

Standardisierte
Humanexperimentelle
Expositionen gegenüber
D-Limonen
zur Bestimmung der
inneren Belastung

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

Vorgelegt von **Claudia Kirschbaum**

aus Marienfeld

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Zentrum für Ökologie
Institut für Arbeits- und Sozialmedizin

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter

Gutachter: Prof. Dr. Menke

Tag der Disputation: 08. Juni 2022

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND AKTUELLER KENNTNISSTAND.....	1
1.1 VORKOMMEN UND VERWENDUNG VON D-LIMONEN	4
1.2. D-LIMONEN	5
1.2.1. <i>Chemische Bezeichnung</i>	5
1.2.2. <i>Chemische und physikalische Eigenschaften</i>	5
1.3 TOXIKOKINETIK DES D-LIMONEN	7
1.3.1. <i>Resorption</i>	7
1.3.2. <i>Verteilung</i>	10
1.3.3. <i>Metabolismus</i>	10
1.3.4. <i>Elimination</i>	11
1.3.5. <i>Wirkung</i>	12
1.3.5.1. <i>Akute Toxizität</i>	13
1.3.5.2. <i>Subakute Toxizität</i>	13
1.3.5.3. <i>Chronische Toxizität</i>	15
1.3.6. <i>MAK-Wert und seine Begründung</i>	16
2.METHODEN UND MATERIAL.....	17
2.1. KOLLEKTIVBESCHREIBUNG	17
2.2. STANDARDISIERTE EXPOSITIONSMETHODE	18
2.3 PROBENGEWINNUNG	20
2.3.1. <i>Luftproben</i>	20
2.3.2. <i>Harnproben</i>	21
2.3.3. <i>Blutproben</i>	21
2.4. ANALYSE-METHODEN.....	22
2.4.1. <i>Analyse der Luftproben</i>	22
2.4.2. <i>Analyse der Blutproben</i>	23
2.4.2.1 <i>Analyse des D-Limonens im Blut</i>	23
2.4.3. <i>Bestimmung von LMN-8,9-OH und LMN-1,2-OH im Harn</i>	26
2.4.4. <i>Kreatininbestimmung</i>	27
3.ERGEBNISSE	29
3.1 ERGEBNISSE DER D-LIMONEN-LUFTKONZENTRATIONEN	29
3.2 LABORERGEBNISSE DES D-LIMONENS IM BLUT	30
3.2.1. <i>LMN-1,2-OH im Blut</i>	31
3.2.2. <i>LMN-8,9-OH im Blut</i>	33
3.3 KONZENTRATIONEN LMN-1,2-OH UND LMN-8,9-OH ALLER PROBANDEN IM HARN	35
3.3.1. <i>Metabolitenkonzentrationen im Harn in [µg/l]</i>	35

3.3.1.1. Konzentrationen LMN-1,2-OH in [$\mu\text{g/l}$].....	35
3.3.1.2. Konzentration LMN-8,9-OH in [$\mu\text{g/l}$].....	39
3.3.2. Metabolitenkonzentrationen unter Kreatininbezug im Harn.....	42
3.3.2.1. Konzentrationen LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin	42
3.3.2.2. Konzentrationen LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin	45
3.4 SUBJEKTIVE SYMPTOME ODER BESCHWERDEN WÄHREND DER EXPOSITION MIT D-LIMONEN.....	51
4. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	52
5. SUMMARY	58
6. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	60
7. LITERATURVERZEICHNIS	63
8. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	68
9. DANKSAGUNG	69

1. Einleitung und aktueller Kenntnisstand

Monoterpene (MTp's) sind für arbeits- und umweltmedizinische Fragestellungen von großem Interesse. Dabei handelt es sich um in der Umwelt weit verbreitete flüchtige, organische Verbindungen. Monoterpene dienen sowohl bei Insekten als auch bei Pflanzen als geruchsintensive Lock- und Abwehrstoffe. Es existieren viele verschiedene Monoterpen-Gruppen. Als für die Gesundheit relevante Umweltchemikalien erregen die Monoterpene mehr und mehr die Aufmerksamkeit des Gesundheitsschutzes sowie der Arbeits- und Umweltmedizin [1]. Dieser Arbeit liegen standardisierte Expositionen mit dem Monoterpen D-Limonen ([4R]-[+]-Limonen, R-Limonen, LMN) zugrunde. D-Limonen ist ein cyclisches Monoterpen und findet Anwendung in der Lebensmittelindustrie, in Kosmetika oder in Dingen für den alltäglichen Bedarf. Limonene (LMN) sind beispielsweise natürlicher Bestandteil von Pflanzen, Pilzen, Gewürzen und Früchten [1]. Sie finden mittlerweile aber auch Anwendung in der Pharmazie [32], zum Beispiel in Medikamenten wie Gelomyrtol®. Diese werden zur Behandlung von bronchialen Infekten eingesetzt. D-Limonen hat ein charakteristisches, nach Zitrusfrüchten duftendes, Aroma und wird aus diesem Grund als günstiger Duftstoff verwendet. Es wird hauptsächlich (bis zu 90 %) aus kaltgepresstem Orangenschalenöl gewonnen [1]. Es zeigt sich eine jährliche weltweite Produktionsmenge von zehn bis 100 kt an D-Limonen [1]. Das Verständnis über den Metabolismus der Monoterpene befindet sich im Wandel. Den ersten Biosyntheseweg beschrieb 1953 Ružička. Er entwickelte die sogenannte „biogenetische Isopren-Regel“, die die chemische Struktur der Terpene, aufgrund analytischer Ergebnisse, erstmalig beschrieb [1, 41]. Diese Erkenntnisse wurden seitdem durch mehrere Studien hinterfragt, korrigiert und weiterentwickelt. Jedoch fehlte bislang ein instrumentelles Verfahren, um biologisches Material, wie zum Beispiel

Blut und Urin, auf bestimmte Abbauprodukte der MTP zu untersuchen. In der INDEX-Studie ermittelte die Europäische Kommission, dass Limonen einen relevanten Schadstoff für die Umwelt darstelle und somit weiter erforscht werden müsse, um Erkenntnisse über die Dosis-Wirkungsbeziehung beim Menschen erhalten zu können. Ohne diese Werte sei es nicht möglich, eine abschließende toxikologische Bewertung durchzuführen [1]. Neuere tierexperimentelle Ergebnisse veranlasste die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG), den geltenden MAK-Wert D-Limonens von 110 mg/m³ auf 28 mg/m³ herunterzusetzen [2]. Es existieren multiple Aufnahmewege für arbeitsmedizinisch-relevante Stoffe, ähnlich dem des D-Limonens. Es kann dermal über die Haut, inhalativ über die Atemwege oder gastrointestinal über den Magen-Darm-Trakt in den Körper gelangen. Mehrere Studien beschäftigten sich mit der Monoterpen-Luftbelastung in Innenräumen und am Arbeitsplatz [42, 16]. Diese reichen jedoch nicht, um die komplexen Abläufe des Monoterpen Metabolismus *in vivo* zu beschreiben.

Seit 2015 existiert ein neues, gaschromatographisches Analyse-Verfahren für Monoterpene (MTP), welches von Schmidt et al. veröffentlicht wurde und somit erstmals ein instrumentelles Verfahren zur Ermittlung von MTPs in biologischem Material bietet [1]. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, die innere Belastung durch Monoterpene, zum Beispiel durch D-Limonen, zu bestimmen. In der Studie wurde gezeigt, dass Monoterpene nach oraler Aufnahme einem hohen hepatischen „First-Pass-Effekt“ unterliegen und somit nur ein geringer Teil der Abbauprodukte unverändert in den Blutkreislauf gelangen. Daraus folgt, dass innerhalb kurzer Halbwertszeiten, von ein bis zwei Stunden, die Metaboliten mit dem Urin der Probanden ausgeschieden werden. Inhalativ aufgenommenes D-Limonen gelangt unverstoffwechselt direkt ins Blut, da der hepatische Kreislauf und der damit im Zusammenhang stehende First-Pass-Effekt umgangen wird.

Hieraus resultieren zwei- bis fünfmal längere Halbwertszeiten als nach oraler Belastung. Zudem wurde in der Studie festgestellt, dass D-Limonen sich, aufgrund seiner unpolaren Struktur, gut, in adipösem Gewebe, verteilt. Es existiert eine allgemeine, homogene Hintergrundbelastung mit Monoterpenen und folglich auch mit D-Limonen [1].

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mittels, standardisierten, humanexperimentellen Studien die innere Belastung mit D-Limonen, bei festgelegter äußerer Belastung, zu messen. Erreicht wird dies durch ein Biomonitoring bestimmter Parameter in biologischem Material (Blut, Urin). Welche Parameter am besten geeignet sind, soll im Folgenden herausgearbeitet werden. Aus dieser Biomonitoring Methode ergibt sich die analytische Kontrollmöglichkeit, Arbeitnehmer über ihr Arbeitsleben vor einer erhöhten Aufnahme von D-Limonen und damit vor einer möglichen berufsbedingten Gesundheitsgefährdung zu schützen. Eine Belastung über ein Arbeitsleben ist durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) definiert, als eine in der Regel tägliche achtstündige Exposition, unter Einhaltung der durchschnittlichen Wochenarbeitszeit von 40 Stunden [40].

1.1 Vorkommen und Verwendung von D-Limonen

D-Limonen ist ein Naturstoff aus der Gruppe der Terpene. Es handelt sich um ein monocyclisches Monoterpen, wobei zwei Enantiomere existieren, das S- und das D-Limonen. D-Limonen kommt in vielen verschiedenen Pflanzen wie Pomeranzenschalenöl, Kümmelöl, Dillöl, Korianderöl, Zitronenöl (zu ~65%) und Orangenöl (> 90%) vor. Sein charakteristischer Zitrusgeruch und sein häufiges Vorkommen erklärt sein Einsatzgebiet als kostengünstiger Duftstoff in der Parfümindustrie. In der Lackindustrie wird D-Limonen vorwiegend als biogenes Lösungs- und Verdünnungsmittel eingesetzt. Zudem entsteht es als Nebenprodukt bei der Orangensaftherstellung [5]. Auch viele Lebensmittel (siehe oben) und Medikamente, wie zum Beispiel Gelomyrtol[®]-Kapseln, die zur Behandlung von Bronchitiden und Sinusitiden eingesetzt werden, enthalten unterschiedliche Mengen an D-Limonen. Die Mengenangaben reichen von 0,4-219 mg/l im Orangensaft bis zu 7000 mg/l in Sellerie bis hin zu 740000-970000 mg/l in Orangenschalenöl [6].

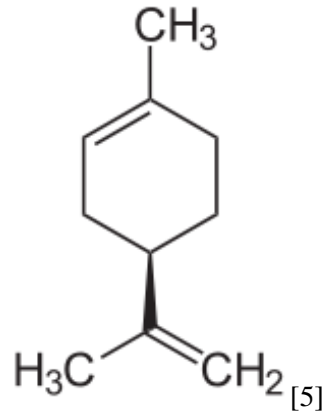
1.2. D-Limonen

1.2.1. Chemische Bezeichnung

D-Limonen

Summenformel: C₁₀H₁₆

Strukturformel:



CAS – Nummer: 5989-27-5

Synonyme:


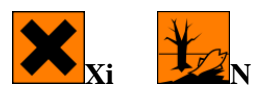
- 1-Methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexen
- Carven
- p-Mentha- 1, 8-dien
- 1-Methyl-4-isopropenyl-1-cyclohexen
- Dipenten
- Kautschin
- Cinen
- Cajeputene

1.2.2. Chemische und physikalische Eigenschaften

Beim D-Limonen handelt es sich um einen Naturstoff aus der Gruppe der Terpene, welcher farblos und brennbar ist und einen charakteristischen zitronenartigen Geruch aufweist. Zudem ist er licht-, luft-, wärme-, alkali- und säureempfindlich. Als Metaboliten entstehen Perillinsäure, Dihydroperillinsäure, LMN-1,2-OH

und Uroterpenol [5]. Die physikalischen Eigenschaften werden in folgender Tabelle aufgelistet [7].

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Gefahrenhinweise von D-Limonen [7]

Molmasse (g/mol)	136,24
Schmelzpunkt (°C)	-89
Siedepunkt (°C)	175
Dampfdruck bei 20°C (hPa (g/ml))	2
Aggregatzustand	flüssig
Flammpunkt (°C)	50
Zündpunkt (°C)	255
Selbstzündungstemperatur (°C)	237
Explosionsgrenzen (Vol%)	0,7-6,1
Geruchsschwelle (mg/m ³)	10
Brechzahl (nD20)	1,4720
Relative Permittivität (ε _r) [20°C]	2,3
Wasserlöslichkeit [20°C]	gering löslich
pKa	-4,2
Wassergefährdungsklasse	2
Verteilungskoeffizient [log POW]	4,5
MAK-Wert (ppm) ¹	5
MAK-Wert (mg/m ³) ¹	28
GHS-Piktogramm	
Gefahrensymbole	
Gefahrenklasse	3, III

¹1 ml/m³ (ppm)= 5,6 mg/m³; 1 mg/m³= 0,18 ml/m³ (ppm)

1.3 Toxikokinetik des D-Limonen

Unter Toxikokinetik werden alle Prozesse zusammengefasst, die mit der Aufnahme (Resorption), der Verteilung im Körper (Distribution), dem Umbau (Metabolismus) und der Ausscheidung (Elimination) eines Gefahrstoffes zu tun haben. Mithilfe dieser Prozesse kann eine Beziehung zwischen äußeren Einflussfaktoren und innerer Belastung hergestellt werden. Die innere Belastung lässt sich über die Konzentration in biologischen Materialien, wie zum Beispiel Blut oder Harn, nachweisen [8].

1.3.1. Resorption

D-Limonen kann dermal, oral oder inhalativ aufgenommen werden [4,5]. Vor allem die inhalative Aufnahme und somit auch die innere Belastung sind von verschiedenen Parametern abhängig. Expositionsdauer und -höhe, Geschwindigkeit der Aufnahme und Elimination, die alveoläre Ventilation und Diffusion sowie der endogene Metabolismus spielen eine entscheidende Rolle. Zudem muss die Löslichkeit des Stoffes in Wasser sowie der Verteilungskoeffizient Blut/Luft bedacht werden [8]. *In vitro* wurde für D-Limonen ein Verteilungskoeffizient Blut/Luft von 42 ermittelt [4]. Die pulmonale Exposition hat die größte Bedeutung [4]. In einer Studie mit acht Probanden wurde bei leichter körperlicher Tätigkeit von 50 Watt eine durchschnittliche inhalative Resorptionsrate von 65 % ermittelt [7]. Die Belastung während der Exposition bestimmt die Aufnahmegeschwindigkeit. Ein Mensch atmet in Ruhe ungefähr acht Liter pro Minute ein, kann das Atemminutenvolumen (AMV) bei Belastung jedoch auf bis zu 30 Liter pro Minute steigern. Daraus resultiert eine erhöhte Aufnahme des jeweiligen Gefahrstoffes [3]. Eine Studie von Falk et al. aus dem Jahr 1991 zeigt, dass die dermale Resorption von unverdünntem D-Limonen um den Faktor zehn geringer ist als die durch inhalative Aufnahme [9]. Die Aufnahme eines Gefahrstoffes über die Haut ist von der Hornschichtdicke, der Durchblutung sowie von

Verletzungen oder eventuellen Schutzmaßnahmen, wie das Tragen von Schutzhandschuhen, abhängig. Zudem spielen chemische Eigenschaften der Stoffe eine Rolle, da hydrophile Stoffe schlechter die Haut penetrieren als lipophile Stoffe. D-Limonen ist in Wasser eher unlöslich und zeigt eine vermehrte Affinität zu fettreichem Gewebe [12]. Dies lässt eine vermehrte dermale Aufnahme vermuten. Doch auch bei zweistündigem Eintauchen einer Hand eines Probanden in 98-prozentiges D-Limonen blieb die Konzentration im Blut unter $0,2 \mu\text{mol/l}$. Allerdings zeigten sich starke lokale hautreizende Reaktionen [9]. Durch diese Studie wurde in Bezug auf das D-Limonen eine hautsensibilisierende Wirkung festgestellt [7]. Weitere Daten in Bezug auf dermale Reaktionen auf D-Limonen existieren in Form von tierexperimentellen Ansätzen mit Mäusen [13]. Nach dem Modell von Fiserova–Bergerova et al. von 1990 errechnet sich hieraus ein dermaler Flux [penetrierende Stoffmenge/Fläche/Zeit] von $0,591 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ bzw. $1183 \text{ mg}/2000 \text{ cm}^2/\text{h}$ für eine gesättigte, wässrige Lösung [10]. Eine weitere Studie nach Guy und Potts (1993) zeigte eine Flux von $0,007 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ bzw. $13 \text{ mg}/2000 \text{ cm}^2$ Hautoberfläche und Stunde [11]. Hinsichtlich der oralen Aufnahme von D-Limonen existieren mehrere Fütterungsstudien mit Mäusen und eine Pilotstudie beim Menschen, bei der das Augenmerk auf dem Metabolismus des Stoffes lag [18]. In der Studie von Lehman-Mc Keeman et al. von 1989 wurden männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten jeweils 0,1; 0,3; 1 und 3 mmol D-Limonen pro Kilogramm Körpergewicht (kgKG), dies entspricht 14, 41, 136 und 409 mg D-Limonen/kg KG, mittels einer Sonde Maiskeimöl verabreicht. Zur Bestimmung der Retention und Proteinbindung wurde den Ratten radiomarkiertes D-Limonen zugeführt. Es zeigten sich Unterschiede in der Konzentration zwischen männlichen und weiblichen Ratten. Nach einem Tag wurde bei den männlichen Ratten eine Zunahme der Bildung hyaliner Tröpfchen in der Niere beobachtet. Diese Zunahme war

von der zugeführten Dosis abhängig. Nach Zugabe von 0,1 mmol radiomarkiertem Isotop C14-D-Limonen/kg KG wurde nach 24 Stunden kein relevanter Unterschied zwischen dem Gehalt an C14 markiertem D-Limonen in den Nieren bei männlichen und weiblichen Tieren beobachtet. Nach der Gabe von 3 mmol C14-markiertem D-Limonen/kg Körpergewicht stieg der Gehalt an C14-D-Limonen jedoch um das Zweieinhalbfache bei den männlichen Tieren an. Auch konnte nur bei den männlichen Ratten mit einer Reverse-Phase-HPLC- und SDS-PAGE-Analyse und einer Massenspektroskopie die Bindung von D-Limonen, den Metaboliten D-Limonen-1,2-oxid und D-Limonen-1,2-diol an Alpha-2u-Globulin in den Nieren nachgewiesen werden. Bei den weiblichen Tieren waren sechs Prozent der C14-Isotope an Proteine gebunden, wohingegen es bei den männlichen Ratten bis zu 40 Prozent waren [14]. Die Pilotstudie der oralen Belastung am Menschen brachte hervor, dass nach Aufnahme von 100 mg D-Limonen/kg KG, gelöst in Vanillesoße, D-Limonen nur in sehr geringem Maße im Blut nachgewiesen werden konnte. Die fünf Frauen und zwei Männer, die an dieser Studie teilnahmen, wurden eine Woche nachbeobachtet. In dieser Phase traten keine toxischen Effekte auf und auch die bestimmten Blutwerte blieben jeweils im Normbereich (Harnstoff-Stickstoff, Kreatinin, Calcium, Magnesium, Phosphor, Harnsäure, Cholesterin, Gesamtprotein, Albumin, Gesamtbilirubin, g-Glutamyltranspeptidase, alkalische Phosphatase, Aspartataminotransferase, Lactatdehydrogenase) [15].

1.3.2. Verteilung

Monoterpene, wie das D-Limonen, verteilen sich leicht im Blut. Bereits nach einer Stunde ist die maximale Blutkonzentration von D-Limonen und seinen Metaboliten erreicht [15]. Zudem besteht eine hohe Affinität zu fettreichem Gewebe, wo es sich bevorzugt anlagert [17]. In einer Studie nach Crowell wiesen nach 24 Stunden nach Dosierung des Limonens das Fett-, Brust-, Nieren- Nebennieren- und Lebergewebe besonders hohe Konzentrationen an D-Limonen und seinen Metaboliten auf [18,19]. Dies unterstreicht die Lipophilie des D-Limonens.

1.3.3. Metabolismus

Der Metabolismus des D-Limonens ist noch nicht vollständig aufgeklärt. D-Limonen wird in Perillinsäure, Dihydroperillinsäure, Limonen-1,2-diol und Uroterpenol im Organismus umgewandelt. D-Limonen wirkt dermal reizend. Seine Oxidationsprodukte (*D*)-Carvon und mehrere Isomere des Limonenoxid, die aus Limonen oxidativ entstehen, können allergieauslösend wirken [20]. Als ein Hauptmetabolit wurde dabei bereits 1974 im Harn das Limonen-8,9-OH identifiziert [21]. Nach oraler Belastung eines Probanden mit 75 mg D-Limonen in Form einer magensaftresistenten Kapsel, konnte zudem ein weiterer Hauptmetabolit als Indikator für die Verstoffwechslung des Limonens gefunden werden. Dabei handelt es sich um das Limonen-1,2-OH (LMN -1,2-OH) [1]. Die nachfolgende Abbildung (Abb.1) soll die wichtigsten vermuteten Metabolisierungswege des Limonens in LMN-8,9-OH und LMN-1,2-OH verdeutlichen.

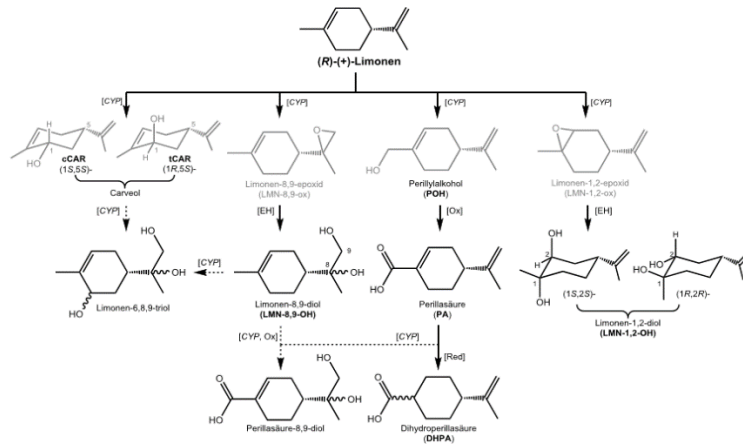


Abbildung 1: Derzeitiger Kenntnisstand von D-Limonen zu seinen Metaboliten LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH [21]

1.3.4. Elimination

Unter Elimination wird die Ausscheidung eines Stoffes aus dem Organismus verstanden. Für das D-Limonen wurden sowohl tierexperimentelle Ansätze als auch Expositionen beim Menschen durchgeführt, um Erkenntnisse über die Ausscheidung aus dem Körper zu gewinnen. So versetzten Lehman et al. 1991 F344 Ratten und B6C3F1 Mäusen mit 500 mg C14-markiertem D-Limonen /kg KG über eine Sonde. Nach einem Tag wurden die Nieren den Tieren entnommen und untersucht. Bei den männlichen Ratten fanden sich $12,2 \pm 0,6$ mg/d Alpha-2u-Globulin, bei der weiblichen Ratte konnte kein Alpha-2u-Globulin nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob ein relevanter Unterschied zwischen dem Metabolismus des Limonens bei Mäusen und Ratten existiert. Die Maus scheidet ein dem Alpha-2u-Globulin der Ratte sehr ähnliches Protein mit dem Urin aus, die männliche Maus zeigte dabei ebenfalls höhere Werte ($14,88 \pm 0,99$ mg/d) als die weibliche Maus ($2,65 \pm 0,45$ mg/d). Die Frage, warum es keine analoge Nephropathie durch D-Limonen bei Mäusen geschlechterunabhängig und weiblichen Ratten gibt, wurde damit beantwortet, dass das D-Limonen und sein Metabolit D-Limonen-1,2-oxid im Urin nicht an Proteine der weiblichen Ratte

sowie der weiblichen und männlichen Maus bindet. Folglich kann keine Nephropathie bei diesen Tieren entstehen [14]. In tierexperimentellen Studien zeigte sich, dass die Metaboliten des D-Limonens hauptsächlich über den Harn (60-90 %) und nur in geringen Mengen durch Faeces und Abatmung (2 %) ausgeschieden werden. Der Zeitraum der Ausscheidung erwies sich mit 24 Stunden (Ratte) bzw. bis zu 72 Stunden (Kaninchen) als relativ kurz [21].

1.3.5. Wirkung

In einer Inhalationsstudie von Falk-Filipsson 1993 mit D-Limonen in Konzentrationen von 10, 225 und 450 mg/m³ traten bei keinem der Exponierten Beschwerden, Irritationen oder negative Effekte am zentralen Nervensystem auf [16]. Jedoch wurde nach Exposition der höchsten Konzentration eine statistisch signifikante Abnahme um ca. 20 % der Vitalkapazität, im Vergleich zu den Werten nach 10 mg/m³, beobachtet. Bei 225 mg D-Limonen/m³ wurden keine Veränderungen bezüglich der Lungenfunktionsparameter festgestellt [16]. Nach lokalem Kontakt mit D-Limonen in Konzentrationen von acht Prozent zeigten die 25 untersuchten Probanden nach Exposition keine Hautreizungen. Dabei wurde ihnen das D-Limonen per Okklusionsverband auf die Haut aufgetragen. Jedoch zeigten 9 von 13 Probanden nach bereits 10 bis 30 Minuten Hauterscheinungen nach Exposition gegenüber unverdünntem D-Limonen. Aus diesem Grund wurde D-Limonen eine sensibilisierende Wirkung auf die Haut zugeschrieben [22]. Einige Studien bezogen sich nicht auf den reinen Stoff D-Limonen, sondern auf oxidierte Gemische. Die positiven sensibilisierenden Ergebnisse, sowohl beim Menschen als auch in tierexperimentellen Ansätzen, erklärt die Markierung des Limonens mit Sh in der MAK-Wert-Liste der Deutschen Forschungsgesellschaft. Hinweise auf Atemwegirritationen finden sich in der Literatur nicht [4]. Neuere Untersuchungen schreiben dem D-

Limonen protektive Wirkung in Bezug auf die Brustkrebsentstehung zu [19].

1.3.5.1. Akute Toxizität

Unter der akuten Toxizität versteht man die schädigenden Einflüsse eines Stoffes, die innerhalb eines kurzen Zeitraumes, dies umfasst in der Regel 14 Tage, nach einmaliger Aufnahme, hier des D-Limonens, auftreten. Im Folgenden werden die inhalative, dermale und orale akute Toxizität des D-Limonens unterschieden. Larsen et al. untersuchten 26-28 BALB cA Mäuse nach Dampfexposition mit 197-1599 ml D-Limonen /m³ auf verändertes Atemminutenvolumen, Respirationsrate und mittlere ausgeatmete Flussrate. Dabei fand sich ein RD 50 Wert nach 30 Minuten von 1163 ml/m³. Bis zu einer Grenze von 629 ml/m³ blieb das Atemvolumen unverändert. Darüber hinaus jedoch nahm das Atemminutenvolumen zu. Es wurde ein NOEL Wert von 900 bis 1600 ml/m³ angegeben [39]. NOEL steht für No Observed Effect Level und beschreibt „die Dosis eines Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Wirkungen hinterlässt.“ [23]. In einem Versuch nach Applikation von D-Limonen auf Kaninchenhaut, ließ sich eine dermale LD 50 von > 5 g/kg ermitteln [24]. Bei oral aufgenommenem Limonen, in Form von 20 g Kapseln, klagten alle fünf männlichen Probanden über unblutige Durchfälle und Krämpfe. Die Funktionsprüfungen der Leber, Nieren und des Pankreas ergaben jedoch keine nennenswerten Veränderungen. Lediglich in den Harnanalysen zeigte sich eine vorübergehend leicht erhöhte Proteinurie [15].

1.3.5.2. Subakute Toxizität

Die subakute Toxizität beschreibt die Toxizität eines Stoffes bei länger andauernder, jedoch nicht dauerhafter Exposition durch einen Gefahrstoff. Hierfür sind vor allem die Experimente an

Tieren relevant. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurden Mäuse und Ratten täglich über das Futter verschiedenen D-Limonenkonzentrationen ausgesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass bei den höheren Konzentrationen (150, 500 bis zu 1000 mg/kg KG) bei 32 von 50 Tieren mehrkernige Leberzellen (Hepatozyten) auftraten. Bei den männlichen Mäusen war zudem das Körpergewicht um 5 bis 15 % vermindert. Daraus resultierte ein NOAEL von 250 mg/kg KG und Tag. NOAEL steht für No Observed Adverse Effect Level und bedeutet „Die Dosis eines Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Schädigungen hinterlässt“ [23]. Bei den weiblichen Ratten stellte sich heraus, dass sich die Überlebenszeit nach 104 Wochen enorm verringerte. Somit wurde ein NOAEL von 300 mg/kg KG und Tag bei der weiblichen Ratte ermittelt [26]. Nach Webb et al. lässt sich ein NOAEL von 100 mg/kg KG ableiten. In dieser Studie wurden jeweils fünf männliche und weibliche Beagle Hunde sechs Monate lang per Schlundsonde null, 100 oder 1000 mg D-Limonen/kg KG ausgesetzt. Dies war die Höchstgrenze, die zu verabreichen möglich war, bevor es bei den Tieren zum Erbrechen kam. Je nach Dosis war das Leber- und Nierengewicht erhöht. Es zeigten sich jedoch keine histopathologischen Veränderungen. Eine Nephropathie, wie sie bei den männlichen Ratten zu beobachten war, fand sich bei den Hunden nicht. Die Blutwerte alkalische Phosphatase und Cholesterin waren um 35 % angestiegen [25]. Ein weiterer Versuch beschäftigte sich mit den Auswirkungen des D-Limonen auf das Leber- und Nierengewicht. Dabei erhielten je zehn männliche (75 und 300 mg D-Limonen/kg KG) und weibliche (150 und 600 mg) F344-Ratten jeden Tag, an fünf Tagen die Woche, oral D-Limonen. Der Zellumsatz war um mehr als 200 % gegenüber dem Kontrollwert erhöht und bereits nach einer Woche nahm die Bildung hyaliner Tröpfchen und Alpha-2u-Globulinprotein in der männlichen Rattenniere zu. In der

Leber fiel eine Erhöhung des Cyp P450 und des Zellumsatzes auf. Es wurde keine Wirkung auf die Schilddrüse beobachtet [27].

1.3.5.3. Chronische Toxizität

Die chronische Toxizität beschreibt, ebenso wie die subakute Toxizität, den Einfluss eines Stoffes auf den Organismus nach mehrmaliger Exposition und über einen längeren Zeitraum. Bei einem chronischen Versuch an rasierter Rattenbauchhaut wurde dieser dreimal pro Tag mit D-Limonen bestrichen und getrocknet. Es bildeten sich ekzemartige Veränderungen an den Bauchfalten, die sich nach und nach ausbreiteten. Nach weiteren Expositionen entwickelten sich dicke Krusten und Borken. Eine Heilung stellte sich nach Absetzen des D-Limonens nach acht Tagen ein [22]. Bezüglich einer kanzerogenen Wirkung des D-Limonens wurden mehrere Studien durchgeführt. Während einer 17-wöchigen Exposition von 25 weiblichen Mäusen mit 0,63 prozentigen D-Limonen zeigte sich, dass D-Limonen einen protektiven Effekt auf die Ausbildung von Lungentumoren hat. Den Tieren wurde nach einer Woche zusätzlich 10 mmol 4-Methylnitrosamin-3pyridyl-1-butanon (NNK) in 0,1 ml Salzlösung intraperitoneal injiziert. Die Kombination mit D-Limonen senkte die Rate an Lungentumoren von 8,1 nach alleiniger Gabe von NNK auf 2,4 nach Kombinationsgabe. Jedoch zeigte D-Limonen isoliert keinen auffälligen Effekt auf die Lungentumorinzidenz [31]. Eine weitere Arbeit untersuchte die Auswirkung von D-Limonen-Gaben auf Magentumoren. Auch hier zeigte sich ein eher positiver Effekt auf die Magentumorinzidenz, wobei jedoch eine D-Limonen-Gabe allein keinen Einfluss hatte [32]. Hinsichtlich Prä- und Postnatalstudien stellte man für D-Limonen keine teratogene Wirkung beim Kaninchen fest. Es wurde ein NOAEL für die mütterliche Toxizität von 250 mg/kg KG und ein für die Entwicklungstoxizität mit 1000 mg/kg KG-Wert angegeben [33].

Mehrere genotoxische *in vitro* Untersuchungen legten dar, dass D-Limonen und auch sein Metabolit D-Limonen-1,2-oxid als nicht genotoxisch zu werten sind (Fellfleckentest 1989) [34].

1.3.6. MAK-Wert und seine Begründung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die akute Toxizität für den Menschen als gering einzustufen ist. Eine Hautirritation gilt als wahrscheinlich, ist aber in keiner humanen Langzeitstudie dokumentiert. Die Tests bezüglich Genotoxizität des D-Limonens sind negativ. Es wurden zwar im Fellfleckentest mutagenitätsmindernde Eigenschaften festgestellt, jedoch zeigten andere tierexperimentelle Studien, dass je nach verabreichter Dosis, irritative Wirkungen auf Lunge, ZNS und Verdauungstrakt auftreten können [4]. Die Auslösung von Nierentumoren bei der männlichen Ratte in Gegenwart des Alpha-2u-Globulin war Gegenstand mehrere Untersuchungen [19,33]. Hier stellten Swenberg und Lehman-McKeeman 1999 heraus, dass für das D-Limonen und seinen Metaboliten D-Limonen-1,2-oxid keine genotoxische Aktivität aufgrund der Evaluierung der *in vitro* und *in vivo* Daten vorliegt [30]. Es wurde nachgewiesen, dass D-Limonen und D-Limonen-1,2-epoxid reversibel an Alpha-2u-Globulin binden und so ein Komplex entsteht, der sich im proximalen Tubulus der Niere sammelt und zu einer Nephropathie, beziehungsweise bei chronischer Exposition bei männlichen Ratten, zu Hyperplasien, Adenomen und Adenokarzinomen in der Niere führen [26]. All diese Studien zeigten, dass der kanzerogenen Wirkung auf die Niere ein über Alpha-2u-Globulin vermittelter Mechanismus zugrunde liegt. Dieser Mechanismus ist jedoch für den Menschen nicht relevant. Aus diesem Grund erklärt sich die fehlende Einstufung des D-Limonens in eine Kanzerogenitäts-Kategorie [4]. Als Grundlage der Feststellung eines MAK-Wertes werden tierexperimentelle Studien und Kurzzeitstudien am Menschen

herangezogen. Bei einer zweistündigen Exposition mit 10 und 225 mg/m³ wurden keine Reizerscheinungen oder Veränderungen der Vitalkapazität beim Menschen gesehen. Durch die tierexperimentellen Daten konnte ein NOAEL von 30 mg/ kg Körpergewicht ermittelt werden, dies würde bei 10 m³ Atemvolumen, 8 Stunden und einem Körpergewicht von 70 kg einem MAK-Wert von 37,8 ml/m³ (210 mg/m³), entsprechen. Erst ab 450 mg/m³ wurde eine Abnahme der Vitalkapazität verzeichnet. Mit einem Sicherheitsfaktor von 2 wurde ein MAK-Wert von 20 ml/m³ festgesetzt [4]. D-Limonen gilt, bei Einhaltung des MAK-Wertes, in der Schwangerschaft als nicht gefährlich und wird so der Schwangerschaftsgruppe C zugeordnet [4]. 2012 wurde der MAK-Wert, aufgrund neuer tierexperimenteller Ergebnisse, weiter auf 28 mg/m³ (5 ml/m³) gesenkt [1].

2.Methoden und Material

2.1. Kollektivbeschreibung

Es wurden 20 freiwillige und gesunde Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 24 Jahren gegenüber D-Limonen exponiert. Darunter befanden sich sechs Männer und vierzehn Frauen. Zwei der Probanden waren Raucher. Die Probanden wurden im Vorfeld mittels Aufklärungsblattes und im persönlichen Gespräch über den Expositionsverlauf und Vorkommen, sowie Toxizität und Reizwirkung des D-Limonens, informiert. Keiner der Freiwilligen stand unter Einfluss von Drogen, Medikamenten oder war berufsbedingt vermehrt D-Limonen ausgesetzt. Zudem war es den Probanden untersagt, während der Exposition und in der 24-stündigen Urinsammelperiode Alkohol zu konsumieren. Es wurde explizit darauf hingewiesen, dass möglichst keine limonenhaltigen Pflegeprodukte zu benutzen sind. Ebenso wurde auf die Einnahme limonenhaltiger Medikamente verzichtet. Alle

Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie [8].

2.2. Standardisierte Expositionsmethode

Die Expositionen fanden in einer 17 m³ großen mit Aluminiumfolie ausgekleideten Kammer statt. Das Aluminium dient dazu, die Adsorptionseffekte des D-Limonens möglichst gering zu halten. Um eine Exposition an einem Arbeitsalltag möglichst realistisch nachzubilden, wurden die Freiwilligen in einem Zeitraum über acht Stunden dem D-Limonen inhalativ ausgesetzt. Nach vier Stunden Exposition folgte eine Pause von einer halben Stunde, in der die Probanden die Kammer verlassen und essen durften. In der restlichen Zeit war es den Probanden untersagt, in der Kammer zu essen oder zu schlafen. Somit sollte eine orale Aufnahme des D-Limonens und ein zu geringer Stoffwechsel möglichst vermieden werden. Als Ausstattung in der Kammer standen den Probanden ein Stuhl, ein Tisch, ein Ventilator, ein Fahrradergometer sowie ein Telefon zur Kommunikation, zur Verfügung. Blickkontakt zur Aufsichtsperson war durch eine Scheibe gegeben. Zur Verdampfung des D-Limonens diente eine Heizplatte. Der Ventilator sorgte während der gesamten Expositionsdauer für eine gleichmäßige Verteilung des D-Limonens in der Expositionskammer. Um eine körperliche Arbeitsbelastung zu simulieren, wurden die Probanden in verschiedene Belastungsgruppen eingeteilt. Sieben Probanden verbrachten die Expositionszeit in Ruhe ohne Belastung, eine Fünfergruppe leistete zehn Minuten/h 50 Watt und sechs Probanden leisteten 75 Watt innerhalb der 10 min/h auf dem Fahrradergometer. Es wurde bei allen Expositionen ein MAK-Wert von 28 mg D-Limonen/m³ (5 ppm) angestrebt. Die Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-

Universität Erlangen (Antragsnummer 4457) sowie von der Justus-Liebig -Universität Gießen (Antragsnummer 63/96) liegt vor.

Tabelle 2: Anzahl der Probanden bei verschiedenen Belastungsgraden (Fahrradergometer je 10 Minuten/h) [28]

Anzahl der Probanden	Geleistete Arbeit
[n]	[Watt]
7	0
5	50
6	75



Abbildung 2: Beispielhafte Exposition in einer Expositions-kammer mit Fahrradergometer und Ventilator [38].

2.3. Probengewinnung

Die Konzentration an D-Limonen und seiner Metaboliten wurde auf verschiedene Arten dokumentiert. Über kommerzielle Absorptionsröhrchen Typ B der Fa. Dräger, Werk Lübeck, wurden die D-Limonen-Konzentrationen kontinuierlich in der Kammer gemessen. Nach den ersten vier Stunden erfolgte bei jedem der 20 Probanden eine Blutentnahme, eine weitere erfolgte nach der gesamten Expositionsdauer von achteinhalb Stunden. Zudem sammelten alle Exponierten nach Expositionsbeginn über mindestens 24 Stunden Harn. Die gesammelten biologischen Materialien wurden auf D-Limonen und seine Metaboliten LMN-8,9-OH und LMN-1,2-OH untersucht.

2.3.1. Luftproben

Über den gesamten Expositionszeitraum lag die Luftkonzentration an D-Limonen in Höhe des MAK-Wertes von 28 mg/m^3 (5 ppm). Im Vorfeld wurde die benötigte Temperatur zur Verdampfung experimentell ermittelt. Anhand des Raumvolumens von 17 m^3 und des einzustellenden MAK-Wertes von 28 mg/m^3 wurde die D-Limonen-Menge berechnet. Zur Bestimmung der Luftkonzentration an D-Limonen wurde über die Dauer der Exposition die Raumluft mit einer konstanten Geschwindigkeit von $0,33 \text{ L/min}$ über eine Pumpe (Typ PCXR8, Fa. SKC, Pennsylvania) durch ein Aktivkohleröhrchen (AKR), Typ B der Fa. Dräger, Lübeck, geleitet [30]. Die Lagerung der Aktivkohleröhrchen erfolgte luftdicht verpackt bei Raumtemperatur am Ende des Expositionszeitraumes. Zur Ermittlung der Luftbelastung wurden die gemessenen Luftkonzentrationen des D-Limonens auf das Verteilungsvolumen der Expositionskammer (17 m^3) umgerechnet. So ergab sich die Konzentration bezogen auf einen Kubikmeter [8].

2.3.2. Harnproben

Jeder der 20 Probanden sammelte nach Exposition über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden Harn in einem Messgefäß, füllte davon ein Aliquot von ~50 bis 80 ml in einzelne Probengefäße ab und beschriftete sie mit Datum, Uhrzeit und Gesamtvolumen. Die abgefüllten Proben wurden bis zur Analyse im Labor bei -20° C eingefroren. Dieses Sammelverfahren wurde bei allen Harnproben gleichermaßen durchgeführt [8].

2.3.3. Blutproben

Nach den ersten vier Stunden Exposition wurde zu Beginn der Pause allen 20 Probanden ~7 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen entnommen. Eine weitere Blutentnahme erfolgte nach Abschluss der Exposition, folglich nach achtstündiger inhalativer Belastung mit D-Limonen. Das Blut wurde ebenfalls bis zur Analyse eingefroren.

2.4. Analyse-Methoden

2.4.1. Analyse der Luftproben

Die gaschromatische Analyse der D-Limonen-Raumluftproben erfolgte anhand eines neu entwickelten Analyse-Verfahrens.

Probenvorbereitung: Die beiden Aktivkohlephasen des Sammelröhrchens wurden getrennt in zwei 20 ml Headspace Gläschen gefüllt, mit 10 ml Schwefelkohlenstoff versetzt und luftdicht verschlossen. Es erfolgte eine einminütige Vermischung auf dem Vortexer. Anschließend wurden die Extraktionen der Aktivkohle, welche auf dem Taumel-Rollenmischer innerhalb von zehn Minuten entnommen wurden, direkt der GC-FID zugeführt und gemessen.

Einstellungen am GC-FID:

Säule:	HP - VOC (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 90 m x 1,2 µm x 0,32 µm Fluss: 2 ml/min
Trägergas:	Helium
GC - Ofen Programm:	45 °C - 5 Min 10 °C - 5 Min --> 90 °C/min 25 °C - 2 Min --> 220 °C/min
Injektionsvolumen:	2 µl
Split - Fluss:	30 ml/min
Liner:	4mm ID, 900 µL Volumen
Inj. - Temperatur:	230°C
FID - Temperatur:	300°C

Zur Bestimmung der Desorptionsausbeute wurden Ansätze, mittels der internen Stammlösung LMN II [C1], Schwefelkohlenstoff und reiner AKR-Adsorptionsschicht, versetzt. Daraus ergab

sich die Desorptionsausbeute, die zur Berechnung der Analyseergebnisse herangezogen wurde. Über eine Gleichung wurde der LMN-Gehalt (c LMN, in mg/l) der Raumluft in Doppelbestimmung analysiert. Dies wurde durch die Kalibrierlösung, Schwefelkohlenstoff (84-1680 mg/l), möglich. Dessen Mittelwert der Peakflächen wurde gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Die erhaltene lineare Kalibrierfunktion ergab die Raumluftkonzentration an Limonen. [1]

2.4.2. Analyse der Blutproben

2.4.2.1 Analyse des D-Limonens im Blut

Gaschromatographische Analyse von D-Limonen im Blut

Messprinzip: „Headspace GC-MS (HS-GC-MS) + System aus Perkin-Elmer Turbo Matrix + 40 Trap HS - Autosampler + Agilent 7890A Gastomatograph + Agilent 5975 C Massenspektrometer mit eingebauter Ionenquelle zur Elektronenstoß-Ionisierung (EI)“

Probenvorbereitung: Zur Analyse wurden 2 ml Vollblut aus den EDTA-Monovetten entnommen und in 20 ml große, mit Stickstoff ausgeblasene HS-Vials eingebracht und gasdicht verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur aufgetaut waren, wurde die Analyse per HS-Autosampler durchgeführt.

Einstellungen am Gerät (Headspace - GC- MS):

HS-Autosampler:

Temp. Ofen:	50 °C	60Min/Probe
Temp. Nadel:	70 °C	
Injektion:	0,04 min	16,5 psi

Temp. Transferleitung: 110 °C

Säule:	Agilent Technik VF - 624 ms 60 m x 320 µm x 1,8 µm + 5m Vorsäule Fluss: 1,2 ml/min
Trägergas:	Helium
GC - Ofenprogramm:	45 °C - 5 Min 190 °C - 3 Min --> 10 °C/min 220 °C - 5 Min --> 25 °C/ min
Injektionsvolumen:	Verhältnis 5:1
Splitfluss:	6 ml/min
Inj. Temp.:	230 °C
Temp.	
Transferleitung:	260 °C
Detektor:	
Ionenquelle:	Elektronenstoß- Ionisierung (EI) 230 °C
Solvent - Delay:	12 min
Q - Temp.:	150 °C
Modus:	SIM
Quantifier - Ion:	m/z 136
Qualifier - Ionen:	m/z 93; 68

Es wurde für jedes Analysat ein Quantifier-Ion zur Bestimmung der Menge und zwei Qualifier-Signale für die jeweilige Bestimmung herangezogen [1].

2.4.2.2 Analyse der D-Limonen-Metaboliten LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH im Blut

Gaschromatographische Analyse der Metaboliten LMN 1,2-OH und LMN-8,9-OH im Blut: „Agilent 7000A Series Triple Quadrupole GC-MS (Agilent 7890A Gaschromatograph mit Multimode Inlet (MMI), Agilent AS 7693 Autosampler, Agilent 7000 A Series EL/CL Mainframe + eingebauter Ionenquelle).“

Probenaufarbeitung: Für die Bestimmung der Metaboliten wurden 4 ml aufbereitetes Probenmaterial, die Analyseprobe versetzt mit Kalibrierlösung, Wasser als Qualitätskontrolle, 1800 µl Natriumacetatpuffer (pH 5; 1M), zehn µl I Std-Arbeitslösung [C2] und 20 µl β-Gucuronidase/Acylsulfatase vermischt und für mindestens zwölf Stunden bei 37 °C im Inkubator temperiert. Zur Qualitätssicherung diente jeweils eine Leerwertprobe mit Wasser anstelle von Blut. Nachdem die Hydrolyse stattgefunden hatte, wurde das Produkt derivatisiert. Dieses Extrakt wurde anschließend direkt im GC-PCI-MS/MS vermessen.

Einstellungen am GC-PCI-MS/MS:

Säule:	ZB - 5 ms Phenomenex 30 m x 250 µm x 0,25 µm + 5 m Vorsäule Fluss: 1,2 ml/min
Trägergas:	Helium
GC - Ofenprogramm:	90 °C - 1 Min 135 °C - 0 Min --> 6 °C/min 170 °C - 0 Min --> 15 °C /min 300 °C - 4 Min --> 40 °C /min
Injektor:	
Temop. Inj.:	250 °C
Modus:	pulsed splitless 50 psi 1 Min
Splitless Zeit:	1, 0 min
Inj. Volumen:	3 µl
Liner:	4mm ID single taper Glaswolle, 900µl Volumen
Temp.	
Transferleitung:	280 °C
Detektor:	
Ionenquelle:	positive chemische Ionisierung (PCI) 250 °C
Reaktand - Gas:	20 % Methan 5.5

Q1-Temp.:	150 °C	
Q3-Temp.:	150 °C	
Modus:	MRM	
Kollisionszelle Q2:		
Quench-Gas:	2,3 ml/min	Helium
Kollisions-Gas:	1,5 ml/min	Stickstoff

Nachdem die Analysate am Gaschromatographen getrennt wurden, wurde jeweils ein Quantifier- sowie ein Qualifier-Massenübergang festgestellt und gemessen.

Aus diesen Ergebnissen ließen sich die Metabolitenkonzentrationen im Blut kalkulieren.

2.4.3. Bestimmung von LMN-8,9-OH und LMN-1,2-OH im Harn

Gaschromatographische Bestimmung der D-Limonen Metaboliten im Harn mittels GC-PCI-MS/MS.

Probenaufbereitung: Es wurden 4 ml Harnmaterial, welches aus der Analyseprobe, einer Kalibrierlösung, der Qualitätskontrolle, Wasser, 400 µl Natriumacetatpuffer (pH 5; 1 Mol), 10 µl I Std-Arbeitslösung [C2] und 20 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase besteht, in einem 8 ml großen Probengefäß gemischt und bei 37 °C für wiederum mindestens zwölf Minuten inkubiert. Nach erfolgreicher Hydrolyse wurde der Probe 50 µl 25 %-ige wässrige Salzsäurelösung (HCl) hinzugefügt. Die Extrakte wurden dann auf eine SSLLE-Säule überführt. Die Derivatisierung erfolgte unter einem Stickstoffstrom. Die so entstandenen Extraktionen in Isooctan konnten direkt im GC-PCI:MS/MS gemessen werden. Die Einstellungen am Gerät entsprechen denen unter 2.4.2.2 [1].

2.4.4. Kreatininbestimmung

Zur Kreatininbestimmung wird die Jaffé-Methode angewandt. Dabei handelt es sich um ein standardisiertes analytisches Verfahren, welches auf dem Prinzip der Photometrie in Mikrotiterplatten beruht [36].

Die zu untersuchenden Harn-Proben wurden auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt, mit alkalischer Pikrinsäurelösung versetzt und auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Es bildete sich nach 45 Minuten Reaktionszeit ein orange-rotes Kreatinin-Pikrat-Reaktionsprodukt, dessen Absorption bei einem Absorptionsmaximum von 494 nm und einer Temperatur von 37 °C gemessen werden konnte [1]. Kreatinin, ein Nebenprodukt im Eiweißstoffwechsel, wird glomerulär in der Niere filtriert und beinahe vollständig mit dem Harn ausgeschieden. Als Durchschnittswert der Kreatininausscheidung gilt bei gesunden, normgewichtigen Erwachsenen im Alter zwischen 30-60 Jahren ein Wert von 1,0 g und 1,6 g Kreatinin pro Tag. Jedoch sind diese Bezugswerte nicht immer verwertbar, da die Kreatininausscheidung abhängig ist von Muskelmasse, Ernährung, Medikamenten- und Drogeneinnahme sowie Alkoholkonsum. Bei Werten unter 0,5 g/l sowie über 2,5 g/l sollten die Kreatininwerte zur Ermittlung der Ergebnisse für Metaboliten von Schadstoffen im Harn nicht mehr herangezogen werden.

Probenaufbereitung: Tiefgefrorene Harn-Proben wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur erwärmt, davon 20 µl Harn mit 980 µl bidestilliertem Wasser im Zentrifugenröhrchen gemischt, verschlossen und geschüttelt. Bei 6000 U/min wurde die Probe für fünf Minuten zentrifugiert. Es erfolgte eine photometrische Vermessung der Proben an einem Plattenlesegerät.

Einstellungen am Gerät:

Messtyp:	Absorption
Messwellenlänge:	492 nm
Messrichtung:	Spaltenweise
Anzahl Messungen:	50 pro Probe
Vorschütteln der Platte:	
Dauer:	60 Sekunden
Modus:	kreisförmig
Intensität:	normal
Absetzphase:	10 Sekunden
Temperatur:	36 °C ± 0,5 °C

„Die Absorptionen des 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" [37].

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der D-Limonen-Luftkonzentrationen

Die D-Limonen-Luft-Konzentrationen aller Probanden sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Dabei werden die Ergebnisse einmal in absolut in mg/ m³ sowie als prozentualer Anteil des MAK-Wertes in Höhe von 28 mg/m³ aufgeführt. Die mittlere Luftkonzentration der 15 Luftproben beträgt 83,47 % des MAK-Wertes mit einer Abweichung von $\pm 8,5$ mg/m³ um den Mittelwert.

Tabelle 3: Durchschnittliche Luftkonzentration in der Expositionskammer nach achtstündiger Exposition gegenüber D-Limonen

Proband [n]	Luftkonzentration [mg/m ³]	Luftkonzentration [% MAK Wert]
6	15,0	53
7	14,5	52
8	18,0	64
9	22,9	82
10	13,2	47
11	18,0	64
12	19,9	71
13	19,3	69
14	21,2	76
16	27,0	96
17	33,0	118
18	28,0	100
19	28,0	100
20	28,0	100
21	46,0	160
Arithmetisches Mittel	25,3	84

3.2 Laborergebnisse des D-Limonens im Blut

D-Limonen wird schnell im menschlichen Organismus metabolisiert [1]. Die Exposition mit $25,32 \pm 8,5$ mg/m³ D-Limonen führt zu einem Konzentrationsanstieg im Blut und Harn der Probanden. Dabei lässt sich feststellen, dass bei allen Belastungsgruppen ein leichter Anstieg der Konzentrationen zu verzeichnen ist. Die nachfolgenden Tabellen zeigen jeweils die Konzentrationen im Blut von D-Limonen, vergleiche Tabelle 4, sowie dessen Metaboliten LMN-1,2-OH, siehe Tabelle 5, und LMN-8,9-OH, siehe Tabelle 6, in µg/l nach vier beziehungsweise achteinhalb Stunden Exposition mit D-Limonen.

Tabelle 4: D-Limonen-Konzentrationen der Blutproben aller Probanden in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Belastung [W]	Proband [Nr.]	D-Limonen Nach 4 h Belastung 1.Expositionsphase [$\mu\text{g/l}$]	D-Limonen Nach 8,5 h Belastung 2.Expositions- phase [$\mu\text{g/l}$]
0	1	12	18
0	2	10	9
0	3	6	8
0	4	9	5
0	5	14	10
0	6	10	11
0	7	15	8
0	8	18	29
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		12	12
50	9	16	19
50	10	17	10
50	11	16	14
50	12	12	18
50	13	16	28
50	14	20	28
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		16	20
75	15	15	14
75	16	16	14
75	17	15	17
75	18	13	23
75	19	21	27
75	20	19	21
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		17	19

3.2.1. LMN-1,2-OH im Blut

In Tabelle 5 zeigt sich ein Anstieg der LMN-1,2-OH Konzentration im Blut über die verschiedenen Belastungsgruppen. Ohne körperliche Belastung auf dem Fahrradergometer liegt der Mittelwert nach vier Stunden bei $15,8 \mu\text{g/l}$, unter 50 Watt Belastung bei $17,1 \mu\text{g/l}$ und unter 75 Watt Belastung bei $19,4 \mu\text{g/l}$. Auch innerhalb der Belastungsgruppen steigt die Konzentration nach

achteinhalb Stunden Exposition, im Vergleich zur vierstündigen Exposition, an.

Tabelle 5: LMN-1,2-OH-Konzentrationen aller Probanden im Blut in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Belastung [W]	Proband [Nr.]	LMN-1,2-OH Nach 4 h Belastung 1.Expositions- phase [$\mu\text{g/l}$]	LMN-1,2-OH Nach 8,5 h Belastung 2.Expositions- phase [$\mu\text{g/l}$]
0	2	18,4	29,5
0	3	21,8	25,5
0	1	10,5	11,9
0	4	9,6	8,6
0	5	31,9	20,3
0	6	11,6	16,1
0	7	13,1	10,7
0	8	9,4	19,8
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		15,8	17,8
50	9	13,7	16,1
50	10	25,3	27,8
50	11	16,3	17,5
50	12	21,4	31,4
50	13	13,3	16,7
50	14	12,5	23,4
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		17,1	22,2
75	15	24,5	26,0
75	16	24,9	38,8
75	17	23,6	31,6
75	18	8,8	16,5
75	19	12,9	16,1
75	20	21,4	24,9
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		19,4	25,7

3.2.2. LMN-8,9-OH im Blut

In Tabelle 6 sind die Konzentrationen an LMN-8,9-OH im Blut nach vier, beziehungsweise achteinhalb Stunden Exposition mit D-Limonen aufgelistet. Im Vergleich zum Metaboliten LMN-1,2-OH zeigen sich höhere absolute Konzentrationen. Analog zu LMN-1,2-OH steigen die Konzentrationen an LMN-8,9-OH in $\mu\text{g/l}$ über die verschiedenen Belastungsgruppen an. Der Mittelwert nach vier Stunden Exposition ohne körperliche Belastung liegt bei $52,2 \mu\text{g/l}$ und steigt auf $55,3 \mu\text{g/l}$ nach achteinhalb Stunden an. Zudem zeigt sich, dass die Konzentration nach vier Stunden auf $62,2 \mu\text{g/l}$ in der Gruppe der Probanden, die 50 Watt auf dem Fahrradergometer leisteten, ansteigt. Ein weiterer Anstieg auf $69,0 \mu\text{g/l}$ ist in der Gruppe mit 75 Watt Belastung zu beobachten.

Tabelle 6: LMN-8,9-OH-Konzentrationen aller Probanden im Blut in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Belastung	Proband	LMN-8,9-OH Nach 4 h Belastung 1.Expositions- phase [$\mu\text{g/l}$]	LMN-8,9-OH Nach 8,5 h Belastung 2.Expositions- phase [$\mu\text{g/l}$]
[W]	[Nr.]		
0	2	58,4	74,4
0	3	55,6	59,5
0	1	40,4	38,4
0	4	41,8	37,8
0	5	70,3	46,8
0	6	44,9	52,1
0	7	51,6	41,5
0	8	54,5	92,1
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		52,2	55,3
50	9	60,0	61,6
50	10	59,5	54,8
50	11	54,9	50,1
50	12	64,1	87,7
50	13	67,2	92,9
50	14	67,4	91,8
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		62,2	73,2
75	15	63,2	67,7
75	16	58,3	76,2
75	17	57,6	70,9
75	18	54,9	96,1
75	19	84,4	99,6
75	20	95,3	91,8
Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]		69,0	83,7

3.3 Konzentrationen LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH aller Probanden im Harn

3.3.1. Metabolitenkonzentrationen im Harn in [$\mu\text{g/l}$]

D-Limonen und seine Metaboliten lassen sich gut im Harn nachweisen. Nachfolgend werden die beiden Hauptmetaboliten des D-Limonens, LMN-1,2-OH sowie LMN-8,9-OH, betrachtet. Unterschieden werden dabei drei verschiedene Belastungsgruppen. Die mittleren Maximalwerte des LMN-1,2-OH sind in Tabelle 7, beziehungsweise des LMN-8,9-OH in Tabelle 9, dargestellt. Der mittlere Maximalwert bedeutet, dass es sich um den Mittelwert der jeweils höchsten LMN-1,2-OH und der LMN-8,9-OH Konzentration im Harn des jeweiligen Probanden einer Belastungsgruppe handelt. Zudem wird auf die Eliminationshalbwertszeit, im folgendem $t_{1/2}$ genannt, eingegangen. Dabei handelt es sich um die Zeitspanne, die nach Exposition mit D-Limonen zwischen der Maximalkonzentration des D-Limonens oder seiner Metaboliten im Blut beziehungsweise Harn, bis zum Abfall auf die Hälfte dieses Wertes verstreicht. Hier zeigt sich, dass die Eliminationshalbwertszeit kürzer ist, je höher die Exposition mit D-Limonen ist. Während in der Gruppe ohne körperliche Belastung die $t_{1/2}$ bei 9,4 Stunden liegt, beträgt sie in der Gruppe der Probanden mit 75 Watt Belastung lediglich 7,3 Stunden.

3.3.1.1. Konzentrationen LMN-1,2-OH in [$\mu\text{g/l}$]

Tabelle 7 zeigt die Konzentration an LMN-1,2-OH in $\mu\text{g/l}$, die Invasionszeit, die Mittelwert-Konzentrationen nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit und deren Standardabweichungen.

Tabelle 7: Maximalwert-Konzentrationen, Invasionszeit, Mittelwert-Konzentrationen nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) von LMN-1,2-OH und deren Standardabweichungen

Belastungsgruppe [W]	Anzahl [n]	Maximale Konzentration LMN-1,2-OH ($\bar{x} \pm S$) [$\mu\text{g/l}$]	Invasionszeit [h]	Konzentration LMN-1,2-OH nach 24h [$\mu\text{g/l}$]	$t_{1/2}$ [h]
0	7	800,4 \pm 241,3	8,1 \pm 2,3	212,6 \pm 161,9	9,4 \pm 3,4
50	5	803,2 \pm 193,4	8,8 \pm 2,4	185,6 \pm 73,6	8,7 \pm 1,9
75	6	896,9 \pm 266,7	9,9 \pm 1,6	182,3 \pm 21,9	7,3 \pm 2,2

Nachfolgend ist die Konzentration des LMN-1,2-OH in $\mu\text{g/l}$, in Abhängigkeit von der Zeit nach Expositionsende in Stunden, in der Gruppe ohne körperliche Belastung aufgetragen (Abb.3). Es zeigt sich eine hohe Streubreite der gemessenen Konzentrationen.

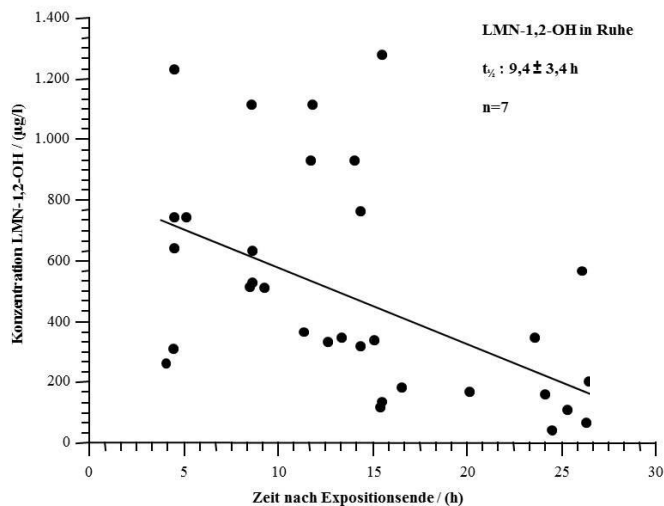


Abbildung 3: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$ ohne Belastung auf dem Fahrradergometer

In Abbildung 4 und 5 sind die Konzentrationen des LMN-1,2-OH in $\mu\text{g/l}$, in Abhängigkeit von der Zeit nach Expositionsende in Stunden, dargestellt. Abbildung 4 zeigt die Gruppe mit 50 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer, die Abbildung 5 die Gruppe mit 75 Watt körperlicher Belastung. Auffällig ist eine große Streubreite der LMN-1,2-OH Konzentrationen.

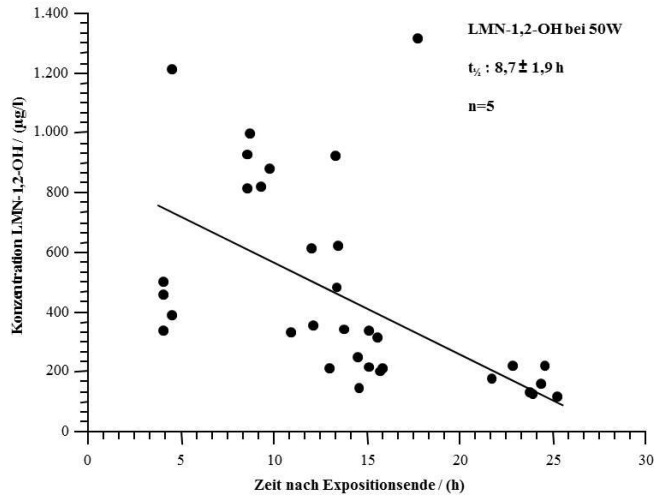


Abbildung 4: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$ bei 50 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer

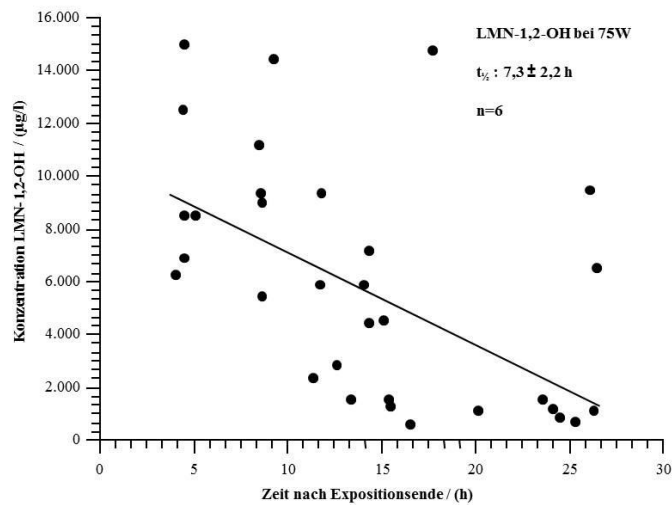


Abbildung 5: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in µg/l bei 75 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer

In der Gruppe der Probanden ohne Belastung ergibt sich bei den LMN-1,2-OH-Konzentrationen ein mittlerer Maximalwert von $800,4 \mu\text{g/l} \pm 241,3 \mu\text{g/l}$, nach einer körperlichen Belastung von 50 Watt ein Wert von $803,2 \mu\text{g/l} \pm 193,4 \mu\text{g/l}$ und bei 75 Watt ein Wert von $896,9 \pm 266,7 \mu\text{g/l}$. Die Zeit bis zum Erreichen des Maximalwertes beträgt in Ruhe $8,1 \pm 2,3$ Stunden, bei 50 Watt $8,8 \pm 2,4$ Stunden und nach 75 Watt $9,9 \pm 1,6$ Stunden. Ferner beträgt die Höhe der mittleren Konzentration an LMN-1,2-OH in µg/l 24 Stunden nach Expositionsende in Ruhe $212,6 \pm 161,9 \mu\text{g/l}$, fällt auf $185,6 \pm 73,6 \mu\text{g/l}$ in der Gruppe mit 50 Watt Belastung und fällt dann auf $182,3 \pm 21,9 \mu\text{g/l}$ in der Gruppe mit 75 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer. Die Eliminationshalbwertszeiten verändern sich innerhalb der Belastungsgruppen wie folgt. In der Gruppe der Probanden ohne Belastung ist nach $9,4 \pm 3,4$ Stunden noch die Hälfte der Konzentration an LMN-1,2-OH im Harn nachzuweisen. Bei 50 Watt Belastung ist dies nach $8,7 \pm 1,9$ Stunden und bei 75 Watt nach $7,3 \pm 2,2$ Stunden der Fall.

3.3.1.2. Konzentration LMN-8,9-OH in [$\mu\text{g/l}$]

Nachfolgende Tabelle 8 stellt die Konzentration an LMN-8,9-OH in $\mu\text{g/l}$, die Invasionszeit, die maximale Mittelwert-Konzentrationen nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit und deren Standardabweichungen dar.

Tabelle 8: Maximale mittlere LMN-8,9-OH Konzentration in $\mu\text{g/l}$, die Invasionszeit in Stunden, Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit mit deren Standardabweichungen

Belastungsgruppe [W]	Anzahl [n]	Konzentration Maximalwert LMN-8,9-OH ($x \pm S$) [$\mu\text{g/l}$]	Invasionszeit [h]	Mittelwert (LMN-8,9-OH) nach 24 Stunden [$\mu\text{g/l}$]	$t_{1/2}$ [h]
0	7	13764 ± 7254	$16,0 \pm 13,6$	2849 ± 3072	$5,4 \pm 1,0$
50	5	18222 ± 4904	$8,7 \pm 3,5$	4273 ± 5085	$6,1 \pm 1,7$
75	6	22807 ± 6774	$8,1 \pm 2,8$	4090 ± 2521	$3,6 \pm 0,9$

In den Abbildungen 6, 7 und 8 werden die Konzentrationen von LMN-8,9-OH in $\mu\text{g/l}$, in Abhängigkeit der Zeit, grafisch dargestellt. Hier zeigt sich über alle Belastungsgruppen eine gleichmäßige Abnahme der Konzentrationen innerhalb von 24 Stunden.

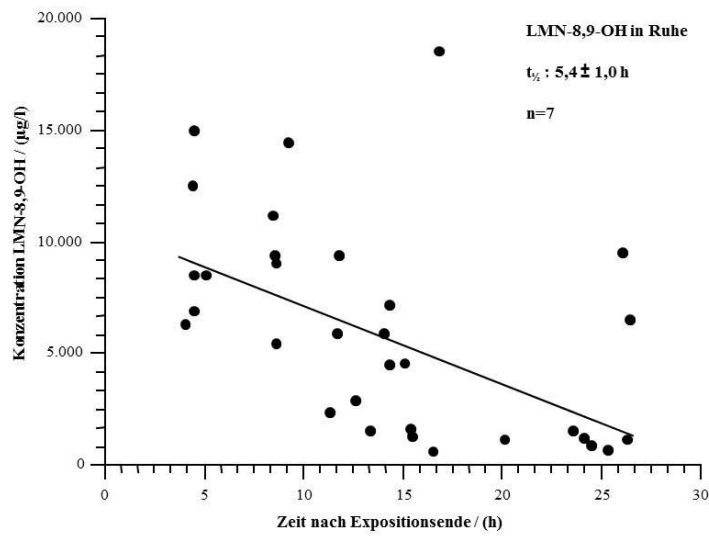


Abbildung 6: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in µg/l in Ruhe

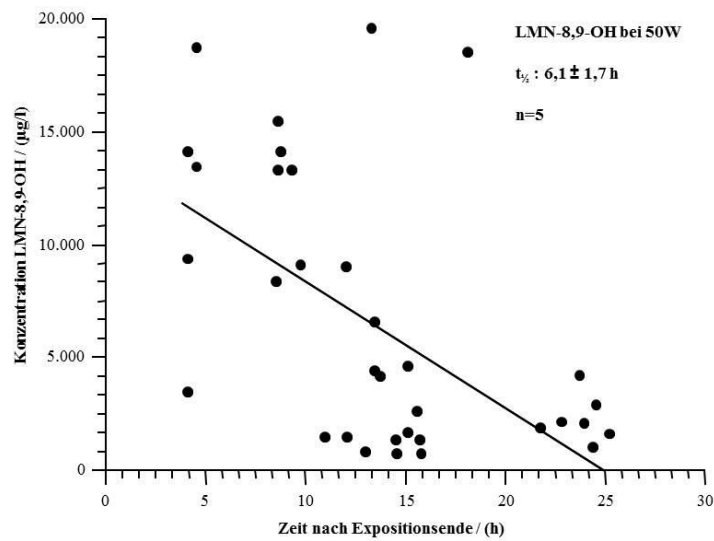


Abbildung 7: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in µg/l bei 50 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer

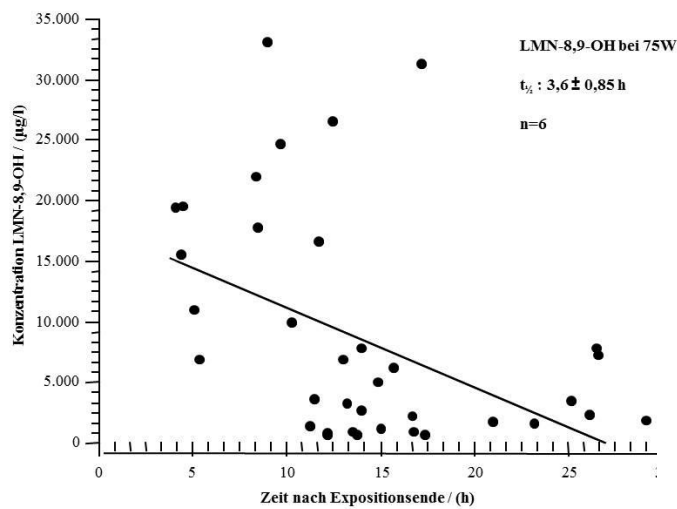


Abbildung 8: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$ bei 75 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer

Tabelle 8 zeigt den mittleren Maximalwert des Metaboliten LMN-8,9-OH in $\mu\text{g/l}$, die Invasionszeit, den Mittelwert über 24 Stunden in $\mu\text{g/l}$ und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) in Stunden. Der mittlere Maximalwert liegt in Ruhe bei $13764,1 \pm 7254,3 \mu\text{g/l}$, bei 50 Watt $18222,0 \pm 4904,8 \mu\text{g/l}$ und bei 75 Watt bei $22807,3 \pm 6774,4 \mu\text{g/l}$. Der Maximalwert wird bei der Gruppe ohne Belastung nach $16,0 \pm 13,6$ Stunden, bei 50 Watt nach $8,7 \pm 3,5$ Stunden und bei 75 Watt nach $8,1 \pm 2,8$ Stunden erreicht. Nach einem Tag liegt der Mittelwert in Ruhe bei $2849,8 \pm 3072,2 \mu\text{g/l}$, bei 50 Watt $4273,9 \pm 5085,6 \mu\text{g/l}$ und bei 75 Watt bei $4090,8 \pm 2521,7 \mu\text{g/l}$. Die Halbwertszeiten beginnen in der Gruppe ohne Belastung auf dem Fahrradergometer bei $5,4 \pm 1,0$ Stunden, steigen an auf $6,1 \pm 1,7$ Stunden, um dann stark auf $3,6 \pm 0,9$ Stunden abzufallen.

3.3.2. Metabolitenkonzentrationen unter Kreatininbezug im Harn
 Nachfolgende Diagramme zeigen die lineare Abhängigkeit der beiden Hauptmetaboliten des D-Limonens, LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH, jeweils bezogen auf die Konzentration des Kreatinins im Harn, um individuelle Unterschiede, wie Sammelperiode, Nierenfunktion und Muskelmasse in die Auswertung einzubeziehen.

3.3.2.1. Konzentrationen LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin

In Tabelle 9 sind die Konzentrationen des LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin, die Invasionszeit, der Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit aufgelistet.

Tabelle 9: Darstellung LMN-1,2-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin, der Invasionszeit, Mittelwert nach 24 Stunden und die Eliminationshalbwertszeit und deren Standardabweichungen

Belastungsgruppe [W]	Anzahl [n]	Mittlerer Maximalwert LMN-1,2-OH [mg/g Kreatinin]	Invasionszeit [h]	Mittelwert (LMN-1,2-OH) nach 24 Stunden [mg/g Kreatinin]	$t_{1/2}$ [h]
0	7	1166 ± 678,3	9,6 ± 4,9	242,2 ± 165,5	10,9 ± 3,4
50	5	1837 ± 1584	11,1 ± 2,4	185,7 ± 100,7	8,7 ± 3,1
75	6	2073 ± 1378	12,8 ± 2,3	175,0 ± 70,5	7,5 ± 1,8

Die folgenden Abbildungen zeigen die Konzentrationen des Metaboliten LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin in Abhängigkeit der Zeit in Ruhe (Abb. 9) und während 50 Watt körperlicher Belastung (Abb.10) auf dem Fahrradergometer.

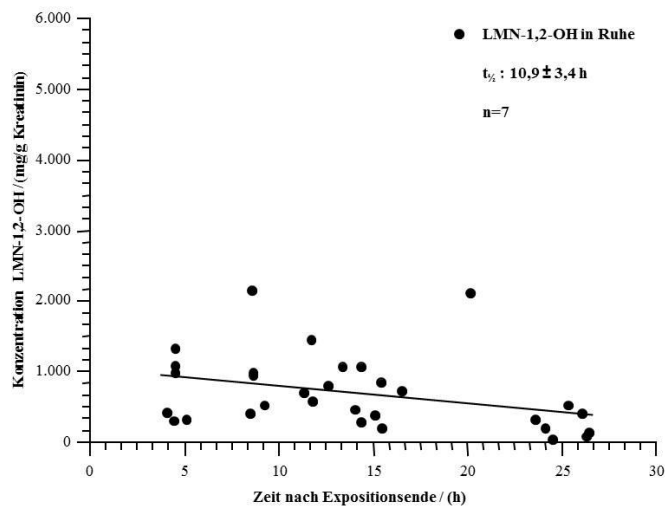


Abbildung 9: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin in Ruhe

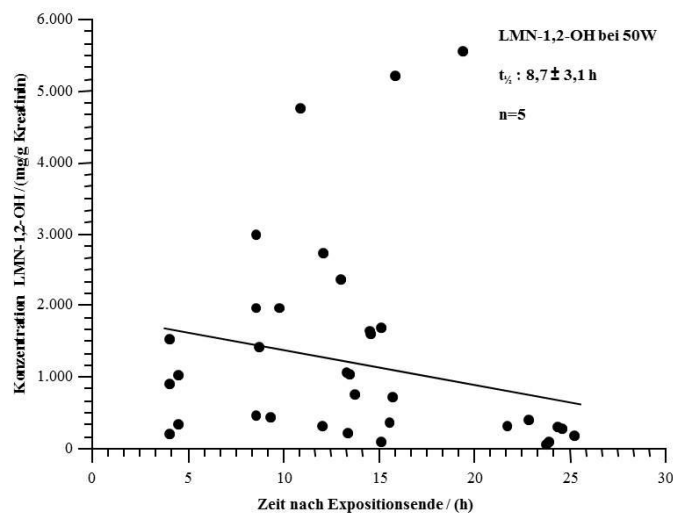


Abbildung 10: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin bei 50 Watt körperlicher Belastung

Abbildung 10 zeigt die Konzentration an LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin bei 50 Watt körperlicher Belastung in Abhängigkeit von der Zeit, wobei ein monophasischer Eliminationsverlauf zugrunde gelegt ist. Tabelle 10 beinhaltet den Vergleich der Eliminationshalbwertszeiten in Stunden zwischen einem

monophasischen und einem biphasischen Eliminationsverlauf des LMN-1,2-OH. Die erste Phase beinhaltet die Werte bis 24 Stunden, die zweite Phase die Werte ab 24 Stunden Sammelperiode. Hierbei fällt auf, dass es in der zweiten Phase keinen Abfall, sondern, aufgrund individueller Schwankungen, einen Anstieg der Konzentrationen gibt.

Tabelle 10: Vergleich zwischen monophasischem und biphasischem Verlauf der $t_{1/2}$ des LMN-1,2-OH in Stunden

LMN-1,2-OH in mg/g Kreatinin	Monophasisch	Biphasisch	
		1.Phase	2.Phase
	$t_{1/2}$ in Stunden	$t_{1/2}$ in Stunden	$t_{1/2}$ in Stunden
Ruhe	$10,9 \pm 3,4$	$77,0 \pm 221$	-13 ± 11
50 Watt	$10,9 \pm 3,4$	$12,1 \pm 8$	512 ± 78434
75 Watt	$7,5 \pm 1,8$	$11,2 \pm 5$	4 ± 2

In Tabelle 10 fallen besonders die negativen Halbwertszeiten von -11,24 Stunden in der ersten Eliminationsphase sowie -13,6 Stunden in der zweiten Eliminationsphase auf. Diese entstehen durch die formelle Auswahl aller Werte innerhalb von 24 Stunden (1.Phase) und den Werten nach 24 Stunden (2.Phase) nach Expositionsbeginn. Aus diesem Grund ist die monophasische der biphasischen Darstellung vorzuziehen.

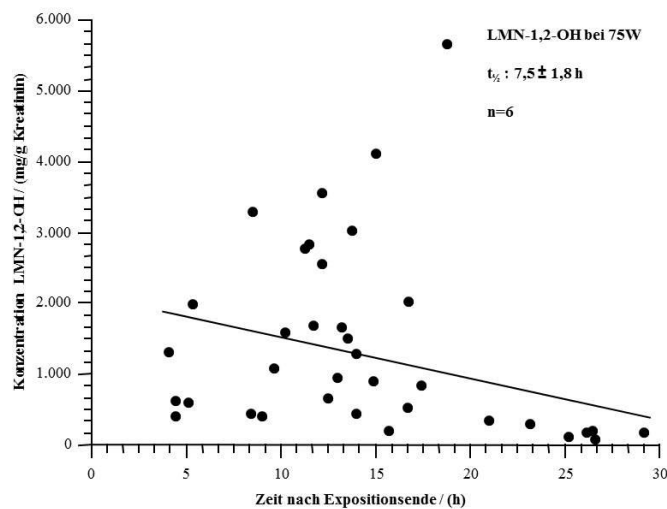


Abbildung 11: LMN-1,2-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin bei 75 Watt

Der mittlere Maximalwert in der Gruppe der Probanden ohne körperliche Belastung liegt bei 1166,4 mg/g Kreatinin mit einer Standardabweichung von 678,3 mg/g Kreatinin nach einer Zeit von $9,6 \pm 4,9$ Stunden. Dabei beträgt die Halbwertszeit $10,9 \pm 3,4$ Stunden. Nach 24 Stunden sind im Mittel noch $242,2 \pm 165,5$ mg LMN-1,2-OH pro/g Kreatinin nachzuweisen. In der 50 Watt Belastungsgruppe zeigt sich ein maximaler Wert von $1837,9 \pm 1584,0$ mg/g Kreatinin, welcher nach $11,1 \pm 2,4$ Stunden gemessen wird. Nach einem Tag lässt sich im Mittel noch $185,7 \pm 100,7$ mg/g Kreatinin nachweisen. In der Gruppe mit der höchsten Belastungsstufe von 75 Watt erreichte der mittlere maximale Wert $2073,1 \pm 1378,9$ mg/g Kreatinin nach $7,5 \pm 1,8$ Stunden. Nach 24 Stunden zeigt sich ein gemittelter Wert von $175,0 \pm 70,5$ mg/g Kreatinin.

3.3.2.2. Konzentrationen LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin

Es folgen die Konzentrationen des Metaboliten LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin. Tabelle 11 zeigt den Mittelwert, die

Invasionszeit, den Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit und deren Standardabweichungen.

Tabelle 11: Konzentrationen des mittleren Maximalwertes an LMN-8,9-OH Metaboliten in mg/g Kreatinin, die Invasionszeit, der Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ und deren Standardabweichungen

Belastungsgruppe [W]	Anzahl [n]	Mittlerer Maximalwert (LMN-8,9-OH) [mg/g Kreatinin]	Invasionszeit [h]	Mittelwert (LMN-8,9-OH) nach 24 Stunden [mg/g Kreatinin]	$t_{1/2}$ [h]
0	7	12997 ± 4452	8,0 ± 2,4	2813 ± 2089	9,1 ± 2,0
50	5	14524 ± 4828	10,1 ± 2,0	2297 ± 775	7,1 ± 1,2
75	6	24333 ± 13494	8,8 ± 3,7	3244 ± 1048	6,9 ± 1,0

Abbildung 12 zeigt die Konzentration an LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin ohne körperliche Belastung in Abhängigkeit der Zeit in Stunden. Die Halbwertszeit liegt bei $9,1 \pm 2,0$ Stunden, wobei nach $8,0 \pm 2,4$ Stunden die mittlere maximale Konzentration an LMN-8,9-OH mit $12997,5 \pm 4452,7$ mg/g Kreatinin erreicht wird. In der 50 Watt Belastungsgruppe wird die maximale mittlere Konzentration von $14524,8 \pm 4828,7$ mg/g Kreatinin nach $10,1 \pm 2,0$ Stunden erreicht.

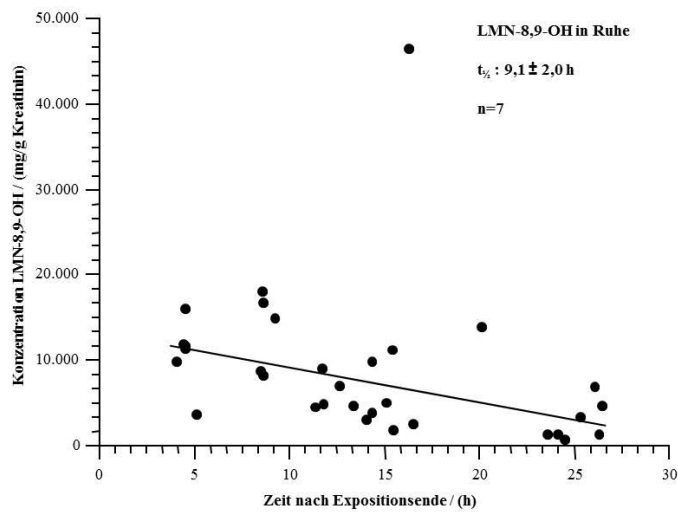


Abbildung 12: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin in Ruhe

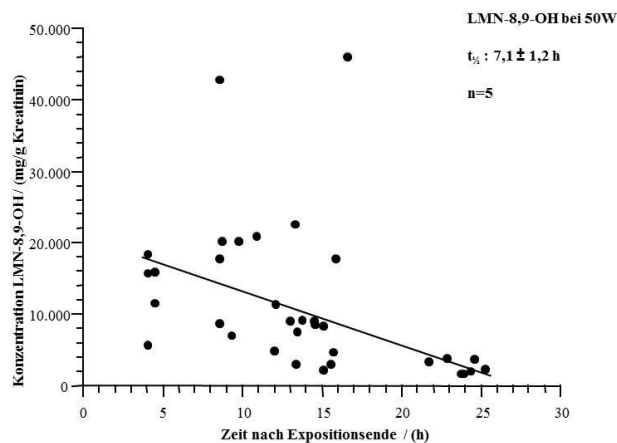


Abbildung 13: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin bei 50 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer

In Abbildung 13 sind die Konzentrationen an LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin in Abhängigkeit der Zeit grafisch dargestellt. Hierbei wird, analog zu LMN-1,2-OH, ein monophasischer Eliminationsweg zugrunde gelegt. Die Abbildung 15 zeigt die Konzentration an LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin in Abhängigkeit der Zeit. Es sind zwei Phasen dargestellt. Die erste Phase

beinhaltet die gemessenen Konzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden, die zweite Phase zeigt den Anstieg, Abfall oder Plateau der Konzentrationen nach Ablauf der 24 Stunden.

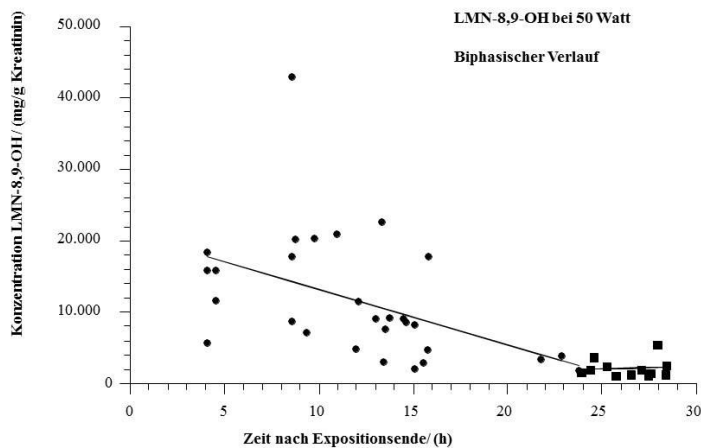


Abbildung 14: Konzentrationen des LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin bei 50 Watt Belastung auf dem Fahrradergometer unter Annahme einer biphasischen Eliminationskinetik

Tabelle 12: Vergleich zwischen monophasischem und biphasischem Verlauf der $t_{1/2}$ des LMN-8,9-OH in Stunden

LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin	Mono- phasisch	Biphasisch	
		1.Phase	2.Phase
	$t_{1/2}$ in Stunden	$t_{1/2}$ in Stunden	$t_{1/2}$ in Stunden
Ruhe	$9,1 \pm 2,0$	$11,5 \pm 5,2$	$-8,6 \pm 4$
50 Watt	$7,1 \pm 1,2$	$7,6 \pm 1,9$	$42,7 \pm 257$
75 Watt	$6,9 \pm 1,0$	$6,8 \pm 1,7$	$8,4 \pm 3$

Die auffällige negative Halbwertszeit in der zweiten Phase der biphasischen Eliminationskinetik bei den Probanden in Ruhe von

-8,6 ± 4,8 Stunden ergibt sich aus der nicht sinnvollen formellen Auswahl der Werte nach bestimmten Zeitpunkten (vergl. Tabelle 10). Aus diesem Grund ist auch bei LMN-8,9-OH die Annahme einer monophasischen Eliminationskinetik dem der biphasischen vorzuziehen.

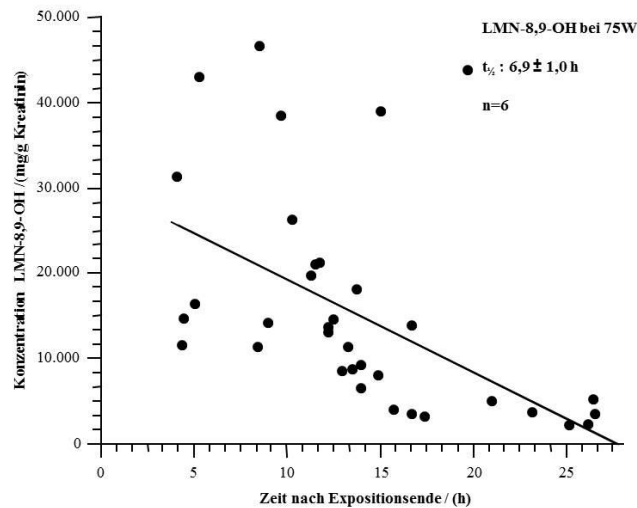


Abbildung 15: LMN-8,9-OH-Konzentrationen in mg/g Kreatinin bei einer körperlichen Belastung von 75 Watt auf dem Fahrradergometer

Nachfolgend beziehen sich die Werte auf die Metaboliten-Konzentrationen von LMN-8,9-OH. In der Probandengruppe ohne Belastung zeigt sich nach $7,96 \pm 2,4$ Stunden ein mittlerer Maximalwert von $12997,5 \pm 4452,7$ mg/g Kreatinin, bei 50 Watt auf dem Fahrradergometer nach $10,1 \pm 2,0$ Stunden ein Wert von $14524,8 \pm 4828,7$ mg/g Kreatinin und bei der höchsten Belastungsstufe von 75 Watt eine Konzentration von $24333,6 \pm 13494,8$ mg/g Kreatinin nach $8,8 \pm 3,7$ Stunden. Der Mittelwert nach 24 Stunden bleibt relativ konstant über alle Belastungsgruppen hinweg. Bei den Personen ohne körperliche Belastung liegt der Wert bei $2813,6 \pm 2089,2$ mg/g Kreatinin, bei 50 Watt um $2297,6 \pm 775,3$ mg/g Kreatinin und bei 75 Watt um $3244,1 \pm 1048,33$ mg/g Kreatinin. Die Halbwertszeiten in der Tabelle

zeigen den Verlauf des Abbaus innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ende der Exposition. Dabei zeigt sich ein Abfall der Halbwertszeiten von $9,1 \pm 2,0$ Stunden bei der Gruppe ohne Belastung, auf $7,1 \pm 1,2$ Stunden bei 50 Watt Belastung und auf $6,9 \pm 1,0$ Stunden bei den Probanden mit der höchsten Belastung von 75 Watt. In Tabelle 13 und 14 werden die Konzentrationen des LMN-1,2-OH sowie des LMN-8,9-OH aufgelistet. Die beiden Probanden haben unterschiedliche körperliche Konstitutionen. Proband 11 liegt mit einem Body-Maß-Index (BMI) von 32,6 im adipösen Ernährungsbereich, Proband 12, mit einem BMI von 18,2 eher im kachektischen Ernährungsbereich.

Tabelle 13: Vergleich LMN-1,2-OH-Konzentrationen als Absolutwerte in $\mu\text{g/l}$, sowie bezogen auf Kreatinin zwischen zwei Probanden unterschiedlicher Konstitution

Proband	11 (BMI 32,6)	12 (BMI 18,2)
Max. Absolutwert (LMN-1,2-OH) in $\mu\text{g/l}$	819,7	995,4
Max. Wert (LMN-1,2 -OH) in mg/g Kreatinin	1601,3	4754,0

Tabelle 14: Vergleich LMN-8,9-OH-Konzentrationen als Absolutwerte in $\mu\text{g/l}$, sowie bezogen auf Kreatinin zwischen zwei Probanden unterschiedlicher Konstitution

Proband	11 (BMI 32,6)	12 (BMI 18,2)
Max. Absolutwert (LMN-8,9-OH) in $\mu\text{g/l}$	13471,9	14108,3
Max. Wert (LMN-8,9-OH) in mg/g Kreatinin	9169,8	20909,0

3.4 Subjektive Symptome oder Beschwerden während der Exposition mit D-Limonen

Bei drei der Probanden traten ähnliche Symptome auf wie bei einer leichten Erkältung. Es waren ein „Kratzen im Hals“ sowie „eine laufende Nase“ nach achteinhalbstündiger Exposition mit D-Limonen zu verzeichnen. Bei einer Probandin, die angab auch Gelomyrtol[®]-Kapseln nicht gut zu vertragen, trat am Folgetag eine Rötung am Auge auf. Die anderen Probanden zeigten keinerlei körperliche Reaktion auf die Exposition.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Der aktuell gültige MAK-Wert des D-Limonens liegt seit 2011 bei 5 ml/m^3 , entsprechend 28 mg/m^3 . Bei Einhaltung dieses Grenzwertes ist nach derzeitigem Wissensstand mit keiner gesundheitlichen Belastung durch D-Limonen über ein Berufsleben zu rechnen. Ziel dieser Arbeit ist es, die innere Belastung durch D-Limonen durch eine arbeitsplatzanaloge, standardisierte achtstündige äußere Exposition in Höhe des MAK-Wertes zu ermitteln. Als geeignetes biologisches Material für die Probennahme erweist sich Harn gegenüber Blut, da sich die Metaboliten des D-Limonens, aufgrund der Funktionalisierungsprozesse, analytisch exakter aus Harnproben nachweisen lassen. Zudem ist die Compliance des Arbeitnehmers zur Probengewinnung größer als für die invasive Maßnahme einer Blutabnahme. Für die Betrachtung der inneren Belastung ist die Kenntnis der eingeatmeten Luftkonzentration entscheidend, denn dadurch ermittelt sich die tatsächliche aufgenommene Menge an D-Limonen. Aus diesem Grund wurden Vorversuche durchgeführt, in denen die benötigte Menge an D-Limonen zur Einstellung der Luftkonzentration in Höhe des MAK-Wertes ermittelt wurde. Wie weiter oben beschrieben, ist D-Limonen, aufgrund seiner Stoffeigenschaften im Blut nur schwer nachzuweisen. So zeigt sich ein Anstieg der Blutkonzentrationen an D-Limonen über den Beobachtungszeitraum über alle Belastungsstufen. Es wurden zwei Blutentnahmezeitpunkte, aufgrund der Akzeptanz der freiwilligen Probanden, gewählt. Diese reichen zur Bestimmung der kinetischen Größe „Halbwertszeit“ für die Invasion und Elimination nicht aus. Geeignete Analyseverfahren zur Bestimmung der D-Limonen Metaboliten aus humanem Probenmaterial sind noch nicht lange verfügbar. Die Konzentrationen der Hauptmetaboliten im Harn können volumenbezogen in $\mu\text{g/l}$ oder in mg/g Kreatinin angegeben werden. Für letzteres ist es notwendig, den Kreatinin-Gehalt im Harn zu

bestimmen. Dies bedeutet zwar mehr Aufwand, da zusätzlich der Kreatinin-Gehalt im Harn bestimmt werden muss, allerdings lassen sich damit besser individuelle Faktoren ausgleichen, die die Metaboliten Konzentrationen beeinflussen. Ein Biomonitoring am Arbeitsplatz sollte somit mit Bezug zum Kreatinin erfolgen. Die individuellen Einflussfaktoren sind die aufgenommene Flüssigkeitsmenge, die Frequenz des Wasserlassens sowie die Nierenfunktion. Kreatinin wird kontinuierlich über die Nieren ausgeschieden und korreliert mit der Sammeldauer. Zudem gibt der Kreatininwert einen Hinweis zur Nierenfunktion. Diese ist entscheidend für die Ausscheidung von Gefahrenstoffen. Der Kreatininwert ist abhängig von der Muskelmasse und folglich auch vom Geschlecht. Je mehr Muskelmasse ein Proband besitzt, desto kleiner wird der Quotient $c(\text{LMN-1,2-/8,9-OH}) / \text{Kreatinin}$. Der durchschnittliche Kreatinin-Wert der männlichen Probanden dieser Studie liegt bei 1,3 mg/l, derjenigen der Frauen bei 0,78 mg/l. Als Störgrößen sind dabei, ein hoher Fleischkonsum oder eine erhöhte Muskelarbeit, zu nennen [28]. Betrachtet man die Ergebnisse des Metaboliten LMN-1,2-OH in $\mu\text{g/l}$ über die verschiedenen Belastungsgruppen, bewegt sich der mittlere Maximalwert in $\mu\text{g/l}$ zwischen 807,8 und 941,4 und schwankt zwischen fünf und 16 Prozent. Je höher die körperliche Belastung ist, desto später wird der Maximalwert an LMN-1,2-OH erreicht. Dies spiegelt sich auch in den Werten von LMN-1,2-OH, bezogen auf Gramm Kreatinin, wider. Hier wird der Maximalwert, gemessen im Harn der Probanden, in der Gruppe von 75 Watt körperlicher Belastung erst ungefähr drei Stunden später erreicht als in den Proben der Gruppe ohne körperliche Belastung. Ausgeschieden wurden die Metaboliten bei höherem Grundumsatz schneller. Dies lässt sich anhand der sinkenden Halbwertszeiten von näherungsweise elf Stunden in Ruhe $10,9 \pm 3,4$ Stunden, auf $7,5 \pm 1,8$ Stunden bei 75 Watt ablesen. Ein erhöhter Grundumsatz durch körperliche Belastung während der Exposition beeinflusst die

Ausscheidungsgeschwindigkeit günstig, da bereits nach kürzerer Zeit die Metaboliten im Harn nachweisbar waren. Zudem spielen auch Umverteilungsprozesse im Organismus eine zentrale Rolle in der Metabolisierungs- und Eliminationskinetik. Durch das erhöhte Atemminutenvolumen unter körperlicher Belastung findet eine erhöhte Aufnahme des D-Limonen in den Körper statt. Aufgrund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften reichert sich D-Limonen im Fettgewebe an [1, S.180].

Es wurden die Metabolitenwerte des D-Limonens einer Probandin mit sehr hohem Body-Maß-Index (BMI) von 32,6 (Probandin 11) mit denen einer Probandin mit sehr niedrigem BMI von 18,2 (Probandin 12), verglichen. Beide leisteten die gleiche Arbeit von 50 Watt auf dem Fahrradergometer. Es zeigt sich, dass sich die Absolutwerte der beiden relevanten Metaboliten (LMN-1,2-OH sowie LMN-8,9-OH) kaum unterscheiden (vgl. Tabelle 13). Unter Kreatinin-Bezug ist jedoch ein signifikanter Unterschied zu beobachten. Es zeigen sich bei der Probandin mit höherem Körpergewicht bei LMN-1,2-OH 1601,28 mg/g Kreatinin und bei der Probandin mit niedrigerem Gewicht ein Wert von 4754,04 mg/g Kreatinin, also der dreifache Wert im Harn. Zudem dauerte es bei der Probandin mit dem höheren Body-Maß-Index näherungsweise 15 Stunden bis der Höchstwert erreicht wurde, bei der Probandin mit niedrigerem BMI waren es hingegen nur elf Stunden bis zum angegebenen Maximalwert. Somit scheidet die schlankere Probandin das D-Limonen schneller und effektiver, das heißt in höheren Mengen, wieder aus, ohne es im eigenen Fettgewebe zu speichern. Da es sich hierbei jedoch um Einzeldaten handelt, ist es nicht möglich, eine generelle Aussage bezüglich der Verteilungsprozesse zu treffen. Es ergeben sich lediglich Hinweise darauf, dass D-Limonen sich möglicherweise im Körper ansammeln könnte. Vereinfacht kann angenommen werden, dass D-Limonen und seine Metaboliten einen monophasischen Verlauf in der Eliminationskinetik haben. Somit ist nach einer bestimmten Zeit das

gesamte aufgenommene D-Limonen ausgeschieden. Werden nun die Daten bezogen auf Kreatinin betrachtet, da hier spezifische Faktoren wie Muskelmasse und Geschlecht einfließen, steigen im weiteren Verlauf die Werte an LMN-8,9-OH wieder leicht an (siehe Tabelle 8 und 10). Es könnten sowohl kumulative Effekte als Folge der Eliminationskinetik eine Rolle spielen, als auch eine hohe äußere Belastung mit D-Limonen. Die Ursache könnte im Gebrauch von limonenhaltigen Konsumgüterprodukten, wie zum Beispiel Duschgel oder Medikamenten, direkt im Anschluss und/oder während der Expositionsstudie liegen, da vor allem Anstiege der Metabolitenkonzentrationen LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH in den Messdaten nach 24 Stunden zu finden sind. Kumulative Effekte bedeuten, dass der Stoff bis zur nächsten Arbeitsschicht nicht vollständig ausgeschieden wird, sondern teilweise im Körper verbleibt und sich somit über die Arbeitswoche anreichert. Problematisch ist hierbei, dass es dem Arbeitnehmer bei kumulativen Effekten lediglich möglich ist, den Stoff am Wochenende oder in Urlaubszeiten vollständig auszuschcheiden, wobei dies von der Halbwertszeit des Metaboliten abhängig ist. Die Eliminationskinetik von LMN-8,9-OH ähnelt derjenigen von LMN-1,2-OH. Der mittlere Maximalwert verdoppelt sich über die Belastungsgruppen hinweg von 10755,7 $\mu\text{g/l}$ auf 22807,3 $\mu\text{g/l}$ und bezogen auf Gramm Kreatinin von 12997,5 auf 24333,6 mg pro Gramm Kreatinin. Auch die Halbwertszeiten sinken bei LMN-8,9-OH von $9,1 \pm 2,0$ Stunden auf $6,9 \pm 1,0$ Stunden in der 75 Watt Belastungsgruppe. Dabei sind die absoluten Konzentrationen des Metaboliten LMN-8,9-OH deutlich höher als bei LMN-1,2-OH. Verglichen mit anderen, in der Arbeitsmedizin relevanten Stoffmengen, liegen die Konzentrationen des LMN-8,9-OH im mg/g Kreatinin in einem hohen Konzentrationsbereich. Normalerweise liegen diese Werte im Bereich von $\mu\text{g/g}$ Kreatinin. Daraus lässt sich ableiten, dass D-Limonen in hohem Maße zu LMN-8,9-OH verstoffwechselt wird und es sich hierbei um einen

Hauptmetaboliten des D-Limonens handelt. In der oralen Belastungsstudie von Göen et al., in der vier Probanden D-Limonen einmalig ausgesetzt waren, zeigte sich, dass D-Limonen zu 4,3 % zu LMN-1,2-OH und zu 32 % zu LMN-8,9-OH verstoffwechselt wird [5]. In einer weiteren oralen Belastungsstudie mit Monoterpenen zeigte sich eine geringe Menge an unverstoffwechselten Limonen im Blut, woraus abgeleitet wurde, dass es sich um einen hohen First-Pass-Effekt in der Leber handeln muss [1]. Denn jeder oral aufgenommene Stoff wird über die Darmschleimhaut resorbiert und dem hepatischen Kreislauf zugeführt. Im Pfortaderkreislauf führen multiple Entgiftungs- und Umbauprozesse zur Umwandlung des jeweiligen Stoffes. Nach inhalativer Aufnahme des D-Limonens wird der hepatische First-Pass-Effekt umgangen und es sind höhere Konzentrationen in Blut und Harn nachweisbar. Dies zeigte sich auch in der inhalativen und oralen Belastungsstudie mit D-Limonen von Schmidt [1]. Im Vergleich der beiden Gruppen, Männer und Frauen, finden sich im Durchschnitt geringere Konzentrationen an LMN-1,2-OH (388,5 mg/g Kreatinin) und LMN-8,9-OH (7054,1 mg/g Kreatinin) bei den Männern. Die Frauen zeigen mit Werten von 945,7 mg/g Kreatinin und 9702,9 mg/g Kreatinin höhere Werte. Eine mögliche Erklärung sind die Unterschiede aus den geringeren Kreatinin-Konzentrationen im Harn der Frauen, da eine Absenkung des Kreatinins zu einer Erhöhung des LMN/Kreatinin Quotienten führt. Monoterpene gehören zu einer arbeitsmedizinisch-toxikologisch relevanten Stoffgruppe. Es zeigt sich, dass vor allem zwei Metaboliten eine relevante Rolle im Metabolismus des D-Limonens im menschlichen Organismus spielen: das LMN-1,2-OH sowie das LMN-8,9-OH, wobei letzteres in höheren Konzentrationen messbar ist. Zum Nachweis der inneren Belastung mit D-Limonen wurden 20 freiwillige Probanden unter standardisierten MAK-Wert-Bedingungen von 28 mg D-Limonen/m³ (5 ppm) inhalativ exponiert. Auf einem Fahrradergometer leisteten die Probanden

50 oder 75 Watt je zehn Minuten pro Stunde oder waren keiner Belastung ausgesetzt. Es wurden Blutproben nach vier, beziehungsweise achteinhalb Stunden entnommen sowie Harnproben über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt. Es zeigte sich, dass es mehrere Metaboliten des D-Limonens gibt, die im Blut sowie im Harn nachzuweisen sind. Als Hauptmetaboliten wurden das Limonen-1,2-OH sowie das Limonen-8,9-OH identifiziert [1]. Ein geeignetes Biomonitoring des D-Limonens am Arbeitsplatz ist, nach den Ergebnissen dieser Arbeit, anhand seiner Hauptabbauprodukte LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH im Harn, möglich. Diese kommen in hohen Konzentrationen vor und sind bis 24 Stunden im Harn nachweisbar. Weitere Studien sollten durchgeführt werden, in denen der Eliminationszeitraum über 24 Stunden nach Expositionsbeginn betrachtet wird, um kumulative Effekte des D-Limonens auszuschließen.

5. Summary

The present study was designed to evaluate the internal load with D-Limonen and its metabolites during an eight hours workplace analogy after an external exposition with D-Limonen. Urine samples are more suitable biological material than blood samples. The determination of metabolite of D-Limonen in urine samples by analysis methods is more exactly, because of the functionalisation processes of D-Limonen. The study is based on its maximum allowable concentration (MAC) of 5ppm (28 mg/m³). 18 volunteers were separately exposed to the MAC value in a laboratory for eight hours. They were divided in three groups: Two groups performed 50 or 75 Watt on a bicycle ergometer for 10 minutes every hour. The third group was not exposed to physical stress [28]. Blood samples were collected after four and eight hours and urine samples were collected over 24 hours. The samples were probed by a new analysis method and by gas-phase chromatograph for Limonen and its main metabolites LMN-1,2-OH and LMN-8,9-OH. Evaluating the results, the quotient of LMN-8,9-OH in mg per gram creatinine is graded between 12997,5 and 24333 according to the physical stress. The half live are also correlated with the physical stress and amount to $9,1 \pm 2,0$ and $6,9 \pm 1,0$ hours. The values of LMN-1,2-OH are 1166,4 until 2073,1 mg per gram creatinine and the half live are amount to $10,9 \pm 3,4$ and $7,5 \pm 1,8$. A higher metabolism during the exposition on the bicycle ergometer has a positive effect on the precipitation kinetics. During a 75 watt exposition the LMN-8,9-OH and LMN-1,2-OH absolute values are reached faster than during the exposition without physical stress. The main metabolites of D-limone are LMN-1,2-OH and LMN-8,9-OH and they are easy measurable in urine samples. Thus they enable a suitable Biomonitoring of D-Limonen on workplace. The metabolites exist in high concentrations until 24 hours in urine samples.

This study has shown that there is a possibility of accumulation of LMN-8,9-OH and LMN-1,2-OH as the metabolite is still detectable in urine samples 24 hours after the exposition started.

Further studies to detect accumulation effects of exposure over more than 24 hours are necessary.

6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Gefahrenhinweise von D-Limonen [7]

Tabelle 2: Anzahl der Probanden bei verschiedenen Belastungsgraden (Fahrradergometer je 10 Minuten/h) [28]

Tabelle 3: Durchschnittliche Luftkonzentration in der Expositions-kammer nach achtstündiger Exposition gegenüber D-Limonen

Tabelle 4: D-Limonen-Konzentrationen der Blutproben aller Probanden in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Tabelle 5: LMN-1,2-OH- Konzentrationen aller Probanden im Blut in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Tabelle 6: LMN-8,9-OH-Konzentrationen aller Probanden im Blut in [$\mu\text{g/l}$] nach 4 h und 8,5 h Exposition

Tabelle 7: Maximalwert-Konzentrationen, Invasionszeit, Mittelwert-Konzentrationen nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) von LMN-1,2-OH und deren Standardabweichungen

Tabelle 8: Maximale mittlere LMN-8,9-OH Konzentration in $\mu\text{g/l}$, die Invasionszeit in Stunden, Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit mit deren Standardabweichungen

Tabelle 9: Darstellung LMN-1,2-OH Konzentrationen in mg/g Kreatinin, der Invasionszeit, Mittelwert nach 24 Stunden und die Eliminationshalbwertszeit und deren Standardabweichungen

Tabelle 10: Vergleich zwischen monophasischem und biphasischem Verlauf der $t_{1/2}$ des LMN-1,2-OH in Stunden

Tabelle 11: Konzentrationen des mittleren Maximalwertes an LMN-8,9-OH Metaboliten in mg/g Kreatinin, die Invasionszeit, der Mittelwert nach 24 Stunden sowie die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ und deren Standardabweichungen

Tabelle 12: Vergleich zwischen monophasischem und biphasischem Verlauf der $t_{1/2}$ des LMN-8,9-OH in Stunden

Tabelle 13: Vergleich LMN-1,2-OH-Konzentrationen als Absolutwerte in $\mu\text{g/l}$, sowie bezogen auf Kreatinin zwischen zwei Probanden unterschiedlicher Konstitution

Tabelle 14: Vergleich LMN-8,9-OH-Konzentrationen als Absolutwerte in $\mu\text{g/l}$, sowie bezogen auf Kreatinin zwischen zwei Probanden unterschiedlicher Konstitution

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Derzeitiger Kenntnisstand von D-Limonen zu seinen Metaboliten LMN-1,2-OH und LMN-8,9-OH

Abbildung 2: Beispielhafte Exposition in einer Expositions-kammer mit Fahrradergometer und Ventilator

Abbildung 3: LMN-1,2-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ ohne Belastung auf dem Fahrradergometer

Abbildung 4: LMN-1,2-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ bei 50 Watt

Abbildung 5: LMN-1,2-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ bei 75 Watt

Abbildung 6: LMN-8,9-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ in Ruhe

Abbildung 7: LMN-8,9-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ bei 50 Watt-Belastung

Abbildung 8: LMN-8,9-OH-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ bei 75 Watt-Belastung

Abbildung 9: LMN-1,2-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin in Ruhe

Abbildung 10: LMN-1,2-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin bei 50 Watt

Abbildung 11: LMN-1,2-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin bei 75 Watt

Abbildung 12: LMN-8,9-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin in Ruhe

Abbildung 13: LMN-8,9-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin bei 50 Watt Belastung

Abbildung 14: Konzentrationen des LMN-8,9-OH in mg/g Kreatinin bei 50 Watt-Belastung auf dem Fahrradergometer, unter Annahme einer biphasischen Eliminationskinetik

Abbildung 15: LMN-8,9-OH-Konzentration in mg/g Kreatinin bei einer körperlichen Belastung von 75 Watt

Chemikalien und interne Standards

[C1] Stammlösung LMN II in CS₂ (500 µ/l)

595 µl (~ 500 mg) LMN werden genau in einem 1 ml Messkolben eingewogen. Anschließend wird mit CS₂ bis zur Marke aufgefüllt [1, S.52].

[C2] I Std Arbeitslösung (100 mg/l in EtOH)

500 µl der Stammlösung werden in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit

EtOH auf 10 ml aufgefüllt [1, S.52].

[C3] Stammlösung LMN I in CS₂ (9,12 g/l)

50 µl (~ 46 mg) LMN werden genau in 5 ml Messkolben eingewogen. Anschließend wird mit CS₂ bis zur Marke aufgefüllt [1, S.52].

7. Literaturverzeichnis

- [1] Schmidt, L. In Vivo Metabolismus- Studien und Human- Biomonitoring von Monoterpenen, *Dissertation Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU)*, **2015**
- [2] Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG), Bedeutung und Benutzung von BAT-Werten Leitwerten. In *MAK- und BAT-Wert Liste 2012*; Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG, Ed.; *Wiley-VCH Verlag GmbH und Co KgaA: Weinheim, Germany*, doi 10.1002/9783527666027.ch11, **2012**
- [3] Deetjen, Speckmann, Hescheler, Physiologie, Kapitel Deetjen, P., Dietl, P. Atmung, Ventilation und Perfusion, *Physiologie, Urban und Fischer Verlag*, **2005**, 493
- [4] Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) *MAK- und BAT-Werte-Liste 2021, Mitteilung 57*, **2021**, 91
- [5] Schmidt, L., Göen, T. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. *Arch Toxicol*, doi 10.1007/s00204-016-1751-6, **2017**, 91 (3), 1175-1185
- [6] Adams, T. B., Gavin, C. L., McGowen, M. M., Waddell, W. J., Cohen, S. M., Feron, V. J., Smith, R. L. assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, doi 10.1016/j.fct.2011.06.011, **2011**, 2471-2494
- [7] Api, A.-M., The fate of dermally applied (14C) d-limonen in rats and humans. *Int J Toxicol*, doi: 10.1177/1091581813479979, **2013**
- [8] Grimm, AF. Standardisierte i-Propylbenzol-Exposition. *Dissertation Justus-Liebig-Universität, Gießen*. **2000**
- [9] Falk, A., Fischer, T., Hagberg, M, Purpuric rash caused by dermal exposure to d-limonene. *Contact Dermatitis* 25. **1991**, 198-199
- [10] Fiserova-Bergerova, V., Pierce, JT., Droz PO Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation. *Am J Ind Med* 17, **1990**, 617-635
- [11] Guy, RH., Potts, RO., Penetration of industrial chemicals across the skin: a predictive model. *Am J Ind Med* 23, **1993**, 711-719

- [12] Limonen (MAK value documentation in german language). *Wiley-VCH*, doi 10.1002/3527600418mb13886ismd0015, **1989**
- [13] Schäfer, R., Schäfer, W., Die perkutane Resorption verschiedener Terpene – Menthol, Campher, Limonen, Isobornylacetat, a-Pinen – aus Badezusätzen. *Arzneim-Forsch* 32, **1989**, 56-58
- [14] Lehman-McKeeman, LD., Rodriguez, PA., Takigiku, R., Caudill, D., Fey, ML., d-Limonene-induced male rat-specific nephrotoxicity: evaluation of the association between d-limonene and alpha-2u-globulin. *Toxicol Appl Pharmacol* 99, doi 10.1016/0041-008x(89)90007-0, **1989**, 250-259
- [15] Crowell, PL., Elson, CE., Bailey, HH., Elegbede, A., Haag, JD., Gould, MN., Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. *Cancer Chemother Pharmacol* 35, doi 10.1615criterevoncog.v5.il.10, **1994**, 31-37
- [16] Falk-Filipsson, A., Löf, A., Hagberg, M., Hjelm, EW., Wang, Z., d-Limonene exposure to humans by inhalation: uptake, distribution, elimination, and effects on the pulmonary function. *J Toxicol Environ Health* 38, doi 10.1080/15287399309531702, **1993**, 77-88
- [17] Falk, A., Gullstrand, E., Löf, A., Hjelm, EW., Liquid/air partition coefficients of four terpenes. *Br J Ind Med* 47, doi 10.1136/oem.47.1.62, **1990**, 62-64
- [18] Igimi, H., Nishimura, M., Studies on the Metabolism of d-Limonene (p-Mentha-1,8-diene): I. The Absorption, Distribution and Excretion of d-Limonene in rats. *Xenobiotica* 4, doi 10.3109/004982574099049347, **1974**, 77
- [19] Cerny, B., Biologische Wirkungen von Mono- und Sequiterpenkohlenwasserstoffen. *Diplomarbeit Universität Wien*, doi 10.25365/THESIS.2267, **2008**, 9-11
- [20] Karlberg, AT. et al., Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. *Contact Dermatitis. Bd.* 26, doi 10.1111/j.1600-0536.1992.tb00129.x, **1992**, 332-340

- [21] Schmidt, L., Belov, V.N., Göen, T., Sensitive monitoring of monoterpene metabolites in human urine using two-step derivatisation and positive chemical ionisation-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, doi 10.1016/j.aca.2013.07.046, **2013**, 793
- [22] Neumann, K.; Aalbers, J. G. Standardisierung Des Kaninchenaugen-Tests zur Prüfung der Reizwirkung von Waschmitteln. Fette, Seifen, *Anstrichm.* 62 (11), doi 10.1002/lipi.19600621115, **1960**, 1053-1057
- [23] Dorato et al., The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues and definitions, *Regul. Toxicol Pharmacol.* doi 10.1016/j.yrtph.2005.05.004, **2005**
- [24] Opdyke, D. L. J., LD50-Werte für D-Limonen, *Food Cosmet. Toxicol.* 13, **1975**, 825
- [25] Webb, DR., Kanerva, RL., Hysell, DK., Alden, CL., Lehman-McKeeman, LD. Assessment of the chronic oral toxicity of d-limonene in dogs. *Food Chem Toxicol* 28, doi 10.1016/0278-6915(90)90142-a, **1990**, 669-675
- [26] Webb, DR, Ridder GM., Alden, CL., Acute and subchronic nephrotoxicity of d-limonene in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 27, doi 10.1016/0278-6915(89)90118-x, **1989**, 639-649
- [27] Elcombe, CR., Odum, J., Foster, JR., Stone, S., Hasmall, S., Soames, AR., Kimber, I., Ashby, J., Prediction of rodent nongenotoxic carcinogenesis: Evaluation of biochemical and tissue changes in rodents following exposure to nine nongenotoxic NTP carcinogens. *Environ Health Perspect* 110, doi 10.1289/ehp.02110363, **2002**, 363-375
- [28] Göen, T, Helden von, F., Knecht, U., Drexler, H., Walter, D. Metabolism and toxicokinetics of 1,4-dioxane in humans after inhalational exposure at rest and under physical stress, *Arch Toxicol* 90, doi 10.1007/s00204-015-1567-9, **2016**, 1315-1324

- [29] Breuer, D., Eisenhardt, A., Ether, cyclisch (1,4-dioxan, Tetrahydrofuran). *Messung von Gefahrstoffen. Berlin. 42. Lfg. V/09. BGIA-Arbeitsmappe. Hrsg BGIA Institut für Arbeitsschutz, 1989*
- [30] Swenberg, JA., Lehman-McKeeman, LD., α 2-urinary globulin-associated nephropathy as a mechanism of renal tubule cell carcinogenesis in male rats. *Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis. IARC Scientific Publications, Band 147, IARC Lyon, 1999*, 95-118
- [31] El-Bayoumy, K., Upadhyaya, P., Desai, DH., Amin, S., Hoffmann, D., Wynder, EL., Effects of 1,4- phenylenebis(methylene)selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and d-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Anticancer Res 16, 1996*, 2709-2712
- [32] Uedo, N., Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Sakai, N., Yano, H., Otani, T., Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N ϵ -nitro-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett 137*, doi 10.1016/s0304-3835(98)00340-1, **1999**, 131-136
- [33] Kodama, R., Okubo, A., Sato, K., Araki E., Noda, K., Ide, H., Ikeda, T., Studies on d-Limonene as a gallstone solubilizer (IX). Effects on development of rabbit fetuses and offspring. *Oyo Yakuri 13, 1977*, 885-898
- [34] Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Band 73, IARC Lyon, 1999*, 307-327
- [35] Justus-Liebig-Universität Gießen. „Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation“, *Richtlinie für die Abgabe von Dissertationen am Fachbereich Medizin, Anlage 3*, <https://www.uni-giessen.de/fbz/fb11/forschung/promotion/prom/doktorand/riliprom>, **2022**

- [36] Blaszkewicz, K., Liesenhoff-Henze, Analytische Methoden Kreatinin im Urin, Wiley-VCH, doi 10.1002/3527600418.bi6027urie0012, **2015**
- [37] Helden von, F., Standardisierte Expositionen gegenüber 1,4-Dioxan zur Etablierung eines Biomonitorings. *Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen*, **2013**
- [38] Dashti-Ardakani, M., Human-experimentelle Untersuchungen zur Toxikokinetik von 1,2-Dichlorbenzol nach standardisierter Exposition. *Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen*, **2007**
- [39] Larsen, ST., Hougaard, KS., Hammer, M., et al., Effects of R- (+) - and S- (-) -limonene on the respiratory tract in mice. *Hum Exp Toxicol* 19, doi 10.1191/096032700682694233, **2000**, 457-466
- [40] Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Definition Wochenarbeitszeit und MAK Wert, *MAK-BAT Wert Liste 2021, Mitteilung 57*, **2021**, 9ff
- [41] Ružička L., The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, doi: 10.1007/bf02167631, **1953**, 357-367

8. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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. [35]“

Ort/Datum

Claudia Kirschbaum

9. Danksagung

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinem Mann Chris, meinen Eltern, meinen Geschwistern und allen weiteren freiwilligen Probanden für die tolle Unterstützung!

Zudem danke ich dem Team um Prof. Dr. Drexler und Prof. Dr. Göen, aus dem Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin von der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen.

Großen Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Dirk Walter, ohne dessen Geduld und Expertise diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank.

Claudia Kirschbaum