

Standardisierte Expositionen gegenüber 1,4-Dioxan zur
Etablierung eines Biomonitorings

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Franziska von Helden
aus Attendorn

Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Ökologie
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin
Leiter: Prof. Dr. Joachim Schneider

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. biol. hom. D. Walter

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Renz

Gutachter: Prof. Dr. med. T. Eikmann

Tag der Disputation: 23.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Vorkommen und Verwendung von 1,4-Dioxan.....	3
1.2	1,4-Dioxan.....	4
1.2.1	Chemische Bezeichnung	4
1.2.2	Chemische und physikalische Eigenschaften	4
1.3	Toxikologisch relevante Eigenschaften von 1,4-Dioxan	5
1.3.1	Resorption	6
1.3.2	Verteilung	7
1.3.3	Metabolismus.....	7
1.3.4	Elimination.....	9
1.3.5	Wirkung	10
1.3.5.1	Akute Toxizität	10
1.3.5.2	Subakute Toxizität	11
1.3.5.3	Chronische Toxizität.....	12
1.3.6	Begründung des MAK-Wertes	14
2.	Material und Methoden.....	15
1.4	Kollektivbeschreibung	15
1.5	Standardisierte Expositionsmethode	15
1.6	Präanalytische Phase der Probengewinnung.....	17
1.6.1	Luftprobennahme während der Expositionen.....	17
1.6.2	Blutproben.....	17
1.6.3	Harnproben	18
1.7	Analyse-Methoden	18
1.7.1	Analyse der Expositionslaborluftproben.....	18
1.7.2	Analyse von 1,4-Dioxan in Blut und Harn	19
1.7.3	Bestimmung von 2-Hydroxyethoxyessigsäure im Harn	19
1.7.4	Kreatininbestimmung.....	20
3.	Ergebnisse	22
1.8	1,4-Dioxan-Luftkonzentrationen im Expositionslabor	22
1.9	1,4-Dioxanwerte im Blut.....	23
1.10	1,4-Dioxan im Harn	26

1.11	2-Hydroxyethoxyessigsäure im Blut.....	28
1.12	2-Hydroxyethoxyessigsäure im Harn.....	29
1.12.1	2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration in mg/L.....	29
1.12.2	2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration, bezogen auf Kreatinin.....	31
1.13	Subjektive Symptome während der Exposition gegenüber 1,4-Dioxan	37
4.	Diskussion.....	38
5.	Schlussfolgerung.....	45
6.	Zusammenfassung.....	46
7.	Summary.....	48
8.	Anhang.....	50
9.	Literaturverzeichnis	64
10.	Erklärung zur Dissertation	68
11.	Danksagung.....	69

1. Einleitung und Fragestellung

Eine wesentliche Aufgabe der Arbeitsmedizin besteht in der Entwicklung präventiver Maßnahmen zum Schutz der Gesundheit von Arbeitnehmerinnen und Arbeitnehmern.

Zur Gesundheitsprävention am Arbeitsplatz gehört unter anderem die Einhaltung von Luftgrenzwerten bei Gefahrstoffen. Diese Grenzwerte werden durch die Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) vorgegeben. Die wissenschaftsbasierten MAK-Werte werden von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) so festgelegt, dass diejenigen Arbeitnehmer, die dieser Konzentration fünfmal pro Woche und täglich acht Stunden in einem 40-jährigen Berufsleben ausgesetzt sind, keine gesundheitlichen Folgen durch Gefahrstoffe befürchten müssen [1].

Der MAK-Wert wird überwiegend mithilfe von epidemiologischen Daten beim Menschen sowie aus tierexperimentellen Studien abgeleitet.

Die individuelle Belastung eines Arbeitnehmers kann jedoch von der gemessenen Luftkonzentration eines Gefahrstoffes am Arbeitsplatz abweichen, da die Gefahrstoffkonzentrationen innerhalb der Raumluft inhomogen verteilt sein können. Je nachdem, wo sich der Arbeitnehmer die meiste Zeit aufhält, kann die Gefahrstoffbelastung von der messtechnisch erfassten Luftkonzentration abweichen.

Ferner steigt die individuelle Gefahrstoffaufnahme dann erheblich an, wenn ein Arbeitnehmer die vorgegebenen Verhaltensregeln missachtet, indem er z.B. nicht unter einer Abzugseinrichtung arbeitet, auf seine persönliche Schutzausrüstung verzichtet oder sich insbesondere direktem Hautkontakt aussetzt. Auch eine körperliche Belastung (Tätigkeit) steigert die Gefahrstoffaufnahme durch erhöhte Atemminutenvolumina. In Ruhe beträgt das durchschnittliche Atemminutenvolumen eines Menschen ~ 7 L/min und steigt bei einer Leistung von 50 W auf ~ 30 L/min an. Eine körperliche Belastung von 75 W führt zu einer weiteren Erhöhung auf ~ 35 L/min [2]. Da die Exposition gegenüber 1,4-Dioxan überwiegend inhalativ erfolgt [3, 14], führt eine Zunahme der körperlichen Aktivität zu einer ansteigenden inneren Belastung.

Alle diese Faktoren können dazu führen, dass im täglichen Arbeitsleben die Arbeitnehmer einer höheren Belastung ausgesetzt sind, als es die maximale Arbeitsplatzkonzentration erwarten lässt. Daher besteht die Notwendigkeit, die individuelle Belastung der Arbeitnehmer durch ein Biomonitoring zu überprüfen.

So stellt die Deutsche Forschungsgemeinschaft als Ergänzung zu den MAK-Werten für Gefahrenstoffe am Arbeitsplatz Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (BAT-Werte) auf, die als Grundlage für ein Biomonitoring bei den Arbeitnehmern dienen. Der BAT-Wert ist wie folgt definiert:

„Der BAT-Wert ist die beim Menschen höchstzulässige Quantität eines Arbeitsstoffs bzw. Arbeitsstoffmetaboliten oder die dadurch ausgelöste Abweichung eines biologischen Indikators von seiner Norm, die nach dem gegenwärtigen Stand der wissenschaftlichen Kenntnis im Allgemeinen die Gesundheit der Beschäftigten auch dann nicht beeinträchtigt, wenn sie durch Einflüsse des Arbeitsplatzes regelhaft erzielt wird.“ [1]

Die BAT-Werte orientieren sich ebenso wie die MAK-Werte am Berufsleben (siehe oben). Sie geben die maximale Konzentration eines Gefahrstoffes in biologischem Material an, die keine gesundheitlichen Schäden verursacht. So kann individueller Gesundheitsschutz betrieben werden, der die über die MAK-Werte hinausgehenden Risiken aufzeigt bzw. vermeidet. Die BAT-Werte sind damit ein wichtiger Parameter der arbeitsmedizinischen Sekundärprävention.

Für die verschiedenen Gefahrenstoffe existieren BAT-Werte bisher nur in begrenztem Umfang. Auch für 1,4-Dioxan ist bislang noch kein BAT-Wert festgelegt worden, der eine gesundheitliche Risikoabschätzung bezüglich der Arbeitsstoffbelastung erlauben würde.

Young et al. haben sechsstündige inhalative Expositionen am Menschen durchgeführt und aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der Plasma- und Harn-Halbwertszeit generiert [14]. Allerdings wurden diese Versuche mit dem damaligen höheren MAK-Wert von 50 ppm durchgeführt. Nachdem Augenreizungen bei den Probanden zu einer Absenkung des MAK-Wertes auf 20 ppm (73 mg/m^3) geführt hatten [4], fanden keine weiteren wissenschaftlich untersuchten Expositionen mit anschließendem Biomonitoring statt. Ebenso fehlen Untersuchungen zur körperlichen Belastung bei Dioxan-Exposition am Arbeitsplatz, die aufgrund gesteigerter Atemvolumina die inhalative Stoffaufnahme verändert. Die Studien von Young et al. fanden ohne körperliche Belastung statt, weshalb der Einfluss körperlicher Belastung auf die Gefahrstoff- bzw. Metaboliten-Konzentration im biologischen Material durch 1,4-Dioxan-Expositionen bislang unbekannt ist.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden 1,4-Dioxan-Expositionen unter standardisierten Bedingungen am Menschen orientieren sich durch die vorgegebene Expositionszeit von zweimal vier Stunden mit einer $\frac{3}{4}$ -stündigen Mittagspause am Arbeitsalltag.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, mithilfe eines Biomonitorings nach standardisierten 1,4-Dioxan-Expositionen in Höhe des MAK-Wertes die toxikokinetischen Daten zu evaluieren, die es ermöglichen, einen BAT-Wert vorzuschlagen.

1.1 Vorkommen und Verwendung von 1,4-Dioxan

Dioxan ist ein zyklischer Ether, der in der Industrie als Lösungsmittel für organische Produkte, Konservierungsmittel und Räuchermittel verwendet wird. Es ist Bestandteil vieler Verbrauchsgüter, wie z.B. Farben, Tinten, Frostschutzmitteln, Putz- und Reinigungsmitteln, Deodorants oder Kosmetikartikeln [7]. Obwohl die Verwendung von Dioxan in den letzten Jahren rückläufig war, findet es nach wie vor auch als „Grundchemikalie“ in der Laborforschung Verwendung [5].

Ferner entsteht es als Nebenprodukt, z. B. durch Ethoxylierungen unter sauren Bedingungen, bei der Herstellung von Kosmetikartikeln (v.a. Shampoos). Die Gehalte schwankten zwischen 20 und 390 ppm (1986), sind heute jedoch deutlich geringer. In Shampoos auf Basis ethoxylierter Tenside war 1991 in allen untersuchten Proben 1,4-Dioxan nachweisbar (6–144 ppm) [6]. Die kosmetische Industrie musste daraufhin durch Änderungen in der Prozessführung die Gehalte an 1,4-Dioxan in kosmetischen Mitteln bis auf eine technologisch unvermeidbare Restmenge (unter 10 ppm) reduzieren [6].

1,4-Dioxan ist zudem in geringen Konzentrationen Bestandteil von Lebensmitteln, wie Tomaten, Tomatenprodukten, Shrimps, Kaffee und gebratenem Hähnchen [7].

1,4-Dioxan kann auf mehreren Wegen produziert werden. Es wird z.B. durch Dehydratation von Ethylenglycol, durch Zusammenbringen von Bis (2-chlorethyl)-ether mit einer Lauge, durch Dimerisierung von Ethylenoxid oder durch Erhitzen und Destillation von Diethylenglykol mit dehydratisierenden Mitteln hergestellt [7].

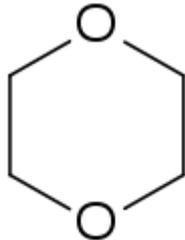
1.2 1,4-Dioxan

1.2.1 Chemische Bezeichnung

1,4-Dioxan

Summenformel: $C_4H_8O_2$

Strukturformel:



CAS-Nummer: 123-91-9

Synonyme: 1,4-Diethylendioxid
1,4-Diethylenoxid
1-4-Dioxacyclohexan
Diethylenether
1,4-Dioxacyclohexan
Dioxan
p-Dioxan
Dioxylethylenether
Tetrahydro-p-dioxin

1.2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Dioxan ist eine zur Gruppe der Sauerstoff-Heterocyclen gehörende farblose, brennbare, angenehm und schwach ätherisch riechende Flüssigkeit. Es ist mit Wasser, Ethanol, Diethylether und Aceton mischbar und liegt strukturell in der Sesselkonformation vor. Seine physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 aufgelistet [10].

Tabelle 1: Die physikalischen Eigenschaften von 1,4-Dioxan [10]

Molmasse (g/mol)	88,11
Schmelzpunkt (°C)	11,8
Siedepunkt (°C)	101,3
Dampfdruck bei 20°C (hPa)	41
Dichte bei 20°C (hPa (g/ml))	1,03
Aggregatzustand	flüssig
Flammpunkt (°C)	11
Zündpunkt (°C)	375
Selbstzündungstemperatur (°C)	180
Explosionsgrenzen (Vol.%)	1,9-22,5
Geruchschwelle (mg/m ³)	10-600
Brechzahl (nD20)	1,4224
Relative Permittivität (ε _r) [20°C]	2,23
Wasserlöslichkeit [20°C]	Unbegrenzt mischbar
pKa	-2,92
Wassergefährdungsklasse	2
Verteilungskoeffizient [logPOW]	-0,27
MAK-Wert (ppm) ^x	20
MAK-Wert (mg/m ³) ^x	73
GHS-Piktogramm	
Gefahrensymbole	
Gefahrklasse	3, II

^x 1 ml/m³ (ppm) = 3,65 mg/m³; 1 mg/m³ = 0,27 ml/m³ (ppm)

1.3 Toxikologisch relevante Eigenschaften von 1,4-Dioxan

Die Toxikokinetik befasst sich mit der Resorption, der Verteilung, dem Metabolismus und der Elimination toxischer Stoffe im Organismus. Sie hilft, eine Verbindung zwischen der Expositionskonzentration (der äußeren Belastung) und der Konzentration im biologischen Material (der inneren Belastung), üblicherweise Blut oder Harn, herzustellen [11]. So können Rückschlüsse auf die Menge der aufgenommenen Gefahrenstoffe gezogen und die Folgen dieser Aufnahme abgeschätzt werden.

1.3.1 Resorption

Dioxan kann inhalativ, dermal und oral aufgenommen werden [7, 12].

Die inhalative Aufnahme eines Arbeitsstoffes und die daraus resultierende innere Belastung sind von der Expositionsdauer und -höhe, der Aufnahme- und Eliminationsgeschwindigkeit, der alveolären Ventilations- und Diffusionsrate, der Wasserlöslichkeit und dem stoffspezifischen thermodynamischen Verteilungskoeffizienten Blut/Luft abhängig [11].

Die körperliche Belastung während der Exposition ist ein entscheidender Faktor für die Höhe des Atemminutenvolumens und somit die Aufnahme von Arbeitsstoffen. In Ruhe ventilert ein Erwachsener ungefähr 7 L Luft pro Minute. Körperliche Arbeit führt durch ein vergrößertes Atemzugvolumen und eine Atemfrequenzsteigerung zu einer Erhöhung des Atemminutenvolumens und kann mehr als 40 L pro Minute betragen [2].

DeRosa et. al berichten in „Health Evaluation of 1,4-Dioxane“ von einer Studie mit vier Probanden, welche sechs Stunden einer Dioxan-Konzentration von 50 ppm ohne zusätzliche körperliche Belastung ausgesetzt waren. Einem schnellen Anstieg der Plasmakonzentration auf 10 µg/ml innerhalb von drei Stunden folgte eine Plateauphase, die verdeutlichte, dass bereits ein sogenanntes „steady state“ erreicht war [7].

Die perkutane Aufnahme ist über direkten Hautkontakt und über die Umgebungsluft möglich. Grundsätzlich gilt, dass die Hautpenetration bei denjenigen Stoffen am größten ist, die sowohl fett- als auch wasserlöslich sind [12]. Wenn nur eine dieser beiden Eigenschaften zutrifft, ist die Hautgängigkeit bei den fettlöslichen Stoffen größer als bei den wasserlöslichen. Die Hautresorption ist von Faktoren wie Hautdurchblutung, Dicke der Hornschicht, Tragen von Handschuhen und Verletzungen abhängig. Aufgrund der Flüchtigkeit von Dioxan wurde eine gute Hautpenetration erwartet. Jedoch führt in vivo der Verdampfungsprozess zu einem Verlust von Dioxan und zu einer deutlich geringeren Hautpenetration als in vitro [12]. Experimentelle Untersuchungen zur Hautresorption liegen nur im Tiermodell vor. So hat das Dioxan, das stärker hydrophil als lipophil ist, in Verbindung mit Methanol eine Hautpenetrationsrate von 2 - 3% ($\pm 0,4$) ergeben; in Verbindung mit einer Hautlotion beträgt die Penetrationsrate 3 - 4% ($\pm 2-4$) [12].

Grenzwerte für ein biologisches Monitoring, das die kombinierte dermale und inhalative Belastung berücksichtigt, sind derzeit nicht verfügbar. Barber hat über Todesfälle von Industriearbeitern in England im Jahre 1933 berichtet, bei denen diese kombinierte Belastung eine entscheidende Rolle spielte: Die Arbeiter waren einer hohen inhalativen

Belastung von 208-650 ppm ausgesetzt, während sie gleichzeitig ihre entblößten Arme in mit Dioxan gefüllte Fässer eintauchten [13].

Die orale Aufnahme ist zwar im Rahmen von Arbeitsunfällen, Fahrlässigkeit und durch Kontamination offener Speisen und Getränke nicht auszuschließen, hat allerdings für die Tätigkeiten im Berufsleben eine untergeordnete Bedeutung. Im Vordergrund stehen hier tierexperimentelle Fütterungsstudien [7, 8, 9], welche die orale Aufnahme und die dadurch bedingte akute sowie chronische gesundheitliche Schädigung nachweisen.

So steht aus arbeitsmedizinischer Sicht die Resorption von 1,4-Dioxan durch Inhalation im Vordergrund.

1.3.2 Verteilung

Im Tierversuch verteilt sich nach intraperitonealer Verabreichung das Dioxan in Blut, Leber, Nieren, Milz, Lunge, Darm und Skelettmuskulatur. Besonders hohe Konzentrationen wurden postmortal in Leber, Milz und Darm festgestellt. Die Werte stiegen über sechs Stunden an und fielen anschließend über zehn Stunden wieder ab [7]. Die histopathologisch nachgewiesene Dioxan-Konzentration steigt in den Nieren und der Leber auch nach sechs Stunden weiter an, da über diese Organe die Ausscheidung stattfindet. Der größte Anteil des Dioxans wurde im Zytosol dieser Organe vorgefunden [7].

1.3.3 Metabolismus

Der Metabolismus von Dioxan ist noch nicht abschließend geklärt. Es werden verschiedene Umwandlungsschritte postuliert, denen experimentelle Untersuchungen zugrunde liegen.

So wird bei einer Luftkonzentration von 50 ppm das Dioxan beim Menschen in der Leber zu über 99,3 % zu 2-Hydroxyethoxyessigsäure metabolisiert und mit dem Harn ausgeschieden [14]. 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA) wird daher als Hauptausscheidungsmetabolit angesehen [4, 15].

Je nach der Isolierungsmethode wurde bei Ratten als Metabolit auch Dioxan-2-on bestimmt, das mit 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA) in einem pH-abhängigen Gleichgewicht steht [17]: unter sauren Bedingungen überwiegt die Umwandlung von HEAA zu Dioxan-2-on, unter alkalischen Bedingungen ist es umgekehrt [15].

Abbildung 1 veranschaulicht die Umwandlungsschritte während der Metabolisierung von 1,4-Dioxan zu HEAA.

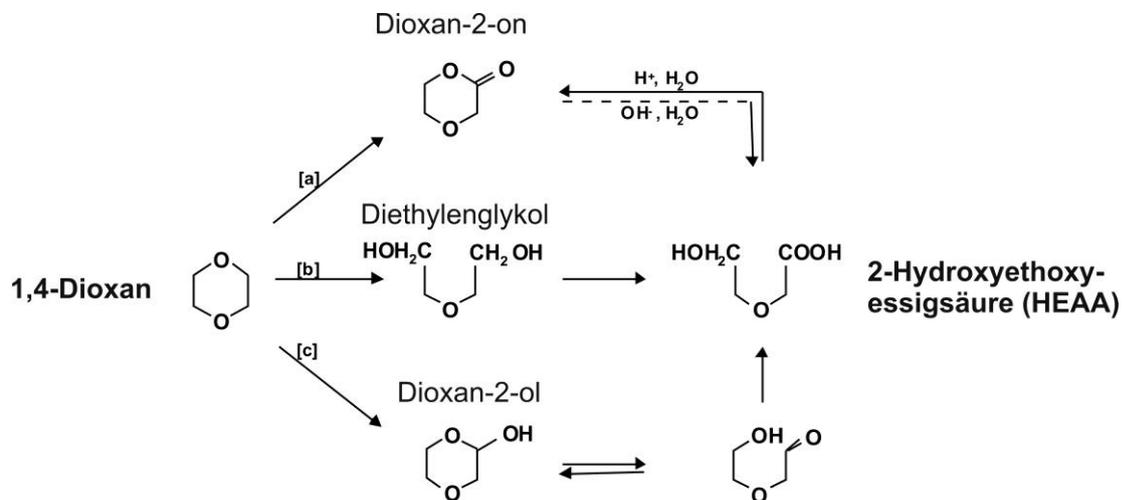


Abbildung 1: Umwandlungsschritte während der Metabolisierung von 1,4-Dioxan zu 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA)

a) Dioxan-2-on entsteht in einem oxidativen Prozess mithilfe von Cytochrom P450. Aus dem zyklischen Keton bildet sich durch Hydroxylierung der Metabolit HEAA. Bei Anwendung einer sauren Isolierungsmethode [17] sowie bei niedrigen Luftkonzentrationen von $\sim 50 \text{ ml/m}^3$ [14] wurde Dioxan-2-on nachgewiesen.

b) Cytochrom P450 führt an einem der beiden Sauerstoffatome unter Bildung von Diethylenglykol zur Ringöffnung. Diethylenglykol wird im Weiteren durch eine Oxidation zu HEAA metabolisiert. Woo et. al. postulierten diesen Weg, nachdem sie in einem Tierexperiment durch Injektion von Diethylenglykol dessen Verstoffwechslung zu HEAA nachweisen konnten [17].

c) Es wird diskutiert, dass es, sobald das steady state des Dioxan eliminierenden Stoffwechselweges erreicht ist, zu einem dritten Umwandlungsweg kommen könnte: An ein Kohlenstoffatom von Dioxan bindet sich in einer α -Hydroxylierung eine Hydroxylgruppe und es entsteht Dioxan-2-ol. Nach darauffolgender Öffnung des Ringes und Hydrolyse entsteht HEAA. Auch für diesen Weg fehlt ein eindeutiger Nachweis. Für ihn spricht lediglich, dass in einem Versuch von Hecht und Young (1981) durch eine Derivatisierung von N-Nitrosomorpholin Dioxan-2-ol und HEAA entstanden [18]. Wie Dioxan-2-on, so steht auch Dioxan-2-ol mit HEAA im Gleichgewicht [4].

Außerdem induziert Dioxan sowohl bei akuter als auch bei chronischer oraler Exposition Cytochrom P450 2E1- und P450 2B1/2-abhängige mikrosomale Monoenasen-Aktivitäten in der Leber von Ratten [16].

Young et al. haben festgestellt, dass bei ansteigender oraler Dosis eine vermehrte Menge an 1,4-Dioxan unverändert mit der Atemluft eliminiert wird. Die Autoren begründeten die Elimination von 1,4-Dioxan mit der Atemluft mit der Sättigung des Metabolismus [15].

1.3.4 Elimination

Es gibt verschiedene Studien, die Erkenntnisse zur Elimination von 1,4-Dioxan liefern. Die dazugehörigen Untersuchungen sind zum Teil am Menschen, zum Teil bei Tieren durchgeführt worden.

Bei einer inhalativen Expositionsstudie von Young et al. am Menschen wurden die Probanden sechs Stunden lang einer Luftkonzentration von 50 ppm Dioxan (entsprechend dem damaligen MAK-Wert) ausgesetzt. Die Halbwertszeit der Elimination betrug im Plasma 59 ± 7 Minuten und im Harn 48 ± 17 Minuten, wobei 99,3 % zu HEAA metabolisiert wurden. Der Unterschied in der Plasma- und Harn-Halbwertszeit kommt durch die geringe Anzahl an Harnsammelperioden zustande und ist nicht signifikant. Schon während der Exposition wurden 90 % der resorbierten Substanz mit dem Harn als HEAA ausgeschieden. Die Ausscheidung war sechs Stunden nach Expositionsende vollständig abgeschlossen [14].

Orale Expositionsversuche wurden nur im Rahmen von Tierexperimenten durchgeführt. Young et al. haben Ratten 10 mg Dioxan/kg Körpergewicht (KG) oral verabreicht. 98,74 % der Substanz wurde mit dem Harn ausgeschieden, 3,07 % als CO₂ und 0,43 % unverändert abgeatmet. Mit zunehmender Dosis stieg aufgrund der Sättigung des Metabolismus die über den Harn ausgeschiedene Menge nicht weiter an, während sich der abgeatmete Anteil erhöhte [19].

Die DOW Chemical Company, Midland, Michigan hat sich ebenfalls mit der Dioxan-Elimination beschäftigt: Bei höheren Dosen ändert sich nicht nur der Weg der Ausscheidung, sondern es sinkt auch die Eliminationsgeschwindigkeit. So war im Tierversuch bei oraler Gabe von 2 bzw. 10 mg/kg KG eine lineare Ausscheidung mit einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden zu verzeichnen. Nach Verabreichung von 100 bzw. 1000 mg/kg KG bildete sich bei 100 mg/kg KG ein Plateau von vier Stunden bzw. bei

1000 mg/kg KG von 24 Stunden. Die Ausscheidung erfolgte anschließend wieder linear [21].

Eine weitere Untersuchung der DOW Chemical Company zeigte die dosisabhängige Dioxanausscheidung. Bei Erhöhung der intravenös verabreichten Dosis von 100 auf 1000 mg/kg KG erniedrigte sich der Anteil, der als HEAA ausgeschieden wurde, während der Anteil des unveränderten Dioxans anstieg. Dies lässt den Schluss zu, dass es bei hohen Dosen zu einer Blockierung des Umwandlungsmetabolismus und zu einer vorübergehenden Kumulation von Dioxan kommt [21].

Bei mehrmaliger Verabreichung induziert Dioxan offenbar seinen eigenen Metabolismus, wie Young et al. beobachtet haben. So wird nach wiederholter oraler Gabe hoher Dosen ein größerer Anteil HEAA mit dem Harn ausgeschieden als nach einmaliger Verabreichung [20].

1.3.5 Wirkung

Lokaler Kontakt mit flüssigem Dioxan wirkt auf der Haut kaum reizend. Bei Augenkontakt konnte jedoch eine Reizung festgestellt werden [24].

Eine inhalative Exposition führt bereits bei geringen Dosen (50 ppm) zu Schleimhautreizungen [3, 14].

Organschäden durch eine Dioxan-Vergiftung zeigen sich vor allem an Nieren und Leber, wobei die Nierenschädigungen mit Nekrosen und Hämorrhagien dominieren [7].

Dioxan wirkt aber auch auf das Zentralnervensystem und führt dort durch eine depressive Wirkung zu einer Verminderung des Atemantriebs [22].

Eine kanzerogene Wirkung ist nach Gabe hoher oraler Dosen im Tierexperiment zu beobachten, nicht aber nach Inhalation [7].

1.3.5.1 Akute Toxizität

Die akute Toxizität von 1,4-Dioxan wurde in zahlreichen Tierversuchen untersucht.

In Untersuchungen von z.B. De Nevasquenz sowie Laug et al. wurden als Vergiftungssymptome nach oraler Aufnahme in Abhängigkeit von der Dosis zentrale Atemdepression, Leberschädigungen und vor allem Nierenschädigungen beobachtet.

Sie zeigten außerdem, dass die LD₅₀ nach oraler Applikation bei Hunden und Kaninchen zwischen 1 und 2,5 ml/kg KG liegt. Bei Mäusen und Ratten beträgt sie zwischen 5,2 und 6,3 ml/kg KG [22, 23]. Nach Verabreichung einer tödlichen oralen Dosis verendeten die Tiere in der Regel innerhalb einer Woche unter zunehmender

Niereninsuffizienz. Die Sektion ergab geschwollene Nieren, die histologische Untersuchung Nekrosen und Hämorrhagien [8, 22, 23].

Mehrstündige Inhalationsversuche von Rowe et al. an Ratten bei 12000 ppm und mehr führten zu ausgeprägten Schleimhautreizungen der Atemwege. Ursache für den Exitus letalis war ein Lungenödem mit daraus resultierendem Lungenversagen. Histologische Untersuchungen ergaben sowohl bei den gestorbenen als auch bei den nach der Exposition getöteten Tieren, dass darüber hinaus fast ausschließlich die Lebern und Nieren geschädigt wurden [25].

Dagegen ergab eine Untersuchung durch Ernstgård auf akute Effekte an sechs weiblichen und sechs männlichen Versuchspersonen nach zweistündiger Inhalation von 1 bis 20 ppm keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Frequenz des Augenzinkerns, der Lungenfunktion, der Schwellung der Nasenschleimhaut und der Entzündungsmarker im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe [26]. Dioxanmengen dieser Größenordnung haben also keine akute toxische Wirkung.

1.3.5.2 Subakute Toxizität

Auch die subakute Toxizität wurde in mehreren Tierversuchen untersucht.

Fairley et al. fügten eine 80%ige wässrige Dioxanlösung in einer Konzentration von 5 % dem täglichen Trinkwasser von Ratten und Mäusen hinzu. Fünf von sechs Ratten verendeten nach 14 - 34 Tagen. Die Sektion und histologische Untersuchung ergaben stark vergrößerte Nieren und Leberzelldegenerationen. Eine Ratte und sechs Mäuse überlebten die Behandlung bis zu 67 Tage [8].

Eine Studie von Schrenk et al. bestätigte die nieren- und leberschädigende Wirkung bei oraler Aufnahme. Die Gabe von mit Dioxan versetztem Trinkwasser in einer Konzentration von 5 % führte bei zwei von drei Hunden nach neun bzw. zehn Tagen zum Tod. Das heißt, sie hatten in diesem Zeitraum insgesamt 3 bzw. 3,5 ml Dioxan/kg KG zu sich genommen, bevor sie verstarben. Die Sektion ergab geschwollene Nieren und Lebern [27].

Fairley et al. untersuchten auch die Wirkung bei dermalen Anwendung. Nach Beträufeln geschorener Kaninchen- bzw. Meerschweinchenhaut mit 10 bzw. 5 Tropfen 80%iger Dioxanlösung traten keine lokalen Reizungen auf. Die Sektion und histologische Untersuchung nach 49 bis 101 Tagen lieferten als Ergebnis eine Degeneration der

Tubuluszellen und der Glomerula sowie Hämorrhagien im Nierenmark und Leberzelldegenerationen [8].

Eine Studie von Wirth et al. an Mäusen wies nach einer täglichen achtstündigen Inhalation einer Dioxan-Konzentration von 1400 ppm nach 17 Tagen lediglich Schleimhautreizungen der Atemwege nach [28].

1.3.5.3 Chronische Toxizität

Die chronische Toxizität wurde in Inhalationsversuchen und Fütterungsstudien an Tieren untersucht.

Torkelson berichtet über folgenden Inhalationsversuch: 15 Meerschweinchen ertrugen 82 Expositionen von täglich sieben Stunden bei 50 ppm innerhalb von 118 Tagen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren bezüglich Aussehen, Verhalten, Wachstum, Mortalität, Hämatologie und klinisch-chemischen Untersuchungen keine Unterschiede zu erkennen. Ähnliche Versuche mit Ratten, Kaninchen und Hunden kamen zu dem gleichen Ergebnis, wobei zwei Kaninchen sogar 100 ppm ausgesetzt waren [29].

In einer Studie von Kasai et al. waren je 50 männliche Ratten einer Luftkonzentration von 0, 50, 250 und 1250 ppm Dioxan sechs Stunden pro Tag, fünf Tage die Woche über 104 Wochen ausgesetzt. Die Überlebensrate der 250 ppm- und 1250 ppm-exponierten Ratten war gegenüber der Kontrollgruppe verringert, was auf die Entstehung maligner Tumore zurückzuführen war. Bei den Tumoren handelt es sich um nasale Plattenepitheltumore, hepatozelluläre Adenome und peritoneale Mesotheliome. Die Exposition von 1250 ppm Dioxan führte im Vergleich mit geringeren Luftkonzentrationen außerdem zu einem reduzierten Körpergewicht, einem deutlichen Anstieg der Leberwerte und zu einem signifikanten Anstieg der Tumorinzidenz. Auch Nierenzellkarzinome und Fibroadenome der Brustdrüse traten bei höheren Dosen vermehrt auf. Allerdings wurden Atrophien und Metaplasien in der Nasenhöhle bereits bei 50 ppm beobachtet [30].

Torkelson et al. schildern die Ergebnisse einer Untersuchung mit 288 Ratten, welche fünfmal pro Woche eine je siebenstündige Inhalation einer Dioxan-Konzentration von 111 ppm zwei Jahre lang symptomlos ertrugen. Es konnte zudem keinerlei chronische Toxizität bestätigt werden. Auch die Sektion und histologische Untersuchung ergaben keine Auffälligkeiten. Die tägliche inhalierte Dosis betrug etwa 100 mg/kg KG, was einer oralen Dosis von 0,1 % Dioxan im Trinkwasser entspricht. Versuche mit der

gleichen Dosis bei oraler Applikation führten zwar zu deutlichen Leber- und Nierenschädigungen, aber ebenfalls zu keinen Tumoren [31].

Dioxan ist nicht teratogen, jedoch embryotoxisch, wenn es in einer Dosis von 1 ml/kg/d neun Tage lang trächtigen Ratten in das Trinkwasser gemischt wird [32].

Folgende orale Versuche wurden zur Beurteilung der chronischen Toxizität durchgeführt:

In einer Untersuchung von Argus et al. entwickelten nach 63-wöchiger oraler Gabe von 1 % Dioxan im täglichen Trinkwasser, was einer Gesamtaufnahme von etwa 132 g/Ratte entspricht, sieben von 26 Tieren einen Tumor. Meist handelte es sich um maligne Lebertumore [33].

Die Dosisabhängigkeit der kanzerogenen Wirkung oraler Dioxangaben ergab folgende Untersuchung von Kokiba et al.: Je 120 Ratten erhielten über 716 Tage 0,01, 0,1 und 1,0 % Dioxan im Trinkwasser. Dies führte bei den Tieren, die 1,0 % Dioxan erhielten, zu verminderter Körpergewichtszunahme, Nieren- und Leberschädigungen und zehn Tumoren (hepatozelluläre Karzinome). Bei Gabe von 0,1 % Dioxan im Trinkwasser konnten ebenfalls Nieren- und Leberschäden sowie ein hepatozelluläres Karzinom nachgewiesen werden. Die Gruppe Ratten, die nur 0,01 % Dioxan im Trinkwasser erhielt, zeigte weder Vergiftungserscheinungen noch Tumore [34].

Lebertumore entstehen auf der Basis degenerativer Veränderungen, welche erst nach Sättigung des Eliminationsmechanismus bei hohen Dosen auftreten [35].

Auch die IARC (International Agency for Research of Cancer) gelangte zu dem Ergebnis, dass die orale Gabe von 1,4-Dioxan an Testtieren zu einer erhöhten Tumorinzidenz führt [36, 37].

Die Kanzerogenität wird auch durch die Induktion von Cytochrom P450 2E1 erklärt, die zu einer Bildung von Sauerstoffradikalen und somit zu einer organspezifischen Toxizität führt [16].

Dioxan wird in Tierversuchen als ein schwach genotoxisches Karzinogen, aber zusätzlich auch als ein starker Promoter der Karzinogenese nach oraler Aufnahme beschrieben [38]. Ein Krebsrisiko für den Menschen ist laut DFG und Stickney et al. [35] aus Tierversuchen aufgrund der unterschiedlichen Physiologie kaum abzuleiten und wird bis auf das 80-Fache überschätzt (physiologically based pharmacokinetic (PB-PK) model) [40], weshalb Stickney et al. eine Reevaluation der Kanzerogenität für notwendig erachten [35].

Zur Überprüfung der Humankarzinogenität bei Inhalation wurde zwischen 1954 und 1978 eine Follow-up Studie mit 165 Dioxan-exponierten Mitarbeitern durchgeführt. Die krebserzeugenden Todesfälle unterschieden sich nicht signifikant von der statistisch zu erwartenden Anzahl [39].

1.3.6 Begründung des MAK-Wertes

Die Notwendigkeit eines Luftgrenzwertes für 1,4-Dioxan liegt in der Erkenntnis, dass bei Konzentrationen von über 50 µg/m³ zytotoxische Effekte auftreten, denen eine nichtlineare Toxikokinetik zugeordnet werden kann.

Wie bereits oben erwähnt, sind die Metabolisierung und Elimination von 1,4-Dioxan dosisabhängig. Bei Inhalation von 50 ppm verringert sich diese sowohl bei Ratten als auch bei Probanden noch nicht. Bei diesem Wert wurden keine Enzyminduktion bzw. organotoxische oder zytotoxische Effekte festgestellt. Allerdings traten deutliche Augenreizungen auf, die zu einer Absenkung des MAK-Wertes im Jahre 1996 von 50 ppm auf 20 ppm führten.

Da Dioxan in Tierversuchen nach oraler Aufnahme eine kanzerogene Wirkung, jedoch keine primäre Genotoxizität, aufweist, wird es in die Kategorie 4 der krebserzeugenden Stoffe eingestuft. Aufgrund der dermalen Resorbierbarkeit von Dioxan erfolgt die Zusatzbezeichnung „H“ in der MAK- und BAT-Werte-Liste [1, 4]. Kategorie 4 beinhaltet

„Stoffe mit krebserzeugender Wirkung, bei denen ein nicht genotoxischer Wirkungsmechanismus im Vordergrund steht und genotoxische Effekte bei Einhaltung des MAK- und BAT-Wertes keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Unter diesen Bedingungen ist kein Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten. Eine Einstufung wird insbesondere durch Befunde zum Wirkungsmechanismus gestützt, die beispielsweise darauf hinweisen, dass eine Steigerung der Zellproliferation, Hemmung der Apoptose oder Störung der Differenzierung im Vordergrund stehen. Zur Charakterisierung eines Risikos werden die vielfältigen Mechanismen, die zur Kanzerogenese beitragen können, sowie ihre charakteristischen Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen berücksichtigt.“ [38]

2. Material und Methoden

1.4 Kollektivbeschreibung

Es wurden 18 Expositionen mit 18 gesunden, freiwilligen Probanden im Durchschnittsalter von 31 Jahren durchgeführt. Acht Probanden waren Männer und zehn waren Frauen.

Zum Zeitpunkt des Experiments hatte keiner der Probanden beruflichen Kontakt mit 1,4-Dioxan oder anderen Gefahrstoffen, Drogen oder Medikamenten. Alkoholkonsum am Tag vor dem Experiment, während des Experiments und in der gesamten 24-stündigen Harn-Sammelperiode, war untersagt. Eine Probandin war Raucherin.

Alle Probanden wurden vor Versuchsbeginn mittels eines Aufklärungsblattes und eines persönlichen Gesprächs über den Expositionsverlauf sowie über die akuten und chronischen toxischen Wirkungen von Dioxan informiert. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis [11].

1.5 Standardisierte Expositionsmethode

Die Expositionsdauer gegenüber 1,4-Dioxan betrug acht Stunden, wobei nach vier Stunden eine 45-minütige Pause außerhalb des Expositionslabors eingelegt wurde, um einen realistischen Arbeitstag zu simulieren.

Die Exposition wurde in einem ca. 17 m³ großen Expositionslabor durchgeführt.

Um die Adsorptionseffekte zu minimieren, war der Innenraum mit Aluminiumfolie ausgekleidet.

Die Ausstattung bestand aus einem Stuhl, einem Tisch, einer Lampe, einem Ventilator, einem Fahrrad-Ergometer und einer Heizplatte zum Verdampfen des Dioxans. Der Ventilator sorgte während der gesamten Expositionszeit für eine gleichmäßige Verteilung des Dioxans im Expositionslabor.

Die Kommunikation mit dem Probanden war über ein Telefon möglich und der Sichtkontakt durch ein Fenster sichergestellt.

Die 18 freiwilligen Probanden wurden in drei Sechsergruppen eingeteilt. Eine Sechsergruppe war keiner körperlichen Belastung ausgesetzt. Die beiden anderen Gruppen leisteten je zehn Minuten pro Stunde 50 bzw. 75 W auf einem Fahrradergometer.

Bei allen Expositionen wurde im Expositionslabor der MAK-Wert von 73 mg 1,4-Dioxan /m³ (20 ppm) eingestellt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Antragsnummer 63/96).

Tabelle 2: Anzahl der Probanden und Höhe der körperlichen Belastung (auf dem Fahrrad-Ergometer, je zehn Minuten pro Stunde)

Anzahl der Probanden [n]	Geleistete Arbeit [W]
6	0
6	50
6	75



Abbildung 2: Beispielhafte Exposition in dem Expositionslabor [45]

1.6 Präanalytische Phase der Probengewinnung

Bei jeder einzelnen je vierstündigen Exposition wurde die durchschnittliche Dioxan-Konzentration der Expositionslaborluft erfasst.

Nach den ersten vier Stunden sowie am Ende der gesamten Exposition wurde jedem Probanden eine Blutprobe entnommen. Zwei Probanden wurden nach Abschluss der Exposition mehrere Blutproben in kurzen zeitlichen Abständen entnommen, um stichprobenartig die Geschwindigkeit der Dioxan-Elimination zu dokumentieren.

Alle Probanden sammelten jeweils von Beginn der Exposition an über 24 Stunden Harnproben.

Die Blut- und Harnprodukte wurden auf 1,4-Dioxan und dessen Metabolit 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA) untersucht.

1.6.1 Luftprobennahme während der Expositionen

Im Expositionslabor wurde der MAK-Wert von 1,4-Dioxan durch Verdampfen der entsprechend benötigten flüssigen Dioxanmenge eingestellt. Die Berechnung der Dioxanmenge ergab sich aus dem Raumvolumen (17 m^3) und dem MAK-Wert in mg/m^3 (73).

Zur Überprüfung der Luftkonzentration zog eine Probennahmepumpe (Typ PCXR8, Fa. SKC, Pennsylvania) über die gesamte Expositionsdauer von vier Stunden mit einer gleichmäßigen Geschwindigkeit [42] Luft durch ein Aktivkohleröhrchen Typ B der Fa. Dräger, Lübeck. Die Aktivkohle diente als Absorptionsstoff für Dioxan. Nach der Expositionsphase wurden die Röhrchen luftdicht verpackt und bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert [11]. Zur Berechnung der Luftkonzentrationen wurde die analysierte Menge Dioxan aus dem Aktivkohleröhrchen auf das Luftvolumen bezogen und anschließend die Belastung pro Kubikmeter ermittelt.

1.6.2 Blutproben

Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Expositionsphase wurde allen 18 Probanden 7 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen entnommen. Zwei dieser Probanden gaben im Anschluss an die zweite Phase in einem zeitlichen Abstand von jeweils ungefähr zehn Minuten insgesamt drei bzw. vier Blutproben ab. Die Blutproben wurden in 20 ml Glasröhrchen mit EDTA umgefüllt, anschließend geschüttelt und eingefroren [11].

1.6.3 Harnproben

Jeder Proband sammelte jeweils nach der Exposition seinen Harn in einem Messgefäß. Uhrzeit und Harnmenge wurden dokumentiert. Von dem Harn wurde ein Aliquot von 50-100 ml in ein spezielles Gefäß umgefüllt und bis zur Analyse eingefroren. In gleicher Weise wurde mit allen Harnproben verfahren [11].

1.7 Analyse-Methoden

1.7.1 Analyse der Expositionslaborluftproben

Die gaschromatische Analyse von 1,4-Dioxan erfolgte nach der Niosh-Methode 1602.

Probenvorbereitung: Die beiden Aktivkohlephasen des Sammelröhrchens wurden getrennt in ein 20 ml Bördelgläschen (Typ 5183-4474, Fa. Agilent) überführt, mit je 10 ml Schwefelkohlenstoff (Typ 1.02214.1000, Fa. Merck) versetzt und sofort mit einer Bördelkappe (Typ 5183-4479, Fa. Agilent) verschlossen. Nach 60 Minuten Desorptionsdauer wurde je 1 ml der Schwefelkohlenstoff-Phasen in ein 1,8 ml Schraubgläschen (Typ 70213, Fa. MN) überführt, mit einer Schraubkappe (Typ 70245, Fa. MN) verschlossen und anschließend am GC-FID analysiert.

Einstellungen am GC-FID:

Säule:	DB 1 60 m x 0,32 mm x 1 µm (Fa. J&W Nr. 123-1063)
Trägergas:	He 5.0, 12 psi
Split-Fluss:	25 ml/min
Temp. Programm:	45°C – 5 min – 10°C/min → 90°C – 5 min – 10°C/min → 125°C –0,1 min – 15°C/min → 220°C – 1 min
Inj. Vol.:	2 µl
FID-Temp:	300°C
Inj-Temp.:	230°C

Die Retentionszeit für Dioxan unter den angegebenen Bedingungen betrug 13,72 Minuten, die Desorptionsausbeute für Dioxan betrug lt. Dräger-Handbuch 90 %.

Kalibrierung:

Zur Kalibrierung wurden Dioxan-Standardlösungen in Schwefelkohlenstoff im Bereich von 10 - 4000 mg/L hergestellt und mit den Proben analysiert.

1.7.2 Analyse von 1,4-Dioxan in Blut und Harn

Gaschromatische Analyse von 1,4-Dioxan in Blut und Harn

Messprinzip: Dampfraum-Analyse

Probenvorbereitung: 2 ml Blut bzw. Harn wurden in ein mit einer teflonkaschierten Butylgummikappe (Typ 5183-4479, Fa. Agilent) verschlossenes 20 ml-Bördelgläschen (Typ 5183-4474, Fa. Agilent) überführt.

Zur Analyse wurden die Proben für mindestens vier Stunden bei 45°C in den Headspace-Probengeber (Typ 3950, Fa. Dani) gestellt und mit GC-FID analysiert.

Einstellungen am GC-FID:

GC:	GC 3300, Fa. Varian
Säule:	DB 624 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm (Fa. J&W, Nr.123-1364)
Trägergas:	N ₂ , 5,0, 1,4 bar
Splitfluss:	10 ml/min
Temp. Programm:	45°C – 8 min – 10°C/min → 90°C – 3 min – 25°C/min → 190°C – 5 min
FID-Temp:	300°C
Inj.-Temp.:	230°C
HS-Gasschleife:	3 ml

Die Retentionszeit für Dioxan betrug unter den angegebenen Bedingungen 13,62 Minuten.

Kalibrierung:

Zur Kalibrierung wurden Blut- bzw. Harn-Standards im Bereich von 0,4 - 4,0 mg/L hergestellt und mit den Proben analysiert.

1.7.3 Bestimmung von 2-Hydroxyethoxyessigsäure im Harn

Zur Analyse des 1,4-Dioxan-Metaboliten HEAA im Harn wurde jeweils 1 ml der Harnprobe mit 50 µl der Stammlösung des internen Standards versetzt. Die Stammlösung (1 g/L) bestand aus dem Natriumsalz der 2-Hydroxyethoxyessigsäure und Methanol.

Mit einer Eppendorf-Pipette wurden 0,25 ml Harn in ein 10 ml Schraubreagenzglas überführt. Es folgte die Zugabe von 750 µl gereinigtem Wasser, 50 µl ISTD (interner Standard) (Verdünnung I), 100 µl konzentrierter Salzsäure und 3 ml Ethylacetat. Nach

zehn Minuten wurde unter Schütteln eine Extraktion durchgeführt. Die Probe wurde anschließend fünf Minuten lang bei 2200 g zentrifugiert.

Das Essigester-Aliquot von 2,5 ml wurde in ein separates Reagenzglas überführt und bei 45°C für ca. 12 Minuten unter 0,6 bar N₂ getrocknet. Nachdem der Rückstand mit 50 µl MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) versetzt worden war, wurde das Reagenzglas verschlossen und für 30 Minuten bei 80°C im Trockenschrank derivatisiert. Anschließend wurde 300 µl Acetonitril zugegeben, homogenisiert und in einen Autosampler-Vial überführt. Der Vial wurde verschlossen und 1 µl splitlos in das Gaschromatograph-Massenspektrometer-System injiziert und anschließend analysiert.

1.7.4 Kreatininbestimmung

Die Kreatininbestimmung erfolgte photometrisch nach der Jaffé-Methode:

Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen Meisenheimer-Komplex (Jaffé-Reaktion). Der entstandene Komplex absorbiert bei 560 nm elektromagnetische Strahlung und zeigt eine intensiv gelb-orange Farbe.

Die Absorption der Lösung ist der Kreatininkonzentration der Probe direkt proportional und wird über eine Kalibrationsgerade einer Kreatininkonzentration zugeordnet.

Für die Kreatinin-Bestimmung benötigt man mindestens 1 ml Urin.

Bis zur Analyse wurde die Probe kurzfristig im Kühlschrank bei 4°C, längerfristig im Gefrierschrank bei ca. -20° C aufbewahrt.

Vor der Probenaufbereitung wurden die Proben auf Zimmertemperatur erwärmt und durch mindestens 20 min Rütteln auf einem Roller-Mixer homogenisiert.

Von jeder Probe/Kontrolle wurden 100 µl in ein Reagenzröhrchen pipettiert. Nachdem alle Proben aufgearbeitet waren, erfolgte die Zugabe von jeweils 150 µl NaOH 10% und 2,0 ml gesättigter Pikrinsäure. Nach 10 min Reaktionszeit wurden die einzelnen Ansätze mit 7,75 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, mit Eindrückstopfen verschlossen und gemischt. Nach weiteren 5 min Reaktionszeit waren sie bereit zur photometrischen Bestimmung.

Die Absorptionen der Standards wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen der Standards zur Kalibrierkurve aufgetragen. Aus der Steigung der Ausgleichskurve (Konzentration/Extinktion) ergibt sich ein Korrekturfaktor des Photometers zur Bestimmung der Messwerte von Kontrollen und Proben.

Aus den für die Proben/Kontrollen erhaltenen Extinktionen lieferte das Photometer nach Multiplikation mit dem ermittelten Faktor direkt die Kreatinin-Konzentrationen.

3. Ergebnisse

1.8 1,4-Dioxan-Luftkonzentrationen im Expositionslabor

Die 1,4-Dioxan-Luftkonzentrationen von allen 18 Expositionen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Wiedergegeben sind sowohl die Absolutwerte in mg/m^3 als auch der prozentuale Anteil des MAK-Wertes in Höhe von $73 \text{ mg}/\text{m}^3$.

Die Luftkonzentration im Expositionslabor beläuft sich im Mittel auf 104 % des MAK-Wertes. Die Werte schwanken mit $\pm 14 \text{ mg}/\text{m}^3$ um den Mittelwert. Grund für die hohen Standardabweichungen sind zwei Ausreißerwerte, die durch technische Fehler während jeweils einer der beiden vierstündigen Expositionsphasen von zwei Probanden bedingt sind. Die zugrundeliegenden Fehler sind schon am Expositionstag aufgefallen. Ohne diese beiden Probanden ergibt sich eine mittlere Konzentration von 107,4 % des MAK-Wertes mit einer Standardabweichung von $\pm 8,9 \text{ mg}/\text{m}^3$. Diese relativ hohe Ausreißerquote zeigt, wie wichtig es für den Versuch ist, die Luftkonzentration im Expositionslabor zu überprüfen.

Tabelle 3: Die durchschnittlichen Luftkonzentrationen von 1,4-Dioxan im Expositionslabor während der gesamten achtstündigen Expositionszeit

Proband [Nr.]	Luftkonzentration [mg/m ³]	Luftkonzentration [% MAK-Wert]
1	71,8	98
2	65,6	90
3	92,9	127
4	75,5	103
5	78	107
6	83,3	121
7	57,2	78
8	78	107
9 ^x	51,1	70
10	83,85	115
11	76,4	105
12	76,1	104
13	74	101
14	91,6	125
15	85,4	117
16	82,1	112
17 ^x	59	81
18	78,8	108
Arithmetisches Mittel	76 ± 14	104

^x Anmerkung: Technische Fehler führten während je einer Expositionsphase bei Proband 9 zu einer tatsächlich niedrigeren Luftkonzentration und bei Proband 17 zu einer zu niedrig gemessenen Luftkonzentration.

1.9 1,4-Dioxanwerte im Blut

1,4-Dioxan lässt sich im Blut nachweisen. Die Eliminationskinetik des Dioxans im Blut wurde bei zwei zufällig ausgewählten Probanden aus verschiedenen Belastungsgruppen detailliert betrachtet: Die Dioxan-Blutkonzentration eines Probanden aus der Gruppe ohne körperliche Belastung (Proband 3) sank bereits zehn Minuten nach Expositionsende um 30 % ab. Die Dioxan-Konzentration eines Probanden der Gruppe mit 50 W körperlicher Belastung (Proband 7) fiel innerhalb von 20 Minuten nach Expositionsende um 55 % auf 0,33 mg/L ab und liegt somit im Bereich der

Nachweisgrenze von 0,3 mg/L. Die Untersuchungen zeigten, dass bereits spätestens nach vier Stunden ein steady state erreicht ist.

Tabelle 54 und Tabelle 45 geben die zeitabhängigen Verläufe der Dioxan-Blutkonzentration der beiden Probanden wieder. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Eliminationskinetik in grafischer Form.

Tabelle 4: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut eines Probanden ohne körperliche Belastung (Proband Nr. 3)

Zeit nach Expositionsbeginn [h]	Dioxan [mg/L]
4,00	1,08
8,75	1,07
8,95	0,75
9,13	0,80
9,33	0,80

Tabelle 5: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut eines Probanden mit 50 W körperlicher Belastung (Proband Nr. 7)

Zeit nach Expositionsbeginn [h]	Dioxan [mg/L]
4,32	0,60
8,95	0,74
9,23	0,33
9,57	0,39

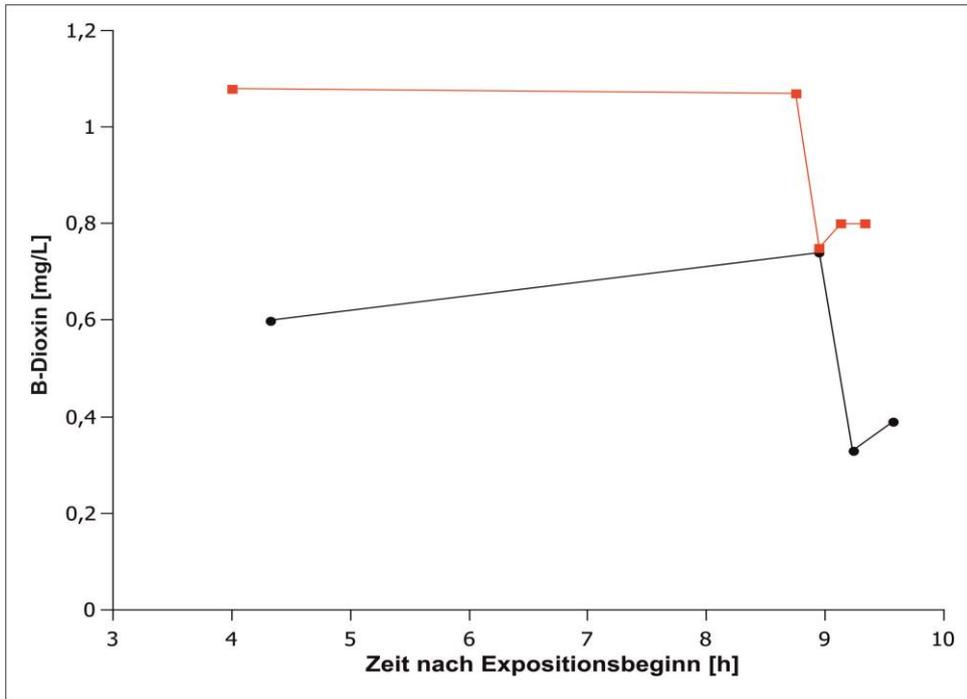


Abbildung 3: 1,4-Dioxan-Werte [mg/L] im Blut der Probanden 3 (rot) und 7 (schwarz) zu verschiedenen Zeitpunkten

In Tabelle 6 sind die Dioxan-Konzentrationen im Blut aller Probanden nach vierstündiger bzw. achtstündiger Exposition aufgelistet.

Tabelle 6: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut

Belastung [W]	Proband [Nr.]	Dioxan [mg/L] nach 1. Expositionsphase (nach 4 Stunden)	Dioxan [mg/L] nach 2. Expositionsphase (nach 8,75 Stunden)
0	1	0,90	1,06
0	2	1,32	0,81
0	3	1,08	1,07
0	4	0,94	0,96
0	5	1,04	1,15
0	6	0,94	1,28
Mittelwert [mg/L]		1,04	1,06
50	7	0,60	0,74
50	8	0,90	0,95
50	9	0,93	0,43
50	10	1,03	1,79
50	11	1,06	1,22
50	12	1,29	1,50
Mittelwert [mg/L]		0,97	1,11
75	13	0,94	1,12
75	14	1,39	1,65
75	15	1,70	1,45
75	16	1,81	1,91
75	17	1,46	1,50
75	18	1,59	1,18
Mittelwert [mg/L]		1,48	1,47

1.10 1,4-Dioxan im Harn

Im Harn findet sich 1,4-Dioxan bereits unmittelbar nach Expositionsende nur in sehr geringen Mengen (durchschnittlich 0,87 mg/L, bei einer Nachweisgrenze von 0,3 mg/L) wieder und ist häufig schon zwei Stunden nach Expositionsende nicht mehr nachweisbar.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen das Eliminationsprofil von Dioxan im Harn mit Bezug auf die Kreatinin-Konzentration (Abbildung 4) sowie die Dioxan-Konzentration in mg/L (Abbildung 5).

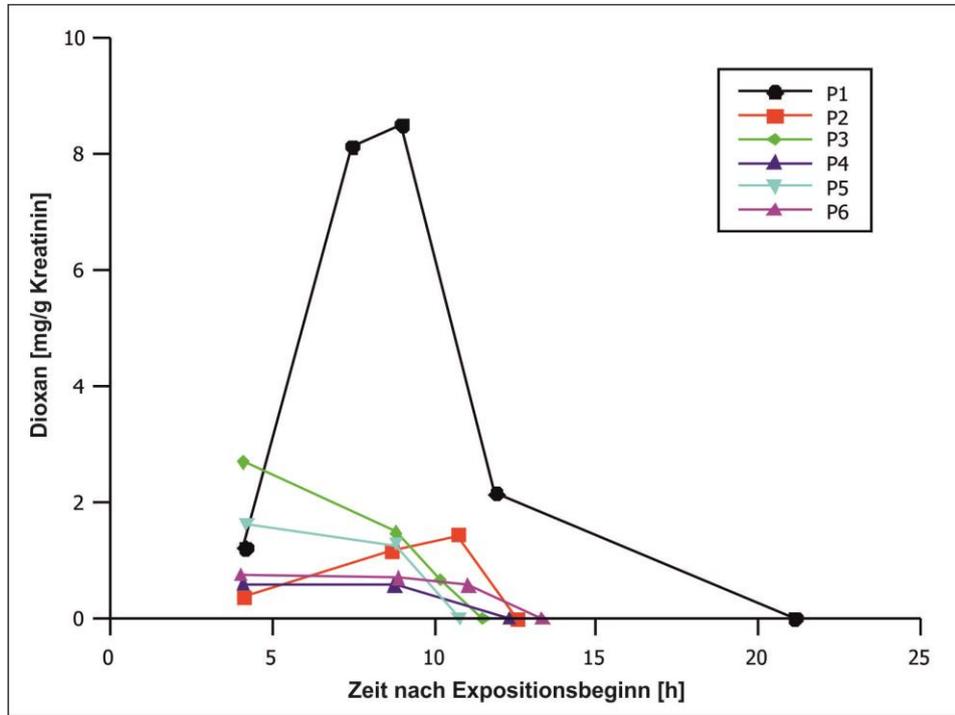


Abbildung 4: Eliminationsprofil von 1,4-Dioxan [mg/g Kreatinin] der Gruppe ohne körperliche Belastung

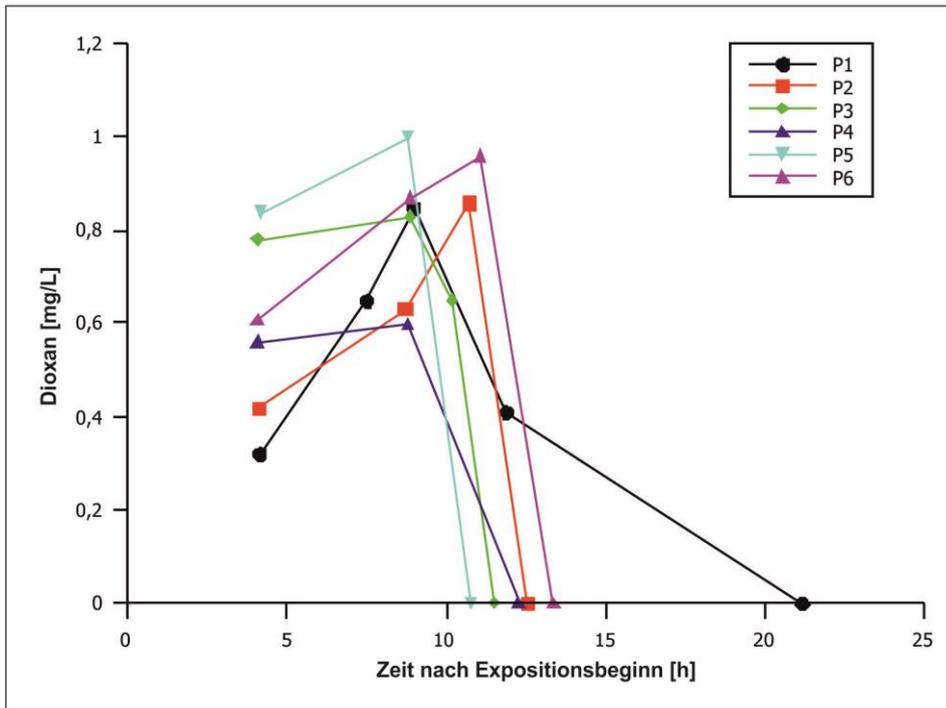


Abbildung 5: Eliminationsprofil von 1,4-Dioxan im Harn [mg/L] der Gruppe ohne körperliche Belastung

1.11 2-Hydroxyethoxyessigsäure im Blut

Der Metabolit 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA), der bei der Metabolisierung von 1,4-Dioxan entsteht, kann im Blut bestimmt werden.

Abbildung 6 stellt die Invasionskinetik von HEAA und von 1,4-Dioxan im Blut dar. Zugrunde liegt eine vierstündige Exposition gegenüber 1,4-Dioxan in Höhe des MAK-Wertes ohne körperliche Belastung. Dieser Proband ist keiner der drei Expositionsgruppen zugeordnet.

Eine Blutabnahme erfolgte vor Expositionsbeginn, vier weitere nach jeder vollen Stunde. Vor Expositionsbeginn waren keine Dioxan- und HEAA-Konzentrationen im Blut nachzuweisen.

Die Konzentration des Metaboliten HEAA im Blut steigt während der ersten drei Expositionsstunden an und hat dann ein „steady state“ von 1,6 mg/L erreicht.

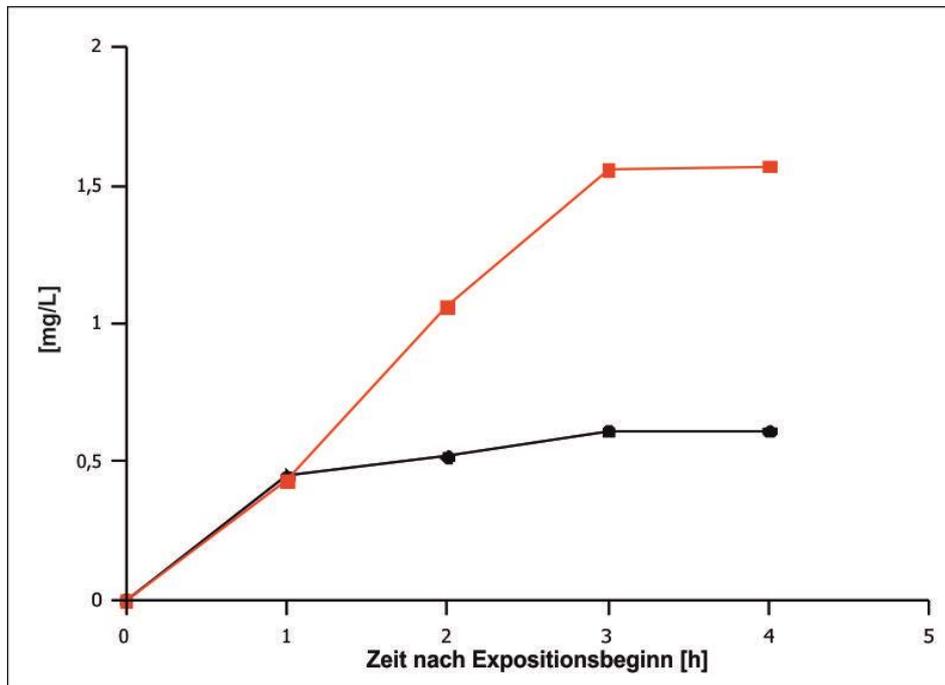


Abbildung 6: Invasionskinetik von 2-Hydroxyethoxyessigsäure (rot) und 1,4-Dioxan (schwarz) im Blut [mg/L] eines Probanden

1.12 2-Hydroxyethoxyessigsäure im Harn

1.12.1 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration in mg/L

Es erfolgte außerdem die Bestimmung der HEAA-Konzentrationen im Harn, deren Ergebnisse zunächst in der Einheit mg/L und anschließend mit Kreatininbezug in mg pro Gramm Kreatinin aufgeführt werden.

Die Werte der drei verschiedenen Belastungsgruppen, werden getrennt voneinander betrachtet. Es werden die mittleren Maximalwerte des Dioxan-Metaboliten HEAA im Harn gebildet. Der mittlere Maximalwert bezeichnet den Mittelwert der jeweils höchsten HEAA-Konzentration aller Probanden in einer Belastungsgruppe.

In der Gruppe ohne körperliche Belastung ergibt sich ein gemittelter Maximalwert von 311 ± 166 mg/L nach durchschnittlich $10,2 \pm 1,2$ Stunden. Der gemittelte Maximalwert in der 50 Watt-Gruppe liegt bei 503 ± 214 mg/L nach einer Zeit von $9,4 \pm 0,9$ Stunden. Die 75 Watt-Gruppe zeigt einen durchschnittlichen Maximalwert von 449 ± 199 mg/L nach $9,6 \pm 0,6$ Stunden. Es ist keine eindeutige Korrelation zwischen körperlicher

Aktivität und der HEAA-Konzentration in mg/L im Harn festzustellen. Die Werte werden in Tabelle 7 präsentiert.

Tabelle 7: Höhe und Zeit bis zum Erreichen des Maximums von HEAA in mg/L sowie Mittelwert nach 24 Stunden und Halbwertszeit der Abklingkurve der drei verschiedenen Belastungsgruppen

Belastungsgruppe [W]	Mittlerer Maximalwert HEAA [mg/L]	Zeit bis zum Erreichen des Maximums [h]
0	311 ± 166	10,2 ± 1,2
50	503 ± 214	9,4 ± 0,9
75	449 ± 199	9,6 ± 0,6

Belastungsgruppe [W]	Mittelwert nach 24 Stunden [mg/L]	Halbwertszeit [h]
0	29 ± 23	4,69 ± 0,87
50	72 ± 65	4,78 ± 1,13
75	43 ± 33	5,06 ± 0,93

Die Abbildungen 7 bis 9 geben die HEAA-Konzentrationen in mg/L im Harn der drei verschiedenen Belastungsgruppen im zeitlichen Verlauf wieder.

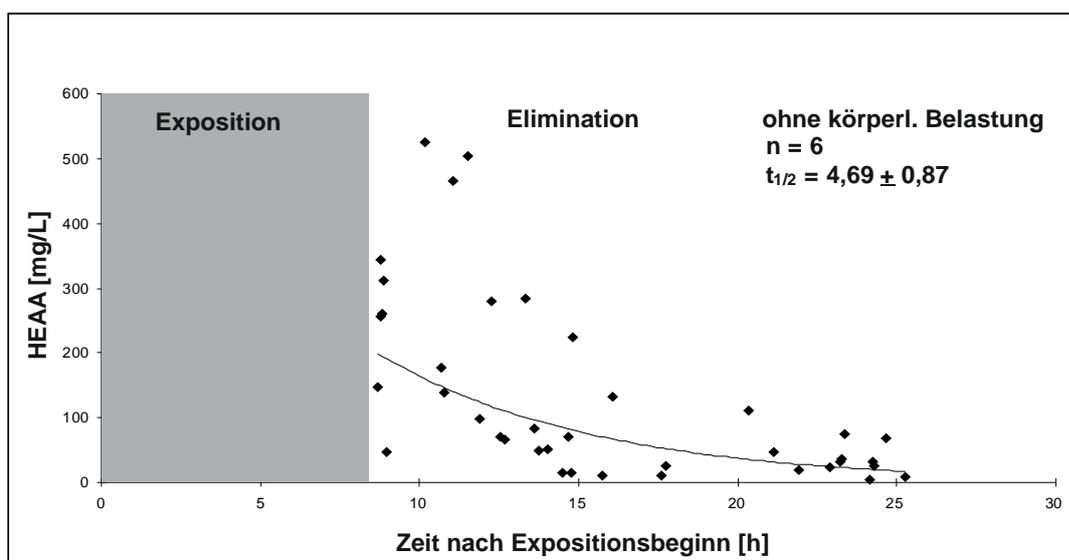


Abbildung 7: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan ohne körperliche Belastung

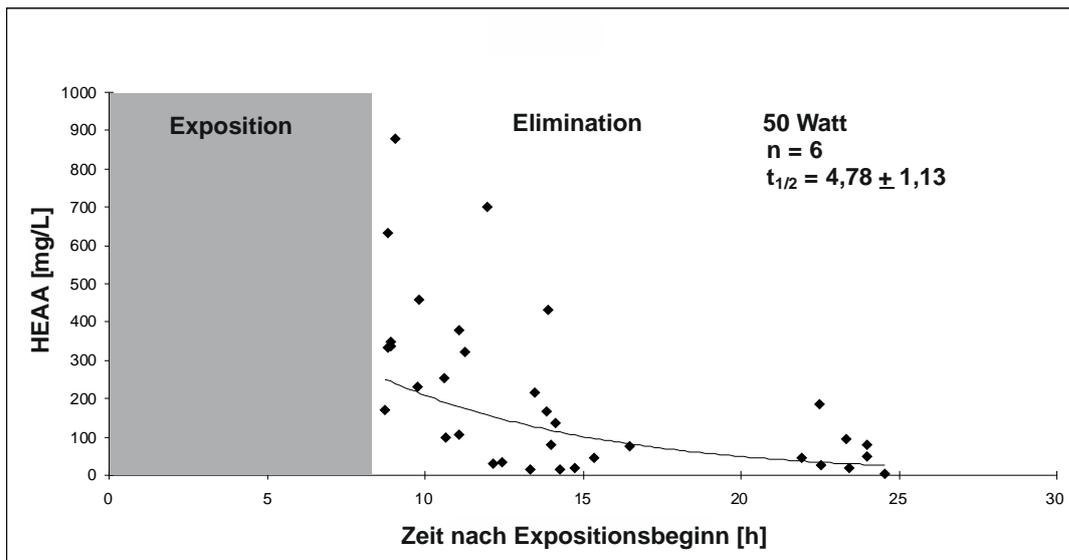


Abbildung 8: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 50 W

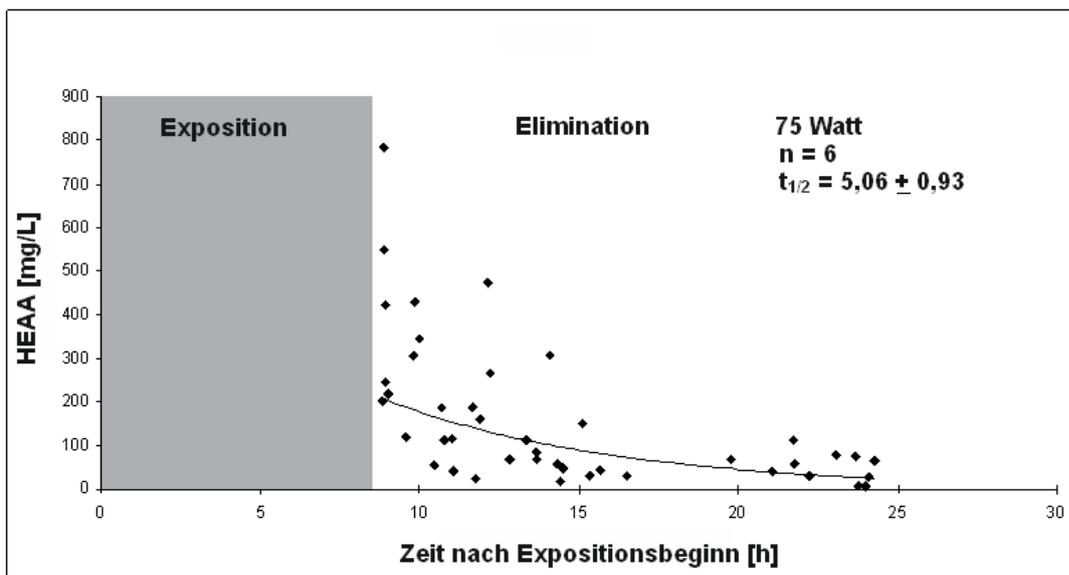


Abbildung 9: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 75 W

1.12.2 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration, bezogen auf Kreatinin

Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen die Eliminationsprofile des Hauptmetaboliten von Dioxan, 2-Hydroxyethoxyessigsäure, bezogen auf die Kreatinin-Konzentration im

Harn. Dieser Bezug ermöglicht es, die individuellen Unterschiede, wie die Sammelperiode, die Nierenfunktion und das Harnvolumen, zu berücksichtigen.

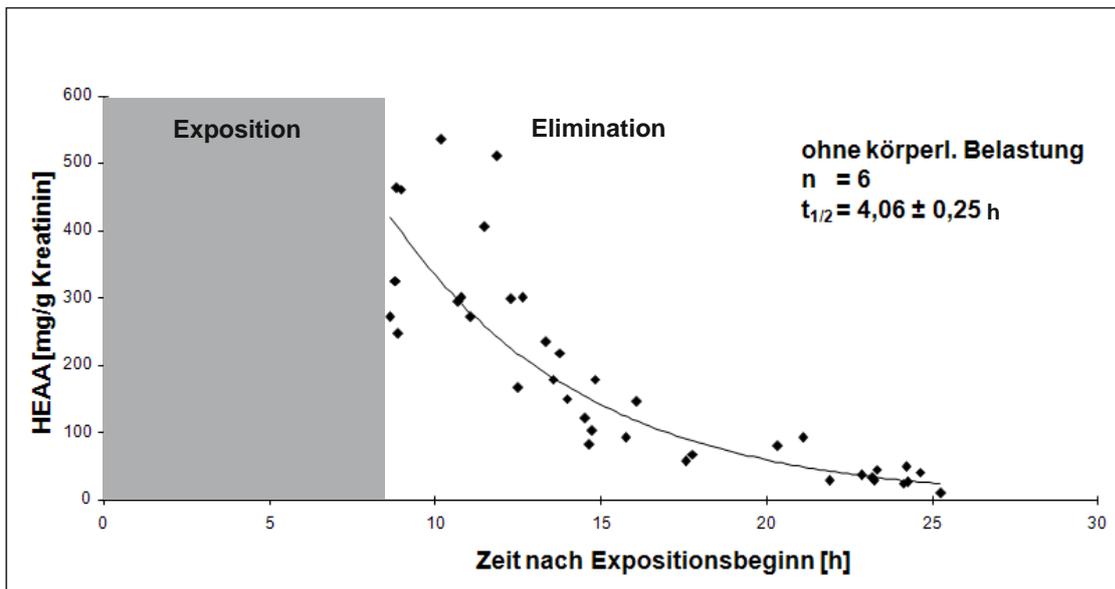


Abbildung 10: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan ohne körperliche Belastung

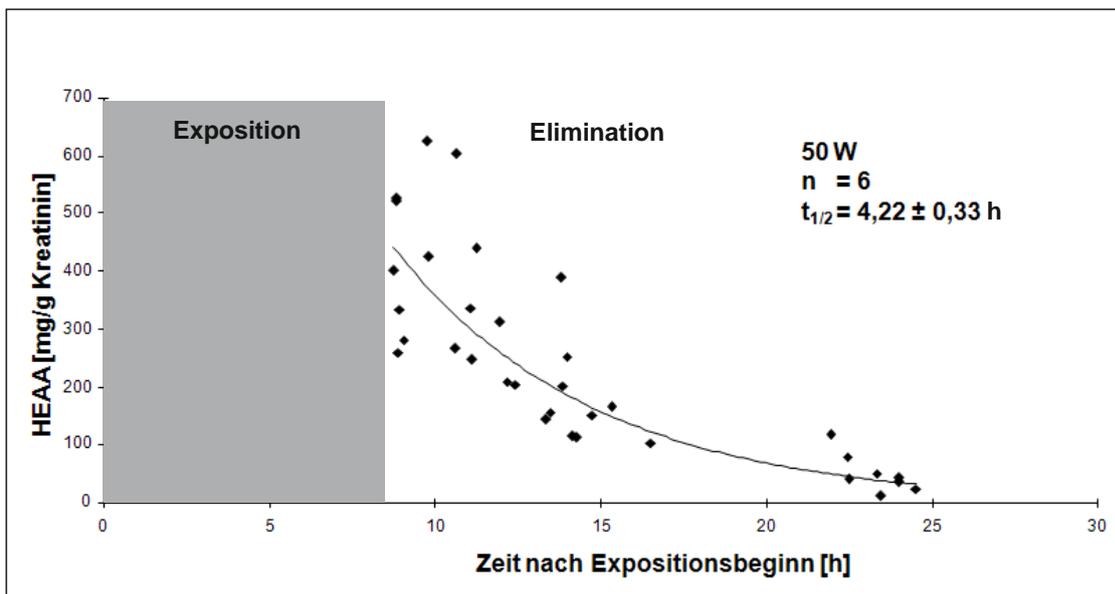


Abbildung 11: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 50 W

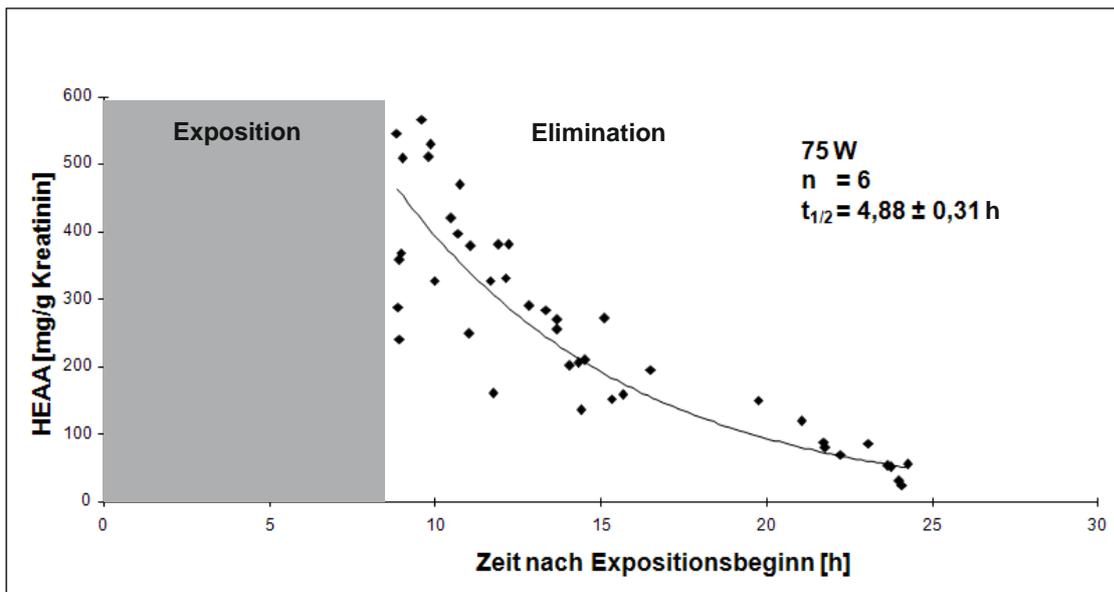


Abbildung 12: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 75 W

Der Vergleich der mittleren Maximalwerte des Dioxan-Metaboliten HEAA im Harn (bezogen auf Gramm Kreatinin) der drei verschiedenen Belastungsgruppen zeigt den Einfluss der körperlichen Belastung auf die Stoffaufnahme.

Der gemittelte Maximalwert der Gruppe ohne körperliche Belastung beträgt 378 mg HEAA pro Gramm Kreatinin (mg/g Kreatinin) bei einer Standardabweichung von 115 mg/g Kreatinin nach durchschnittlich $9,7 \pm 1$ Stunden. Die Halbwertszeit beträgt $4,06 \pm 0,25$ Stunden. Nach 24 Stunden können im Mittel noch 31 ± 14 mg HEAA/g Kreatinin nachgewiesen werden.

In der Gruppe mit 50 W bildet sich ein durchschnittliches Maximum von 404 ± 139 mg HEAA/g Kreatinin nach $9 \pm 2,4$ Stunden aus. Die Halbwertszeit beträgt $4,22 \pm 0,33$ Stunden. Die mittlere HEAA-Konzentration beträgt 24 Stunden nach Expositionsbeginn 41 ± 23 mg HEAA/g Kreatinin.

Das mittlere Maximum der höchsten Belastungsgruppe, 75 W, liegt bei 451 ± 102 mg HEAA/g Kreatinin. Dieser Wert wird nach $9,9 \pm 1,1$ Stunden erreicht. Die Halbwertszeit der Elimination beziffert sich mit $4,88 \pm 0,31$ Stunden. 24 Stunden nach Expositionsbeginn werden durchschnittlich 51 ± 22 mg HEAA/g Kreatinin nachgewiesen.

Die so ermittelten mittleren Maximalwerte zeigen eine Steigerung um ~5% bei 50 W körperlicher Belastung bzw. um ~17% bei 75 W körperlicher Belastung gegenüber der Gruppe ohne körperliche Belastung auf.

Wenn man jeweils die höchste und die niedrigste HEAA-Konzentration pro Belastungsgruppe unberücksichtigt lässt, ergibt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Maximalwerte von 364,35 mg/g Kreatinin über 405,25 mg/g Kreatinin auf 453,5 mg/g Kreatinin.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Daten der 50 Watt-Gruppe sind mit und ohne die Werte von Proband 9 aufgeführt, da dessen Dioxan-Luftkonzentration durch einen Fehler im Versuchsaufbau mit 51,1 mg/m³ nur 70% des MAK-Wertes betrug.

Tabelle 8: Mittlere Maximalwerte der HEAA-Konzentration, bezogen auf Kreatinin, Mittelwerte nach 24 Stunden und Halbwertszeiten der verschiedenen Belastungsgruppen

Belastungsgruppe [W]	Anzahl der Probanden [n]	Mittlerer Maximalwert, HEAA/Kreatinin [mg/g]	Zeit bis zum Erreichen des Maximums [h]
0	6	378 ± 115	9,7 ± 1,0
50	6	404 ± 139	9,0 ± 2,4
50 ^x	5	431 ± 263	9,9 ± 1,6
75	6	451 ± 102	9,9 ± 1,1
Belastungsgruppe [W]	Mittelwert von HEAA/Kreatinin nach 24 Stunden [mg/g]		Halbwertszeit [h]
0	31 ± 14		4,06 ± 0,25
50	41 ± 23		4,22 ± 0,33
50 ^x	47 ± 21		4,50 ± 0,39
75	51 ± 22		4,88 ± 0,31

^x ohne P 9

Zwei weitere achtstündige Dioxan-Expositionen mit zwei männlichen Probanden unter den beschriebenen Bedingungen und bei einer körperlichen Belastung von 100 W sollten den Nachweis erbringen, ob die innere Belastung mit 1,4-Dioxan, gemessen an der HEAA-Konzentration in mg/g Kreatinin im Harn, im Vergleich zu der 75 Watt-Gruppe weiter ansteigt.

Es wurde eine maximale HEAA-Konzentration von 609 mg/g Kreatinin bei Proband 19 bzw. 341 mg/g Kreatinin bei Proband 20 nachgewiesen. 24 Stunden nach Expositionsbeginn fanden sich noch ~70 mg/g Kreatinin (Proband 19) bzw. 54 mg/g Kreatinin (Proband 20) im Harn. Die maximalen HEAA-Konzentration sowie die HEAA-Konzentration 24 Stunden nach Expositionsbeginn sind gegenüber den entsprechenden Durchschnittswerten der 75 Watt-Gruppe (siehe Tabelle 8) etwas erhöht, liegen aber bis auf die maximale HEAA-Konzentration des Probanden 19 innerhalb der Standardabweichung.

Die HEAA-Konzentrationen im Harn der Probanden 19 und 20 mit 100 W körperlicher Belastung sind in Abbildung 13 veranschaulicht.

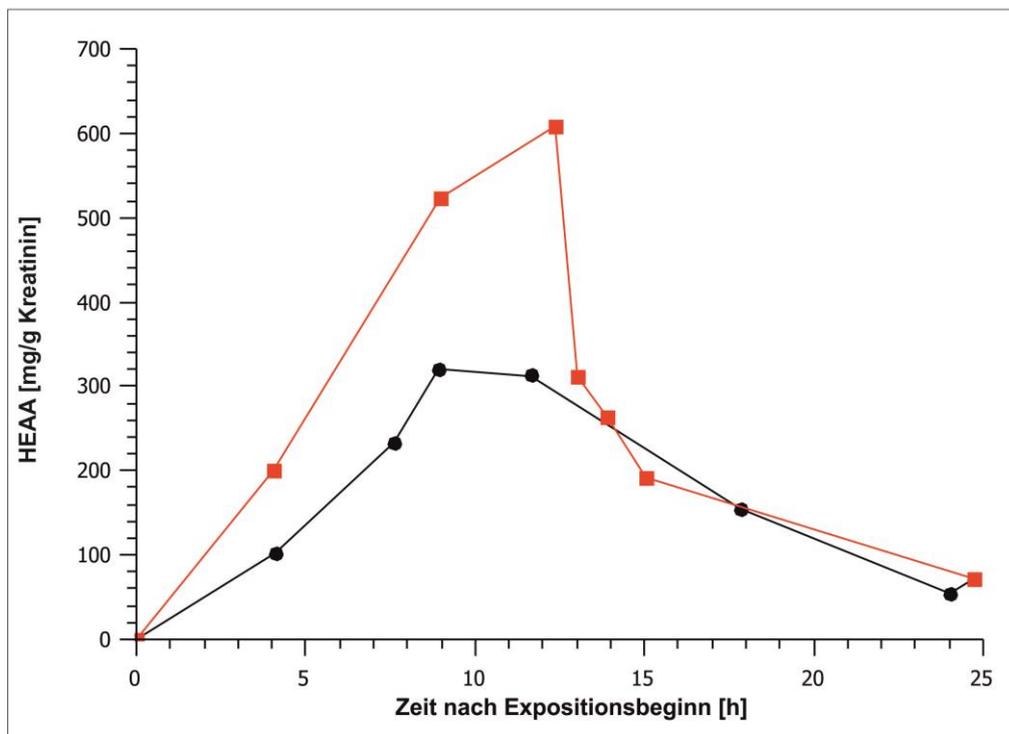


Abbildung 13: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/g Kreatinin] im Harn von Proband 19 (rot) und 20 (schwarz) nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 100 W

In Abbildung 14 werden die HEAA-Konzentration im Harn in mg/g Kreatinin der weiblichen Probandinnen von denen der männlichen Probanden unterschieden, um aufzuzeigen, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Konzentrations-Höhe gibt. Es zeigt sich, dass die Frauen höhere HEAA-Harnkonzentrationen aufweisen als die Männer.

So beträgt die mittlere maximale HEAA-Konzentration der Frauen der Gruppe ohne körperliche Belastung 424 mg HEAA/g Kreatinin und der Wert der Männer derselben Gruppe 284 mg HEAA/g Kreatinin. In der Gruppe mit 50 W körperlicher Belastung erreicht die mittlere HEAA-Maximalkonzentration der Frauen 484 mg/g Kreatinin, die der Männer hingegen nur 286 mg/g Kreatinin. Auch in der Gruppe mit 75 W körperlicher Belastung finden sich bei den Frauen mit 555 mg/g Kreatinin deutlich höhere mittlere maximale HEAA-Konzentrationen gegenüber 399 mg/g Kreatinin bei den Männern.

Am Ende der 24-stündigen Harnsammelperiode lassen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede mehr nachweisen.

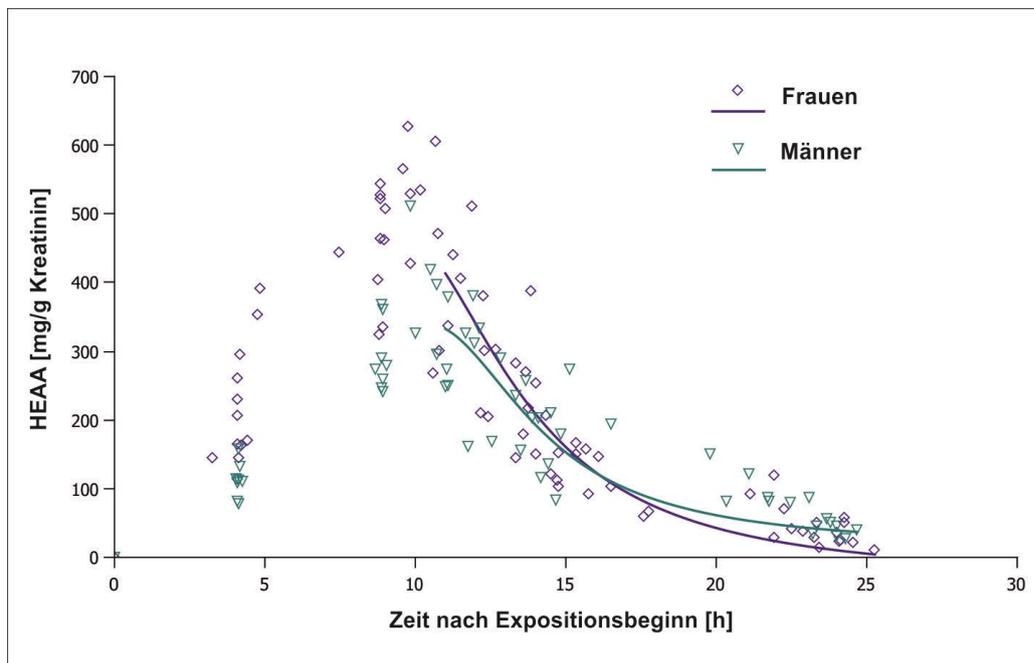


Abbildung 14: Vergleich von 2-Hydroxyethoxyessigsäure in mg/g Kreatinin zwischen Frauen und Männern

In Anlehnung an eine Studie von Tomicic et al. [43] wurde zwischen den teilnehmenden Probandinnen, die hormonelle Kontrazeptiva einnehmen (n=8) und solchen, die keine einnehmen (n=2), unterschieden. Die HEAA-Konzentrationen in mg/g Kreatinin dieser Probandinnen sind in Abbildung 15 dargestellt.

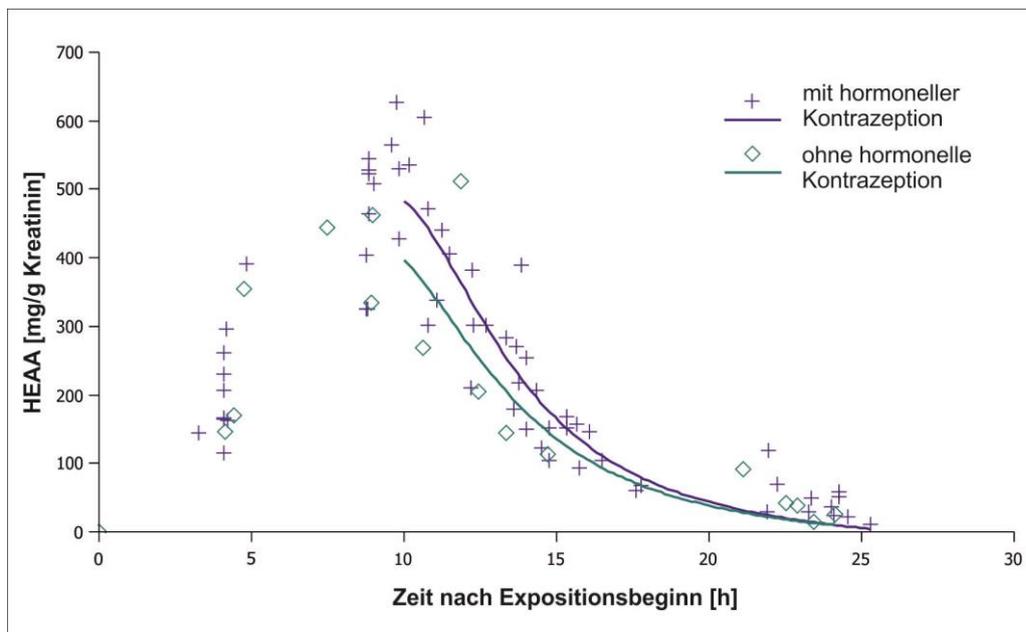


Abbildung 15: Vergleich von 2-Hydroxyethoxyessigsäure in mg/g Kreatinin zwischen Frauen mit und ohne Einnahme hormoneller Kontrazeptiva

1.13 Subjektive Symptome während der Exposition gegenüber 1,4-Dioxan

Zwei Probanden bemerkten eine leichte Reizung der Nasenschleimhaut, ein anderer berichtete von geringfügigem Augenbrennen zu Beginn beider Expositionsphasen. Weitere Symptome traten nicht auf.

4. Diskussion

Dioxan wird in der Industrie weit verbreitet eingesetzt.

Bei Einhaltung des MAK-Wertes ist weder kurzfristig mit chemisch-irritativen Wirkungen noch bei langjähriger Exposition mit toxikologisch bedingten Organschäden zu rechnen.

Der MAK-Wert gibt jedoch nur die durchschnittliche Luftkonzentration an. Lokal kann es am Arbeitsplatz zu Überschreitungen kommen, die bei Raumlufmessungen meist nicht erfasst werden. Außerdem kann sich die individuelle Stoffaufnahme durch direkten Hautkontakt und körperliche Belastung erhöhen. Daher besteht die Notwendigkeit, die individuelle Belastung der Arbeitnehmer durch ein Biomonitoring zu überprüfen.

Wissenschaftliche Ergebnisse darüber, wie hoch die innere Belastung beim Menschen durch eine arbeitstaganaloge achtstündige 1,4-Dioxan-Exposition in Höhe des MAK-Wertes von 73 mg/m^3 (20 ppm) ist, lagen bislang nicht vor. Für die verschiedenen Gefahrenstoffe existieren BAT-Werte (Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte) bisher nur in begrenztem Umfang. Auch für 1,4-Dioxan ist noch kein BAT-Wert festgelegt worden, der eine gesundheitliche Risikoabschätzung bezüglich der Arbeitsstoffbelastung erlauben würde.

Die BAT-Werte orientieren sich ebenso wie die MAK-Werte am Berufsleben: Sie geben die maximale Konzentration eines Gefahrstoffes in biologischem Material an, die keine gesundheitlichen Schäden in Laufe eines Berufslebens verursacht. So kann individueller Gesundheitsschutz betrieben werden, der die über die MAK-Werte hinausgehenden Risiken aufzeigt bzw. vermeidet. Die BAT-Werte sind damit ein wichtiger Parameter der arbeitsmedizinischen Sekundärprävention.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage nach dem geeigneten Parameter (Lösemittel oder Metabolit) sowie dem geeigneten biologischen Material (Blut oder Harn) zur Etablierung eines Biomonitorings für 1,4-Dioxan.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, nach standardisierten 1,4-Dioxan-Expositionen in Höhe des MAK-Wertes, die toxikokinetischen Ergebnisse zu evaluieren, die es ermöglichen, einen BAT-Wert vorzuschlagen.

Für die Interpretation der inneren Belastung der einzelnen Probanden ist die Kenntnis der jeweiligen Konzentration an 1,4-Dioxan in der eingeatmeten Luft entscheidend. Aus diesem Grund wurde in Vorversuchen ohne Probanden die benötigte Dioxanmenge ermittelt, die zum Erreichen der Luftkonzentration in Höhe des MAK-Wertes nötig ist. Darüber hinaus wurde während aller Expositionen die jeweilige Luftkonzentration überprüft. Dass die mittlere 1,4-Dioxan-Konzentration mit $76 \pm 8,9 \text{ mg/m}^3$ um den MAK-Wert von 73 mg/m^3 variiert, ergibt sich letztendlich aus einer Summe von Effekten, die überwiegend auf die Probenahme, insbesondere auf die Probenaufarbeitung und die Analytik, entfällt. Aber auch Adsorptionseffekte durch die unterschiedliche Kleidung der Probanden können zu leicht veränderten Luftwerten führen. Generell gelten Variationen von durchschnittlich 10 % bei Lösemittelexpositionen im Expositionslabor als tolerierbar [41]. In dieser Studie belief sich der durchschnittliche MAK-Wert aller Expositionen auf 104 % (Tabelle 3).

Zur Ermittlung der inneren Belastung mit 1,4-Dioxan lässt sich der Parameter Dioxan im Blut, also das unverstoffwechselte Lösemittel selbst, für ein Biomonitoring nicht etablieren: die entsprechenden Dioxan-Konzentrationen liegen nur unwesentlich über der analytischen Nachweisgrenze von $0,3 \text{ mg/L}$ (Tabelle 6) und fallen zudem innerhalb kurzer Zeit nach Expositionsende stark ab (Abbildung 3). So eignet sich ein Biomonitoring von 1,4-Dioxan im Blut sowohl aufgrund fehlender praktikabler analytischer Methoden als auch aufgrund der geringen Halbwertszeit des Lösemittels nicht für die arbeitsmedizinische Prävention.

Die Invasionszeit von Dioxan beträgt weniger als eine Stunde, danach stellt sich ein „steady state“ ein, woraus gefolgert werden kann, dass die Invasionsgeschwindigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit entspricht. Die maximale Dioxan-Konzentration beträgt bei dem Expositionsversuch, der Abbildung 6 zugrunde liegt, $\sim 0,6 \text{ mg/L}$ und ist damit gerade einmal doppelt so hoch wie die minimal nachweisbare Konzentration.

Die Kinetik der Dioxan-Konzentration im Blut von zwei Probanden (Abbildung 3) bestätigt, dass sich spätestens vier Stunden nach Expositionsbeginn ein „steady state“ einstellt. Die Eliminationszeit nach Expositionsende beträgt nur wenige Minuten: Bereits nach 20 Minuten liegt der Wert von Proband 7 mit $0,33 \text{ mg/L}$ im Bereich Nachweisgrenze von $0,3 \text{ mg/L}$.

Proband 3 war während der Exposition keiner körperlichen Belastung ausgesetzt, Proband 7 leistete 50 W. Trotzdem weist Proband 3 höhere Dioxan-Werte im Blut auf

als Proband 7 (Abbildung 3). Eine Ursache dafür könnte die unterschiedliche Luftkonzentration sein. Während der Exposition von Proband 3 betrug die Dioxan-Konzentration in der Luft durchschnittlich 127 % des MAK-Wertes, während der Exposition von Proband 7 allerdings nur 78 %. Die maximale Konzentration von HEAA/g Kreatinin im Harn des Probanden 3 liegt mit 536 mg/g deutlich über dem Maximalwert des Probanden 7 (250 mg/g) und bestätigt eine insgesamt höhere innere Belastung dieses Probanden. Eine Ursache für die unterschiedlichen Luftkonzentrationen bei den Expositionen dieser beiden Probanden konnte nicht gefunden werden.

Wenn die Luftkonzentration nicht der alleinige Grund für die unterschiedliche Höhe der Blut-Dioxan-Konzentration ist, ist außerdem die körperliche Konstitution der Exponierten als Einflussfaktor zu diskutieren. Die beiden Probanden unterscheiden sich durch unterschiedliche Körperfettanteile: Proband 3 hat einen BMI von $\sim 18 \text{ kg/m}^3$, Proband 7 von $\sim 30 \text{ kg/m}^3$. Dioxan ist durch die CH-Anteile im Molekül auch ein Stoff, der auch lipophile Eigenschaften hat [12]. Durch Diffusion ins Fettgewebe ist eine Verringerung der Konzentration im Blut möglich. Weitere Ergebnisse zur Unterstützung dieser Hypothese liegen nicht vor.

Der Vergleich der Blut-Dioxan-Werte aus den drei Gruppen unterschiedlicher körperlicher Belastung zeigt nach Expositionsende keine aussagekräftigen Unterschiede hinsichtlich der Konzentrationshöhe: Der mittlere Maximalwert bei Expositionsende beträgt in den Gruppen ohne Belastung und bei 50 W $\sim 1 \text{ mg/L}$ und steigert sich auch in der 75 Watt-Gruppe nur auf $\sim 1,5 \text{ mg/L}$ an. Auch hier ist eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse nicht möglich, da alle ermittelten Konzentrationen im Bereich der analytischen Nachweisgrenze von $0,3 \text{ mg/L}$ liegen. Der Nachweis von Dioxan im Blut eignet sich aus diesen Gründen nicht für ein Biomonitoring.

Auch im Harn ist die Konzentration des reinen Lösemittels 1,4-Dioxan kein sensitiver Parameter für die Beurteilung der inneren Belastung, da die entsprechenden Dioxan-Konzentrationen ebenfalls im Bereich der Nachweisgrenze von $0,3 \text{ mg/L}$ liegen und schnell absinken (Abbildungen 4 und 5).

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen das Eliminationsprofil von Dioxan im Harn mit Bezug auf die Kreatinin-Konzentration (Abbildung 4) sowie die Dioxan-Konzentration in mg/L (Abbildung 5). In Abbildung 4 fallen die Werte eines Probanden auf, dessen Dioxan-Konzentration in mg/g Kreatinin deutlich über den Werten der anderen

Probanden seiner Gruppe liegt. Ein solcher „Ausreißer“ ist in Abbildung 5 nicht auszumachen. Es ist nicht eindeutig festzulegen, ob sich dessen Dioxanbelastung tatsächlich von denen der anderen Probanden unterscheidet und der Bezug zu Kreatinin dies aufdeckt oder ob gerade der Bezug zu Kreatinin die Werte verzerrt. Dieser Proband wies auffallend niedrige Kreatinin-Werte ($\sim 0,3$ g/L) im Harn auf, die durch dessen große Harnvolumina zu erklären sind. Theoretisch sollte jedoch gerade durch den Bezug zu Kreatinin der Quotient von Dioxan zu Kreatinin auch bei größeren Harnvolumina gleichbleiben. Es gibt keine besonderen äußeren Umstände, die für eine tatsächlich höhere innere Belastung sprechen würden. Insbesondere sind die HEAA-Konzentrationen dieses Probanden mit maximal 512 mg/g Kreatinin innerhalb der Streubreite.

In Abbildung 6 wird die Invasionskinetik von HEAA und von 1,4-Dioxan im Blut dargestellt.

Die Konzentration von 1,4-Dioxan im Blut hat bereits eine Stunde nach Expositionsbeginn ein „steady state“ von $\sim 0,5$ mg/L erreicht, während die HEAA-Konzentration im Blut, erst nach drei Stunden ein bei einer Konzentration von $\sim 1,6$ mg/L nicht weiter ansteigt. Diese Verzögerung ist durch die Metabolisierungsprozesse bedingt, die HEAA aus Dioxan bilden.

Diese Studie hat gezeigt, dass die innere Belastung nach Dioxan-Expositionen gut durch ein Biomonitoring des Hauptmetaboliten von 1,4-Dioxan, 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA), im Harn beschrieben werden kann. Generell kann die Metaboliten-Konzentration im Harn, volumenbezogen in mg/L, oder, bezogen auf die Menge Kreatinin im Harn, (mg/g Kreatinin) angegeben werden. Zwar muss bei einem Kreatinin-Bezug zusätzlich der Kreatiningehalt im Harn bestimmt werden, was weiteren Aufwand bedeutet, dafür werden jedoch die individuellen Faktoren, die die Metaboliten-Konzentration beeinflussen, ausgeglichen. Aus diesem Grund sollte die Angabe im mg/g Kreatinin zur Beurteilung der inneren Belastung bevorzugt zum Einsatz kommen.

Die HEAA-Konzentrationen in mg/g Kreatinin streuen deutlich geringer um die Ausgleichsfunktion als die Konzentrationen, die in mg/L angegeben sind (Abbildungen 7-9 und 10-12).

Die individuellen Variationen in der Konzentration sind bedingt durch die unterschiedliche Flüssigkeitsaufnahme, die Frequenz des Wasserlassens (also die Sammeldauer) und die Nierenfunktion. Kreatinin wird kontinuierlich von den Nieren ausgeschieden und ist somit ein Marker, der mit der Sammeldauer korreliert. Außerdem stellt der Kreatinin-Wert einen Parameter für die Nierenfunktion dar, die für alle mit dem Harn ausgeschiedenen Gefahrstoffe und deren Metaboliten entscheidend ist. Die Kreatinin-Konzentration korreliert, genau wie die Metaboliten-Konzentration im Harn, zudem umgekehrt proportional mit der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge.

Der Kreatinin-Wert ist abhängig von der Muskelmasse und somit vom Geschlecht. Je größer die Muskelmasse ist, desto geringer wird der Quotient HEAA/Kreatinin. Bei den Probanden dieser Studie beträgt der Kreatinin-Wert im Harn der männlichen Probanden durchschnittlich 1,08 mg/L, der Wert der weiblichen Probandinnen 0,54 mg/L. Neben dem Geschlecht gibt es Störgrößen, wie z.B. hoher Fleischkonsum und starke Muskularbeit, welche die Kreatinin-Konzentration im Harn beeinflussen können. Sie können den Kreatinin-Wert erhöhen bzw. den Quotienten HEAA/Kreatinin erniedrigen. Der Vergleich der HEAA-Konzentration in mg/g Kreatinin zwischen weiblichen und männlichen Probanden zeigt auf, dass die Frauen höhere HEAA-Harnkonzentrationen in mg/g Kreatinin aufweisen als die Männer (Abbildung 14). Möglicherweise ist dieser Unterschied bedingt durch die geringeren Kreatinin-Konzentrationen im Harn der Frauen.

Der Einfluss der körperlichen Belastung auf die Stoffaufnahmen, gemessen an der HEAA-Konzentration im Harn in mg/g Kreatinin, ist anhand der Abbildungen 10-12 und Tabelle 8 nachzuvollziehen. Je höher die körperliche Belastung in Watt ist, desto höher ist der Maximalwert des Metaboliten HEAA und umso höher sein Wert 24 Stunden nach Expositionsbeginn. Dies bezieht sich auf körperliche Belastungen bis 75 W. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse von zwei weiteren Probanden zu sehen, die einer körperlichen Belastung von 100 W ausgesetzt waren. Diese Expositionen sollten zeigen, ob die HEAA-Konzentrationen deutlich über die Werte der mit 75 W belasteten Probanden ansteigen. Die Maximalkonzentration des Probanden 19 lag mit 609 mg/g Kreatinin deutlich über dem mittleren Maximum von 451 mg/g Kreatinin der 75 Watt-Gruppe und etwas oberhalb dem höchsten Maximalwert aus der 75 Watt-Gruppe (565 mg/g Kreatinin). Der Proband 20 hingegen, welcher ebenfalls 100 W körperliche Belastung leistete, wies mit 341 mg/g Kreatinin einen deutlich niedrigeren Wert auf. Es lässt sich also nicht eindeutig schlussfolgern, dass eine körperliche Belastung über 75 W

zu einer gesteigerten inneren Belastung führt. Weitere Studien sind nötig, um die Auswirkung hoher körperlicher Belastungen auf die innere Belastung zu klären. Wenn durch eine hohe Stoffaufnahme die maximale Metabolisierungsgeschwindigkeit von 1,4-Dioxan zu HEAA erreicht wird, kann laut Woo et al. Dioxan-2-ol entstehen, das folglich nach solchen Expositionsversuchen mit sehr hoher körperlicher Belastung zusätzlich gemessen werden müsste [17].

Für die körperlichen Belastungsgruppen bis 75 W konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass ein erhöhtes Atemvolumen, bedingt durch die körperliche Betätigung, zu einer vermehrten Stoffaufnahme führt, was wiederum bei einer Grenzwertfestlegung im Sinne des BAT-Konzepts zu berücksichtigen ist.

Die maximale Metaboliten-Konzentration wird bei allen drei Belastungsgruppen ~9,7-9,9 Stunden nach Expositionsbeginn erreicht, also ca. eine Stunde nach Expositionsende. Dass der Zeitpunkt des Erreichens der maximalen HEAA-Konzentration zwischen den Belastungsgruppen nicht variiert, deutet auf eine uneingeschränkte Metabolisierung von Dioxan zu HEAA bei Expositionen in Höhe des MAK-Wertes von 20 ml/m³ hin. Diese Beobachtung wird durch die Untersuchungen von Young et al. [19, 20] gestützt: Die Autoren stellten fest, dass bei Konzentrationen bis 50 ml/m³ Dioxan vollständig zu HEAA metabolisiert wird. Erst höhere Luftkonzentrationen führen zu einer zeitlichen Verzögerung der Metabolisierung. Dies ist von praktischer Relevanz, denn so kann der Zeitpunkt der Harnprobennahmen zur Überprüfung der inneren Belastung nach einer Dioxan-Exposition für alle Belastungsgruppen bis 75 W identisch sein.

Ein wichtiger Aspekt in der Bewertung von Gefahrenstoffen ist die Frage nach der möglichen Kumulation: Ist ein Stoff nach 24 Stunden noch nicht komplett ausgeschieden, reichert er sich von Arbeitstag zu Arbeitstag an und kann – wenn überhaupt – erst über das Wochenende vollständig verstoffwechselt und ausgeschieden werden.

Dioxan selbst ist bereits nach 4 Stunden nicht mehr im Harn nachzuweisen und kumuliert somit nicht bei niedrigen Luft-Konzentrationen in Höhe des MAK-Wertes.

Hingegen weist der Metabolit HEAA am nächsten Morgen, also ~15 Stunden nach Expositionsende, noch durchschnittliche Werte von 30-50 mg/g Kreatinin auf.

Zur Überprüfung möglicher kumulativer Effekte sammelte ein Proband seine Harnproben über 30,5 Stunden. Nach dieser Zeit waren noch 12 mg/g Kreatinin nachweisbar. Daraus ergibt sich eine geringfügige Kumulation des Metaboliten HEAA.

Tomicic et al. haben in einer Studie die Variabilität biologischer Marker im Harn nach Exposition gegenüber Methylethylketon, 1-Methoxy-2-Propanol und 1,1,1-Trichloroethan zwischen Männern und Frauen untersucht und dabei zusätzlich zwischen Frauen, die hormonelle Kontrazeptiva einnehmen, und solchen, die keine einnehmen, differenziert. Es zeigte sich, dass eine Einnahme hormoneller Kontrazeptiva zu einem Anstieg von über 50 % der Metaboliten-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme (ebenfalls ~50 %) der Konzentrationen der unveränderten Ausgangssubstanzen im Harn führte [43].

In Anlehnung an diese Studie wurde bei den teilnehmenden Probandinnen ebenfalls bezüglich der hormonellen Kontrazeption unterschieden (Abbildung 15). Allerdings ließ sich ein Einfluss auf die Metabolisierung von 1,4-Dioxan nicht nachweisen. Denn das Verhältnis von acht zu zwei Probandinnen mit bzw. ohne die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva ist nicht geeignet, eine statistisch verlässliche Aussage zu treffen.

5. Schlussfolgerung

Für ein arbeitsmedizinisches, präventives Biomonitoring könnte aus den Ergebnissen der standardisierten achtstündigen Expositionen in Höhe des MAK-Wertes von 20 ppm ein Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert (BAT-Wert) in Höhe von

400 mg 2-Hydroxyethoxyessigsäure/g Kreatinin

vorgeschlagen werden [44].

Diesem Wert liegt die mittlere maximale HEAA-Konzentration im Harn der Gruppe mit einer körperlichen Belastung von 50 W zugrunde, da in der Regel an Arbeitsplätzen eine mittelschwere körperliche Tätigkeit verrichtet wird. Der Bezug auf die Kreatinin-Konzentration im Harn erwies sich als vorteilhaft.

Die Harnprobennahme findet am Expositionsende bzw. Schichtende statt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie diente der Evaluierung eines Biologischen Arbeitsstoff-Toleranzwertes (BAT), um eine fundierte, individuelle Risikoabschätzung beim Umgang mit 1,4-Dioxan gewährleisten zu können. Zugrunde liegt die Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von 20 ppm (73 mg/m³).

18 freiwillige Probanden waren einzeln jeweils acht Stunden lang in einem Expositionslabor dem MAK-Wert exponiert und leisteten auf einem Fahrradergometer 50 bzw. 75 W je 10 Minuten pro Stunde oder waren keiner körperlichen Belastung ausgesetzt. Es wurden Blutproben nach vier und acht Stunden entnommen sowie über 24 Stunden Harnproben gesammelt. Die Proben wurden gaschromatografisch auf 1,4-Dioxan sowie dessen Metaboliten 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA) untersucht.

In Bezug auf die Auswertung hat sich gezeigt, dass der Quotient aus HEAA und Kreatinin im Harn ein guter Indikator für die innere Belastung mit 1,4-Dioxan ist. Dioxan selbst steigt im Blut und Harn kaum über die Nachweisgrenze an.

Die mittleren Maxima von HEAA in mg pro Gramm Kreatinin sind in ihrer Höhe entsprechend der körperlichen Belastung gestaffelt und liegen zwischen 378 und 451 mg/g Kreatinin. Die Halbwertszeiten korrelieren ebenfalls mit der Belastung und betragen 4 h, 4,2 h und 4,9 h. Nach 24 Stunden sind noch 31 bis 51 mg HEAA/g Kreatinin im Harn nachweisbar, was zu einer geringfügigen Kumulation des Metaboliten führt.

Für die Festlegung des BAT-Wertes (des Biologischen Arbeitsstoff-Toleranzwertes) werden die Ergebnisse der mittleren Belastungsgruppe herangezogen, da eine körperliche Belastung von 50 W der durchschnittlichen Arbeitsleistung entspricht. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie könnte ein möglicher

BAT-Wert in Höhe von 400 mg HEAA/g Kreatinin

abgeleitet werden.

Die Überprüfung der inneren Belastung soll anhand einer Harnprobe des Arbeitnehmers nach Schichtende bzw. nach Expositionsende vorgenommen werden.

Eine Überschreitung dieses Wertes muss eine Änderung der Arbeitsplatzbedingungen zur Folge haben, damit der Gesundheitsschutz der Arbeitnehmer gewährleistet ist.

Diese Studie hat nachgewiesen, dass es zu einer schwachen Kumulation des Metaboliten HEAA kommt, da der Metabolit 24 Stunden nach Expositionsbeginn noch im Harn nachweisbar ist. Um beurteilen zu können, ob es durch die Kumulation des Metaboliten zu einer relevanten Erhöhung der inneren Belastung kommt, sind weitere Studien mit mehrtägigen Expositionen unerlässlich.

Der Einfluss hormoneller Kontrazeptiva auf die Metabolisierung von Dioxan muss ebenso anhand weiterer Studien überprüft werden, da das Verhältnis in dieser Studie von 2:8 Frauen ohne bzw. mit Einnahme hormoneller Kontrazeptiva zu unausgeglichen war und somit keine verlässliche Schlussfolgerung zulässt.

Die Auswirkungen einer körperlichen Höchstbelastung von >100 W auf die 1,4-Dioxanaufnahme müssen in Folgestudien mit weiteren Dioxan-Expositionen untersucht werden.

7. Summary

The present study was designed to evaluate a biological tolerance value (BAT value) for 1,4-dioxane in order to ensure an established, individual risk assessment when dealing with 1,4-dioxane. The study is based on its maximum allowable concentration (MAC) of 20 ppm (73 mg/m³).

18 volunteers were separately exposed to the MAC value in a laboratory for eight hours. They were divided into three groups: Two groups performed 50 or 75 W on a bicycle ergometer for 10 minutes every hour. The third group was not exposed to physical stress. Blood samples were collected after four and eight hours and urine samples were collected over 24 hours. The samples were probed by a gas-phase chromatograph for 1,4-dioxane and its metabolite 2-Hydroxyethoxyacetic acid (HEAA).

Evaluating the results, the quotient of HEAA and creatinine in urine is proved to be a suitable indicator to determine the internal load of 1,4-dioxane. The levels of dioxane rise in blood and urine barely above the detection limit.

The average maxima of HEAA in mg per gram creatinine are graded between 378 and 451 mg/g creatinine according to the physical stress. The half-lives are also correlated with the physical stress and amount to 4 h, 4.2 h and 4.9 h. After 24 hours 31 to 51 mg HEAA/g creatinine is detected in urine, leading to a slight accumulation of the metabolite.

For the determination of a BAT value the results of the group that performed 50 W are used because a physical stress of 50 W is almost equal to an average work load. The results of this study suggest a

BAT value of 400 mg HEAA/g creatinine.

The examination of the internal load should be carried out on a urine sample of the employee at the end of the working shift or at the end of exposure.

Exceeding this value must cause a change in workplace conditions, so that the health of the workers is ensured.

This study has shown that there is a weak accumulation of the metabolite HEAA as the metabolite is still detectable in the urine 24 hours after exposure started. In order to

assess whether there is a relevant increase of the internal stress, further studies over several days of exposure are necessary.

The influence of hormonal contraceptives on the metabolism of dioxane must be reviewed in further studies, since the study examined an unbalanced ratio of 8: 2 women taking or not taking hormonal contraceptives and thus does not allow reliable conclusions.

The effects of a physical maximum load of >100 W during exposure with 1,4-dioxane must also be investigated in further studies.

8. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Umwandlungsschritte während der Metabolisierung von 1,4-Dioxan zu 2-Hydroxyethoxyessigsäure (HEAA).....	8
Abbildung 2: Beispielhafte Exposition in dem Expositionslabor [45].....	16
Abbildung 3: 1,4-Dioxan-Werte [mg/L] im Blut der Probanden 3 (rot) und 7 (schwarz) zu verschiedenen Zeitpunkten	25
Abbildung 4: Eliminationsprofil von 1,4-Dioxan [mg/g Kreatinin] der Gruppe ohne körperliche Belastung.....	27
Abbildung 5: Eliminationsprofil von 1,4-Dioxan im Harn [mg/L] der Gruppe ohne körperliche Belastung.....	28
Abbildung 6: Invasionskinetik von 2-Hydroxyethoxyessigsäure (rot) und 1,4-Dioxan (schwarz) im Blut [mg/L] eines Probanden	29
Abbildung 7: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan ohne körperliche Belastung.....	30
Abbildung 8: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 50 W	31
Abbildung 9: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/L] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 75 W	31
Abbildung 10: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan ohne körperliche Belastung	32
Abbildung 11: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 50 W	32
Abbildung 12: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentration [mg/g Kreatinin] im Harn nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 75 W	33
Abbildung 13: 2-Hydroxyethoxyessigsäure-Konzentrationen [mg/g Kreatinin] im Harn von Proband 19 (rot) und 20 (schwarz) nach Exposition gegenüber 1,4-Dioxan bei einer körperlichen Belastung von 100 W	35
Abbildung 14: Vergleich von 2-Hydroxyethoxyessigsäure in mg/g Kreatinin zwischen Frauen und Männern	36

Abbildung 15: Vergleich von 2-Hydroxyethoxyessigsäure in mg/g Kreatinin zwischen Frauen mit und ohne Einnahme hormoneller Kontrazeptiva	37
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die physikalischen Eigenschaften von 1,4-Dioxan [10].....	5
Tabelle 2: Anzahl der Probanden und Höhe der körperlichen Belastung (auf dem Fahrrad-Ergometer, je zehn Minuten pro Stunde)	16
Tabelle 3: Die durchschnittlichen Luftkonzentrationen von 1,4-Dioxan im Expositionslabor während der gesamten achtstündigen Expositionszeit.....	23
Tabelle 4: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut eines Probanden ohne körperliche Belastung (Proband Nr. 3).....	24
Tabelle 5: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut eines Probanden mit 50 W körperlicher Belastung (Proband Nr. 7).....	24
Tabelle 6: 1,4-Dioxan-Konzentration im Blut	26
Tabelle 7: Höhe und Zeit bis zum Erreichen des Maximums von HEAA in mg/L sowie Mittelwert nach 24 Stunden und Halbwertszeit der Abklingkurve der drei verschiedenen Belastungsgruppen	30
Tabelle 8: Mittlere Maximalwerte der HEAA-Konzentration, bezogen auf Kreatinin, Mittelwerte nach 24 Stunden und Halbwertszeiten der verschiedenen Belastungsgruppen	34

Ergänzende Daten zur Analytik

Bestimmung von HEAA mittels GC-MS im Harn

1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

1.1 Geräte

Harnsammelgefäß PP (z. B. Fa. Kautex)

Analysenwaage

Labor-Zentrifuge

Messkolben, 10 ml

Reagenzgläser mit teflonkaschiertem Schraubverschluß (z.B. Fa. Schütt)

Einmalpasteurpipetten (z.B. Sarstedt)

Trockenschrank

100 und 1000 µl Varipette (z.B. Fa. Eppendorf)

Pipettenspitzen (z.B. Fa. Eppendorf)

200 µl Vials (z.B. Macherey-Nagel)

Bördelkappen (z.B. Macherey-Nagel)

Stickstoffevaporator (z.B. Zymark)

Laborschüttler (z.B. IKA Vibrax)

GC/MS-Konfiguration bestehend aus: Injektor Hewlett-Packard 7673, Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II und Massenspektrometer Hewlett-Packard 5989 A.

Gaschromatographische Säule: Optima 35ms-Säule (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

1.2 Chemikalien

2-Hydroxyethoxyessigsäure, Natriumsalz, HEAA-Gehalt: 70 % (Auftragssynthese, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

2-Hydroxyethoxyessigsäure, Natriumsalz, HEAA-Gehalt: 85 %, Isotopenreinheit: 93 % (Auftragssynthese, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Essigsäureethylester zur Rückstandsanalyse (z.B. Merck Art. 1.10972)

Acetonitril zur Rückstandsanalyse (z.B. Merck Art 1.06404)

Salzsäurekonz. 37% p.a. (z.B. Merck Art. 1.00317)

Gereinigtes Wasser (z.B. Milli-Q-Wasser)

N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid, MSTFA (z.B. Sigma Aldrich Art. M7891-25G)

Stickstoff 4.6 (z.B. Linde)

Helium 5.0 (z.B. Linde)

1.3 Interner Standard

Stammlösung (SL, 1 g/L)

11,8 mg des Natriumsalzes der 2-Hydroxyethoxyessigsäure (Gehalt 85%) werden in einem 10-ml-Messkolben eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

Verdünnung 1 (V1, 0,1 g/L)

1 ml der Stammlösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

1.4 Vergleichstandards

Stammlösung (SL, 1 g/L)

14,3 mg des Natriumsalzes der 2-Hydroxyethoxyessigsäure (Gehalt 70 %) werden in einem 10-ml-Messkolben eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

Verdünnung I (VI, 50 mg/L)

0,5 ml der SL werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

Die Kalibrierstandards werden mit Poolurin nach folgendem Schema angesetzt (Stammlösung = SL, Verdünnung I = VI):

Kalibrier- standard	Konzentration [mg/L]	Standard	Dotierung [µl]	Poolurin [µl]	Zugabe (V1) [µl]	IS
1	1,0	VI	20	980	50	
2	2,0	VI	40	960	50	
3	5,0	VI	100	900	50	
4	10,0	SL	10	990	50	
5	25,0	SL	25	975	50	
6	50,0	SL	50	950	50	
7	100,0	SL	100	900	50	

2. Probennahme und Probenaufbereitung

2.1 Probennahme

Ist eine zeitnahe Analytik nicht möglich kann der Urin bei ca. -20 °C für mindestens 6 Monate bis zur Aufarbeitung gelagert werden.

2.2 Probenaufarbeitung

Von den zu untersuchenden Urinproben wird jeweils 1 ml abgenommen und mit 50 µl der Stammlösung des internen Standards versetzt.

- 0.25 ml Urin werden mit einer Eppendorf-Pipette in ein 10 ml Schraubreagenzglas überführt.
- Zugabe von 750 µl gereinigtem Wasser
- Zugabe von 50 µl ISTD (Verdünnung I)
- Zugabe von 100 µl konz. Salzsäure
- Zugabe von 3 ml Ethylacetat
- 10 min Extraktion unter Schütteln
- Probe 5 min bei 2200 g zentrifugieren
- Essigester-Aliquot von 2.5 ml in ein separates Reagenzglas überführen
- Essigester-Extrakt bei 45 °C für ca. 12 min bei 0.6 bar N₂ trocknen

- Rückstand mit 50 µl MSTFA versetzen
- Reagenzglas verschließen und für 30 min bei 80°C im Trockenschrank derivatisieren
- 300 µl Acetonitril zugeben, homogenisieren und in ein Autosampler-Vial überführen
- Vial verschließen
- 1 µl splitlos in GC-MS injizieren.

3 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Gaschromatograph

Säule:	Optima 35ms, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Ofenprogramm:	80 °C 2 min halten 8 °C/min bis 180 °C 1 min halten 25 °C/min bis 270 °C 10 min halten
Injektor:	260 °C
Transferline:	280 °C
Trägergas und Fluss:	Helium, 1,2 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl, splitlos

Massenspektrometer

Ionisationsart:	Elektronenstoß-Ionisierung
Quellentemperatur:	200 °C
Quadrupoltemperatur:	100 °C
Detektion:	Selected Ion Monitoring (SIM)
Messzeit pro Ion:	100 ms
Elektronenenergie	70 eV

4 Analytische Bestimmung

Die angegebenen Geräteparameter werden eingestellt und je 1 µl der Analysenprobe in das GC-MS-System injiziert. Proben die einen Gehalt oberhalb 100 mg/L aufweisen, werden entsprechend verdünnt und wiederholt analysiert.

Analyt	Retentionszeit [min]	Gemessene Ionenspur [m/z]
HEAA	15,91	249 Quantifier
		191 Qualifier
HEAA	15,88	253 Quantifier
		195 Qualifier

5 Kalibrierung

Die Kalibrierung ist im Bereich von 1 bis 100 mg/L linear mit Korrelationskoeffizienten von $r > 0,998$ (siehe Anhang).

6 Berechnung des Analysenergebnisses

Zur Berechnung des HEAA-Gehaltes in einer Probe wird der Quotient der Peakflächen von Analyt und internem Standard berechnet und in die Kalibrierfunktion eingesetzt.

7 Standardisierung und Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung werden zwei Kontrollproben parallel zu jeder Probenserie analysiert. Stehen keine käuflichen QS-Standards zur Verfügung, müssen diese selber hergestellt werden. Dazu wird eine Standardlösung in unbelastetem Urin angesetzt (Gehalt z.B. 10 mg/L) oder eine belastete Urinprobe verwendet. Diese Lösungen werden portioniert tiefgekühlt gelagert. Für die Analyse werden dann je zwei Proben a 0.25 ml als QS-Probe eingesetzt. Die erhaltenen Messwerte werden in einer Qualitätsregelkarte dokumentiert.

8 Beurteilung des Verfahrens

8.1 Präzision in der Serie

Die Bestimmung zur Präzision in der Serie wurde mit je acht dotierten Urinproben in den Konzentrationen 5 mg/L und 20 mg/L durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurde die Standardabweichung ermittelt.

Analyt	Konzentration (mg/L)	Mittelwert (mg/L)	Relative Standardab- weichung (%)	Spannweite (%)
HEAA	5	4,94	1,60	3,7
	20	20,5	2,25	5,2

8.2 Präzision von Tag zu Tag

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde mit je zwei belasteten Urinproben in den mittleren Konzentrationen von 0.27 mg/L und 0.42 mg/L an vier verschiedenen Arbeitstagen jeweils doppelt durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurde die Standardabweichung ermittelt.

Analyt	Probe	Anzahl (n)	Relative Standardab- weichung (%)	Spannweite (%)
HEAA	Urin 1 (0.27 mg/L)	8	3,85	8,9
	Urin 2 (0.42 mg/L)	8	0,73	1,7

8.3 Richtigkeit

Die aus den dotierten Proben zur Bestimmung der Präzision in der Serie ermittelten Wiederfindungsraten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Analyt	Konzentration (mg/L)	Mittlere Wiederfindungs-rate (%)	Range (%)
HEAA	5	98.8	96.4 – 101.0
	20	102.4	96.8 – 104.0

8.4 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde mit 0.1 mg/L, bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von besser als 5:1, festgelegt (siehe Störeinflüsse).

8.5 Störeinflüsse

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden 10 verschiedene Individualurine analysiert. Dabei konnten keine Interferenzen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. In einigen Urinen wurden bei Anwendung einer DB 5 Trennsäule Matrixpeaks bei 7.00 und 7.20 min (m/z 249) detektiert, die jedoch chromatographisch vom HEAA-TMS2 (7.29 min) abgetrennt werden konnten. Die Qualifier-Massen 191 und 147 liefern wegen der hohen Untergrundsignale keine besseren Nachweisgrenzen. Optional wurde eine DB17 HT Trennsäule getestet, bei der ebenfalls keine Überlagerungen oberhalb der Nachweisgrenze festgestellt werden konnten.

Bestimmung von Kreatinin im Urin

1 Grundlage des Verfahrens

Die Kreatininbestimmung erfolgt photometrisch nach der Jaffé-Methode:

Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen sogenannten Meisenheimer-Komplex (Jaffé-Reaktion). Der entstandene Komplex absorbiert bei 560nm und zeigt eine intensiv gelb-orange Farbe.

Die Absorption der Lösung ist der Kreatininkonzentration der Probe direkt proportional und wird über eine Kalibrationsgerade einer Kreatininkonzentration zugeordnet.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

Eppendorf Photometer 1101M + CKE 6455

mit Durchflussküvette und Absaugung Eppendorf 4151

Filter 546 nm

Drucker Eppendorf 6526

Röhrchen 13 ml, Fa. Sarstedt, 51582 Nümbrecht, Bestellnr. 55.518/500 Stück

Eindrückstopfen, passend zum Reagenzröhrchen, Fa. Sarstedt, 51582 Nümbrecht, Bestellnr.65.793/1000 Stück

Variable Pipette 100 -1000 µl (z.B. Eppendorf)

Pipette 2 ml (z.B. Eppendorf)

Rundkolben, 50 ml mit Stopfen

Dispenser für mindestens 1-L-Wasserflasche für die Zugabe von 7,75 ml H₂O

Faltenfilter 595 ½, Durchmesser 185 mm, von Schleicher & Schuell, 37582 Dassel

Stoppuhr

2.2 Chemikalien

Natriumhydroxid zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Bestellnr. 1.06498.1000 für 1000g

Pikrinsäure mit Wasser angefeuchtet, Fa. Fluka, Neu-Ulm

Kreatinin Feststoff, Fa. Merck, Bestellnr. 1.05206.0050

Destilliertes Wasser

2.3 Lösungen

NaOH 10%: 100g Natriumhydroxid + 900 g Destilliertes Wasser

Pikrinsäure gesättigt: in eine braune 1-Liter-Flasche gibt man etwa 1 L destilliertes Wasser und dazu mehrere Gramm Pikrinsäure. Unter mehrfachem Schütteln löst sich ein Teil der Pikrinsäure zu einer gesättigten Lösung. In der gesättigten Lösung muss

immer ein Bodensatz bleiben. Man lässt die Lösung über Nacht stehen. Am nächsten Tag wird sie filtriert.

Beide Lösungen sind mehrere Monate haltbar.

2.4 Vergleichstandards

Kalibrierstandards

Vor jeder Messung ist eine Eichkurve anzusetzen.

Für die Kalibration werden wässrige Standards im Bereich von 0,10 bis 5,0 g/L eingesetzt. Die entsprechenden Kalibrierpunkte werden durch Verdünnung der jeweiligen Ausgangslösung (AL) mit den Kalibrierpunkten 5,0 (AL 5) – 4,0 (AL 4) – 3,0 (AL 3) – 2,0 (AL 2) und 1,0 (AL 1) g/L hergestellt. Hierfür werden 250/200/150/100/50 mg Kreatinin Feststoff in je 50 ml Aqua bidest gelöst. Durch entsprechende Verdünnung der jeweiligen Ausgangslösung werden die Zwischenkonzentrationen 0,1/0,2/0,5/0,7/1,5/2,5/3,5 und 4,5 gewonnen (siehe Schema):

S1:	0.1	1000 µl AL 1	ad 10 ml aqua bidest.
S2:	0.2	2000 µl AL 1	ad 10 ml aqua bidest
S3:	0.5	5000 µl AL 1	ad 10 ml aqua bidest
S4:	0.7	7000 µl AL 1	ad 10 ml aqua bidest
S5:	1.0	50 mg Kreatinin / 50 ml a. d.	AL 1
S6:	1.5	7500 µl AL 2	ad 10 ml aqua bidest
S7:	2.0	100 mg Kreatinin / 50 ml a. d.	AL 2
S8:	2.5	8300 µl AL 3	ad 10 ml aqua bidest
S9:	3.0	150 mg Kreatinin / 50 ml a. d.	AL 3
S10:	3.5	8750 µl AL 4	ad 10 ml aqua bidest
S11:	4.0	200 mg Kreatinin / 50 ml a. d.	AL 4
S12:	4.5	9 ml AL 5	ad 10 ml aqua bidest
S13:	5.0	250 mg Kreatinin / 50 ml a. d.	AL 5

Für die Eichung werden je 100 µl Standard mit 150 µl NaOH (10%) und 2 ml gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt, diese Lösung nach 10 min Reaktionszeit mit 7,75 ml aqua bidest aufgefüllt und nach weiteren 5 min Wartezeit photometrisch die

Extinktionen der einzelnen Standards ermittelt. Auch hier ist ein Reagenzienleerwert mitzuführen.

Die Extinktionen des Reagenzienleerwertes sowie der einzelnen Standards werden protokolliert und in Bezug zur jeweiligen Konzentration gesetzt. Gegen die so ermittelte Eichkurve werden die Probenwerte abgelesen.

3 Probennahme und Probenaufbereitung

3.1 Probennahme

Für die Kreatinin-Bestimmung benötigt man mindestens 1 ml Urin.

Bis zur Analyse wird die Probe kurzfristig im Kühlschrank bei 4°C, längerfristig im Gefrierschrank bei ca. -20° C aufbewahrt.

3.2 Probenaufbereitung

Vor der Probenaufbereitung werden die Proben auf Zimmertemperatur gebracht sowie gleichzeitig homogenisiert, indem man sie mindestens 20 Minuten auf den Roller-Mixer legt.

Von jeder Probe/Kontrolle werden 100 µl in ein Reagenzröhrchen pipettiert. Nachdem alle Proben vorgelegt sind, gibt man jeweils 150 µl NaOH 10 % und 2,0 ml gesättigte Pikrinsäure dazu. Nach 10 min Reaktionszeit werden die einzelnen Ansätze mit 7,75ml Aqua dest aufgefüllt, mit Eindrückstopfen verschlossen und gemischt. Nach weiteren 5 min Reaktionszeit können sie zur photometrischen Messung eingesetzt werden.

Als Reagenzienleerwert wird eine Probe mit 100 µl Aqua dest (statt Urin) mitgeführt.

4 Photometrische Arbeitsbedingungen

Eppendorf Photometer 1101M mit Durchflussküvette und Drucker

Filter: 546 nm

5 Analytische Bestimmung

Analytische Bestimmung der nach Abschnitt 3.2 aufgearbeiteten Proben:

Die Durchflussküvette wird mit Aqua dest gespült. Zuerst wird der Reagenzienleerwert eingefüllt, die Absorption des Leerwertes wird auf Null eingestellt und ausgedruckt. Der

Reagenzienleerwert wird abgesaugt und nun nacheinander die Standards, Kontrollen und Proben eingefüllt, gemessen, ausgedruckt, abgesaugt. Es ist ratsam, zwischen den einzelnen Proben die Küvette mit Aqua dest zu spülen, um Verschleppungen zu vermeiden.

6 Kalibrierung

Die um den Reagenzien-Leerwert verminderten Absorptionen der Standards werden gegen die eingesetzten Konzentrationen der Standards zur Eichkurve aufgetragen. Man ermittelt an mehreren Punkten den Steigungsfaktor der Kurve (Konzentration/Extinktion), der Mittelwert daraus ergibt den Faktor, dieser wird am Photometer eingegeben und zur Messung der Kontrollen/Proben eingesetzt.

7 Berechnung der Analyseergebnisse

Mit den für die Proben/Kontrollen erhaltenen Extinktionen (vermindert um den Reagenzien-Leerwert) werden mittels Multiplikation mit dem aus der Eichkurve ermittelten und am Photometer eingegebenen Faktor die Konzentrationen direkt ausgedruckt.

8 Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird mindestens eine Präzisionskontrolle mitgeführt.

9 Beurteilung des Verfahrens

Präzision von Tag zu Tag

20 Analysen (Vorperiode) RV48 2A (Soll: 0,55): 0,03; entspricht VK: 5,5 %

20 Analysen (Vorperiode) RV48 2B (Soll: 2,42): 0,03; entspricht VK: 1,2 %

Präzision in Serie

15 Analysen RV48-2A: 0,02, entspricht VK: 3,6 %

15 Analysen RV48-2B: 0,02, entspricht VK: 0,8 %

Wiederfindung

RV48-2A: 102% (Soll: 0,55 Ist: 0,56)

RV48-2B: 100% (Soll: 2,42 Ist: 2,42)

Nachweisgrenze

Dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis: ca. 0,01 g/L

9. Literaturverzeichnis

1. DFG. List of MAK and BAT values. Wiley-VCH. Weinheim. 2012
2. <http://www.atenschutzlexikon.de/lexikon/a/atemminutenvolumen/>. November 2012
3. Young JD, Braun WH, Gehring PJ, Horvath BS, Daniel RL. 1,4-dioxane and beta-hydroxyethoxyacetic acid excretion in urine of humans exposed to dioxane vapors. *Toxicol Appl Pharmacol* 38: 643-646. 1976
4. DFG. MAK 1,4-Dioxane, 36. Lieferung. 6, 25. 2003
5. Santodanto J, Bosch S, Meylan W, Becker J, Neal M. Monograph on Human Exposure to Chemicals in the Workplace: 1,4-Dioxane. New York: Center for Chemical Hazard Assessment, Syracuse Research Corporation. 1985
6. Italia, MP, Nunes, MA, *J Soc Cosmet Chem.* 42, 97–104. 1991
7. DeRosa Christopher T, Wilbur S, Holler J, Richter P, Stevens Y-W. Health Evaluation of 1,4-Dioxane. *Tox Ind Health*, Vol. 12, 3-17. 1996
8. Fairley A, Linton EC, Ford-Moore AM. The toxicity to animals of 1,4 dioxan. *J Hyg* 34: 486-501. 1934
9. Yamazaki K, Ohno H, Asakura M, Narunni A, Obbayashi H, Fujita H, Obnishi M, Katagiri T, Seno H, Yamanouchi K, Nakayama E, Yamamoto S, Noguchi T, Nagano K, Enomoto M, Sakabe H. Two-year toxicological and carcinogenesis studies of 1,4-dioxane in F344 rats and BDF mice-drinking studies. Second Asia-Pacific Symposium on Environmental and Occupational Health, 193-198. 1994
10. Kraus T, Schaller KH und Csanády C. 1,4-Dioxan. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg). *Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und Biologische Leitwerte (BLW) – Arbeitsmedizinische-toxikologische Begründungen*, 14. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim. 1-8. 2007
11. Grimm AF. Standardisierte i-Propylbenzol-Exposition. Dissertation Justus-Liebig-Universität, Gießen. 2000
12. Anjo DM und Maibach HI. In vivo skin penetration studies of 2,4-toluenediamine, 2,4-diaminoanisole, 2-nitro-p-phenylenediamine, p-dioxane and n-nitrosodiethanolamine in cosmetics. Division of Toxicology, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services 744-746. 1981

13. Barber H. Hemorrhagic nephritis and necrosis of the liver from dioxane poisoning. *Guys Hosp Rep* 84: 267-280. 1934
14. Young JD, Braun WH, Rampy LW, Chenweth MB, Blau GE. Pharmacokinetics of 1,4-dioxane in humans. *J Toxicol Environ Health* 3: 507-520. 1977
15. Registry Agency for Toxic Substances and Disease. Draft Toxicological Profile for 1,4-Dioxane. 92-96. 2007
16. Nannelli A, De Rubertis A, Longo V, Gervasi PG. Effects of dioxane on cytochrome P450 enzymes in liver, kidney, lung and nasal mucosa of rat. *Arch Tox* 79: 74-82. 2005
17. Woo YT, Argis MF, Arcos JC, Griffin GW, Nishiyama K. Structural identification of p-dioxane-2-one as the major urinary metabolite of p-dioxane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 299: 283-287. 1977
18. Hecht SS, Young JD. Metabolic α -hydroxylation of N-nitrosomorpholine and 3,3,5,5-tetradeutero-Nnitrosomorpholine in the F344 rat. *Cancer Res.* 41, 5039-5043. 1981
19. Young JD, Braun WH, Gehring PJ. Dose-dependant fate of 1,4-dioxane in rats. *J Environ Health* 2: 263-282. 1978a
20. Young JD, Braun WH, Gehring PJ. Dose-dependant fate of 1,4-Dioxane in rats. *J Toxicol Environ Health* 4: 709-726. 1978b
21. The DOW Chemical Company, Midland, Michigan, Toxicology Unit, Chemical Biology Research: Vortrag vor der Society of Toxicology, Williamsburg, Virginia. 1975
22. De Nevasquez, S. Experimental tubular necrosis of the kidney accompanied by liver changes due to dioxane poisoning. *J Hyg (Lond)* 35, 540-548. 1935
23. Laug EP, MO Calvery, HJ Morris, G. Woodard. *J Ind Hyg* 21: 173. 1939
24. Zeller, H. Unveröffentlichte Untersuchung der BASF Aktiengesellschaft, *Gewerbehygiene und Toxikologie*. 1973
25. Rowe VK, Wolf MA. Derivatives of glycols, 19, dioxane. In: Clayton GD, Clayton FE, Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Band 2, 3. Auflage: 3909-4052. 1982
26. Ernstgård L, Iregren A, Sjögren B, Johanson G. Acute effects of exposure to vapours of dioxane in humans. *Hum Exp Toxicol* 25(12): 723-9. 2006
27. Schrenk HH, WP Yant. Toxicity of dioxane. *J Ind Hyg Toxicol* 18, 448-460. 1936

28. Wirth W, O Klimmer. Zur Toxizität der organischen Lösungsmittel. 1,4-Dioxan. Int Arch Gewerbepath Gewerbehyg 7, 192-206. 1937
29. The Dow Chemical Company, Midland, Michigan. Toxicology Unit: unveröffentlichte Untersuchungen. Zit. in: Torkelson TR, BKJ Leong, RJ Kociba WA Richter, PJ Gehring. 1,4-Dioxan. II. Results of a 2-year inhalation study in rats. Toxicol appl Pharmacol 30, 287-298. 1974
30. Kasai T, Kano H, Umeda Y, Sasaki T et al. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats. Inhalation toxicology. - Kanagawa, Japan: 21(11): 889-97. 2009, Sep
31. Torkelson TR, BKJ Leong, RJ Kociba, WA Richter, PJ Gehring. 1,4-Dioxan. II. Results of a 2-year inhalation study in rats. Toxicol Appl Pharmacol 30:287-298. 1974
32. Giavini E, Vismara C und Broccia ML. Teratogenesis study of dioxane in rats. Toxicology Letters. 26, 85-88. 1985
33. Argus MF, JC Arcos, C Hochligeti. Studies on the carcinogenic activity of the protein-denaturing agents: hepatocarcinogenicity of dioxane. J Natl Cancer Inst 35, 949-958. 1965
34. Kociba RJ, SB McCollister, C Park, TR Torkelson, PJ Gehring. 1,4-Dioxan. I. Results of a 2-year inhalation study in rats. Toxicol appl Pharmacol 30:275-286. 1974
35. Stickney JA, Sager SL, Clarkson JR, Smith LA, Locey BJ, Bock MJ, Hartung R, Olp SF. An updated evaluation of the carcinogenic potential of 1,4-dioxane. Regul Toxicol Pharmacol. 38:183-95. 2003
36. IARC (Hrsg). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Suppl 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon. 1987
37. IARC, (Hrsg) Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 71; IARC: Lyon, S. 589-602. 1999
38. Kitchin KT, Brown JL. Is 1,4-dioxane a genotoxic carcinogen? Cancer Lett. 53:67-71. 1990
39. Buffler PA, Wood SM, Suarez L, Kilian DJ. Mortality follow-up of workers exposed to 1,4-dioxane. J Occup Med. 20:255-9. 1978

40. Leung HW, Paustenbach DJ. Cancer risk assessment for dioxane based upon a physiologically-based pharmacokinetic approach. *Toxicology letters*. - 51:147-62. 1990
41. Knecht U, Walter D. Persönliche Mitteilung. Gießen, 2012.
42. Breuer D, Eisenhardt A. Ether, cyclisch (1,4-dioxan, Tetrahydrofuran). In: *Messung von Gefahrstoffen*. Berlin. 42. Lfg. V/09. BGIA-Arbeitsmappe. Hrsg BGIA Institut für Arbeitsschutz. 1989
43. Tomicic C, Berode M, Oppliger A, Castelle V, Leyvraz F, Praz-Christianz SM, Danuser B. Sex differences in urinary levels of several biological indicators of exposure: A human volunteer study. *Toxicology Letters* 202: 218-225. 2011
44. Walter D, Helden von F, Knecht U, Drexler H, Göen T. Aktuelle toxikokinetische Daten zur Etablierung eines Biomonitorings für 1,4-Dioxan, *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 47, 122-123. 2012.
45. Dashti-Ardakani M. Human-experimentelle Untersuchungen zur Toxikokinetik von 1,2-Dichlorbenzol nach standardisierten Expositionen. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen. 2007

10. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. J. Schneider, dem Leiter des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin des Zentrums für Ökologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die Förderung dieser Arbeit und die Gewährleistung materieller und personeller Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Dr. D. Walter, der mich über den gesamten Zeitraum sehr gut betreut hat. Allen Mitarbeitern der Arbeitsmedizin Gießen, insbesondere Herrn R. Arhelger, Herrn E. Roth und Herrn PD Dr. Dr. U. Knecht, danke ich für ihre freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei all meinen Freunden, Verwandten und den Mitarbeitern der Arbeitsmedizin Gießen bedanken, die sich als freiwillige Probanden zur Verfügung gestellt haben. Ohne sie hätte diese Arbeit nicht verwirklicht werden können.