgenommene BaP-Menge im Laufe von 70 Jahren in mg

Untersuchungen an Kolben- wie auch Turbinenbetriebenen Flugzeugen (27) ergaben, daß Abgase wie auch emittierter Rußschwarz Benzo[a]pyren beinhalten. Die Tests ergaben, daß ein Turbinen-Luftstrahl-Triebwerk, bei einer Drehzahl von 10500 Upm (Umdrehungen pro Minute), zwischen 2 und 4 mg/min BaP emittiert, wobei die Emission von einem Turbinen-Propeller-Triebwerk bei einer Drehzahl von 8000 Upm bei 4 mg/min BaP liegt. Die BaP-Konzentration steigt bei größeren Drehzahlen, höheren Temperaturen, sowie höherem Luft- und Brennstoffverbrauch und erreicht Werte die über 10 bzw. 8 mg/min BaP liegen, für Turbinen-Luftstrahl- und Turbinen-Propeller-Triebwerke jeweils.

Es muß hingewiesen werden, daß An- wie Abflug ein kleiner Bruchteil des Gesamtflugs eines Flugzeuges darstellt, wobei die Abgase in Höhen von ein paar Kilometer und über großen Flächen zerstreut werden. Manche dieser BaP-Mengen können unter Einfluß der Sonnenstrahlung, des Ozons oder anderer Agenzien zerfallen, aber ein großer Teil erreicht eventuell die Erdoberfläche als BaP oder als BaP-Zerfallsprodukte (27).

Verbindung Summenformel Massenzahl	Struktur	Schmp.	Sdp.	Biol.Akt.
Phenanthren $C_{14}H_{10}$, 178		101	340	-
Anthrazen $C_{14}H_{10}$, 178		217	340	-
Fluoranthren $C_{16}H_{10}$, 202		111	383	-
Pyren $C_{16}H_{10}$, 202		156	393	-
Chrysen $C_{18}H_{12}$, 228		256	441	+
Benzo [b] fluor- anthen $C_{20}H_{12}$, 252		168	481	++
Benzo [k] fluor- anthen $C_{20}H_{12}$, 252		217	481	++
Benzo [e] pyren $C_{20}H_{12}$, 252		179	493	-/+

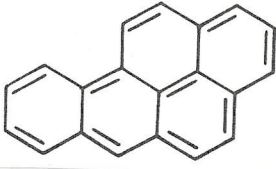
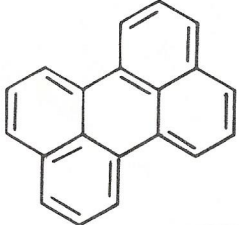
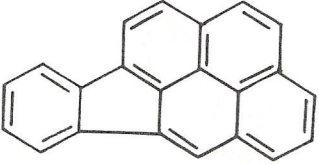
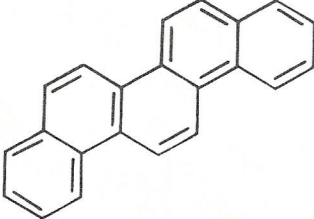
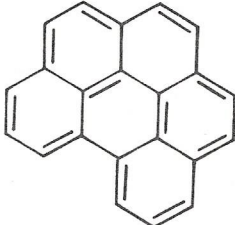
Verbindung		Schmp.	Sdp.	Biol.Akt.
Summenformel				
Massenzahl				
Benzo[a]pyren		117	496	++
$C_{20}H_{12}$, 252				
Perylen		278		-
$C_{20}H_{12}$, 252				
Indeno[1,2,3-cd]pyren				+
$C_{22}H_{12}$, 276				
Benzo[a]chrysen		368	519	-
$C_{22}H_{14}$, 278				
Benzo[ghi]perylen		278		+
$C_{22}H_{12}$, 276				

Abb. 3: Ausgewählte Eigenschaften von PAH. Biologische Aktivität (im Tierversuch ermittelt): ++ mäßig; + schwach; - nicht karzinogen

1.2 Aufgabenstellung

Die enorme Steigerung der Industrialisierung und Technisierung der letzten Jahrzehnte brachte eine Zunahme der Umweltbelastung mit sich. Eine Vielfalt an analytischen Methoden und Geräten wurden entwickelt, um die Größe dieser Belastung zu bestimmen.

Ausser anorganischen Substanzen wie Blei, Cadmium und Thallium und ihre Verbindungen, stellen polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) einen krebserzeugenden Risikofaktor dar.

Aus der Reihe der PAH wird das Benz[a]pyren unter dem Namen "Leitsubstanz" in Verbindung mit

- a) emittententypischer PAH
- b) Indikator für die Anwesenheit von PAH
- c) Indikator für den Gehalt an PAH in einer Probe wie auch als
- d) Indikator für die Kanzerogenität einer Probe verwendet.

Dem Benzo[a]pyren wird also eine besondere Rolle unter den PAH zugeschrieben, sodaß zahlreiche Arbeiten über seinen Abbau in Form der Lichteinwirkung wie auch unter Anwendung mikrobiologischer Systeme existieren.

Die Benzo[a]pyren-Belastung verschiedener Nahrungsmittel kann der nachstehenden Tabelle entnommen werden (28, 29, 30) (Tab. 4).

Nahrungsmittel	BaP µg/kg
Grünkohl	24,50
Salat	5,30
Tomaten	0,22
geräucherter Schinken	3,20

Tab. 4: BaP in Nahrungsmitteln (28, 29, 30)

Untersuchungen der Luft in Räucherungsanlagen zeigten eine Gesamt-PAH-Konzentration vom 0,133 bis 0,465 mg/m³ (31). Der Benzo[a]pyren-Anteil lag je Probe zwischen 0,009 bis 0,094% der PAH-Gesamtmenge (0,4 µg BaP/m³). Diese Ergebnisse verdeutlichen, in welchem Umfang geräucherte Fleischerzeugnisse, die über längere Zeit den Rauchgasen ausgesetzt werden, BaP anreichern können.

Untersuchungen an Pflanzen von verkehrsreichen Bereichen (z.B. Autobahn, Flughafen) zeigen höhere BaP-Konzentrationen als Pflanzen aus industriiefernen Regionen.

Im Auftrag der Stadt Filderstadt bei Stuttgart führte der Technische Überwachungs-Verein Stuttgart e.V. im Bereich des Flughafens Echterdingen-Stuttgart im Sommer 1986 (25) Wirkungsmessungen von Luftschadstoffen mit pflanzlichen Bioindikatoren durch. Das BaP wurde bei diesen Messungen als Leitsubstanz benutzt, wobei Durchschnittswerte von 2,3 (0,5-4,0) µg BaP/kg Frischgewicht ermittelt wurden. Als Bioindikatoren wurden Grünkohlpflanzen eingesetzt über einer Expositionszeit von 8 Wochen.

Grimmer und Hildebrandt (29) konnten feststellen, daß das Waschen des Grünkohls mit 20°C warmem Leitungswasser nur einen kleinen Teil der BaP-Gesamtmenge (ca. 16%) entfernt, wie zweimaliges gründliches Waschen ergab.

Die Photooxidation des Benzo[a]pyrens unter Lichteinwirkung führt (wie aus mehreren Arbeiten zu ersehen ist) zur Bildung seiner isomeren Dione (BaP-6,12-, BaP-1,6-, BaP-3,6-dion), die krebserregende wie auch toxische Eigenschaften besitzen. Es war interessant, die Zerfallsrate von Benzo[a]pyren auf Lebensmitteln (Pflanzen und geräucherte Fleischerzeugnisse) unter gleichzeitiger Bildung der drei isomeren Benzo[a]pyrendione bei Lichteinwirkung zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Gehalt verschiedener Nahrungsmittel (Salate, Rauchfleisch) an Benzo[a]pyren und der drei isomeren Dione (BaP-6,12-, BaP-1,6-, BaP-3,6-dion) ermittelt werden. Dabei waren für die verschiedenen

Materialien geeignete Verfahren bzw. Probenvorbereitungen für die spurenanalytische Erfassung der zu bestimmenden Substanzen auszuarbeiten. Im einzelnen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Überprüfung der Aufnahme des Benzo[a]pyren durch Pflanzen aus kontaminiertem Boden. Belastete Bereiche in der Nähe des Flughafens Echterdingen bei Stuttgart sollten auf BaP-Konzentrationen überprüft werden (bzw. BaP-dione).
2. Stabilitäts-Überprüfungen von Benzo[a]pyren an Pflanzen und geräuchertem Fleisch mittels Bestrahlung der Proben mit Sonnenlicht bzw. simuliertem Tageslicht. Bei diesen Untersuchungen sollte ausser die Zerfallsrate des Benzo[a]pyrens die prozentuale Entstehung der drei isomeren BaP-dione (BaP-6,12-, BaP-1,6-, BaP-3,6-dion) geprüft werden.
3. Derivatisierungsmöglichkeiten der BaP-dione, um ihre Identifizierung und Bestimmung zu erleichtern.
4. Untersuchungen pflanzlicher Proben aus belasteten Bereichen, wie die Autobahn-Raststätte Stuttgart und der Flughafen Echterdingen-Stuttgart. Ausser BaP sollte die BaP-dione-Konzentration der Proben untersucht werden.
5. Geräucherte Fleischerzeugnisse sollten auf die Anwesenheit der drei isomeren BaP-dione überprüft werden.
6. Mikrobiologische Abbau-Versuche des Benzo[a]pyrens.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1 Nomenklatur der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

Die Bezeichnungen der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe entsprechen den Vorschlägen der IUPAC (Union of Pure and Applied Chemistry), die heute allgemein verwendet werden.

An dieser Stelle soll die IUPAC-Nomenklatur kurz erläutert werden (32).

a) Erhaltung der Basiskomponenten

Als Basiskomponente wird die Komponente angesehen, die den größten Ring enthält. Beim Vorliegen eines Trivialnamens (nach IUPAC sind 35 Trivialnamen zulässig) wird als Basiskomponente der Polycyclus benutzt, der die meisten Ringe enthält.

b) Erhaltung der Präfixe

Die nachfolgende Präfixe werden beibehalten:

Acenaphtho-

Anthro-

Benzo-

Naphtho-

Perylo-

Phenanthro-

c) Bezifferung des Kohlenstoffskelettes

In einem Koordinatensystem wird der Polycyclus so geordnet, daß:

1. möglichst viele Ringe auf der Abszisse liegen
2. möglichst viele Ringe im 1. Quadranten liegen
3. möglichst wenige Ringe im 3. Quadranten liegen

Die Bezifferung wird im Uhrzeigersinn vorgenommen und beginnt am obersten rechtesten Ring, an dessen linkerster Position,

die keine Verschmelzungsstelle sein darf (Abb. 4).

d) Chiffrierung der Isomeren

Die Seiten der Basiskomponente werden im Sinne der Positionszählung 1, 2, ... mit den Buchstaben a, b, ... bezeichnet. Für die zugeordneten Sekundärkomponenten wird die übliche Bezifferung beibehalten. Die Verschmelzungsposition wird in eckiger Klammer zwischen die Bezeichnung der Teilstrukturen geschoben. Es gilt das Prinzip kleinster Chiffre. Bei der Benennung ist die erste unterscheidbare Position als Maßstab heranzuziehen. Die Ziffernabfolge richtet sich nach der Buchstabenfolge. Nach dem Einfügen einer Sekundärkomponente muß das entstandene Kohlenstoffgerüst neu beziffert werden (Abb. 5).

e) Bezifferung innerer Kohlenstoffatome

Die mehreren Ringen angehörenden Kohlenstoffatome werden indirekt durch Anfügen von a, b, ... an die Position des unmittelbar vorausgehenden Kohlenstoffs beziffert, wobei das Prinzip kleinster Zahlen anzuwenden ist. Innere Kohlenstoffatome werden von der höchstbezifferten Position fortlaufend mit a, b, ... im Uhrzeigersinn belegt (Abb. 6).

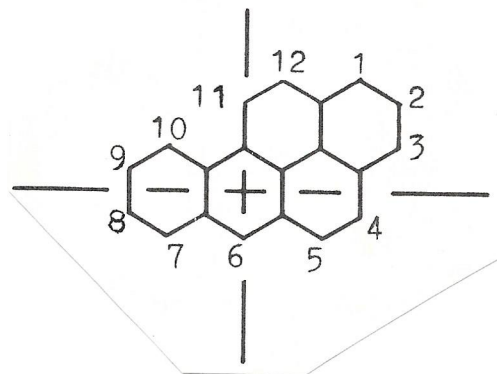


Abbildung 4: Bezifferung des Kohlenstoffskeletts

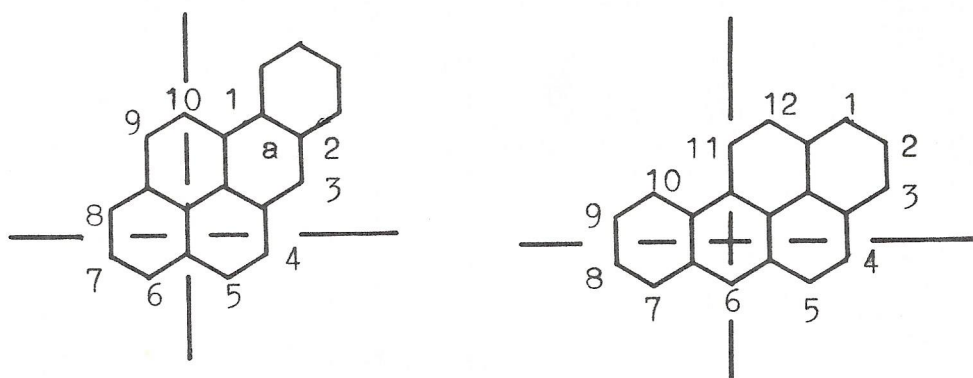


Abbildung 5: Chiffrierung der Isomeren

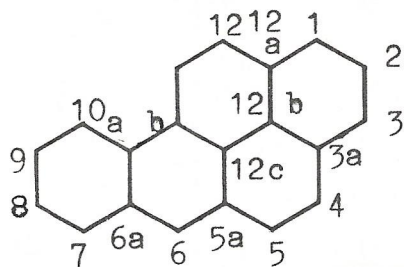


Abbildung 6: Bezifferung innerer Kohlenstoffatome

2.2 Biochemische Bildung von Benzo[a]pyren

Ob neben den Bildungsweisen, die in der Einleitung aufgeführt sind, auch eine Biosynthese in Mikroorganismen oder Pflanzen möglich ist, bleibt bis heute noch eine offene Frage. Als sicher zu sehen ist, daß bei einer eventuellen Biosynthese gebildete Mengen gegenüber den abiotisch gebildeten Mengen kaum ins Gewicht fallen.

Gräf und Diehl (³³) berichten über die Kultivierung einer bestimmten Anzahl von Roggen-, Weizen-, und Linsenkörnern in einer synthetischen Nährlösung, die auf Freiheit von PAH geprüft war. Sie stellten fest, daß in der gleichen Anzahl ungekeimter Körner einige PAH nur in äußerst geringer Mengen vorhanden waren, während in den getrockneten Sämlingen 10-20 ppb BaP gefunden wurden. Sie berichten aber in der Versuchsbeschreibung nicht, ob sie PAH-Verunreinigungen durch die Luft ausgeschlossen haben.

In Untersuchungen von Grimmer (³⁴) mit in Klimakammern aus Samen gezogenem Roggen, Salat, Tabak oder Sojapflanzen, zeigten sich nach 6-12 Wochen keine nachweisbaren Spuren von BaP. Voraussetzung für die Abwesenheit von PAH ist die Filtration der Zuluft durch eine Spezialfilterkombination, sowie das Betreten der Kammer durch eine Luftschleuse und der Wechsel der Arbeitskleidung in der Schleuse, die eine Kontamination aus der Luft ausschliessen.

Über die biochemische Synthese von BaP durch *Chlorella vulgaris* berichtet Borneff (³⁵). Diese Algen wurden in neutralem synthetischem Nährmedium gezüchtet mit ¹⁴C-Acetat als einzige Kohlenstoffquelle, und erwiesen nach der Extraktion eine 10-fach höhere Aktivität an ¹⁴C-markiertem BaP als die der Kontrollkulturen. Zweifel an diesen Ergebnissen bringen die ungenauen Versuchsangaben wie z.B. welche Aktivität an ¹⁴C-Acetat insgesamt eingesetzt wurde. Das isolierte BaP wurde nur in sehr geringer Aktivität festgestellt, wobei es sich um verschleppte Aktivität handeln könnte.

Untersuchungen (³⁶), die sich mit dem Pigment in der Cutis des Meereswurmes *arenicolora marina* beschäftigten, ergaben anhand der massen- und NMR-spektroskopischen Daten dieses Farbstoffes sowie von Derivatisierungen, daß es sich bei Arenichromin um 2,4,5-Trihydroxy-10-methoxybenzo[a]pyren-6,12-chinon handelt (Abb. 7).

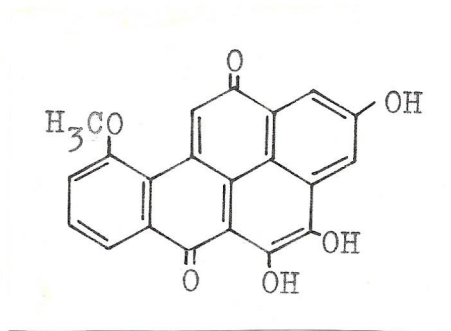


Abbildung 7: Arenichromin aus *arenicolora marina* (cutis)

Allerdings verweisen die Autoren auf einen Gehalt des Meeresandes von etwa 0.12 ppb an BaP, woraus sie schlossen, daß Akkumulation von BaP in *a.marina* mit nachfolgender metabolischer Derivatisierung wahrscheinlicher ist als vollständige de novo Synthese des zugrundeliegenden Polycyclus.

Gräf und Nowak (³⁷) bezeichneten einige PAH, wie Benzo[a]-anthrazen, Indeno[1,2,3-cd]pyren und Benzo[a]pyren als Pflanzenwuchsstoffe. Ihre Versuche, die unter Verwendung dieser Substanzen mit Polyäthylenglykol im Gießwasser als Lösungsvermittler durchgeführt wurden, ergaben eine wachstumsfördernde Wirkung. Für Benzo[a]pyren war diese Wirkung am stärksten. Bei Tabakpflanzen wurde das Wachstum nach diesen Autoren auf das doppelte verstärkt.

Eigene Untersuchungen die an Kopfsalatsetzlingen durchgeführt wurden, haben keine derartige Ergebnisse erbracht. Die Probenpflanzen wurden in der Nähe der Wurzel wie auch bei anderen

Proben an der Erdoberfläche kontaminiert. Es wurde eine 1,2 mM BaP Lösung in Methanol verwendet, die mit $[7,10-^{14}\text{C}]$ -Benzo[a]pyren radioaktiv markiert war (molare spezifische Aktivität: $1 \cdot 10^8$ Bq/mmol). Jede Probe wurde direkt nach dem Anpflanzen mit 2 ml dieser Lösung kontaminiert. Die in der freien Luft kultivierten Pflanzen wurden jeden 2. Tag mit Leitungswasser gegossen und nach 5 Wochen geerntet. Während der ganzen Wachstumsperiode haben sowohl die an der Wurzel, wie auch die an der Erdoberfläche behandelten Proben keinen merklichen Wachstumsunterschied gegenüber den Kontrollpflanzen gezeigt. Es muß hingewiesen werden, daß die Versuchspflanzen nur ein Mal mit BaP behandelt wurden, wobei Gräf (37) eine regelmäßige Behandlung mit BaP erwähnt. Die Extraktion (siehe exp. Teil) der Blätter und der Stämme haben gezeigt, daß keine BaP-Aufnahme durch die Pflanzen nachgewiesen werden kann. Die ausgewählten Versuchsbedingungen würden eine mögliche Aufnahme von BaP auch in Form eventueller Metaboliten nachweisen, wobei die Radioaktivitätsüberprüfung eine solche Annahme nicht zuläßt.

2.3 Effekt der Sonnenlichtbestrahlung an BaP

In den letzten Jahren wird ein größeres Interesse am Abbau-Mechanismus von PAH registriert, weil der Verdacht nahe liegt, daß Abbauprodukte stärkere Mutagene sind und deswegen größere potentielle Risiken für den Menschen darstellen als Stammkörper der PAH.

BaP zerfällt, unter atmosphärischen Bedingungen mit simulierter Sonnenlichteinwirkung, mit einer Halbwertszeit von $T_{1/2}=5,3$ Stunden. Die zusätzliche Einwirkung von Ozon im Dunkeln ($T_{1/2}=0,62$ Stunden) und die Beschleunigung der Photolyse mit simuliertem Sonnenlicht beim Vorhandensein von Ozon ($T_{1/2}=0,58$ Stunden), läßt eindeutig erkennen, daß dem BaP-Zerfall eine radikalische Oxidation zugrunde liegt. Die Untersuchungen (³⁸) haben gezeigt, daß die Existenz von Luft oder Sauerstoff für eine BaP-Photolyse notwendig ist, wobei unter Stickstoffatmosphäre das BaP sich als stabil erweist.

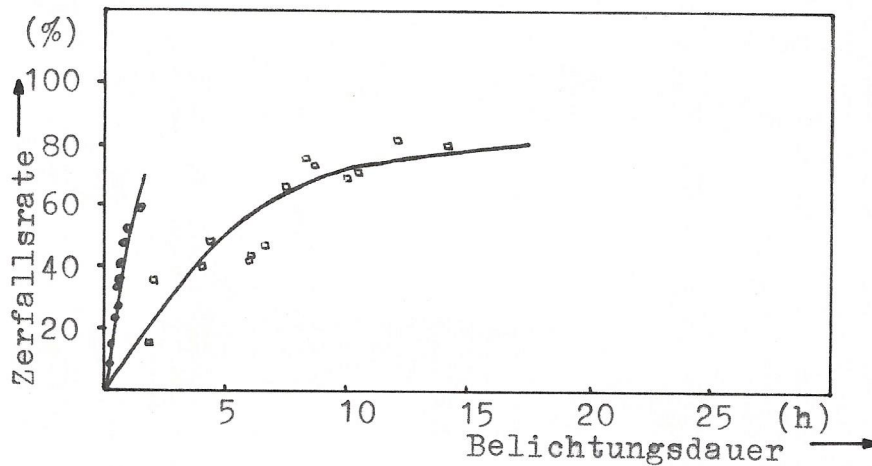


Abb. 8 : Zeitliche Zerfallsrate von BaP mit simuliertem Sonnenlicht (□) und mit simuliertem Sonnenlicht unter Einwirkung von 0,2 ppm Ozon (○) nach Katz (³⁸), auf Dünnschichtplatten.

An BaP, das auf luftgetragenen Schwebstoffen (Airborne Particulate Matter -APM-) wie Rußschwarz adsorbiert war, wurde von Valerio (148) der Effekt der Photolyse durch Sonnenlichtbestrahlung untersucht (Abb. 9).

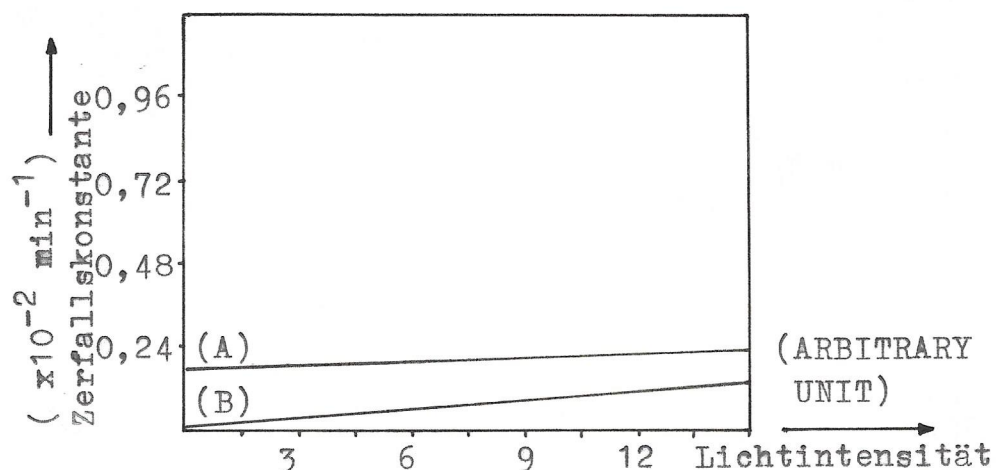


Abb. 9: Zusammenhang der Zerfallskonstante von BaP und der durchschnittlichen Sonnenstrahlungsintensität, nach Adsorption an APM (148). Unbehandeltes APM (A), mit Cyclohexan extrahiertes APM über 12 Stunden (B)

Das BaP erweist sich als stabiler, wenn das APM mit Lösungsmitteln vor der Adsorption extrahiert wird. Die Untersuchungen zeigten, daß auch die Ozon-Konzentration in Rechnung gezogen werden muß: Die Zerfallsrate von BaP war höher an den Tagen wo auch eine höhere Ozon-Konzentration registriert wurde. An Flugasche dampfadsorbiertes BaP erwies sich stabil gegenüber der Photolyse mittels Sonnenlichtstrahlung (149). Der prozentuale Zerfall an BaP nach 3,8 stündiger Sonneneinstrahlung betrug 17%, wobei nach dem gleichen Verfahren behandelte Flugasche, die sich 190 Stunden im Dunkeln befand, einen Zerfall von 11% zeigte. Es ist daher anzunehmen, daß das Licht eine kleinere Rolle beim Zerfall von Flugascheadsorbiertem BaP spielt.

2.4 Mechanistische Übersicht der BaP-Oxidation

Bei der Oxidation von BaP, wie auch im Verlauf des metabolischen Stoffwechselweges entstehen zum Teil identische Produkte. Der Zusammenhang hierfür ist dadurch gegeben, daß zur Oxidation von BaP Luftsauerstoff notwendig ist (38, 39). Nach der Vermutung, daß bei Versuchen, die den metabolischen Abbau von BaP zum Inhalt haben, infolge von Lichteinwirkung Photooxidationsprodukte entstanden sein könnten, konnte Devdariani (84) zeigen, daß auch bei vollständigem Lichtausschluß keine unterschiedlichen Stoffwechselprodukte nachzuweisen waren. Die vom Jeftic (40) durchgeführte anodische Oxidation von BaP an Pt-Elektroden in verschiedenen Lösungsmitteln (Acetonitril, Dimethylformid, Propylencarbonat und Nitrobenzol) zeigte in allen Lösungsmitteln ein identisches BaP-Verhalten und ein Oxidationspotential von ca. +1,2 V. Die elektrochemische Oxidation von BaP erwies sich als eine Einelektronoxidation, in deren Verlauf BaP zu einem Benzo[a]pyrenradikalkation oxidiert wird.

Der Nachweis des Benzo[a]pyrenradikalkations konnte wegen der schnellen Folgereaktion mittels ESR nicht gelingen.

Untersuchungen von Cavalieri (41), die chemische und biochemische Experimente beinhalten, bekräftigen die Einelektronoxidations-Theorie unter Bildung des BaP-Radikalkations.

Unter Verwendung von Jod wurde BaP in Gegenwart von AgClO_4 , unter Argon-Atmosphäre oxidiert. Das BaP-Radikalkation (als $\text{BaP}^+ \cdot \text{ClO}_4^-$) konnte mittels ESR charakterisiert werden.

Eine große Bedeutung wird dem C_6 -Atom im BaP-Radikalkation zugeschrieben. Nach HMO-Berechnungen liegt hier die reaktivste Stelle vor (40). Es sind deswegen Folgereaktionen an diesem Kohlenstoff zu erwarten.

Es wurde bisher gezeigt, daß die C_6 -Position sowohl gegenüber Substitutionsreaktionen, als auch hinsichtlich eines Wasserstoffaustauschs die reaktivste Stelle im BaP-Molekül ist (42).

Wie Elektronendichteberechnungen für das BaP-Molekül belegen, ist die Reaktivität der Positionen C₆, C₁, C₃ und C₁₂ gegenüber elektrophiler Substitution, in absteigender Reihenfolge begünstigt (43).

Eine der angenommenen Folgereaktionen des BaP-Radikalkations ist die Dimerisierung, wobei das 6-(6'-Benzo[a]pyrenyl)benzo[a]pyren entsteht (40). Die Identifikation erfolgte anhand des charakteristischen Fluoreszenzspektrums im Vergleich zu einem präparativ gewonnenen Produkt. Höhere Polymerisationsprodukte konnten nicht identifiziert werden.

Ein Hauptteil des BaP-Radikalkations unterliegt einem anderen Reaktionweg als dem des BaP-Dimers. Das wesentliche Intermediärprodukt ist das 6-OH-BaP, das durch nukleophilen Angriff von Wasser (aus dem Lösungsmittel) an das Radikalkation entsteht (40). Bei diesem Schritt der elektrochemischen Oxidation erfolgt eine Einelektronoxidation. Die weitere Oxidation des 6-OH-BaP führt zum 6-Oxo-benzo[a]pyren-Radikal. Weiterer nukleophiler Angriff von Wasser erzeugt drei isomere Dihydroxy-benzo a pyrene:

- a) 1,6-Dihydroxy-benzo[a]pyren
- b) 3,6-Dihydroxy-benzo[a]pyren
- c) 6,12-Dihydroxy-benzo[a]pyren

Aus diesen leicht oxidierbaren Substanzen entstehen in Analogie zu den Chinon-Hydrochinon-Redoxpaaren (44):

- a) Benzo[a]pyren-1,6-dion
- b) Benzo[a]pyren-3,6-dion
- c) Benzo[a]pyren-6,12-dion

Besonders interessant erscheint das 6-OH-BaP, das als intermediäres Oxidationsprodukt sowohl bei der elektrochemischen Oxidation von BaP (40), bei der Autoxidation (44) als auch als Metabolit der enzymatischen BaP-Oxidation (45) nachgewiesen wurde.

Wie bei der elektrochemischen Oxidation erwähnt, so entsteht auch bei der Autoxidation von 6-Oxo-BaP, das 6-Oxo-BaP-Radikal, das durch sein ESR-Signal im Verlauf der Reaktion identi-

fiziert werden konnte (44).

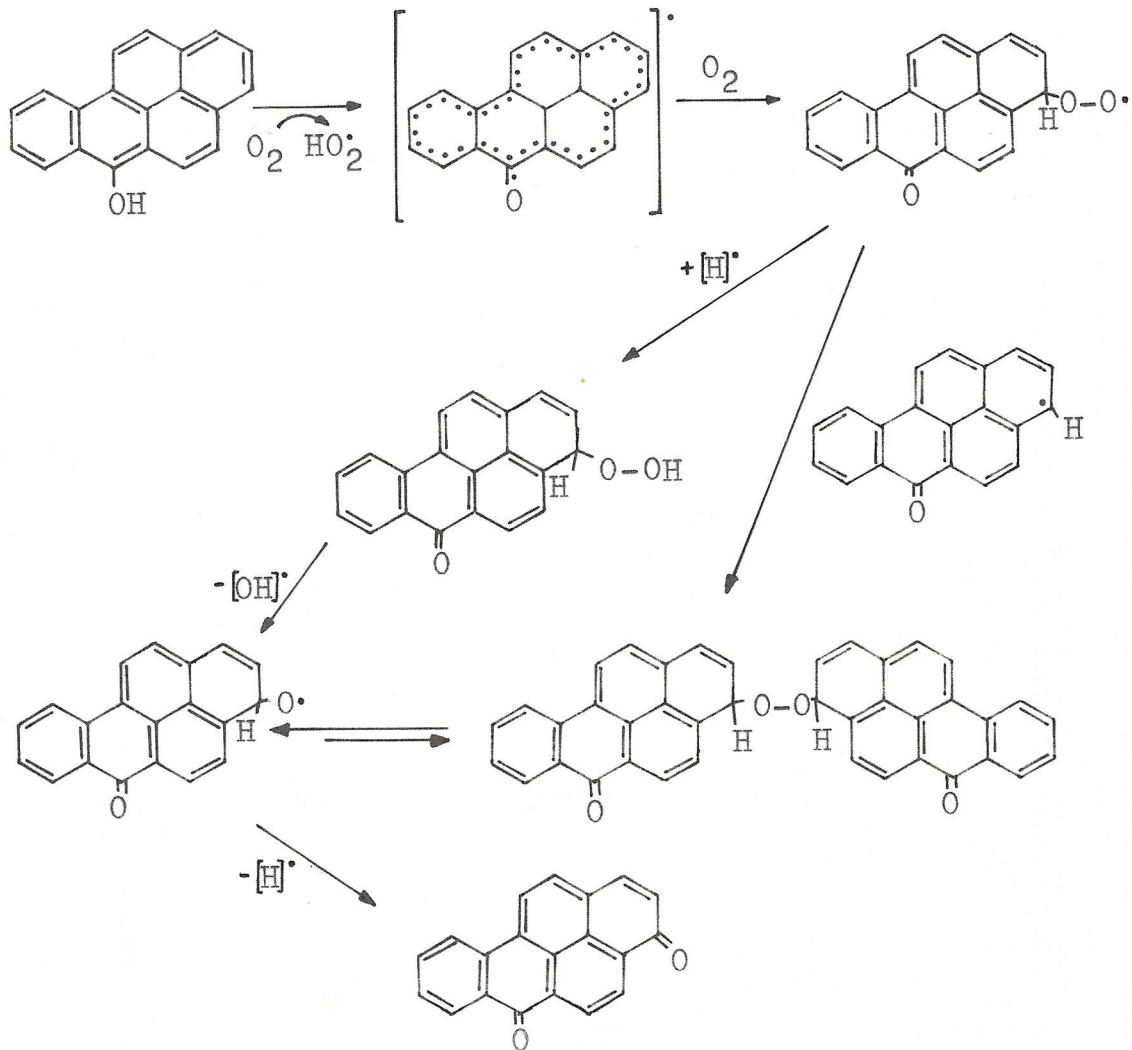


Abb. 10: Reaktionsmechanismus der Autoxidation von 6-OH-BaP, am Beispiel der Bildung von BaP-3,6-dion nach Lorentzen (44)

Cerniglia und Gibson (46) konnten mit *Cunnighamella elegans* in einer 96 Stunden-Periode 18,4% des eingesetzten BaP metabolisieren und den metabolischen Ablauf verfolgen (Abb. 12).

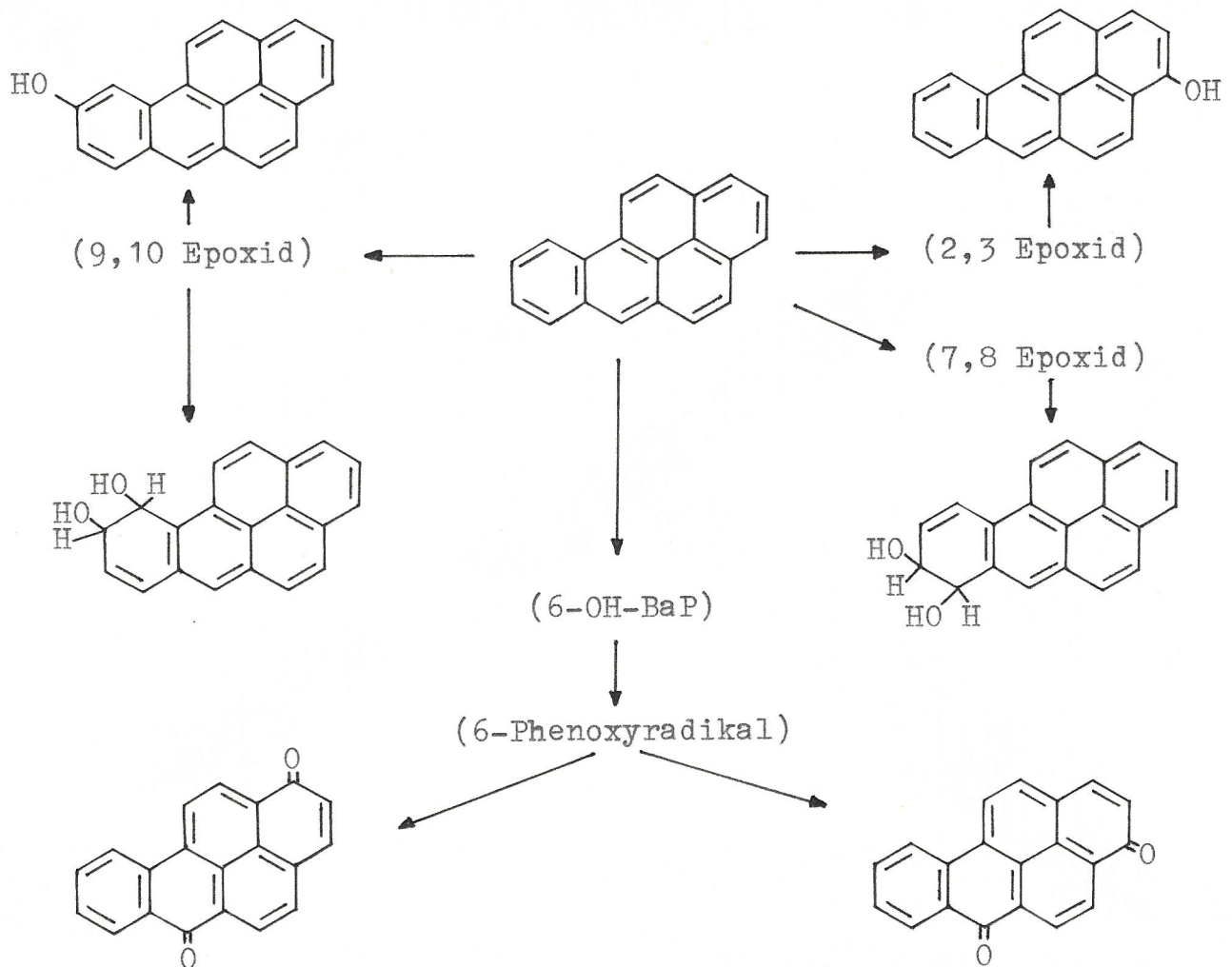
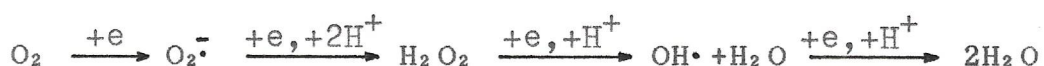


Abb. 12: Mechanismus der BaP-Metabolisierung durch *C. elegans*. Die in Klammern stehenden Verbindungen wurden nicht isoliert (46).

Während die Autoxidation des 6-OH-BaP durch Einelektronen Transfer (mit freien Radikal-Zwischenstufen) erfolgt, sind die Mechanismen der Autoxidation von Phenol-Verbindungen komplex.

Wenn Molekularer Sauerstoff als ein Elektron- oder Wasserstoff-Akzeptor fungiert, erfolgt seine Reduktion nach dem Schema:



Wegen der Überführbarkeit der verschiedenen Derivate elementaren Sauerstoffs werden alle drei reaktiven Intermediärprodukte (Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal) gleichzeitig gebildet. Durch spontane Dismutation des Superoxidradikalanions wird reaktiver Singulett-Sauerstoff gebildet.

Die Aussagen, die Jeftic (40) aus der anodischen Oxidation von BaP gewann, konnten zu einem mechanistischen Modell für die Oxidation von BaP helfen, das auch durch den Nachweis identischer Produkte bei der Autoxidation von 6-OH-BaP bestätigt wurde (44).

Enzymatische Oxidationssysteme liegen diesem Reaktionsmechanismus nahe.

In der Gallenflüssigkeit von Ratten konnte von Falk (48) das Produkt 6-OH-BaP-Glucuronid nachgewiesen werden, nachdem Ratten intravenös [¹⁴C]-BaP injiziert wurde. Dieses stabile Folgeprodukt signalisierte die Existenz des 6-OH-BaP im Ablauf der enzymatischen Oxidation.

Die isomeren Photooxidationsprodukte von BaP (BaP-dione) verhalten sich unterschiedlich unter Einfluß einer weiteren Photooxidation. Tebbens (49) beschreibt in einem Reaktionsschema (Abb. 13) die weitere Photooxidation des BaP-1,6- und BaP-3,6-dions unter Bildung von Benzo[a]pyrensäure, wobei das BaP-6,12-dion nicht in der Lage ist, dieses Produkt aufzuweisen. Die Reaktion verläuft unter Benzo[a]pyrensäurean-

hydrid-Bildung, das aber nicht nachgewiesen werden konnte.

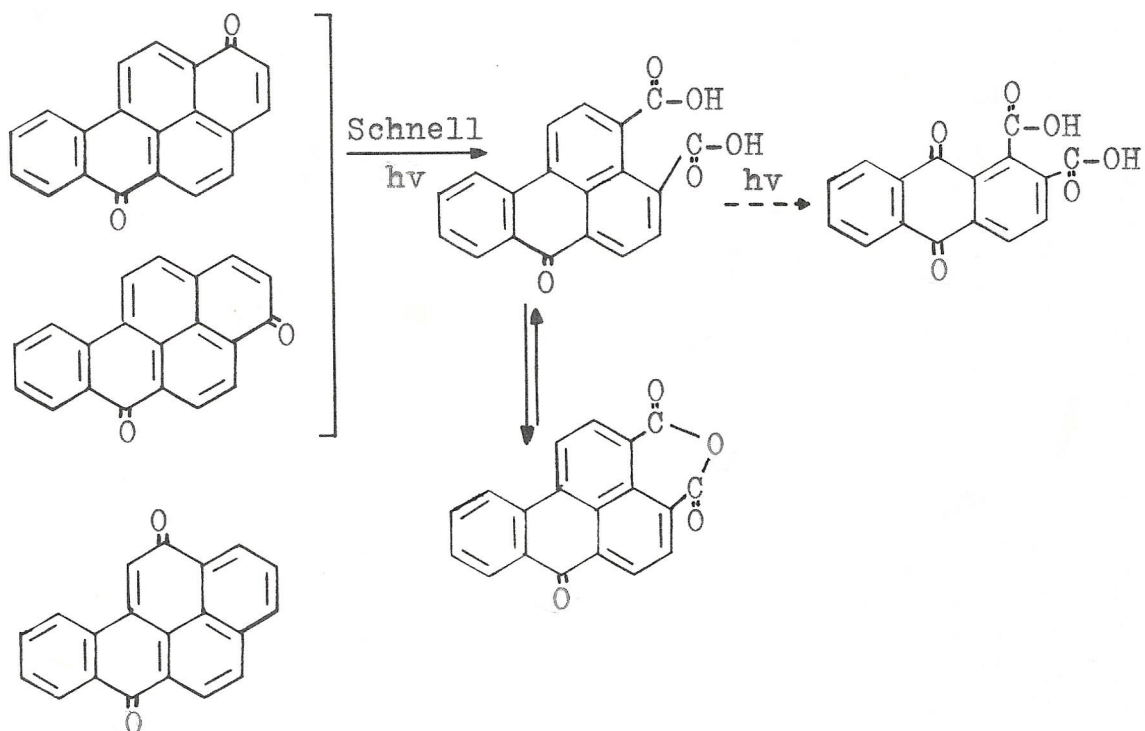


Abb. 13: Reaktionsschema der Photooxidation von Benzo[a]-pyren-dionen nach Tebbens (49). Die Anthrachinon-1,2-dicarbonsäure wurde nicht gefunden.

2.5 Kanzerogenität des Benzo[a]pyrens und seiner Oxidationsprodukte

Pullmann und Pullmann (50) haben den ersten Versuch gemacht, chemische Struktur und krebserregende Wirkung miteinander zu korrelieren. Danach ist eine sogenannte "K-Region" mit hoher Elektronendichte für die kanzerogene Wirkung eines Kohlenwasserstoffs verantwortlich, wie bei BaP eine existiert (Abb. 14).

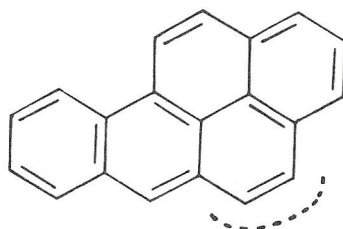


Abb. 14: "K-Region" des BaP

Bindungsstudien mit Nucleinsäuren, bakterielle und tierische Mutationstests, Transformationen in Zellkulturen und in vivo-Kanzerogenese-Studien des BaP ergaben (52), daß nicht die "K-Region", sondern der anellierte Benzolring für die krebserregende Wirkung von BaP von Bedeutung ist.

Unter Beteiligung von Cytochrom P 450 (im endoplasmatischen Reticulum der Zelle) wird der Aromat zum Arenoxid oxidiert, das mit dem Enzym Epoxidhydratase in das Dihydrodiol überführt wird. Erneute Epoxidierung dieses proximalen Kanzerogens mit Cytochrom P 450 führt zum ultimalen Kanzerogen, dem Diol-Epoxid, das mit den zellulären nucleophilen Basen kovalent unter Öffnung des Epoxidrings reagiert (51) (Abb. 15). Dieses Diolepoxid reagiert bevorzugt mit der freien Amino-Gruppe des Guanins (Abb. 16).

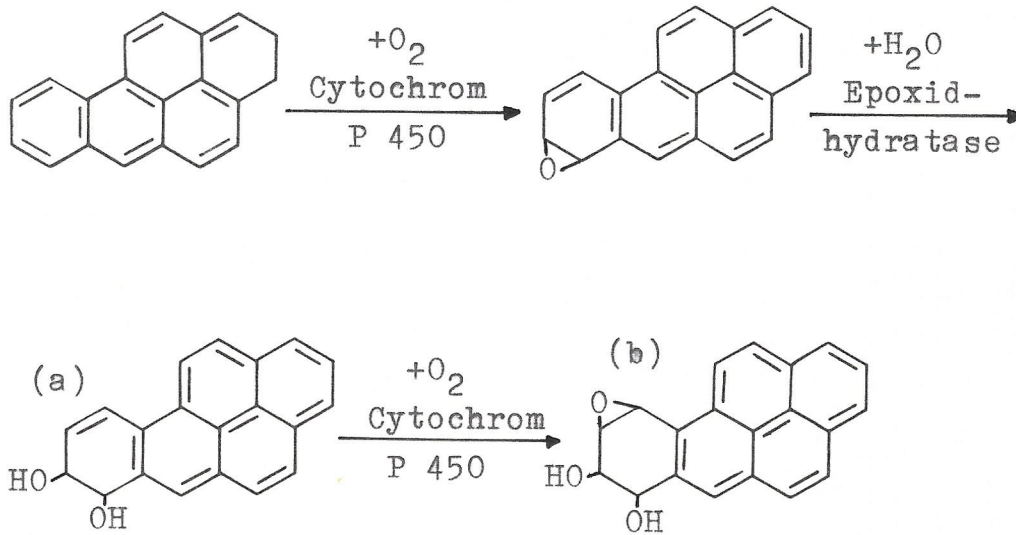


Abb. 15: Bildung des proximalen (a) und ultimalen (b) Kanzerogens von BaP (51)

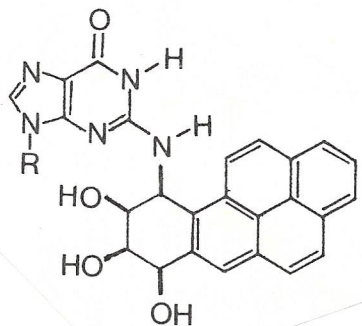


Abb. 16: Di-epoxid-Addukt an einem Guanin-Baustein von Nucleinsäure

Versuche mit Poly-Cytidin, -Uridin und -Adenosin verliefen negativ. Wahrscheinlich ist dies nicht die einzige Störung in der Zell-Information.

Detoxifizierungsreaktionen, die dazu parallel ablaufen (⁵²), überführen die proximalen und ultimalen Kanzerogene in Phenole, Glutathionaddukte oder Tetrole. Es stellte sich heraus, daß das (-)-Enantiomere des BaP-7,8-Dihydrodiols (Abb. 15a) für die Tumorbildung in Mäusen verantwortlich ist und das Enantiomere BaP-7,8-diol-9,10-oxid (Abb. 15b) der vier möglichen Diolepoxide des BaP das stärkste Mutagen und Kanzerogen ist.

Ein Paradoxon der Natur ist zu erwähnen:

Der oxidative Metabolismus chemischer Fremdstoffen durch Lebermikrosomen ist ein lebensnotwendiger Detoxifizierungsvorgang. Jedoch aber macht derselbe Abbau aus den chemisch inertesten Kanzerogenen, die endgültigen Krebsinduzierenden Metaboliten. Die beiden dafür verantwortlichen Enzymsysteme, Cytochrom P 450 und Epoxidhydratase, arbeiten beim Abbau des BaP dann stereospezifisch so zusammen, daß selektiv von allen möglichen Metaboliten das stärkste Kanzerogen gebildet wird.

Leadon (⁵³) zeigte bei Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung von BaP mit HMEC (human mammary epithelial cells), daß reaktive Sauerstoffderivate sich bildeten, die eine indirekte Zerstörung in der DNA zur Folge hatten. Thyminglykol ist einer der indirekten Zerstörungstypen, die von Leadon gemessen wurden. Diese Zerstörung war gleich oder größer, als die Menge der direkten DNA-Addukte nach Behandlung mit dem Karzinogen.

Es wäre möglich, daß die indirekte Wirkung von BaP durch aktive Sauerstoffderivate und andere freie Radikale, die durch die Autoxidation des primären BaP-Metabolites 6-OH-BaP entstehen, vermittelt wird. In jedem Fall scheint, daß die cytotoxischen Effekte von BaP relativ zur Bildung von reaktiven Sauerstoffderivaten und der indirekten Zerstörung

stehen.

Während die meisten biologischen Effekte von ionisierenden Strahlungen durch Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies vermittelt werden, liegt die Menge des Thyminglykols, die nach Behandlung von HMEC mit BaP gebildet wird, 10-fach höher als die einer vergleichbar toxischen Rate von γ -Strahlen.

Aus heutiger Sicht ähneln die Produkte des photoinduzierten Abbaus von BaP stark denen der metabolischen Verstoffwechslung. Während die Produkte des Metabolismus hinsichtlich ihrer blasmogenen Wirkung bewertet wurden, sind die blasmogenen Eigenschaften der BaP-Photooxidationsprodukte noch unbekannt und können nur durch Experimente an Lebewesen zuverlässig beantwortet werden.

Gubergric (54), beschäftigte sich mit der karzinogenen Aktivität des gesamten Produktionsgemisches aus der Bestrahlung von Benzo[a]pyren, wobei als Versuchstiere Mäuse dienten. Es zeigte sich, daß die Kanzerogenität der eingespritzten Lösungen (in Olivenöl) vom darin enthaltenen übrigen BaP abhängig waren. Er kam zur Schlußfolgerung, daß der photooxidative Abbau, am Beispiel von BaP, als Mittel zur Detoxifikation von PAH in der Umwelt eingesetzt werden kann.

Dadurch wurden die Ergebnisse von Berenblum (55) bestätigt, dessen Versuche im Hinblick auf die Auslösung von Tumoren für das 6-OH-BaP eine geringe tumorerzeugende Wirkung aufwiesen, während BaP-3,6-dion inaktiv war. Im Gegensatz dazu wird von Katz (38) berichtet, daß bei der Untersuchung von PAH auf ihre Mutagenität gegenüber salmonella typhimurium (Ames-Test), die drei isomeren BaP-dione (BaP-6,12-dion, BaP-3,6-dion, BaP-1,6-dion) direkt wirkende Mutagene waren, während die BaP-Phenole erst nach Aktivierung mutagene Wirkung zeigten. Wislocki (57) beobachtete schwache Mutagenität der drei isomeren BaP-dione, aber keine mutagene Wirkung gegenüber Hamsterzellkulturen. Lorentzen (56) beobachtete die starke Cytoxizität aller drei BaP-chinone, die auf der leichten Reduzierbarkeit unter anaeroben Bedingungen mit

schwachen biologischen Reduktionsmittel (NAD(P)H, Glutathion) beruht. Die bei der Reduktion gebildeten BaP-chinole, werden unter Einwirkung von Luftsauerstoff zu BaP-chinonen oxidiert. Die RNS-Syntheserate wird in Tests mit Hamsterzellen kurz nach Behandlung mit BaP-1,6-dion und BaP-3,6-dion erheblich herabgesetzt. Dabei entstehen nennenswerte Mengen von Wasserstoffperoxid und wahrscheinlich noch weitere reaktive Sauerstoffderivate (58).

Sowohl BaP-phenole wie auch BaP-dione besitzen eine kleine Eigenaktivität und könnten mit Stickstoffbasen unter Bildung von Schiff-basen reagieren zu kovalenten Verbindungen mit der DNA (57).

Es wäre abschliessend zu erwähnen, daß die kleine oder unbedeutende mutagene Aktivität von manchen BaP-derivaten keine Ausnahme in der Regel der kanzerogenen Wirkung von BaP bilden. Es wäre möglich, daß manche dieser Metaboliten eine fördernde Funktion besitzen oder eine Modifizierung des in vivo Metabolismus bewirken, sodaß der polycyclische Grundkörper oder das proximale Kanzerogen zum ultimalen Kanzerogen wird. Ferner könnten schwach mutagene oder inaktive Verbindungen weiter-metabolisieren zu reaktiven mutagenen oder kanzerogenen Spezies. Ein Beispiel dafür bietet Benzo[a]pyren-7,8-oxid und Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol (57).

2.6 Rußschwarz, Aktivkohle

Grimmer (59) untersuchte Ruß aus der Absauganlage eines Straßentunnels als Charakteristikum für die PAH-Emission von Kraftfahrzeugen. Er verwendete Methanol, Methanol + 10% Wasserzusatz, Benzol, sowie Dimethylformamid als Extraktionsmittel.

Meier zu Köcker (13) führte Untersuchungen von Adsorbaten aus dem Ruß eines Ölvergaserbrenners durch. Die Bestimmung der PAH erfolgte nur halbquantitativ, wobei keine Zahlenwerte angegeben wurden. Zur Anreicherung des Rußextraktes (Cyclohexan, Benzol) wurden die Inhaltsstoffe an einer Silicagelsäule mit einer Reihe von Lösungsmitteln zunehmender Polarität getrennt und die Aromatenfraktion durch Papierchromatographie und UV-Betrachtung analysiert.

Sprengler (60) untersuchte den Ruß, der bei der Verbrennung von n-Hexan und Dieselkraftstoff in einem Versuchsbrenner entstanden war. Der Ruß wurde mit n-Heptan extrahiert und teilweise gaschromatographisch an gepackten Säulen, oder nach Trennung an einer Aluminiumoxidsäule UV-spektrophotometrisch auf den PAH-Gehalt untersucht.

Bei Untersuchungen von Ruß, der bei der direkten Trocknung von Körnerfrüchten mit ölbeheizten Anlagen in der Brennkammer niederschlägt, wurde die zu analysierende Probe in einem Soxhletextraktor mit Aceton behandelt und nach Wasserzusatz mit Cyclohexan extrahiert (61). Nach flüssig-flüssig-Verteilung und Säulechromatographie an Silicagel wurden die PAH gaschromatographisch an einer Glaskapillare SE 54 Trennsäule qualitativ und quantitativ untersucht.

In Untersuchungen von Gharaibeh (150) an Ruß von Kerosin- und Dieselmotoren wurde die Rußprobe mit Methanol gerührt, filtriert, mit DC-Platten chromatographiert und mit der HPLC analysiert (stationäre Phase: RP18, mobile Phase: Acetonitril/Wasser 75/25).

Shabad (27) untersuchte Proben des Rußabscheiders eines Meß-

stands-Auspuffsystems für Flugzeug-Triebwerke. Turbinen-Propeller-Triebwerke und Turbinen-Luftstrahl-Triebwerke ergaben jeweils 30 und 27 mg BaP pro kg Ruß. Die Rußproben wurden im Soxhlet mit Benzol extrahiert.

Bei den Untersuchungen von Valerio (148) über den photooxidativen Zerfall des rußadsorbierten BaP wurde als Extraktionsmittel Cyclohexan benutzt mit einer angegebenen Wiederfindungsrate von 100%. Die anschließende quantitative Analyse wurde gaschromatographisch durchgeführt.

Tebbens (49) untersuchte den photooxidativen Abbau von BaP über die isomeren BaP-dione bis zur 7H-Benz[d,e]anthrazen-7-on-3,4-dicarbonsäure (BaP-säure) anhand der BaP Adsorption auf Ruß. Als Extraktionsmittel für das BaP wurde Benzol verwendet mit einer Wiederfindungsrate von 80%. Die isomeren BaP-dione wurden anschliessend im Sauren mit Ether extrahiert. Die Wiederfindungsraten sind wie folgt angegeben:

BaP-1,6-dion	39%
BaP-3,6-dion	53%
BaP-6,12-dion	44%

Pulverförmige Aktivkohle besitzt eine schwammartige Sekundärstruktur aus kleinsten Graphit-Kristalliten, die durch amorphen Kohlenstoff dreidimensional miteinander verknüpft sind. Bei Temperaturen zwischen 700 und 1100°C unter Einfluß von Wasserdampf und Kohlendioxid erfolgt die Aktivierung des Rußausgangsmaterials, wobei eine Teiloxidation des Kohlenstoffs in Inneren des Ausgangsmaterials Poren erzeugt (62). Experimente mit pulverförmiger Aktivkohle zeigten, daß die Affinität vom BaP wie auch seiner Chinone (1,6/3,6/6,12), sowohl in organischen Lösungsmitteln wie auch in wässrigen Suspensionen als sehr groß zu bezeichnen wäre. Sofern die untersuchten Substanzen farbig waren (wie die BaP-dione), fand nach Zugabe der Aktivkohle eine unmittelbare Entfärbung statt. 0,3 mg BaP, das mit [7,10-¹⁴C]-BaP radioaktiv markiert war (spezifische Aktivität: $1,38 \cdot 10^7$ Bq/mmol), wurde in CH₂Cl₂

gelöst bzw. mit Aceton in Wasser suspendiert. Die Lösungen wurden mit 0,1 g Aktivkohle (Merck) versetzt und 24 Stunden im Dunkeln geschüttelt. Die Aktivkohle wurde mit Filterpapier herausfiltriert und das Filtrat eingeengt bzw. mit CH_2Cl_2 extrahiert und eingeengt. Die Radioaktivitätsmessung ergab, daß fast keine Radiaktivität bzw. BaP in der Methylenchlorid-Phase vorhanden war. Das gleiche Ergebnis erbrachte auch eine dünnschichtchromatographische Untersuchung (stationäre Phase: Kieselgel 60; mobile Phase: CH_2Cl_2).

0,1 mg von jedem Dion (^{14}C -radioaktiv markiert an den Stellen 7 und 10) mit einer spezifischen Aktivität von $2,6 \cdot 10^6$ Bq/mmol jeweils wurden zusammen in CH_2Cl_2 gelöst bzw. mit Aceton in Wasser suspendiert und mit 0,1 g Aktivkohle versetzt. Nach der Aufarbeitung, wie für das BaP beschrieben, ergab die Radioaktivitätsprüfung wie auch die dünnschichtchromatographische Untersuchung, daß die BaP-dione unter diesen Bedingungen völlig an der Aktivkohle haften. Die Aktivkohle von allen Versuchen wurden mit Methylenchlorid in einem Soxhletextraktor über 5 Stunden behandelt. Die Prüfung der Extrakte ergab, daß das BaP in beiden Proben auf diese Weise zu 25-30% zu extrahieren wäre, wobei BaP-dione nur eine Wiederfindungsrate von 2-3% im Soxhlet-Extrakt ergaben. Aktivitätsmessungen der benutzten Aktivkohle gaben die restliche Aktivität wieder.

2.7 Trennmethode von BaP aus der Matrix und von den anderen PAH

Auf Grund ihrer Entstehung kommen die PAH (bzw. BaP) in sehr komplexen Gemischen vor und müssen vor dem eigentlichen Nachweis, aufgetrennt werden. Bei bestimmten Endnachweismethoden, wie der UV- oder der Fluoreszenz-Spektrometrie, können unter Umständen auch Gruppen von 2 oder 3 Verbindungen nebeneinander bestimmt werden. Bei diesen Trennungen werden also nicht die Trennleistungen gefordert wie bei der kontinuierlichen Registrierung durch einen Flammenionisationsdetektor (FID) bei der Gaschromatographie. Hier müssen die Verbindungen vollständig von einander getrennt sein, weil das Signal des FID massenproportional ist. Es ist also zu ersehen, daß die Trennmethode jeweils mit der Auswahl der Endbestimmungsmethode gewählt werden muß.

2.7.1 Flüssigchromatographie (LC)

Die PAH können säulenchromatographisch, je nach Art der verwendeten Gelmatrix und des Elutionsmittels, entweder nach Adsorptionschromatographischen oder nach Gelchromatographischen Prinzipien aufgetrennt werden. Bei der ersten erfolgt die Elution in der Reihenfolge zunehmender Ringgröße, bei der letzteren in der Reihenfolge abnehmender Ringgröße. Die ersten säulenchromatographischen Trennungen wurden auf anorganischen Adsorbentien durchgeführt, wobei als Säulenfüllmaterialien Aluminiumoxid und Kieselgel fungierten. Grimmer (59,60) trennte 13 PAH durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid. Weniger verwendet wurde Silikagel, das hauptsächlich zur Vorreinigung der Proben, die neben PAH noch andere Verbindungsklassen enthalten, benutzt wird.

Zur Trennung von PAH an organischen Gelen werden hauptsächlich Sephadex LH-20 (Pharmacia), ein hydroxypropyliertes Dextrangel,

Bio-Beads SX-8, ein Kopolymer aus Styrol und Divinylbenzol verwendet. Beide Gele sind quellfähig in organischen Lösungsmitteln.

Bei Untersuchungen der Systeme LH-20/Isopropanol und LH-20/Chloroform stellte Wilk (64) die Vermutung auf, daß wegen der geringeren Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe in Isopropanol die Solvatationskräfte in diesen Lösungsmitteln gering sind und daß die Wechselwirkungen zwischen den PAH und den Sephadex-Strukturen größer sind als der normale Ausschlußeffekt. Molekülgröße und Elutionsvolumen laufen parallel. Bei Chloroform als Elutionsmittel werden die PAH besser solvatisiert, die Wechselwirkung PAH-Molekül-Gelmatrix und der Ausschlußeffekt halten sich die Waage. Dabei erfolgt keine Auftrennung des PAH-Gemisches und sie eluieren geschlossen. Eine umfangreiche Untersuchung an LH-20/Isopropanol führte Oelert (65) durch und stellte folgendes fest: Die Geometrie der Trennstrecke hat keinen großen Einfluß auf die relativen Elutionsvolumina. Steigende Elutionsgeschwindigkeit bedingt sinkende Elutionsvolumina, wobei die Zahl der theoretischen Trennstufen sinkt. Steigende Temperatur bedingt (größere Querdiffusion) abnehmendes Elutionsvolumen und sinkende Zahl der theoretischen Trennstufen.

Untersuchungen und Berechnungen der Adsorptionswerte von PAH in methanolischer und isopropanolischer Lösung an Sephadex LH-20 wurden von Streuli (66) mit dem folgenden Ergebnis durchgeführt: Diese Werte können für planare PAH aus ihren Resonanzenergien berechnet werden und somit die Elutionsvolumina. Die π -Elektronenwolken der PAH bedingen also die Adsorptionswechselwirkung zwischen Molekül und Gelmatrix, wobei sie durch Wahl eines anderen Lösungsmittels vollständig unterdrückt werden können. Dieses Verhalten konnte von Klimisch (67) unter Verwendung von Dimethylanilin als Lösungsmittel an Sephadex LH-20 und Bio-Beads SX-8 bestätigt werden. Dimethylanilin bildet mit den PAH charge-transfer-Komplexe, sodaß die Wechselwirkung Gelmatrix-PAH unterdrückt wird. Die Trennleis-

tung dieser Systeme ist aber geringer als bei der Verwendung dieser Gele mit protischen Lösungsmitteln. Das Prinzip der Gelpermeationschromatographie beruht darauf, daß die Moleküle des gelösten Stoffes in die lösungsmittelgefüllten Porengröße der Gelmatrix eindringen. Kleinere Moleküle dringen weiter ein als größere und eluieren deshalb später von der Säule. Die Elution erfolgt nach abnehmender Molekülgröße.

Klimisch (68) untersuchte verschiedene Dextrangele und Lösungsmittel. Er kam zu dem Ergebnis, daß Dextrangele (Sephadex LH-20) in Alkoholen (Methanol, Isopropanol) die besten Trenneigenschaften für PAH aufweisen. Mit Methanol trennen sich die niederkondensierten PAH besser, wobei mit Isopropanol eine bessere Auftrennung der höherkondensierten erfolgt.

Grimmer (69) setzte das System Sephadex LH-20 mit Dimethylformamid/Wasser (85:15) als stationäre Phase und n-Hexan als mobile Phase als verteilungschromatographischen Anreicherungsschritt ein, der zur Abtrennung größerer Mengen an Begleitstoffen bei der Bestimmung von PAH in Mineralölprodukten diente.

Zusammenfassend wäre zu sagen, daß die Säulenchromatographie nur zur Gruppentrennung der PAH benutzt werden kann, um die PAH von Verbindungen zu reinigen, die die Identifikation und die quantitative Bestimmung stören. Sie besitzt kaum die Leistung einer Auftrennung der Substanzen dieser Verbindungsklasse. Da die isomeren Chinone des Benzo[a]pyrens in der Planarität, dem aromatischen Charakter und dem Molekulargewicht dem Grundkörper BaP stark ähneln, bietet die Säulenchromatographie eine substanzschonende Anreicherungsmöglichkeit.

2.7.2 Dünnschichtchromatographie (TLC)

Wegen der Vielzahl der in den Praxisproben auftretenden PAH ist Auftrennung durch TLC mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Die Wahl des Trennsystems ist in großem Maße von der

Herkunft der Probe und von den mitextrahierten Begleitstoffen abhängig.

Sawicky (70) verglich die bis zu diesem Zeitpunkt am häufigsten benutzten Trennsysteme: Aluminiumoxid/Pentan-Diäthylether (10:1); Acetylierte Cellulose/DMF-H₂O (1:1). Die vollständige Trennung des Benzo[a]pyrens von Benzo[k]fluoranthen, Benzo[e]pyren und Perylen, der "Benzopyrenfraktion" gelang nur auf acetylierter Cellulose. Kieselgel (71), Magnesiumhydroxid (72) wie auch Polyamid (73) wurde ebenfalls als stationäre Phasen für die Trennung verwendet, wobei das Magnesiumhydroxid eine Schicht mit hoher Kapazität bot aber mit dem Nachteil von langen Laufzeiten.

Bei der eindimensionalen dünnschichtchromatographischen Methode sind theoretisch maximal etwa ein Dutzend Spots auflösbar. Praktisch wird diese Methode fast ausschließlich zur Abtrennung einzelner PAH, wie BaP von den übrigen (74) oder einer Gruppe ausgewählter PAH von Begleitsubstanzen (75) benutzt. Bei zweidimensionaler Trennung mit zwei verschiedenen Laufmitteln werden höhere Trennleistungen erreicht. Dies ist insbesondere notwendig bei höheren Konzentrationen von PAH und Begleitsubstanzen. Kunte und Borneff (76) trennten auf diese Weise an einer Aluminiumoxid und acetylierte Cellulose Mischschicht den Extrakt einer Wasserprobe (a. n-Hexan/Benzol 9:1, b. Methanol/Ether/H₂O 4:4:1). Auf diese Weise konnten die PAH Fluoranthen, Benzo[a]pyren, Benzo[ghi]perylen, Indeno[1,2,3-cd]pyren aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden. Bei der hochauflösenden Dünnschichtchromatographie an Umkehrphasen (reversed phase high performance thin-layer chromatography "RPHPTLC") zeigte die RP18-Phase die größte Selektivität für PAH. Weil und Hauck (77) entwickelten ein Verfahren zur Unterscheidung zwischen mit PAH belasteten und unbelasteten Trinkwasserproben auf einer HPTLC-Fertigplatte RP-18 (Merck) mit Konzentrierungszone, mit der die sonst üblichen Auftragemengen im nl-Bereich auf 0,1 ml erweitert werden konnten. Die spektrophotometrische Auswertung wurde durch eine

visuelle Auswertung der Fluoreszenzintensität der Proben im Vergleich mit einem Standard ersetzt.

Neben den Screening-Verfahren zur halbquantitativen Bestimmung wird die Dünnschichtchromatographie als Reinigungsschritt bei der Vortrennung von PAH-haltigen Extrakten verwendet. Howard und Mills (78) trennten die 2 bis 7 Ringe enthaltenden PAH von anderen fluoreszierenden unpolaren und polaren organischen Verbindungen auf einer Silikagelplatte. Von Kaschani (79, 80) wurde ein dünnschicht-fluorometrisches Verfahren entwickelt, das PAH in Abgaskondensaten bestimmt. Ausgewählt wurden 6 PAH, die auf einer Acetylcelluloseplatte mit Methanol/Diäthylether/Wasser (6:4:1) als Fließmittel getrennt und anschließend einer fluorometrischen in situ-Auswertung unterzogen wurden. Mehrmaliges Entwickeln erreichte eine Trennungsverbesserung. Die Dünnschichtchromatographie stellt auch ein Trennungsverfahren für die BaP-Oxidationsprodukte dar. Es werden hauptsächlich Kieselgel- und seltener reversed phase-Schichten verwendet.

Borgen (81) verwendete zur Trennung von BaP-Metaboliten Kieselgelschichten mit Benzol/Ethanol (9:1) als Laufmittel. Das gleiche dünnschichtchromatographische Verfahren wurde auch von Cerniglia (82, 83) verwendet. Dervdariani (84) benutzte ein zweidimensionales Dünnschichtverfahren mit Kieselgelschichten (a. Benzol/n-Hexan (1:15); b. Benzol/Ethanol (9:1)). Zur Trennung der drei BaP-dione wurde über Aluminiumoxid-Benzol/Petrolether (3:7) chromatographiert. Eine gute Trennung der drei Dione erreichte Jäger (85) mit Kieselgel-Benzol/Aceton (9:1). Kinoshita (86) verwendete zweidimensionale Chromatographie mit Kieselgel (a. Methanol/Benzol (1:19); b. Benzol/n-Hexan (1:15)).

Raha (87) berichtete von einem Verfahren, bei dem zur Trennung von BaP-Oxidationsprodukten Kieselgelschichten mit sehr guten Ergebnissen verwendet wurden. Als singuläre Laufmittel wurde Dichlormethan und Essigsäureethylester verwendet. Binäre Systeme wie n-Hexan/Benzol (3:1), Dichlormethan/Benzol

(97:3), Dichlormethan/Ethanol (9:1) sowie Methanol/Tetrahydrofuran (19:1), fanden je nach vorliegendem Substanzgemisch Anwendung.

Die Dünnschichtchromatographie bietet die Möglichkeit, sofern radioaktiv markierte Proben eingesetzt werden, mittels Autoradiographie einen halbquantitativen Nachweis zu erreichen. Eine quantitative Bestimmung wäre direkt von der Oberfläche, mit einem Scanner möglich (81).

2.7.3 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie findet am meisten Verwendung bei der Trennung, Identifizierung und quantitativen Auswertung PAH-haltiger Proben. Die Anwendung auf die BaP-Oxidationsprodukte wird selten eingesetzt.

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung ist eine ausreichende Auftrennung, wobei die Anzahl der zu bestimmenden Komponenten nahezu keine Rolle spielt.

2.7.3.1 Gepackte Säulen

Gepackte Säulen beinhalten Trennschichten aus organischen Wachsen oder organische Siliziumverbindungen, die an anorganische Trägerschichten aus Chromosorb G oder W gebunden sind. Tausch und Stehlik (88) erreichten eine bis zu 50 proz. Trennung der Isomerenpaare Phenanthren/Anthrazen und Benzo[e]pyren/Benzo[a]pyren auf einer 3 m x 2 mm ID, mit 1% OV-7 auf Supelcoport (80/100 mesh). Die Trennung von BeP und BaP gelang Lao (89,90) auf 3,6 m-Säule mit 6% Dexsil 400 auf Chromosorb W (80/100 mesh) mit wesentlich verkürzter Retentionszeit. Grimmer (91) erreichte eine für die quantitative Bestimmung ausreichende Auftrennung eines vorgereinigten PAH-Klärschlamm-Extraktes an einer 10 m x 2 mm ID, OV-101 auf Supelcoport (100/120 mesh) Säule.

Bettencourt (92) verwendete 1% OV-1 an Chromosorb W zur Be-

stimmung von BaP-Dihydrodiolen. Nach Silylierung der Metaboliten aus Inkubationsansätzen mit BaP, erreichte Jacob (93) sehr gut aufgelöste Chromatogramme an 3% OV-101 auf Supelcoport. Takahashi (94) gelang die Trennung von 36 Photooxidationsprodukten nach Silylierung mit Pyridin/N,O-Di(trimethylsilyl)acetamid/Trimethylchlorsilan (2:2:1) und Verwendung der Trennschichten 2% OV-1 an Chromosorb W und 6% Dexsil-300 an Chromosorb W. Die isomeren BaP-chinone wurde mit LiAlH_4 in Ether zu den Dihydroxyverbindungen reduziert und anschließend silyliert (keine Angaben über Ausbeuten des Verfahrens).

2.7.3.2 Kapillarsäulen

Kapillarsäulen verfügen über eine höhere Trennleistung, die um das 5 - 10-fache an Trennstufenzahlen liegt, als bei gut gepackten Säulen. Man unterscheidet Glaskapillarsäulen je nach dem Aufbau zwischen Dünnschichtkapillarsäulen (Bedeckung der inneren Säulenoberfläche mit einem gleichmäßigen dünnen Film) und Dünnschichtkapillarsäulen (Belegung der inneren Säulenoberfläche nach Aufrauen mit dickerer Schicht einer stationären Phase).

Mit der Verwendung einer 50 m-Trennsäule mit der Belegung SE-54 gelang die Basislinientrennung von Phenanthren/Chrysen, Benzo[e]pyren/Benzo[a]pyren, Benzo[ghi]perylen und dem als Standard verwendeten Picen (61). Zu der gleichen Belegung existieren eine Reihe von Publikationen über PAH-Trennungen. Romanowski (95) trennte fast 200 PAH auf einer 15 m mit SE-54 belegten Kapillarsäule. Jacob (96) gelang die Trennung von BaP-Metaboliten an einer 25 m langen SE-30-Glaskapillarsäule. König (97) konnte unter Verwendung einer 25 m Glaskapillarsäule mit OV-73-Belegung die sogenannte mäßig polare Fraktion aus PAH-Luftproben bestimmen. Der Nachweis der darin enthaltenen Ketone und chinoiden PAH-Derivate erfolgte mit einer 30 m Quarzkapillarsäule mit SE-30-Belegung.

2.7.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Während bei der Säulenflüssigkeitschromatographie mit Niveau-gefäßen bzw. der Mitteldruckchromatographie mit flüssigkeitsfördernden Pumpen Trennzeiten von mehreren Stunden in Kauf genommen werden müssen, kann man mit den Vorzügen der HPLC Trennungen mit einem Zeitbedarf zwischen wenigen Minuten bis maximal einer Stunde auskommen. Die Entwicklung feinkörniger Säulenfüllmaterialien, mit denen eine höhere Zahl von theoretischen Trennstufen erreicht wurde, bewirkte einen starken Aufschwung der HPLC. Die Einführung der Gradientenelution mit noch kürzeren Trennzeiten und der Lösung von schwierigen Trennproblemen sorgte ebenso für steigendes Interesse der analytischen Trennungen mittels der HPLC insoweit, daß sie eine Alternative zur hochauflösenden Gaschromatographie besonders für die Bestimmung schwer verdampfbarer Substanzen bietet. Am Anfang der HPLC wurden als stationäre Phasen oft Aluminiumoxid und Kieselgele verwendet, wobei hauptsächlich PAH-Testgemische getrennt wurden.

Klimisch (98) trennte BaP selektiv an einer Säule mit quervernetztem Celluloseacetat HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x (Macherey u. Nagel). Engelhardt (99) trennte an einem basischen Aluminiumoxid (mobil. Phase: n-Heptan/12% Chlorpropan) mehrere PAH-Isomere, erreichte aber keine Trennung zwischen BaP und Perylen. Die meisten heute angewandten Trennungen von PAH werden an chemisch modifizierten Kieselgelen durchgeführt. Dadurch werden die Nachteile von Aluminiumoxiden und Kieselgelen, wie irreversible Adsorption von polaren Begleitstoffen oder die Empfindlichkeit gegenüber dem Wassergehalt der Lösungsmittel aufgehoben. Die Kieselgelmaterialien haben durch die Oberflächenmodifikation völlig neue Eigenschaften erhalten, der Selektivität eingeschlossen.

Rumeliotis (100) untersuchte mehrere polare oberflächenmodifizierte Säulenmaterialien wie Nucleosil 5 NH₂, Nucleosil 5 NO₂ und Nucleosil 5 CN von der Fa. Macherey und Nagel. Mit

Cyano- und Amino-Phase wurden zwar die PAH-Testgemische getrennt, aber die Selektivität war nicht befriedigend. Die vergleichbar beste Selektivität zeigte die NO₂-Phase, die aber nicht in der Lage war, selbst mit dem unpolaren n-Heptan als Elutionsmittel, eine ausreichende Retention zu erzielen, um eine Praxisprobe mit über 100 PAH-Komponenten zu trennen. Bei Verwendung von Kieselgelen, deren Oberfläche mit Octylsilan- oder Octadecylsilanderivaten modifiziert wurden, erreicht man bessere Ergebnisse. Die so entstandenen Phasen werden "reversed phase" (kurz RP) genannt, mit unpolarem und lipophilem Charakter. Sie besitzen die Eigenschaft der Elution der zu trennenden Substanzen in der Reihenfolge abnehmender Polarität. Als mobile Phase werden polare organische Lösungsmittel wie Methanol und Acetonitril verwendet. Die Analysezeit der PAH wird unter Verwendung der Gradientenelution erheblich verkürzt, wobei auch eine bessere Trennung unter Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der Elutionsmischung erzielt werden kann.

Wise (101) trennte nach Untersuchungen an verschiedenen im Handel erhältlichen PR C-18-Säulen, auf einer Vydac 201 TP eine Gruppe von 17 PAH (lineare Gradientenelution 40% bis 100% Acetonitril in Wasser). Es wurde eine Basislinientrennung von den schwer zu trennenden PAH erreicht wie: BaA, CHY, BbFLT, BkFLT, BaP, BghiPER und IPYR. Unter Verwendung der selektiven Fluoreszenzdetektion konnten BkFLT und BeP getrennt werden (Die Trennung auf der Säule konnte erreicht werden mit einer anderen Elutionsmischung auf Kosten der Trennung anderer Komponenten). Hagenmaier und Jäger (102) entwickelten für die routinemässige Bestimmung der nach der Trinkwasserverordnung zu untersuchende PAH (Fluoranthen, Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen, Benzo[a]pyren, Indeno[1,2,3-cd]pyren und Benzo[ghi]perylen) ein Verfahren an Plygosil 60-D5 C-18-Säule (mobile Phase: Methanol), das auf die spezifischen Erfordernisse zugeschnitten ist.

Mit einem ternären Elutionsgemisch (MeOH/H₂O/THF) trennten

Stöber und Reupert (103) 9 PAH an einer Lichrosorb RP-18-Säule (Merck). Sie benutzten die selektive Fluoreszenzdetektion um schwer trennbare PAH zu bestimmen.

Organ und Katz (104) trennten 16 PAH an einer Perkin-Elmer HC-ODS-Säule, wobei ausser anderen genannten Trennungen auch die Trennung der Fünfringgruppe Benzo[a]pyren, Benzo[e]pyren, Benz[e]acephenanthrylen und Benzo[k]fluoranthen vollständig gelang. Die Nachweisgrenze lag für einige PAH unter 10 ng/l.

Smith und Strickler (105) entwickelten ein neues Verfahren zur Trennung von PAH bis zu einem Molekulargewicht von 450. Sie benutzten zwei hintereinander geschaltete Du Pont Zorbax ODS-Säulen und ein quarternäres Elutionsmittel bestehend aus: a. 15% H₂O / 85% MeOH und b. 30% THF / 70% CH₃CN (linear gradientisch ausgehend von 5% bis 100% b.).

Scott und Kucera (106) führten die Verwendung von Microbore-Säulen ein, mit einem Durchmesser von 1 mm und weiteren Vorteilen. Als Füllmateriall wurde RP-18 benutzt, wobei sie bei einer Langzeitauftrennung (20 h) 120 PAH unterscheiden konnten.

Takeuchi und Ishii (107) entwickelten die Ultra-Micro-HPLC mit Querschnittsflächen um den Faktor 100 kleiner als die Microbore-Säulen und einer Vergrößerung der Empfindlichkeit um den Faktor 10.

Huber und Emmert (108) haben ein "on line"-Verfahren vorgelegt zur Identifizierung und Bestimmung von PAH. Ein UV/Vis-Diodenarraydetektor sorgte für die Identifizierung der einzelnen Komponenten mittels Aufnahme von Spektren während der Analyse. Für die höchstempfindliche Anzeige bis in den unteren Picogrammbereich wurde ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt. Zur Trennung der Proben wurde eine Supelcosil LC-PAH-Säule eingesetzt, wobei für die Gradientenelution CH₃CN/H₂O- und MeOH/H₂O-Gemische verwendet wurden.

Alpert (43) trennte die drei isomeren BaP-dione und 1-OH-, 7-OH-, 9-OH-BaP sowie 6-Methoxy-BaP aus einem Inkubationsansatz an einer ODS-Säule mit einem linearen Methanol/Wasser-Gradienten von 35-85% Methanol. Bond (109) trennte an RP-18

drei BaP-diole, ein BaP-oxid, drei BaP-phenole, sowie die drei isomeren BaP-dione, mit einem Methanol/Wasser-Gradienten von 55-100% Methanol. Holder (110) entwickelte ein umfassendes Trennverfahren, das die große Anzahl von 24 BaP-Metaboliten verkraften sollte. Es wurden zwei hintereinandergeschaltete Du Pont ODS-Säulen verwendet mit einem linearen Gradienten von 35-85% Methanol in Wasser. Das Ergebnis der BaP-dione-Trennung erscheint aber wegen ausgeprägtem "tailing" und Zusammenelution als nicht befriedigend.

Hukkelhoven (111) konnte drei BaP-dione, drei BaP-diole und drei BaP-phenole an einer LiChrosorb RP-18-Säule mit einem linearen Gradienten von 65-100% Methanol in Wasser trennen. Mit einer isokratischen Elution von 80% Methanol in Wasser, berichtet Katz (38) eine ausreichende Trennung der isomeren BaP-dione an einer ODS Spherisorb-Säule. Selkirk (112) berichtet unter anderem von einer Trennung der BaP-dione (BaP-1,6-, BaP-3,6- und BaP-6,12-dion) an einer 1-M ODS Permaphase-Säule mit einem linearen Gradienten von 30-70% Methanol in Wasser, die jedoch nicht ausreichend war. Yang (113, 114, 39) entwickelte ein Verfahren, das in der Lage ist, die drei isomeren BaP-dione im einem Trennungsgang neben zwei metabolischen BaP-phenolen sauber zu trennen. Es wurde eine Zorbax ODS Säule mit einem linearen Gradienten von 60-100% Methanol in Wasser verwendet.

Abschliessend wäre angebracht, die Vorzüge der HPLC im Vergleich zu anderen Analysemethoden (wie Gaschromatographie oder GC/MS-Kopplung) zu erwähnen (108):

1. PAH wie auch BaP-oxidationsprodukte haben ein hohes Molekulargewicht und sind nur schwer verdampfbar. Mit der HPLC lassen sich die einzelnen Substanzen bei Raumtemperatur auftrennen. Auf diese Weise wird das Problem der Zersetzung während der Verdampfung ausgeschlossen.
2. Die HPLC lässt sich mit UV/Vis-Diodenarraydetektoren koppeln, die zur qualitativen Detektierung und quantitativen Be-

stimmung herangezogen werden können. Ausserdem erhöht eine Kopplung mit empfindlichen Fluoreszenzdetektoren die Nachweisgrenze der PAH bis in den unteren Picogrammbereich.

2.8 Gewinnung der BaP-dione durch Bestrahlen mit simuliertem Tageslicht in wässrigen Systemen

Zur Isolierung der drei photooxidativen BaP-dion-Isomeren (BaP-6,12-, BaP-3,6-, BaP-1,6-dion) aus wässrigen Systemen wurde ein Versuchsaufbau benutzt, der auch bei der Flüssigführung phototropher Mikroorganismen verwendet wird (115). Wegen der geringen Wasserlöslichkeit ($5 \cdot 10^{-8}$ mol/l) von BaP wurde das BaP in einer Mischung Methanol/Essigsäureethylester (8:2) gelöst und in 1 Liter Wasser langsam zugegeben. Dadurch erreicht man eine wässrige Suspension, wobei das BaP in feinsten Verteilung vorliegt. Als Reaktionsgefäße wurden 1-Liter-Schikanen-Kolben benutzt, wie sie in der Mikrobiologie üblich sind (Erlenmeyerkolben mit Einkerbungen für bessere Durchmischung und Belüftung). Die Kolben wurden auf einer Schüttelmaschine geschüttelt unter gleichzeitiger Belichtung mit Leuchtstoffröhren, aus 50 cm Entfernung. Das Emissionsspektrum der verwendeten Lampen gleicht dem des Tageslichtes mit einem UV-Anteil von 2,1% (Abb. 17).

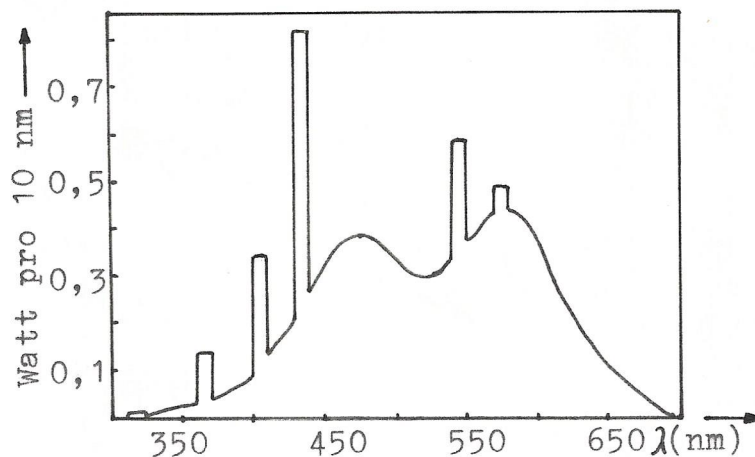


Abbildung 17: Emissionsdiagramm der Sylvania-Lampen

Teilweise wurden Proben mit $[7,10-^{14}\text{C}]$ -BaP angesetzt, um radioaktiv markierte Benzo[a]pyren-dione zu erhalten. Aus Untersuchungen der Optimierung der BaP-dion-Gewinnung und -Isolierung erwiesen sich Konzentrationen von 4 mg/l und eine Belichtungsdauer von 3 Wochen als geeignet (Abb. 18).

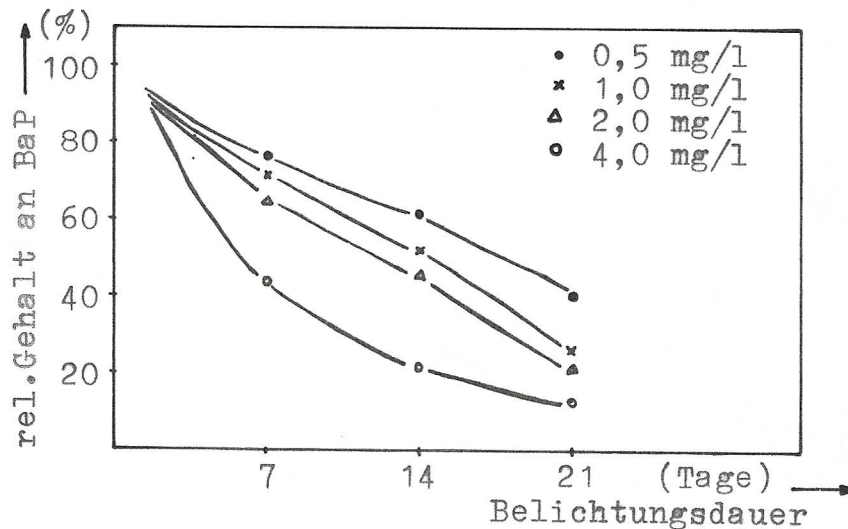


Abb. 18: BaP-Zerfall bei Belichtung in wässrigen Medien

2.8.1 Extraktion und Reinigung der Dione

Es existiert eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Isolierung von BaP-Oxidationsprodukten aus wässrigen Systemen beschäftigen. In den meisten Fällen wird bei der Extraktion Essigsäureethylester verwendet, um möglichst in einem Extraktionsschritt alle BaP-Metaboliten zu erfassen (92, 116, 82). Es wird auch über Extraktion mit Chloroform (117), oder mit Mischungen wie Aceton/Benzol (118), Aceton/n-Hexan (84), Aceton/Essigsäureethylester (110) und Aceton/n-Hexan (81) berichtet.

Die Wahl der Extraktion der wässrigen Systeme fiel auf Essigsäureethylester und zeigte, daß damit der Großteil aller Photooxidationsprodukte aus der Reaktionslösung entfernt werden konnte (115). Wegen der relativ guten Wasserlöslichkeit des

Essigsäureethylesters mußte allerdings ein weiterer Extraktionsschritt mit Cyclohexan angefügt werden, womit auch der gelöste Essigsäureethylester, aus der wässrigen Phase entfernt wurde.

Von den unter 2.7.2 aufgeführten dünnschichtchromatographischen Trennverfahren, erwies sich das von Raha (87) eingeführte als das am besten geeignete. Für die Trennung der in der organischen Phase enthaltenen BaP und BaP-Photooxidationsprodukte brachten Kieselgel 60-Schichten das beste Ergebnis. Als Laufmittel wurde das singulär System Methylenchlorid verwendet, wobei die Laufstreckendifferenzen zwischen den zu trennenden BaP, BaP-dione und geringer Mengen anderer Oxidationsprodukte ausreichend groß waren. In diesem Trennsystem blieben alle polarere BaP-Derivate entweder am Start hängen oder besaßen R_f -Werte um 0,05. Das photooxidativ nicht abgebaute BaP lief fast mit der Laufmittelfront und besaß einen R_f -Wert von 0,85.

BaP-6,12-dion konnte ohne Schwierigkeiten von den anderen zwei Dionen getrennt werden (R_f -Wert: 0,45). Problematischer schien die Trennung zwischen BaP-1,6-dion (R_f -Wert: 0,25) und BaP-3,6-dion (R_f -Wert: 0,21), die auch durch mehrmaliges Entwickeln rein erhalten wurden.

Die Identifizierung der erhaltenen Produkte erfolgte durch Vergleichen der R_f -Werte gegen gekaufte Referenzsubstanzen, sowie der UV/Vis-Spektren. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit einem Spektralphotometer anhand der bekannten Extinktionskoeffizienten oder durch Radioaktivitätsmessungen, soweit es um radioaktive Ansätze bekannter spezifischer Aktivität handelte. Die Färbung der Zonen unterm UV-Sichtgerät (bei 254 nm), kann in Zusammenhang mit den R_f -Werten, zur Identifikation herangezogen werden:

BaP	R_f : 0,85	blau
BaP-6,12-dion	R_f : 0,45	gelb
BaP-1,6-dion	R_f : 0,25	gelb
BaP-3,6-dion	R_f : 0,21	rot

2.9 Stabilitätsüberprüfungen des BaP und der BaP-dione in organischen Lösungsmitteln

Bekanntlich ist Benzo[a]pyren in festem Zustand wie auch in wässrigen Systemen lichtempfindlich, was auch für seine isomeren Dione zutrifft.

Um relative Werte der Handhabung dieser Verbindungen in organischen Lösungsmitteln zu erhalten, wurden verschiedene Untersuchungen mit drei der in dieser Arbeit benutzten Lösungsmittel durchgeführt (Cyclohexan, Methylenchlorid, Essigsäureethylester). Die Untersuchungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60/CH₂Cl₂) und UV/Vis-Spektrometrie an Lösungen der oben genannten Substanzen vollzogen. Die Belichtungen fanden statt in der Belichtungsanlage (s.Kap. 2.8), wobei Quarzküvetten als Reaktionsgefäße benutzt wurden. Die untersuchten Substanzen erwiesen sich in allen Lösungsmitteln und im Dunkeln über 1 Woche als stabil. Die Belichtungen ergaben, daß die Probenvorbereitung und das Analyseverfahren in 3 bis 4 Tagen und unter gedämpftem Licht durchgeführt werden muß, um Verluste durch Modifikation der Substanzen auszuschliessen. Cyclohexan erwies sich als sehr geeignet für die Aufbewahrung von BaP, da auch bei Belichtungsversuchen keine Veränderung des BaP festgestellt werden konnte. Das Cyclohexan konnte bei den BaP-dionen wegen ihrer Unlöslichkeit nicht überprüft werden. Die Methylenchlorid-Lösungen der Dione ergaben nach einer Woche Belichtung eine deutliche Veränderung der UV/Vis-Spektren (Abb. 19-21), mit einer Abnahme der Extinktionskoeffizienten und einem veränderten Kurvenverlauf. Auf den entwickelten dünnschichtchromatographischen Platten waren eine Reihe von Zerfallszonen erkennbar, die teilweise ein unpolareres wie auch polareres Laufverhalten besaßen als die BaP-dione selbst. Entsprechende Ergebnisse lieferten auch die Belichtungen der BaP-dione in Essigsäureethylester.

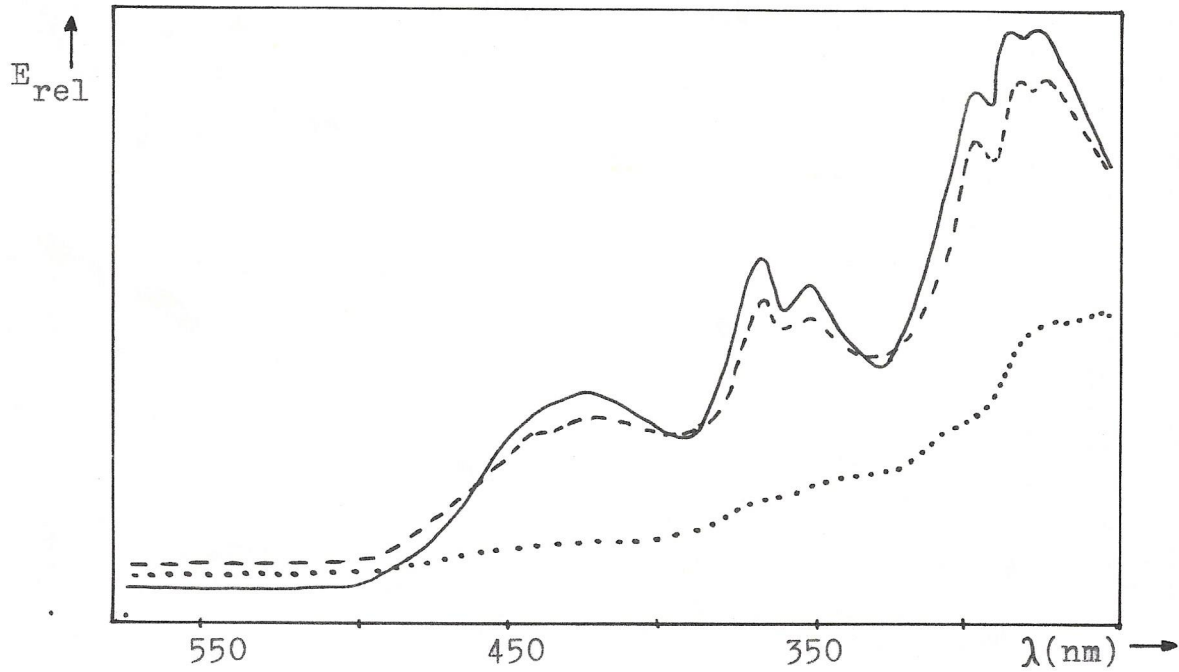


Abb. 19: UV/Vis-Spektren von BaP-6,12-dion in CH₂Cl₂
— unbelichtet; --- nach 1 Tag; nach 7 Tagen

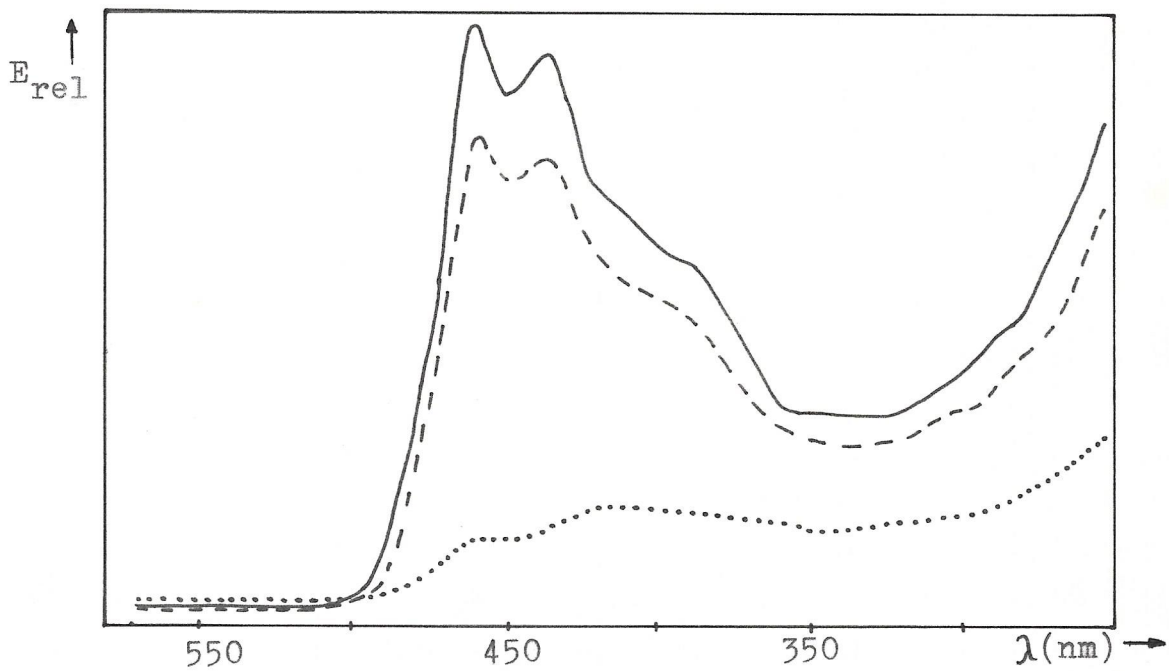


Abb. 20: UV/Vis-Spektren von BaP-1,6-dion in CH₂Cl₂
— unbelichtet; --- nach 1 Tag; nach 7 Tagen

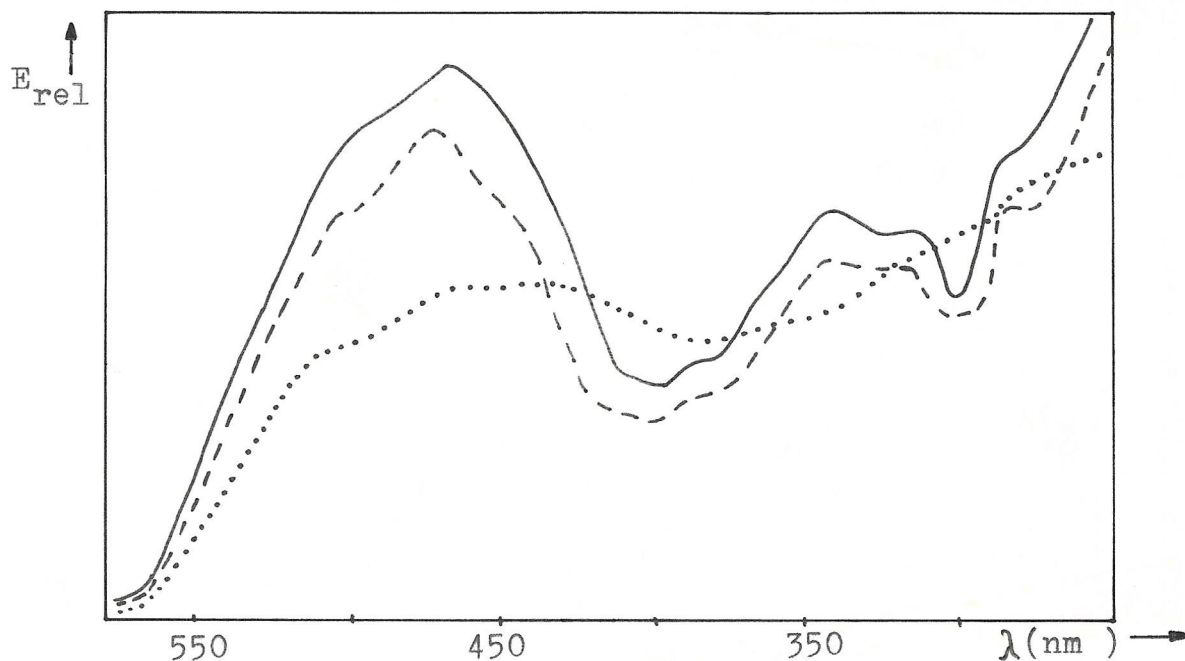


Abb. 21: UV/Vis-Spektren von BaP-3,6-dion in CH₂Cl₂

— unbelichtet; --- nach 1 Tag; nach 7 Tagen

2.10 Probenvorbereitung und Anreicherung von BaP und BaP-dionen aus pflanzlichen Materialien

2.10.1 Extraktion

Mit zunehmendem Interesse an den verschiedenen Umweltverschmutzungsfaktoren stieg auch die Zahl der Untersuchungen an geräucherten Lebensmitteln und landwirtschaftlichen Erzeugnissen. Die Zahl der Berichte von Untersuchungen über PAH aus pflanzlichen Proben ist sehr groß. Entsprechend groß ist auch die Zahl der verwendeten Extraktionsmittel. Während Chloroform⁽¹¹⁹⁾, Methylenchlorid⁽¹²⁰⁾ und Diäthylether⁽¹²¹⁾ seltener verwendet wurden, berichten Genest und Smith⁽¹²²⁾ sowie Hertel und Suckow⁽¹²³⁾ über eine ausreichende Ablösung der PAH mit n-Hexan. Auch Methanol wie auch Benzol und Methanol nacheinander^(29,124) wurden zur Extraktion eingesetzt.

Um das BaP und seine isomeren Dione in einem Schritt erfassen zu können, sollte ein Extraktionsmittel gewählt werden, das in der Lage wäre, nicht nur das BaP zu lösen, sondern auch die genannten BaP-dione. Die Polarität des Lösungsmittels sollte nicht übermäßig stark sein, weil sonst zu viele pflanzliche Begleitstoffe aus der Pflanzenmatrix heraus extrahiert werden könnten. Sie würden die Reinigung und Anreicherung wie auch die Bestimmung beeinträchtigen. Als geeignet schien, trotz seiner Giftigkeit, das Methylenchlorid. Seine niedrige Siedetemperatur (40°C) läßt bei Zimmertemperatur im Rotationsverdampfer eine schonende Entfernung aus den extrahierten Substanzen zu.

Die pflanzlichen Proben (Endivien-, Kopfsalat sowie andere wild wachsende Pflanzen) wurden zu je 800 bis 1000 g in einem Mixer zerkleinert und im Scheidetrichter mit 300 bis 500 ml Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wurde dann mit Wasser gewaschen und über vorgereinigtes Na₂SO₄ getrocknet. Die Filtration erfolgte über einer Glasfritte, anschliessend wurde das Methylenchlorid bei Zimmertemperatur im Rotationsverdampfer bis fast zu Trockene (3 ml Rückstand) entfernt. Wiederfindungsversuche mit radioaktiv markierten BaP und BaP-dionen ergaben, daß der Extraktionsschritt eine Ausbeute von 96 bis 98% besaß. Für diese Versuche wurde die zerkleinerte Probe mit den radioaktiven Substanzen versetzt und für 3 h stehen gelassen. Anschliessend wurde wie oben erwähnt extrahiert.

2.10.2 Vorreinigung und Trennung

Wie in vorigen Kapiteln besprochen, ist die Beständigkeit des BaP und seiner Dione relativ klein. Die Erkenntnisse aus den Stabilitätsuntersuchungen haben als notwendig erwiesen, daß nur solche Vorreinigungs- und Trennungs-Verfahren eingesetzt werden, die a) sich schonend für das BaP und seine Dione auszeichnen, b) eine relativ kurze Analysezeit in Anspruch

nehmen und c) eine große Effizienz aufweisen.

Um einen möglichen Zerfall des Benzo[a]pyrens zu seinen isomeren Dionen während der Analyse und somit eine Veränderung der Anfangskonzentration der Dione in den Probenmaterialien zu vermeiden, wurde das BaP direkt nach der Extraktion von den polarereren Dionen getrennt.

Der Einsatz einer Kieselgel 60-Säule erbrachte die gewünschte Trennung. 5 g Lichroprep Si-60 wurden in einer Säule mit einem Durchmesser von 25 mm mit n-Hexan als Lösungsmittel aufgeschlämmt. Der Rückstand des Pflanzenextraktes wurde mit n-Hexan/CH₂Cl₂ (3 ml) aufgelöst und auf die Kieselgelsäule vorsichtig gegeben. Die Elution erfolgte mit n-Hexan wobei nach 100 ml Eluat eine Wiederfindungsrate von 97 bis 100% an BaP zu messen war (Radioaktivitätsüberprüfung). Das BaP wurde bei allen Analysenproben von einer gelben Färbung begleitet, die aus der pflanzlichen Matrix stammt und einen weiteren Reinigungsschritt erforderlich machte (siehe Verteilungs-Chromatographie). Auf diese Weise wurde das unpolare BaP von polaren BaP-Dionen und einer Vielzahl an anderen polaren pflanzlichen Substanzen getrennt. Die polarereren Substanzen bleiben an der obersten Schicht des Kieselgels hängen und es bedarf polarer Lösungsmittel, um eine Elution zu erreichen. Dafür wurde Methanol sowie eine Methanol/Aceton-Mischung (50:50) eingesetzt. Die Effizienz dieser Elution ergab Werte von über 98% (Radioaktivitätsüberprüfung). Das gesamte Methanol- bzw. Methanol/Aceton-Eluat (30-50 ml) wurde am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur bis auf wenige Milliliter (2 ml) eingeeengt und einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterworfen. Dafür wurde eine Säule (Durchmesser 25 mm) mit einem reversed phase-Material (RP 18) verwendet. Das RP 18 wurde in Methanol aufgeschlämmt und nach 3 h-Aufquellzeit in die Säule gegeben. Das vorher eingeeengte Methanol-Eluat wurde auf die Säule getragen und anschliessend mit Methanol eluiert. In den ersten 15 bis 30 ml eluieren die BaP-dione, die sich auf diese Weise von einem großen

Teil der pflanzlichen Begleitstoffe trennten. Dieser Reinigungsschritt erwies eine Wiederfindungsrate von 94-96% (Radioaktivitätsprüfung).

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des RP 18-Eluats zeigten, daß eine große Anzahl der pflanzlichen Begleitstoffe die Identifizierung und Bestimmung der BaP-dione beeinträchtigen. Diese Substanzen besaßen in etwa die gleichen Polaritäten wie die Dione selbst; deshalb wurde versucht, sie mittels einer Molekularsiebtrennung von den Dionen zu entfernen.

Analoge Trennungsvorgänge existieren auch bei der Vortrennung der PAH untereinander auf Grund ihrer Molekulargewichtsunterschiede (61). Nach Untersuchung von verschiedenen organischen Materialien (Sephacorb HP, Sephadex LH-60, Sephadex LH-20) wurde das Sephadex LH-20 als geeignet angesehen. Das Material wurde nach einer Quellzeit von 24 h mit dem gleichen Lösungsmittel an einer Niederdruckanlage eingesetzt. Die Wahl des Elutionsmittels sollte als Kompromiss zwischen Trennung und Elutionsdauer ausgewählt werden. Es wurden verschiedene Lösungsmittel probiert (wie sie auch bei der PAH-Trennung eingesetzt werden) wie Methylenchlorid, Aceton, Isopropanol und Methanol. Obwohl Isopropanol mit Sephadex LH-20 eine sehr gute Trennung der pflanzlichen Begleitstoffe von den BaP-dionen bietet, ist die Elution von sehr großer Dauer und mit einem großen Lösungsmittelverbrauch verbunden (Abb. 22). Das beste Ergebnis erbrachte die Mischung Isopropanol/Methanol (50:50) in Verbindung mit der stationären Phase Sephadex LH-20 (Abb. 23). Die pflanzlichen Begleitstoffe eluierten wegen ihrer größeren Molekulargewichte vor der Fraktion, die BaP-dione enthielt. Die Säule für die Voruntersuchungen besaß einen Durchmesser von 16 mm und die Füllhöhe war 160 mm. Weil sie nicht in der Lage war, größere Menge an pflanzlichen Begleitstoffen zu verkräften, wurde sie für die späteren Probenuntersuchungen gegen eine Säule mit einem Durchmesser von 26 mm und einer Füllhöhe von 300 mm ausgetauscht.

Die Ermittlung der Fraktionen erfolgte mit einem UV-Detektor.

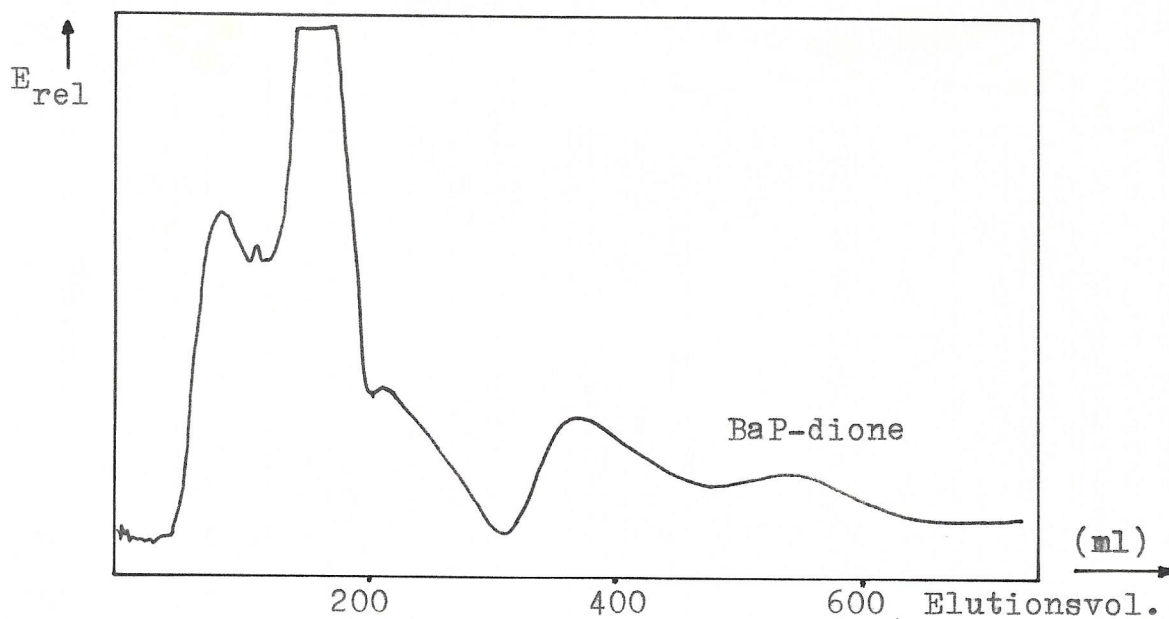


Abb. 22: Eluogramm der BaP-dione-Trennung von pflanzlichen Begleitsubstanzen. Stationäre Phase: Sephadex LH-20, mobile Phase: Isopropanol

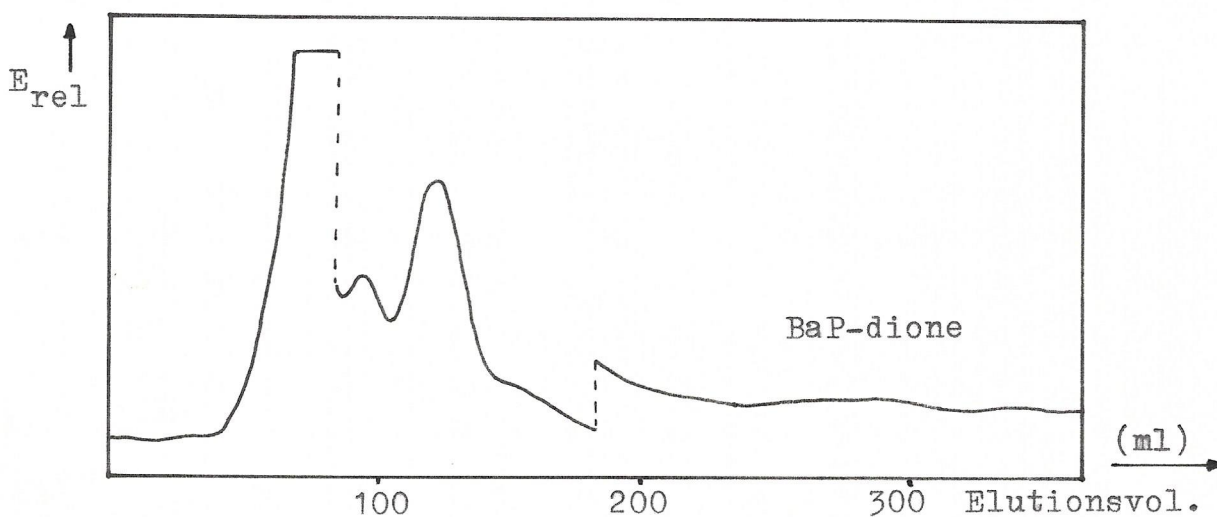


Abb. 23: Eluogramm der BaP-dione-Trennung von pflanzlichen Begleitsubstanzen. Stationäre Phase: Sephadex LH-20, mobile Phase: Isopropanol/Methanol (50:50)

Die Elution der BaP-dione erfolgte im Bereich von 230 bis 315 ml des Isopropanol/Methanol-Eluates. Die ersten Fraktionen (pflanzliche Begleitsubstanzen) wurden verworfen. Das Betreiben der gelchromatographischen Säulen kann nicht unter Verwendung der Schwerkraft erfolgen, deswegen wurde eine Flüssigkeitsfördernde Pumpe verwendet, um Elutionsdrücke von 2 bar zu erreichen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 9,7 ml/h.

Dieser Reinigungsschritt war der zeitaufwendigste und benötigte eine Gesamtelutionszeit von ca. 30 Stunden. Die Säule wie auch alle Leitungen wurden lichtundurchlässig abgedichtet, um eventuelle negative Einflüsse des Lichtes auf die zu isolierenden BaP-dione auszuschliessen.

Die Trennung erfolgte automatisch an einer installierten Niederdruckanlage, die mit einem intern gesteuerten Fraktionensammler angeschlossen war (exper. Teil).

Die Radioaktivitätsüberprüfung erbrachte eine Effizienz des Verfahrens von 89-93%. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung (Kieselgel 60/CH₂Cl₂) zeigte, daß die BaP-dione soweit angereichert waren, daß eine quantitative Bestimmung möglich wäre.

2.10.3 Trennung und Bestimmung der Benzo[a]pyren-dione mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die isomeren Bezo[a]pyren-dione lassen wegen ihrer hohen Schmelzpunkte (¹²⁵) keine direkte Bestimmung durch die Gaschromatographie zu:

BaP-6,12-dion	324-326°C
BaP-1,6-dion	325-326°C
BaP-3,6-dion	295-296°C

Wie im Kapitel 2.7.4 berichtet, bedienen sich fast alle Ar-

beiten zur Trennung und Identifizierung der Benzo[a]pyren-
dione der Gradientenelution mit "reversed phase"-Materialien,
um eine ausreichende Trennung zu erzielen. Ohne Laufmittel-
gradienten kam Katz (38) aus. Es wurde eine ausreichende
Auftrennung der drei BaP-dione unter Verwendung einer ODS
Spherisorb-Säule mit 80% wässrigem Methanol ermöglicht.
Die Verwendung einer mit $-(CH_2)_3-Ph-NO_2$ -Gruppen modifizier-
ten Kieselgel-Säule Nucleosil 100-5NO₂ (Fa. Macherey-Nagel)
und der mobilen Phase n-Hexan/Chloroform (75:25) erbrachte
eine Basislinientrennung der BaP-dione unter isokratischer
Elution (Abb. 24).

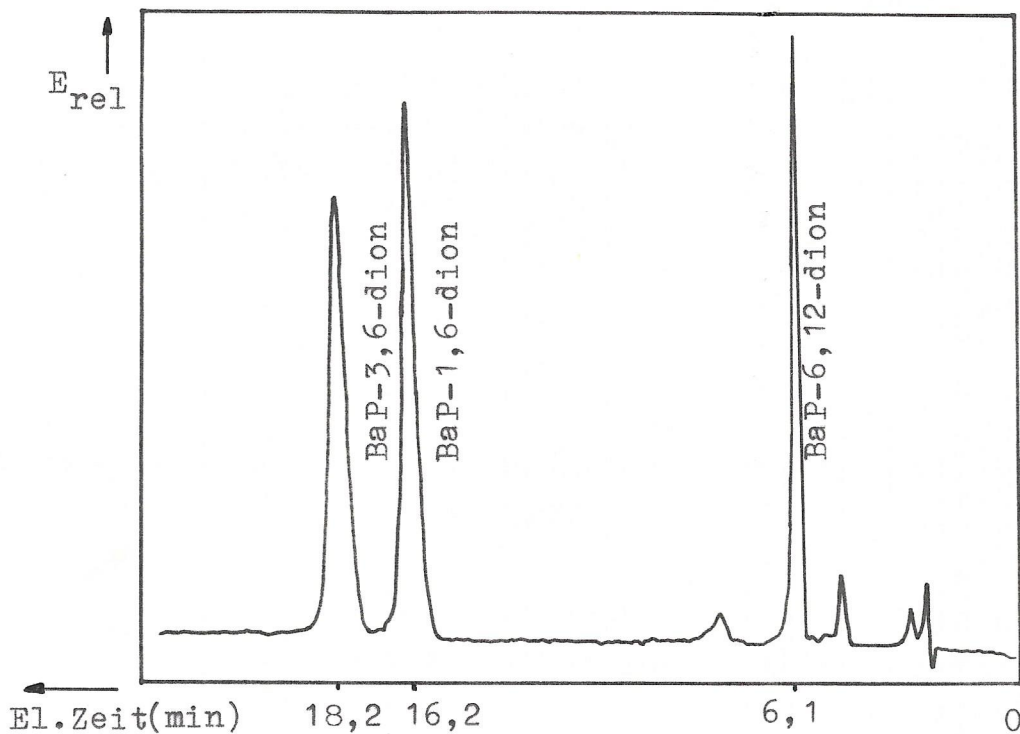


Abb. 24: Elutionsbild von BaP-6,12-, BaP-1,6- und BaP-3,6-dion.
Trennsäule: Nucleosil 100-5NO₂ (Korngröße: 5 µm)
200 mm x 40 mm (Macherey-Nagel). Mobile Phase: n-He-
xan/Chloroform (75:25)

2.10.4 Gelverteilungschromatographische Isolierung von BaP

Im vorigen Kapitel wurde die Trennung des BaP von den polarereren Bestandteilen der Pflanzen und von den Dienen unter Verwendung einer Lichroprep Si-60-Säule mit n-Hexan als mobile Phase besprochen. Das n-Hexan Eluat enthielt ausser BaP auch eine Reihe von unpolaren Substanzen pflanzlichen Ursprungs und mit dem gleichen Laufverhalten wie das BaP selbst bei den genannten Trennbedingungen. Deshalb wurde ein Reinigungsschritt durch Gelverteilungschromatographie an Sephadex LH-20 angeschlossen. Das Sephadex LH-20 wurde mit 85-prozentigem wässrigem Dimethylformid (DMF) imprägniert, das insgesamt als stationäre Phase diente. Als mobile Phase wurde DMF-gesättigtes n-Hexan verwendet (69,126). Die Säulendimensionen waren: Durchmesser 26 mm und Füllhöhe 115 mm. Durch die Sättigung von n-Hexan (leichte Trübung) kann es dabei unter Umständen bei der Elution zum Austreten von stationärer Phase in Tröpfchenform kommen. Dieser Effekt könnte verhindert werden, indem man eine Elution mit halbgesättigtem n-Hexan durchführt. Winkler (61) stellte aber unter Verwendung des halbgesättigten n-Hexans fest, daß eine Auswaschung der DMF-Imprägnierung erfolgt. Auf diese Weise würde die Gelverteilungssäule schon nach einer einzigen Elution unbrauchbar gemacht. Lässt man beim Sättigen des n-Hexans mit DMF/Wasser (85:15) das Gemisch nach mehrfachem Schütteln im Scheidetrichter über Nacht stehen, ist die n-Hexan-Phase klar und die genannten nachteiligen Effekte treten nicht mehr auf. Obwohl die Säule, nach Winkler (61), für etwa 20 Elutionen ohne Nachbehandlung einsetzbar wäre, wurde sie bei der vorliegenden Arbeit, nach je 5 bis 6 Elutionen, nachimprägniert.

Die Gelverteilungssäule wurde nach der Äquilibrierung mit dem Elutionsmittel (DMF/Wasser-gesättigtes n-Hexan) bei einem Druck von 0,2 bar und einem Durchfluß von ca. 96 ml/h betrieben.

Die pflanzlichen polaren Begleitsubstanzen eluierten am Anfang

der Elution, wobei die ersten Spuren von BaP nach 170 ml Elutionsmischung dünnschichtchromatographisch erkennbar waren. Die Hauptfraktion des BaP erschien im Bereich von 250 bis 270 ml. Die ersten 170 ml wurden verworfen und das Elutionsvolumen 170 bis 500 ml weiter behandelt. Die vorsorglich im großen Bereich gesammelte BaP-Fraktion wurde im Scheidetrichter mehrmals mit Wasser DMF-frei gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 (vorgereinigtes) getrocknet und im Rotationsverdampfer bei gedämpftem Licht und einer Wasserbadtemperatur unter 30°C bis fast zur Trockene eingeeengt (ca. 2-3 ml Lösung). Das restliche n-Hexan wurde vorsichtig mit einem Stickstoffstrom ausgeblasen. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte eine vollständige Reinigung. Der Einsatz von radioaktiv markiertem BaP erwies eine Ausbeute des Verfahrens von über 97%. Das so isolierte BaP, wie auch die mitteluierten PAH aus der pflanzlichen Matrix konnten anschliessend einer quantitativen Bestimmung unterworfen werden (kap. 2.10.5).

Bei diesem Anreicherungs-schritt werden in dem ersten Bereich (bis 170 ml) zusammen mit den pflanzlichen Begleitstoffen auch die PAH mit drei Ringen entfernt. Wegen der fehlenden Kanzerogenität dieser PAH kann auf ihre Bestimmung verzichtet werden. Bei der quantitativen Bestimmung von Benzo[a]pyren enthält seine Fraktion der Gelverteilungschromatographie PAH, die ringzahlmässig über Fluoranthen liegen. Die Gelverteilungssäule wurde nach jeder Elution mit ca. 300 ml Elutionsgemisch gewaschen. Das Verfahren benötigte 5 bis 6 Stunden Elutionszeit. Um einen eventuellen Zerfall des Benzo[a]pyrens während der Trennung auszuschliessen, wurde die Säule wie auch alle Leitungen lichtundurchlässig abgedichtet. Die Gelverteilungschromatographie wurde an einer Niederdruckanlage mit automatischer Steuerung eines Fraktionensammlers betrieben.

2.10.5 Trennung und Bestimmung von Benzo[a]pyren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographische Verfahren zur Trennung und Identifizierung der PAH untereinander wurden im Kapitel 2.7.4 beschrieben.

Die Benutzung einer Chromspher PAH-Säule (Fa. Chrompack) erbrachte die gewünschte Trennung der PAH untereinander, sodaß die Bestimmung des Benzo[a]pyrens unter isokratischen Bedingungen möglich wurde. Die Säule-Dimensionen betragen 200 mm x 30 mm und das Elutiongemisch war Methanol/Wasser (87:13). Zur Detektion wurde die selektive Fluoreszenzmessung des BaP eingesetzt, wobei in diesem Bereich eine Fluoreszenzlöschung der anderen PAH erfolgte. Dadurch verstärkte sich der BaP-Peak erheblich (Abb. 25).

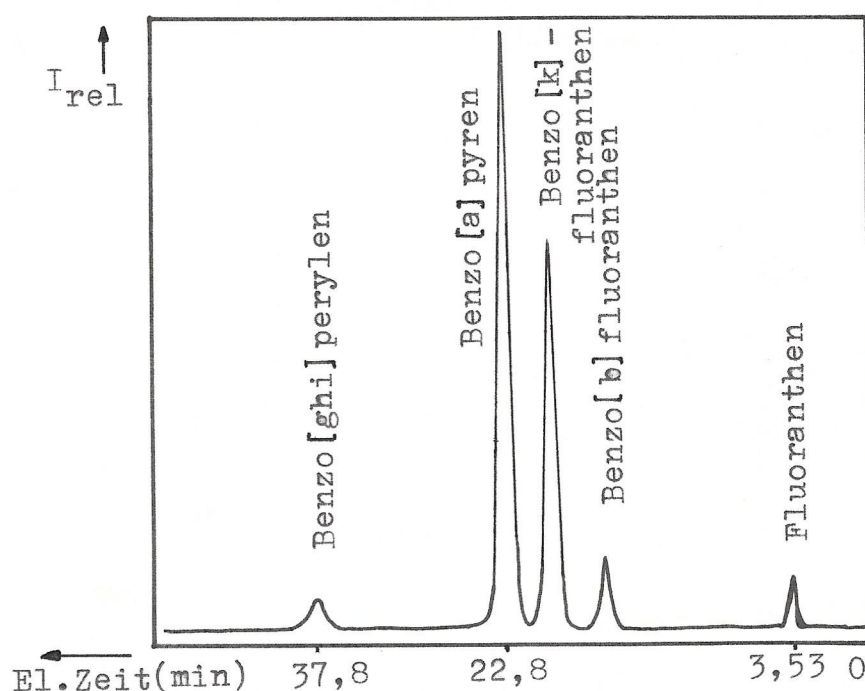


Abb. 25: Elutionsbild eines Testgemisches, aus 6 PAH nach der Trinkwasserverordnung. Säule: Chromspher PAH, mobile Phase: MeOH/H₂O (87:13). Flußrate: 0,8 ml/min $\lambda_{an}=262$ nm, $\lambda_{em}=403$ nm. Einspritzung: 5 μ l

Das Anregungs- und Emissions-Spektrum des Benzo [a] pyren wurde im Methanol/Wasser (87:13) aufgenommen und als Anregungswellenlänge $\lambda_{an}=262$ nm ausgewählt. Die Detektion erfolgte bei $\lambda_{em}=403$ nm, dem Maximum des Emissionsspektrums (Abb. 26b).

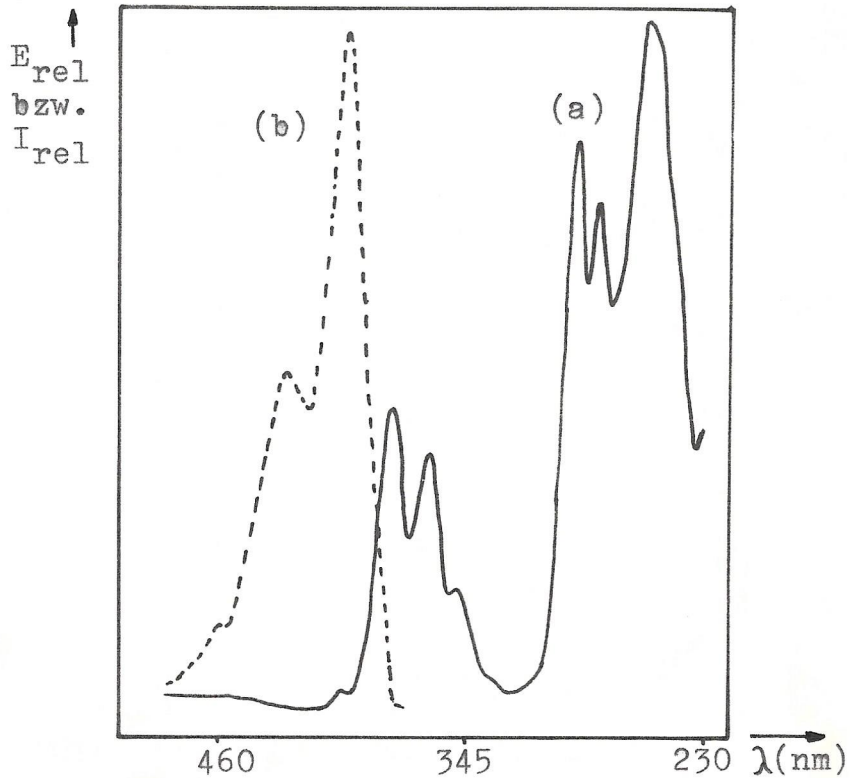


Abb. 26: a) Anregungsspektrum des Benzo [a] pyrens
b) Emissionsspektrum des Benzo [a] pyrens

Die Überprüfung der Trennung des PAH-Testgemisches bei Verwendung der Absorptiondetektion bei 254 nm (Abb. 27) verdeutlichte die Vorzüge der Fluoreszenzdetektion.

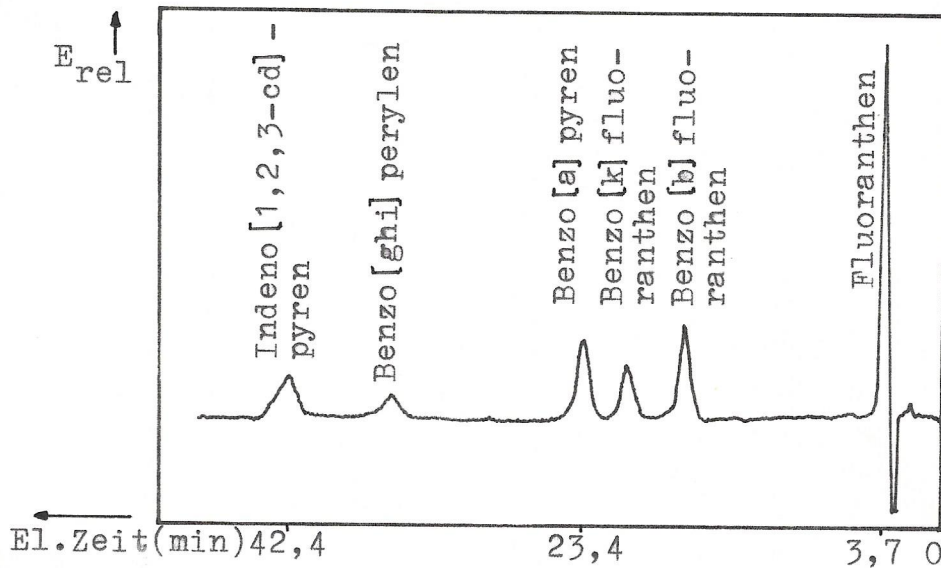


Abb. 27: Elutionsbild eines Testgemisches aus 6 PAH nach der Trinkwasserverordnung. Säule: Chromspher PAH, mobile Phase: MeOH/H₂O (87:13). Flußrate: 0,8 ml/min. UV-Detektion bei 254 nm. Einspritzung: 10 µl

Die Identifizierung der verschiedenen Peaks sowohl bei der UV- wie auch bei der Fluoreszenz-Detektion erfolgte durch Einspritzung einzelner Testsubstanzen.

Ausser den im Eluogramm genannten PAH wurden eine Reihe von PAH überprüft, um die Sicherheit der ungestörten Elution des Benzo [a] pyren zu bekräftigen. Unter Verwendung der gleichen oben genannten Bedingungen (siehe Abb. 27) wurden folgende Retentionszeiten ermittelt (Tab. 5).

Substanz	Retentionszeit (in Minuten)	Fluor.Detekt. ($\lambda_{an}=262/\lambda_{em}=403$)	UV-Detekt. (254)
Phenanthren	3,3	(+)	(+)
Anthrazen	3,42	(+)	(+)
Fluoranthren	3,53	(+)	(+)
Pyren	6,1	(+)	(+)
Chrysen	2,8	(+)	(+)
Benzo[b] - fluoranthren	16,7	(+)	(+)
Benzo[k] - fluoranthren	20,1	(+)	(+)
Benzo [e]pyren	14,3	(+)	(+)
Benzo [a]pyren	22,8	(+)	(+)
Indeno [1,2,3- cd]pyren	43,6	(-)	(+)
Benzo [ghi] - perylen	37,8	(+)	(+)

Tab. 5: Retentionszeiten und Detektion der PAH.

Säule: Chromspher PAH, mob. Phase: MeOH/H₂O (87:13)

Flußrate: 0,8 ml/min. Fluoresz.- u. UV-Detektion

(+) Detektion möglich, (-) Detektion unmöglich

2.10.6 Extraktion und Anreicherung aus Bodenproben

Bodenproben des Flughafens Echterdingen bei Stuttgart wurden analog den Pflanzenproben aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.10). Die Bodenproben (1000 g) wurden aus der Flugschneise entnommen und am gleichen Tag aufgearbeitet. Zur Extraktion wurden 500 ml Methylenchlorid verwendet, wobei die Probe und das Lösungsmittel in einen Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) gegeben und auf einer Schüttelmaschine über 5 Stunden geschüttelt wurden. Das Methylenchlorid wurde mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die organische Phase wurde nach der Filtration über eine Glasfritte vorsichtig am Rotationsverdampfer (Zimmertemperatur) eingeeengt und mit einer n-Hexan/ CH_2Cl_2 Mischung (80:20) aufgenommen. Die Kieselgel Filtration erfolgte über Lichroprep Si-60 (7 g) und mit n-Hexan als Elutionsmittel. Es wurde mit n-Hexan bis zur Farblosigkeit des Eluats eluiert. Diese Fraktion beinhaltete die PAH-Fraktion und weitere bodenbedingte Begleitsubstanzen. Nach Einengen des n-Hexan wurde über der Gelverteilungssäule chromatographiert (analog Kapitel 2.10.4), und das Eluat nach Entfernung des DMF durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie ausgewertet.

Die Lichroprep Si-60-Säule wurde anschliessend mittels CH_2Cl_2 chromatographiert (im Gegensatz zu den pflanzlichen Proben mit MeOH), um eine weitere Reinigung aus den sehr polaren Begleitstoffen zu erreichen. Nach einer Elution mit Methanol über RP-18 (2 g) wurde die vordere Methanol-Fraktion (20 ml) nach dem Einengen der gelchromatographischen Trennung (analog Kapitel 2.10.2) unterworfen.

Die dünnschichtchromatographische Überprüfung (Kieselgel 60/ CH_2Cl_2) konnte keine Benzo[a]pyren-dione aufweisen, obwohl die Dünnschichtchromatographie (acet. Cellulose/Aceton/Ethanol/Wasser 25:60:15) wie auch die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie einen hohen Gehalt an Benzo[a]pyren ergaben (siehe Kapitel 2.16.1).

2.11 Probenvorbereitung und Anreicherung von BaP und BaP-dionen aus geräucherten Fleischwaren (Rauchfleisch)

2.11.1 Extraktion

Fleischerzeugnisse (oder Fische) die an offenem Feuer (bzw. Kohle) gegrillt oder in einer Räucherungsanlage geräuchert werden, stellen einen Risikofaktor der Kanzerogenität dar. Um die Kontamination der Waren quantitativ zu erfassen, sind eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden.

Allgemein beinhalten geräucherte Waren einen relativ hohen Anteil an Fetten, die bei der Extraktion der Proben mitextrahiert werden und den Analyse- und Bestimmungsvorgang in hohem Maße stören.

Die Verseifung von fettreichen Proben mittels einer methanolischen KOH-Lösung unter Rückfluß, ist das meist verwendete Verfahren (127, 128, 129, 130, 131, 132, 133). Boris und Gasc (134) untersuchten BaP in Haushaltslebensmitteln unter Verwendung einer 10 proz. ethanolischen KOH-Lösung zur Verseifung der Proben. Es wird auch über die Verwendung von Methanol (135), Aceton (133), 1,1,2-Trichlor-1,2,2-trifluoroethan (136) und Cyclohexan (137) als Extraktionsmittel zur Isolierung und Bestimmung von BaP (bzw. PAH allgemein) berichtet.

Yasuhide (138) verwendete eine n-Hexan/Ether-Mischung (4:1), um BaP aus Lebensmitteln zu isolieren.

Chloroform (119), Methylenchlorid (139) und Petrolether (140) wurden ebenfalls als Extraktionsmittel angewandt.

Bei allen bekannten Verfahren wurden die zu untersuchenden Proben zerkleinert und anschliessend extrahiert, um eine grössere Freisetzung der PAH aus der Matrix zu erreichen.

Die Auswahl des Extraktionsmittels sowie des Analyseverfahrens wurde durch die Zielsetzung der Anreicherung und Bestimmung der eventuell vorhandenen Photooxidationsprodukte von BaP (BaP-dione) auf geräucherten Fleischwaren erschwert.

Das Extraktionsmittel sollte in der Lage sein, die polaren BaP-dione aus der Matrix zu lösen wie auch eine substanzschonende Analyse zu erlauben. Chloroform und Methylenchlorid als Lösungsmittel erlaubten eine Extraktion sowohl des BaP wie auch seiner isomeren Dione. Bei dieser Auswahl braucht nicht in der Siedehitze extrahiert zu werden, was eine Zersetzung der Dione zur Folge hätte. Die zerkleinerten Proben (20 bis 50 g) wurden mit Chloroform versetzt und in einem Erlenmeyerkolben (mit Einkerbungen im Bodenbereich) auf einer Schüttelmaschine über Nacht extrahiert. Die Proben wurden ausserdem mit Na_2SO_4 und Seesand versetzt, um eine gleichzeitige Trocknung wie auch Verreibung der Oberfläche zu erreichen. Der Nachteil dieser Extraktion lag bei der Mitextraktion von grösseren Mengen Fett, die das Analyseverfahren erschwerten.

2.11.2 Vorreinigung und Trennung

Bei der Methode von Grimmer (128) wurde das Probenmaterial zuerst vollständig mittels methanolischer KOH verseift. Die weitere Extraktion und Anreicherung der PAH gelang durch mehrfache Flüssig-Flüssig-Verteilung, wobei die Löslichkeit dieser Stoffe in verschiedenen Gemischen von N,N-Dimethylformamid (DMF) und Wasser ausgenutzt wurde. Eine Kieselgel Säule diente für eine Vorreinigung der PAH, wobei die Gel-Chromatographie an Sephadex LH-20 die notwendige Reinigung des Extraktes für die gaschromatographische Bestimmung bot. Potthast und Eigner (119) extrahierten geräucherte oder gegrillte Fleischwaren mit Chloroform. Sie verwendeten Celite und eluierten mit Propylencarbonat, wodurch eine Befreiung der Probe aus dem mitextrahierten Fett erreicht wurde. Das Propylencarbonat wurde anschliessend verseift (NaOH-Lösung) und mit Petrolether extrahiert. Für die Reinigung des Extrakts wurde eine Florisil-Filtration durchgeführt.

Van Heddeghem (140) löste fettreiche Proben in tiefsiedendem Petrolether und extrahierte die Lösung mit einer 15 proz. Koffein-Lösung in 85-90% Ameisensäure. Die Ameisensäure-Phase wurde mit 2 proz. NaCl-Lösung versetzt und mit Petrolether extrahiert. Die Reinigung erfolgte mittels Kieselgelsäule und Petrolether/Benzol (3:1).

Untersuchungen der BaP-dione in methanolischer KOH-Lösung ergaben, daß das Verfahren nach Grimmer (128) nicht anwendbar ist (s. Kap. 2.13). Für die vorliegende Arbeit würde sich das Verfahren nach Potthast (119) eignen. Das Verfahren wurde durch geringfügige Modifizierung an die Problematik angepasst. Der Rauchfleischextrakt (wie oben berichtet) wurde über eine Glasfritte filtriert. Die Chloroform-Lösung wurde mit Celite versetzt und im Rotationsverdampfer zur Trockene einrotiert. Der auf Celite aufgezugene Rückstand wurde anschliessend auf eine Celite-Säule gegeben und durch Klopfen verdichtet. Die Säule wurde mit 2 cm Seesand überschichtet und mit Propylen-carbonat eluiert. Anschliessend wurde mit Wasser eluiert und die erste Fraktion der Propylen-carbonat-Elution aufgefangen (ca. 40 ml). Diese Fraktion wurde chromatographiert unter Verwendung einer "reversed phase" RP-18-Säule. Als Elutionsmittel diente eine Methanol/Wasser-Mischung (1:9). Durch diesen Reinigungsschritt konnte das Propylen-carbonat vom BaP/BaP-dione abgetrennt werden, sonst müßte man eine alkalische Verseifung (128) verwenden, der die BaP-dione nicht standhalten könnten. Um eine anschliessende Elution von BaP/BaP-dione zu erreichen, wurde das Elutionsmittel auf 100% Methanol umgestellt. Das Methanol-Eluat wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und vorsichtig eingeengt. Der ölige Rückstand wurde in Isopropanol aufgenommen (ca. 4 ml) und gelchromatographisch über Sephadex LH-20 gereinigt. Als Elutionsmittel wurde Isopropanol/Methanol (50:50) eingesetzt. Die ersten Fraktionen beinhalteten rauchfleischtypische Begleitsubstanzen wie auch Propylen-carbonat und gewisse Fettmengen. Nach 210 bis

330 ml Elutionsmittel eluierten das BaP und die BaP-dione. Die Ausbeuten des Verfahrens lagen bei 70 bis 75%. Die dünn-schichtchromatographische Überprüfung der LH-20/(Isopropanol/Methanol)-Elution zeigte eine Anreicherung, die eine Bestimmung von BaP und seiner isomeren Dione erlauben würde.

2.12 Stabilitätsüberprüfung von Benzo [a] pyren

2.12.1 Bestrahlung von Benzo [a] pyren auf Pflanzen

Endiviensalatsetzlinge wurden auf Blumenerde gepflanzt. Die Blattoberfläche der Pflanzen wurde mit radioaktivmarkiertem Benzo[a]pyren kontaminiert ($[7,10-^{14}\text{C}]$ -BaP in Methylenchlorid). Pro Pflanze wurden 0,2 mg BaP mit einer spezifischen Aktivität von $3,026 \cdot 10^9$ Bq/mol in 0,1 ml CH_2Cl_2 eingesetzt. Eine Reihe legte man der Belichtungsanlage (s. exp. Teil) und eine zweite der Herbst-Sonne vor. Die Expositionszeit lag bei 4 Wochen, entsprechend der notwendigen Zeit zwischen Anpflanzung und Ernte unter normalen Bedingungen in Gärtnereien. Als Versuchsort der unter atmosphärischen Bedingungen gewachsenen Pflanzen wurde ein Flachdach des Institutsgebäutes in Stuttgart, Azenbergstrasse 18, gewählt. Es ist so gelegen, daß ganztags Sonnenlicht auf die Versuchspflanzen fallen kann. Die geernteten Proben (nach 4 Wochen) wurden nach dem im Kapitel 2.10 geschilderten Verfahren aufgearbeitet. Die Identifizierung erfolgte dünn-schichtchromatographisch auf analytischen Kieselgel 60-Platten mit Methylenchlorid als Laufmittel. Radioaktivitätsmessungen unter Berücksichtigung der eingesetzten spezifischen Aktivität verhalfen zur quantitativen Bestimmung (Tab. 5).

zurückerhaltenes BaP in % des eingesetzten (µg an BaP)	isolierte BaP-dione in % des eingesetzten BaP (µg an BaP-dionen)
<u>a) unter der Herbst-Sonne:</u>	
70,8 (141,6)	3 (6,7)
53,8 (107,6)	2,2 (4,9)
44,8 (89,6)	1,7 (3,8)
<u>b) unter simuliertem Tageslicht:</u>	
70 (140)	1,2 (2,7)
67 (134)	1,7 (3,8)
55 (110)	1,3 (2,9)

Tab. 5: Stabilitätsüberprüfung von BaP an Pflanzen und
Ermittlung der entstandenen BaP-dion-Mengen

Eine weitere Reihe mit BaP-kontaminierten Endiviensalatsetzlingen wurde der Sommer-Sonne unter atmosphärischen Bedingungen ausgesetzt. Mit 50 µg (spez. Aktiv.: $1,86 \cdot 10^{11}$ Bq/mol) und 100 µg BaP (spez. Aktiv.: $9,34 \cdot 10^{10}$ Bq/mol) wurden je zwei Proben behandelt. Nach 4 Wochen wurden sie geerntet und wie im Kapitel 2.10 beschrieben aufgearbeitet (Tab. 6).

	<u>zurückerhaltenes BaP in %</u>	<u>(µg an BaP)</u>
a)	33	(16,5)
b)	13	(6,5)
c)	44	(44)
d)	43	(43)

Tab. 6: Isoliertes BaP nach Bestrahlung mit der Sommer-Sonne. a),b): 50 µg Proben; c),d): 100 µg Proben

Nach Reinigung der polaren Substanzen auf RP-18 (s. Kap. 2.10) wurde eine dünnschichtchromatographische Trennung an 20x20 analytischen Kieselgel 60-Platten (CH₂Cl₂) durchgeführt mit folgendem Ergebniss (Tab. 7):

isolierte BaP-dione in % des eingesetzten BaP
(ng an BaP-dionen)

	<u>a)</u>	<u>b)</u>	<u>c)</u>	<u>d)</u>
<u>BaP-6,12-dion</u>	0,1 (56)	0,16 (90)	0,4 (448)	0,1 (112)
<u>BaP-1,6-dion</u>	0,2 (112)	0,17 (95)	0,7 (783)	0,4 (448)
<u>BaP-3,6-dion</u>	0,3 (168)	0,22 (123)	0,5 (560)	0,58 (649)

Tab. 7: Isolierte BaP-dione nach Bestrahlung mit der Sommer-Sonne. a),b): 50 µg Proben; c),d): 100 µg Proben

Die analytischen DC-Platten erwiesen eine Vielfalt von radioaktiv markierten Zonen, die teilweise einen unpolaren wie auch grössten Teils einen polaren Charakter besaßen als die BaP-dione. Diese Verbindungen könnten als hydroxylierte Zerfallsprodukte von BaP angesehen werden, die aber nicht weiter verfolgt wurden. Ihrer prozentualer Anteil an eingesetztem BaP lag bei 2,5 bis 4,4%.

2.12.2 Bestrahlungsversuche von BaP an Rauchfleischproben unter simuliertem Tageslicht und unter UV-Bestrahlung

Die äussere Schale eines im Handel erworbenen Rauchfleisches wurde mit 100 µg radioaktiv markiertem $[7,10-^{14}\text{C}]$ -BaP (spez. Aktivität: $9,3 \cdot 10^{10}$ Bq/mol) kontaminiert. Eine Reihe von diesen radioaktiv behandelten Proben (50 bis 100 g) wurde in der Belichtungsanordnung (siehe exp. Teil) 7 Tage bestrahlt und eine zweite 1 Tag der UV-Bestrahlung (bei 254 nm) ausgesetzt. Nach Ablauf der Belichtungszeit wurden die Proben wie im Kapitel 2.11 beschrieben aufgearbeitet. Die analytische Verfolgung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60/ CH_2Cl_2) und die quantitative Bestimmung mittels der bekannten spezifischen Aktivität durch Radioaktivitätsmessungen. Es wurden folgende Ergebnisse an zurückisoliertem BaP ermittelt:

- | | |
|------------------------------|------|
| a) Bestrahlungsanordnung | 5,5% |
| b) UV-Bestrahlung bei 254 nm | 7,4% |

Die Untersuchungen haben ergeben, daß sowohl unter simuliertem Tageslicht als auch unter UV-Bestrahlung keine Photooxidationsprodukte in Form der isomeren BaP-dione zu isolieren waren. Die restliche Radioaktivität war in den Startzonen der dünnschichtchromatographischen Platten wiederzufinden. Die Identifizierung dieser Substanzen wurde nicht weiterverfolgt.

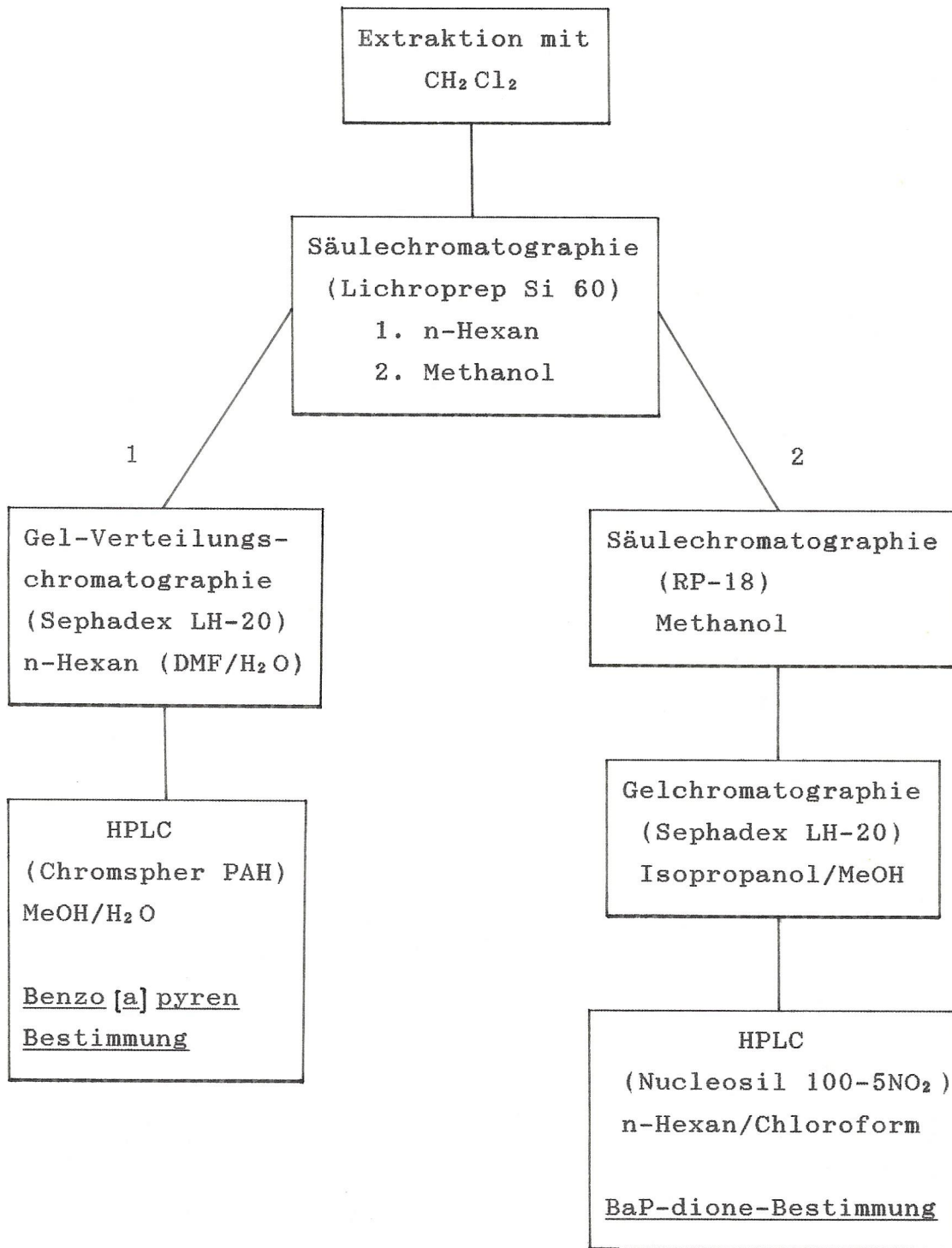


Abb. 28: Schematische Darstellung des Analyseweges zur Bestimmung des BaP und seiner Dione auf Pflanzen

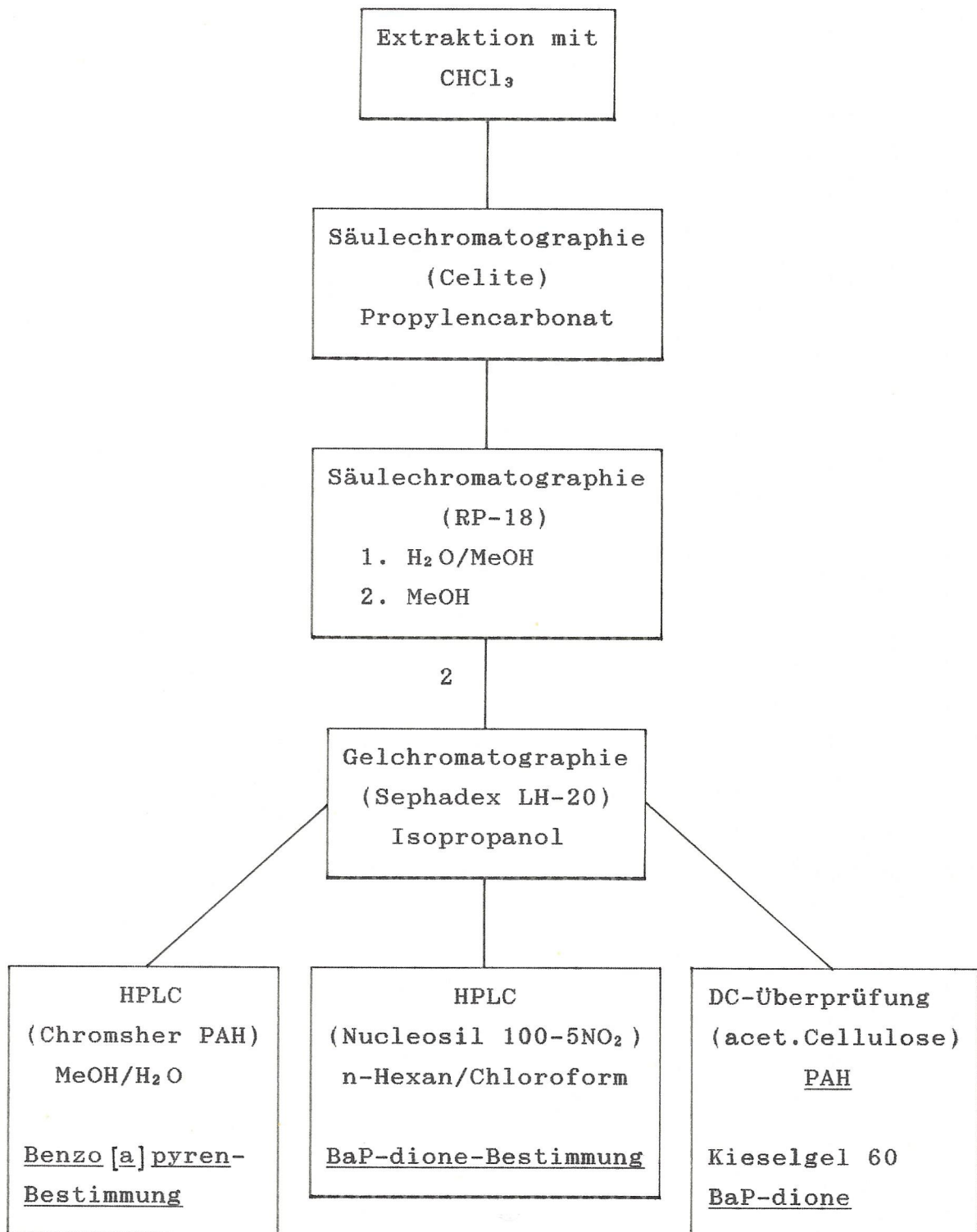


Abb. 29: Schematische Darstellung des Analyseweges zur Bestimmung von BaP/BaP-dione auf Rauchfleischproben

2.13 Stabilität von BaP und der BaP-dione unter den Bedingungen der alkalischen Verseifung

Radioaktiv markiertes Benzo[a]pyren sowie Benzo[a]pyren-dione wurden in 25 g KOH, 90 ml Methanol und 10 ml H₂O gelöst und 2 Stunden unter Rückfluß gekocht (methanolische KOH-Lösung). Diese Bedingungen werden bei der Anreicherung und Isolierung von BaP aus fettreichen Proben (128) angewendet. Die Aufarbeitung der Mischung wurde im alkalischen, neutralen bzw. im sauren Milieu durchgeführt, anschliessend mit Wasser verdünnt bis zur Auflösung des Niederschlags. Die Extraktion erfolgte unter Verwendung von Methylenchlorid. Der Extrakt wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und unter Verwendung von 20x20 cm analytischen Kieselgel 60-Platten (CH₂Cl₂) chromatographiert. Die Auswertung erfolgte über die spezifische Aktivität der eingesetzten Substanzen durch Radioaktivitätsmessungen (Tab. 8).

	BaP	BaP- 6,12-dion	BaP- 1,6-dion	BaP- 3,6-dion
a)	95	10,5	1,8	5,6
b)	90	0	0	0
c)	92	0	0	0

Tab. 8: Isoliertes BaP und BaP-Dione nach der alkalischen Verseifung in % der eingesetzten Mengen (je 20 µg).
a) Aufarbeitung nach Neutralisierung mit verd. HCl
b) Aufarbeitung nach Ansäuern mit verd. HCl
c) Direkte Aufarbeitung der alkalischen Lösung

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich wird, ist die Aufarbeitung von fettreichen Proben nur hinsichtlich des BaP unter Verwendung der alkalischen Verseifung relevant. Für die BaP-dione ist dieses Verfahrens nicht geeignet.

Die fehlende Radioaktivität war in den Startzonen der Chromatogramme wie auch in den wässrigen Phasen wieder zu finden. Diese Umwandlungsprodukte wurden nicht weiter untersucht.

2.14 Derivatisierung der BaP-dione

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß Versuche unternommen wurden, um die Identifizierung und Bestimmung der isomeren Benzo[a]pyren-dione zu erleichtern.

Ein besonderes Verfahren wird von Jäger (85) erwähnt. BaP wie auch BaP-dione werden dünnschichtchromatographisch von anderen Substanzen getrennt (Analyse von Luftverunreinigung). Die Bestimmung erfolgt durch Fluoreszenzmessung der isolierten Verbindungen bei -197°C . Bei diesem Verfahren liegen die Nachweisgrenzen bei $0,5 \mu\text{g/ml}$. Obwohl eine Aufarbeitung dieser Art vorzuziehen wäre, scheint der apparative Aufwand sehr groß. Die ethanolischen Lösungen müssen (wie berichtet) 15 Tage in speziellen Glasküvetten belichtet werden, wobei die Lösungen eine blaue Fluoreszenz im UV-Licht aufweisen. Anschliessend werden von den bei -197°C gefrorenen Lösungen Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Alpert und Cavalieri (43) berichteten von der Dimethoxyderivatisierung der isomeren Benzo[a]pyren-dione. Sie verwendeten eine Dioxan-Lösung der genannten Dione, die unter Zugabe von 5N NaOH-Lösung unter Rückfluß gekocht wurde. Die Mischung wurde mit Zinkstaub in Benzol und mit Dimethylsulfat abwechselnd versetzt. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung in wässrige und organische Phase (Benzol) getrennt, wobei die organische Phase nach der Trocknung über MgSO_4 , über eine Aluminiumoxid-Säule (n-Hexan/Benzol 1:1) gerei-

nigt wurde. Die Umkristallisation aus n-Hexan/Benzol erbrachte Ausbeuten über 79%. Mit dieser Methode wurden 1,6-Dimethoxybenzo[a]pyren, 3,6-Dimethoxybenzo[a]pyren sowie 6,12-Dimethoxybenzo[a]pyren isoliert.

Takahashi (94) verwendete Lithiumaluminiumhydrid in Ether, um die BaP-dione unter Rückfluß (30 min) zu reduzieren. Anschliessend wurde mittels Pyridin/N,O-Di(trimethylsilyl)acetamid/Trimethylchlorsilan (2:2:1) silyliert. Die Trennung und Identifikation erfolgte gaschromatographisch sowie unter Verwendung eines Massenspektrometers. Über die Ausbeuten dieser Methode wurden keine Angaben gemacht.

Eigene Versuche zur Reduktion wurden eingestellt, weil die Vielfalt der dabei entstehenden Substanzen keine quantitativen Aussagen zulassen. Als Reduktionsmittels wurden Lithiumaluminiumhydrid wie auch Natriumborhydrid in Ether verwendet.

2.14.1 Derivatisierung der BaP-dione mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Bei der Suche nach Derivatisierungsmethoden für einen eventuellen Nachweis der isomeren BaP-dione durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie wurde die Derivatisierung der BaP-dione mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin entwickelt. 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde aus carbonylfreiem Methanol umkristallisiert. Die BaP-dione wurden mit Methanol (carbonylfrei) in einen Rundkolben gegeben und mit einer Lösung aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Methanol/H₂SO₄ konz. versetzt. Während der tropfenweisen Zugabe der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung wurde im Wasserbad gekühlt. Die Mischung wurde anschliessend am Rotationsverdampfer bei 30°C Wasserbadtemperatur gedreht (2 Stunden), dann unter leichtem Vakuum das Methanol abgezogen. Die verschiedenen Hydrazone-Lösungen zeigten dabei eine Farbveränderung:

BaP-6,12-dion	von gelb nach rot
BaP-1,6-dion	von gelb nach rot
BaP-3,6-dion	von gelb nach grün

Die entstandenen Hydrazone wurde aus der schwefelsauerer Lösung mit einer Mischung Tetrachlormethan/Methylenchlorid (4:1) extrahiert. Dabei ergab sich die für alle drei gebildeten Hydrazone typische blau-violette Färbung der organischen Phase. Diese Phase wurde mit Wasser schwefelsäurefrei gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die $\text{CCl}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und mit Aceton versetzt. Dadurch wird das im Überschuß eingesetzte 2,4-Dinitrophenylhydrazin zum entsprechenden Hydrazon umgesetzt. Die Aceton-Lösung wurde anschliessend der bei der BaP/BaP-dione-Trennung üblichen dünn-schichtchromatographischen Trennung (Kieselgel 60/ CH_2Cl_2) unterworfen, wobei die aufgetretenen Zonen, soweit sie radioaktiv markiert waren (bei radioaktiver Zugabe der BaP-dione), näher untersucht wurden. In diesem System zeichnete sich jeweils eine Zone pro eingesetztem Dion aus, die den Hauptteil der Radioaktivität besaß und im UV (bei 254 nm) wie auch im Sichtbaren eine blau-violette Färbung aufwies (für alle drei BaP-dion-Umsetzungen). Nach Optimierung des Verfahrens (wie oben beschrieben) wurden folgende Ausbeuten erzielt:

BaP-6,12-dion/Hydrazon-Umsetzung	95,5%
BaP-1,6-dion/Hydrazon-Umsetzung	97,7%
BaP-3,6-dion/Hydrazon-Umsetzung	82,8%

Durch inaktive Umsetzungen konnten die entsprechenden Zonen isoliert und spektrophotometrisch überprüft werden. Wie aus den UV/Vis-Spektren zu ersehen ist, erfolgte bei allen drei BaP-dionen eine Verschiebung der Absorptionsspektren ins Bathochrome (vergleiche UV/Vis-Spektren Abb. 30-35).

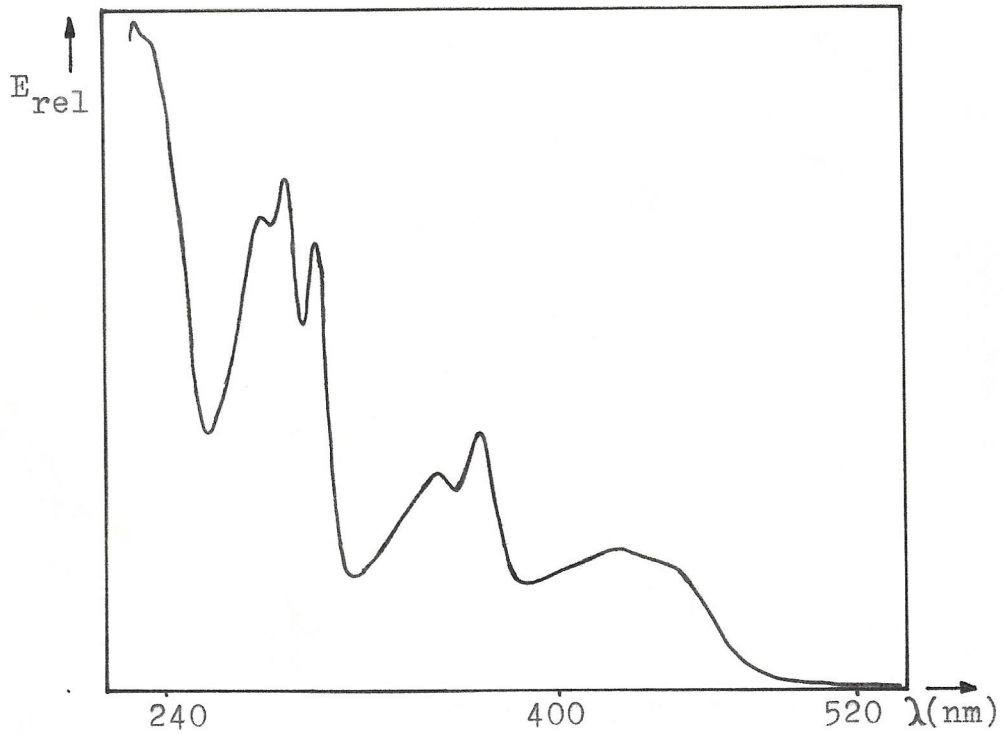


Abb. 30: UV/Vis-Spektrum von BaP-6,12-dion, aufgenommen in Methylenchlorid

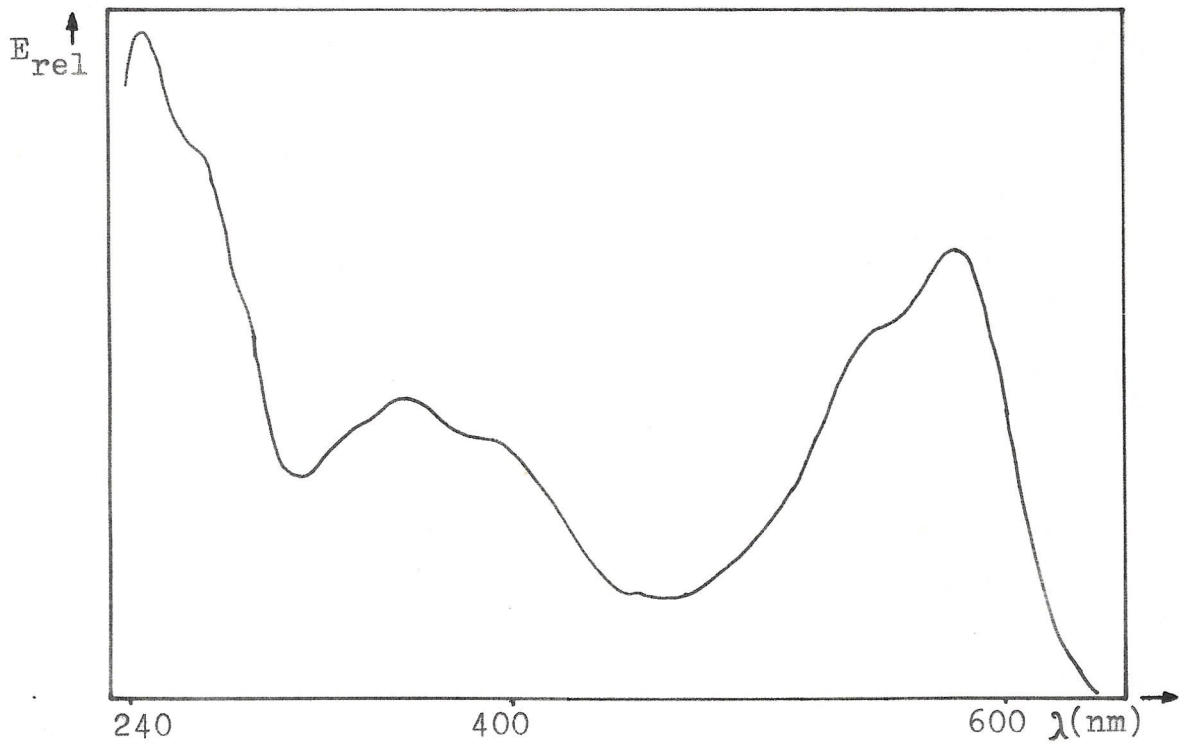


Abb. 31: UV/Vis-Spektrum von BaP-6,12-dion-hydrazone, aufgenommen in Methylenchlorid

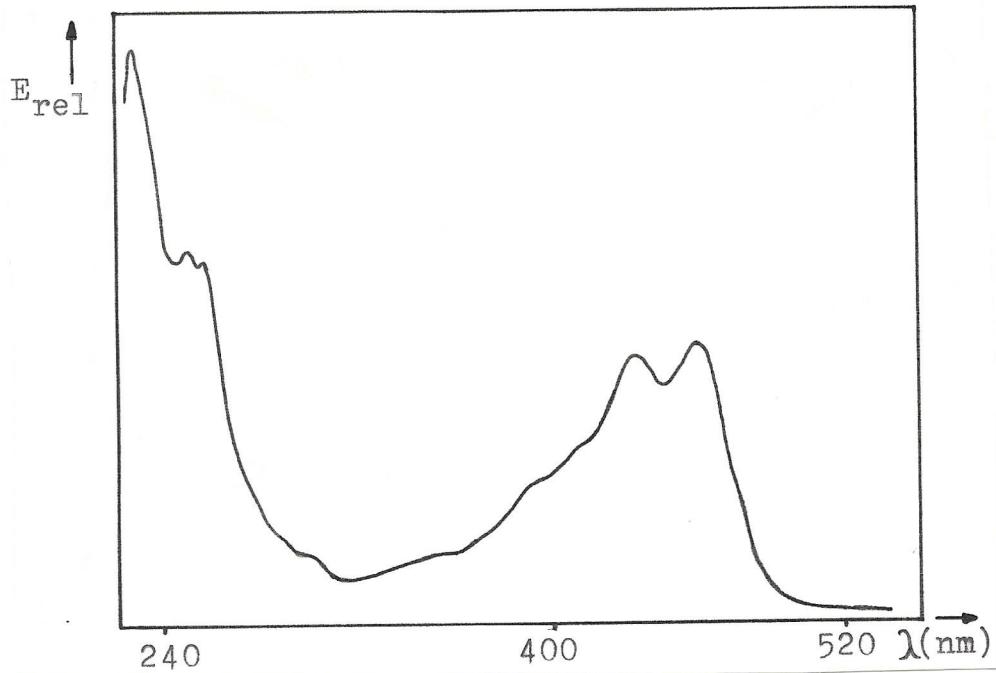


Abb. 32: UV/Vis-Spektrum von BaP-1,6-dion, aufgenommen in Methylenchlorid

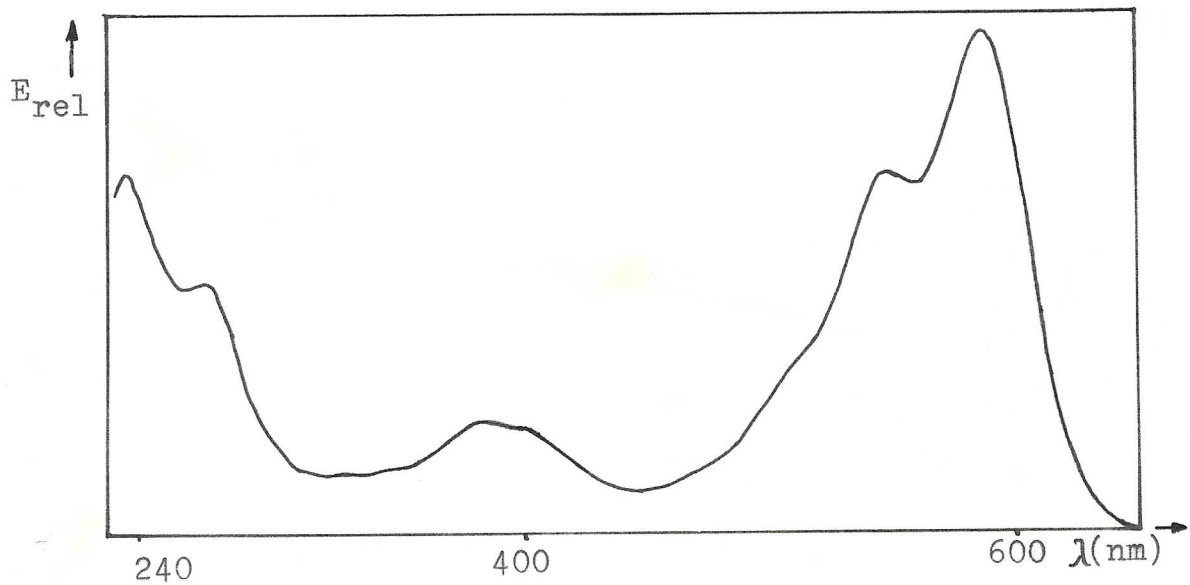


Abb. 33: UV/Vis-Spektrum von BaP-1,6-dion-hydrazone, aufgenommen in Methylenchlorid

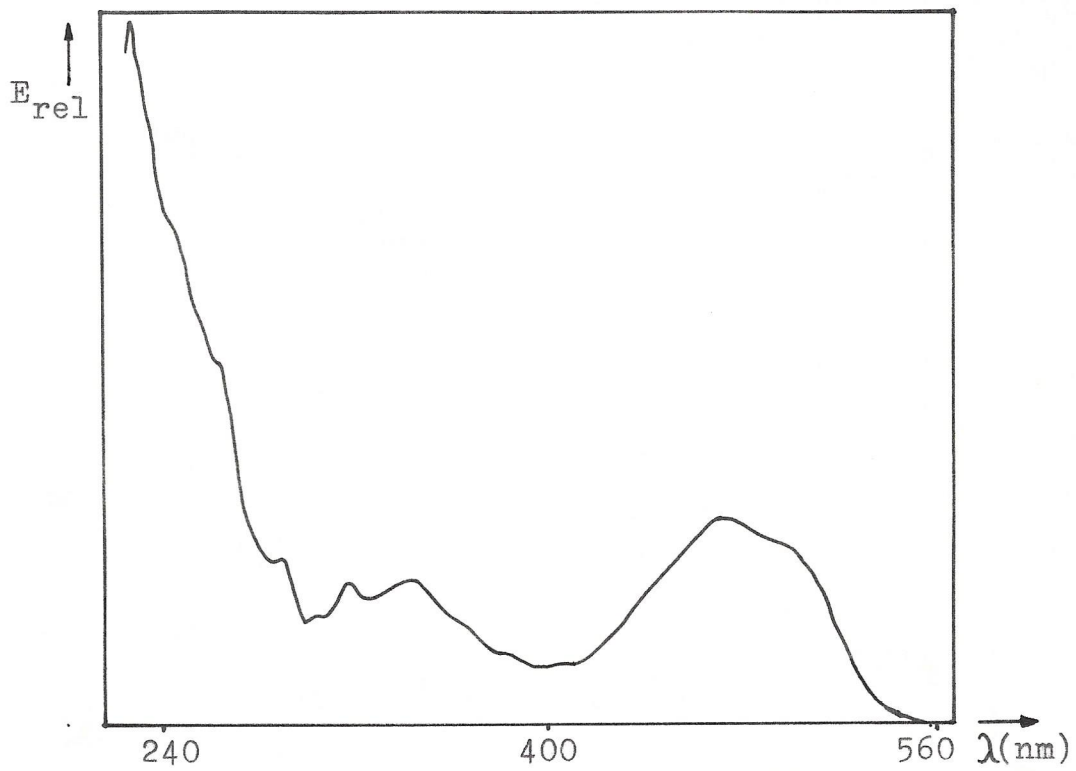


Abb. 34: UV/Vis-Spektrum von BaP-3,6-dion, aufgenommen in Methylenchlorid

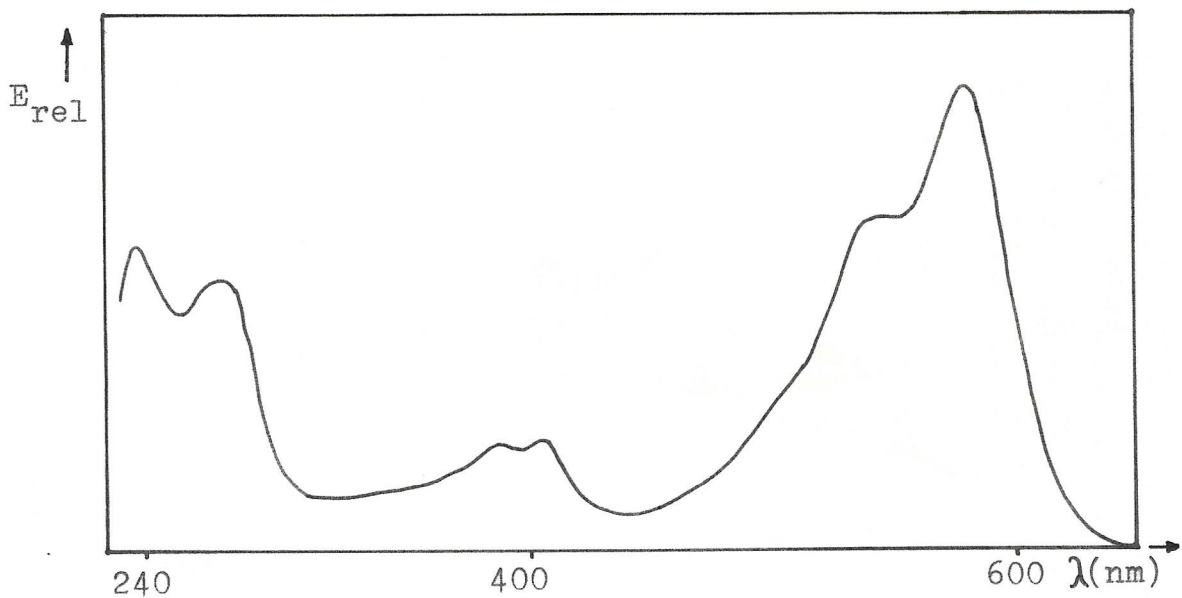


Abb. 35: UV/Vis-Spektrum von BaP-3,6-dion-hydrazone, aufgenommen in Methylenchlorid

Massenspektroskopische Untersuchungen ergaben den Hinweis der Monohydrason-Bildung mit einer Massenzahl (für alle drei dargestellten Hydrazone) von 462 (siehe Massenspektren Abb. 36-38). Durch hochauflösendes MS wurde die elementare Zusammensetzung der gebildeten Hydrazone gesichert, wobei die angenommene Summenformel $C_{26}H_{14}N_4O_5$ bestätigt wurde.

Bei der Hydrason-Derivatisierung der Dione konnte durch Fourier-Transformations Infrarot-Spektroskopie ausgesagt werden, daß die freistehende (bzw. nicht derivatisierte) Carbonylgruppe auch nach der Derivatisierung eine Ketofunktion darstellt und nicht zur Hydroxygruppe reduziert wird (siehe Abb. 39,41,43). Im Vergleich siehe IR-Spektren der BaP-dione (Abb. 40,42,44).

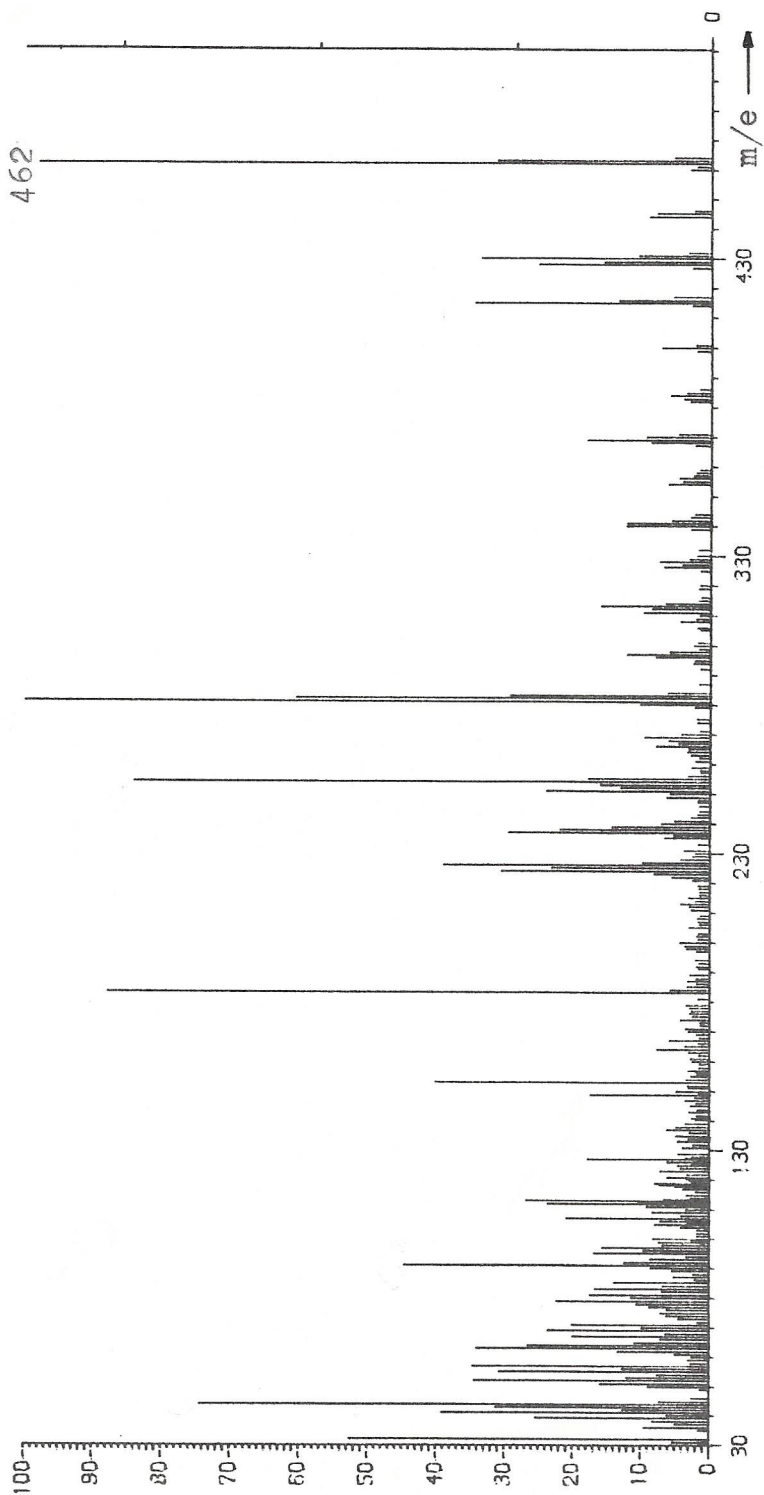


Abb. 36: Massenspektrum des Hydrazone-Derivates von BaP-6,12-dion. Molpeak (m/e)=462

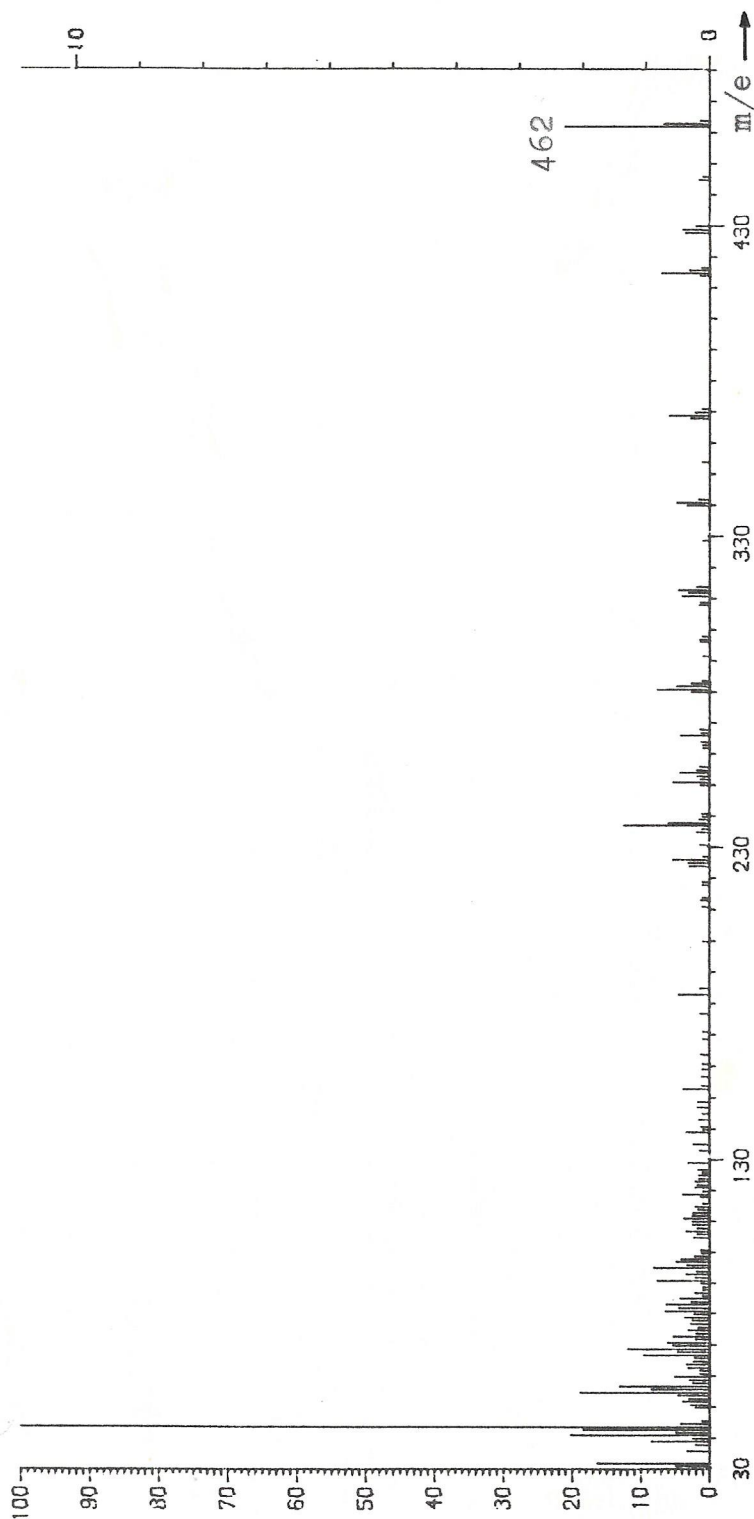


Abb. 37: Massenspektrum des Hydrazon-Derivates von BaP-1,6-dion. Molpeak (m/e)=462

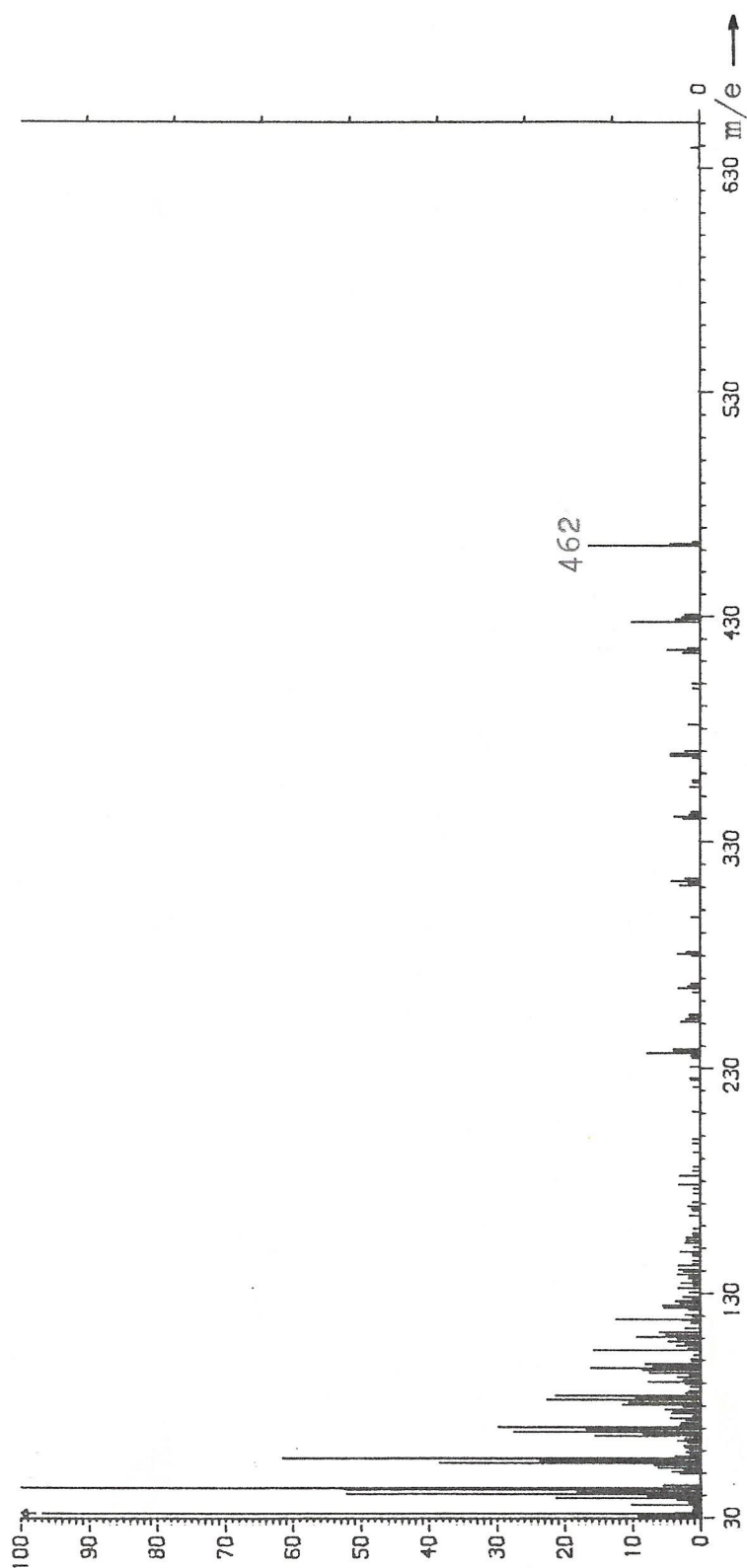


Abb. 38: Massenspektrum des Hydrazon-Derivates von BaP-3,6-dion. Molpeak (m/e)=462

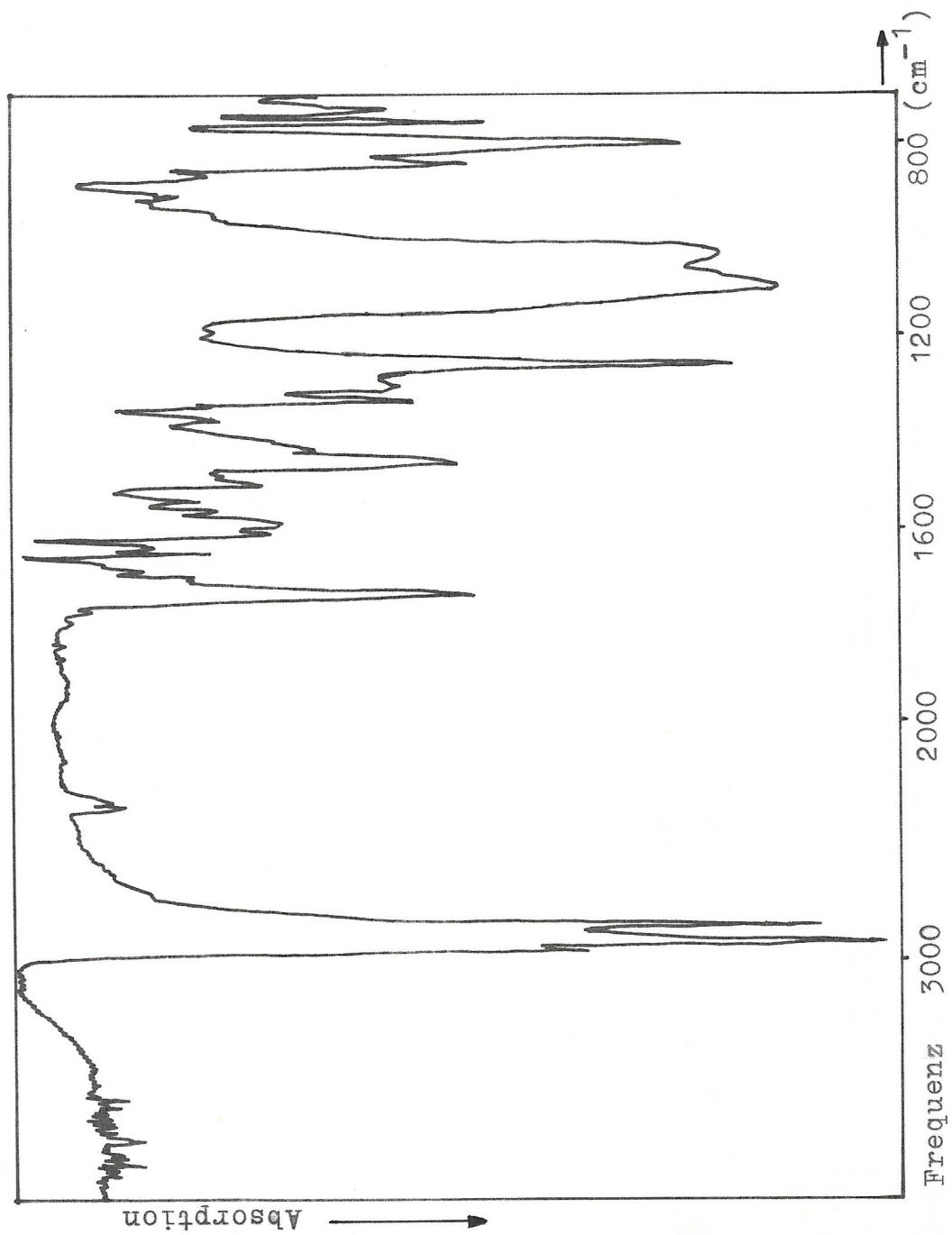


Abb. 39: IR-Spektrum des Hydrazone-Derivates von BaP-6,12-dion

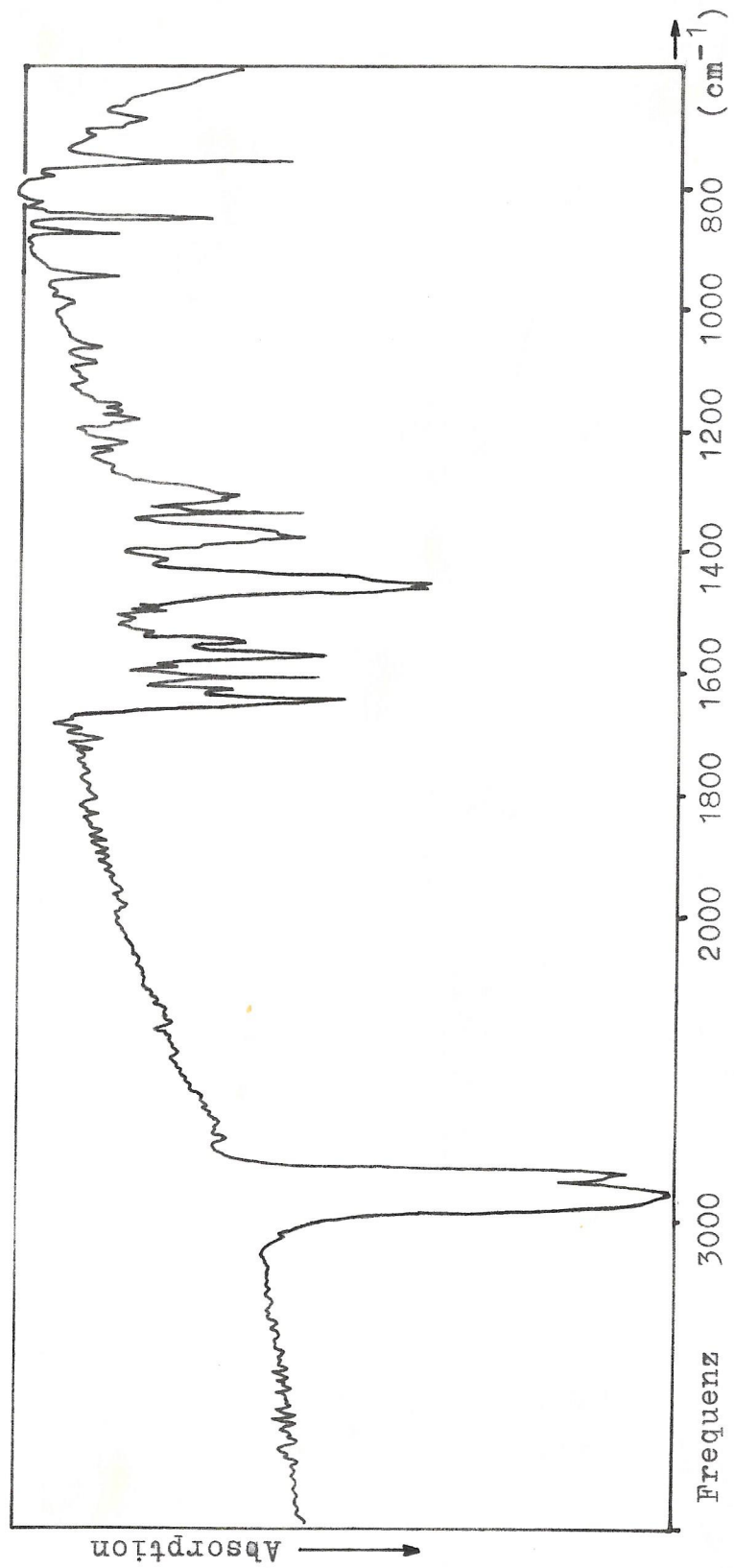


Abb. 40: IR-Spektrum von BaP-6,12-dion

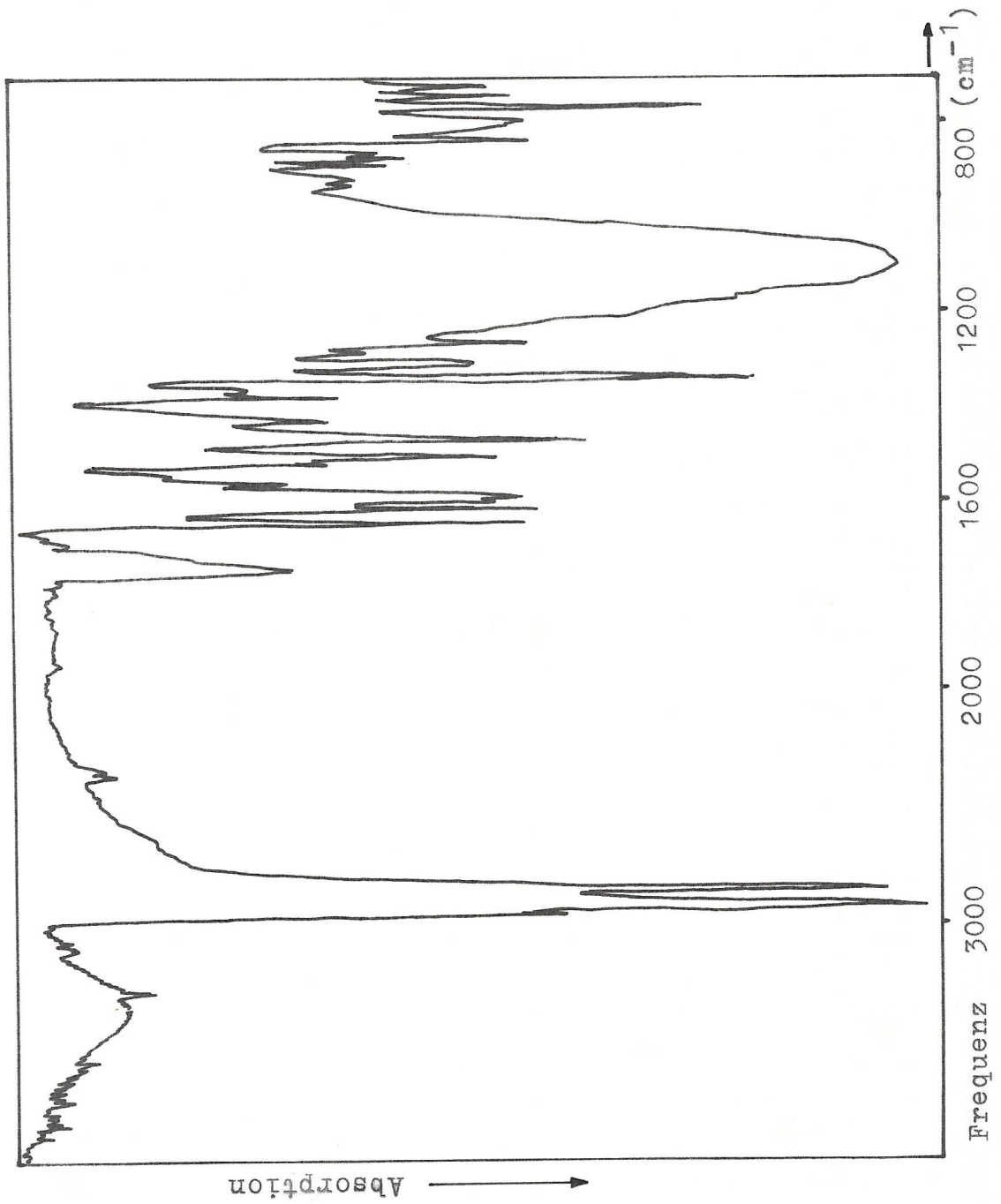


Abb. 41: IR-Spektrum des Hydrazon-Derivares von BaP-1,6-dion

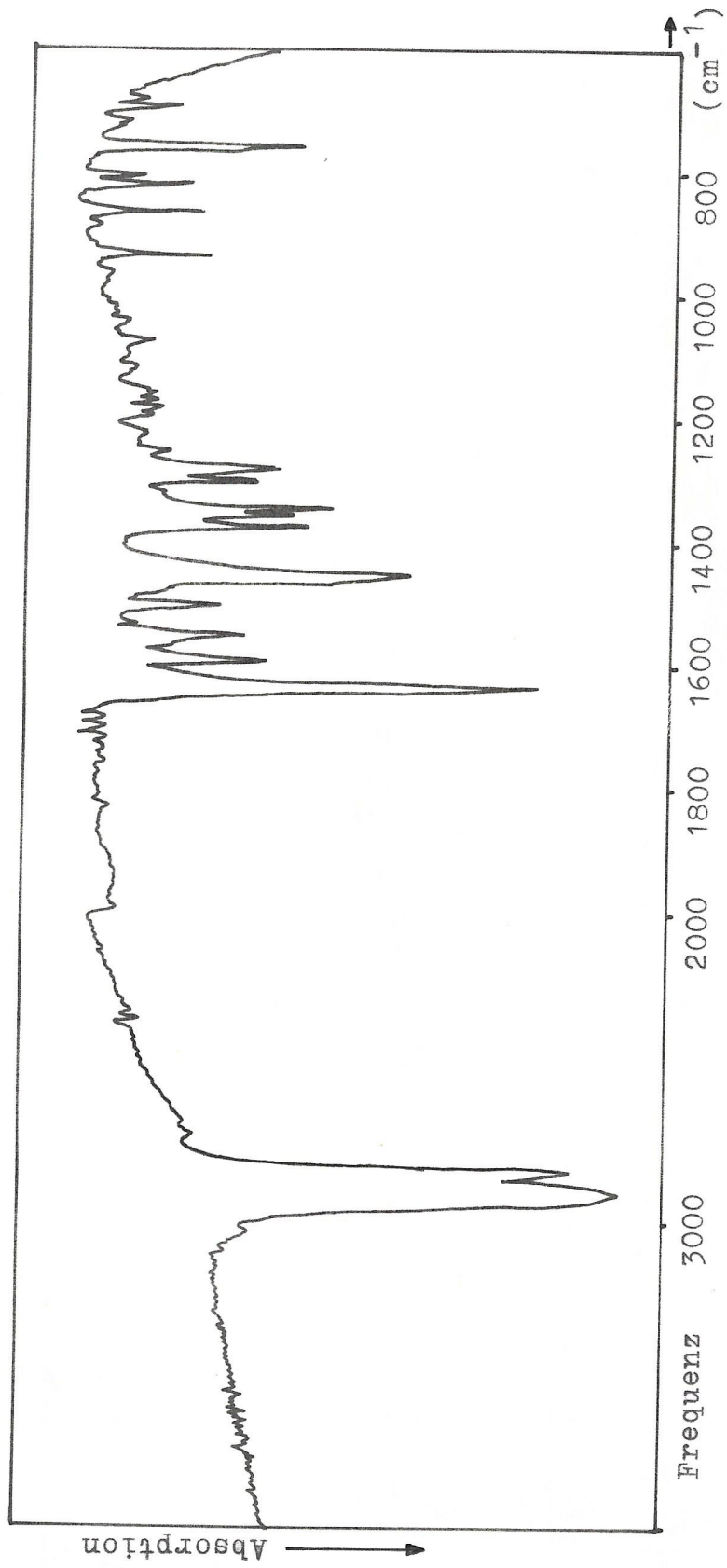


Abb. 42: IR-Spektrum von BaP-1,6-dion

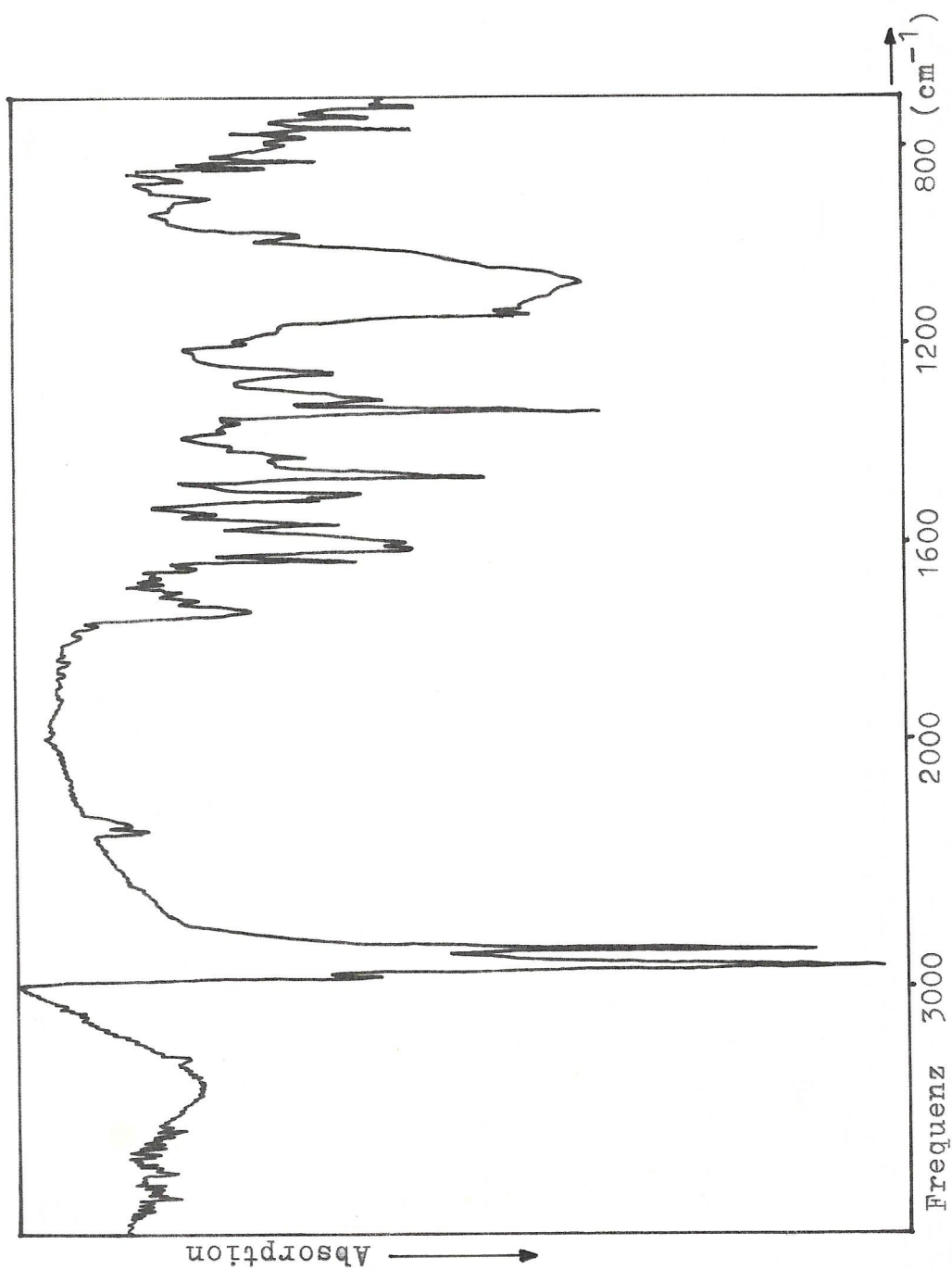


Abb. 43: IR-Spektrum des Hydrazon-Derivates von BaP-3,6-dion

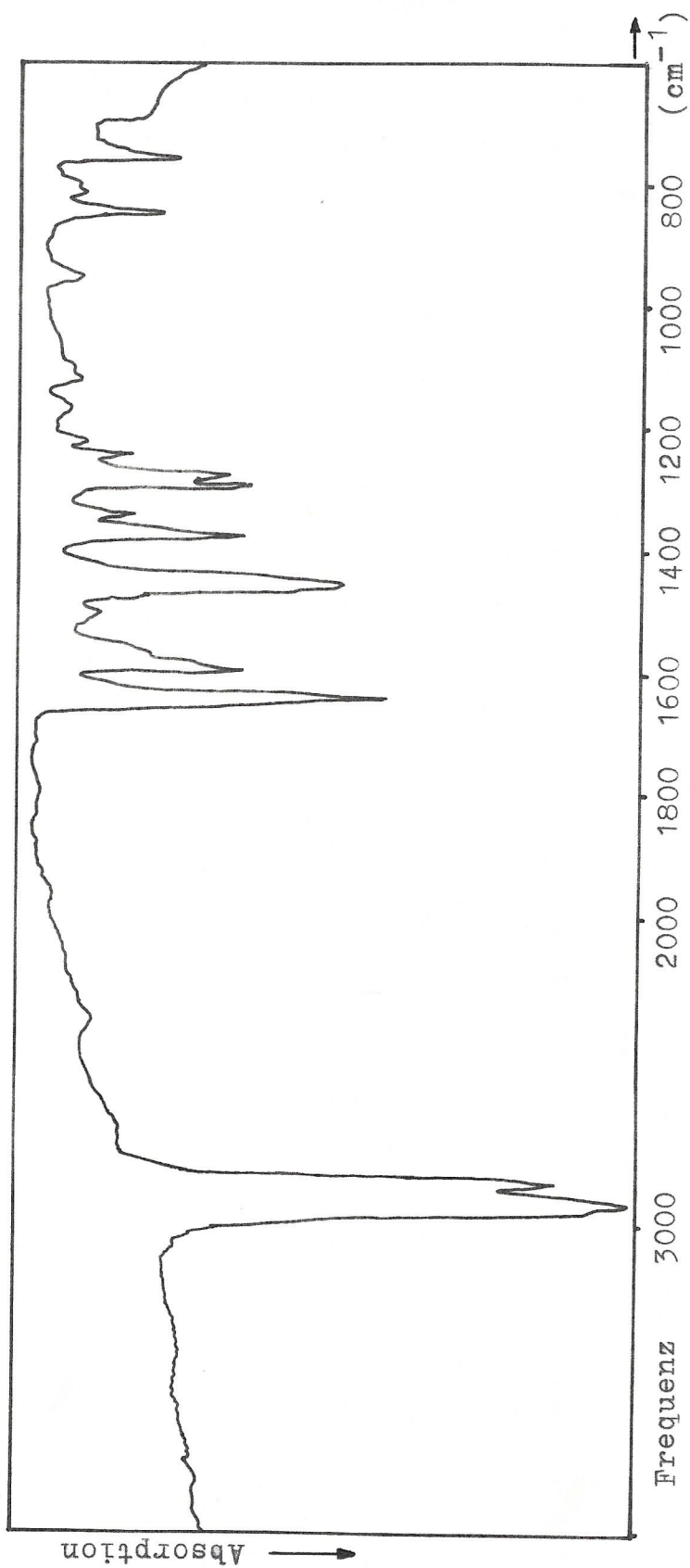


Abb. 44: IR-Spektrum von BaP-3,6-dion

2.14.2 Verwendung, Vorteile und Trennung

Die Hydrazone-Bildung der isomeren BaP-dione konnte eine direkte Anwendung für die Identifizierung der Dione finden. Als erstes konnte die schwefelsaure Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Methanol (0,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 20 ml Methanol und 5 ml H₂SO₄) als Sprühreagenz nach der dünnschichtchromatographischen Trennung eingesetzt werden. Die analytischen Kieselgel 60-Platten (mobil. Phase:CH₂Cl₂) wurden nach der BaP-dione-Trennung mit der oben genannten frisch hergestellten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung besprüht und anschliessend im Trockenschrank bei 130°C erhitzt. Die BaP-dione enthaltenden Zonen verändern ihre Farbe sowohl im Sichtbaren wie auch unterm UV-Licht (254 nm) von gelb bzw. rot nach blau-violett, die mit der Zeit wieder verschwindet.

Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone besitzen Extinktionskoeffizienten, die teilweise höher liegen als die der BaP-dione selbst (siehe unten).

Absorptionsmaxima in nm (in Klammern die zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten):

- a) BaP-6,12-dion-monohydrazon: 580 (35637), 540 (29506),
390 (21070), 350 (24115), 325 (31770), 270 (43292).
- b) BaP-1,6-dion-monohydrazon: 580 (53843), 545 (38213),
370 (12316), 260 (29395).
- c) BaP-3,6-dion-monohydrazon: 580 (57908), 540 (41892),
405 (14859), 385 (14343), 280 (35857).

Die Trennung dieser Derivate untereinander gelang auf Kieselgel 60-Platten unter Verwendung eines ternären Laufmittelsystems. Die Mischung bestand aus Tetrachlormethan, tertiär-Butylmethylether und Tetrahydrofuran im einem Verhältnis von 9:1:1. Die erzielte Trennung lieferte folgende Rf-Werte:

BaP-6,12-dion-monohydrazon: 0,71
BaP-1,6-dion-monohydrazon: 0,56
BaP-3,6-dion-monohydrazon: 0,47

Die Anwendung einer Lichroprep Si-60-Säule (Korngröße 5 μm) für die Hochleistungs-Flüssigkeitchromatographie erbrachte unter Benutzung der gleichen Elutionsmischung wie bei der Dünnschichtchromatographie (Tetrachlormethan/t-Butylmethylether/Tetrahydrofuran 9:1:1) eine Basislinientrennung der Monohydrazone bei isokratischen Elutionsbedingungen (Abb. 45). Die Detektion erfolgte bei 580 nm.

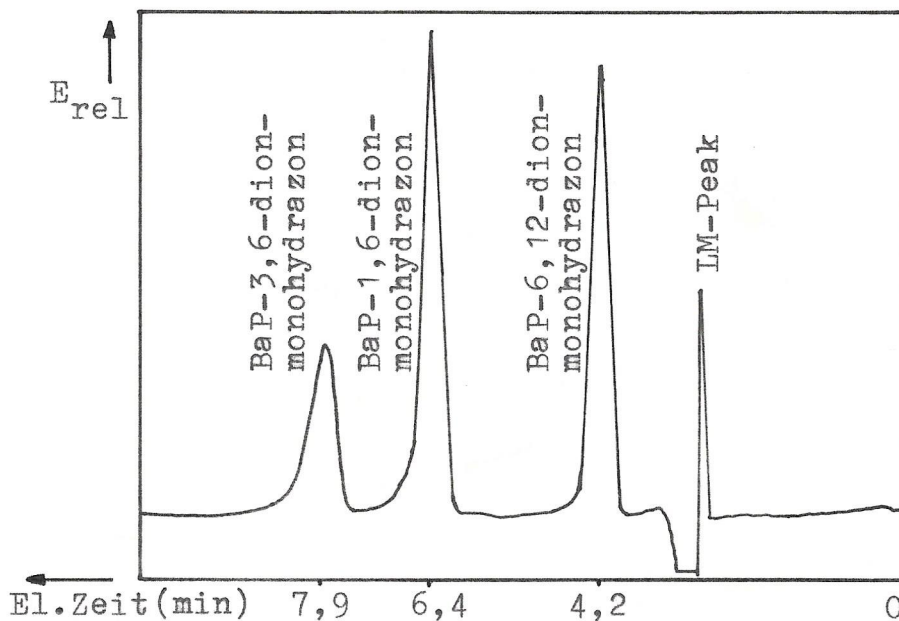


Abb. 45: Elutionsbild von a) BaP-6,12-dion-monohydrazon, b) BaP-1,6-dion-monohydrazon und c) BaP-3,6-dion-monohydrazon.

Trennsäule: Lichroprep Si-60 (Korngröße 5 μm) Merck
Fließmittel: Tetrachlormethan/t-Butylmethylether/
Tetrahydrofuran (9:1:1). Flußrate: 1,0 ml/min.
Detektion bei 580 nm

Unter Verwendung einer RP-18-Säule konnte die Umsetzung der BaP-dione in der Mischung (alle drei gemeinsam) zu den Hydrazonen gereinigt werden:

Die BaP-dione enthaltende Isopropanol/Methanol-Fraktion der Sephadex LH-20 Gelchromatographie (siehe Kap. 2.10.2) wurde eingeengt und in carbonylfreiem Methanol aufgenommen. Die Derivatisierung erfolgte (wie im Kap. 2.13.1 beschrieben) mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Methanol/H₂SO₄ konz.) bei 30°C. Zur Extraktion der Mischung wurde CCl₄/CH₂Cl₂ (4:1) eingesetzt, der Extrakt anschliessend eingeengt und mit wenigen ml Methanol versetzt. Die Methanol-Lösung wurde über eine RP-18-Säule gegeben und mit Methanol eluiert. Die Retentionszeiten der Monohydrazone in diesem System waren relativ groß verglichen mit denen der Verunreinigungen. Nachdem die vorderen Fraktionen abgetrennt worden waren, konnten die Monohydrazone in einer Fraktion unter Benutzung von Methylenchlorid eluiert werden.

Diese Methode würde sich eignen, um eine schnelle Reinigung der Derivate von BaP-dionen aus Umweltproben zu erreichen, die anschliessend durch HPLC zu bestimmen wären.

2.15 Nachweisgrenzen der verschiedenen Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden, soweit sie für die Bestimmung von Benzo[a]pyren und seiner isomeren Dione (auch in Form der durch Derivatisierung gebildeten Monohydrazonen) eingesetzt wurden, wurden auf ihre Nachweisgrenzen hin überprüft.

2.15.1 Benzo[a]pyren-Bestimmung

Die Überprüfung der HPLC-Methode (Chromspher PAH/MeOH-Wasser) mittels eines Testgemisches (nach der Trinkwasserverordnung DIN 38409 von Fa. Promochem) ergab, daß Benzo[a]pyren bis

zu 1 ng zu identifizieren war. Jedoch konnte man nur reproduzierbare Ergebnisse im Bereich oberhalb von 4 ng erzielen. Die Dünnschichtchromatographie bei der Verwendung von acetylierter Cellulose (Aceton/Ethanol/Wasser 25:60:15) erzielte Werte, die im untersten Picogrammbereich (100 pg) lagen, die aber wegen ihrer subjektiven Auswertung bei der visuellen Betrachtung nur zur Überprüfung der Proben herangezogen wurde.

2.15.2 Benzo[a]pyren-dione

Standard-Lösungen von Benzo[a]pyren-dionen, eingespritzt bei Verwendung der HPLC an Nucleosil 100-NO₂ (n-Hexan/Chloroform 75:25), ergaben Nachweisgrenzen für dieses Verfahren, die bei 10 ng lagen für alle Benzo[a]pyren-dione. Die Reproduzierbarkeit der Einspritzungen (Integration) lag aber bei Werten von über 40 ng.

Die dünnschichtchromatographische Überprüfung auf analytischen Kieselgel 60-Platten (CH₂Cl₂) ohne Fluoreszenzindikator ergab (visuelle Auswertung bei 254 nm) folgende Werte:

BaP-6,12-dion: 1,5 ng
BaP-1,6-dion: 0,3 ng
BaP-3,2-dion: 0,2 ng

Die auf BaP-dione zu überprüfenden Proben wurden deshalb nach der HPLC-Elution (im Bereich der BaP-dion-Fraktion) gesammelt und dünnschichtchromatographisch überprüft.

2.15.3 Monohydrazone

Die Nachweisgrenzen der Monohydrazone nach Anwendung der HPLC-Trennmethode an Lichrospher Si 60 (Tetrachlormethan/t-Butylmethylether/Tetrahydrofuran 9:1:1) lagen für alle

drei Monohydrazone bei ca. 5 ng, wobei erst Mengen von über 20 ng zu reproduzierbaren Integrationen der Elutionspeaks führten.

Die Identifizierung auf dünnschichtchromatographischen Platten wurden in zwei verschiedenen Systemen überprüft:

a) Kieselgel 60 (CCl₄/t-BME/THF 9:1:1) ohne Fluoreszenzindikator.

Visuell im Sichtbaren: 1,5 ng

Visuell bei 254 nm: 5 ng

b) Kieselgel 60 (CCl₄/t-BME/THF 9:1:1) mit Fluoreszenzindikator

Visuell im Sichtbaren: 0,7 ng

Visuell bei 254 nm: 2 ng

2.16 Analyseergebnisse und Diskussion

2.16.1 Analyseergebnisse bezogen auf Benzo[a]pyren

Unter Verwendung der angeführten Trennmethode (s. Kapitel 2.10.3) wurden Pflanzen unterschiedlichen Ursprungs untersucht.

Salatprobe	Wachstumsdauer (in Wochen)	BaP ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht)
Kopfsalat	3	0,212
Kopfsalat	3	0,399
Endiviensalat	3	0,574
Endiviensalat	3	0,430
Eissalat	6	0,363
Eissalat	6	0,220
Kopfsalat	6	0,580
Kopfsalat	6	0,713

Tab. 10: Pflanzliche Proben in der Nähe der Flugschneise des Flughafens Stuttgart-Echterdingen vom Sommer 1988.

Die Werte des Benzo[a]pyren-Gehaltes lagen alle unter 1 μg pro Kilogramm Frischgewicht (im Bereich des untersuchten Feldes), wobei eine Erhöhung der BaP-Konzentration erkennbar war zwischen Kopfsalat-Proben die über 3 bzw. 6 Wochen auf dem Feld lagen (vergl. Tab. 10).

Untersuchungen an wildwachsenden Pflanzen rund um die Abzäunung des Flughafenbereiches ergaben unterschiedliche Werte, die mit der Windrichtung sowie der Wachstumsdauer zusammenhängen (Tab. 11).

wildwachsende Pflanzen	BaP ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht)
W1	0,192
W2	0,330
W3	1,080
W4	1,458
W5	2,491
W6	3,112
W7	3,750

Tab. 11: Pflanzliche wildwachsende Proben vor der Abzäunung des Flughafens Stuttgart-Echterdingen vom Sommer 1988

Die Untersuchung der Wildpflanzen lieferte Hinweise auf die Größe der Belastung der um den Flughafen liegenden Felder. Untersuchungen des TÜV-Stuttgart (25) an Grünkohlproben im gleichen Raum im Sommer 1986 (Expositionszeit 3 Monate) erbrachten Werte, die mit den höher belasteten Wildpflanzen (siehe Tab. 11) vergleichbar sind (TÜV: 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Bodenuntersuchungen an Feldern, die direkt an der Flughafenabgrenzung lagen, ergaben Werte, die starke Belastung wiedergeben. Die aufgearbeiteten Proben (Kapitel 2.10.6) erreichten Werte von 92 bis 282 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (untersucht wurde die oberste Humusschicht).

Untersuchungen an wildwachsenden Pflanzen aus der Autobahn-
raststätte Stuttgart-Degerloch ergaben eine Steigerung der
BaP-Konzentration im Zeitraum April bis August 1988 von
0,308 auf 0,78 μg pro Kilogramm Frischgewicht.

Pflanzenproben aus Griechenland von der starkbefahrenen Na-
tionalstrasse (Rasthof Katerini) ergaben Werte, die von 0,71
bis 1,11 μg pro Kilogramm reichten. Die Proben wurden im
Sommer 1988 gesammelt. Im Vergleich zur Raststätte Stuttgart
waren die BaP-Konzentrationen dieser Proben deutlich höher
trotz der grösseren Sonneneinstrahlung, die eigentlich für
kleinere BaP-Konzentrationen verantwortlich sein sollte.

Aus einem am Rande einer Verkehrsstrasse gelegenen Ge-
müseladen wurden Proben genommen, um die Belastung der Wa-
ren zu überprüfen. Die Proben wurden während 5 Tagen dem
dort herrschenden Verkehr wie auch der Sonne ausgesetzt (Som-
mer 1988) und anschliessend wie im Kapitel 2.10 aufgearbei-
tet. Zu den ausgesetzten Proben (Kopfsalat) wurden Referenz-
proben entnommen, die am gleichen Tag aufgearbeitet wurden
(siehe Tab. 12).

Probe	aufgearbeitet nach (Tagen)	BaP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Referenz	0	0,06
S1	3	0,308
S2	5	0,403
S3	5	0,933

Tab. 12: Ermittelte BaP-Werte bei der Untersuchung von Kopf-
salatproben, die an einem Strassenverkaufsstand dem
Kraftfahrzeugverkehr ausgesetzt wurden.

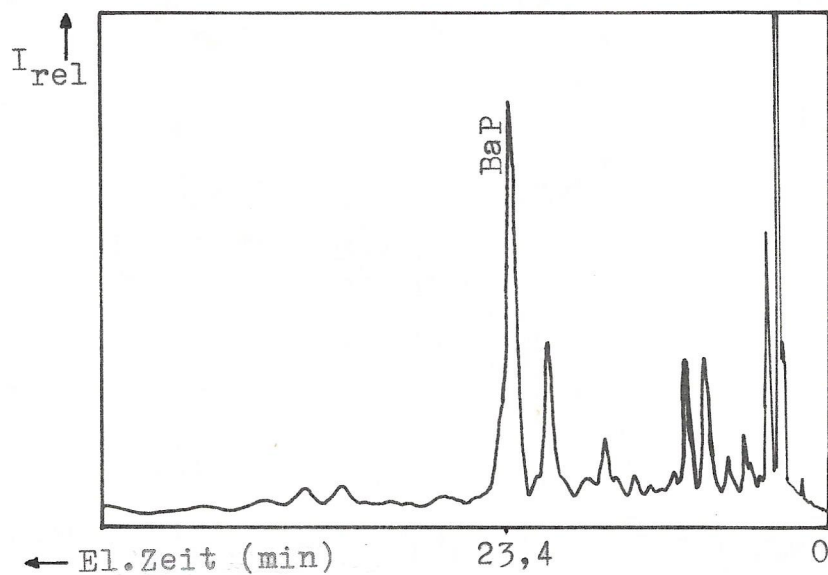


Abb. 46: HPLC-Elutionsbild einer Kopfsalatprobe (Daten wie im Kapitel 3.7.1)

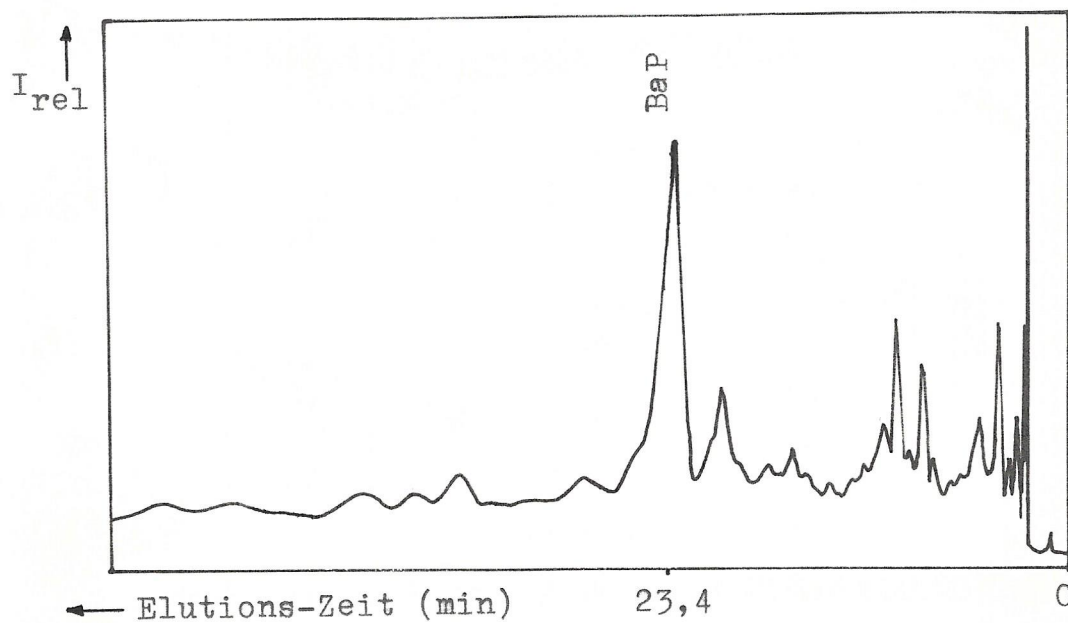


Abb. 47: HPLC-Elutionsbild einer wildgewachsenen Pflanzenprobe (Daten wie im Kapitel 3.7.1)

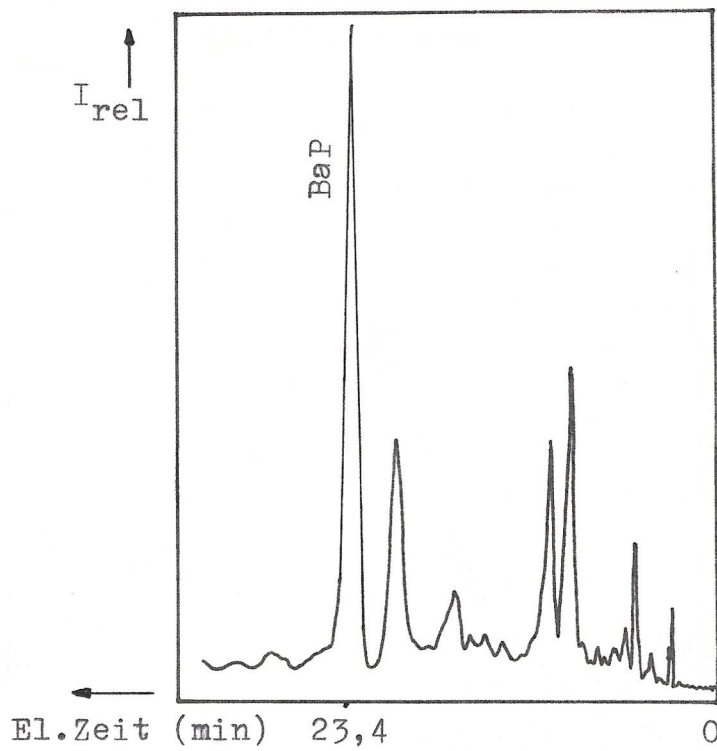


Abb. 48: HPLC-Elutionsbild einer Bodenprobe (Daten wie im Kapitel 3.7.1)

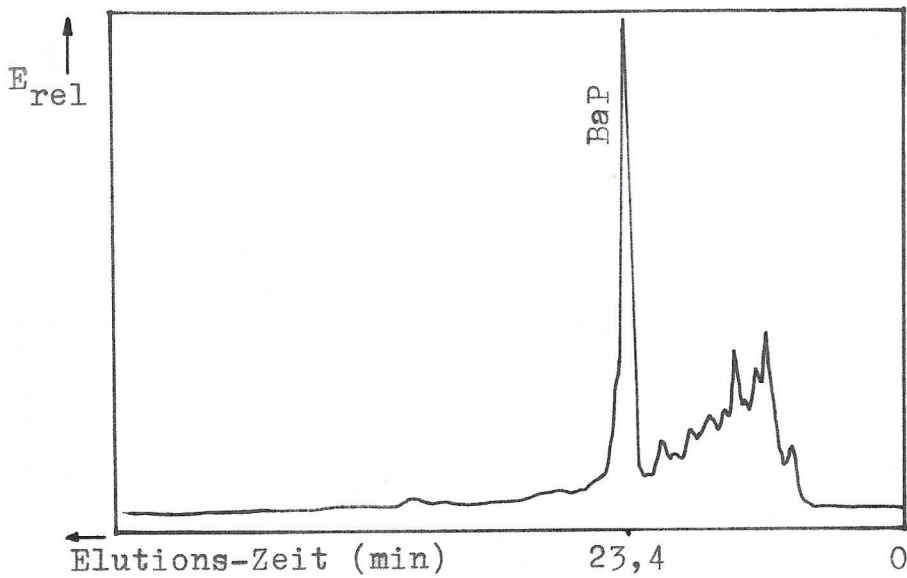


Abb. 49: HPLC-Elutionsbild einer Rauchfleischprobe (Daten wie im Kapitel 3.7.1)

Rauchfleischuntersuchungen (Abb. 49) ergaben Werte, die bis zu 4 µg pro Kilogramm reichten. Bei diesen Untersuchungen wurde die Aussenhaut bis zu 1 cm Tiefe abgeschnitten und nach dem Verfahren im Kapitel 2.11 aufgearbeitet.

2.16.2 Analysenergebnisse bezogen auf die Benzo[a]pyren-dione (BaP-6,12-, BaP-1,6-, BaP-3,6-dion)

Unter Verwendung der angeführten Anreicherungs- und Trenn-Methoden (siehe Kapitel 2.10.2 und 2.10.3) wurde versucht, eine quantitative Aussage über den Gehalt der untersuchten Proben an den isomeren Benzo[a]pyren-dionen zu treffen. Die ausgearbeitete HPLC-Methode eignete sich wohl für eine quantitative Bestimmung dieser Substanzen, ihr geringer Gehalt in den Proben ließ jedoch wegen der hierfür nicht ausreichenden Nachweisempfindlichkeit eine Erfassung nicht zu. Diese war jedoch nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung möglich (s.u.).

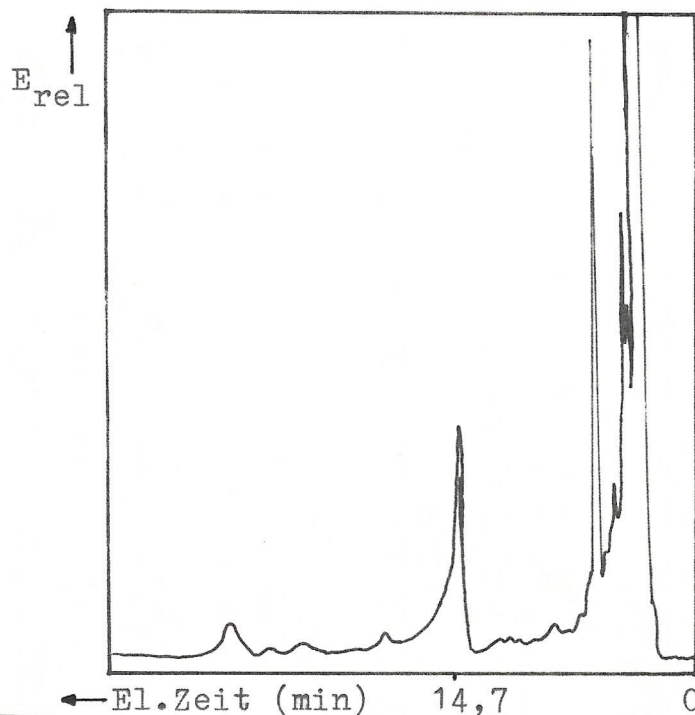


Abb. 50: Elutionsbild einer pflanzlichen Probe
(Daten wie im Kapitel 3.7.2)

Alle Proben wurden im Bereich der Elution der Dione sowie der Hydrazone (je nach Probe) aufgefangen und anschliessend nach Trennung auf Dünnschichtplatten einer visuellen Auswertung unterzogen.

Die Benzo[a]pyren-dion-Fractionen wurden nach Entfernung des Lösungsmittels (unter Stickstoffstrom) auf analytischen Kieselgel 60-Platten und Methylenchlorid chromatographiert. Durch Auftragen verschiedener Mengen von Standardlösungen der isomeren Benzo[a]pyren-dione und visuellen Vergleich mit den chromatographierten Proben war es möglich, halbquantitative Aussagen über die Gehalte zu machen (Tab. 13).

Probe	BaP-6,12-dion (ng/kg)	BaP-1,6-dion (ng/kg)	BaP-3,6-dion (ng/kg)
1	2-5	10-15	8-10
2	(-)	5-7	6-8
3	(-)	4-6	2-3
4	(-)	8-10	(-)
5	(-)	6-8	(-)

Tab. 13: Werte der isomeren BaP-dione, ermittelt nach dünn-schichtchromatographische Auftrennung (an Kieselgel 60/Methylenchlorid) durch visuellen Vergleich unter UV-Licht (bei 254 nm). Proben (s. Text Kap. 2.15.1):

1. pflanzl. Probe aus Griechenland
2. pflanzl. Probe, Raststätte Stuttgart
3. pflanzl. Probe, wildgewachsen, Flughafen Stuttgart
4. pflanzl. Probe, Kopfsalat, Flughafen Stuttgart
(nach 6 Wochen Expositionszeit)
5. pflanzl. Probe, Eissalat, Flughafen Stuttgart
(nach 6 Wochen Expositionszeit)

Die überprüften Dünnschichtchromatogramme wurden anschließend mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (MeOH/H₂SO₄) besprüht, wobei die Farbe der BaP-dion-Zonen nach blau-violett umschlugen.

Die dünnschichtchromatographische Überprüfung der Monohydrzone (nach der HPLC-Elution) erbrachte vergleichbare Werte (Tab. 13).

Abschliessend wäre zu sagen, daß die angeführten Proben die größten Konzentrationen an Benzo[a]pyren-dionen aufwiesen. Es konnte der Beweis erbracht werden (auch bei anderen Proben), daß Spuren an isomeren Benzo[a]pyren-dionen (BaP-6,12-, BaP-1,6- und BaP-3,6-dion) in pflanzlichen Proben enthalten sind.

Bei entsprechenden Untersuchungen an Rauchfleischproben konnten keine Benzo[a]pyren-dione nachgewiesen werden, auch wenn das Rauchfleisch mit Benzo[a]pyren kontaminiert und belichtet wurde (siehe Kapitel 2.12.2).

2.17 Mikrobiologische Abbauprozesse

Mikroorganismen spielen seit jeher eine entscheidende Rolle im biologischen Gleichgewicht der Natur.

Ihre Hauptaufgabe bestand ursprünglich in der Mineralisierung von biosynthetisch entstandenem Material und in der Rückführung der Bioelemente in den natürlichen Kreislauf. Heute gewinnen sie mehr und mehr an Bedeutung bei ihrem Einsatz im Rahmen des Umweltschutzes.

Es werden gezielt Mikroorganismen gezüchtet, die in der Lage sind, bestimmte umweltbelastende Stoffe als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle zu nutzen.

In der Literatur sind einige Bakterien, Hefen und Pilze beschrieben, die die Fähigkeit besitzen, Benzo[a]pyren zu metabolisieren. Bis heute aber ist kein Mikroorganismus bekannt, der Benzo[a]pyren vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren kann.

Während PAH kleiner Ringzahl, wie Naphthalin oder Phenanthren, einem bakteriellen Abbau relativ leicht zugänglich sind, können Polycyclen größerer Ringzahl (wie Benzo[a]pyren) nur sehr schwer von Mikroorganismen als einzige Kohlenstoffquelle benutzt werden. Die meisten Mikroorganismen sind nicht in Lage, das Kohlenstoffskelett vollständig zu verwerten.

Cerniglia (46) isolierte unter Verwendung von *Cunninghamella elegans* folgende BaP-Metaboliten, bei einer 18,4% Metabolisierung des eingesetzten Benzo[a]pyrens (siehe Abb. 12).

trans-9,10-Dihydro-9,10-dihydroxy-benzo[a]pyren

trans-7,8-Dihydro-7,8-dihydroxy-benzo[a]pyren

9-Hydroxy-benzo[a]pyren

3-Hydroxy-benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren-1,6-dion

Benzo[a]pyren-3,6-dion

Cerniglia (82) gelang die Oxidation von Benzo[a]pyren mit Hefe-Experimenten unter Verwendung von *Candida lipolytica*.

Das BaP metabolisierte dabei zu 3-Hydroxy-benzo[a]pyren und

9-Hydroxy-benzo [a] pyren.

Wiseman und Woogs (141) erhielten aus Zellextrakten von *Saccharomyces cerevisiae* 9-Hydroxy-benzo [a] pyren, 3-Hydroxy-benzo [a] pyren sowie trans-7,8-Dihydro-7,8-dihydroxy-benzo [a] pyren.

Auch *Candida tropicalis* besitzt wie alle Eukaryoten Cytochrom P-450 Monooxygenasen und konnte die gleichen Benzo [a] pyren-Metaboliten bilden (111).

Die grünen Algen (142) *Selenastrum capricornutum* bauen BaP ab, indem sie

cis-11,12-Dihydro-11,12-dihydroxy-benzo [a] pyren,
cis-7,8-Dihydro-7,8-dihydroxy-benzo [a] pyren und
cis-4,5-Dihydro-4,5-dihydroxy-benzo [a] pyren bilden.

Auch die Algen (143):

Nitella specialis

Fucus vesiculosus

Enteromorpha intestinalis

Cladophora glomerata

Chara aspera

sind in der Lage, Benzo [a] pyren zu seinen Phenolen, Dionen und Diolen zu oxidieren.

Die Fermentation von Benzo [a] pyren mit einem Eiweißpräparat aus Kürbiskernen (84) ergab folgende Metaboliten:

9,10-Dihydro-9,10-dihydroxy-benzo [a] pyren

7,8-Dihydro-7,8-dihydroxy-benzo [a] pyren

4,5-Dihydro-4,5-dihydroxy-benzo [a] pyren

3-Hydroxy-benzo [a] pyren

Benzo [a] pyren-6,12-dion

Benzo [a] pyren-1,6-dion

Benzo [a] pyren-3,6-dion

2.17.1 Bakterielle Abbauversuche

Bakterielle Abbauversuche von Benzo[a]pyren wurden unter Verwendung der folgender Stämme untersucht:

Stamm

1. Mycobakterium phlei
2. DBF 250
3. RST 69-211
4. RST 69-233
5. CIB 250
6. NCIB 9816
7. NCIB 12092
8. NCIB 10353

Alle Stämme außer dem Mycobakterium phlei wurden vom Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt, wobei die internen Bezeichnungen übernommen wurden.

Gegenüber Mycobakterium phlei, einem Mikroorganismus, der zum Abbau von Kohlenwasserstoffen befähigt ist, erwies sich BaP als stabil. Über entsprechende Untersuchungen und Ergebnisse wurde berichtet (115).

Auch bei den Stämmen DBF 220, RST 69-211 und RST 69-233, die die Fähigkeit besitzen, Dibenzofuran (DBF) zu verwerten, konnte kein Angriff festgestellt werden. Der Stamm CIB 250, der die Chlorbenzoesäure vollständig mineralisiert, konnte BaP nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten.

Untersuchungen bei den Naphthalinabbauenden Stämmen NCIB 9816, NCIB 12092 und NCIB 10353 führten zu einem Benzo[a]pyren Abbau.

In der vorliegenden Arbeit werden nur die Stämme näher erläutert, die einen Benzo[a]pyren-Abbau zeigten.

2.17.2 Allgemeines

Alle drei Naphthalinabbauenden Stämme (siehe Kapitel 2.17.1) wurden von The National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) (Catalogue of Strains, 4th Edition 1986) bezogen.

Die Stämme gehören zu der Gattung der *Pseudomonas putida*, wobei der Stamm NCIB 9816 von Evans aus Gartenerde isoliert wurde. Er kann außer auf Naphthalin auch auf Anthracen und Phenanthren wachsen (144).

Naphthalin wird über ein cis-Dihydrodiol-Intermediat zu 1,2-Dihydroxynaphthalin oxidiert (Abb. 51). Die Verbindung unterliegt einer Ringspaltung durch eine metasplaltende Dioxygenase. Unter Pyruvat-Abspaltung kommt es schliesslich zur Bildung von Salicylaldehyd und Salicylat. Das Salicylat wird durch eine Monooxygenase unter Hydroxylierung und Decarboxylierung zu Catechol umgesetzt, welches wiederum einer Metaspaltung unterliegt.

Beim Anthracen konnte ein ähnlicher Abbauweg nachgewiesen werden, wobei ein o-Hydroxy-Intermediat gebildet wird, das einer Metaspaltung durch eine Dioxygenase unterliegt.

Bei der mikrobiellen Degradation von Phenanthren konnten zwei Abbauwege aufgezeichnet werden. Eine Dihydroxylierung führt zur Metaspaltung und diese wiederum zur Bildung von 1-Hydroxy-2-naphtholsäure, für die nun zwei Abbauwege beschrieben sind:

Der eine Weg verläuft über die Oxidation von 1,2-Dihydroxynaphthalin.

Der zweite Weg führt mittels Dioxygenase zur einer Ringspaltung zwischen der Hydroxy- und der Carboxylgruppe. Durch die Oxidation der Seitenkette entsteht Phthalsäure, die anschliessend über Protocatechuat weiter umgesetzt wird (145, 146, 147) (Abb. 51).

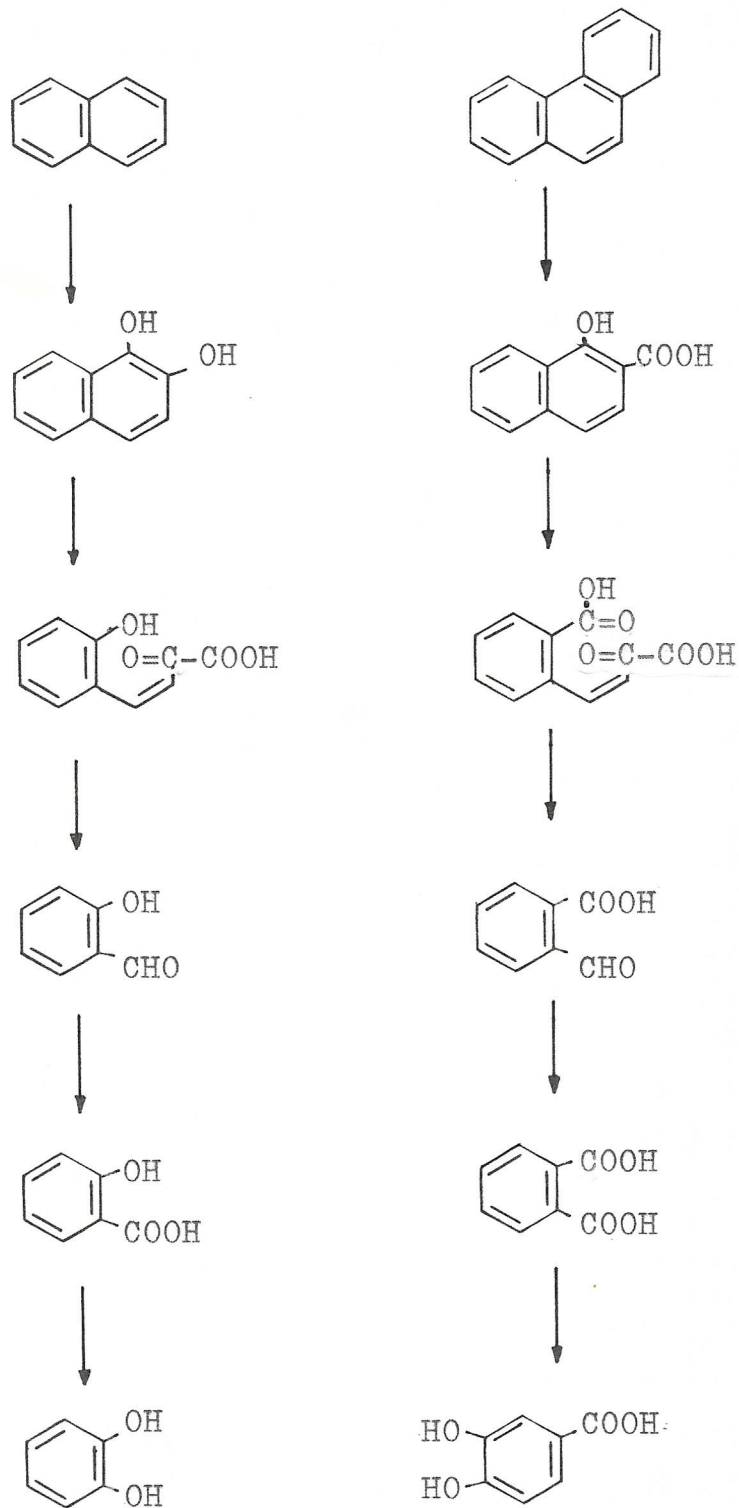


Abb. 51: Mechanismus der Naphthalin- und Phenanthren-Metabolisierung, durch Stämme der Gattung *Pseudomonas putida* (144).

Es ist kein Mikroorganismus bekannt, der nach den genannten Abbauwegen das Benzo[a]pyren metabolisiert.

2.17.3 Stammführung, Probenvorbereitung, Extraktion und Aufarbeitung

Das Agar-Medium (siehe Exp. Teil) wurde auf dem Wasserbad (60-70°C) erhitzt. Nach dem Sterilisieren wurde zu Agar-Platten und Schrägagar ausgegossen. Die mit den Stämmen beimpften Schrägagar wurden zwei Tage bei 30°C im Brutschrank bebrütet. Das Komplettmedium (siehe Exp. Teil) wurde mit einer Kolonie beimpft und bei 30°C auf einer Rotationsschüttelmaschine bei 90 Upm inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Verhältnis 1:10 auf Glucose-Medium (siehe Exp. Teil) überimpft, wobei die Kulturen auf diesem Medium sehr schnell wachsen. Nach 8 Stunden Inkubation wurde wieder im Verhältnis 1:10 auf Naphthalin überimpft, wobei der Naphthalinabbau an einer Orangefärbung der Reaktionslösung und Verschwinden der am Boden des Erlenmeyerkolbens liegenden Naphthalin-Kristalle erkennbar war (Zugabe von Naphthalin unsteril). Die nicht umgesetzten Naphthalin-Kristalle wurden mittels einer Glasfritte abfiltriert.

Bei den Abbauversuchen wurde von den verschiedenen Führungen ausgegangen:

- a) Es wurde nach dem Wachstum auf Glucose-Medium auf das BaP-Medium überimpft.
- b) Nach dem Wachstum auf Naphthalin wurde auf das BaP-Medium überimpft.
- c) Nach dem Naphthalinabbau wurden Ruhezellen isoliert, mit 2-facher Pufferlösung (Phosphatpuffer pH 7,4) aufgenommen und nach Zugabe von Spurensalzlösung (siehe exp. Teil) mit BaP inkubiert.

Das Benzo[a]pyren (82 µg) wurde im 300 Milliliter-Erlenmeyerkolben mit einer spezifischen Aktivität von $5,68 \cdot 10^{10}$ Bq/mol an radioaktiv markiertem $[7,10-^{14}\text{C}]$ -BaP vorgelegt.

Die Benzo[a]pyren-Ansätze wurden in lichtundurchlässig abgedichteten Schüttelkolben bei 32°C auf der Rotationsschüttelmaschine 10 bis 14 Tagen inkubiert und anschliessend aufgearbeitet.

Die Aufarbeitung der Ansätze wurde nach dem Abfiltrieren über ein Blaubandfilter wie folgt durchgeführt:

1) Aufarbeitung des Überstandes

Der Überstand der Ansätze wurde mit Ethylacetat (4x 100 ml) und anschliessend mit Cyclohexan (2x 100 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur 32°C) vorsichtig eingeeengt. Um Wasserreste zu entfernen, wurde mehrmals mit Aceton aufgenommen und eingeeengt. Der Rückstand wurde in n-Hexan/CH₂Cl₂ (1:1) aufgenommen und säulechromatographisch auf Al₂O₃ (Aktivitätsstufe III) gereinigt. Als Elutionsmittel wurde n-Hexan verwendet (BaP-Fraktion) und anschliessend auf Methylenchlorid als mobile Phase gewechselt (Fraktion polarerer Substanzen). Die verschiedenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Methylenchlorid aufgenommen und dünnschichtchromatographisch an analytischen Kieselgel 60-Platten untersucht (Laufmittel CH₂Cl₂). Die verschiedenen auf dem Chromatogramm erschienenen Zonen wurden abgekratzt, mit CH₂Cl₂ eluiert und durch Radioaktivitätsmessungen unter Berücksichtigung der bekannten spezifischen Aktivität ausgewertet.

2) Aufarbeitung der Bakterienfeuchtmasse (BFM)

Der BMF-Rückstand auf dem Filterpapier wurde mit Methylenchlorid (4x 50 ml) aufgenommen, mit einem Magnetrührer kurz gerührt und wieder abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgetrennt und der Rückstand (überschüssiges Kohlenwasserstoff-Gemisch an BMF haftend) auf eine Al₂O₃-Säule (Aktivitätsstufe III) aufgetragen. Als Elutions-

mittel wurde n-Hexan verwendet und anschliessend Aceton. Die beiden Fraktionen wurden eingengt und dünnschichtchromatographisch untersucht (Kieselgel 60/CH₂Cl₂). Die verschiedenen Zonen wurden nach dem Abkratzen und Elution mit Methylenchlorid, durch Radioaktivitätsmessung ausgewertet.

3) Aufarbeitung des Rückstandes

Nachdem die Bakterienfeuchtmasse mit Methylenchlorid extrahiert worden war, wurde der Rückstand in Aceton bei -30°C aufgeschlossen. Das Aceton wurde am Kryostat auf -30°C heruntergekühlt und anschliessend die Zellen zugegeben. Die Suspension wurde ein bis zwei Stunden gerührt dann über ein Blau-bandfilter filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in n-Hexan/Methylenchlorid (1:1) aufgenommen und dünnschichtchromatographisch untersucht (Kieselgel 60/CH₂Cl₂). Die Auswertung der unterschiedlichen Zonen erfolgte durch Radioaktivitätsmessungen.

Die Radioaktivitätsüberprüfung des Verfahrens ergab folgende Ausbeuten:

<u>1) Aufarbeitung des Überstandes:</u>	95,3%
<u>2) Aufarbeitung der Bakterienfeuchtmasse:</u>	94,0%
<u>3) Aufarbeitung des Rückstandes:</u>	93,3%

2.17.4 Stamm NCIB 9816

Die Überprüfung des Stammes wurde nach den in Kapitel 2.17.3 angeführten Punkten a), b) und c) durchgeführt.

Der Überstand wurde abfiltriert und die Zellen wie beschrieben extrahiert und aufgeschlossen.

Die Ergebnisse der Inkubationen waren wie folgt (Tab. 14).

	(a) (rel. Anteil)	(b) (rel. Anteil)	(c) (rel. Anteil)
<u>Zellen:</u>	43,86%	48,0%	51,5%
BaP	100%	100%	85,0%
BaP-6,12-dion	---	---	---
BaP-1,6-dion	---	---	2,8%
BaP-3,6-dion	---	---	2,87%
<u>Überstand:</u>	53,8%	49,5%	47,5%
BaP	85,0%	87,0%	87,0%
BaP-6,12-dion	1,4%	0,43%	0,5%
BaP-1,6-dion	4,8%	0,5%	0,1%
BaP-3,6-dion	0,53%	0,36%	0,12%

Tab. 14: Abbaueversuche von BaP mit dem Stamm NCIB 9816.

(a) nach Glucose-Wachstum auf BaP, Inkubation 10 Tage

(b) nach Naphthalin-Wachstum auf BaP, Inkubation 10 Tage

(c) Ruhezellen nach Naphthalin-Wachstum auf BaP (10 Tage)

Die relative Radioaktivitätsverteilung BaP/BaP-dione bezieht sich auf die Radioaktivität des jeweiligen Überstandes bzw. Zellenextraktes und -aufschlusses.

2.17.5 Stamm NCIB 10353

Die Überprüfung des Stammes wurde nach den in Kapitel 2.17.3 angeführten Punkten a), b) und c) durchgeführt.

Der Überstand wurde abfiltriert und die Zellen wie beschrieben extrahiert und aufgeschlossen.

Die Ergebnisse der Inkubationen waren wie folgt (Tab. 15).

	(a) (rel.Anteil)	(b) (rel.Anteil)	(c) (rel.Anteil)
<u>Zellen:</u>	69,0%	19,6%	50,1%
BaP	100%	100%	100%
BaP-6,12-dion	---	---	---
BaP-1,6-dion	---	---	---
BaP-3,6-dion	---	---	---
<u>Überstand:</u>	27,5%	78,0%	47,1%
BaP	100%	88%	87%
BaP-6,12-dion	---	0,6%	0,12%
BaP-1,6-dion	---	0,53%	0,18%
BaP-3,6-dion	---	1,6%	0,17%

Tab. 15: Abbaubersuche von BaP mit dem Stamm NCIB 10353

(a) nach Glucose-Wachstum auf BaP, Inkubation 10 Tage

(b) nach Naphthalin-Wachstum auf BaP, Inkubation 12 Tage

(c) Ruhezellen nach Naphthalin-Wachstum auf BaP (12 Tage)

Die relative Radioaktivitätsverteilung BaP/BaP-dione bezieht sich auf die Radioaktivität des jeweiligen Überstandes bzw. Zellenextraktes und -aufschlusses.

2.17.6 Stamm NCIB 12092

Die Überprüfung des Stammes wurde nach den in Kapitel 2.17.3 angeführten Punkten a), b) und c) durchgeführt.

Der Überstand wurde abfiltriert und die Zellen wie beschrieben extrahiert und aufgeschlossen.

Die Ergebnisse der Inkubationen waren wie folgt (Tab. 16).

	(a) (rel.Anteil)	(b) (rel.Anteil)	(c) (rel.Anteil)
<u>Zellen:</u>	53,2%	50,2%	52,7%
BaP	100%	100%	100%
BaP-6,12-dion	---	---	---
BaP-1,6-dion	---	---	---
BaP-3,6-dion	---	---	---
<u>Überstand:</u>	44,7%	48,7	45,4%
BaP	100%	87%	85%
BaP-6,12-dion	---	---	0,25%
BaP-1,6-dion	---	0,38%	0,17%
BaP-3,6-dion	---	0,40%	0,26%

Tab. 16: Abbauprobungen von BaP mit dem Stamm NCIB 12092.

(a) nach Glucose-Wachstum auf BaP, Inkubation 14 Tage

(b) nach Naphthalin-Wachstum auf BaP, Inkubation 14 Tage

(c) Ruhezellen nach Naphthalin-Wachstum auf BaP (14 Tage).

Die relative Radioaktivitätsverteilung BaP/BaP-dione bezieht sich auf die Radioaktivität des jeweiligen Überstandes bzw. Zellenextraktes und -aufschlusses.

2.17.7 Abbauprobungen mit den BaP-dionen

Nachdem beim Angriff mit dem Naphthalinabbauenden Stamm NCIB 9816 der größte Anteil an Oxidationsprodukten festgestellt worden war, wurde auch der Angriff von BaP-dionen durch diesen Stamm untersucht.

Nach dem Wachstum der Zellen auf a) Glucose, b) Naphthalin und c) Ruhezellen aus dem Naphthalin-Wachstum, wurden jeweils BaP-6,12-dion, BaP-1,6-dion und BaP-3,6-dion 2 Tage inkubiert. Bei der Analyse der Inkubationsansätze wurden die BaP-dione praktisch quantitativ zurückerhalten. Auch zeigte die chromatographische Auftrennung der Proben (Kieselgel 60/CH₂Cl₂) keine Umwandlungsprodukte.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Allgemeines zur Arbeitstechnik der Spurenanalytischen Bestimmungen

Um die Empfindlichkeit der hochleistungs-flüssigkeitschromatographischen Endbestimmungsverfahren ausnutzen zu können, ist es notwendig, den Anteil der Begleitsubstanzen soweit wie möglich zu reduzieren. Insbesondere dürfen im Laufe des Analyseverfahrens keine neuen Verunreinigungen dazugelangten. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Benzo[a]pyren ist besondere Vorsicht geboten, um die Endergebnisse nicht durch arbeitsbedingte Photooxidationsprodukte zu verfälschen.

Der Anreicherungsverfahren der Proben sollte in kürzester Zeit durchgeführt werden, in Räumen mit gedämpftem Licht und mit lichtundurchlässig abgedichteten Apparaturen. Der Empfindlichkeit der Substanzen gegen hohen Temperaturen sollte Rechnung getragen werden.

Die Aufbewahrung der Substanzen in Lösungsmitteln sollte in lichtundurchlässig abgedichteten Gefäßen (Aluminiumfolie) bei 4°C erfolgen.

Die verwendeten Glasgeräte müssen absolut frei von Schliff fett sein. Die Schliffverbindungen werden mit Teflonmanschetten abgedichtet. Die gesamten Hahnküken aus Scheidetrichter, Säulen, Niederdruckanlagen und Destillationskolonnen waren aus Teflon. Alle Glasgeräte sollten rückstandsfrei gewaschen werden. Dazu wurden die Geräte zuerst mit Aceton gespült und anschliessend in ein Bad mit Chromschwefelsäure gelegt. Das Spülen der Geräte erfolgte mit bidestilliertem Wasser. Diese Prozedur wurde vor jedem Arbeitsgang wiederholt. Das verwendete handelsübliche Aceton wurde vor dem Gebrauch (Spülung) destilliert. Dieser Vorgang beruht auf Beobachtungen von Winkler⁽⁶¹⁾, bei denen das handelsübliche Aceton nach dem Abdampfen Rückstände im Kolben hinterlassen hatte, die starke Schmutzpeaks im Gaschromatogramm ergaben.

Auf die Reinheit der verwendeten Lösungsmittel wurde besondere Sorgfalt gelegt. Deshalb wurden alle Lösungsmittel in gesonderten Destillationskolonnen (1,5 m) unter hohem Rücklaufverhältnis destilliert.

Das verwendete Wasser für die Analysen stammte aus einer Bi-Destillationsanlage (Heraeus Quarzschmelze, Hanau).

Als Lösungsmittel wurden Waren mit der Bezeichnung "pro analysis" (Merck) wie auch "nanograde" (Promochem) benutzt. Auch handelsübliche Produkte mit der Bezeichnung "chemisch rein" wurden verwendet.

An sonstigen Chemikalien wurden nur noch die jeweiligen Säulefüllmaterialien und Na_2SO_4 verwendet. Nach dem Packen der Säulen mit dem entsprechenden Material wurde gründlich mit dem Elutionsmittel durchgespült. Natriumsulfat, das für die Trocknung benutzt wurde, wurde mit Methylenchlorid gewaschen und nach dem Absaugen des Lösungsmittels über eine Glasfritte im Trockenschrank bei 120°C getrocknet.

3.2 Substanzen, Lösungsmittel, Trennmaterialien

Das benutzte Benzo[a]pyren stammte von Aldrich Steinheim (Art.Nr.B 1,008-0) und wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Die eingetetzte Stammlösung enthielt 100 mg BaP in 1000 ml Cyclohexan. Die Konzentration der Stammlösung wurde photometrisch bestimmt. 10 ml dieser Lösung wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit (Wasserbadtemperatur 30°C). Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol/Methanol (1:1) aufgenommen und die genaue Konzentration photometrisch bestimmt (Zeiss PMQ2). Dafür wurde die Extinktion bei 364 nm ($\epsilon=22908$), 384,5 nm ($\epsilon=27542$) und bei 403 nm ($\epsilon=3981$) gemessen und unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten in Klammern die Konzentration errechnet (sie betrug genau 100 mg/l). Die Aufbewahrung der lichtundurchlässig abgedichteten Stammlösung erfolgte bei $+4^\circ\text{C}$. Die Reinheit des Benzo[a]pyren

wurde vor jeder Verwendung dünnschichtchromatographisch überprüft. Dazu wurden 10 ml der Lösung am Rotationsverdampfer eingengt, mit wenig Methylenchlorid (200 µl) aufgenommen und auf analytische Kieselgel 60-Platten (Schichtdicke 0,2 mm ohne Fluoreszenzindikator, Merck) mit Methylenchlorid als Laufmittel chromatographiert. Die Betrachtung der Chromatogramme erfolgte unterm UV-Sichtgerät bei 254 nm.

Das radioaktiv markierte [7,10-¹⁴C]-Benzo[a]pyren (Art.Nr. CFA 471) wurde von der Fa. Amersham Buchler bezogen. Die spezifische Radioaktivität betrug 1,85 GBq/mmol und die gesamte Radioaktivität pro Verpackungseinheit lag bei 1,85 MBq. Zur Herstellung der radioaktiven Stammlösung wurde der gesamte Flascheninhalt in einen 50 ml Meßkolben überführt und in Toluol gelöst. Die Radioaktivität der Lösung wurde überprüft; sie betrug 1,85 MBq/50 ml. Die radioaktive Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt. Die radiochemische Reinheit wurde durch Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator) mit Methylenchlorid als Laufmittel und anschliessender Autoradiographie überprüft. Die Autoradiographie wurde unter Benutzung von ³H-Ultrofilm-Film (Fa. LKB München) durchgeführt. Es konnten keine weiteren Zonen, ausser BaP, festgestellt werden. Die Handhabung und Lagerung aller radioaktiv markierten Substanzen erfolgte im Sinne der Strahlenschutzverordnung. Weitere Referenzsubstanzen wurden bei der vorliegenden Arbeit benutzt:

BaP-6,12-dion

BaP-1,6-dion

BaP-3,6-dion

Sie stammten alle vom National Cancer Institute (USA), NCI Chemical Carcinogen Repository, Missouri.

Die Reihe konnte den beige packten Datenblättern entnommen werden. Die IR-Spektren wurden für die Charakterisierung der Monohydrazone verwendet.

Zusätzlich wurden folgende PAH zu hochleistungs-flüssigkeits-

chromatographischen Untersuchungen benutzt:

Benzo [e] pyren,

Indeno [1,2,3-cd] pyren,

bezogen von der Fa. Aldrich Steinheim.

Benzo [b] fluoranthen,

Benzo [k] fluoranthen,

stellte freundlicherweise Herr Prof. Dr. G.Grimmer vom Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Ahrensburg, zur Verfügung.

Anthrazen,

Fluoranthen,

Pyren,

Chrysen und

Benzo [ghi] perylen,

wurden von Herrn W.Altenhoff von der Verkaufsvereinigung für Teererzeugnisse GmbH in Essen zur Verfügung gestellt.

Die Standard-Lösung zur Eichung der HPLC-Trennmethode beinhaltete folgende PAH:

Fluoranthen	10 ng/µl
Indeno [1,2,3-cd] pyren	2 ng/µl
Benzo [b] fluoranthen	2 ng/µl
Benzo [k] fluoranthen	2 ng/µl
Benzo [a] pyren	2 ng/µl
Benzo [ghi] perylen	2 ng/µl

Sie wurden von der Fa. Promochem, Wesel, bezogen und entsprach der Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Trinkwasser nach DIN 38409.

Als Trenngele wurden Lichrosorb Si-60 (40-63 µm, Merck), Aluminiumoxid W 200 neutral (Woelm) verwendet. Als "reversed phase" Materialien wurde RP-18 15-25 µm der Fa. Merck und Nucleosil 100-1525 C18 15-25 µm der Fa. Macherey-Nagel, Düren, verwendet.

Für die Gelchromatographie wurde Sephadex LH-20 von der Firma Deutsche Pharmacia GmbH bezogen.

Für die HPLC wurden drei verschiedene Trennsäulen verwendet:

PAH-Trennung:

Chromspher PAH 5 μm , 200 mm x 3 mm (Fa. Chrompack GmbH)

Benzo [a] pyren-dione-Trennung:

Nucleosil 100-5NO₂ 5 μm , 200 mm x 4 mm (Fa. Macherey-Nagel)

Monohydrazon-Trennung:

Lichrospher Si-60 5 μm , 250 mm x 4 mm (Fa. Merck)

3.3 Entsorgung von Abfällen, Handhabung von Produkten

Benzo[a]pyren-Abfälle, sofern sie nicht radioaktiv markiert waren, wurden gesondert gesammelt und mit Chromschwefelsäure längere Zeit behandelt. Weil davon ausgegangen werden muß, daß auch BaP-Oxidationsprodukte mutagene Eigenschaften besitzen, wurden auch diese Abfälle mit Chromschwefelsäure behandelt. Radioaktiv markierte Substanzen wurden gemäß der Strahlenschutzverordnung den entsprechenden Behältnissen zugeführt. Bei radioaktiven wie auch bei inaktiven Versuchen wurde darauf geachtet, daß keine Kontamination erfolgte. Bei Arbeitsgängen, bei denen Staub entstand, wie z.B. beim Abkratzen von Dünnschichtchromatogrammen, wurden Feinstaubmasken (Fa. Roth) benutzt. PVC-Handschuhe (Fa. Rotiprotect) sorgten für eine Verhinderung der Hautkontamination sowohl bei radioaktiven wie auch inaktiven Ansätzen.

3.4 Radioaktivitätsmessungen

Messungen von energiearmen β -Strahlern, wie ³H oder ¹⁴C werden mit Hilfe flüssiger Szintillatoren (fluoreszenzfähige Substanzen) durchgeführt, bei denen die radioaktive Probe und der Szintillator gemeinsam in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. Die Messung erfolgt in Flüssigkeitsszintillationszähler.

Für die Auswertung der radioaktiven Ansätze wurde die radioaktiv markierte Probe auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wurde in ein Flüssigkeitsszintillationsfläschchen gegeben und mit 10 ml Szintillationscocktail (Quickszint 454 der Fa. Zinsser, Frankfurt) vermischt. Nach 1/2-Stunde Abklingzeit wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS 3801) gemessen.

3.5 UV/Vis-Spektren

Ein registrierendes Zeiss-Spektralphotometer (RPQ 20 A) wie auch ein Zweistrahl-Spektralphotometer (UVIKON 810P) der Fa. Kontron, Zürich, wurden für die Aufnahmen der in dieser Arbeit erscheinenden UV/Vis-Spektren benutzt.

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mittels eines nicht-registrierenden Zeiss-Photometers (PMQ 2).

3.6 Bestrahlungsanordnung

Bei der Bestrahlungsanordnung wurden gleichzeitig 9 Leuchtstoffröhren vom Typ 15 T8-D day-light (UV-Anteil 2,1%) von Sylvania (Emissionsspektrum siehe Abb. 17) und 4 Leuchtstoffröhren vom Typ IMP-LXD Weis-Universal (UV-Anteil 4%) von Osram, eingesetzt. Die Gesamtleistung der Anordnung war 215 Watt, wobei die zu bestrahlenden Proben in einer Entfernung von ca. 50 cm (in der Mitte der im Kreis geordneten Lampen) gesetzt wurden.

3.7 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Für die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie bestand folgende Gerätezusammensetzung:

Die mobilen Phasen wurden mittels einer Perkin-Elmer Series 1

Pumpe gefördert. Sie war in Verbindung mit einem Rheodyne Ventil (7125) geschlossen. Die Probenaufgabeschleife hatte ein Fassungsvermögen von 20 µl. Für die Detektion wurde ein Perkin-Elmer (Coleman 55) UV/Vis-Detektor mit variabler Wellenlänge verwendet, der einem Schreiber (Foci Recorder 1100) angeschlossen war. Für die Fluoreszenzdetektion wurde ein zweistrahliges Fluoreszenzspektrometer von Perkin-Elmer (Typ 3000) verwendet, an das ein Schreiber (Perkin Elmer 561 Recorder) angeschlossen war. Sowohl der UV/Vis- wie auch der Fluoreszenz-Detektor waren parallel an einem Integrator (Howlett Packard 3370B) angeschlossen. Beide Detektoren waren hintereinander geschaltet, wobei der UV/Vis-Detektor zuerst durchlaufen wurde.

Alle für die HPLC benutzten Elutionsmischungen wurden während 30 min in einem Ultraschallbad entgast.

3.7.1 HPLC-Trennung der PAH

Für die Trennung und quantitative Bestimmung des Benzo[a]pyrens in Gegenwart der mitextrahierten PAH bei allen Proben (Pflanzliche-, Boden- und Rauchfleischproben) wurde die oben erwähnte Gerätekombination verwendet. Die Elutionsdaten waren wie folgt:

Stationäre Phase: Chromospher PAH 5 µm, 200 mm x 3 mm

Mobile Phase: Methanol/Wasser (87:13)

Durchflußgeschwindigkeit: 0,8 ml/min

Druck: 12 MPA

Temperatur: 20°C

Probeaufgabeschleife: 20 µl

Fluoreszenzdetektion: $\lambda_{an}=262$ nm, $\lambda_{em}=403$ nm

Expansion x 10

Schreiber: 10 mV, Geschwindigkeit 5 mm/min

Die eingespritzten Proben waren in n-Hexan gelöst.

Die eingespritzten Volumina lagen bei 3 bis 10 µl.

3.7.2 HPLC-Trennung der BaP-dione

Für die Trennung und quantitative Bestimmung der BaP-dione wurde die oben erwähnte Gerätekombination verwendet. Die Elutionsdaten waren wie folgt:

Stationäre Phase: Nucleosil 100-5NO₂ 5 µm, 200 mm x 4 mm

Mobile Phase: n-Hexan/Chloroform (75:25)

Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Druck: 6 MPA

Temperatur: 20°C

Probeaufgabenbeschleife: 20 µl

UV-Detektion: 254 nm

Schreiber: 2,5 mV, Geschwindigkeit 5 mm/min

Die eingespritzten Proben waren in n-Hexan/CHCl₃ (75:25) gelöst. Die eingespritzten Volumina lagen bei 5 bis 10 µl.

3.7.3 HPLC-Trennung der Monohydrazone

Für die Trennung und quantitative Bestimmung der Monohydrazone wurde die oben erwähnte Gerätekombination verwendet.

Die Elutionsdaten waren wie folgt:

Stationäre Phase: Lichrospher Si-60 5 µm, 250 mm x 4 mm

Mobile Phase: CCl₄/t-Butylmethylether/THF (9:1:1)

Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Druck: 8 MPA

Temperatur: 20°C

Probeaufgabenbeschleife: 20 µl

Vis-Detektion: 580 nm

Schreiber: 2,5 mV, Geschwindigkeit 5 mm/min

Die eingespritzten Proben waren in Methylenchlorid gelöst. Die eingespritzten Volumina lagen bei 3 bis 10 µl.

3.8 Infrarot-Spektren

Die Infrarotspektren der Monohydrazone wurden an einem Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer mit inert Gas-Kammer von Perkin-Elmer (Model 1800) aufgenommen (Frauenhofer-Institut Stuttgart). Die Substanzen wurden auf einem NaCl-Plättchen gemessen.

3.9 Säulenchromatographie an Niederdruckanlagen

3.9.1 Gelchromatographie mit Sephadex LH-20

70 g an Sephadex LH-20 (Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden) wurden in 300 ml einer Mischung aus Isopropanol/Methanol (1:1) suspendiert und 24 Stunden zum Quellen gelassen. In einer Chromatographiesäule 350 mm x 26 mm (Fa. Quickfit) wurde bis zu 1/3 mit der Elutionsmischung gefüllt und die obengenannte Suspension vorsichtig zugegeben. Die Bepackung erfolgte unter Durchfluß, wobei am Schluß unter Druck eluiert wurde. Nach Absetzung des Gelbettes (h=300 mm) wurden die mit Teflon abgedichteten Stempel fixiert.

Die Säule wurde über 8 Stunden mit der Elutionsmischung (Isopropanol/Methanol 1:1) äquilibriert.

Die Gerätekombination dieser Anordnung war wie folgt:

Die vor jeder Elution entgaste Mischung wurde mit einer flüssigkeitsfördernden Pumpe (Duramat CFG) mit integriertem Manometer gepumpt. Die in 4 ml Isopropanol/Methanol (1:1) gelöste Probe wurde über zwei Dreiweghähne mittels einer Probeaufgabeschleife (Fassungsvermögen 5 ml) auf die Säule aufgetragen unter dem Elutionsmittel-Druck.

Es erwies sich als zweckmäßig, zur Dämpfung der Pulsation zwischen Pumpe und Dreiweghahn ein geschlossenes Gefäß zu schalten. Das Ein- und Auslaufrohr des Gefäßes reichten nahezu bis zum Boden des bis zur Hälfte (50 ml) mit der Elutions-

mischung gefüllten Gefäßes. Das eingeschlossene Luftvolumen sorgte für ausreichende Dämpfung der Pulsation der Pumpe. Die Registrierung des Eluats, das in 5 ml-Fractionen abgefangen wurde, erfolgte mit einem UV-Monitor (Isco UA 5) bei 254 nm (Filter). Der Monitor war an einen Multiplexer-Expander (Isco Model 1133) angeschlossen. Der Fraktionensammler (Isco Golden Retriever Model 328) steuert ein elektromagnetisches Absperrventil an, das während des Fraktionenwechsels schließt, damit das Eluat quantitativ aufgefangen werden kann.

Für pflanzliche Proben wurden die Fraktionen von 0 bis 230 ml verworfen und die Fraktionen 230 bis 310 ml aufgearbeitet (sie beinhalteten BaP-dione).

Für Rauchfleischproben wurden die Fraktionen von 0 bis 210 ml verworfen und die Fraktionen 210 bis 330 ml aufgearbeitet (sie beinhalteten BaP und BaP-dione).

Die Elutionsgeschwindigkeit lag bei 9,7 ml/h bei einem Druck von 2 bar.

3.9.2 Gelverteilungschromatographie an Sephadex LH-20

27 g Sephadex LH-20 (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden über Nacht in 200 ml eines Gemisches aus Dimethylformamid (DMF) und Wasser (85:15) zum Quellen gelassen. Die Gelsuspension wurde in einer Säule (350 mm x 26 mm, Quickfit) unter Ablauf gepackt. Danach gab man 50 ml eines mit n-Hexan gesättigten DMF-Wasser-Gemisches auf und eluierte. Anschliessend gab man 30 ml dieses Gemisches und 1 ml n-Hexan auf die Säule, schüttelte kräftig durch und packte unter Durchlauf. Das n-Hexan-gesättigte DMF-Wasser-Gemisch (85:15), welches nicht von Sephadex LH-20 adsorbiert worden war, wurde mit DMF-Wasser (85:15)-gesättigtem n-Hexan verdrängt.

Bei der Herstellung des DMF-Wasser (85:15)-gesättigten n-Hexans wurden die beiden Phasen im Scheidetrichter über Nacht

gelassen, denn wenn die Sättigung nicht vollständig ist, wird die Imprägnierung des Trägermaterials (Sephadex LH-20) herausgelöst und die Säule kann nur ein einziges Mal benutzt werden.

Die Gelbetthöhe betrug 115 mm. Die mit Teflon abgedichteten, beweglichen Stempel der Säule wurden bis zum Gelbett gefahren und fixiert. Die Säule wurde anschliessend mit dem DMF-Wasser (85:15)-gesättigten n-Hexan äquilibriert.

Die Gelverteilungssäule wurde an eine Niederdruckanlage mit folgender Gerätekombination angeschlossen:

Die Förderung des Elutionsmittels (DMF-Wasser (85:15)-gesättigtes n-Hexan) wurde mit einer Pumpe (Isco Metering Pump Model 312) durchgeführt. Die in 2 ml gesättigtem n-Hexan gelöste Probe wurde in eine Probeaufgabeschleife (Fassungsvermögen 2 ml) gegeben. Die Schleife war über zwei Dreiweghähne mit der Pumpe und der Säule verbunden. Die Aufgabe der Probe auf die Säule erfolgte unter Elutionsmittel-Druck. Ein Manometer (Fa. Haenni) war zwischen der Pumpe und dem Dreiweghahn angeschlossen. Die Registrierung des Eluates, das in 5 ml-Fractionen gesammelt wurde, erfolgte mit einem UV-Monitor (Isco Absorbance Monitor Model UA-5) bei 254 nm (Filter). Der angeschlossene Fraktionensammler (Isco Golden Retriever Model 328) steuerte ein elektromagnetisches Absperrventil an, das während des Fraktionenwechsels schließt, und somit das Eluat quantitativ aufgefangen werden konnte.

Für pflanzliche Proben (auch Bodenproben) wurden die Fraktionen von 0 bis 170 ml verworfen und die 170 bis 500 ml Fraktionen aufgearbeitet (sie beinhalten BaP).

Die Elutionsgeschwindigkeit lag bei 96 ml/h bei einem Druck von 0,2 bar.

Nach jeder Elution wurde die Gelverteilungssäule mit 300 ml Elutionsmittel gespült. Nach je 5 bis 6 Probenelutionen oder nach längerem Stehen wurde die Säule nachimprägniert (regeneriert). Dafür wurden 3 bis 4 ml des n-Hexan-gesättigten-DMF/Wasser (85:15)-Elutionsmittels verwendet.

3.10 Wässrige Systeme

Zur Optimierung der BaP-dion-Gewinnung wurden wässrige BaP-Lösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Die Lösungen beinhalten 0,5, 1, 2 und 4 mg/l Benzo [a] pyren. Die Zugabe von radioaktiv markiertem BaP wurde so ausgewählt, daß jede Probe $3,7 \cdot 10^4$ Bq beinhalten. Die inaktive BaP-Menge wurde aus der entsprechenden Stammlösung (100 mg/l Cyclohexan) mit einer Vollpipette entnommen und in einen Rundkolben gegeben. Dazu wurde aus der radioaktiven BaP-Lösung ($1,85 \cdot 10^6$ Bq/50 ml Toluol) 1 ml entnommen und dem inaktiven zugesetzt (soweit es sich um radioaktive Ansätze handelte). Die Lösung wurde vorsichtig am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit einer Methanol/Essigsäure (5:1)-Mischung (10 ml) gelöst. Diese Lösung wurde anschliessend in 1 Liter bidestilliertes Wasser gegeben.

Alle Lösungen (aktive wie auch inaktive) wurden auf einer Schüttelmaschine an der Belichtungsanordnung bestrahlt. Die Extraktion der Proben erfolgte in einem Scheidetrichter mit 3 x 100 ml Essigsäureethylester und anschliessend 2 x 100 ml Cyclohexan. Die organischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer vorsichtig bis ca. 100 ml eingeeengt und über Na_2SO_4 getrocknet. Die organische Phase wurde nach dem Abfiltrieren am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und in wenig Methylenchlorid (1-2 ml) gelöst. Die Trennung und Isolierung des Benzo [a] pyren wie auch seiner Dione wurde dünnschichtchromatographisch durchgeführt. Dabei wurde an mehreren analytischen Kieselgel 60-Platten mit Methylenchlorid entwickelt, wobei um eine gute Trennung der BaP-dione (BaP-1,6- und BaP-3,6-dion) zu erreichen, die DC-Platten abgetrocknet und nochmals im gleichen Laufmittel chromatographiert wurden. Die entstandenen Zonen (BaP, BaP-6,12-, BaP-1,6- und BaP-3,6-dion) wurde abgekratzt und über Watte mit Methylenchlorid in Meßkolben eluiert. Bei radioaktiven Ansätzen erfolgte die Auswertung mittels der spezi-

fischen Radioaktivität der Substanzen nach Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler. Bei inaktiven Ansätzen wurden die Mengen anhand der Extinktionskoeffizienten nach Extinktionsmessungen ermittelt.

3.11 Pflanzliche Proben

Von den pflanzlichen Proben (Endivien-, Kopf-, Eissalat wie auch wildwachsende Pflanzen) wurden 800 bis 1000 g gesammelt und gewogen. Die Proben wurden in einem Mixer (Starmixer) zerkleinert und im Scheidetrichter mit 3 x 150 ml Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wurde mit 2 x 200 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und nach dem Abfiltrieren über eine Glasfritte (G2) am Rotationverdampfer vorsichtig zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 3 bis 5 ml n-Hexan/Methylenchlorid (1:1)-Mischung aufgenommen und auf eine 5 g Lichroprep Si-60-Säule (200 mm x 25 mm) aufgetragen. Die Elution erfolgte unter Benutzung von n-Hexan als Elutionsmittel. Das n-Hexan-Eluat (100 ml) enthielt neben BaP unpolare pflanzlichen Substanzen. Die n-Hexan-Fraktion wurde zur Trockene einrotiert und mit DMF/Wasser (85:15)-gesättigtem n-Hexan aufgenommen (2 ml). Das BaP konnte anschliessend mit Hilfe der Gelverteilungschromatographie an Sephadex LH-20 von diesen Substanzen getrennt werden. Die polareren Benzo[a]pyren-dione wurden von der Lichroprep Si-60-Säule unter Verwendung von Methanol als Elutionsmittel (40 ml) eluiert (es wurde teilweise eine Methanol/Aceton-Mischung 50:50 verwendet). Die Methanol-Fraktion wurde bis fast zur Trockene einrotiert (ca. 3 ml) und auf eine 3 g RP-18-Säule (200 mm x 25 mm) aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde Methanol verwendet, wobei die BaP-dione in den ersten 15 bis 30 ml, befreit von einem grossen Anteil der pflanzlichen Begleitstoffe, eluierten. Die Methanol-Fraktion wurde am Rotationverdampfer bis fast zur

Trockene eingeengt und anschliessend in 4 ml einer Isopropanol/Methanol (1:1)-Mischung aufgenommen. Die Probe wurde weiter einer gelchromatographischen Trennung unterzogen. Das BaP-dione enthaltende Eluat wurde eingeengt und mittels Methylenchlorid in Mikroliter-Gefässe (mit spitzem Boden) überführt. Anschliessend wurde das Methylenchlorid vorsichtig im Stickstoffstrom ausgeblasen und mit Hilfe einer Mikroliter-Eppendorf Varipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) ein definiertes Volumen an Methylenchlorid (30-50 μ l) zugesetzt. Mit einer 10 μ l Hamilton-Spritze wurden dann aliquote Volumina für die entsprechende HPLC-Trennung und Bestimmung der BaP-dione entnommen.

Das Eluat der Gelverteilungschromatographie (BaP-Fraktion), wurde in einem Scheidetrichter mit 3 x 100 ml bidest. Wasser DMF-frei gewaschen. Die organische Phase wurde anschliessend mit Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockene eingeengt. Mit Methylenchlorid als Lösungsmittel wurde die Probe in ein Milliliter-Gefäss überführt und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom ausgeblasen. Mit einer Eppendorf Varipette wurde anschliessend ein definiertes Volumen an n-Hexan zugesetzt, woraus mit einer 10 μ l Hamilton-Spritze aliquote Volumina für die HPLC-mässige Bestimmung entnommen wurden.

Entsprechend den pflanzlichen Proben wurden auch die Bodenproben aufgearbeitet.

3.12 Rauchfleischproben

Die zerkleinerte (20 bis 50g) Rauchfleischprobe wurde mit 50 ml Chloroform versetzt. Zusätzlich wurden 20 g Na_2SO_4 und 10 g Seesand zugesetzt und über Nacht im Schüttelkolben auf der Schüttelmaschine extrahiert. Die Probe wurde über eine Glasfritte (G4) filtriert und der Extrakt mit 20 g vorgeglühter Celite (Typ 545, 20-45 μ m, Fa. Serva) versetzt. Das Chloroform wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und die

Celite über 2 Stunden im Vakuum rotiert. Die so erhaltene Celite wurde anschliessend auf eine vorbereitete Celite-Säule (10 g Celite in einer 400 mm x 30 mm Säule) gegeben und unter Klopfen verdichtet. Die Säule wurde mit einer 2 cm Seesand-Schicht überschichtet, um ein Aufschwimmen des Celite-Materials zu verhindern. Es wurden dann 80 ml Propylencarbonat (Pestanal, Riedel de Haen) zum Einsickern zugegeben und mit Wasser nacheluiert. 40 ml des verdrängten Propylencarbonats wurden aufgefangen und auf eine RP-18-Säule (350 mm x 26 mm, Gelbetthöhe=250 mm) aufgetragen. Das RP-18 wurde erst im Methanol suspendiert in die Säule gegeben, dann nach der Fixierung der beweglichen Stempel mit einer Mischung aus Methanol/Wasser (1:9) äquilibriert (1200 ml). Nach dem Auftragen der 40 ml Propylencarbonat-Fraktion, die mit 72 ml Wasser und 31 ml Methanol vermischt waren, wurde mit der Methanol/Wasser (1:9)-Mischung eluiert. Die Elution erfolgte unter Niederdruck (Gerätekombination wie bei der Gelverteilungschromatographie) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 85 ml/h. Nach 300 ml Elution (Ablösung des Propylencarbonats), wurde das Elutionsmittel gewechselt auf Methanol (100%). Nach 60 ml wurden die Fraktionen bis zu 230 ml aufgefangen. Dieses Methanol-Eluat wurde eingeengt, in Aceton aufgenommen und nochmals eingeengt. Der gelbliche, ölige Rückstand wurde in 4 ml Isopropanol/Methanol (1:1) aufgenommen und der Gelchromatographie an Sephadex LH-20 unterworfen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit der Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit Isopropanol/Methanol (1:1) als Elutionsmittel.

3.13 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH)

Carbonylfreies Methanol:

Ein Liter vordestilliertes Methanol (p.a. Merck) wurde mit 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt und zwei Stunden unter

Rückfluß gekocht. Anschliessend wurde das carbonylfreie Methanol abdestilliert.

Umkristallisiertes 2,4-Dinitrophenylhydrazin:

2 g 2,4-DNPH (p.a Merck) wurden in einem 250 ml Zweihalskolben mit 50 ml carbonylfreiem Methanol versetzt und mit einem Rückflußkühler bestückt. Dann wurde zum Sieden erhitzt und solange carbonylfreies Methanol zugefügt (ca. 100 ml), bis das ganze 2,4-DNPH gelöst war. Der Rückflußkühler wurde entfernt, die noch heiße Lösung abgefrittet und nach Erkalten auf Raumtemperatur im Kühlschrank zum Auskristallisieren gebracht.

Jedes Benzo[a]pyren-dion (BaP-6,12-, BaP-1,6- und BaP-3,6-dion) wurde aus seiner Methylenchlorid-Lösung mit einer Vollpipette entnommen und in einen Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vorsichtig entfernt und mit 5 ml carbonylfreiem Methanol versetzt.

Die 100-fache molare Menge an 2,4-DNPH (bezogen auf das BaP-dion) wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 10 ml carbonylfreiem Methanol versetzt und anschliessend 2 ml konz. H_2SO_4 unter Rühren zugetropft. Die Lösung wurde im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die 2,4-DNPH-Lösung wurde vorsichtig dem Kolben mit dem BaP-dion zugefügt (abkühlen im Wasserbad) und am Rotationverdampfer bei $30^\circ C$ (Wasserbadtemperatur) 2 Stunden gedreht. Danach wurde das Methanol unter leichtem Vakuum am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Schwefelsäure Lösung wurde mit je 100 ml einer CCl_4/CH_2Cl_2 (4:1)-Mischung 3 Mal im Scheidetrichter extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit bidest. Wasser (2 x 100 ml) schwefelsäurefrei gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, über einer Glasfritte filtriert und eingeengt. Für die dünnschichtchromatographische Trennung wurde der Rückstand in Aceton gelöst und auf analytischen Kieselgel 60-Platten (Methylenchlorid)

von dem nicht umgesetzten BaP-dion gereinigt. Die Monohydrazone-Zone wurde abgekratzt und mittels der bekannten spezifischen Aktivität (bei Zugabe von radioaktiv markiertem BaP-dion) durch Radioaktivitätsmessung mengenmässig ausgewertet. Bei inaktiven Ansätzen wurde die Auswertung unter Verwendung der ermittelten Extinktionskoeffizienten durchgeführt. Für die säulenchromatographische Isolierung wurde der Rückstand mit Methanol versetzt und auf eine RP-18-Säule (mit Methanol äquilibriert) aufgetragen. Verunreinigungen wurden mit Methanol eluiert, wobei die Monohydrazone an der obersten Schicht der RP-18 (3 g)-Säule hafteten. Die Elution der Monohydrazone wurde unter Verwendung von Methylenchlorid (eluierten mit der Elutionfront) erreicht. Die Säulenchromatographie wurde bei der Derivatisierung der BaP-dione nach ihrer gelchromatographischen Isolierung an Sephadex LH-20 (Isopropanol/Methanol) angeschlossen. Die isolierten Monohydrazone wurden mittels Methylenchlorid in ein Mikroliter-Gefäß mit spitzem Boden überführt und das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom vorsichtig abgeblasen. Mit einer Eppendorf-Variante wurde ein definiertes Volumen an CCl_4 /t-Butylmethylether/THF (9:1:1) zugegeben (30 bis 50 μl). Aus dieser Lösung wurden anschliessend aliquote Volumina mit einer Hamilton-Spritze für die HPLC entnommen.

3.14 Mikrobiologische Methoden

3.14.1 Sterilisation

Die Sterilisation aller Medien und Lösungen erfolgte im Autoklaven bei 1 atü und 121°C , 15 Minuten lang. Pipetten wurden im Trockenschrank bei 180°C sterilisiert.

3.14.2 Nähragar

Nutrient broth	2,4 g
NaCl	1,5 g
Agar (Difco)	3,0 g

auf 300 ml mit bidestilliertem Wasser

3.14.3 Komplet-Medium

bidest. H ₂ O	10,0 ml
Nutrient broth	0,1 g (1%)
NaCl	0,06 g

3.14.4 Glucose-Medium

2-fach Phosphat-Puffer	10,0 ml
100-fach Salzlösung	0,1 ml
Glucose	10 mM

3.14.5 Phosphat-Puffer 20-fach (500 mM)

KH ₂ PO ₄	20,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	70,0 g

auf 1 Liter mit bisdestilliertem Wasser

3.14.6 Salze 100-fach

Ammoniumsulfat	50,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10,0 g
SL 6	50,0 ml
Fe(III)-NH ₃ -Citrat	0,5 g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	2,5 g (getrennt lösen)

auf 500 ml mit bidestilliertem Wasser

3.14.7 Schwermetall-Lösung (SL 6) nach Pfennig

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	30 mg
(300 mg auf 500 ml Wasser davon 50 ml)	
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	30 mg
auf 1 Liter mit bidest. Wasser	

3.14.8 Führung auf Naphthalin

2-fach Phosphat-Puffer	100 ml
100-fach Salzlösung	1,0 ml
Naphthalin	0,1 g

3.14.9 Führung auf Benzo[a]pyren

2-fach Phosphat-Puffer	100 ml
100-fach Salzlösung	1,0 ml
Benzo [a] pyren	82 µg

3.14.10 Aluminiumoxid-Säule

Aluminiumoxid (W 200 neutral Fa. Woelm) wurde bei 120°C im Trockenschrank über zwei Stunden getrocknet. Anschliessend wurde das Al₂O₃-Material mit 3% Wasser versetzt und geschwenkt. Dadurch wurde Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe III (nach Brockman) hergestellt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Für spurenanalytische Bestimmungen von Benzo[a]pyren (BaP) sowie seiner isomeren Dione BaP-6,12-, BaP-1,6- und BaP-3,6-dione, die neben anderen Produkten bei der Photooxidation des polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffs entstehen, wurden Verfahren zur Anreicherung aus pflanzlichen Nahrungsmitteln, geräucherten Fleischerzeugnissen, Mikroorganismen und Bodenproben ausgearbeitet. Dabei haben sich radiochemische Methoden unter Einsatz der ^{14}C -markierten Stoffe besonders bewährt, da sie in jedem Stadium der Extraktionen und Trennoperationen durch Radioaktivitätsmessungen rasch erfaßt werden konnten. Die hierzu erforderlichen markierten BaP-dione wurden aus $[7,10-^{14}\text{C}]$ -Benzo[a]pyren durch Photooxidation dargestellt und bis zur Konstanz ihrer spezifischen Radioaktivität gereinigt.

Bei der Ausarbeitung der Anreicherungsverfahren für BaP und seine isomeren Dione aus pflanzlichen Proben, geräucherten Fleischwaren, Mikroorganismen und Bodenproben konnten durch Versuchsserien je nach Material Ausbeuten zwischen 70 und 95 % erreicht werden.

Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für die BaP-dione wurden diese mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin in die Monohydrazone übergeführt. Sie können für die HPLC und bei der dünnschichtchromatographischen Trennung angewendet werden. Die Dinitrophenylhydrazone können auch nach Trennung der Dione auf dünnen Schichten gebildet werden und dabei zu ihrer Identifizierung dienen.

Die quantitative Bestimmung von BaP, BaP-dionen und Dinitrophenylhydrazonen der BaP-dione erfolgte unter Anwendung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Bei Unterschreitung deren Nachweisgrenze wurden halbquantitative Nachweise durch visuellen Vergleich mit entsprechenden Proben auf DC-Platten geführt.

Untersuchungen zur Photooxidation von BaP auf Pflanzen bei Sonnenbestrahlung wie auch unter dem Einfluß von simuliertem Tageslicht zeigten, daß dabei die isomeren BaP-dione in einer Größenordnung von 0,5 bis 3 % des ursprünglich vorhandenen BaP entstehen. In Gebieten starker Umweltbelastung wurden neben BaP auch die BaP-dione aufgefunden. So ergaben Untersuchungen an pflanzlichen Produkten aus dem Bereich des Flughafens Stuttgart-Echterdingen 0,2 bis 3,7 µg BaP je kg und 6 bis 10 ng BaP-dione je kg. Bodenproben aus dem Bereich des Flughafens Stuttgart-Echterdingen ergaben Werte zwischen 90 und 280 µg BaP je kg. Die Kontamination der Pflanzen erfolgt jedoch offenbar direkt aus der Luft, da Aufnahmestudien mit BaP negativ verliefen.

Versuche zur Photooxidation von BaP auf geräucherten Fleisch-erzeugnissen bei simuliertem Tageslicht und unter UV-Bestrahlung ergaben, daß dabei keine BaP-dione entstehen.

Mikrobiologische Untersuchungen zur Stabilität von BaP gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zeigten, daß die Naphthalin abbauenden Stämme NCIB 9816, NCIB 12092 und NCIB 10353 eine Umwandlung zu den isomeren Dionen bewirken. Die höchste Umwandlungsrate wurde mit 6,7 % des eingesetzten BaP bei dem Stamm NCIB 9816 erzielt.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Cook J.W.; Hewett C.L.; Hieger I.
J. Chem. Soc., (1933), S.395
- 2 Mottram J.C.; Doniach I.
Nature 144:933-4 (1937)
- 3 Mottram J.C.; Doniach I.
Nature 140:588 (1937)
- 4 Falk H.; Steiner P.; Goldfein S.; Breslow A.; Hykes R.
Cancer Res., 11:318 (1951)
- 5 Steiner R.
Cancer Res., 14:103 (1954)
- 6 Grimmer G.
Erdöl Kohle 25:339 (1972)
- 7 Grimmer G.
Mitteilung auf DMGK-Arbeitssitzung Okt. 1976
- 8 Grimmer G. in
Berichte des Umweltbundesamtes 1:58 (1979)
- 9 Grimmer G.
Vortrag in Hamburg, Mai 1975 (Diss. Winkler)
- 10 Pierce R.; Katz M.
Anal. Chemistry, 47:1743 (1975)
- 11 Howard J.W.; White R.H.; Fry B.E.
JAOAC 49:611 (1966)
- 12 Grimmer G. in
Berichte des Umweltbundesamtes 1:14 (1979)
- 13 Meier H. zu Köcker
Brennstoff-Chemie 47:35 (1966)
- 14 Ray S.K.; Long R.
Comb. Flame 8:139 (1964)
- 15 Kern J.; Spengler G.
Erdöl Kohle 23:813 (1970)

- 16 Badger G.M.
J. Nat. Cancer Institute, Monogr. 9:1 (1962)
- 17 Badger G.M.
J. Chem. Soc., (1958), S.2449
- 18 Badger G.M.
Nature 187:663 (1960)
- 19 Badger G.M.
Austr. J. Chem., 17:778 (1964)
- 20 Crittenden B.D.; Long R.
Carcinogenesis-A Comprehensive Survey 1:209
Freudenthal R.; Jones P.W. (New York 1976)
- 21 Suess M.J.
Sci. Total. Environ., 6:239 (1976)
- 22 Grimmer G. in
Berichte des Umweltbundesamtes 1:59 (1979)
- 23 DGMK Forschungsbericht: 4568
- 24 DGMK Forschungsbericht: 4547 II
- 25 Technischer Überwachungs-Verein Stuttgart
Wirkungsmessungen von Luftschadstoffen mit Bio-
indikatoren in Filderstadt (1986)
- 26 Grimmer G. in
Berichte des Umweltbundesamtes 1:104 (1979)
- 27 Shabad L.M.; Smirnov G.A.
Atm. Environ. Pergam. Press 6:153-64 (1972)
- 28 Grimmer G.; Hildebrandt A.
Z. Krebsforsch., 67:272 (1965)
- 29 Grimmer G.; Hildebrandt A.
Dtsch. Lebensm. Rundsch., 61:237 (1965)
- 30 Howard J.; Teague R.Jr.; White R.
JAOAC 49:595 (1966)
- 31 Maslowska J.; Nowicka K.
Gospod. Miesna 36(9-10):21-3 (1984)

- 32 Hellwinkel D.
"Die systematische Nomenklatur der organischen
Chemie", Springer Verlag, Heidelberg 1978
- 33 Gräf W.; Diehl H.
Arch. Hyg. Bakteriolog., 150:49 (1966)
- 34 Grimmer G.; Duvel D.
Z. Naturforsch., 256:1171 (1970)
- 35 Borneff J.
Arch. Hyg. Bakteriolog., 152:279 (1968)
- 36 Morimoto I.; Shaikh M.; Thomson R.; Williamson D.
J. Chem. Soc. Chemical Comm., (1970), S.550-51
- 37 Gräf W.; Nowak W.
Arch. Hyg. Bakteriolog., 150:513-27 (1967)
- 38 Katz M.; Chann C.; Tosine H.; Sakuma T.
PAH Int. Symp. 3rd: 171-88 (1979)
- 39 Yang S.; Roller P.; Gelboin H.
Biochem., 16(16):3680-87 (1977)
- 40 Jeftic L.; Adams R.N.
J. Am. Chem. Soc., 92(5):1332-37 (1969)
- 41 Cavalieri E.L.; Rogan E.G.; Cremones P.; Devonesen P.D.
Biochem. Pharm., 37(11): 2173-82 (1988)
- 42 Fieser L.F.; Hershberg E.B.
J. Am. Chem. Soc., 61:1565-74 (1939)
- 43 Alpert J.; Cavalieri E.L.
J. Med. Chem., 23:919-27 (1980)
- 44 Lorentzen R.J.; Caspary W.J.; Lesko S.A.; Ts'o P.O.P.
Cancer Res., 39:3194-98 (1979)
- 45 Lesko S.A.; Caspary W.J.; Lorentzen R.J.; Ts'o P.O.P.
Biochemistry 14(18):3978-84 (1985)
- 46 Cerniglia C.E.; Gibson D.T.
J. Biol. Chem., 254(23):12175-80 (1979)
- 47 Lorentzen R.; Caspary W.; Lesko S.; Ts'o P.O.P.
Biochem., 14(18):3970-77 (1975)

- 48 Falk H.L.; Kotin P.; Lee S.S.; Nathan A.
J. Nation. Cancer Inst., 207:699-724 (1962)
- 49 Tebbens B.D.; Mukai M.; Thomas J.F.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 52:365-72 (1971)
- 50 Pullmann A.; Pullmann B.
Adv. Cancer Res., 3:117 (1955)
- 51 Houben Weyl, Vol 5/2b, S.21
- 52 Schäfer-Ridder: Chemische Carcinogene
Nachr. Chem. Techn., 27(1) (1979)
- 53 Leadon S.A.; Stampfer M.R.; Bartley J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4365-68 (1988)
- 54 Gubergric M.J.; Linnik A.B.; Paalme L.P.; Sabad L.M.
Vosposyonkologii Leningrad 20(1):77-80 (1974)
- 55 Berenblum J.; Crowfoot D.; Holiday E.
Cancer Res., 3:151-58 (1943)
- 56 Lorentzen R.j.; Ts'o P.O.P.
Biochem., 16(7):1467-73 (1977)
- 57 Wislocki P.G.; Wood A.W.; Chang R.; Lewin W.; Yagi H.;
Hernandez O.; dansette P.; Jerina D.; Conney A.
Cancer Res., 36:3350-57 (1976)
- 58 Lorentzen R.J.; Lesko S.A.; McDonald K.; Ts'o P.O.P.
Cancer Res., 39:3194-98 (1979)
- 59 Grimmer G.; Hildebrandt A.
J. Chromatogr., 20:89 (1965)
- 60 Sprengler G.; Haupt G.
Erdöl Kohle 22:679 (1969)
- 61 Winkler E.
Dissertation, Universität Stuttgart (1977)
- 62 Broschüre: Aktivkohlen
"Herstellung, Eigenschaften und Einsatzgebiete"
Degussa AG/Frankfurt
- 63 Grimmer G.
Erdöl Kohle Compendium S.606 (1975/76)

- 64 Wilk M.
J. Chromatogr., 24:414 (1966)
- 65 Oelert H.H.
Z. Anal. Chem., 244:91 (1969)
- 66 Streuli C.A.
J. Chromatogr., 56:219 (1971)
- 67 Klimisch H.; Ambrosius D.
J. Chromatogr., 94:311 (1974)
- 68 Klimisch H.; Reese D.
J. Chromatogr., 80:266 (1973)
- 69 Grimmer G.; Böhnke H.
Chromatographia 9:30 (1976)
- 70 Sawicky E.
Anal. Chem., 36:497 (1964)
- 71 Thielemann H.
Microchim. Acta 1971:838 (1971)
- 72 Keefer L.K.
J. Chromatogr., 31:390 (1967)
- 73 Borries G.
J. Chromatogr., 130:387 (1977)
- 74 Aichberger K.
Landwirtsch. Forsch., 34:51 (1981)
- 75 Oslanski V.L.; Yatzus T.
Microchem. J., 28:151 (1983)
- 76 Kunte J.; Borneff H.
Z. Wasser- u. Abwasser- Forsch. 9:35 (1976)
- 77 Weil L.; Hauck E.
GIT Fachz. Lab., 24:538 (1980)
- 78 Howart A.G.; Mills G.A.
Int. J. Environ. Anal. Chem., 14:43 (1983)
- 79 Kaschani D.T.
DGMK-Vortrag Köln Okt. 1977
- 80 Kaschani D.T.
"Instrumental HPLC" S.185, Heidelberg 1980

- 81 Borgen A.; Darvey H.; Castagnoli N.
J. Med. Chem., 16(3):502-506 (1973)
- 82 Cerniglia C.E.; Crow S.A.
Arch. Microbiol., 129:9-13 (1981)
- 83 Cerniglia C.E.; Gibson D.T.
J. Biol. Chem., 255(11):5159-63 (1980)
- 84 Devdariani T.V.; Durmishidze S.V.
Metodybioch. isledov. rast. Tblisi, (1983), S.101-107
- 85 Jäger J.
Z. Anal. Chem., 255:281-84 (1971)
- 86 Kinoshita N.; Shears B.; Gelboin H.
Cancer Res., 33:1937 (1973)
- 87 Raha C.
J. Chromatogr., 264:453-58 (1983)
- 88 Tausch H.; Stehlik G.
Chromatographia 10:350 (1977)
- 89 Lao R.C. in
Carcinogenesis, Vol 1, S.271
- 90 Lao R.C.
J. Chromatogr., 112:681 (1975)
- 91 Grimmer G.
Fresenius Z. Anal. Chem., 289:91 (1978)
- 92 Bettencourt A.; Lhoest G.; Roberfroid M.; Mercier M.
J. Chromatogr., (1977), S.323-330
- 93 Jacob J.; Grimmer G.; Schmoltdt A.
Z. Physiol. Chemie 360:1525-34 (1979)
- 94 Takahashi G.; Kinoshita K.; Hashimoto K.; Yasuhiry K.
Cancer Res., 39:1814-18 (1979)
- 95 Romanowski Th.
HRC+CC 4:209 (1981)
- 96 Jeffrey A.; Blobsten S.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:3211-15 (1976)
- 97 König J.; Balfanz E.; Funcke W.; Romanowski Th.
PAH Int. Symp. 7th: 711 (1983)

- 98 Klimisch H.; Ambrosius D.
J. Chromatogr., 120:299 (1976)
- 99 Engelhardt H.; Böhme W.
Erdöl Kohle Compendium 741 (1974/75)
- 100 Roumeliotis P.
Z. Anal. Chem., 298:241 (1979)
- 101 Wise S.A. in Polynuclear Aromatic Hydrocarbons:
Chemistry and Biological Effects (1980), S.791
- 102 Hagenmaier H.; Jäger W.
Vom Wasser 53:9 (1978)
- 103 Stöber I.; Reupert R.
Vom Wasser 56:115 (1981)
- 104 Organ K.
Anal. Chem., 51:1315 (1979)
- 105 Smith T.R.; Strickler V.H.
HRC+CC 3:634 (1980)
- 106 Scott R.P.W.; Kucera P.
J. Chromatogr., 161:51 (1979)
- 107 Takeuchi T.; Ishii D.
J. Chromatogr., 218:199 (1981)
- 108 Huber L.; Emmert J.
Staub- Reinhalt. Luft 47(1-2):22-27 (1987)
- 109 Bond J.A.; Mitchell C.E.; Li A.
Bioch. Pharm., 32(24):3771-76 (1983)
- 110 Holder G.; Yagi H.; Dansette P.; Jerina D.;
Lewin W.; Lu A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71(11):4356-60 (1974)
- 111 Duppel W.; Lebeault J.
Eur. J. Biochem., 36:583-92 (1973)
- 112 Selkirk J.; Croy R.; Roller P.; Gelboin H.
Cancer Res., 34:3474-80 (1974)
- 113 Yang S.; McCourt D.; Roller P.; Gelboin H.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73(8):2594-98

- 114 Yang S.; Roller P.; Fu P.
Bioch. Biophys. Res. Comm., 77(4):1176-82 (1977)
- 115 Mach W.
Dissertation, Universität Stuttgart (1987)
- 116 Bond J.A.; Kumar V.
Talanta 29:65-9 (1982)
- 117 Bock K.; Lilienblum W.; Pfeil W.
FEBS Lett., 121:269-72 (1980)
- 118 Conney A.H.; Miller E.C.; Miller J.A.
J. Biol. Chem., 228:753-66 (1957)
- 119 Potthast K.; Eigner G.
J. Chromatogr., 103:173 (1975)
- 120 Fritz W.
Nahrung 12:639 (1968)
- 121 Bergert K.H.; Köhler M.; Schulmacher H.
Z. Anal. Chem., 208:44 (1964)
- 122 Genest C.; Smith D.M.
JAOAC 47:894 (1964)
- 123 Hertel W.; Suckow P.; Rohrlich M.
Getreide Mehl 20:65 (1970)
- 124 Rohrlich M.
Qual. Plant. Veget., 16:334 (1968)
- 125 Begleitunterlagen zu den Referenzsubstanzen vom:
National Cancer Institut USA, NCI chemical Carcinogen
Repository Missouri
- 126 DGMK-Forschungsbericht: 4559
- 127 Grimmer G.; Hildebrandt A.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 55:631-35 (1978)
- 128 Grimmer G.; Hildebrandt A.; Böhnke H.
Z. Dtsch. Lebensm. Rundsch., 3:93-100 (1975)
- 129 Yukio S.; Hiroshi S.; Mitsuharu T.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 61(1):129-35 (1978)
- 130 Jahr D.; Höllerer G.
Z. Lebensm. Unters.- Forsch., 163:1-3 (1977)

- 131 Grimmer G.; Böhnke H.; Naujack K.W.
Fresenius Z. Anal. Chem., 290:147 (1978)
- 132 Binnemann P.H.
Z. Lebensm. Unters.- Forsch., 169:447-52 (1979)
- 133 Mitt. Grimmer G., 14 Feb. 1980
- 134 Bories G; Gasc N.
Ann. Fals. Exp. Chim., 73:487-96 (1980)
- 135 Lenges J.; Lunks D.; Vo Thi N.B.
Rev. Ferment. Ind. Aliment 31:20-22 (1976)
- 136 Morozzi G.; Gambelunghe C.; Manenti R.
Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment 14(5):351-6 (1985)
- 137 Mitt. Grimmer G., 10 Nov. 1980
- 138 Yasuhide T.; Shunjiro O.; Masatake T.
J. Food Prot., 45(2):139-42 (1982)
- 139 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
(April 1981)
- 140 Van Heddeghem A.; Huyghebaert A.; De Moor H.
Z. Lebensm. Unters.- Forsch., 171: 9-13 (1980)
- 141 Wiseman A.; Woods L.
J. Chem. Tech. Biotechnol., 29:320-24 (1979)
- 142 Warshawsky D.; Radika M.
Biochem. Biophys. Res. Com., 152(2):540-4 (1988)
- 143 Kirso U.; Belykh L.
PAH Int. Symp. 7th: 679-87 (1983)
- 144 Kiyohara H.; Nagaa K.
J. Gen. Microbiol., 105:69-75 (1978)
- 145 Davies J.I.; Evans W.C.
Biochem. J., 91:251 (1964)
- 146 Patel T.R.; Barnsley E.A.
J. Bacteriol., 143(2):668-73 (1980)
- 147 Bransley E.A.
Biochem. Biophys. Res. Com., 72(3):1116-21 (1976)
- 148 Valerio F.; Lazzaroto A.
Int. J. Environ. Anal. Chem., 23:135-51 (1985)

- 149 Korfmacher W.A.; Wehry E.L.; Mamantov G.; Natusch D.F.S.
Environ. Sci. Technol., 14:1094-99 (1980)
- 150 Gharaibeh S.H.; Abuirjeie M.A.; Hunaiti A.A.;
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41:449-53 (1988)

6. LEBENS LAUF

Name	Konstantinos Christoglou
Geburtsdatum	11. Sept. 1959
Guburtsort	Katerini/Griechenland
Eltern	Michail Christoglou und Ehefrau Sofia geb. Amperiadou
Schulbildung	1965-1971 Grundschule in Katerini 1971-1978 A'-Gymnasium in Katerini 1978-1979 Studienkolleg Karlsruhe
Studium	WS 1979/80 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Stuttgart Diplom Sept. 1986 seither Anfertigung der vorliegenden Dissertation

