

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Arbeitsmedizin
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Ute Witting-

**Entwicklung einer Methode zur gaschromatographisch-
massenspektrometrischen Bestimmung von
3-Hydroxyfettsäuren aus bakteriellem Endotoxin**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Doris Julia Zürner (geb. Matei)
aus Mediasch / Rumänien

2009

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Norbert Binding

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff

Tag der mündlichen Prüfung:

24.02.2009

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Arbeitsmedizin**

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ute Witting
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Binding
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff

Zusammenfassung

Entwicklung einer Methode zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von 3-Hydroxyfettsäuren aus bakteriellem Endotoxin

Doris Julia Zürner (geb.Matei)

Als Standardmethode zur Bestimmung von Endotoxin gilt derzeit der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL). Dieser Test erfasst jedoch nicht die Endotoxin-Quantität, sondern die Endotoxin-bedingte biologische Aktivität einer Probe. Zudem ist der Test nicht Endotoxin-spezifisch und störanfällig. Der Bedarf für alternative Verfahren ist daher augenscheinlich, umso mehr, als die zuverlässige messtechnische Erfassung von Endotoxin in Aerosolen mit komplexer Matrix grundlegende Voraussetzung für einen effektiven Arbeitsschutz bei Endotoxin-Exposition ist. Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative gaschromatographisch/massenspektrometrische Methode zu entwickeln, die die zuverlässige und sensitive Quantifizierung von Endotoxin in Staubproben in arbeitsplatz- und umweltrelevanten Konzentrationen erlaubt.

Endotoxine sind amphiphilische bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Lipidanteil (Lipid A). Der Lipid A-Anteil enthält charakteristische 3-Hydroxyfettsäuren (3-OH FA), die für die Quantifizierung genutzt werden können. Nach Hydrolyse und Extraktion werden die freien Fettsäuren in einer zweistufigen Reaktion derivatisiert, wobei die Säurefunktion mit 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid verestert wird und in die Hydroxyfunktion mit Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid eine Trimethylsilylgruppe eingeführt wird. Diese Derivate werden mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung im Single Ion Modus (SIM) mit Electron Ionization (EI) getrennt und quantifiziert.

Die Methodenentwicklung erfolgte zunächst mit einem Standardgemisch Endotoxintypischer 3-Hydroxyfettsäuren. Die Basislinien-Trennung aller 3-OH FA-Derivate (10:0 3-OH, 12:0 3-OH, 14:0 3-OH, 16:0 3-OH sowie 15:0 3-OH als interner Standard) konnte realisiert werden. Für die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus wurde das Pentafluorbenzyl Kation (m/z 181) genutzt, das in allen Fällen den Basispeak der Massenspektren bildet. Die erstellten Kalibrationsfunktionen zweiter Ordnung wiesen ausgezeichnete Korrelationskoeffizienten auf. Mit Standardabweichungen in der Serie zwischen 3 und 11% bzw. von Tag zu Tag zwischen 0,6 und 10% konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode gezeigt werden. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 30 und 40 fmol/ μ l. Nach Abschluss der Methodenentwicklung konnte die Validität der Methode durch Aufarbeitung und Analyse reiner LPS von *E. coli* demonstriert werden.

Damit kann eine präzise und sensitive Alternativmethode zur Bestimmung von Endotoxin zur Verfügung gestellt werden. Ein wesentlicher Vorteil der neuen Methode ist, dass eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit durch Einsatz eines anderen, insbesondere für halogenierte Substanzen geeigneten Ionisierungsverfahrens (Negative Ion Chemical Ionization, NICI) erreichbar ist. In einer nachfolgenden Arbeit konnte dies mittlerweile mit einer Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 100 belegt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2009

Diese Arbeit ist meinem Ehemann Helmut Zürner gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden.....	5
2.1 Chemikalien.....	5
2.2 Geräte	5
2.3 Stammlösungen	7
2.3.1 Stammlösungen der 3-Hydroxyfettsäuren	7
2.3.2 Kalibrationslösungen	7
2.4 Derivatisierungsverfahren	8
2.4.1 Standardlösungen für die Derivatisierung	8
2.4.2 Derivatisierung im „Eintopfverfahren“ bei unterschiedlicher Temperatur.....	8
2.4.3 Stufenweise Derivatisierung mit Zugabe von Essigsäure.....	9
2.4.4 Stufenweise Derivatisierung bei unterschiedlicher Temperatur.....	9
2.4.5 Standard-Derivatisierungsverfahren.....	10
2.5 Gaschromatographische Trennung und Massenspektrometrie	12
2.5.1 Gaschromatographische Trennung mit Cool-on-Column-Injektion...	12
2.5.2 Single-Ion-Modus und Total-Ion-Modus	12
2.6 Kalibration	13
2.7 Hydrolyse des Lipopolysaccharids von E. coli.....	13

2.8 Qualitätskriterien	14
2.8.1 Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	14
2.8.2 Bestimmung der Standardabweichung.....	15
2.8.2.1 Standardabweichung in der Serie	15
2.8.2.2 Standardabweichung von Tag zu Tag.....	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Massenspektren der Derivate der 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0 3- OH Fettsäuren	17
3.2 Gaschromatographische Trennung	20
3.2.1 Cool-on-Column Methode	20
3.2.2 Fragmentierung der Derivate	21
3.3 Bestimmung der 3-OH Fettsäuren aus Lipopolysacchariden	23
3.4. Kalibrationsfunktionen der 3-Hydroxyfettsäuren.....	24
3.5. Standardabweichungen	27
3.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	27
4. Diskussion.....	28
4.1 Die Zellwandstruktur gram-negativer Bakterien	28
4.1.1 Struktureller Aufbau von Lipopolysacchariden (LPS)	30
4.2 Wirkung von Endotoxinen auf den menschlichen Organismus	34
4.2.1 Medizinische Relevanz von Endotoxin	34

4.2.2 Pathophysiologie der durch Endotoxine hervorgerufenen Entzündungsreaktion.....	35
4.3 Endotoxinvorkommen in privaten und öffentlichen Umgebungen ..	39
4.4 Arbeitsmedizinische Prävention	43
4.4.1 Rechtliche Regelung des Arbeits- und Gesundheitsschutzes	43
4.4.2 Einstufung von Gefahrstoffen und biologischen Arbeitsstoffen	46
4.4.3 Grenzwerte.....	48
4.4.3.1 Arbeitsplatzgrenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz	48
4.4.3.2 Biologische Grenzwerte	50
4.4.4 Richtwerte für Endotoxinbelastungen in der Luft am Arbeitsplatz	50
4.5 Nachweis von Endotoxinen	53
4.5.1 Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test	53
4.5.2 Chemisch-analytische Nachweisverfahren zur Bestimmung von Endotoxin	55
4.5.2.1 Grundlagen der Gaschromatographie	56
4.5.2.2 Grundlagen der Massenspektrometrie	58
4.6. Alternativmethoden zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin	62
4.7 Bewertung der neuen Methode zur Quantifizierung von bakteriellem LPS mit Hilfe der GC/MS.....	63
4.8. Beantwortung der eingangs gestellten Fragen	65
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis.....	68

7. Lebenslauf	89
8. Danksagung	91

1. Einleitung

Endotoxine sind amphiphilische Lipopolysaccharide (LPS), bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Lipidanteil. Endotoxine haben bei der lebenden Bakterienzelle neben strukturellen Aufgaben wichtige kontakt-mediatorische Funktionen (antigene Wirkung, Adhäsine, etc.) (TODAR et al. 2002).

Wird die Bakterienzelle durch (Auto)Lyse oder Phagozytose zerstört, entfaltet das freigesetzte LPS eine toxische (pyrogene) Wirkung.

Der Lipidanteil (Lipid A) besteht aus einem Disaccharid, an das über Ester- oder Amidbindungen 3-Hydroxyfettsäuren gekoppelt sind. Lipid A stellt die endotoxisch aktive Komponente von LPS dar (WESTPHAL und LÜDERITZ 1954, RIETSCHEL et al. 1982, GALANOS et al. 1984, BRADE und RIETSCHEL 1986).

Endotoxine haben nach zunehmend gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnissen aufgrund ihrer potentiell pathogenen Wirkung vielfältigen Einfluss auf eine Reihe von Erkrankungen des menschlichen Organismus (RIETSCHEL et al. 1996).

Endotoxine gelten mittlerweile als Hauptursache für die auf gram-negative Bakterien zurückzuführende Septikämie, sowie für den unter Umständen daraus resultierenden septischen Schock, eine katastrophal und oft tödlich verlaufende systemische Reaktion des Körpers (GLAUSER et al. 1991).

Darüber hinaus besteht weitgehend Konsens darüber, dass zwischen luftgetragener Endotoxinbelastung und bestimmten chronischen respiratorischen Syndromen bzw. akuten Atemwegserkrankungen wie Husten, erhöhte Schleimproduktion, Niesen, Atemnot oder Brustenge ein Zusammenhang existiert (RYLANDER 1987, JACOBS 1989, MILTON und CHRISTIANI 1989, HEEDERIK et al. 1991, SMID et al. 1994, SCHWARTZ et al. 1995).

Bakterien und bakterielle Substanzen (darunter Endotoxin) werden als organische Substanzen primär durch die Umgebungsluft übertragen und sind in weiten Bereichen des häuslichen, sozialen und vor allem arbeitsspezifischen

Umfelds anzutreffen: in landwirtschaftlichen Tierzucht- und Tierverarbeitungsbetrieben (ATTWOOD et al. 1986, VINZENTS und NIELSEN 1992), in getreideverarbeitenden Betrieben (SMID et al. 1992, SCHWARTZ et al. 1995), woll- und baumwollverarbeitenden Betrieben (ÖZESMI et al. 1987, LI et al. 1995), Naturlatexproduktionsstätten (HAISHIMA et al. 2001), Obst- und Gemüseplantagen oder Gewächshäusern (DUTKIEWICZ 1994) bis hin zu Brauereien (CARVALHAIRO et al. 1994), Abwasserkläranlagen (RYLANDER 1999) oder Betrieben der papierverarbeitenden Industrie (RYLANDER et al. 1999).

Als Methode zum Nachweis von Endotoxinen gilt heute der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test als Standardverfahren. Dieser biologische Test ist sehr sensitiv auf Endotoxine, darüberhinaus aber weitgehend ungeeignet, um absolute Endotoxinmengen zu bestimmen (LARSSON und SARAF 1996). Zudem lässt sich der LAL-Test nur unzureichend standardisieren, weil die Löslichkeit von Endotoxin sowie die angewandte Extraktionsmethodik oft eindeutige Schlussfolgerungen und Kreuzvergleiche über mehrere unterschiedliche Studien/Tests erschweren (EDUARD et al. 2004). Daher wurden in jüngerer Zeit alternative chemisch-analytische Methoden entwickelt und für die quantitative Bestimmung von Endotoxin erprobt.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyseverfahren setzen den Fokus hauptsächlich auf die Quantifizierung der 3-Hydroxyfettsäuren von LPS (SONESSEN et al. 1990, MIELNICZUK et al. 1993, WALTERS et al. 1994, SARAF und LARSSON 1996, BINDING et al. 2004), Neben "klassischen" GC/MS-Verfahren kommen auch erweiterte Analyseverfahren wie die Ionenfallen-Tandemmassenspektrometrie zum Einsatz (GC/MS/MS), welche sich vor allem durch verbesserte Nachweisspezifität auszeichnen (LARSSON und SARAF 1996).

Eine zuverlässige und sensitive chemisch-analytische Methode zur Quantifizierung von Endotoxinen wurde von Jaschinski am Institut für Arbeitsmedizin Münster in ihrer Arbeit zur Entwicklung einer gaschromatographischen Methode mit massenselektiver Detektion zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin

entwickelt (BINDING et al. 2004, JASCHINSKI 2004). Bei der vorgestellten Methode erfolgte die Bestimmung der Endotoxinkonzentrationen über ein einstufiges Derivatisierungsverfahren nach hydrolytischer Abspaltung und Extraktion der 3-Hydroxyfettsäuren. Diese wurden mit einem Reagenzgemisch bestehend aus N-Methyl-bis-trifluoracetamid (Reagenz A) und N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid (Reagenz B) derivatisiert, wobei Reagenz A selektiv mit der Hydroxylfunktion und Reagenz B mit der Carboxylfunktion der 3-Hydroxyfettsäuren reagierte.

Die Derivate der 3-Hydroxyfettsäuren wurden mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung im Single-Ion-Modus mit Electron-Impact-Ionisierung getrennt und quantifiziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue Methode zur Bestimmung von 3-Hydroxyfettsäuren (3-OH FA) zu entwickeln, die als Grundlage für ein zukünftiges Verfahren zur Bestimmung bakterieller LPS (Endotoxin aus Lipopolysacchariden) dienen soll. Als Derivatisierungsreagenzien wurden Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid und 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid gewählt. Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse in dieser Arbeit erfolgte mit Elektronenionisation (Electron Ionization, EI). Die Pentafluorobenzylgruppe erlaubt jedoch für zukünftige Untersuchungen auch die chemische Ionisierung (NICI, Negativ Ion Chemical Ionization), die zu einer deutlich empfindlicheren Detektion führen sollte.

Folgende Fragen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Gelingt die reproduzierbare Derivatisierung der 3-Hydroxyfettsäuren mit den Reagenzien Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid und 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid?
2. Lassen sich die Derivate der 3-Hydroxyfettsäuren gaschromatographisch basisliniengetrennt nachweisen?
3. Ist mit den gewählten Derivatisierungsverfahren die empfindliche und reproduzierbare Quantifizierung der 3-Hydroxyfettsäuren möglich?
4. Ist die Methode geeignet, als Grundlage für neue Bestimmungsmethoden für Endotoxin zu dienen?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

3-Hydroxydecansäure (10:0 3-OH FA), >98 %, (Sigma, Steinheim)

3-Hydroxydodecansäure (12:0 3-OH FA), ≥99 %, (Sigma, Steinheim)

3-Hydroxytetradecansäure (14:0 3-OH FA), ≥98 %, (Sigma, Steinheim)

3-Hydroxypentadecansäure (15:0 3-OH FA), >98 %, (Larodan, Malmö)

3-Hydroxyhexadecansäure (16:0 3 OH FA), 99%, (Sigma, Steinheim)

N,N–Diisopropylethylamin, redistilled, 99,5% (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid, 99%, (Aldrich, Steinheim)

Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, 99+%, (Aldrich, Steinheim)

Essigsäure, Acetic acid glacial 100% p.a., (Roth, Karlsruhe)

Acetonitril, (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

Lipopolysaccharid von Escherichia coli 055:B5, (Sigma-Aldrich, St. Louis)

Chloroform p.a. (Merck, Darmstadt)

2.2 Geräte

Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung:

GC 5890 Serie II, Massenselektiver Detektor MSD 5971 A, Injektor 6890
(Agilent Technologies, Waldbronn)

HP Chem Station B.02.02 (Agilent Technologies, Waldbronn)

Trennsäulen: HP-1701 (L=30 m, ID: 0,25mm, Filmdicke: 0,25µm), (Agilent Technologies, Waldbronn) für Cool-on-column-Injektion



Abbildung 1: Gaschromatograph 5890 Series II

Bördelgläschen 1,1 ml, Rollrandflasche ND 11, Klarglas (IVA Analysentechnik e.K., Meerbusch)

Eppendorf-Transferpipetten 10, 100, 1000, 5000 μ l mit dazugehörigen Pipettenspitzen, ep. T.I.P.S Standard 0,1-20 μ l, 50-1000 μ l, 100-5000 μ l (Brand, Wertheim)

Aluminium-Bördel-Verschlusskappen butylgummibeschichtet, 11 mm (IVA-Analysentechnik e.K., Meerbusch)

2.3 Stammlösungen

2.3.1 Stammlösungen der 3-Hydroxyfettsäuren

12,5 μmol der jeweiligen 3-Hydroxyfettsäuren werden in 50 ml Chloroform gelöst:

Molmasse	Einwaage für 50 ml Lösung	
10:0 3-OH	188 g/mol	2,35 mg
12:0 3-OH	216 g/mol	2,70 mg
14:0 3-OH	244 g/mol	3,05 mg
15:0 3-OH	258 g/mol	3,22 mg
16:0 3-OH	272 g/mol	3,40 mg

Die Konzentration der Stammlösung beträgt für die jeweilige Fettsäure 250 $\mu\text{mol/l}$.

2.3.2 Kalibrationslösungen

Aliquote der Stammlösungen der jeweiligen 3-OH Fettsäuren werden entnommen und in ein Bördelgläschen gegeben. Als interner Standard werden 20 μl 15:0 3-OH Fettsäure hinzugefügt. Hergestellt werden Kalibrationslösungen (Derivatisierungsverfahren vgl. Kapitel 2.4.5) mit folgenden Konzentrationen:

25 nmol/100 μl (= 250 pmol/ μl) : 100 μl je Fettsäure

12,5 nmol/100 μl (= 125 pmol/ μl) : 50 μl je Fettsäure

6,25 nmol/100 μl (= 62,5 pmol/ μl) : 25 μl je Fettsäure

3,125 nmol/100 μl (= 31,25 pmol/ μl) : 12,5 μl je Fettsäure

1,56 nmol/100 μl (= 15,6 pmol/ μl) : 6,25 μl je Fettsäure

2.4 Derivatisierungsverfahren

2.4.1 Standardlösungen für die Derivatisierung

Lösung 1 bestehend aus: 100 µl N,N-Diisopropylethylamin und 900 µl Acetonitril

Lösung 2 bestehend aus: 100 µl 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid und 900 µl Acetonitril

2.4.2 Derivatisierung im „Eintopfverfahren“ bei unterschiedlicher Temperatur

100 µl der jeweiligen Fettsäurenstammlösung werden in ein Bördelgläschen gegeben und im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. 50 µl der Lösung 1 und 50 µl der Lösung 2 sowie 50 µl Bis(trimethylsilyl)fluoracetamid werden hinzugegeben. Das Bördelgläschen wird verschlossen und 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend wird im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. 100 µl Acetonitril werden hinzupipettiert. Aliquote der Reaktionslösung werden für die GC/MS-Messungen verwendet.

Nach der gleichen Methode wird die Derivatisierung bei 40 °C, 60 °C und 80 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach Abkühlen der Proben werden diese im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und in je 100 µl Acetonitril aufgenommen. Aliquote der Reaktionslösungen werden für die GC/MS-Messungen verwendet.

2.4.3 Stufenweise Derivatisierung mit Zugabe von Essigsäure

100 µl der Stammlösungen der jeweiligen Fettsäuren werden in ein Bördelgläschen gegeben und im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

50 µl der Lösung 1 und 50 µl der Lösung 2 werden hinzupipettiert. Das Bördelgläschen wird verschlossen, 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in 50 µl der Lösung 1 sowie 50 µl Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetoamid aufgenommen. Das Bördelgläschen wird verschlossen und im Wasserbad für 5 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lösung im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und in 100 µl Acetonitril aufgenommen.

2 µl Essigsäure zur Umsetzung überschüssigen Pentafluorobenzylbromids werden hinzupipettiert, das Bördelgläschen wird verschlossen und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Aliquote der Reaktionslösung werden für die GC/MS-Messung verwendet.

2.4.4 Stufenweise Derivatisierung bei unterschiedlicher Temperatur

100 µl der Stammlösungen der 10:0 3-OH, 12:0 3-OH, 14:0 3-OH und 16:0 3-OH Fettsäuren werden in ein Bördelgläschen gegeben und im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. 50 µl der Lösung 1 sowie 50 µl der Lösung 2 werden hinzugegeben. Das Bördelgläschen wird verschlossen, 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. 50 µl der Lösung 1 und 50 µl Bis(trimethylsilyl)-fluoracetamid werden hinzugegeben. Das Bördelgläschen wird verschlossen und bei Raumtemperatur 60 min stehen gelassen.

3 weitere Proben werden nach der gleichen Methode hergestellt und nach Zugabe des Bis(trimethylsilyl)fluoracetamids für 60 min im Wasserbad auf 40 °C, 60 °C und 80 °C erhitzt.

Nach Abkühlen werden die Proben im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Aliquote der Reaktionslösungen werden für die GC/MS – Messungen verwendet.

Die Resultate haben gezeigt, dass die optimale Derivatisierung stufenweise und bei 60 °C erfolgt. Diese Methode wird als Standardmethode definiert und angewandt.

2.4.5 Standard-Derivatisierungsverfahren

Aliquote der Stammlösungen der 3-OH Fettsäuren werden in ein Bördelgläschen gegeben und vor der Derivatisierung im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Zu dem im Stickstoffstrom eingedampften 3-OH Fettsäurengemisch werden je 50 µl der Lösung 1 und 50 µl der Lösung 2 pipettiert. Das Bördelgläschen wird verschlossen, für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Je 50 µl der Lösung 1 und 50 µl Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid werden zugegeben. Die Reaktionslösung wird im verschlossenem Bördelgläschen für 5 min im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Probe werden Aliquote der Reaktionslösung für die GC/MS-Messungen verwendet.

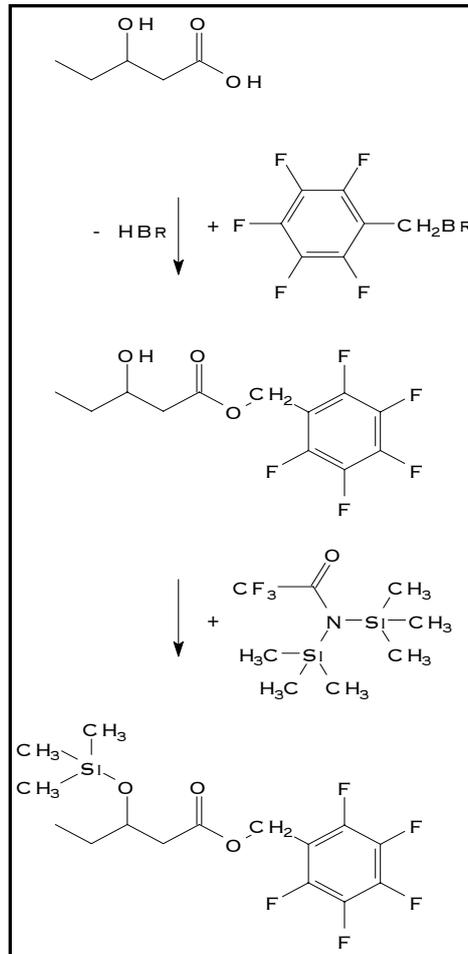


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion

2.5 Gaschromatographische Trennung und Massenspektrometrie

2.5.1 Gaschromatographische Trennung mit Cool-on-Column-Injektion

Temperaturen:

Injektor: Starttemperatur: 153 °C (folgt der Ofentemperatur)

Detektor: 280 °C

Ofen: 150-250 °C

Temperaturgradient: 10 min bei 150 °C
7 °C/min bis 250 °C
15 min bei 250 °C

Analysedauer: 39,29 min

Trägergas: Helium 5.0

Säulenvordruck: 2,2 psi

Injiziertes Volumen: 1 µL

2.5.2 Single-Ion-Modus und Total-Ion-Modus

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt im Total-Ion-Modus (Total Ion Chromatogramm = TIC) sowie im Single-Ion-Modus (SIM).

Im Total-Ion-Modus werden alle vorhandenen Ionen detektiert, im Gegensatz dazu werden im Single-Ion-Modus Ionen einer definierten Masse innerhalb eines definierten Zeitfensters detektiert.

Für die Single-Ion-Modus-Detektion der 3-Hydroxyfettsäurederivate werden die Ionen m/z 181 gewählt. Die Massenzahlen und Zeitfenster der 3-Hydroxyfettsäurederivate für die Single-Ion-Modus-Detektion zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Massenzahlen und Zeitfenster der 3-Hydroxyfettsäurederivate bei SIM Detektion

Fettsäure	Molmasse der Derivate [g]	Ion [m/z]	Zeitfenster der Detektion [min]
10:0 3-OH	440	181	20-21
12:0 3-OH	468	181	23
14:0 3-OH	496	181	26
15:0 3-OH	510	181	27-28
16:0 3-OH	524	181	29-30

2.6 Kalibration

Für die Kalibration werden jeweils 1 µl der Kalibrationslösungen (siehe Kapitel 2.3.2) mit Hilfe der GC/MS analysiert. Die Kalibrationsfunktion wird durch Auftragen des Quotienten der Peakfläche der jeweiligen 3-Hydroxyfettsäure und des internen Standards (15:0 3-OH Fettsäure) gegen die Konzentration erstellt.

2.7 Hydrolyse des Lipopolysaccharids von E. coli

Zur Quantifizierung von Lipopolysacchariden über die 3-Hydroxyfettsäuren ist deren hydrolytische Abspaltung vor der Derivatisierung erforderlich.

Die alkalische Hydrolyse erfolgte wie folgt (JASCHINSKI 2004):

500 µl einer Stammlösung der LPS aus E. coli werden in ein Reagenzglas mit Schraubdeckel gegeben und mit 1000 µl 8M Natronlauge versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 6 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wird mit 1100 µl 8M Salzsäure angesäuert und zweimal mit je 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Zur Verbesserung der Phasentrennung wird jeweils für 15 min zentrifugiert (1500 U/min). Die organischen Phasen werden abpipettiert, in einem Reagenzglas mit Schraubdeckel vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet.

Nach erneutem Zentrifugieren (1500 U/min) werden Aliquote der Lösung abpipettiert und in ein Bördelgläschen überführt. Die Lösung wird im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Die Derivatisierung der freigesetzten 3-Hydroxyfettsäuren erfolgt dann wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben.

2.8 Qualitätskriterien

2.8.1 Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze bezeichnet den kleinsten Wert eines Messverfahrens, bis zu dem die Messgröße noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die Bestimmungsgrenze charakterisiert den kleinsten Wert eines Messverfahrens, bis zu dem die Messgröße zuverlässig quantifizierbar ist.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze können mit Hilfe der "Signal-to-Noise-Ratio" (SNR -Signal-Rauschverhältnis) ermittelt werden. Das SNR stellt dabei das Verhältnis der Größe des Analysesignals zur Größe des Grundrauschens dar.

Zu diesem Zweck wurden zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der 3-Hydroxyfettsäurederivate die Kalibrierlösungen fortgesetzt im Verhältnis von 1:10 verdünnt und mit Hilfe der GC/MS analysiert. Es gilt dabei ein SNR von 3 für die Ermittlung der Nachweisgrenze und ein SNR von 10 für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze.

2.8.2 Bestimmung der Standardabweichung

Standardabweichungen wurden für die direkte Derivatisierung der 3-Hydroxyfettsäuren bestimmt.

2.8.2.1 Standardabweichung in der Serie

Zur Bestimmung der Standardabweichung in der Serie wurden von drei Kalibrationslösungen der Konzentrationen 250 pmol/μl, 125 pmol/μl sowie 62,5 pmol/μl jeweils 10 Proben hergestellt und in der Serie an einem Tag vermessen.

Die absolute Standardabweichung σ_{n-1} wurde nach der Formel

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

berechnet.

Die relative Standardabweichung S_{rel} wurde nach der Formel

$$S_{rel} = \frac{\sigma_{n-1} \times 100}{\bar{x}} [\%]$$

berechnet.

2.8.2.2 Standardabweichung von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Standardabweichung von Tag zu Tag wurde von drei Kalibrationslösungen der Konzentrationen 250 pmol/ μ l, 125 pmol/ μ l sowie 62,5 pmol/ μ l an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Probe pro Konzentration hergestellt und analysiert.

Die absolute und die relative Standardabweichung wurden nach den in Kapitel 2.8.2.1 dargestellten Formeln berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Massenspektren der Derivate der 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0 3-OH Fettsäuren

Die Massenspektren der 3-OH Fettsäuren sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Charakteristisch für alle Spektren ist, dass sie einen Basispeak m/z 181 aufweisen. Dieser Peak entspricht der abgespaltenen Pentafluorbenzylgruppe. Alle Derivate zeigen weitere gemeinsame Fragmente bei M-15 (entspricht der Abspaltung der Methylgruppe) sowie bei M-57.

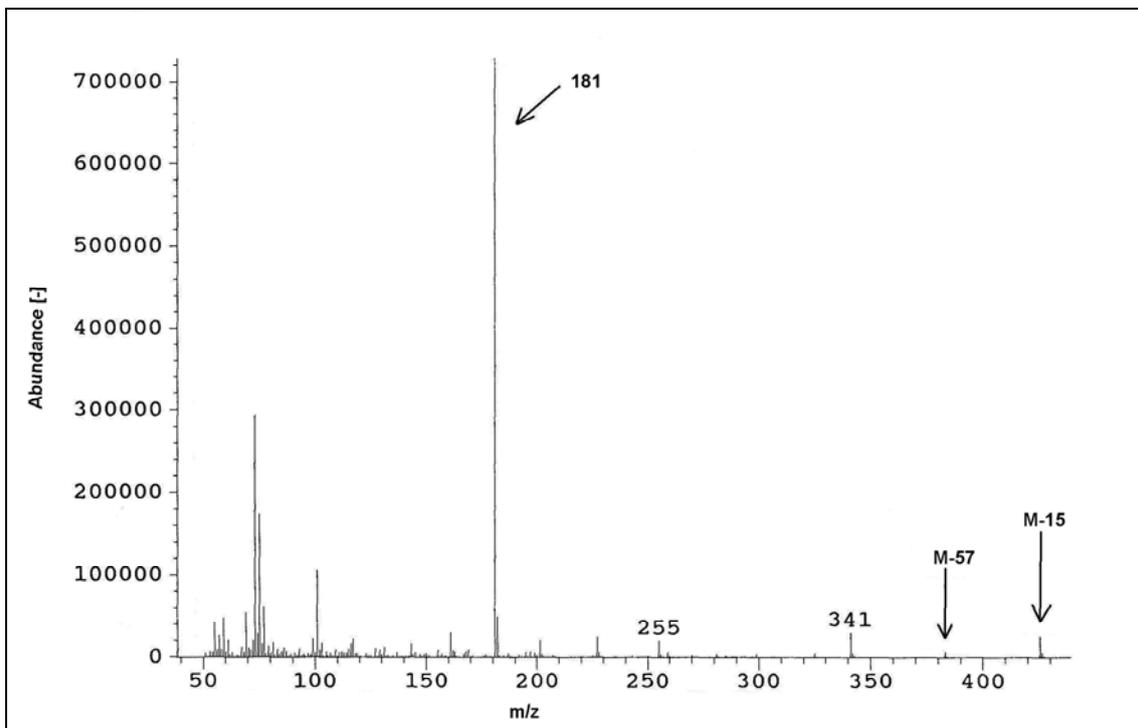


Abbildung 3: Massenspektrum des 10:0 3-OH Derivats

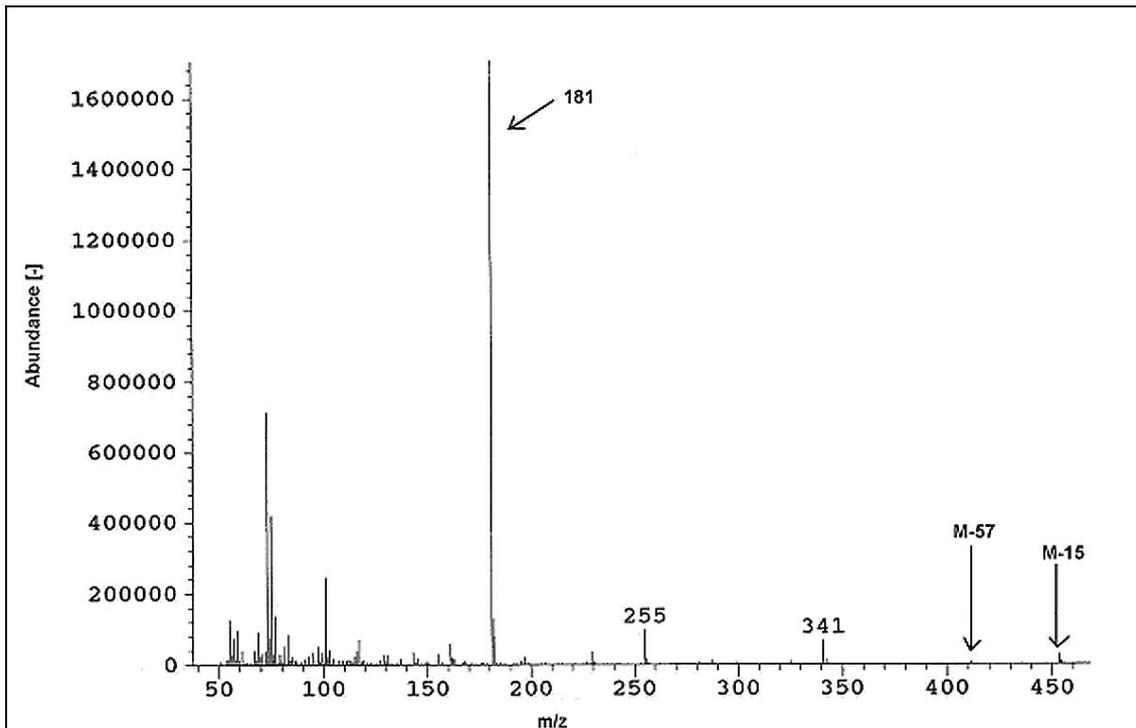


Abbildung 4: Masspektrum des 12:0 3-OH Derivats

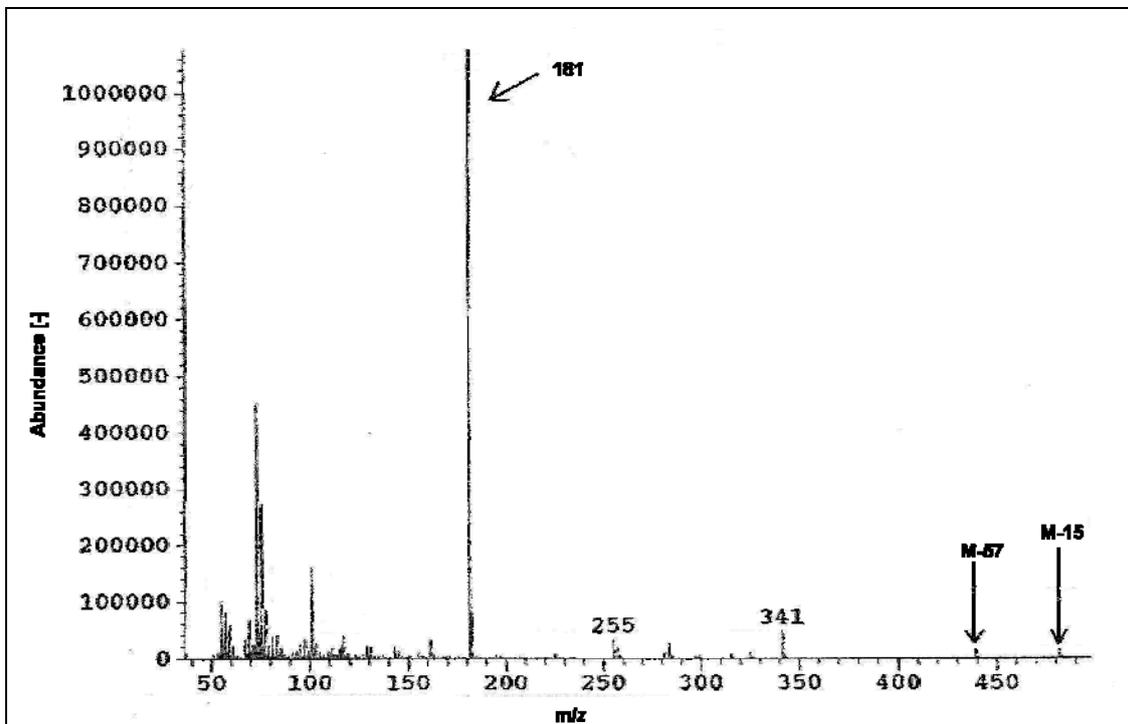


Abbildung 5: Massenspektrum des 14:0 3-OH Derivats

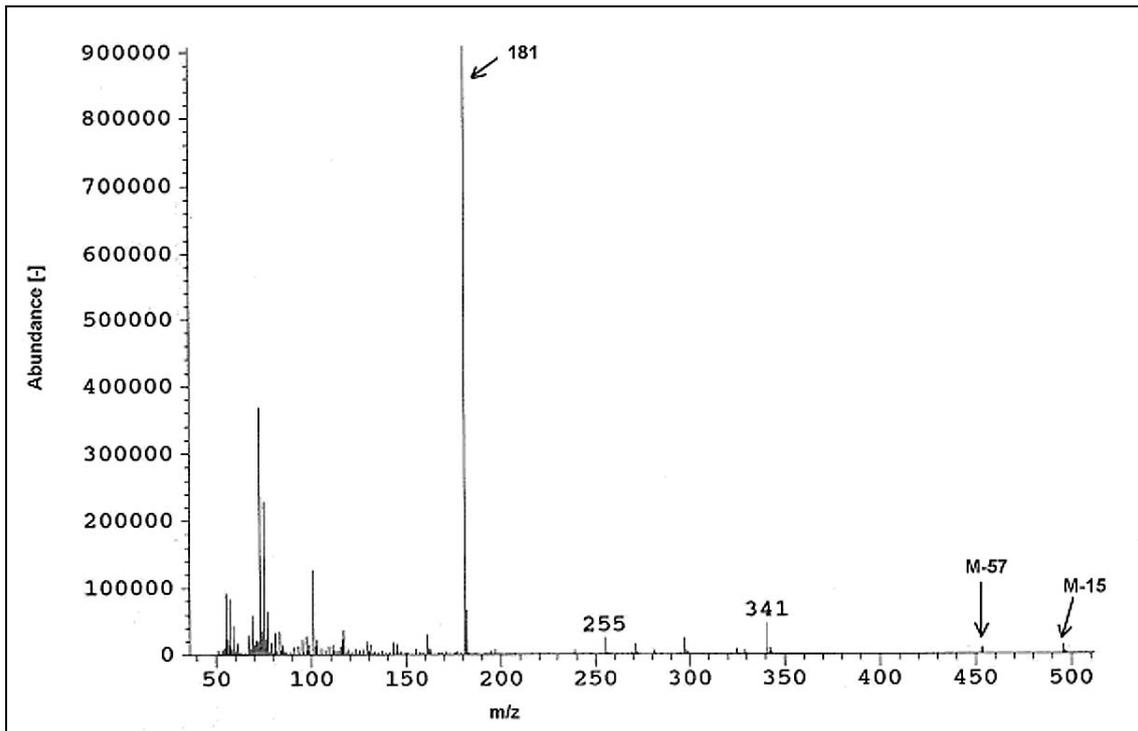


Abbildung 6: Massenspektrum des 15:0 3-OH Derivats

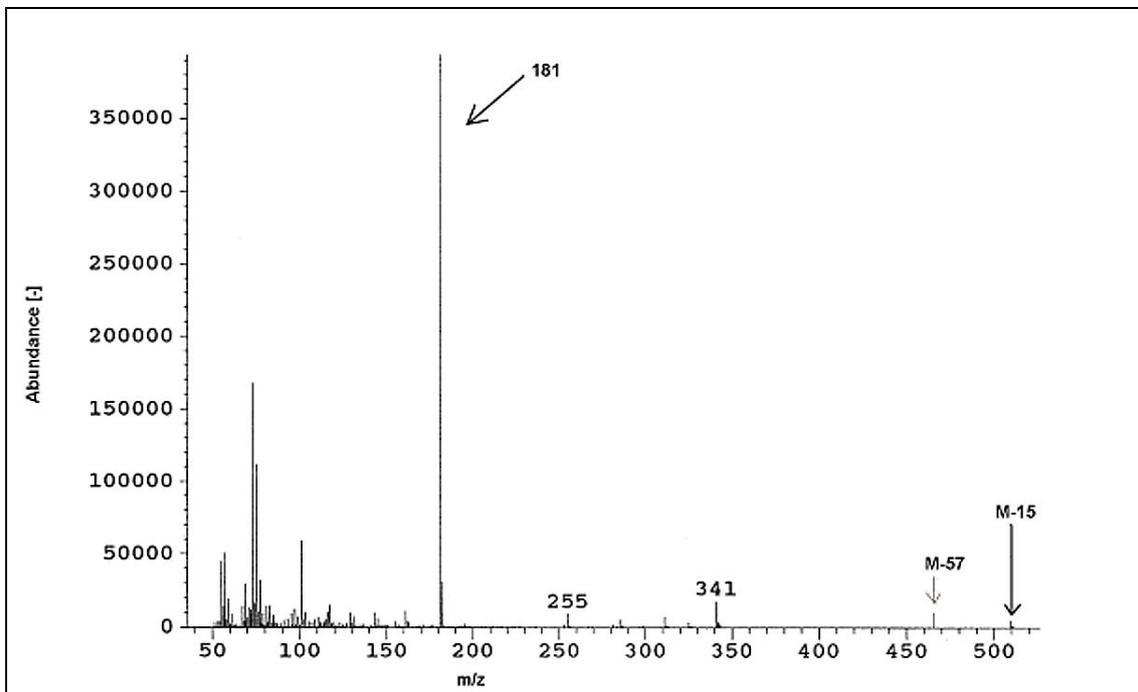


Abbildung 7: Massenspektrum des 16:0 3-OH Derivats

3.2 Gaschromatographische Trennung

3.2.1 Cool-on-Column Methode

Jaschinski zeigte 2004, dass die Cool-on-Column-Injektion für die gaschromatographische Trennung von 3-Hydroxyfettsäure-Derivaten besonders geeignet ist, da sie im Vergleich zur Split-/Splitless-Injektion zu wesentlich geringerer thermischer Belastung der Derivate führte. Eliminierungsreaktionen der Fettsäure-Derivate konnten bei Cool-on-Column-Injektion auf ein Minimum gesenkt werden.

Bei der Cool-on-Column-Methode werden die Fettsäure-Derivate direkt in die der Kapillar-Trennsäule vorgeschaltete unbelegte Vorsäule injiziert. Die thermische Belastung durch den notwendigerweise auf Temperaturen deutlich oberhalb 200 °C temperierten Injektorblock des Split-/Splitless-Injektors wird so vermieden. Die Injektortemperatur beträgt bei der Injektion lediglich 153 °C und liegt während der Trennung immer 3 °C oberhalb der Ofentemperatur und folgt dem Temperaturgradienten.

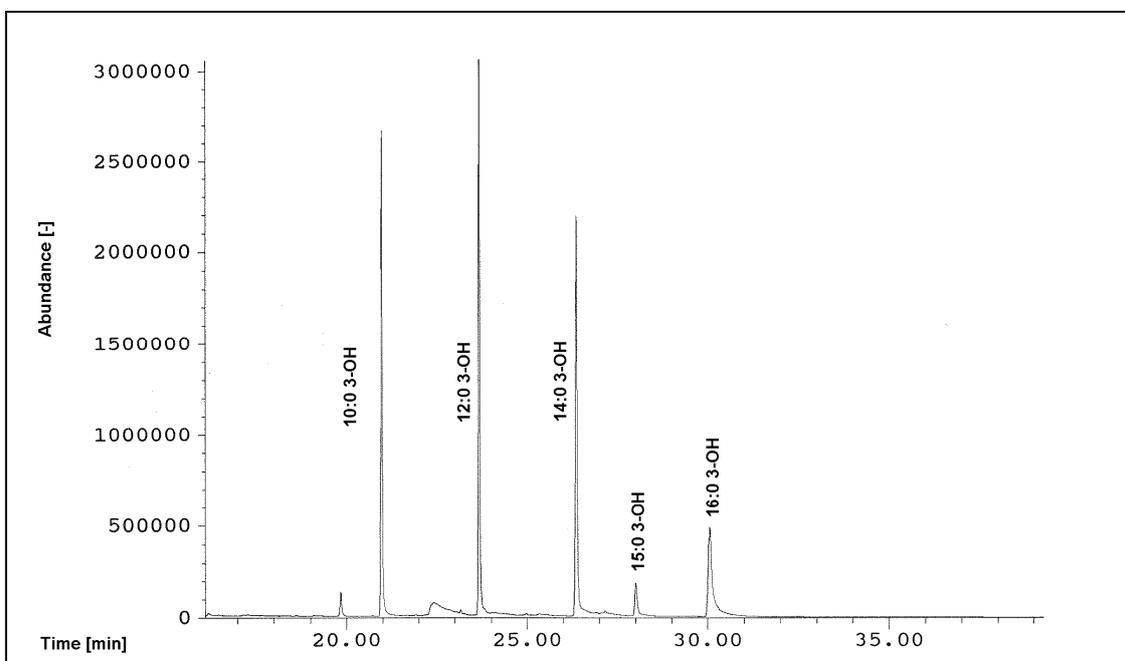


Abbildung 8: Chromatogramm aller 3-OH-Fettsäuren (SIM, Cool-on-Column-Injektion)

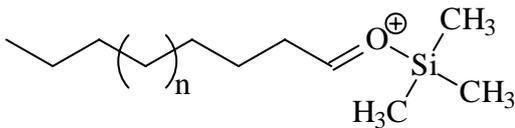
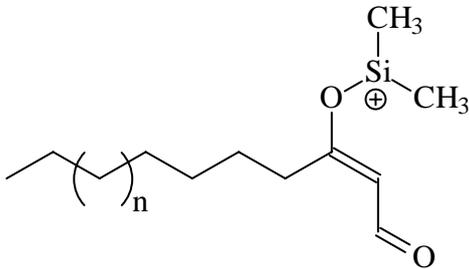
Tabelle 2: Retentionszeiten der 3-Hydroxyfettsäurederivate im Single-Ion-Modus

Fettsäure	Retentionszeit [min]
10:0 3-OH FA	20,97
12:0 3-OH FA	23,68
14:0 3-OH FA	26,37
15:0 3-OH FA	28,00
16:0 3-OH FA	30,05

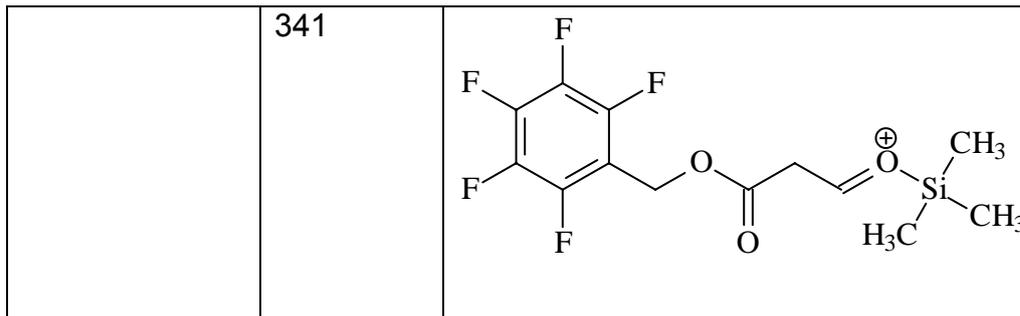
3.2.2 Fragmentierung der Derivate

Allen Massenspektren gemeinsam ist die typische Fragmentierung der Derivate. In Tabelle 3 sind Strukturvorschläge für die Fragmentionen aufgeführt. Für die Detektion im SIM wurde der Peak des Pentafluorbenzylkations (m/z 181) gewählt, der in allen Spektren den Basispeak bildet.

Tabelle 3: Fragmentionen

	Ionische Spezies bzw. m/z	Fragmentionen (Strukturvorschläge)
Ionen, die die Fettsäurekette enthalten	$[M-239]^+$	
	$[M-213]^+$	

	[M-57] ⁺	<p>Chemical structure of [M-57]⁺ ion: A polyether chain with a trimethylsilyloxy group and a pentafluorophenyl ether group.</p>
	[M-15] ⁺	<p>Chemical structure of [M-15]⁺ ion: A long polyether chain with a trimethylsilyloxy group and a pentafluorophenyl ether group.</p>
Ionen, die die Fettsäurekette nicht enthalten	73	<p>Chemical structure of ion 73: Trimethylsilyloxy cation.</p>
	101	<p>Chemical structure of ion 101: Vinyltrimethylsilyloxy cation.</p>
	181	<p>Chemical structure of ion 181: Pentafluorophenylmethyl cation.</p>
	255	<p>Chemical structure of ion 255: Pentafluorophenyltrimethylsilyloxy cation.</p>



3.3 Bestimmung der 3-OH Fettsäuren aus Lipopolysacchariden

Durch Hydrolyse aus dem Lipopolysaccharid von *E. coli* freigesetzte Fettsäuren werden derivatisiert und analysiert. Abbildung 9 zeigt das Chromatogramm des Hydrolysats. *E. coli* weist in seiner LPS lediglich die 14:0 3-OH FA auf, die auch massenspektrometrisch im Hydrolysat nachweisbar ist.

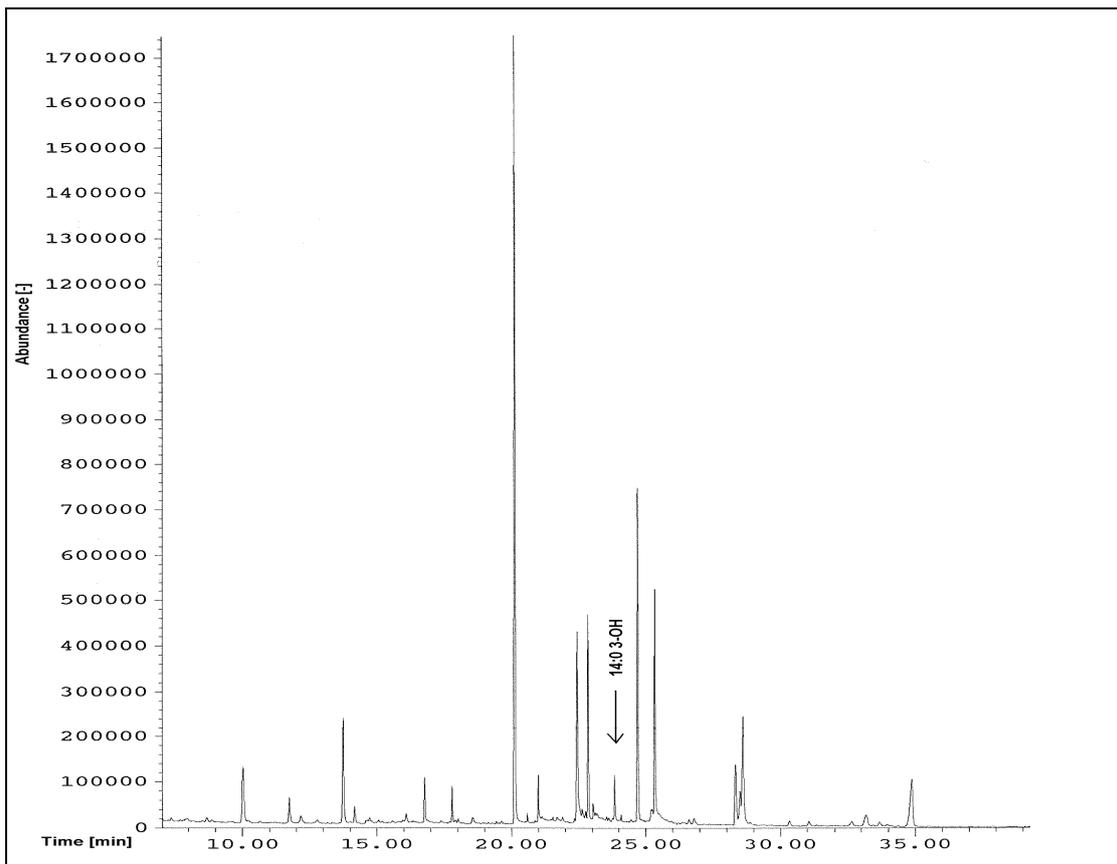


Abbildung 9: Chromatogramm (SIM) der durch Hydrolyse freigesetzten 3-OH Fettsäuren der LPS von *E. coli*

3.4. Kalibrationsfunktionen der 3-Hydroxyfettsäuren

Kalibrationsfunktionen 2. Ordnung wurden für jede einzelne 3-Hydroxyfettsäure erstellt. In Tabelle 4 sind die Kalibrationsgleichungen und die Korrelationskoeffizienten dargestellt. Zur Erstellung der Kalibration wurden die Konzentrationen 15,63 pmol/μl, 31,25 pmol/μl, 62,50 pmol/μl, 125 pmol/μl und 250 pmol/μl gemessen (vgl. Abbildung 10).

Tabelle 4: Kalibrationsgleichungen und Korrelationskoeffizienten

Fettsäure	Kalibrationsgleichung	Korrelationskoeffizient
10:0 3-OH FA	$y = -3E-05x^2 + 0,0279x - 0,0872$	$R^2 = 0,9995$
12:0 3-OH FA	$y = -4E-05x^2 + 0,0329x - 0,01001$	$R^2 = 0,9991$
14:0 3-OH FA	$y = -4E-05x^2 + 0,0335x - 0,2562$	$R^2 = 0,9945$
16:0 3-OH FA	$y = -5E-06x^2 + 0,0233x - 0,2575$	$R^2 = 0,9987$

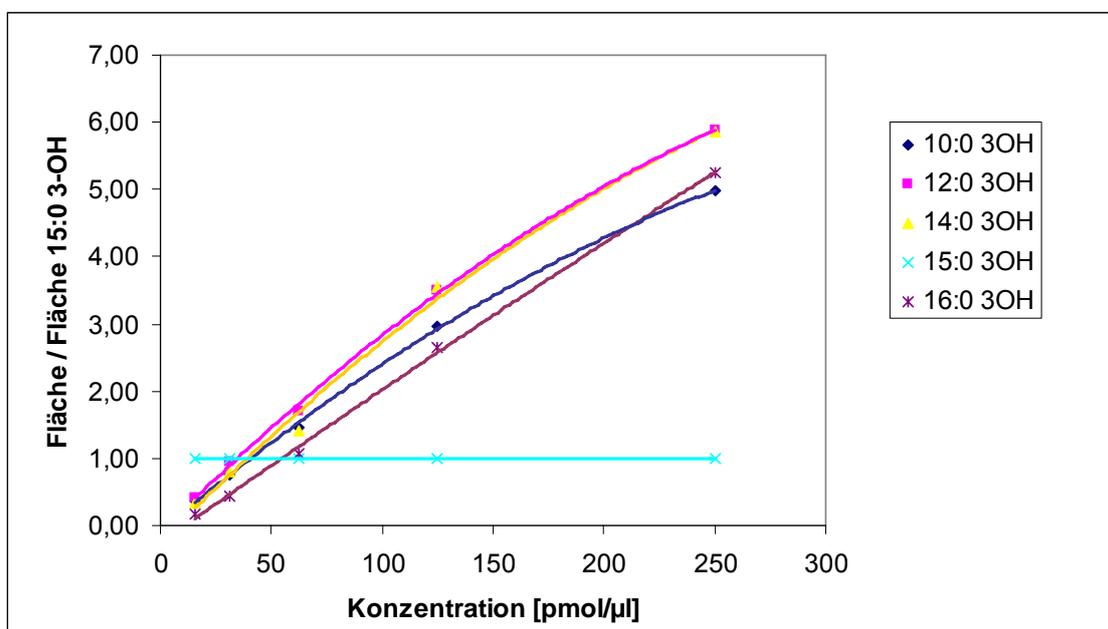


Abbildung 10: Kalibrationsgraphen aller 3-Hydroxyfettsäuren

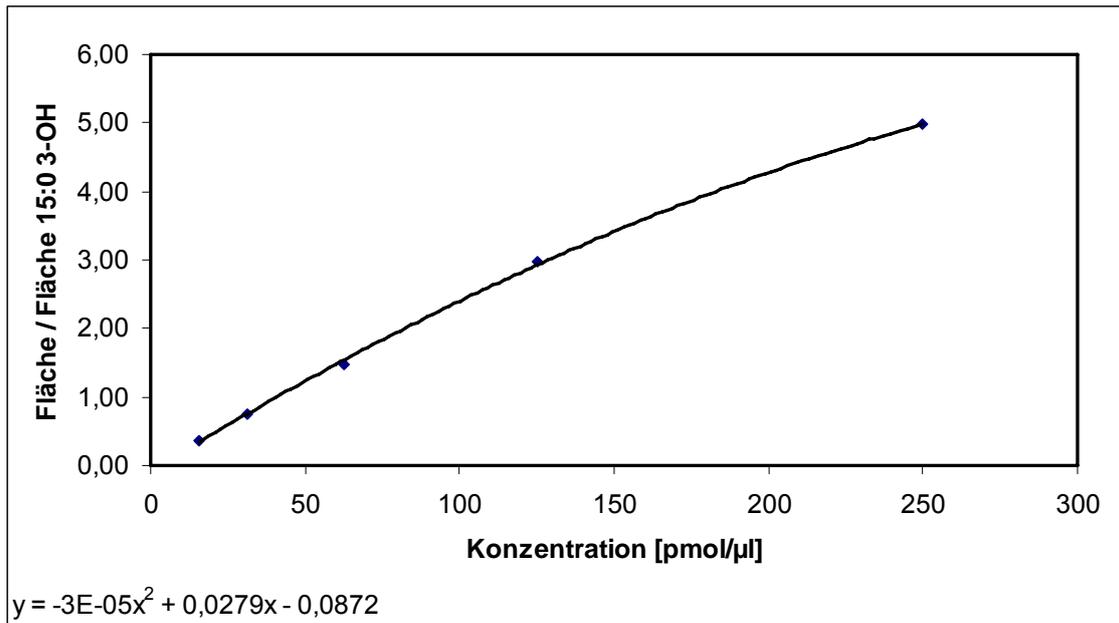


Abbildung 11: Kalibrationsgraph der 10:0 3-OH Fettsäure

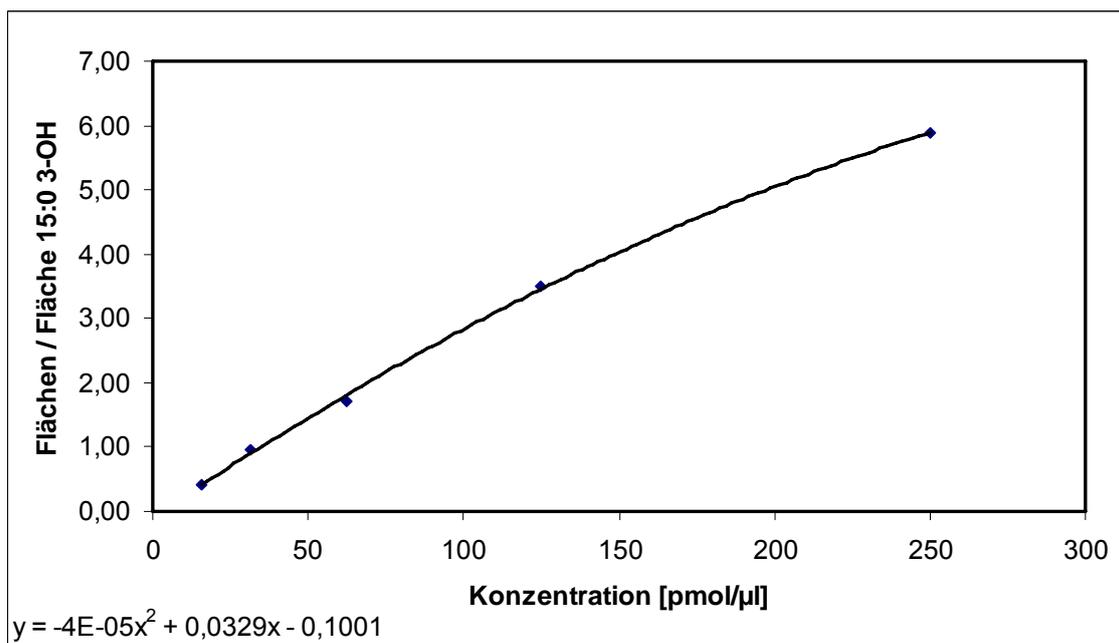


Abbildung 12: Kalibrationsgraph der 12:0 3-OH Fettsäure

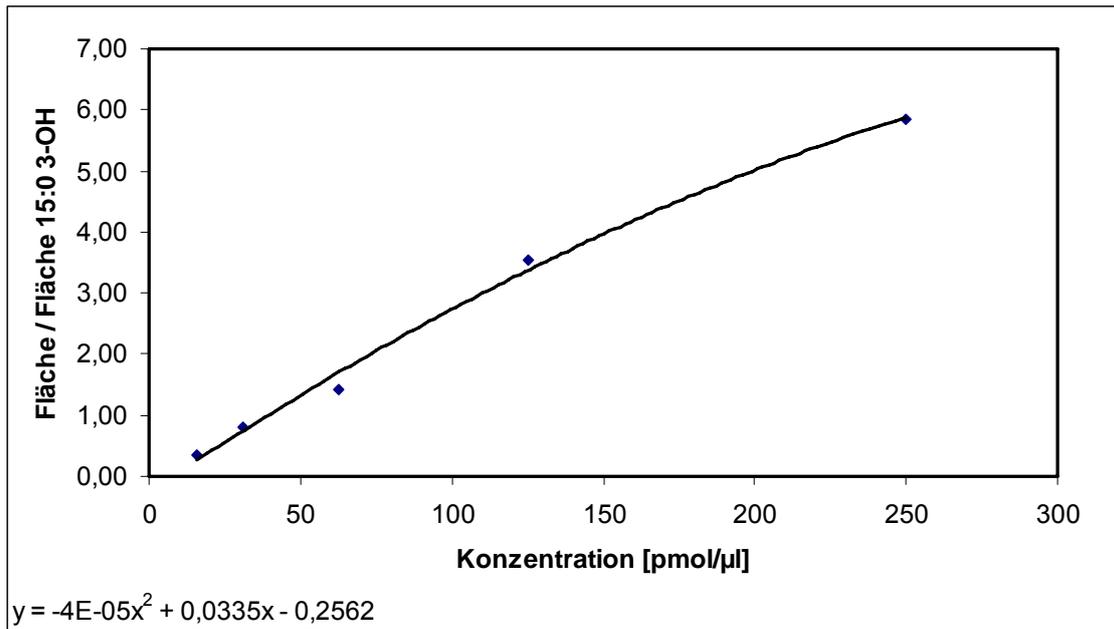


Abbildung 13: Kalibrationsgraph der 14:0 3-OH Fettsäure

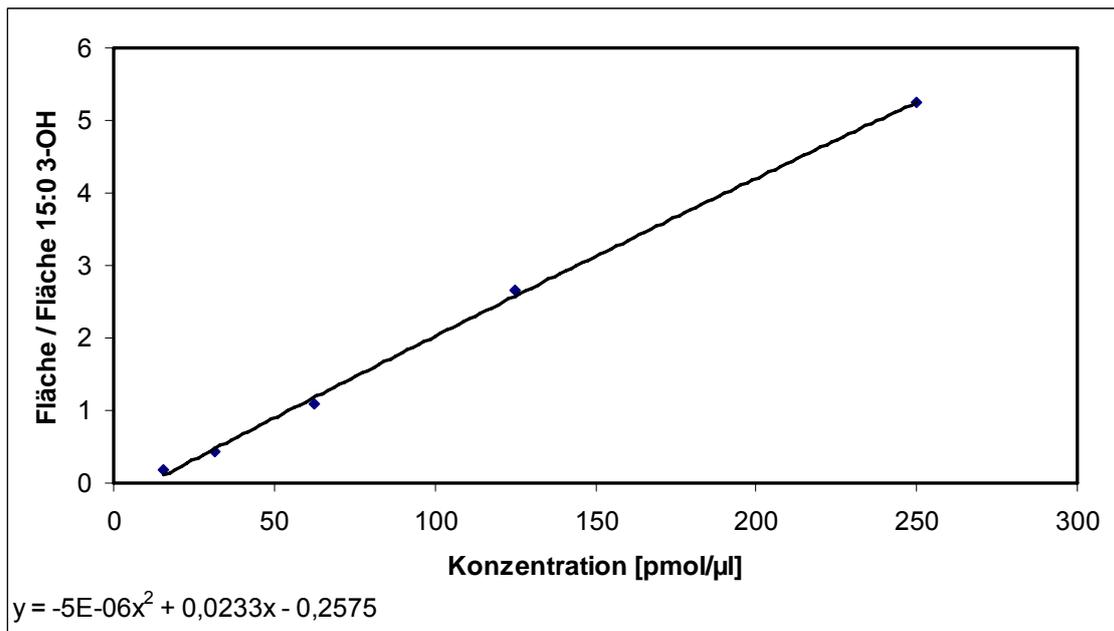


Abbildung 14: Kalibrationsgraph der 16:0 3-OH Fettsäure

3.5. Standardabweichungen

Die Standardabweichungen wurden, wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben, berechnet.

Die Ergebnisse sind in den Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Standardabweichung (S_{rel}) (n=5) von Tag zu Tag

Konzentration [pmol/ μ l]	10:0 3-OH S_{rel} (n=5) [%]	12:0 3-OH S_{rel} (n=5) [%]	14:0 3-OH S_{rel} (n=5) [%]	16:0 3-OH S_{rel} (n=5) [%]
62,5	5,16	7,36	3,20	10,69
125	6,64	7,01	2,04	6,10
250	0,61	0,86	1,02	3,57

Tabelle 6: Standardabweichung (S_{rel}) (n= 10) in Serie

Konzentration [pmol/ μ l]	10:0 3-OH S_{rel} [%]	12:0 3-OH S_{rel} [%]	14:0 3-OH S_{rel} [%]	16:0 3-OH S_{rel} [%]
62,5	11,73	10,25	11,04	6,45
125	7,20	3,92	4,50	5,10
250	4,86	4,34	3,63	4,59

3.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Fettsäurederivat	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
10:0 3-OH	38 fmol	125 fmol
12:0 3-OH	34 fmol	114 fmol
14:0 3-OH	37 fmol	122 fmol
16:0 3-OH	36 fmol	119 fmol

4. Diskussion

4.1 Die Zellwandstruktur gram-negativer Bakterien

Die innere Begrenzung einer Bakterienzelle wird durch die Zytoplasmamembran gebildet, einer doppelten Phospholipidschicht mit eingelagerten Proteinen (Abbildung 15). Diese Proteine können in verschiedene Kategorien unterteilt werden: zum einen dienen sie dem aktiven Transport von Nährstoffen von Außen nach Innen (Permeasen), sind Bestandteil des Sekretionssystems (Proteinausschleusung), wirken als Biosyntheseproteine (des Mureins und anderer äußerer Zellwandkomponenten), sowie als Sensorproteine (KAYSER et al. 2005).

Die Verbindung zwischen äußeren und inneren Zellwandkomponenten stellt der periplasmatische Zwischenraum dar, dessen Bestandteile das Mureingerüst (Peptidoglykan) sowie Murein-Lipoproteine darstellen, welche den Zusammenschluss mit den äußeren Zellwandstrukturen bilden (HOF et al. 2005).

Die Grundbestandteile des Peptidoglykans sind N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin. Sind diese alternierend 2- (gram-negative Bakterien) oder 3-dimensional (gram-positive Bakterien) über die Tetrapeptidketten der N-Acetylmuraminsäure in β -1,4-Glykosidbindung zusammengeschaltet, entsteht das formgebende, flexible Mureingerüst (ROTTER 2004).

Die äußere Membran ist ebenfalls strukturell als Lipiddoppelschicht aufgebaut und stellt eine wichtige semi-permeable Hülle dar, die für die im Inneren der Bakterienzelle gebildeten wasserlöslichen Zellbestandteile nicht passierbar ist, während Porine (oder *Outer Membran Protein* - OMP F) als spezielle Proteine der äußeren Membran in Abhängigkeit vom chemischen Milieu (pH-Wert, Ionenkonzentration) den geregelten Stoffaustausch von außen nach innen steuern und gleichzeitig als grobes Molekülsieb fungieren (HOF et al. 2005).

Weitere Proteine der äußeren Zellmembran erfüllen enzymatische Funktionen, wirken als Adhesine, Invasine (Penetrierung von Wirtszellen) oder haben resis-tiven Charakter bei der Phagozytose (KAISER 2007).

Den äußeren Abschluß der Zellwand bei gram-negativen Bakterien bilden Lipo-polysaccharide (LPS), nach einer irrtümlichen Annahme Ihres „Entdeckers“¹, auch Endotoxine genannt. Es wird empfohlen (DANUSER et al. 1999), den Be-griff „LPS“ nur für chemisch reine Wirkstoffe zu verwenden, während der Termi-nus „Endotoxine“ weiterhin zur Beschreibung von biologisch aktiven Zellwand-komponenten dienen soll. In der Literatur werden jedoch beide Begriffe als Sy-nonyme verwendet.

Endotoxine sind amphiphilische Moleküle, bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Lipidanteil, und haben bei der lebenden Bakterienzelle neben strukturellen Aufgaben wichtige kontakt-mediatorische Funktionen (Antigene Wirkung, Adhäsine, etc.) (TODAR et al. 2002).

Wird die Bakterienzelle durch (Auto)Lyse oder Phagozytose zerstört, entfaltet das freigesetzte LPS eine toxische (pyrogene) Wirkung. Die dabei auftretenden Wechselwirkungen werden im Detail in Kapitel 4.2 besprochen.

¹ Der deutsche Hygieniker, Immunologe und Bakteriologe Richard Friedrich Johannes Pfeiffer (1858-1945) beschrieb als erster die potentiell toxische Wirkung von Lipopoly-sacchariden, von der er annahm, sie käme durch Freisetzungen aus dem Inneren („endo-“) der Bakterien zustande (PFEIFFER et al.)

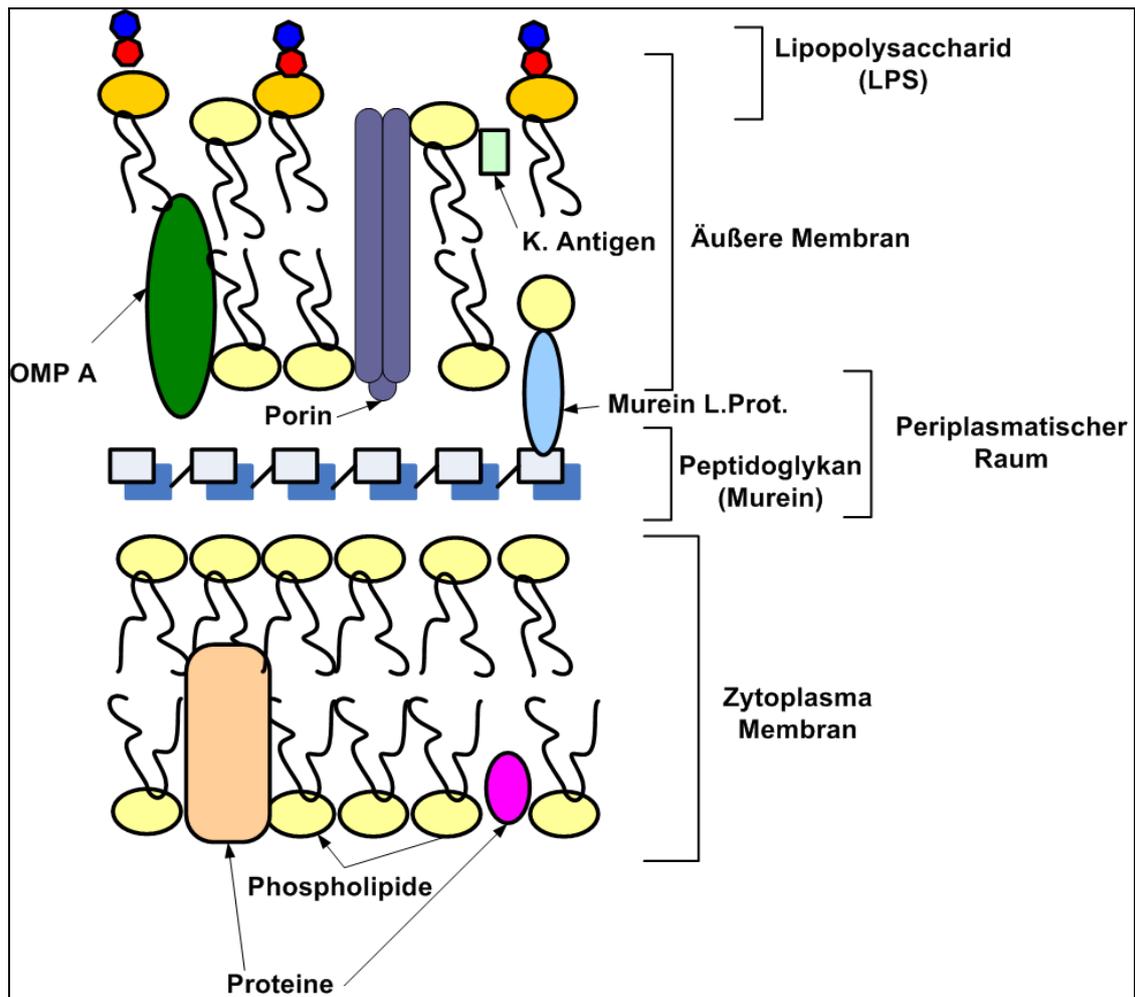


Abbildung 15: Die Zellwand gram-negativer Bakterien (nach KAYSER et al. 2005, HOFER et al. 2005)

4.1.1 Struktureller Aufbau von Lipopolysacchariden (LPS)

Die chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien wurde 1954 durch eine grundlegende Arbeit über Separierung- und Analyse von Endotoxinen sowie deren einzelnen Komponenten begründet (WESTPHAL und LÜDERITZ 1954).

Strukturell lässt sich LPS in 3 Komponenten teilen: in einen hydrophoben Anteil, das Lipid A, in einen aus Polysacchariden bestehenden Kernbereich, sowie in einen weiteren, hydrophilen Polysaccharidanteil, die O-Kette (O-Antigen). (BRADE und RIETSCHER 1986).

Die in Abbildung 16 dargestellte Form wird auch als S-Form LPS bezeichnet (vollständige Ausprägung), während LPS mit fehlender O-Kette als R-Form beschrieben werden (HOLST 2002).

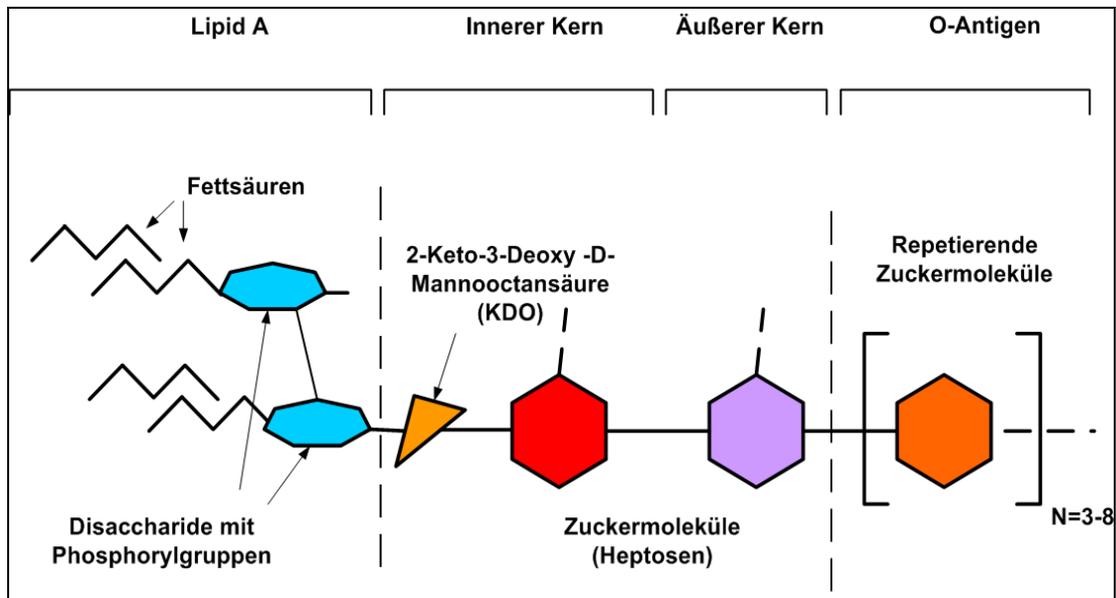


Abbildung 16: Schematische Struktur von Lipopolysacchariden (nach HOLST 2002)

Die O-spezifische Kette stellt die Komponente mit der höchsten Varianz und Spezifität dar. Sie kann aus bis zu 20 verschiedenen Zuckern bestehen, von denen viele Bi-Deoxyhexosen natürlich nur bei gram-negativen Bakterien vorkommen (TODAR 2002). Die Summe der durch das O-Antigen ausgedrückten Eigenschaften legen den serologischen Typ des jeweiligen Bakteriums fest (BRADE und RIETSCHER 1985). Tritt ein Wirt in Kontakt mit gram-negativen Bakterien, werden vornehmlich Antigene gegen Komponenten der O-Kette gebildet. LPS mit fehlendem O-Antigen besitzen keine virulenten Eigenschaften und sind anfälliger für Phagozyten (TODAR 2002).

Die Polysaccharidmoleküle der Kernregion stellen eine weit weniger variable Komponente dar, wobei es dennoch nur ein Molekül gibt, das bei allen LPS vorkommt, und welches die Verbindung zwischen Kern und Lipid A herstellt: 2-Keto-3-Deoxy-D-Mannooctansäure (KDO) (UNGER 1983, HOLST 2002).

Mutanten ohne Kernregion sind nicht entwicklungsfähig, bei unterschiedlich defekten Kernregionen entsteht durch die relativ geringe Variabilität eine breite Kreuzresistenz der spezifischen Antikörper (R-Antigene) (BRADE et al. 1983, BRADE und RIETSCHEL 1986). Gleichzeitig besitzen Bakterien mit Mutationen der Kernregion eine erhöhte Sensibilität für die Wirkung bestimmter hydrophober Präparate wie Antibiotika, Detergenzien oder bestimmter Stereoiden (Gallensalze) (TODAR 2002).

Lipid A stellt die endotoxisch aktive Komponente von LPS dar (WESTPHAL und LÜDERITZ 1954, RIETSCHEL et al. 1982, GALANOS et al. 1984, BRADE und RIETSCHEL 1986, SILVERMAN und OSTRO 1998, MARRE et al. 2000).

Chemisch besteht Lipid A aus einem 1,4'-biphosphorylierten β (1,6)-verknüpften D-Glucosamin-Disaccharid mit in Ester- oder Amidbindung verknüpften (R)-3-OH Fettsäuren. Zusätzliche Fettsäuren können dabei an den 3-OH Gruppen in Esterbindung verknüpft sein, so dass typischerweise Lipid A mit 6 oder 7 Fettsäuren vorkommt. Die chemische Struktur von Lipid A am Beispiel *Escherichia coli* ist in Abbildung 17 dargestellt (CAROFF und KARIBIAN 2003, MEREDITH et al. 2003, RAETZ et al. 2007).

Lipid A Varianten entstehen durch unterschiedliche Anzahl und Länge der gesättigten Fettsäuren (RIETSCHEL et al. 1984, BRADE und RIETSCHEL 1986).

Lipid A und KDO Residuen sind Elementarbestandteile für die Entwicklungsfähigkeit der äußeren Zellmembran und somit der Bakterienzellen selbst. Varianten mit gestörten oder fehlenden Lipid A Komponenten können deswegen nur bedingt als letale Mutanten isoliert werden (TODAR 2002).

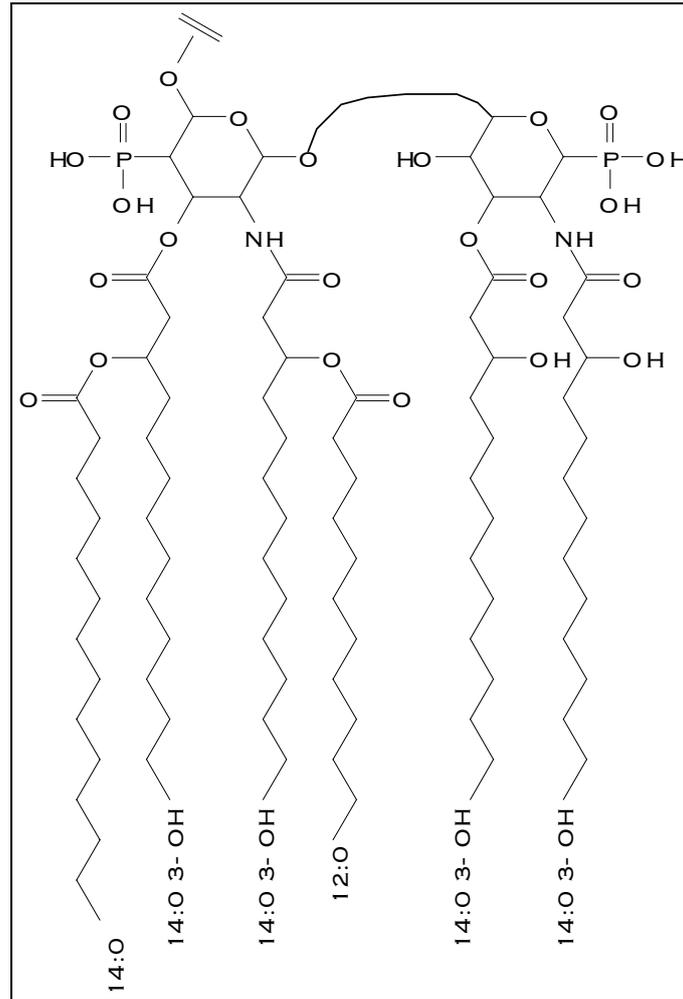


Abbildung 17: Chemische Struktur von Lipid A - *Escherichia coli* (nach Raetz et al 2007)

4.2 Wirkung von Endotoxinen auf den menschlichen Organismus

4.2.1 Medizinische Relevanz von Endotoxin

Endotoxine haben nach zunehmend gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnissen aufgrund ihrer potentiell pathogenen Wirkung vielfältigen Einfluss auf eine Reihe von Erkrankungen des menschlichen Organismus (RIETSCHEL 1996).

Endotoxine gelten mittlerweile als Hauptursache für die auf gram-negative Bakterien zurückzuführende Septikämie² sowie für den möglicherweise daraus resultierenden septischen Schock, einer katastrophal und oft tödlich verlaufenden systemischen Reaktion des Körpers, die zunächst reversibel, später irreversibel und durch Blutdruckabfall, Sauerstoffmangel, Durchblutungsstörungen sowie multiples Organversagen gekennzeichnet ist (GLAUSER et al. 1991).

In den Vereinigten Staaten von Amerika sterben jährlich geschätzte 175000 - 200000 Menschen an Septikämie oder septischem Schock (HOFFMAN et al. 1993, ULEVITCH et al. 1995).

Gram-negative Bakterien (und Endotoxine) gelten dabei in 30 - 80% der Fälle als Auslöser (GLAUSER et al. 1991).

Ungeachtet der Fortschritte bei der medizinischen Versorgung, verlaufen bis zu 40% der Fälle von Septikämie tödlich (CARCILLO 1997).

Septischer Schock ist häufigste Todesursache auf Intensivstationen (GASCHE 1995), die Inzidenz von Septikämie steigt dabei durch den zunehmenden Fortschritt invasiver Techniken, den Einsatz von Immunsuppressoren und zytotoxischer Chemotherapie sowie den gleichzeitigen Anstieg von im Krankenhaus erworbenen (nosokomialen) Infektionen (LAMY 1995).

² Septikämie als systemische Erkrankung, bei der Bakterien kontinuierlich oder schubweise in die Blutbahn gelangen. Der Terminus Sepsis beschreibt das dabei entstehende Krankheitsbild.

4.2.2 Pathophysiologie der durch Endotoxine hervorgerufenen Entzündungsreaktion

Endotoxine können exogen in Form einer nachgewiesenen bakteriellen Infektion von außen in den Körper gelangen und zu lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen führen. Werden Antibiotika als therapeutische Mittel der Wahl eingesetzt, kann das nach dem Tod der Bakterienzelle freigesetzte Endotoxin weiter eine Entzündungsreaktion verursachen oder diese sogar verschlimmern (PRINS 1996).

Eine zweite, endogene Endotoxinexposition kann durch Translokation von (meist anaeroben, gram-negativen) Darmbakterien erfolgen (VAN LEEUWEN et al. 1994, LEMAIRE 1997). Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass geringe Mengen von Fragmenten der äußeren Zellwand, darunter Endotoxine, kontinuierlich im Darm freigesetzt und von Leberzellen neutralisiert werden (JACOB et al. 1977, MATHISON et al. 1979, NOLAN 1981, RUITTER et al. 1981).

Wird eine der vom Wirt kontrollierten Barrieren überwunden, können große Mengen von Bakterien oder Endotoxin über lymphatische oder vaskuläre Kanäle den Darm verlassen.

Endotoxine können eine Vielzahl der natürlichen Elemente des humoralen und zellulären Immunsystems triggern, die als Mediatoren bei der Entzündungsreaktion des Körpers nach Infektionen auftreten (BONE 1991, REMICK 1995, ULEVITCH et al. 1995, RIETSCHHEL et al. 1996).

Bei Septikämie oder SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) versagen die Regelungsmechanismen, und die Entzündungsreaktion führt zu Fieber, inneren Blutungen, Herzinsuffizienz und Schock (SUFFREDENI et al. 1989, RIETSCHHEL et al. 1996).

Die Mediatoraktivierung und klinische Folgereaktionskaskade sind in Abbildung 18 zusammenfassend dargestellt.

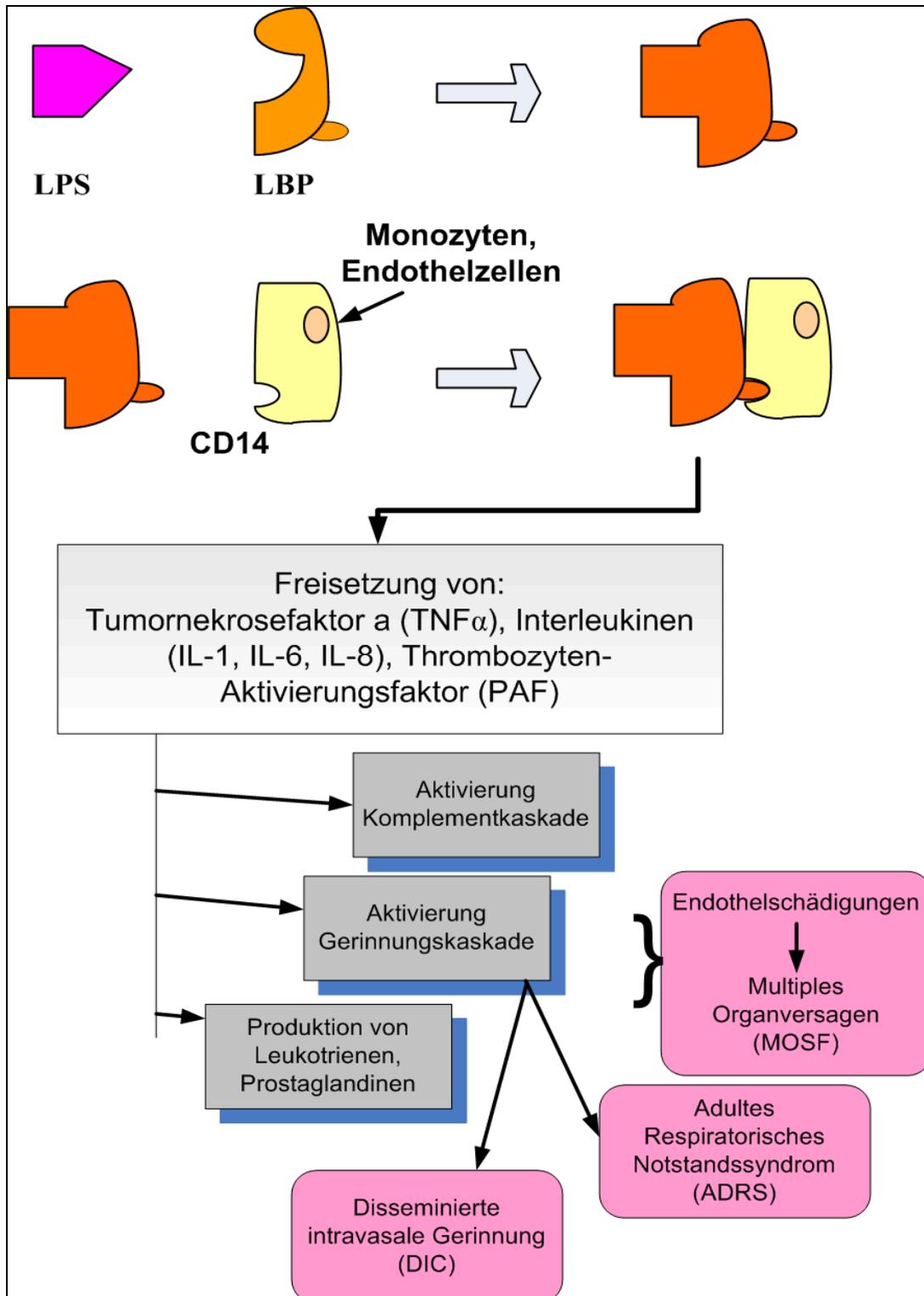


Abbildung 18: Mediatoraktivierung und klinische Folgereaktionen von LPS (nach MARRE et al. 2000); LBP = Lipid Binding Protein

Weitere klinische Komplikationen, die mit möglichen bakteriellen Translokationen (und somit Endotoxinfreisetzung) in Zusammenhang gebracht werden können, sind schwere Traumata, die einen hämorrhagischen Schock bedingen sowie post-traumatische multiple Bluttransfusionen (AGARWAL et al. 1993, HIKI et al. 1995).

Entzündungsreaktionen nach kardiovaskulären chirurgischen Eingriffen (Eingriffen am offenen Herzen, Bypassoperationen) wurden bei gleichzeitiger Zirkulation von Endotoxin und $TNF\alpha$ beobachtet (ANDERSEN et al. 1987, ROCKE et al. 1987, CASEY et al. 1992). Auch generelle abdominale chirurgische Eingriffe am Aortensystem können Darmblutungen verursachen und somit bakterielle Translokation begünstigen (BAIGRIE et al. 1993, TAGGART et al. 1994). Der ursächliche klinisch relevante Zusammenhang einer durch Endotoxine verursachten Erkrankung ist trotz der Vielzahl der beobachteten Symptome allerdings weiterhin nicht eindeutig ableitbar. (ROUMEN et al. 1993).

Sepsis nach schweren Verbrennungen kann sowohl auf die direkte Infektion der offenen Wunden mit gram-negativen Bakterien zurückgeführt werden (SAADIA et al. 1990), als auch, bei fehlendem Nachweis einer externen Infektion, auf mögliche Translokationen begünstigt durch Darmblutungen nach massivem Flüssigkeitsverlust und Schock (JONES II. et al. 1991a, JONES II. et al. 1991b).

Endotoxine werden bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen als potentiell pathogene Faktoren vermutet:

- Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn (GARDINER 1995, VAN DEVENTER 1998)
- Neonatale nekrotisierende Enterocolitis (*NEC*), eine zunehmend alarmierende Komplikation in der neonatalen Intensivmedizin und im direkten Zusammenhang stehend mit der in den letzten Jahren deutlich gesteigerten Überlebensrate von Frühgeburten durch eine intensivierte Frühbehandlung von *NEC*. Als Endotoxinquellen wurden Herdinfektionen (Peritonitis), Bakteriämie und bakterielle Darmtranslokationen nachgewiesen (SCHEIFELE et al. 1985, KLIEGMAN et al. 1993).
- Akute Pankreatitis (CURLEY 1996)
- Direkte oder durch Komplikationen bedingte Leberschädigungen (FUKUI et al. 1991, BODE et al. 1993, SCHAFFER et al. 1997).
- Parodontalerkrankungen: Gram-negative Bakterianreicherungen an den Zähnen können lokale Zahnfleischentzündungen verursachen, die im Zusammenspiel mit weiteren bakteriellen Toxinen und aggressiven Enzymen zu Weichgeweberückgang und Knochenschwund und somit zu schweren Formen der Parodontitis führen (LOESCHE 1993, WILSON 1995).
- Zystische Fibrose (WILMOTT et al. 1994).
- Asthma: Zahlreiche Studien haben einen signifikanten Einfluß von Endotoxinen auf die Funktion der Atmungsorgane nachweisen können (SANDSTRÖM et al. 1992, MILTON et al. 1996, MICHEL et al. 1997, SARAF et al. 1999, THORN 2001, SAVOV et al. 2005). Theoretische Ansätze (DUBIN et al. 1996, JAGIELO et al. 1998) führen asthmatische Komplikationen auf eine durch Antigene bedingte massive Produktion von Lipid Binding Protein (LBP) und löslichem CD14 zurück, welche dann nach LPS Inhalation eine signifikante Endzündungsreaktion auslösen können.

- Arterielle Koronarerkrankungen, wobei ein möglicher Zusammenhang aber kontrovers diskutiert wird (MARCUS et al. 1993, PATEL et al. 1995).
- Langzeitkomplikationen bei Dialysepatienten (PEREZ-GARCIA et al. 1993, SUNDARAM et al. 1996).
- Krebserkrankungen, vor allem der Leber, von Magen und Darm sowie verschiedene Formen von Blutkrebs: Ein Zusammenhang zwischen Endotoxinkonzentration und diversen Komplikationen nach Chemotherapie und Bestrahlung konnte in einer Vielzahl von Fällen nachgewiesen werden, wenn auch die klinische Signifikanz vorläufig noch unklar ist (ENGERVALL et al. 1995, EASSON et al. 1998, YOSHIDA et al. 1998, AMATI et al. 1998).

Zahlreiche Studien haben die klinische Wirksamkeit von synthetisch hergestelltem oder modifiziertem, gering-toxischem Lipid A (*Monophosphoryl Lipid A*, *MPLA*) als Adjuvanzien (HAMDY et al. 2007), sowie weiterer Substanzen (*monoklonale Antikörper*, *IG2a*), welche die Induzierung von $TNF\alpha$ durch Lipid A antagonistisch unterdrücken, zum Ziel (RIETSCHHEL et al. 1994, BARON 1996). Die therapeutischen Erfolge sind dabei teilweise vielversprechend (ULRICH et al. 1995, EVANS et al. 2003, BALDRIDGE et al. 2004, HAMDY et al. 2007).

4.3 Endotoxinvorkommen in privaten und öffentlichen Umgebungen

Bakterien und bakterielle Substanzen (darunter Endotoxin) sind als organische Substanzen in weiten Bereichen des häuslichen, allgemeinen/sozialen oder arbeitsspezifischen Umfelds anzutreffen und werden dabei primär durch die Umgebungsluft übertragen.

Zahlreiche Studien haben die pathogene Wirkung von Staub im allgemeinen, aber auch von in organischen Stäuben enthaltenen bakteriellen Partikeln und Substanzen wie z.B. Endotoxin oder Peptidoglykan (MICHEL et al. 1991, FOX

et al. 1993, KLINE et al. 1999, WAN und LI 1999, MICHEL 2001, SEBASTIAN et al. 2003), oder Fungi (PEPYS 1969, BRUNEKREEF 1992, DALES et al. 1999) bis hin zu allgemeinen chemischen Substanzen wie Ammonium oder auch Kohlendioxid untersucht (KULLMAN et al. 1998).

Die bei Endotoxin-Belastung in diesen Studien angewandten Untersuchungs- und Auswertungsmethoden basierten auf unterschiedlichen Parametern, die wie folgt gruppiert werden können:

Zeitliche Variablen und Anzahl Messwerte:

- pro Tag
- pro Woche
- Langzeitstudie

Tätigkeitsprofile und Auswahl der Teilnehmer

- Funktion, Tätigkeit
- Anzahl der Teilnehmer
- Auswahl innerhalb einer Gruppe/Schicht oder zwischen Schichten
- Vorerkrankungen und Drogenanamnese (Raucher)

Angewandtes Nachweisverfahren

- (Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test)
- Analytische Methoden (Gaschromatographie)

Klinische Auswertungsmethodik

- Objektive Tests (z.B. spirometrische Messungen)
- Subjektive Erhebungen (Fragebögen, Umfang und Inhalt)

Ungeachtet der teils methodologisch unterschiedlichen Ansätze und der daraus resultierenden teilweise eingeschränkten Generalisierungs- bzw. Standardisierungsmöglichkeiten (SMID et al. 1992), besteht weitgehend Konsens darüber, dass zwischen luftübertragener Endotoxinbelastung und bestimmten chronischen respiratorischen Syndromen bzw. akuten Atemwegserkrankungen wie

Husten, erhöhte Schleimproduktion, Niesen, Atemnot oder Brustenge ein Zusammenhang existiert. Auch eine statistisch relevante Veränderung bestimmter Lungenfunktionsparameter, hier vor allem des forcierten expiratorischen Einsekundenvolumens (FEV_1) bzw. der maximalen expiratorischen Flußrate ($MEF_{25, 50, 75}$) kann als Dosis-Reaktion vorliegen (RYLANDER 1987 [b], JACOBS 1989, MILTON und CHRISTIANI 1989, HEEDERIK et al. 1991, SMID et al. 1994, SCHWARTZ et al. 1995).

Beschäftigte bestimmter Berufe weisen statistisch ein geringeres Lungenkrebsrisiko auf als der allgemeine Teil der Bevölkerung, darunter fallen Gruppen mit landwirtschaftlichem Tätigkeitsprofil (BLAIR 1982, STUBBS et al. 1984, LEE et al. 2002, LANGE et al. 2003), aber auch bestimmte Tätigkeiten aus dem Bereich der Textilindustrie (ENTERLINE et al. 1985, RYLANDER 1990), der Automobilindustrie (SCHROEDER et al. 1997) oder von städtischen Entsorgungsbetrieben (RAPITI et al. 1997). Während die meisten Untersucher den Zusammenhang zwischen vermindertem Lungenkrebsrisiko und einer bestimmten Exposition am Arbeitsplatz ausschließen, fehlt bei einigen Studien nach Ausschluss eines methodologischen 'Auswahlbias' (healthy-worker Effekt, Rauchgewohnheiten) ein schlüssiger Hinweis auf die Ursache für ein vermindertes Lungenkrebsrisiko, während andererseits ein Zusammenhang zwischen einem verminderten Lungenkrebsrisiko und einer nachgewiesenen Endotoxinbelastung aufgezeigt werden konnte (NIEUWENHUIJSEN et al. 1999, LANGE et al. 2003, ASTRAKIANAKIS et al. 2007).

Endotoxine als Bestandteile organischer Stäube kommen sowohl in geschlossenen Räumen des häuslichen oder sozialen Umfelds vor (SARAF et al. 1997, LARSSON et al. 2003, HINES et al. 2003) als auch in den meisten Arbeitsumgebungen mit spezifischer oder erhöhter Belastung durch (die Luft übertragene) organische Partikel. Das können landwirtschaftliche Tierzucht- und Tierverarbeitungsbetriebe sein (ATTWOOD et al. 1986, VINZENTS und NIELSEN 1992), getreideverarbeitende Betriebe (SMID et al. 1992, SCHWARTZ et al. 1995), woll- und baumwollverarbeitende Betriebe (ÖZESMI et al. 1987, LI et al. 1995), Naturlatexproduktionsstätten (HAISHIMA et al.

2001), Obst- und Gemüseplantagen oder Gewächshäuser (DUTKIEWICZ 1994), bis hin zu Brauereien (CARVALHAIRO et al. 1994), Abwasserkläranlagen (RYLANDER 1999) oder Betrieben der papierverarbeitenden Industrie (RYLANDER et al. 1999).

4.4 Arbeitsmedizinische Prävention

4.4.1 Rechtliche Regelung des Arbeits- und Gesundheitsschutzes

Dem Schutz der Gesundheit des arbeitenden Menschen wird auf nationaler und auch auf europäischer Ebene große Bedeutung beigemessen. Dies wird z.B. durch zahlreiche Gesetze, Verordnungen und Regelwerke sowie durch EU-Richtlinien verdeutlicht, die den Schutz der Arbeitnehmer vor Gefahrstoffen sicherstellen sollen. Im Folgenden sollen die wesentlichen rechtlichen Regelwerke kurz dargestellt werden.

Gefahrstoffverordnung und technische Regelwerke

Die Bundesregierung hat mit der Gefahrstoffverordnung eine rechtliche Grundlage für den Schutz vor Gefahrstoffen erlassen.

Die im Vergleich zu vorhergehenden Fassungen völlig neu konzipierte Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) diente bei Ihrer Veröffentlichung am 23. Dezember 2004 insbesondere der Umsetzung verschiedener EU-Richtlinien (Anhang I GefStoffV). Die letzte Änderung der GefStoffV stammt vom 12.10.2007.

§1 Abs. 1-5 der GefStoffV definiert dabei den Anwendungsbereich der Verordnung wie folgt:

- Schutz der Beschäftigten und sonstiger Personen, Schutz der Umwelt
- Das Inverkehrbringen von gefährlichen und nichtgefährlichen Stoffen im Sinne des Chemikaliengesetzes, auch Pestizide.
- Die Beförderung gefährlicher chemischer Stoffe und Zubereitungen.
- Biologische Arbeitsstoffe sind vom Anwendungsbereich ausgenommen, siehe Biostoffverordnung.

Eine Umsetzung in ein technisches Regelwerk, unter Berücksichtigung technischer Grundlagen, arbeitsmedizinischer und arbeitshygienischer Vorgaben so-

wie unter Zugrundelegung von gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnissen erfolgt in "**Technischen Regeln für Gefahrstoffe - TRGS**" (TRGS 001).

Die TRGS werden vom Ausschuss für Gefahrstoffe (**AGS**) erstellt und angepasst.

Die TRGS gliedern sich wie folgt:

- TRGS 001-099 Allgemeines
- TRGS 100-199 Begriffsbestimmungen
- TRGS 200-299 Inverkehrbringen von Stoffen und Erzeugnissen
- TRGS 300-399 Arbeitsmedizinische Vorsorge
- TRGS 400-499 Gefährdungsbeurteilung
- TRGS 500-599 Schutzmaßnahmen
- TRGS 600-699 Ersatzstoffe und -Verfahren
- TRGS 700-899 Brand und Explosionsschutz
- TRGS 900- 999 Grenzwerte, Einstufungen, Begründungen, weitere Beschlüsse des AGS

Insbesondere der Arbeitgeber hat dabei die Vorgaben der TRGS zu beachten, umzusetzen und gegebenenfalls anzupassen.

Biostoffverordnung und technische Regelwerke

Die Verordnung über den Schutz von Beschäftigten gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe - BioStoffV - trat am 27. Januar 1999 in Kraft und wurde am 23.04.2004 geändert. Gleichzeitig wurden biologische Arbeitsstoffe vom Anwendungsbereich der Gefahrstoffverordnung ausgenommen (vgl. §2 Abs.5 i.V.m. §3 Abs. 1 GefStoffV).

Analog zur GefStoffV stellt die BioStoffV ein branchen- und tätigkeitsübergreifendes Richtlinienwerk für den Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen dar. Als Anleitungen für die korrekte und konkrete Umsetzung der Bestimmungen dienen für die Beteiligten die "**Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA)**" (TRBA 001). Diese werden vom "**Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe - ABAS**" aufgestellt und angepasst.

Die TRBA werden wie folgt eingeteilt:

TRBA 001 - 099 Allgemeines, Aufbau und Anwendung

TRBA 100 - 299 Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen

TRBA 300 - 399 Arbeitsmedizinische Vorsorge

TRBA 400 - 499 Gefährdungsbeurteilung

TRBA 500 - 599 Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen

Angegliedert an die TRBA decken die Beschlüsse des ABAS den Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen in besonderen Fällen ab (Reihe 600).

Da die TRBA 002 "Übersicht über den Stand der Technischen Regeln und Beschlüsse für Biologische Arbeitsstoffe", welche eine detaillierte Auflistung aller TRBA nach Kategorien enthielt, nicht mehr weitergeführt wird, erscheint eine aktuelle Sammlung der TRBAs und Beschlüsse nun ausschließlich auf den Internetseiten des Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin - BAUA (<http://www.baua.de>).

4.4.2 Einstufung von Gefahrstoffen und biologischen Arbeitsstoffen

Die TRGS 200 spezifiziert wie Gefahrstoffe, entsprechende Erzeugnisse und Zubereitungen einzustufen sind, gemäß welcher Regeln und Verfahren diese Einstufung erfolgt und wie eine Kennzeichnung zu erfolgen hat.

Das Ziel ist dabei, der Allgemeinheit und den Beschäftigten, die Umgang mit Gefahrstoffen haben, Hinweise über physikalisch-chemische, toxische oder ökotoxische Eigenschaften zu liefern und Möglichkeiten der Gefahrenvermeidung aufzuzeigen (TRGS 200, Abs. 1-4).

Neben chemischen Elementen und ihren Verbindungen gelten auch Substanzen mit unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte und biologische Materialien als Stoffe im Sinne des §3 des Chemikaliengesetzes - ChemG (TRGS 200, Abs. 2.1-2).

Nach §3 und §4 GefStoffV sind Stoffe und Zubereitungen dann als gefährlich einzustufen, wenn sie mindestens eines der folgenden Merkmale aufweisen (TRGS 200, Abs. 2.5)

- explosionsgefährlich
- brandfördernd
- hochentzündlich
- leichtentzündlich
- entzündlich
- sehr giftig
- giftig
- gesundheitsschädlich
- ätzend
- reizend
- sensibilisierend
- krebserzeugend
- fortpflanzungsgefährdend
- erbgutverändernd
- umweltgefährlich

Zur Einstufung eines Stoffes oder einer Zubereitung können unterschiedliche Informationen herangezogen werden, die neben den Hinweisen auf physikalisch-chemische Zusammensetzung und Eigenschaften auch toxikologische oder ökotoxische Daten, Angaben über Erfahrungen aus der Praxis (am Menschen), oder Verhalten bei Freisetzung, Abbau und möglichen Reaktionen liefern (TRGS 200 Abs. 3-1).

Erhebungen über Erfahrungen aus der Praxis können dabei unter anderem anhand von

- Erkenntnissen aus arbeitsmedizinischen Untersuchungen
- Erfahrungen bei Herstellung und Verwendung
- Ergebnissen klinischer Untersuchungen
- Erkenntnissen von Tests mit freiwilligen Probanden

erfolgen (TRGS 200, Abs. 3.5-3).

Für biologische Arbeitsstoffe definiert die TRBA 450 „Einstufungsregeln für Biologische Arbeitsstoffe“ (TRBA 450). Die Einstufungskriterien dienen hauptsächlich dazu, Wirkungen auf Menschen einschätzen zu können und Mitarbeiter, die Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen haben, entsprechend zu schützen.

Die Einstufung erfolgt dabei aufgrund des Risikos, Infektionskrankheiten beim gesunden Menschen hervorzurufen, in 4 Risikogruppen. Auch toxische und sensibilisierende Wirkungen sind dabei gemäß EU Richtlinie 2000/54/EG in die Gefährdungsbeurteilung mit einzubeziehen (TRBA 450, Abs. 3-2, 3-3).

Die Einstufungskriterien gelten für die Organismengruppen der Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Folgende Kriterien sind dabei definiert (TRBA 450, Abs. 4):

- Systematische Stellung - Bezeichnung oder Artbezeichnung, ggf. Zuordnung
- Stoffwechseleigenschaften von Pro- und Eukaryoten (gilt nicht für Viren und Parasiten)
- Natürlicher Standort, Lebensweise

- Pathogenität für den Menschen, Virulenz mit folgenden Pathogenitätsfaktoren:
 - Adhäsine
 - Antiphagozytäre Faktoren
 - Invasionsfaktoren
 - **Toxine (Endotoxine und Exotoxine)**
 - Immunomodulatoren

Weitere Kriterien für Pathogenität:

- Krankheitsbild
- Infektiöse Dosis, Manifestation
- Persistenz, Latenz
- Behandlungsmöglichkeiten
- Vorbeugungsmöglichkeiten
- Diagnosemöglichkeiten
- Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen
- Mechanismen und Wege der Übertragung (u.a. aerogen, oral, perkutan)
- Epidemiologie
- Widerstandsfähigkeit, Tenazität

4.4.3 Grenzwerte

4.4.3.1 Arbeitsplatzgrenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz

Die Beurteilung der Gefahrstoffexposition von Beschäftigten, die entsprechende Handhabung und ggf. Vermeidung und Prävention finden anhand definierter Grenzwerte statt, bei deren Einhaltung eine akute oder chronische Gefährdung von Beschäftigten in der Regel nicht zu erwarten ist.

Der „Arbeitsplatzgrenzwert“ (AGW) stellt dabei gemäß TRGS 900 „Arbeitsplatzgrenzwerte“ (TRGS 900) die zeitlich gewichtete, durchschnittliche Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz im Bezug auf einen Referenzzeitraum dar.

Nach der Neuordnung der GefStoffV von Januar 2005 und der dadurch veranlassten Neufassung der TRGS 900 gibt es nur noch eine Art von Luftgrenzwert, den gesundheitsbezogenen AGW. Gefahrstoffe, für die nur ein technischer Grenzwert existierte oder die Datenlage unzureichend ist oder Stoffe, für die (noch) kein AGW festgesetzt werden konnte, wurden dabei aus der TRGS 900 entfernt und z.T. in eine der TRGS 900 angegliederte Bearbeitungsliste überführt (Bearbeitungsliste des AGS zur TRGS 900).

Zu jedem Gefahrstoff, für den ein AGW erstellt wurde und der in der TRGS 900 aufgelistet ist, wird ein zugehöriges Begründungsdokument erstellt. Die Begründungsdokumente werden vom AGS verwaltet und sind unter <http://www.baua.de> zu finden.

Begründungen und Erläuterungen zur Festlegung von AGW in der Luft am Arbeitsplatz sind in TRGS 901 enthalten (TRGS 901).

AGW sind Mittelwerte, die auf eine Exposition während einer achtstündigen Schicht, für die Dauer von 5 Tagen pro Woche über die Lebensarbeitszeit bezogen werden.

Als Konzentration (C) eines Stoffes wird dabei die Menge eines Stoffes pro Luftvolumeneinheit definiert.

Dieses ist bei Schwebstoffen die Masse pro Volumeneinheit (mg/m^3), bei Gasen zusätzlich auch das Volumen pro Volumeneinheit (ml/m^3) – „parts per million“ (ppm) (TRGS 900, Abs. 1-3).

Zu den Schwebstoffen zählen Nebel, Staub und Rauch. Bei der Beurteilung des Gefährdungspotentials wird dabei nicht nur die Konzentration gemessen, sondern auch die Partikelgestalt als Einflussfaktor definiert.

So wird ein einatembarer Anteil (E) definiert und davon wiederum der alveolengängige Anteil (A) abgegrenzt.

Die Ermittlung und Beurteilung der Konzentration von gefährlichen Stoffen in der Luft am Arbeitsplatz wird durch die TRGS 402 (TRGS 402) geregelt. TRGS 402 legt neben dem Anwendungsbereich noch eine Vielzahl von Definitionen fest, die bei der technischen Ermittlung und Bewertung von Stoffkonzentrationen relevant sind:

- (Inhalative) Exposition, Kurzzeitbewertungen

- Arbeitsbereich
- Messergebnis und Messverfahren
- Befund (Einhaltung, Überschreitung).

4.4.3.2 Biologische Grenzwerte

Neben den in TRGS 900 definierten AGW führt TRGS 903 eine weitere Begriffsbestimmung für biologische Grenzwerte ein als toxikologisch-arbeitsmedizinisch abgeleitete Konzentrationen eines Stoffes, seiner Metaboliten oder seiner Beanspruchungsindikatoren in biologischem Material (TRGS 903, Abs. 1-1) und legt zusätzlich zu der Auflistung der biologischen Grenzwerte (BGW) (TRGS 903 Abs. 3) auch den Rahmen ihrer Anwendung fest, u.a. als Abgrenzung zu den AGW (TRGS 903 Abs. 2).

Die zeitliche Mittelung für biologische Grenzwerte erfolgt dabei in Analogie zu den AGW, wobei die Grenzwerte als Konzentrationen und als Bildungs- oder Ausscheidungsrate festgelegt werden können (TRGS 903, Abs. 1-3). Biologische Grenzwerte gelten in der Regel für Einzelstoffe (TRGS 903, Abs. 1-2).

4.4.4 Richtwerte für Endotoxinbelastungen in der Luft am Arbeitsplatz

Arbeitsmedizinisch relevant sind luftgetragene Endotoxine. Akute Endotoxininhalationen können Husten, Beeinträchtigung der Lungenfunktion, Fieber und grippeähnliche Symptome hervorrufen. Langandauernde Expositionen können zur chronischen Bronchitis führen (RYLANDER 1990).

Aus einer Endotoxinbelastung ergeben sich gesundheitsbeeinflussende akute und chronische Effekte insbesondere auf die Atemwege. Entscheidend für die individuelle Ausprägung dieser Wirkungen sind Höhe und Dauer der Exposition und die persönliche Empfindlichkeitsschwelle.

Höhere Konzentrationen von bis zu 40.000 Endotoxineinheiten pro m³ Atemluft (EU/m³) wurden an Arbeitsplätzen in der Landwirtschaft, naturproduktverarbeitenden Branchen oder der Abfall- und Abwasserbehandlung nachgewiesen

(SCHWARTZ et al. 1995, DOUWES et al. 2000, WANG et al. 2002, THORN et al. 2002, LINSEL et al. 2003, HARTUNG et al. 2004).

Sehr häufig wurde dabei als Endotoxinnachweismethode der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test verwendet.

Die durchgeführten Analysen erfolgten dabei unter verschiedenen Bedingungen.

So wurden nicht nur unterschiedliche Filtermaterialien verwendet, es kamen auch unterschiedliche Extraktionsmethoden zum Einsatz. Auch abweichende Verfahren bezüglich der Lagerung der Extrakte vor der Bestimmung, sowie die Verwendung von unterschiedlichen Reagenzien verschiedener Hersteller haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt (REYNOLDS et al. 2002). Der LAL Test stellt zwar ein sensibles, aber auch störanfälliges Messverfahren dar und zeigt deutlich auf, dass die Einhaltung eines standardisierten Messverfahrens von großer Bedeutung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist. Somit erlauben solche Tests weder die Definition von Endotoxingrenzwerten für einzelne Branchen, noch die eines allgemein gültigen Schwell- oder Grenzwertes.

Die TRBA 405 „Anwendung von Messverfahren und technischen Kontrollwerten für luftgetragene Biologische Arbeitsstoffe“ (TRBA 405) gibt dabei allgemeine Empfehlungen für die Bestimmung von Bakterien und Pilzen in der Luft am Arbeitsplatz und die Bewertung von technischen Kontrollwerten zur Überprüfung der technischen Wirksamkeit von Schutzmaßnahmen.

Als Standardverfahren für die Arbeitsplatzbeurteilung soll dabei die in einer Arbeitsmappe des Berufsgenossenschaftlichen Instituts für Arbeitssicherheit (BIA) veröffentlichte Vorschrift zur Messung von Gefahrstoffen (Kennziffer 9450 – Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen in der Luft am Arbeitsplatz) herangezogen werden (BIA ARBEITSMAPPE).

Studien mit gesicherter statistischer Datenbasis (CASTELLAN 1987, SMID 1993) mit dem Nachweis akuter oder chronischer Effekte von Endotoxin liefern Angaben über Wirkungsschwellen (No Observed Effect Level, NOEL), die zwischen 100 EU/m^3 (Castellan) und 150 EU/m^3 (Smid) liegen, während Rylander

(1999 [b]) NOEL Werte von 100 EU/m³ (Atemwegsentzündungen) bis 2000 EU/m³ (toxische Pneumonitis) anführt.

Diese Studien sind dabei mit nicht-standardisierten Analyse- und Messverfahren durchgeführt worden und verdeutlichen die oben angeführte Problematik einer nicht vorhandenen aussagekräftigen und studienübergreifenden Vergleichsmöglichkeit.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Fehlen von international anerkannten Grenz- oder Richtwerten für Endotoxine (INFORMATIONSPAPIER ABAS) wissenschaftlich hauptsächlich begründet wird durch:

- eine messtechnisch nicht vergleichbare Basis
- heterogene Zusammensetzung von Bioaerosolen in verschiedenen Branchen
- Probleme bei der Umsetzung von NOEL-orientierten Grenzwerten in bestimmten Branchen (etwa innerhalb der Landwirtschaft)

4.5 Nachweis von Endotoxinen

Zum Nachweis von Endotoxinen können entweder biologische oder analytische Methoden herangezogen werden. Als biologische Methode hat sich der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test bewährt, während zu den chemisch-analytischen Methoden die Analyse mittels Gaschromatographie-/Massenspektrometrie- oder Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung gezählt wird.

4.5.1 Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test

Die Koagulation von Blut des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus Polyphemus*) wurde 1885 von Howell beschrieben. Siebzig Jahre später fand Bang (1953) heraus, dass gram-negative Bakterien die Koagulation von *Limulus*-Blut verursachen. Die Reaktion erfolgt dabei enzymatisch, die Enzyme befinden sich in der Granula der Amöbozyten (LEVIN et al. 1964a).

Die Gerinnungskaskade wird durch Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) in Gang gesetzt (LEVIN et al. 1964b).

Obwohl die komplette Reaktionskette noch nicht vollständig erforscht ist, nimmt man an, dass eine kaskadenartig ablaufende Reaktion enzymatischer Aktivierungsschritte zur Blutgerinselbildung führt.

Im letzten Schritt wird Gerinnungsprotein (Koagulogen) durch aktiviertes Gerinnungsenzym gespalten. Die unlöslichen Spaltprodukte vereinigen sich in einer ionischen Wechselwirkung und bilden die Gel-Matrix (LEVIN et al. 1968, NOVITSKY 1984, WATSON et al. 1987).

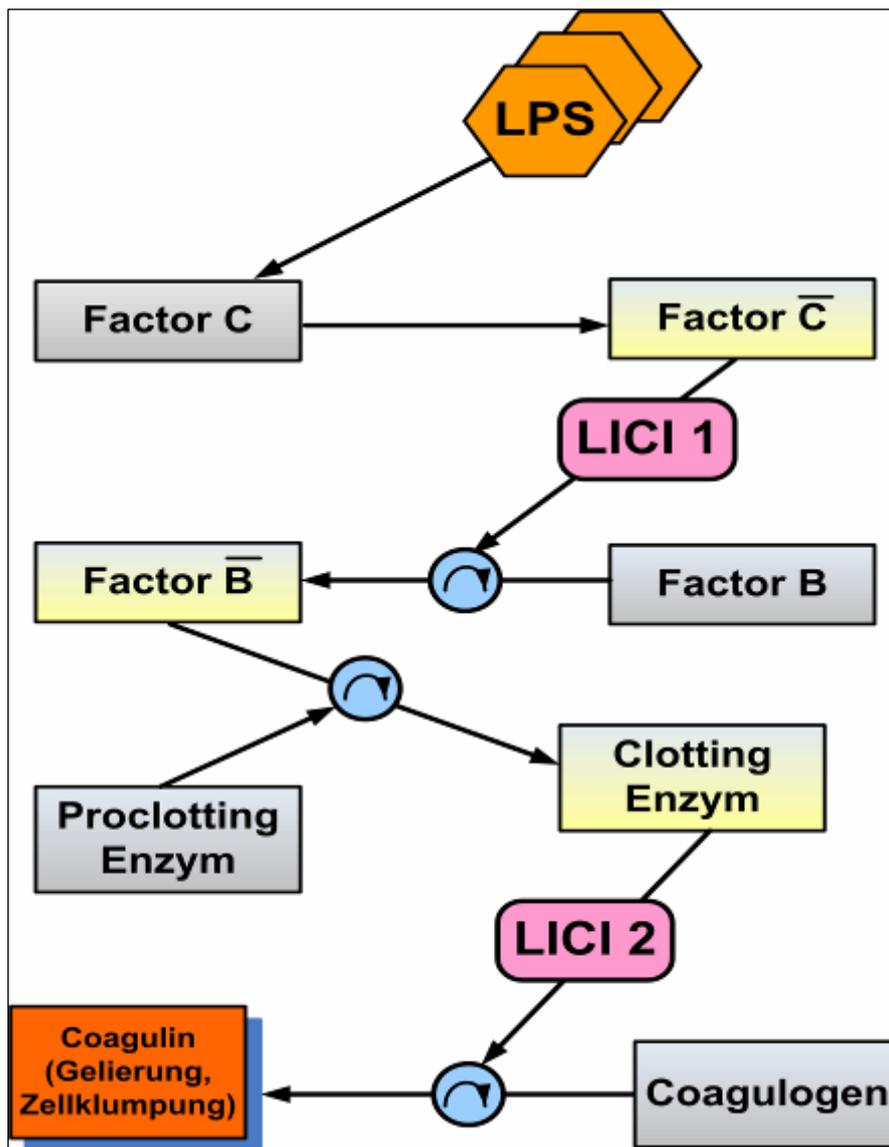


Abbildung 19: LPS-induzierte Gerinnungskaskade beim LAL-Test (nach IWANAGA 2007)

Der LAL-Test ist extrem sensitiv auf Endotoxine, ist aber weitgehend ungeeignet, um absolute Endotoxinmengen zu bestimmen (LARSSON und SARAF 1996). Er liefert Informationen über die endotoxische Aktivität einer endotoxinhaltigen Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe (LPS aus E.coli), jedoch erlaubt die endotoxische Aktivität keine konkreten Rückschlüsse zur Endotoxinquantität.

Der LAL-Test lässt sich nicht standardisieren, da er nicht bakterienspezifisch ist, Endotoxine verschiedener gram-negativer Bakterien weisen unterschiedliche Toxizitäten auf (ALLERMANN HANSEN et al. 1999).

Darüberhinaus ist bekannt (NOVITSKY et al. 1982, REMILLARD et al. 1987), dass Interferenzen, hervorgerufen durch verschiedene Chemikalien, Proteine und andere Wirkstoffe, die Aussagefähigkeit des LAL-Tests zusätzlich erschweren.

Das Problem der fehlenden Standardisierung von LAL-Tests erschwert selbst bei Anwendung modifizierter LAL-Tests (turbidimetrischer Test oder Chromogen-Test) nach wie vor qualitativ und quantitativ kohärente Aussagen (ZHANG et al. 1988, REYNOLDS et al. 2002).

4.5.2 Chemisch-analytische Nachweisverfahren zur Bestimmung von Endotoxin

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyseverfahren setzen den Fokus auf die Quantifizierung der 3-Hydroxyfettsäuren von LPS (SONESSON et al. 1990, MIELNICZUK et al. 1993, WALTERS et al. 1994, SARAF und LARSSON 1996, SARAF et al. 1997, SARAF et al. 1999, JASCHINSKI 2004), während andere Ansätze von einem Nachweis des 2-Keto-3-Deoxy-D-Mannooctansäure (KDO) Anteils, einem inhärenten Bestandteil von LPS, ausgehen (RYBKA und GAMIAN 2005, GAROZZO et al. 2005).

Neuere Studien schlussfolgern dabei, dass nicht alle 3-Hydroxyfettsäuren gleichermaßen zum Endotoxinnachweis geeignet sind (LARSSON et al. 2005) und dass 3-Hydroxyfettsäuren mit 16 oder mehr C-Atomen u.U. eher als Marker für Actinobakterien in Betracht gezogen werden können.

Neben "klassischen" GC/MS Verfahren kommen auch erweiterte Analyseverfahren wie Ionenfallen Tandemmassenspektrometrie zum Einsatz (GC/MS/MS), welche sich vor allem durch verbesserte Nachweisspezifität auszeichnen (LARSSON und SARAF 1996).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Verfahren (HPLC) sind eine weitere Möglichkeit, 3-Hydroxyfettsäuren und KDO von Endotoxinen hochspezifisch nachzuweisen (LYNGBY et al. 2002).

Eine Kombination aus Kapillarelektrophorese, einer hochauflösenden Technik zur Separierung von biologischen Gemischen, mit massenspektrometrischen Analyseverfahren zum Nachweis von LPS in komplexen Strukturen, stellt eine weitere präzise chemische-analytische Nachweismethode dar (LI et al. 2005, LI und RICHARDS 2006).

4.5.2.1 Grundlagen der Gaschromatographie

Die Gaschromatographie beruht, wie andere chromatographische Verfahren auch, auf dem Prinzip von Verteilung und/oder Absorption.

Die zu analysierenden Substanzen müssen dabei gasförmig vorliegen oder sich durch Verdampfen in den gasförmigen Zustand überführen lassen (SCHWEDT 1979).

Mittels eines Injektors wird die Probe auf eine Trennsäule gegeben. Dazu verwendet man ein Trägergas, auch mobile Phase genannt, meist Stickstoff, Helium oder Wasserstoff.

Als Säule dient eine Röhre (gepackte Säule), diese kann aus Glas und bei älteren Geräten auch aus Metall bestehen. Heutzutage werden i.d.R. aber Kapillaren aus beschichtetem Quarzglas eingesetzt. Die Kapillare ist innen mit dem Trennmaterial (stationäre Phase) ausgekleidet, bei modernen Säulen ist das ein hochvernetzter Film unterschiedlicher Dicke (Silikone). Die Säule befindet sich dabei im GC-Ofen, der bis auf 450°C aufgeheizt werden kann (SCHOMBURG 1987).

Je nach Aggregatzustand der stationären Phase unterscheidet man die Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) und die Gas-Fest-Chromatographie (GSC).

Im einfachsten Fall erfolgt die Auftrennung einer Probe ausschließlich durch die wiederholt (tausendfache) Verteilung aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelsubstanzen. Eine Wechselwirkung mit der stationären Phase findet dabei nicht statt.

Eine Wechselwirkung der Probe mit der stationären Phase wird andererseits in vielen Fällen gezielt herbeigeführt, diese ist je nach funktioneller Zusammensetzung und Struktur der Trennphase unterschiedlich stark.

Die Trennung erfolgt bei unpolaren Phasen ausschließlich über Dispersionswechselwirkungen (Van-der-Waals Bindungen), während bei polaren Phasen Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Donator-Akzeptor Bindungen stattfinden (BAUGH 1997).

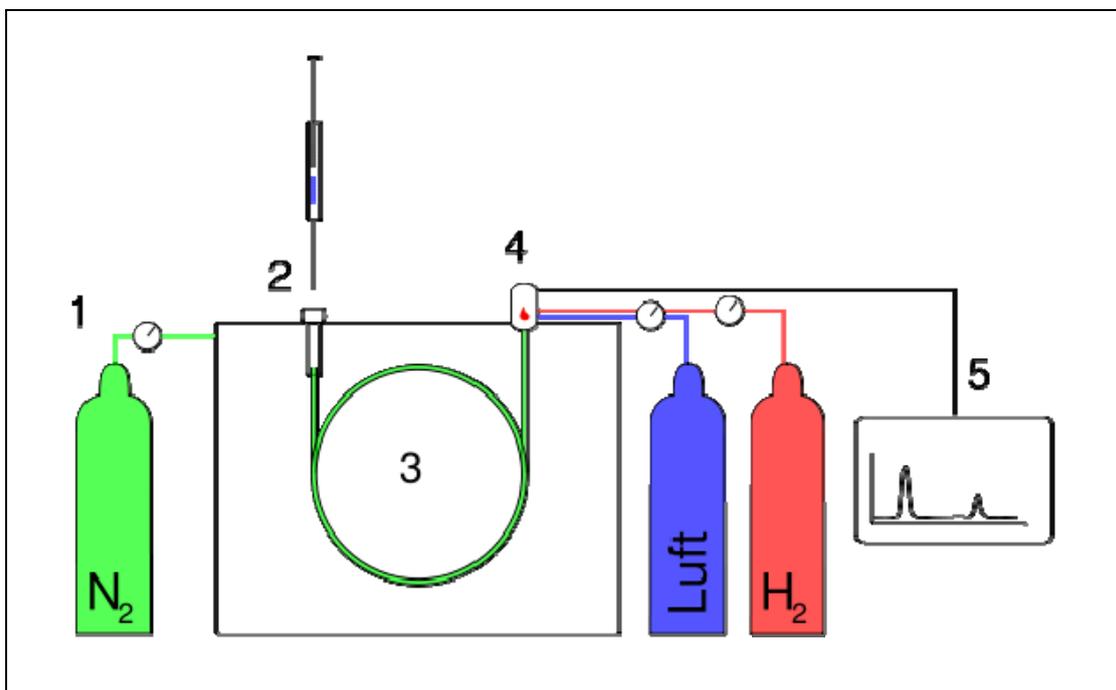


Abbildung 20: Prinzipieller Aufbau eines Gaschromatographen (Quelle: de.wikipedia.org)

- 1: Trägergas
- 2: Injektor
- 3: Säule/Ofen
- 4: Detektor, z.B. Massenspektrometer
- 5: Aufzeichnung

Im Gegensatz zur Gaschromatographie wird bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) die Probe mittels einer flüssigen Phase (*Eluent*, *Elutionsmittel*) mit hohem Druck über die Trennsäule transportiert.

Zur Trennung finden hauptsächlich adsorptionschromatographische oder verteilungschromatographische Verfahren Anwendung (ACED und MÖCKEL 1991, MEYER 1999).

Bei der Adsorptionschromatographie binden die Substanzen der Probe über Dipol-Dipol Wechselwirkungen an die stationäre Phase. Diese Bindungen sind reversibel und je nach Art der Probensubstanzen unterschiedlich stabil. Je nach Bindungsstabilität ist die Verweildauer unterschiedlich, wodurch eine Trennung stattfindet.

Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der Probenbestandteile in den beiden Phasen zur Separierung aus (SCHWEDT 1996).

4.5.2.2 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Entwicklung der Massenspektrometrie (MS) geht auf Arbeiten von J. J. Thomson aus dem Jahre 1910 zurück, in denen er zeigte, dass das Edelgas Neon aus einer Mischung von zwei Isotopen (^{20}Ne und ^{22}Ne) besteht (GROSS 2004).

KIENITZ beschrieb 1968 das Grundprinzip der Massenspektrometrie, welches darin besteht, aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen, diese Ionen nach ihrer Masse (m) und Ladung (z) zu trennen und sie mit einem Registriersystem nach Masse und Häufigkeit qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die Ionisation der Substanzen kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen und Photonen erfolgen. Die im allgemeinen positiven Ionen können einzelne ionisierte Atome, ionisierte Moleküle oder deren Fragmente sein. Die Ionentrennung erfolgt durch statische oder dynamische elektrische und magnetische Felder.

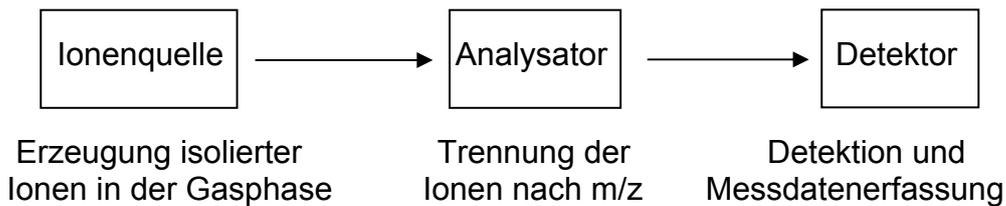


Abbildung 7: Blockbild eines Massenspektrometers und Funktion der Baugruppen
(Quelle: Massenspektrometrie MS-Labor@OCIHD)

Als Massenspektrum (GROSS 2004), das eine zweidimensionale Information von Ionenhäufigkeit versus Ionenmasse zu Ladungsverhältnis (m/z) darstellt, werden die bei der Ionisierung einer Substanz erzeugten Ionen entweder gleichzeitig oder zeitlich nacheinander registriert.

Die Intensität wird aus der Fläche oder einfach der Höhe der Signale, der sogenannten Peaks, ermittelt und auf den intensivsten Peak im Spektrum, den sogenannten Basispeak, normiert.

Ionisationsquelle

Die Elektronen-Stoß-Ionisation (Electron Ionization, EI) ist die universellste Ionisationsmethode der organischen Massenspektrometrie. Unter EI-Bedingungen werden die zu untersuchenden Moleküle isoliert in einer hochvakuumierten Ionisationskammer in der Gasphase bei 10^{-5} bis 10^{-6} mbar mit Elektronen hoher kinetischer Energie (meist 70 eV) beschossen. Dabei werden aus dem Molekül ein oder zwei Elektronen herausgeschlagen. Aus dem Molekül M wird so das Molekülion M^+ , welches anschließend durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durch ein magnetisches Feld dispergiert wird (BUDZIKIEWICZ 2005).

Analysator

Nach der Ionisierung werden die Ionen mit der Masse m und der Ladung z (i.d.R. $z = 1$) durch ein magnetisches Feld abgelenkt und gelangen zum Analysator. Im Analysator werden die Ionen nach ihrer Masse und Ladung getrennt. Die Quadrupol-Methode stellt dabei das einfachste Prinzip der Massenanalyse dar. Die Ionen durchfliegen eine Anordnung von vier zylinderförmigen Elektroden, die parallel verlaufen und deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden. Die gegenüberliegenden Elektroden befinden sich auf gleichem Potential und zwischen benachbarten Elektroden wird eine Gleich- und eine Wechselspannung angelegt. Das Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung bestimmt, welche Ionen die Anordnung passieren können. Haben die Ionen nicht die richtige Masse, werden sie nach außen beschleunigt und kollidieren mit den Elektroden (HÜBSCHMANN 1996, BUDZIKIEWICZ 2005).

Weitere Analysatoren, die in der Massenspektrometrie Anwendung finden, werden nach den verschiedenen Methoden zur Ionentrennung (nach m/z) bezeichnet:

- Sektorfeldgeräte (Magnetische und elektrische Sektorfelder senkrecht zur Flugrichtung der Ionen)
- Ionencyclotronresonanzgeräte (Elektrische Anregung in sehr starkem Magnetfeld und Bestimmung der Cyclotronresonanzfrequenz. Erlaubt Speicherung der Ionen.)
- Flugzeitgeräte
- Hybridgeräte (Kombination verschiedener Analysatoren für MS/MS)

Detektor

Die in der Ionenquelle gebildeten und vom Massenanalysator entsprechend ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennten Ionen werden von einem Detektor registriert, dabei wird jeweils die Intensität des Ionenstroms ermittelt. Der Detektor erzeugt ein elektrisches Signal, das nach Digitalisierung zur Auswertung an das Datensystem weitergegeben wird.

Wichtige Kenngrößen eines Detektors sind die Genauigkeit und die Empfindlichkeit (statische Größen) sowie der Detektionsbereich und die Retentionszeit (dynamische Größen).

Folgende Detektoren können eingesetzt werden:

- Fotoplatten
- Array-Detektoren
- Faraday-Auffänger
- Szintillationsdetektoren
- Sekundärelektronenvervielfacher

Der Sekundärelektronenvervielfacher ist aufgrund seines hohen Verstärkungsfaktors und seiner Anwendbarkeit für geringe Ionenströme (bis zu 10^{-16} A) der heute am häufigsten eingesetzte Detektor (HÜBSCHMANN 1996, BUDZIKIEWICZ 2005).

4.6. Alternativmethoden zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin

Ein einstufiges Derivatisierungsverfahren als Alternative zu den bisher zweistufigen Verfahren der validen Endotoxinquantifizierung über 3-Hydroxyfettsäuren wurde in einer Arbeit über die Entwicklung einer gaschromatographischen Methode mit massenselektiver Detektion zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin (JASCHINKI 2004) vorgestellt.

Vorteile des einstufigen Derivatisierungsverfahren sind die Minimierung von Arbeitsschritten bei der Probenaufbereitung und die Reduktion möglicher Fehler im Analyseverfahren.

Die sichere Trennung der 2-Hydroxyfettsäuren von den 3-Hydroxyfettsäuren (beide Fettsäuretypen kommen in luftgetragenen, komplex strukturierten Staubproben vor) mittels der N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) und N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA)-Derivatisierung gewährleistete eine störungsfreie gaschromatographische Endotoxinquantifizierung.

Ein weiterer Aspekt, den Jaschinskis Arbeit aufzeigte, ist die Entstehung von Eliminierungsprodukten während der sauren hydrolytischen Abspaltung der Fettsäuren vom LPS-Molekül und während der Injektion und Trennung der Derivate auf der GC-Säule. Die Tendenz der 3-Hydroxyfettsäuren, Wasser zu eliminieren sowie die Tendenz der Derivate, Trifluoressigsäure abzuspalten, führt zur Entstehung von α,β -ungesättigten Verbindungen und somit zu möglichen Störreaktionen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Bildung von α,β -ungesättigten Verbindungen abhängig von der Injektortemperatur ist.

Die Umstellung vom thermischen Split/Splitless-Injektor auf einen Cool-on-Column-Injektor führte zu einer Reduktion der thermischen Belastung und damit der Menge an Eliminierungsprodukten.

Die Methode erfüllt mit Bestimmungsgrenzen von 7 bis 50 pg/Injektion und relativen Standardabweichungen von 5 bis 19 %, die Qualitätsanforderung für die valide Quantifizierung von Endotoxinkonzentrationen.

4.7 Bewertung der neuen Methode zur Quantifizierung von bakteriellem LPS mit Hilfe der GC/MS

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode zeigt, dass die Derivatisierung beider funktionellen Gruppen (Carboxyl- und Hydroxylfunktion) mittels Bis(trimethylsilyl)fluoracetamid und Pentafluorobenzylbromid gewährleistet werden kann. Die Injektion in den Gaschromatographen erfolgte mittels Cool-on-Column-Injektion, einer thermisch schonenden Methode zur effektiven Vermeidung der Entstehung potenzieller Eliminierungsprodukte.

Die Kalibration mit der 15:0 3-OH FA als internem Standard ergab für die 10:0 3-OH, 12:0 3-OH, 14:0 3-OH sowie für die 16:0 3-OH FA Kalibrationsfunktionen 2. Ordnung mit exzellenten Korrelationskoeffizienten. Somit kann eine valide Quantifizierung anhand dieser Kalibrationsfunktionen gewährleistet werden.

Die Ergebnisse der erzielten Bestimmungsgrenzen (114-125 fmol) zeigen, dass das gewählte Derivatisierungsverfahren mittels Bis(trimethylsilyl)fluoracetamid und Pentafluorobenzylbromid eine mit anderen Verfahren (JASCHINSKI 2004) vergleichbare Empfindlichkeit (Sensitivität) aufweist.

Bei einer Konzentration von 62,5 pmol/µl wurden Standardabweichungen von 5,61 bis 10,69% erreicht.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Bis(trimethylsilyl)fluoracetamid/Pentafluorobenzylbromid-Methode hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Sensitivität alle Anforderungen zur Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen, die üblicherweise in Luft-/Staubproben aus unterschiedlichen häuslichen, allgemeinen/sozialen oder arbeitsspezifischen Bereichen vorkommen (SARAF et al. 1997, LARSSON et al. 2003, HINES et al. 2003), erfüllt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Ionisierung der 3-OH FA-Derivate im EI-Modus. Durch die Einführung der Pentafluorbenzylgruppe sollten die Derivate

aber insbesondere auch für den NICI-Modus (Negative Ion Chemical Ionization) geeignet sein. Dieser Modus erfasst halogenierte Analyten besonders empfindlich. Mittlerweile konnte die hier erarbeitete Methode erfolgreich für den NICI-Modus adaptiert werden (BLETZ 2008). Wie erwartet war eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 100 im Vergleich zum EI-Modus zu verzeichnen.

4.8. Beantwortung der eingangs gestellten Fragen

Die im Rahmen dieser Arbeit gestellten Fragen lassen sich abschließend wie folgt beantworten:

- (1) Mit Hilfe der Bis(trimethylsilyl)fluoracetamid und Pentafluorobenzylbromid-Derivatisierungsreagenzien lassen sich die aus Endotoxin hydrolytisch freigesetzten 3-Hydroxyfettsäuren reproduzierbar derivatisieren.
- (2) Nach erfolgter Derivatisierung lassen sich die Derivate der 3-Hydroxyfettsäuren mit Hilfe der GC/MS-Kopplung im EI-Modus mit Single-Ion-Detektion nachweisen.
- (3) Das gewählte Derivatisierungsverfahren weist abhängig von der Kettenlänge der 3-Hydroxyfettsäuren Bestimmungsgrenzen von 114-125 fmol, sowie relative Standardabweichungen von 5-11% auf und erfüllt somit die Qualitätsanforderungen, die an eine Methode zur validen Quantifizierung hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Sensitivität zu stellen sind. Endotoxinkonzentrationen, die üblicherweise in Staub-/Luftproben in häuslichen, allgemeinen/sozialen oder arbeitsspezifischen Bereichen vorkommen, können sicher detektiert werden.
- (4) Die in dieser Arbeit entwickelte Bestimmungsmethode mit Ionisierung der Derivate im EI-Modus eignet sich als Grundlage für neue Endotoxinbestimmungsmethoden mit Negative Ion Chemical Ionization (NICI). Mittlerweile konnte BLETZ (2008) zeigen, dass mit NICI eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 100 erreicht werden kann.

5. Zusammenfassung

Als Standardmethode zur Bestimmung von Endotoxin gilt derzeit der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL). Dieser Test erfasst jedoch nicht die Endotoxin-Quantität, sondern die Endotoxin-bedingte biologische Aktivität einer Probe. Zudem ist der Test nicht Endotoxin-spezifisch und stör anfällig. Der Bedarf für alternative Verfahren ist daher augenscheinlich, umso mehr, als die zuverlässige messtechnische Erfassung von Endotoxin in Aerosolen mit komplexer Matrix grundlegende Voraussetzung für einen effektiven Arbeitsschutz bei Endotoxin-Exposition ist. Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative gaschromatographisch/massenspektrometrische Methode zu entwickeln, die die zuverlässige und sensitive Quantifizierung von Endotoxin in Staubproben in arbeitsplatz- und umweltrelevanten Konzentrationen erlaubt.

Endotoxine sind amphiphilische bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Lipidanteil (Lipid A). Der Lipid A-Anteil enthält charakteristische 3-Hydroxyfettsäuren (3-OH FA), die für die Quantifizierung genutzt werden können. Nach Hydrolyse und Extraktion werden die freien Fettsäuren in einer zweistufigen Reaktion derivatisiert, wobei die Säurefunktion mit 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid verestert wird und in die Hydroxyfunktion mit Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid eine Trimethylsilylgruppe eingeführt wird. Diese Derivate werden mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung im Single Ion Modus (SIM) mit Electron Ionization (EI) getrennt und quantifiziert.

Die Methodenentwicklung erfolgte zunächst mit einem Standardgemisch Endotoxin-typischer 3-Hydroxyfettsäuren. Die Basislinien-Trennung aller 3-OH FA-Derivate (10:0 3-OH, 12:0 3-OH, 14:0 3-OH, 16:0 3-OH sowie 15:0 3-OH als interner Standard) konnte realisiert werden. Für die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus wurde das Pentafluorbenzyl Kation (m/z 181) genutzt, das in allen Fällen den Basispeak der Massenspektren bildet. Die erstellten Kalibrationsfunktionen zweiter Ordnung wiesen ausgezeichnete Korrelations-

koeffizienten auf. Mit Standardabweichungen in der Serie zwischen 3 und 11% bzw. von Tag zu Tag zwischen 0,6 und 10% konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode gezeigt werden. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 30 und 40 fmol/ μ l. Nach Abschluss der Methodenentwicklung konnte die Validität der Methode durch Aufarbeitung und Analyse reiner LPS von E. coli demonstriert werden.

Damit kann eine präzise und sensitive Alternativmethode zur Bestimmung von Endotoxin zur Verfügung gestellt werden. Ein wesentlicher Vorteil der neuen Methode ist, dass eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit durch Einsatz eines anderen, insbesondere für halogenierte Substanzen geeigneten Ionisierungsverfahrens (Negative Ion Chemical Ionization, NICI) erreichbar ist. In einer nachfolgenden Arbeit konnte dies mittlerweile mit einer Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 100 belegt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aced G, Möckel, HJ – Liquidchromatographie (1991) Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. Wiley-VCH
2. Agarwal N, Murphy JG, Cayten CG, Stahl WM (1993) Blood transfusion increases the risk of infection after trauma. Arch Surg 128:171-177
3. Allermann HL, Poulsen OM, Würtz H (1999) Endotoxin potency in the A 549 lung epithelial cell bioassay and the limulus amoebocyte lysate assay. J Immunol Methods 226:49-58
4. Amati L, Caradonna L, Greco B, Leo S, Caccavo D, Jirillo E (1998) Impairment of phagocytic and T-cell mediated antibacterial activity and plasma endotoxins in patients with untreated gastrointestinal cancer. Scand J Gastroenterol 33(8):847-852
5. Andersen L, Baek L, Degn H, Lehd J, Krasnik M, Rasmussen JP (1987) Presence of circulating endotoxins during cardiac operations. J Thorac Cardiovasc Surg 93:115-119
6. Astrakianakis G, Seixas N, Ray R (2007) Lung Cancer Risk Among Female Textile Workers Exposed to Endotoxin. JNCI J Natl Cancer Inst 99(5):357-364
7. Attwood P, Versloot P, Heedrik D, De Witt R, Boleij JSM (1986) Assessment Of Dust And Endotoxin Levels In The Working Environment Of Dutch Pig Farmers: A Preliminary Study. Am Occup Hyg Vol 30:201-208
8. Danuser B, Monn C (1999) Endotoxine in Arbeitswelt und Umwelt, Schweiz Med Wochenschr 129:475 – 483

-
9. Baigrie R, Lamont P, Whiting S, Morris P (1993) Portal endotoxin and cytokine responses during abdominal aortic surgery. *Am J Surg* 166:248-251
 10. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D (2004) Taking a Toll on humans disease: Toll – like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 4:1129-1138
 11. Bang FB (1953) The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Biol Bull* 105:361-362
 12. Baron S (1996) Bacterial Pathogenesis. *Medical Microbiology*. The University of Texas Medical Branch of Galveston
 13. Baugh P (1997) Gaschromatographie. Eine anwenderorientierte Darstellung. Springer Verlag
 14. Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz (BIA) – Messung von Gefahrstoffen, Arbeitsmappe. Expositionsermittlung bei chemischen und biologischen Einwirkungen. Ergänzbare Sammlung. Erich Schmidt Verlag
 15. Binding N, Jaschinski S, Werlich S, Bletz S, Witting U (2004) Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. *J Environ Monit* 6:65-70
 16. Blair A (1982) Cancer risks associated with agriculture: Epidemiological evidence. *Basic Life Sci* 21:93-111

17. Bletz S (2008) Bestimmung von Endotoxinen mit Hilfe der Gaschromatografischen-Massenspektrometrischen-Kopplung: Empfindlichkeit unterschiedlicher massenspektrometrischer Detektionsverfahren. Diplomarbeit, Münster
18. Bode C, Fukui H, Bode CJ (1993) Hidden endotoxin in plasma of patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5:257-262
19. Bone R (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115(6):457-469
20. Brade H, Galanos C (1983) Common lipopolysaccharide specificity: new type of antigen residing in the inner core region of S- and R- Form lipopolysaccharides from different families of gram-negative bacteria. *Infect Immun* 42:250-256
21. Brade H, Rietschel ET (1986) Die Endotoxine Gram-negativer Bakterien: chemische Struktur und biologische Wirkung, *Z Gastroenterol Suppl* 3 24:25-31
22. Brunekreef B (1992) Damp housing and adult respiratory symptoms. *Allergy* 47:498-502
23. Budzikiewicz, H, Schäfer M (2005) Massenspektrometrie – Eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim
24. Carcillo J, Cunnion R (1997) Septic shock. *Crit Care Clin* 13(3):553-574
25. Caroff M, Karibian D (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 338:2431-2447

26. Carvalheiro MF, Gomes MJM, Santos O, Duarte G, Henriques J, Mendes B, Marques A, Avila R, MD (1994) Symptoms and Exposure to Endotoxin Among Brewery Employees. *Am J Ind Med* 25:113-115
27. Casey W, Hannallah R, Midgley F, Khan W (1992) Circulating endotoxin and tumor necrosis factor during pediatric cardiac surgery. *Crit Care Med* 20(8): 1090-1096
28. Castellan RM, Olenchock SA, Kinsley KB (1987) Inhaled Endotoxin and Decreased Spirometric Values. *N Engl J Med* 317:605-610
29. Curley PJ (1996) Endotoxin, cellular immune dysfunction and acute pancreatitis. *Ann R Coll Surg Engl* 78(6):531-535
30. Dales RE, Miller D, White J (1999) Testing the association between residential fungus and health using ergosterol measures and cough recordings. *Mycopathologia* 147:21-27
31. Douwes J, McLean D, Van der Maarl E (2000) Worker Exposures to Airborne Dust, Endotoxin and beta(1,3)-Glucan in two New Zealand Sawmills. *Am J Ind Med* 38:426-430
32. Dubin W, Martin T, Swoveland P, Leturq D, Moriarity A, Tobias P, Bleecker E, Goldblum S, Hasday J (1996) Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14 in bronchoalveolar compartment. *Am J Physiol* 270:736-744
33. Dutkiewicz J, PhD (1994) Bacteria, Fungi, and Endotoxin as Potential Agents of Occupational Hazard in a Potato Processing Plant. *Am J Ind Med* 25:43-46

-
34. Easson AM, Bode BP, Fischer CP, Souba WW (1998) Effects of endotoxin challenge on hepatic amino acid transport during cancer. *J Surg Res* 77(1):29-34
 35. Eduard W, Westby MH, Larsson L (2004) Solubility of Endotoxins From *Escheria coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Ind Med* 46:375-377
 36. Engervall P, Ganström E, Andersson M, Björkholm M (1995) Monitoring of endotoxin, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations in neutropenic patients with fever. *Eur J Haematol* 54:226-234
 37. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR (2003) Enhancement of antigen – specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi. 529. *Expert Rev. Vaccine* 2:219-229
 38. Fox A, Rosario R, Larsson L (1993) Monitoring of bacterial sugars and hydroxy fatty acids in dust form air condition by gas chromatography – mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 59:4354-4360
 39. Fukui H, Brauner B, Bode CJ, Bode C (1991) Plasma endotoxin concentration in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 12:162-169
 40. Galanos C, Freudenberg MA, Jay F, Nerkar D, Veleva K, Brade H, Strittmater W (1984) Immunogenic properties of lipid A. *Rev Infect Dis* 6:546-552
 41. Gardinder K, Halliday M (1995) Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut* 36:897-901
 42. Garozzo D, Sturiale L, Silipo A, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A (2005) New conditions for matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spe-

- ctrometry of native bacterial R-type lipopolysaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(13):1829-1834
43. Gasche Y, Pittet D, Suter P (1995) Outcome and prognostic factors in bacteremic sepsis. In: Sibbald WJ, Vincent JL (eds) *Clinical Trials for the Treatment of Sepsis*, Springer Verlag Berlin, S 35-51
44. Glauser M, Zanetti G, Baumgartner J, Cohen J (1991) Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338:732-736
45. Gross JH (2004) Skript Massenspektrometrie: Spektroskopische Methode in Anorganischer und Organischer Chemie. MS-Labor am OCI, INF 270, Heidelberg
46. Haishima Y, Murai T, Nakagawa Y, Hirata M, Yagami T, Nakamura A (2001) Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. *J Biomed Mater Res* 55:424-432
47. Hamdy S, Haddadi A, Somayaji V, Ruan D, Samuel J (2007) Pharmaceutical analysis of synthetic lipid A-based vaccine adjuvants in poly (D,L – lactic – co – glycolic acid) nanoparticle formulations. *J Pharm Biomed Anal* 44:914-923
48. Hartung E, Ollesch K, Häusermann A (2004) Stallluftqualität und Arbeitsplatzbelastungen in unterschiedlichen Mastschweinehaltungsverfahren. *Agrartechnische Forschung* 10:47-53
49. Heedrik D, Brouwer R, Biersteker K, Boleij J (1991) Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *Int Arch Occup Environ Health* 62:595-601

-
50. Hof H, Dörries R (2005) Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag
51. Hiki N, Berger D, Buttenschoen K, Boelke E, Seidelmann M, Strecker W, Kinzl L, Berger H (1995) Endotoxemia and specific antibody behavior different endotoxins following multiple injuries. *J Trauma* 38(5):794-801
52. Hines CJ, Waters MA, Larsson L, Petersen MR, Saraf A, Milton DK (2003) Characterization of endotoxin and 3-Hydroxy fatty acid levels in air and settled dust from commercial aircraft cabins. *Indoor Air* 13:166-173
53. Hoffman W, Natason C (1993) Endotoxin in septic shock. *Anesth Analg* 77: 613-624
54. Holst O (2002) Chemical Structure of the Core Region of Lipopolysaccharides – an Update. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol 14 No 76 pp: 87-103
55. Howell WH (1985). Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. *Johns Hopkins University Circular* 43:4-5
56. Kaiser GE (2007) The Procaryotic Cell – CCBC, Biol 230, Microbiology Lecture Guide. <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/gncw.html>
57. Hübschmann H-J (1996) Handbuch der GC/MS, Grundlagen und Anwendung, VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim

-
58. Informationspapier des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) (2005): Irritativ-toxische Wirkungen von luftgetragenen biologischen Arbeitsstoffen am Beispiel der Endotoxine. BArbBl Nr: 6/2005 49
59. Iwanaga S (2007) Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins. Proc Jpn Acad Ser B 83
60. Jacob A, Goldberg O, Bloom N, Degenshein A, Kozinn O (1977) Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterol 72(6):1268-1270
61. Jacobs RR (1989) Airborne endotoxins: An association with occupational lung disease. Appl Ind Hyg 4:50-56
62. Jacobs RR (1997) Analyses of endotoxins. Int J Occup Environ Health 3:42-48
63. Jagielo P, Quinn T, Qureshi N, Schwartz D (1998) Grain dust-induced lung inflammation is reduced by *Rhodobacter sphaeroides* disphosphoryl lipid A. Am J Physiol 274:26-30
64. Jaschinski S (2004) Entwicklung einer gaschromatographischen Methode mit massenselektiver Detektion zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin. Dissertation, Münster
65. Jones W II, Barber A, Minei J, Fahey T, Shires G T III, Shires GT (1991a) Differential pathophysiology of bacterial translocation after thermal injury and sepsis. Ann Surg 213(7):24-30
66. Jones W II, Barber A, Minei J, Fahey T, Shires GT III, Shires GT (1991b) Splanchnic vasoconstriction and bacterial translocation after thermal injury. Am J Physiol 261:1190-1196

-
67. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J (2005) Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag
68. Kliegmann RM, Walker WA, Yolken RH (1993) Necrotizing enterocolitis: Research agenda for a disease of unknown etiology and pathogenesis. *Pediatr Res* 34(6):701-708
69. Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt JL, Wohlford-Lenane CL, Powers LS, Jones MP, Schwartz DA (1999) Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 160:297-303
70. Kromidas S, www.novia.de/docs/GC_fuer_Neueinsteiger.pdf
71. Kullmann GJ, Thorne PS, Waldron PF, Marx JJ, Ault B, Lewis DM, Siegel PD, Olenchock SA, Merchant JA (1998) Organic Dust Exposure from Work in Dairy Barns. *Am Ind Hyg Assoc J* 59:403-413
72. Lamy M, Deby-Dupot G, Damas P (1995) ARDS and sepsis resemblances and differences. In: Sibbald WJ, Vincent JL (eds) *Clinical Trials for the Treatment of Sepsis*. Springer Verlag Berlin 35-51
73. Larsson L, Sebastian A (2003) Characterization of the Microbial Community in Indoor Environments: a Chemical-Analytical Approach. *Appl Environ Microbiol* Vol 69 No 6 :3103-3109
74. Larsson L, Saraf A (1996) Use of Gas Chromatography/Ion-trap Tandem Mass-Spectrometry for the Determination of Chemical Markers of Micro-organism in Organic Dust. *J Mass Spectrom* Vol 31:389-396

-
75. Larsson L, Sebastian A, Szponar B (2005) Characterization of the microbial community in indoor environments by chemical marker analysis: and update and critical evaluation. *Indoor Air* 15 Suppl 9:20-26
76. Lee E, Burnett CA, Lalich N, Cameron LL, Sestito JP (2002) Proportionate mortality of crop and livestock farmers in the United States 1984-1993. *Am J Ind Med* 42:410-420
77. Lemaire L, Van Lanschot J, Stoutenbeek C, Van Deventer S, Wells C, Gouma D (1997) Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 84:1340-1350
78. Levin J, Bang FB (1964a) A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp* 115:337-345
79. Levin J, Bang FB (1964b) The role of endotoxin in the extracellular of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp* 115:265-274
80. Levin J, Bang FB (1968) Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 19:186-197
81. Li DW, Richards JC (2006) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(2):377
82. Li D, Zhong YN, Rylander R, Ma QY, Zhou XY (1995) Longitudinal study of the health of cotton workers. *Occup Environ Med* 52: 328-331
83. Linsel G, Backe E, Brehme G (2003) Anwendung eines Vollbluttests zur Messung luftgetragener Endotoxine in der Landwirtschaft. Dokumentati-

- onsband 43, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin, Dresden
84. Loesche W (1993) Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis* 16(Suppl 4): S203-210
85. Lyngby J, Olsen LH, Eidem T, Lundanes E, Jantzen E (2002) Quantification of Lipopolysaccharides in Outer Membrane Vesicle Vaccines Aga-inst Meningococcal Disease. High-performance Liquid Chromatographic Determination of the Constituent 3-Hydroxy-lauric Acid. *Biologicals* 30(1):7-13
86. Marcus A, Hajjar D (1993) Vascular transcellular signaling. *J Lipid Res* 34:2017-2031
87. Marre (2000) *Klinische Infektiologie*. Urban & Fischer Verlag
88. Mathison J, Ulevitch R (1979) The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* 123(5):2133-2143
89. Meredith TC, Aggarwal P, Mamat U, Lindner B, Woodaard RW (2006) Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escheria coli*. *ACS Chem Biol* 1 S33-42
90. Meyer S, Wesdorp R (1994) Clinical significance of translocation. *Gut* S28-34
91. Meyer VR (1999) *Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*. Wiley-VCH
92. Michel O (2001) Role of house-dust endotoxin exposure in aetiology of allergy and asthma. *Mediators Inflamm* 10:301-304

-
93. Michel O, Ginnani R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R (1991) Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 21:441-448
94. Michel O, Nagy AM, Schroeven M, Duchateau J, Fondu JNP, Sergysels R (1997) Dose – Response Relationship to Inhaled Endotoxin in Normal Subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 156 pp:1157-1164
95. Milton DK, Amsel J, Reed CE, Enright PL, Brown LR, Aughenbaugh GL, Morey PR (1996) Endotoxin exposure-response in a fiberglass manufacturing facility. *Am J Ind Med* 29(1):3-13
96. Milton DK, Christiani DC, Greaves IA (1989) Letter to the editor. *Am Ind Hyg Assoc J* 50:A-594-595
97. Nolan J (1981) Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. *Hepatology* 1(5):458-465
98. Novitsky TJ (1984) Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. *Oceanus* 27:13-18
99. Novitsky TJ, Ryhter SS, Case MJ, Watson ST (1982) Automated LAL Testing of Parenteral Drugs in the Abbott MS-2. *J Parent Sci Tech* 36:11-16
100. Olenchock SA, Lewis DM, Mull JC (1989) Effects of different extraction protocols on endotoxin analyses of airborne grain dusts. *Scand J Work Environ Health* 15:430-435

-
101. Özesmi M, Aslan H, Hillerdal G, Rylander R, Özesmi C, Baris YI (1987) Byssinosis in carpet weavers exposed to wool contaminated with endotoxin. *Br J Ind Med* 44:479-483
102. Patel P, Mendall M, Carrington D, Strachan D, Leatham E, Molineaux N, Levy J, Blakeston C, Seymour C, Camm A, Northfield T (1995) Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 311:711-714
103. Pepys J (1969) Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dusts. *Monogr Allergy* 4:1-147
104. Perez-Garcia R, Anaya F, Garcia Vinuesa M, Albarracin C, Tejedor A, Chisvert J, Valderrabano F (1993) Plasma tumor necrosis factor alpha (TNF) and interleukin-6 (IL-6) in patients on hemodialysis (HD). *Kidney Int* 44:1495
105. Prins J (1996) Antibiotic induced release of endotoxin – clinical data and human studies. *J Endotox Res* 3(3):269-273
106. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007) Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Am Rev Biochem* 76:295-329
107. Rapiti E, Sperati A, Fano V (1997) Mortality among workers at municipal waste incinerators in Rome: a retrospective cohort study. *Am J Ind Med* 31:659–661

-
108. Remick D (1995) Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care* 10(4):198-212
109. Remillard JF, Gould MC, Roslansky PF, Novitsky TJ (1987) Quantification of Endotoxin in Products using the LAL Kinetic Turbidimetric Assay. In: Watson SW, Levin J, Nowitsky TJ. In: Detection of bacterial endotoxins with the limulus amebocyte lysate test. Alan R Liss Inc, New York, pp. 197-210
110. Reynolds SJ, Thorne PS, Donham KJ, Croteau EA, Kelly KM, Lewis D, Whitmer M, Heederik DJJ, Douwes J, Connaughton I, Koch S, Malmberg P, Larsson BM, Milton DK (2002) Comparison of endotoxin assays using agricultural dust. *Am Ind Hyg Assoc J* 63:430-438
111. Pfeiffer R, Friedberger E (1919) *Lehrbuch der Mikrobiologie*. Fischer Verlag, Jena
112. Rietschel ET, Holst O, Brade L, Muller – Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F (1996) Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:39-81
113. Rietschel ET, Kirikae T, Schade UF, Mamat U, Schmidt G, Lopnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Padova di F, Schreier M, Brade H (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure of activity and function. *FASEB J* 218 Vol 8:217-225
114. Rietschel ET, Galanos C, Lüderitz O, Westphal O (1982) Chemical structure, physiological function and biological activity of lipopolysaccharides and their lipid A component. In: Webb D (ed) *Immunopharmacology and the Regulation of Leukocyte Function*. Marcel Dekker, New York, pp183-229

-
115. Rietschel ET, Wollenweber H – W, Russa R, Brade H, Zähinger U (1984) Concepts of the chemical structure of lipid A. *Rev Infect Dis* 6: 432-438
116. Rocke D, Gaffin S, Wells M, Koen Y, Brock-Utine J (1987) Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 93:832-837
117. Rotter M (2004) Bakteriologie für Mediziner. Vorlesungsskriptum, Klinisches Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Wien
118. Roumen R, Hendriks T, Van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen G, Sauerwein R, Van der Meer J, Goris J (1993) Cytokine patterns in patient after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma: relation with the subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 218(6):769-776
119. Ruitter D, Van der Meulen J, Brouwer A, Hummel M, Mauw B, Van der Ploeg and Wisse E (1981) Uptake by liver cells of endotoxin following intravenous injection. *Lab Invest* 45(1):38-45
120. Rylander R (1987) Endotoxin reactions to cotton dust. *Am J Ind Med* 12: 687
121. Rylander R (1990) Environmental exposures with decreased risks for lung cancer. *Int J Epidemiol* 19:567–572
122. Rylander R (1999) Health effects among workers in sewerage treatment plant. *Occup Environ Med* 56:354-357 [a]

-
123. Rylander R (1999) Endotoxin in the environment-exposure and effects. *J Endox Res* 8:241-252 [b]
124. Rylander R, Thorn J, Attefors R (1999) Airways inflammation among workers in a paper industry. *Eur Respir J* 13:1151-1157
125. Saadia R, Schein M, MacFarlane C, Boffard K (1990) Gut barrier function and the surgeon. *Br J Surg* 77:487-492
126. Sandström T, Bjermer L, Rylander R (1992) Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* 5:992-996
127. Saraf A, Larsson L, Burge H, Milton D (1997) Quantification of Ergosterol and 3-Hydroxy Fatty Acid in Settled House Dust by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Comparison with Fungal Culture and Determination of Endotoxin by a Limulus Amebocyte Lysate Assay. *Applied and Environmental Microbiolog* Vol 63 No 7 p2554-2559
128. Saraf A, Larsson L, Larsson BM, Larsson K, Palmberg L (1999) House Dust Induces IL-6 and IL-8 Response in A549 Epithelial Cells. *Indoor Air* 9:219-225
129. Savov JD, Brass DM, Lawson BL, McElvania-Tekippe EI, Walker JKL, Schwartz DA (2005) Toll-like receptor 4 antagonist (E5564) prevents the chronic airway response to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:329-337
130. Schafer C, Greiner B, Landig J, Feil E, Schutz T, Bode C (1997) Decreased endotoxin-binding capacity of whole blood in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 26:567-573

-
131. Scheifele DW, Olsen EM, Pendray MR (1985) Endotoxemia and thrombocytopenia during neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Clin Pathol* 83(2):227-229
132. Schomburg G (1987) *Gaschromatographie*. Weinheim: VCH
133. Schroeder JC, Tolbert PE, Eisen EA (1997) Mortality studies of machining fluid exposure in the automobile industry. IV: A case-control study of lung cancer. *Am J Ind Med* 31:525–533
134. Schwartz D, Donham K, Olenchock S (1995) Determinants of longitudinal changes in spirometric function among swine confinement operators and farmers. *Am J Respir Crit Care Med* 151:47-53
135. Schwartz DA, Thorne PS, Yagla SJ, Burmeister LF, Olenchock SA, Watt JL, Quinn TJ (1995) The Role of Endotoxin in Grain Dust-induced Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 152:603-608
136. Schwedt G (1979) *Chromatographische Trennmethoden*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
137. Schwedt G (1996) *Taschenatlas der Analytik*. Georg Thieme Verlag
138. Smid T, Heedrik D, Mensink G, Houba R, Boleij Jan SM (1992) Exposure To Dust, Endotoxins, And Fungi In The Animal Feed Industry. *Am Ind Hyg Assoc J* 53(6):362-368
139. Smid T, Heedrik D, Houba R, Quanjer PH (1994) Dust- and Endotoxin-Related Acute Lung Function Changes and Work-Related Symptoms in Workers in the Animal Feed Industry. *Am J Ind Med* 25:877-888

-
140. Smid T, Heedrik, D, Houba R (1992) Dust and Endotoxin related Respiratory Effects in the Animal Feed Industry. *Am Rev Respir Dis* 146:1474-1479
141. Sonesson A, Larsson L, Schutz A, Hagmar L, Hallberg T (1990) *Appl Environ Microbiol* 56:1271-1278
142. Stubbs HA, Harris J, Spear RC (1984) A proportionate mortality analysis of California agricultur workers 1978-1979. *Am J Med* 6:305-320
143. Suffredini A, Fromm R, Parker M, Brenner M, Kovacs J, Wesley R, Parrilo J (1989) The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 321(5):280-287
144. Sundaram S, King A, Pereira B(1996) Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing factor during hemodialysis: clinical determinants and role of different membranes. *J Am Soc Nephrol* 8:463-470
145. Taggart D, Sundaram S, McCartney C, Bowman A, McIntyre H, Courtney J, Wheatley D (1994) Endotoxemia, complement, and white blood cell activation in cardiac surgery; a randomized trial of laxatives and pulsatile perfusion. *Ann Thorac Surg* 57:376-382
146. Thorn J (2001) The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin. *Inflamm Res* 50 :254-261
147. Thorn J, Beijer L, Jonsson T (2002) Measurement Strategies for the Determination of Airborne Bacterial Endotoxin in Sewage Treatment Plants. *Ann Occup Hyg* 6:549-554

-
148. Todar K (2002) Mechanism of Bacterial Pathogenicity Endotoxins. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology
149. TRBA 001 (2008) Allgemeines und Aufbau des Technischen Regelwerks zur Biostoffverordnung- Anwendung von Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. Ausgabe Februar 2008, GMBI. Nr 4 02/2008 S82-83
150. TRBA 405 (2006) Anwendung von Messverfahren und technischen Kontrollwerten für luftgetragene Biologische Arbeitsstoffe. Ausgabe Februar 2006, BArbBl. 7-2006, 193-194
151. TRBA 450 (2004) Einstufungsregeln für Biologische Arbeitsstoffe. Ausgabe November 2004, BArbBl. 04/2004
152. TRGS 001 (2006) Das Technische Regelwerk zur GefahrstoffV - Allgemeines – Aufbau. Übersicht Ausgabe Dezember 2006, BArbBl. 12/2006 S149
153. TRGS 200 (2007) Einstufung und Kennzeichnung von Stoffen, Zubereitungen und Erzeugnissen. Ausgabe Februar 2007, GMBI Nr 18 S 371, 04/2007
154. TRGS 402 (2007) Ermittlung und Beurteilung der Konzentrationen gefährlicher Stoffe in der Luft in Arbeitsbereichen. Ausgabe November 2007. BArbBl. Heft 11/1997 S 27-33
155. TRGS 900 (2006) Arbeitsplatzgrenzwerte. GMBI Nr 55 S 1094. Dazu gehörig: Begründungen zu AGW. Noch dazu gehörend: Bearbeitungsliste des AGS zur TRGS 900

-
156. TRGS 901 (1997) Begründungen und Erläuterungen zu Grenzwerten in der Luft am Arbeitsplatz. Ausgabe April 1997, zuletzt geändert BArbBl Heft 1/2006 S 55
157. TRGS 903 (2006) Biologische Grenzwerte. BArbBl Heft 12/2006 S 167-171
158. Ulevitch R, Tobias P (1995) Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Ann Rev Immunol* 13:437-457
159. Ulrich JT, Myers KR (1995) Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* 6:495-524
160. Van Deventer S, Ten Cate J (1998) Intestinal endotoxemia –clinical significance. *Gastroenterology* 94:825-831
161. Vinzents P, Nielsen BH (1992) Variations In Exposure To Dust And Endotoxin In Danish Piggeries. *Am Ind Hyg Assoc J* 53 (4): 237-241
162. Walters M, Milton DK, Larsson L, Ford T (1994) *Appl Environ Microbiol* 60:996-1005
163. Wan GH, Li CS (1999) Indoor endotoxin and glucan in association with airway inflammation and systemic symptoms. *Arch Environ Health* 54:172-179
164. Wang XR, Pan, LD, Zhang, HX (2002) Follow-up study of respiratory health of newly-hired female cotton textile workers. *Am J Ind Med* 41:111-118
165. Watson SW, Levin J und Novitsky TJ (1987) Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Alan R Liss Inc, New York

-
166. Westphal O, Lüderitz O (1954) Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew Chem* 66 Nr. 13/14
167. Wilmott R, Frenzke M, Kociela V, Peng L (1994) Plasma interleukins and, tumor necrosis Factor- α , and lipopolysaccharide concentrations during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis. *Pediat Pulmonol* 18:21-27
168. Wilson M (1995) Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacterial and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog* 78(1):19-34
169. Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K (1998) Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *Ann Surg* 227(4):485-491
170. Zhang GH, Baek L, Koch C (1988) New Microassay for Quantitation of Endotoxin Using Limulus Amebocyte Lysate Combined with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol* 26:1464-1470

7. Lebenslauf

Name: Doris Julia Zürner (geb. Matei)
Geburtsort: Mediasch/Siebenbürgen
Geburtsdatum: 05.05.1975
Familienstand: verheiratet mit Helmut Zürner
Eltern: Hermine Matei (geb. Gergel)
Dezsö Matei
Geschwister: Christian Matei

Schulbildung:

1981-1990 Stefan L.Roth Gymnasium - Mediasch/Siebenbürgen
1990-1991 Martin-Behaim Gymnasium – Nürnberg
1997-2000 Abendgymnasium Dortmund – Abitur & Latinum

Ausbildung:

09/1991-07/1994 Ausbildung zur Zahnarzthelferin in der Praxis Dr.
K.Heider & Dr. K. Behringer – Nürnberg

Hochschulausbildung:

03/2001-03/2002	Studium der Wirtschaftswissenschaften - Fachhochschule Dortmund
04/2002-11/2007	Studium der Zahnmedizin – Westfälische Wilhelms-Universität Münster
09/2003	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
03/2005	Zahnärztliche Vorprüfung
11/2007	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)
Seit 04/2008	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. A. Lintel-Höping – Arnsberg

Dortmund,

8. Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Ute Witting, die durch ihre inspirierende Vorlesung mein Interesse an einer interessanten und herausfordernden Dissertationsarbeit im Bereich Arbeitsmedizin geweckt hat.

Herrn Prof. N. Binding gilt mein besonderer Dank. Seine großartige fachliche Unterstützung, seine stets wertvollen Ratschläge sowie seine freundliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit waren mir eine unersetzliche Hilfe.

Für die wertvolle Laboreinführung möchte ich Herrn Stefan Bletz herzlich danken, ebenso Frau Christiane Verstege für die vielen praktische Ratschläge während der Durchführung der Versuchsreihen.

Ohne die Hilfe meiner Eltern Hermine und Dezsö Matei wären Studium und Promotion anders verlaufen – Ihnen gilt dafür mein ausdrücklicher Dank.

Zu guter Letzt möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinem Mentor, meinem Ehemann Helmut Zürner bedanken. Ihm möchte ich diese Dissertationsarbeit widmen, denn ohne seine jahrelange, liebevolle und aufopfernde Unterstützung hätte ich meinen Traum des Zahnmedizinstudiums und der Promotion sicherlich nicht erfüllen können.