

Biomonitoring von PAK

Neues Verfahren am IPA erlaubt die Bestimmung der inneren Belastung mit Benzo[a]pyren



Tobias Weiß, Stephan Koslitz, Holger M. Koch, Thomas Brüning

Im Human-Biomonitoring (HBM) werden Expositionen gegenüber kanzerogenen Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) an Arbeitsplätzen seit mehreren Jahrzehnten routinemäßig anhand von 1-Hydroxypyren im Urin erfasst. Leitkomponente bei PAK-Expositionen ist das kanzerogen wirkende Benzo[a]pyren, für das bislang noch kein für die Routine geeignetes HBM-Verfahren zur Verfügung stand. Im IPA wurde daher jetzt eine neue, routinetaugliche Methode etabliert, mit der ein spezifisches Stoffwechselprodukt des Benzo[a]pyrens im Urin quantifiziert werden kann.

Bei der Verbrennung organischen Materials entstehen komplexe Gemische unterschiedlichster Verbindungen wie die Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Beschäftigte können unter anderem bei der Gewinnung von Steinkohlenteer, in Kokereien, im Straßenbau, in der Hütten- und der Feuerfestindustrie gegenüber PAK exponiert werden. Diese unterteilt man in „leichte“ PAK, Verbindungen mit drei bis vier aromatischen Ringen wie zum Beispiel Pyren und Chrysen, sowie in „schwere“ PAK, Verbindungen mit fünf bis sieben aromatischen Ringen wie Benzo[a]pyren (BaP), Benzo[b]fluoranthren, Dibenz[a,h]anthracen oder Indeno[1,2,3-cd]pyren. PAK kommen an Arbeitsplätzen und in der Umwelt immer im Gemisch vor. Da die einzelnen PAK ein unterschiedliches kanzerogenes Potenzial aufweisen, ist das kanzerogene Potenzial eines jeden Gemisches abhängig von seinem Substanzprofil. Dieses hängt wiederum wesentlich von den komplexen Umständen und Bedingungen

ab, unter denen die Verbrennung stattfindet. Hierzu zählen die Zusammensetzung des Verbrennungsguts aber auch die Verbrennungstemperatur. Das Verhältnis von Pyren zu Benzo[a]pyren kann in Abhängigkeit vom Arbeitsplatz um den Faktor 1 bis mehr als 100 variieren (ACGIH 2006). Die entsprechenden Einflussfaktoren sind bislang jedoch nicht vollständig geklärt.

Bewertung von PAK-Gemischen

Die zu den PAK zählenden Einzelverbindungen sind in Deutschland nicht als humankanzerogen eingestuft. Dazu gehört auch Benzo[a]pyren. Einzelne Vertreter haben sich jedoch im Tierversuch als krebserzeugend gezeigt und sind entsprechend in Kategorie 1B (CLP-Verordnung) beziehungsweise Kategorie 2 (MAK-Kommission) der krebserzeugenden Stoffe eingruppiert. Die internationale Krebsagentur der WHO führt Benzo[a]pyren hingegen als humankanzerogenen Stoff.

Kurz gefasst

- PAK-Expositionen treten an verschiedenen Arbeitsplätzen im Rahmen von Verbrennungsprozessen auf. Leitkomponente bei PAK-Expositionen ist das kanzerogen wirkende Benzo[a]pyren
- Bislang gab es noch kein für die Routine geeignetes Humanbiomonitoring-Verfahren.
- Mit der am IPA etablierten HBM-Methode kann nun ein Metabolit der PAK-Leitkomponente Benzo[a]pyren zuverlässig erfasst werden. Sie steht ab sofort für wissenschaftliche Fragestellungen, für die arbeitsmedizinische Praxis im Rahmen der Vorsorge oder für die Überwachung von Präventionsmaßnahmen zur Verfügung.

Gemäß TRGS 905 sind PAK-haltige Gefahrstoffe als krebserzeugend im Sinne der Gefahrstoffverordnung anzusehen, sofern der Massengehalt an Benzo[a]pyren gleich oder größer als 0,005 Prozent (50 mg/kg) ist. Die MAK-Kommission hat Verbrennungsprodukte aus organischem Material, die unter anderem PAK enthalten, als humankanzerogen eingestuft (Kategorie 1). Dies betrifft insbesondere Braun- und Steinkohlenteere, Steinkohlenteerpeche und -öle sowie Kokereirohgas, da sie einen besonders hohen Anteil an PAK enthalten und die krebserzeugende Wirkung dieser Gemische beim gewerblichen Umgang mit epidemiologischen Methoden nachgewiesen wurde.

Der Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) hat eine Exposition-Risiko-Beziehung (ERB) für Benzo[a]pyren in bestimmten PAK-Gemischen abgeleitet. Dabei wird Benzo[a]pyren als Leit-

komponente gesehen, die die Exposition gegenüber einem Gemisch von PAK (Gesamt-PAK) in den Bereichen Kokereien, Kohlevergasung und -verflüssigung, Aluminiumproduktion, Eisen- und Stahlgießereien und vielen mehr, repräsentiert. Aus der ERB wurden eine Toleranzkonzentration in Höhe von 700 ng/m³ und eine Akzeptanzkonzentration von aktuell 70 ng/m³ abgeleitet (TRGS 910).

Liegen in der Luft am Arbeitsplatz Benzo[a]pyren -Konzentrationen als Schichtmittelwert im Bereich oberhalb der Akzeptanzkonzentration von 70 ng/m³ vor, hat der Arbeitgeber den Beschäftigten geeignete persönliche Schutzausrüstung insbesondere geeignete Atemschutzgeräte zur Verfügung zu stellen. Die Anforderungen an den Atemschutz steigen gestuft in Abhängigkeit von der vorherrschenden Benzo[a]pyren-Arbeitsplatzkonzentration.

Außerberufliche Expositionsquellen

Da Benzo[a]pyren und andere PAK bei der Verbrennung von organischem Material freigesetzt werden, finden sie sich überall in der Umwelt. Der Mensch ist gegenüber Benzo[a]pyren aus einer Vielzahl von Quellen exponiert. Hierzu zählen vornehmlich die Umgebungsluft, Tabakrauchen aber auch der Verzehr gegrillter oder geräucherter Lebensmittel. Für nichtrauchende Personen aus der Allgemeinbevölkerung ohne zusätzliche berufliche PAK-Belastung wurde eine tägliche Aufnahme von 1,1 ng Benzo[a]pyren pro kg Körpergewicht abgeschätzt. Dies entspricht bei einer Normalperson von 70 kg einer täglichen Exposition von etwa 80 ng Benzo[a]pyren. Quellen einer Luftbelastung sind vornehmlich Abgase

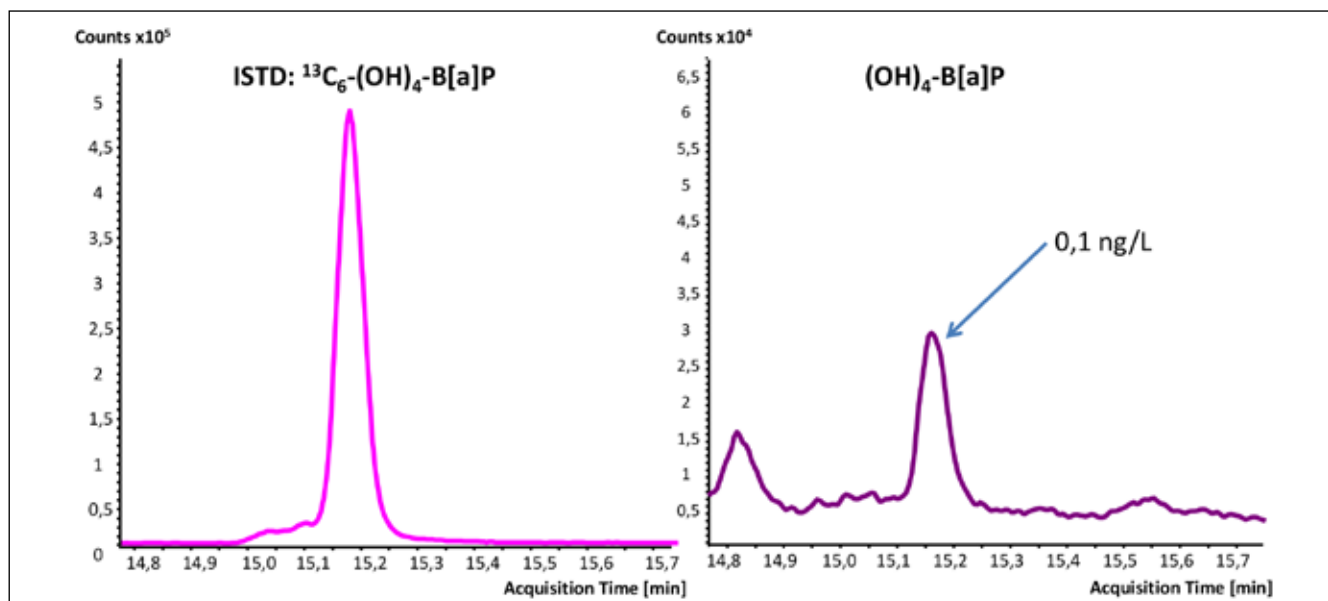


Abbildung 1: Beispielchromatogramm einer mit (OH)₄-Benzo[a]pyren dotierten Urinprobe (0,1 ng/L, entspricht 2x LOQ), die zuvor kein (OH)₄-BaP enthielt.

aus Straßenverkehr und Hausfeuerung sowie Industrieemissionen. Laut der EU-Richtlinie gibt es einen Benzo[a]pyren-Zielwert von 1 ng/m^3 als Jahresmittelwert. Dieser Zielwert wird heutzutage in ländlichen wie auch städtischen Gebieten in Deutschland in der Regel eingehalten. Auch Tabakrauch enthält PAK. Im Hauptstromrauch einer Zigarette findet sich Benzo[a]pyren im Bereich bis etwa 10 ng. Ein durchschnittlicher Raucher mit einem täglichen Konsum von 20 Zigaretten ist inhalativ gegenüber etwa 100 ng Benzo[a]pyren pro Tag exponiert. PAK entstehen auch bei Herstellungs- und Behandlungsverfahren, bei denen Lebensmittel stark erhitzt werden oder mit Verbrennungsgasen beziehungsweise Rauch in Kontakt kommen. Geräucherte Lebensmittel weisen zu meist Benzo[a]pyren-Rückstände unterhalb von $1 \mu\text{g/kg}$ auf, in Einzelfällen auch oberhalb von $100 \mu\text{g/kg}$. Vergleichsweise hohe Gehalte an BaP können in gegrillten Fleisch- und Wurstwaren vorkommen, insbesondere wenn bei offenem Holzkohlenfeuer Fett in die Glut tropft und dort „verbrennt“. So wurden in gegrilltem Fleisch Benzo[a]pyren-Konzentrationen bis $5 \mu\text{g/kg}$ gefunden (Kazerouni et al. 2001).

Biomonitoring von PAK

1-Hydroxypyren im Urin stellt den klassischen seit mehr als zwei Jahrzehnten verwendeten Biomonitoring-Parameter dar, um umweltbedingte wie auch beruflich bedingte PAK-Expositionen zu erfassen. Für umweltbedingte Hintergrundbelastungen hat die MAK-Kommission einen Biologischen Arbeitsstoff-Referenzwert, kurz BAR, in Höhe von $0,3 \mu\text{g}$ 1-Hydroxypyren pro Gramm Kreatinin abgeleitet. Der BAR

orientiert sich als rein statistischer Wert am 95. Perzentil der Verteilung entsprechender Messwerte in der beruflich nicht exponierten Allgemeinbevölkerung. Er wurde im Wesentlichen auf Basis des Umweltsurveys 1998 abgeleitet und gilt nur für Nichtraucher (Becker et al. 2002).

3-Hydroxybenzo[a]pyren nicht als Parameter geeignet

In der internationalen Literatur sind zwei ähnliche Verfahren publiziert, die die Bestimmung von 3-Hydroxybenzo[a]pyren im Urin als Benzo[a]pyren-Expositionsmarker im HBM als prinzipiell geeignet erscheinen lassen (Simon et al. 2000, Barbeau et al. 2011). Trotz erheblichen Aufwandes ist es jedoch weder gelungen, die Methoden nachzustellen noch ein hinreichend zuverlässiges Biomonitoringverfahren für das Phase-II-Glucuronsäurekonjugat des 3-Hydroxybenzo[a]pyrens im Urin selbst zu entwickeln. Die Schwierigkeiten lagen in einer Kombination von Effekten, die im unteren Konzentrationsbereich zu nicht reproduzierbaren Verlusten an Analyten führte. So wurde im Rahmen der Methodenentwicklung unter anderem festgestellt, dass sich der kommerziell erhältliche 3-Hydroxybenzo[a]pyren-Standard mit der Zeit abbaute beziehungsweise zersetzte. Zwischenzeitlich hat der Hersteller des Standards wegen dieser Stabilitätsprobleme sein Produkt vom Markt genommen. Entsprechende Instabilitäten wurden von uns in organischen Lösungsmitteln wie auch in Wasser und Urin beobachtet, so dass zu befürchten ist, dass auch in gelagerten nativen Urinproben eine Zersetzung von 3-Hydroxybenzo[a]pyren stattfindet. Daher wurde zusätzlich das Glucuronsäurekonjugat des

INFO

AGS: Ausschuss für Gefahrstoffe berät das Bundesministerium für Arbeit und Soziales zu Fragen der Gefahrstoffverordnung.

Akzeptanzkonzentration: Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz, die über seine Exposition-Risiko-Beziehung dem Akzeptanzrisiko entspricht und bei Unterschreitung mit einem niedrigen, hinnehmbaren Krebsrisiko verbunden ist.

CLP-Verordnung oder Verordnung (EG) Nr.

1272/2008: „Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures (Verordnung über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen).

ERB: Exposition-Risiko-Beziehung eines Stoffes beschreibt den Zusammenhang zwischen der Massenkonzentration und der statistischen Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Erkrankung.

GefStoffV: Die Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Gefahrstoffverordnung) regelt umfas-

send die Schutzmaßnahmen für Beschäftigte bei Tätigkeiten mit Gefahrstoffen.

MAK-Kommission: Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Ihre Aufgabe besteht in der wissenschaftlichen Beratung des Senates der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Bundes-/Landesregierungen, Parlamente und Behörden zu Fragen des Gesundheitsschutzes bei Exposition gegen Gefahrstoffe, insbesondere im Arbeitsschutz.

TRGS 905: Technische Regeln für Gefahrstoffe – Verzeichnis krebserzeugender, keimzellmutagener oder reproduktionstoxischer Stoffe.

TRGS 910: Technische Regeln für Gefahrstoffe – Risikobezogenes Maßnahmenkonzept für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen.

Toleranzkonzentration: Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz, die über seine Exposition-Risiko-Beziehung dem Toleranzrisiko entspricht und bei Überschreitung mit einem hohen, nicht hinnehmbaren Krebsrisiko verbunden ist.

INFO

PAK-bedingte Berufskrankheiten

Erkrankungen durch PAK können unter bestimmten Bedingungen als Berufskrankheit anerkannt werden. Hierzu zählen die Berufskrankheiten nach Nr. 1321 „Harnblasenkrebs durch PAK nach Einwirkung von mindestens 80 BaP-Jahren [($\mu\text{g}/\text{m}^3$) x Jahre]“, Nr. 4110 „Lungenkrebs durch Kokereiohrgase“, Nr. 4113 „Lungenkrebs durch PAK nach Einwirkung von mind. 100 BaP-Jahren“, Nr. 4114 „Lungenkrebs durch das Zusammenwirken von Asbestfaserstaub und PAK“.

3-Hydroxybenzo[a]pyren O-3-Hydroxybenzo[a]pyrenylglucuronid synthetisiert, um zu prüfen, inwieweit dieser Parameter für ein Humanbiomonitoring geeignet ist. Im Glucuronsäurekonjugat liegt die Phenolfunktion des 3-Hydroxybenzo[a]pyrens geschützt als Ether vor, so dass im Gegensatz zum ungeschützten Benzo[a]pyren-Metaboliten keine Instabilitäten beobachtet werden sollten. Allerdings zeigte sich, dass auch beim Glucuronsäurekonjugat insbesondere im relevanten, niedrigen Konzentrationsbereich unterhalb von etwa 5 ng/l teils reproduzierbar aber auch teils nicht reproduzierbare Effekte, wie die Adsorption an Glasgefäßen und/oder Quencheffekte im Massenspektrometer, auftraten, die einer zuverlässigen Quantifizierung in diesem Konzentrationsbereich entgegenstehen.

Als Ergebnis aus den umfangreichen Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung und -validierung muss

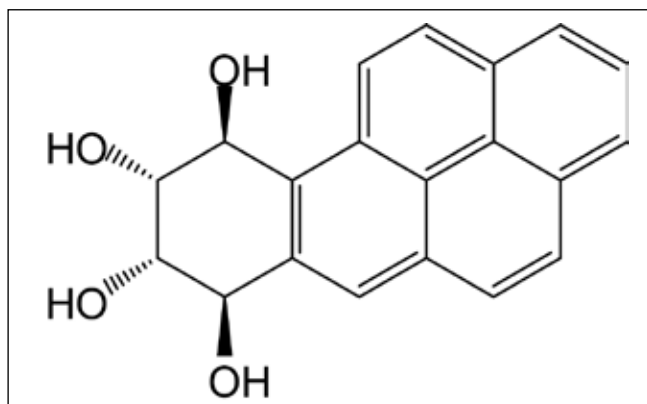


Abbildung 2: trans-anti-7,8,9,10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren – kurz $(\text{OH})_4$ -Benzo[a]pyren bzw. $(\text{OH})_4$ BaP

festgehalten werden, dass insbesondere aufgrund der chemischen Instabilität erhebliche Zweifel bestehen, ob 3-Hydroxybenzo[a]pyren generell einen geeigneten, routinefähigen Parameter für ein Humanbiomonitoring darstellt.

Neu etablierte Methode

$(\text{OH})_4$ -Benzo[a]pyren (trans-anti-7,8,9,10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren) wird erst seit kurzem als alternativer, vielversprechender Biomarker für eine Benzo[a]pyren Exposition diskutiert (Zhong et al. 2011). Dieser Biomarker repräsentiert zum einen den kanzerogenen Wirkmechanismus des Benzo[a]pyren und wird zum anderen in deutlich höheren Konzentrationen ausgeschieden als 3-Hydroxybenzo[a]pyren. Ferner wurden für $(\text{OH})_4$ -Benzo[a]pyren auch keine Instabilitäten beobachtet. Die am IPA ein-



gesetzte Methode zur Bestimmung des (OH)₄-BaP basiert auf einem von Barbeau et al. 2018 publizierten Verfahren, das leicht modifiziert wurde. Dabei erfolgt die Quantifizierung nach kapillargaschromatographischer Trennung an einem Tandem-Massenspektrometer mit Large-volume Injektion unter Verwendung von isopenmarkierten (OH)₄-Benzo[a]pyren als internem Standard. Das Verfahren weist eine Bestimmungsgrenze von 0,05 ng (OH)₄-BaP pro Liter Urin auf. Die Wiederfindungen lagen bei 91 Prozent (1 ng/L) beziehungsweise 97 Prozent (20 ng/L). Die Präzisionen in der Serie wie auch von Tag zu Tag waren jeweils besser als 8 Prozent.

Erste Untersuchungen von Urinproben von Personen aus der Allgemeinbevölkerung zeigen innere Benzo[a]pyren-Expositionen mit (OH)₄-Benzo[a]pyren im Bereich bis etwa 0,1 ng/L. Bei etwa 90 Prozent der untersuchten Proben konnten Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze gefunden werden. Berufliche Expositionen lagen in der Regel oberhalb von 0,1 bis etwa 4 ng/L Urin.

Fazit

Mit dem am IPA etablierten neuen routinefähigen Biomonitoring-Verfahren ist es möglich, PAK-Expositionen auch anhand eines Metaboliten der PAK-Leitkomponente Benzo[a]pyren zuverlässig zu erfassen. Das mit dem Verfahren im Urin gemessene Benzo[a]pyren-Tetrol hat als Biomonitoringparameter den Vorteil, dass es im Stoffwechsel aus dem ultimativ kanzerogen wirkenden Benzo[a]pyren-Metaboliten, dem anti-Benzo[a]pyren-dihydrodiolepoxid entsteht und somit quantitativ auch den kanzerogenen Stoffwechselfad des Benzo[a]pyren abbildet. Das Verfahren steht ab sofort für wissenschaftliche Fragestellungen oder für die arbeitsmedizinische Praxis im Rahmen der Vorsorge zur Verfügung. Ebenso können damit Präventionsmaßnahmen etabliert und überwacht werden.

Die Autoren:

**Prof. Dr. Thomas Brüning, Dr. Holger M. Koch,
Stephan Koslitz, Dr. Tobias Weiß**
IPA

Literatur

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Edition – Supplement 2006; ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA

Barbeau D, Lutier S, Choïnard L, Marques M, Persoons R, Maître A. Urinary trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene as the most relevant biomarker for assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. *Environ Int* 2018; 112: 147-155

Barbeau D, Maître A, Marques M. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst* 2011; 136: 1183-91

Becker K, Kaus S, Krause C, Lepom P, Schulz C, Seiwert M, Seifert B. Umwelt-Survey 1998, Band III: Human-Biomonitoring. Stoffgehalte in Blut und Urin der Bevölkerung in Deutschland. *WaBoLu-Heft* 2002; 01/02

Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 423-36

Simon P, Lafontaine M, Delsaut P, Morele Y, Nicot T. Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatography B: Biomed Sci Appl* 2000; 748: 337-348

Zhong Y, Steven Carmella SG, Hochalter JB, Balbo S, Hecht S. Analysis of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine: A biomarker for directly assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure plus metabolic activation. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 73-80