

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Happy People GmbH

Lindwurmstr. 5

**80337 München**

Oskar-von-Miller-Straße 10  
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650

Fon Schongau: +49 8861 256-5250

Fax: +49 8861 256-7162

Email: [info@dartsch-scientific.com](mailto:info@dartsch-scientific.com)

Web: [www.dartsch-scientific.com](http://www.dartsch-scientific.com)

2. Juli 2015

## TESTBERICHT

### Mutagene Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampf ausgewählter E-Liquids der Firma Happy People GmbH

---

#### Hintergrund

Die E-Zigarette oder elektronische Zigarette ist ein elektrisch beheiztes Gerät zur Verdampfung einer aromatisierten Flüssigkeit (E-Liquid). Das entstehende Aerosol wird vom Konsumenten inhaliert. Im Unterschied zur Zigarette findet beim Dampfen einer E-Zigarette kein Verbrennungsprozess statt.

Nach den aktuellen Erkenntnissen sind elektrische Zigaretten eine bei weitem weniger schädliche Alternative zum Tabakrauchen und es werden bei Rauchern, die von Tabakrauch auf elektrische Zigaretten wechseln, gesundheitliche Vorteile erwartet. Speziell der Anteil an mutagenen Substanzen sollte im Dampf einer E-Zigarette bei „normalem“ Gebrauch mit einer Leistung von etwa 6 bis 6,5 Watt erheblich geringer sein als in einer Tabakzigarette. Dass offenbar eine zu hohe Leistung und Temperatur des Verdampfers zum Entstehen von mutagenen Substanzen führen kann, wurde vor kurzem von Kosmider et al. (2014) sowie Jensen et al. (2015) gezeigt.

Vor diesem aktuellen wissenschaftlichen Hintergrund wurde der Dampf von zwei E-Liquids der Firma Happy People GmbH auf ihre mutagenen Wirkungen im Ames MPF-Test im Vergleich zum Tabakrauch einer herkömmlichen Zigarettenmarke untersucht.

---

Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, et al. (2014): Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors - effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res* 16:1319–1326).

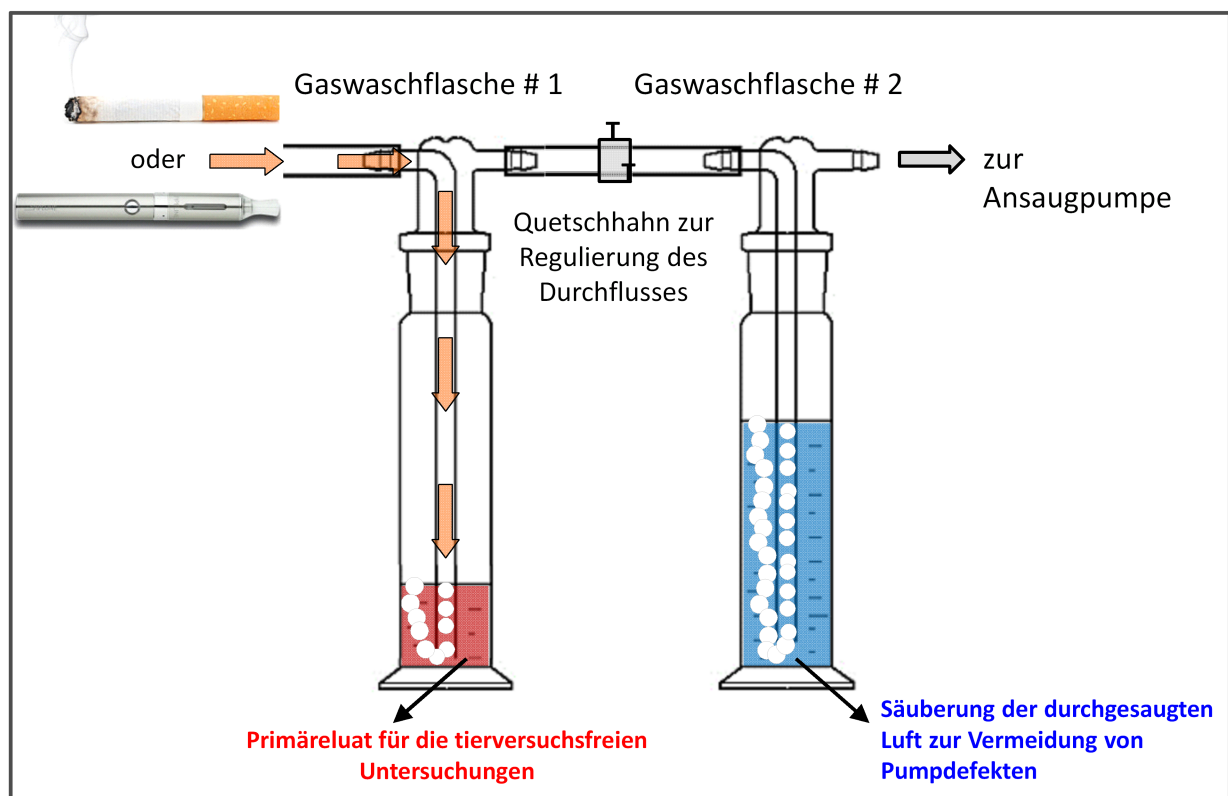
Jensen RP, Wentai L, Pankow JF, Strongin RM, Peyton DH (2015): Hidden formaldehyde in e-cigarette aerosols. Letter to the editor. *N Engl J Med* 372: 392-394.

## Verwendete Tabakzigarette und E-Liquids

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit einer verbreiteten Zigarettenmarke mittlerer Stärke mit jeweils 10 mg Teer, 0,8 mg Nikotin und 10 mg Kohlenmonoxid. Im Vergleich dazu wurden die folgenden E-Liquids der Firma Happy People GmbH getestet: (1) „Menthol“ mit 18 mg/ml Nikotin und (2) „Erdbeere mit Menthol“ mit 6 mg/ml Nikotin.

## Simulation des Rauchens bzw. Dampfens

Um unter möglichst in vivo-nahen Bedingungen den Rauch bzw. Dampf aufzufangen, wurde eine speziell konstruierte Rauchapparatur verwendet (Abb. 1). Diese gestattet es, die Zugfrequenz und die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Als Vorlage wurden für das Rauchen von fünf Tabakzigaretten 50 Züge mit jeweils 3 Sekunden Dauer und einer Pause von 15 Sekunden zwischen zwei Zügen angenommen (Vansickel AR et al.; 2010).



**Abb. 1:** Versuchsanordnung zur Simulation des Dampfens bzw. Rauchens. Für die zellbiologischen Untersuchungen wird nur das Primäreluat in der linken Gaswaschflasche verwendet, in welcher sich Aqua dest. während des Durchsaugens von E-Liquid-Dampf bzw. Zigarettenrauch befindet.

Vansickel AR et al. (2010): A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic "cigarettes": Nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention* 19:1945–1953.

Für die Verdampfung der beiden E-Liquids in einer handelsüblichen E-Zigarette mit einer Leistung von 6,2 Watt (EVOD, EU-Version, Verdampfer 2,2  $\Omega$  und Akku 3,7 V; Kanger-Tech) wurden die vergleichbaren Bedingungen eingehalten, d.h. es wurden 50 Züge mit jeweils 5 Sekunden Dauer durchgeführt. Anmerkung: Bei E-Zigaretten wird im Vergleich zur Tabakzigarette weniger stark, aber dafür deutlich langsamer und länger gezogen.

Der Rauch der Tabakzigaretten bzw. Dampf der gepoolten E-Liquids wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml Aqua dest. geleitet. Das wässrige Primäreluat war im Falle der Tabakzigarette braungelb verfärbt; im Falle des Dampfes war keine Verfärbung feststellbar. Für alle Primäreluate wurde keine Abweichung vom neutralen pH-Wert festgestellt.

### **Ames MPF-Test – Grundprinzip**

Der Ames-Test wird als Standardtest zur Bestimmung von mutagenen Effekten verwendet. Er wird sowohl bei der Entwicklung und Überprüfung von pharmazeutischen Wirkstoffen und Formulierungen wie auch bei der Registrierung von Chemikalien und der Kontrolle und Untersuchung von Kosmetika, Wasser und Abwasser sowie Nahrungsmitteln eingesetzt. Der Ames MPF nach Gee et al. (1998) ist eine Weiterentwicklung des klassischen Ames-Tests (Maron and Ames; 1983). Er ermöglicht eine schnellere, empfindlichere und ressourcenschonendere Testung. Es werden Bakterien, die durch Mutation in einem Gen nicht mehr in der Lage sind, eine bestimmte Aminosäure zu synthetisieren (sogenannte Mangelmutanten oder auxotrophe Bakterien), in ein diese Aminosäure nicht enthaltendes Nährmedium gebracht. Da diese Bakterien zur Fortexistenz auf diese Aminosäure angewiesen sind, würden sie absterben bzw. könnten sich nicht in diesem Medium vermehren. Nun setzt man die Bakterien dem potentiellen Mutagen aus. Findet nach dem anschließenden Inkubieren eine Bakterienvermehrung in dem Mangelmedium statt, so haben einzelne Bakterien die Fähigkeit zur Synthese der entsprechenden Aminosäure zurückerlangt. Es handelt sich hierbei um sogenannte Revertanten. Man geht davon aus, dass diese Rückmutation sehr wahrscheinlich der Wirkung des zugegebenen Agens zuzuschreiben ist und es sich somit um ein Mutagen handelt, welches eine Punktmutation in einem Gen bewirkt. In der Regel tritt eine solche Rückmutation auch spontan von selbst auf, jedoch in viel geringerem Maßstab. Meist setzt man im Ames MPF-Test Bakterienstämme von *Escherichia coli* (Tryptophan-Auxotrophie) oder *Salmonella typhimurium* (Histidin-Auxotrophie) ein.

---

Maron DM, Ames BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut Res 113: 173-215.

Gee P, Sommers CH et al. (1998): Comparison of base-specific salmonella tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study. Mut Res 412: 115-130.

## Versuchsdurchführung

Der Dampf der beiden E-Liquids sowie der Rauch der Tabakzigarette wurden mit dem Ames MPF-Test (Ames MPF Aqua, Xenometrix AG, Schweiz) untersucht. In diesem bakteriellen Reverse-Mutationstest wurden die zwei Histidin-auxotrophen *Salmonella typhimurium*-Stämme TA98 (zur Detektion von Frameshift-Mutationen) und TA100 (zur Detektion von Basenpaarsubstitutionen) verwendet.

Die wässrigen Primärextrakte wurden sechsmal stufenweise verdünnt, was folgende Testkonzentrationen ergab: 74, 37, 18.5, 9,25, 4,63 and 2,32 Vol%. Die *Salmonella typhimurium*-Stämme TA98 und TA100 wurden für 90 Minuten mit den Testkonzentrationen exponiert und im Anschluss in eine Multiwell-Platte mit 384 Vertiefungen überführt. Nach 48 Stunden wurden die Revertanten, d.h. die Bakterien, in welchen aufgrund der induzierten Mutagenität ein Wachstum stattfinden konnte, detektiert und dokumentiert.

Um eine mögliche Metabolisierung der in den Primärextrakten enthaltenen Substanzen zu simulieren, wurde zusätzlich ein Rattenleber-Extrakt (S9) verwendet. Positive Effekte (als Kontrolle) wurden mittels 4-Nitroquionolin-N-oxid (0,5 µg/ml bei TA100–S9), 2-Nitrofluoren (2 µg/ml bei TA98–S9) und 2-Aminoanthracen (2,5 µg/ml bei TA100+S9 und TA98+S9) induziert. Alle Messungen wurden als Triplikat bestimmt.

Zur Analyse der Ergebnisse wurde die relative Zunahme der Anzahl der Revertanten bezogen auf die Basislinie der Lösungsmittelkontrolle herangezogen. Die Basislinie der Lösungsmittelkontrolle wurde berechnet aus dem Mittelwert der positiven Revertanten in der Lösungsmittelkontrolle zuzüglich der Standardabweichung. Überschreitet eine Testsubstanz oder ein Testgemisch den doppelten Wert der Basislinie, ist dies als kritischer Wert zu betrachten.

## Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Untersuchung des Dampfes der beiden E-Liquid-Proben „Menthol“ und „Erdbeer-Menthol“ der Marke HappyLiquid mittels Ames MPF-Test ergab, dass im TA98-Stamm keine mutagenen Effekte nach einer kontinuierlichen Exposition für 90 Minuten nachzuweisen waren (Ia und IIa). Bei einer Exposition mit Tabakrauch dagegen zeigte sich im gleichen Versuchsansatz ein deutlicher dosisabhängiger Anstieg der auftretenden Revertanten (IIIa). Wird der Versuch mit S9 zur Simulation der Metabolisierung in der Leber durchgeführt, zeigt sich ein vergleichbares Bild. Bei keiner der Testkonzentrationen wird bei den E-Liquids der kritische Schwellenwert überschritten (Ib und IIb). Dagegen zeigt sich bei der Untersuchung vom Tabakrauch ein deutlicher Anstieg der positiven Revertanten über den kritischen Grenzwert hinweg (IIIb) – viel stärker als bei den Versuchen ohne S9-Metabolisierung. Auch die Untersuchung der beiden E-Liquids mit dem Ames MPF-Test und dem TA100-Stamm ergab, dass sowohl mit als auch ohne initiiertes S9-Metabolisierung gleich-

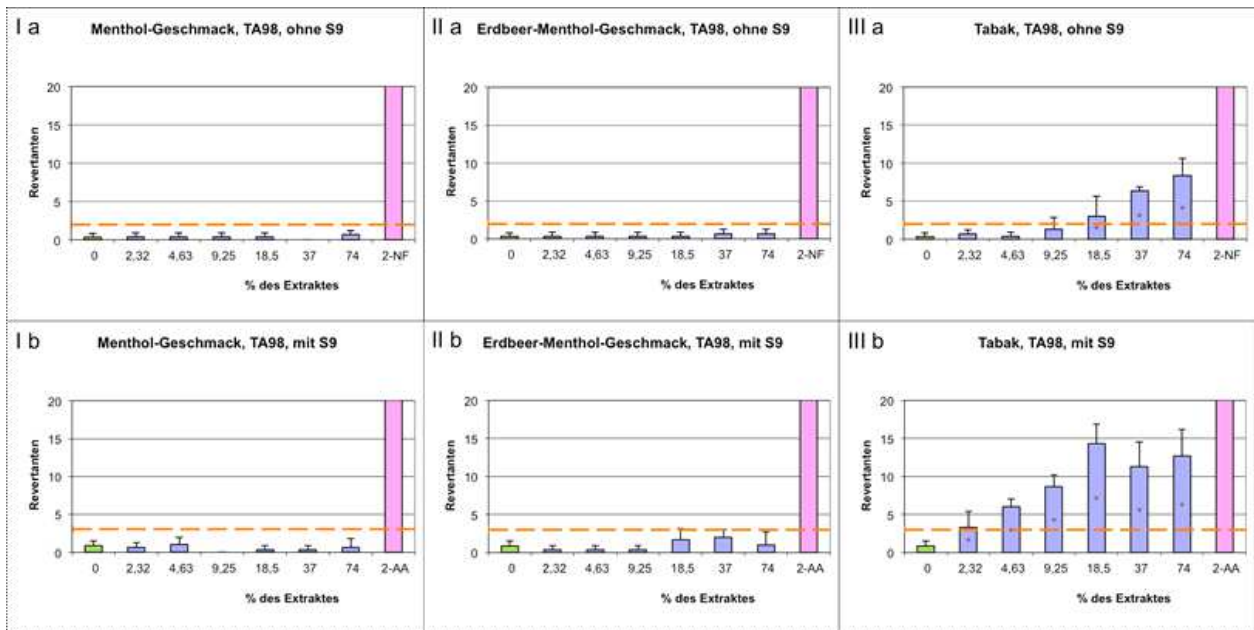
falls keine mutagenen Effekte über dem kritischen Grenzwert nachweisbar waren (Ic, IIc, Id, IID). Der beim TA100-Stamm erhöhte kritische Grenzwert ist auf die höhere Spontanrate des TA100-Stammes gegenüber dem TA98-Stamm zurückzuführen. Bei allen Tabakrauchproben war neben dem mutagenen Effekt durch die erhöhte Frameshift-Mutationsrate und Basensubstitutionsrate ein stark ausgeprägter zytotoxischer Effekt – wahrscheinlich durch die beim Rauchen entstandenen freien Radikale – nachweisbar. Möglicherweise führt dieser zytotoxische Effekt zu einer Unterbewertung der Frameshift-Mutation und der Basensubstitution durch das Absterben der Bakterien.

Zusammengefasst kann unter den hier dargestellten Untersuchungsbedingungen unter Verwendung der beiden Bakterienstämme TA98 und TA100 keine mutagene Wirkung, d.h. keine Frameshift-Mutationen oder Basensubstitutionen, für den Dampf der beiden E-Liquids („Menthol“ und „Erdbeer-Menthol“) der Firma Happy People GmbH festgestellt werden. Dies gilt sowohl mit als auch ohne S9-Metabolisierung. Im Gegensatz dazu zeigte der Tabakrauch bei beiden Bakterienstämmen und sowohl mit als auch ohne S9-Metabolisierung eine klare dosisabhängige mutagene Wirkung. Diese mutagene Wirkung wurde zudem von einem akuten toxischen Effekt auf die Bakterienstämme begleitet. Aus gesundheitlichen Gründen sollte daher dem Dampfen einer E-Zigarette mit einem der getesteten E-Liquids auf jeden Fall der Vorzug gegenüber einer Tabakzigarette gegeben werden.

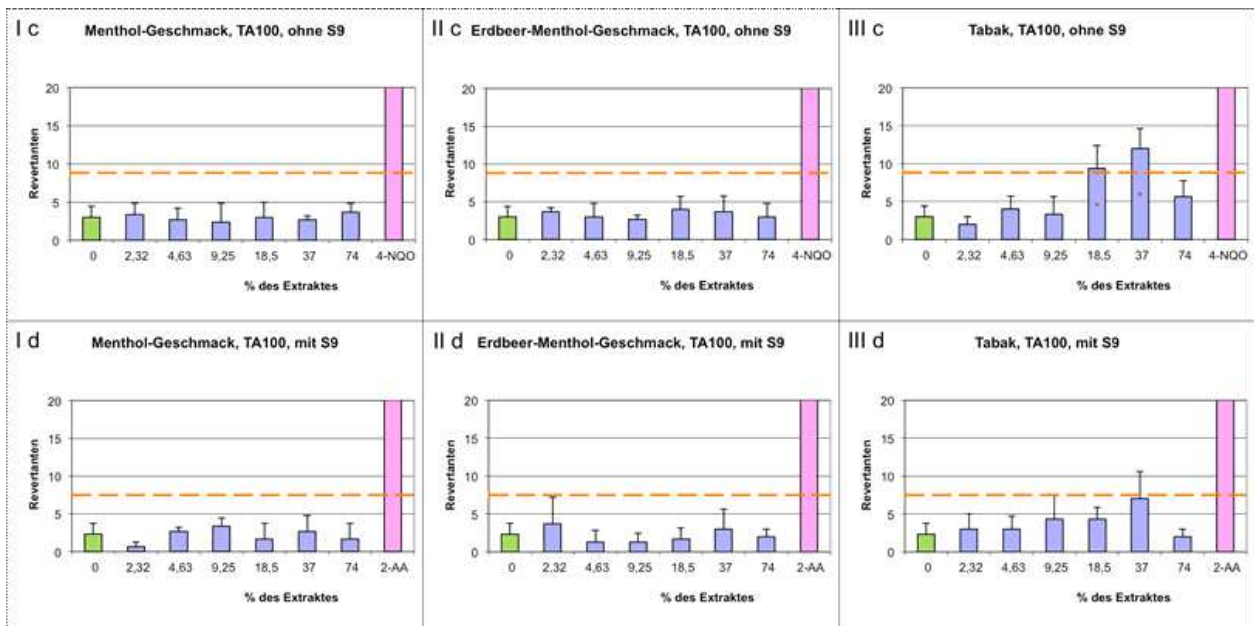
Schongau, den 2. Juli 2015



Prof. Dr. Peter C. Dartsch  
Diplom-Biochemiker



**Abb. 2:** Testung der beiden E-Liquids und Tabakzigarette mittels Ames MPF-Test, Stamm TA98. I: Menthol, II Erdbeer-Menthol, III Tabakzigarette. a: ohne S9 (keine simulierte Metabolisierung), b: mit S9 (simulierte Metabolisierung). Positivkontrollen: 2-Nitrofluoren (2-NF) und 2-Aminoanthracen (2-AA).



**Abb. 3:** Testung der beiden E-Liquids und Tabakzigarette mittels Ames MPF-Test, Stamm TA100. I: Menthol, II: Erdbeer-Menthol, III: Tabakzigarette. c: ohne S9 (keine simulierte Metabolisierung), d: mit S9 (simulierte Metabolisierung). Positivkontrollen: 4-Nitroquionolin-N-oxid (4-NQO) und 2-Aminoanthracen (2-AA).