

S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA)

Anwendbarkeit: Bestimmung in Urin

Analyt. Messprinzip: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/
Tandem-Massenspektrometrische Detektion
(LC/MS/MS)

Abgeschlossen im: Mai 2004

Zusammenfassung

Das hier vorgestellte Analyseverfahren erlaubt die sichere Quantifizierung von S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA), einem Hauptmetaboliten des Acroleins, im Urin sowohl von beruflich belasteten Personen als auch von Personen der Allgemeinbevölkerung.

Nach Ansäuern des Urins wird die HPMA durch Festphasenextraktion von störenden Matrixkomponenten abgetrennt. Ein Aliquot des Extraktes wird einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Trennung unterzogen und tandem-massenspektrometrisch nach chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) analysiert.

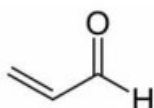
Die Kalibrierung erfolgt anhand von Vergleichslösungen, die in Nichtraucher-Poolurin angesetzt werden. Quantifiziert wird mittels Isotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von dreifach deuteriertem HPMA als internem Standard.

S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA)

Präzision in der Serie: Standardabweichung (rel) $s_w = 0,8$ bzw. $5,7$ bzw. $4,9\%$
Streubereich $u = 1,8$ bzw. $12,9$ bzw. $11,1\%$
bei einer Konzentration von 594 bzw. 1632 bzw. $2807 \mu\text{g}$
HPMA pro Liter Urin und jeweils $n = 10$ Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel) $s_w = 5,9$ bzw. $5,7$ bzw. $4,3\%$ Streubereich $u = 13,3$ bzw. $12,1$ bzw. $9,7\%$ bei einer Konzentration von 594 bzw. 1633 bzw. $2814 \mu\text{g}$ HPMA pro Liter Urin und $n = 10$ bzw. 16 bzw. 10 Be- stimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel) $r = 97,8$ bzw. $94,8$ bzw. $95,6\%$ bei einer Dotierung von 88 bzw. 166 bzw. $333 \mu\text{g}$ HPMA pro Liter Urin (nativ $142 \mu\text{g/L}$) und jeweils $n = 10$ Be- stimmungen
Bestimmungsgrenze:	$20,4 \mu\text{g}$ HPMA pro Liter Urin

Acrolein



Acrolein ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd, der sich durch eine hohe Reaktivität gegenüber nukleophilen Zentren auszeichnet. Acrolein wird zur Herstellung von Acrylsäure, Acrylaten, Methionin, Allylalkohol und Glycerin verwendet. Acrolein kommt in Kraftfahrzeugabgasen ($0,05\text{--}27,7 \text{ mg/m}^3$), Zigarettenrauch (Hauptstromrauch: $10\text{--}140 \mu\text{g/Zigarette}$; Nebenstromrauch: $480\text{--}1500 \mu\text{g/Zigarette}$) und einigen Lebensmitteln (Äpfel, Weintrauben, Himbeeren: $10\text{--}50 \mu\text{g/kg}$; Gemüse: bis zu $60 \mu\text{g/kg}$; Käse: $290\text{--}1300 \mu\text{g/kg}$; Rotwein: bis zu $3,8 \text{ mg/L}$) vor und entsteht beim Erhitzen von pflanzlichem und tierischem Fett [1]. In der Außenluft in ländlichen Gebieten beträgt die Acrolein-Konzentration $1\text{--}5 \mu\text{g/m}^3$, im städtischen Bereich $5\text{--}20 \mu\text{g/m}^3$. In Räumen ohne Tabakrauchbelastung liegt die Acrolein-Konzentration unter $10 \mu\text{g/m}^3$, mit Tabakrauchbelastung bei $5\text{--}50 \mu\text{g/m}^3$ [1, 2]. Acrolein ist ein Nebenprodukt der physiologischen Lipidperoxidation, so dass der menschliche Organismus auch ohne externe Acrolein-Exposition endogen mit diesem reaktiven Stoff belastet ist [3, 4].

Ein Metabolismusschema für Acrolein ist in Abbildung 1 gezeigt. Der Hauptabbauweg des Acroleins erfolgt über die Konjugation mit Glutathion (GSH). Diese Reaktion kann spontan oder enzymatisch katalysiert erfolgen. Für die enzymatisch katalysierte Konjugation ist beim Menschen hauptsächlich die Glutathion-S-Transferase (GST) P1 verantwortlich [5]. Im weiteren Verlauf des Stoffwechsels kann es zur Bildung der reduzierten Mercaptursäure (S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure, HPMA) oder der oxidierten Mercaptursäure (S-(2-Carboxyethyl)mercaptursäure, CEMA) kommen. Beim Menschen und diversen Nagern wurde von einer überwie-

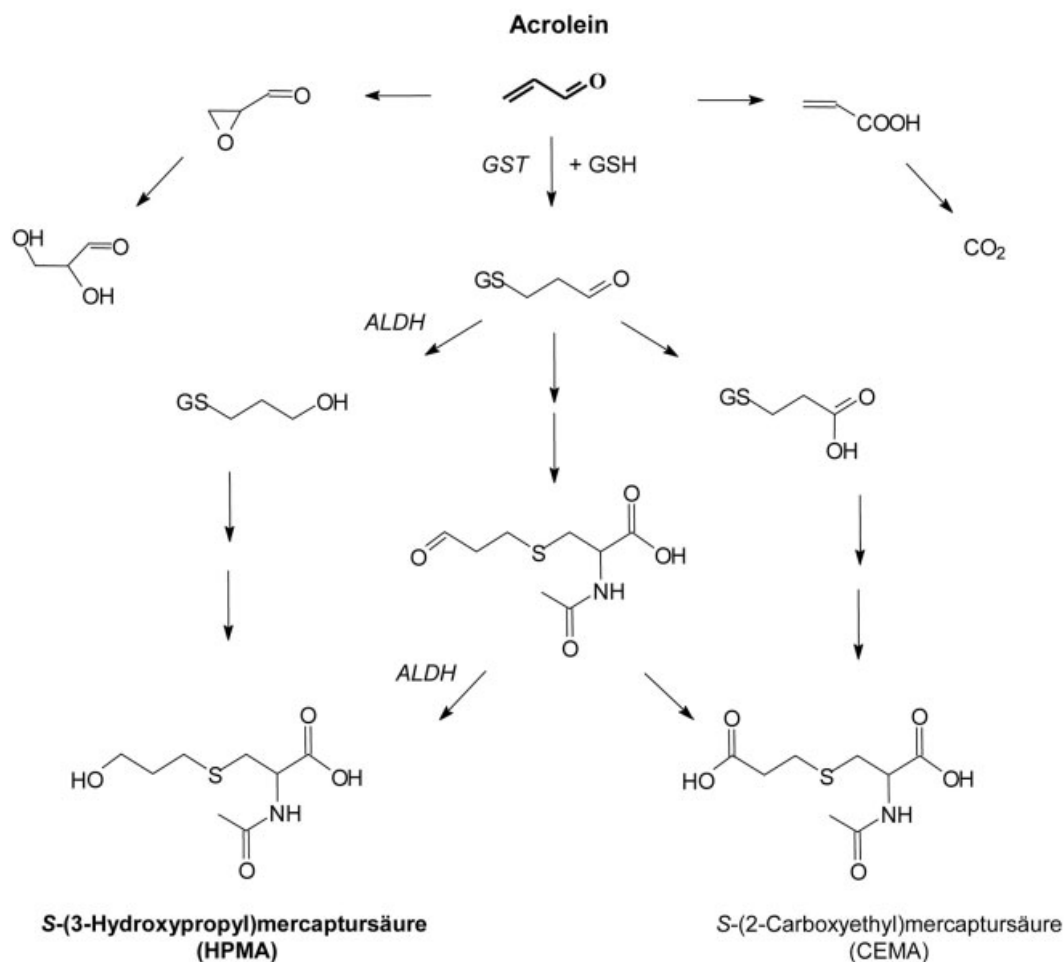


Abb. 1. Metabolismus von Acrolein nach [7, 13] (*GST*: Glutathion-S-Transferase; *GSH*: Glutathion; *ALDH*: Aldehyddehydrogenase).

genden Entstehung von HPMA berichtet [5–10]. Neben Acrolein können auch andere Allylverbindungen als Vorläufer für HPMA fungieren [6]. Des Weiteren entsteht auch im Metabolismus des Zytostatikums Cyclophosphamid Acrolein, das wiederum zur Bildung von HPMA führt [11, 12]. Es wird geschätzt, dass zwischen 20 und 80% einer absorbierten Acroleindosis über den Urin als HPMA ausgeschieden werden [6, 7].

Aufgrund seiner Reaktivität bildet Acrolein auch DNA-Addukte (1,*N*²-Propanodeoxyguanosin-Addukte) [15–19]. Die *International Agency for the Research on Cancer* (IARC) hat Acrolein in Gruppe 3 und somit als „nicht klassifizierbar hinsichtlich der Kanzerogenität gegenüber dem Menschen“ eingestuft [1]. Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen For-

schungsgemeinschaft hat Acrolein in Krebskategorie 3B eingestuft, wonach Hinweise auf mögliche krebserzeugende Wirkung beim Menschen bestehen, eine endgültige Bewertung aufgrund unzureichender Informationen jedoch derzeit nicht möglich ist [20]. Eine ausführliche Abhandlung der toxikologischen Aspekte des Acroleins ist in der Begründung zum MAK-Wert nachzulesen [21, 22].

Bisher sind keine Untersuchungen zur HPMA-Ausscheidung im Urin von am Arbeitsplatz mit Acrolein exponierten Personen bekannt. Aufgrund der endogenen Entstehung von Acrolein während der Lipidperoxidation und dessen ubiquitären Vorkommens in der Luft, in Zigarettenrauch und in einigen Nahrungsmitteln wird HPMA allerdings auch ohne arbeitsbedingte Exposition von der Allgemeinbevölkerung in nennenswerten Mengen ausgeschieden. Bei Untersuchungen der HPMA-Ausscheidung in Abhängigkeit zur Tabakrauchexposition zeigte sich, dass Raucher ca. 3–4 mal höhere Mengen an HPMA im Urin ausscheiden als Nichtraucher [9, 23–25]. Die Ergebnisse einer Untersuchung zur HPMA-Exkretion an ca. 300 nicht beruflich mit Acrolein belasteten Personen sind in Tabelle 1, aufgeteilt nach Rauchverhalten, dargestellt [24].

Tab. 1. Ausscheidung von S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA) bei nicht beruflich belasteten Personen, aufgeteilt nach Rauchverhalten [24].

	HPMA–Ausscheidung [$\mu\text{g}/24\text{ h}$]	
	Nichtraucher	Raucher
N	100	194
Mittelwert $\pm$ SD	337 ± 383	1297 ± 1164
Bereich	18 – 2169	81 – 7895

Autoren: *G. Scherer, M. Urban*

Prüfer: *T. Göen*

S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA)

Anwendbarkeit: Bestimmung in Urin

Analyt. Messprinzip: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/
Tandem-Massenspektrometrische Detektion
(LC/MS/MS)

Abgeschlossen im: Mai 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.1	Geräte
2.2	Chemikalien
2.3	Lösungen
2.4	Vergleichsstandards
2.4.1	Interner Standard (IS)
2.4.2	Vergleichsstandards
3	Probenahme und Probenvorbereitung
3.1	Probenaufbereitung
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen
4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen
4.2	Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen
5	Analytische Bestimmung
6	Kalibrierung
7	Berechnung der Analysenergebnisse
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung
9	Beurteilung des Verfahrens
9.1	Präzision
9.2	Richtigkeit
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze
9.4	Störeinflüsse

10 Diskussion der Methode

11 Literatur

1 Grundlage des Verfahrens

Nach Ansäuern des Urins wird die S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA) durch Festphasenextraktion von störenden Matrixkomponenten abgetrennt. Ein Aliquot des Extraktes wird einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Trennung unterzogen und tandem-massenspektrometrisch nach chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) analysiert.

Die Kalibrierung erfolgt anhand von Vergleichslösungen, die in Nichtraucher-Poolurin angesetzt werden. Quantifiziert wird mittels Isotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von dreifach deuteriertem HPMA als internem Standard.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

LC/MS/MS-System bestehend aus einer isokratischen Pumpe, einem Säulenofen mit Schaltventil, einem automatischen Flüssigprobengeber mit Thermostatisierung, einem tandem-massenspektrometrischen Detektor mit Möglichkeit der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) und einem PC-System zur Datenauswertung.

Analytische HPLC-Säule:

Synergi MAX RP 80; Länge: 150 mm; innerer Durchmesser: 4,6 mm; Teilchendurchmesser: 4 µm (z. B. Phenomenex Nr. 00F-4337-E0)

Vorsäule: C12, 4 × 3 mm (z. B. Phenomenex Nr. AJ0-6074)

10-, 100-, 500- und 1000-mL-Messkolben

250-mL-Bechergläser

100-, 250-mL-Messzylinder

50-mL-Messpipette und 10-mL-Vollpipette (z. B. Brand)

Pasteurpipetten aus Glas (z. B. VWR)

pH-Meter (z. B. Lab 850, Schott Instruments)

Vakuum-Filtrationsgerät, bestehend aus Glasfilterhalter mit Fritte, Glasaufsatz, Aluminiumklemme und Erlenmeyer-Kolben (1000 mL) (z. B. Millipore)

Membranfilter GS 0,22 µm Filter (z. B. Millipore)

25-mL-Braunglasfläschchen (z. B. Schott-Duran)

Variabel einstellbare Pipetten 10–100 µL, 100–1000 µL und 1000–5000 µL mit entsprechenden Pipettenaufsätzen (z. B. Eppendorf)

Handdispenser mit entsprechenden Aufsätzen für 100, 200, 500 und 1000 µL (z. B. Multipette von Eppendorf)

4-mL-Gewindefläschchen mit Schraubverschluss (z. B. Klaus Ziemer GmbH)

Kunststoffflaschen zum Sammeln von Urin, z. B. aus HD-Polyethylen oder Polypropylen (z. B. Sarstedt)

Filterpapier (z. B. Schleicher & Schuell)

10-mL-Polypropylenröhrchen (z. B. Sarstedt)

Laborzentrifuge (z. B. Rotanta 460R, Hettich)

Festphasenextraktionsstation mit Trockenaufsatz (z. B. VacMaster 20, Biotage)

Isolute PTFE-Kanülen mit Absperrhahn für Festphasenextraktionsstation (z. B. Biotage, Nr. 121-0001)

Isolute ENV+-Festphasenextraktionskartuschen, 50 mg, 1 mL (z. B. Biotage, Nr. 915-0005-A)

Wasserstrahlpumpe

Vakuumzentrifuge (z. B. Speedvac Concentrator, Jouan)

Vortexer (z. B. VX-2500, VWR)

1,2-mL-Vials aus Braunglas mit Gewinde, mit Schraubdeckel (z. B. Klaus Ziemer GmbH)

2.2 Chemikalien

Deionisiertes Wasser (z. B. Seradest Reinstwasseranlage)

Salzsäure 32%, p. a. (z. B. Roth, Rotipuran®, Nr. P074.1)

Methanol, für die HPLC (z. B. Promochem, Optigrade®, Nr. 3041)

Ameisensäure, 98–100%, p. a. (z. B. Merck, Nr. 1.00264.1000)

Ammoniumacetat, p. a. (z. B. Merck Nr. 1.01116.0500)

N-[D₃]-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein, Dicyclohexylammoniumsalz (Toronto Research Chemicals, Nr. A179077)

N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein, Dicyclohexylammoniumsalz (Toronto Research Chemicals, Nr. A179075)

Reinigungsmittel (z. B. Beliclean PL1, Belimed)

Stickstoff 5.0 (z. B. Linde)

2.3 Lösungen

1 M Salzsäure:

In einen 1000-mL-Messkolben werden ca. 500 mL deionisiertes Wasser vorgelegt. Mit einer 50-mL-Messpipette werden insgesamt 82 mL 32%ige Salzsäure dazupipettiert. Anschließend wird der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und ist 6 Monate verwendbar.

verdünnte Salzsäure (pH 2,5):

In einem 250-mL-Messzylinder werden 200 mL deionisiertes Wasser abgemessen und in ein 250-mL-Becherglas gegeben. Unter ständiger pH-Kontrolle mit einem pH-Meter wird mit einer Pasteur-Pipette tropfenweise 1 M Salzsäure zupipettiert, bis ein pH-Wert von 2,5 erreicht ist. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt eine Woche.

2%ige Ameisensäure in Methanol:

In einem 500-mL-Messkolben werden etwa 250 mL Methanol vorgelegt. Mit einer 10-mL-Vollpipette werden 10 mL Ameisensäure hinzupipettiert. Der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt eine Woche.

HPLC-Eluent: 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,8)

In einem 1000-mL-Messkolben werden 770,8 mg Ammoniumacetat eingewogen. Der Kolben wird bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird an einem Vakuum-Filtrationsgerät über einen 0,22-µm-Membranfilter gereinigt. Der Puffer wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt eine Woche.

10 mM Ammoniumacetatpuffer/Methanol, 80:20 (v/v):

Mit einem 100-mL-Messzylinder werden nacheinander 80 mL 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,8) und 20 mL Methanol abgemessen und in einen 100-mL-Messkolben gegeben. Die Lösung wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt eine Woche.

2.4 Vergleichsstandards

2.4.1 Interner Standard (IS)

IS-Stammlösung (1 g/L):

18,11 mg N-[D₃]-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein, Dicyclohexylammoniumsalz (entsprechend 10 mg D₃-HPMA) werden in einen 10-mL-Messkolben eingewogen. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in ein 25-mL-Braunglasfläschchen überführt und bei –20 °C gelagert.

IS-Arbeitslösung (10 mg/L):

1 mL der IS-Stammlösung wird in einen 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in 25-mL-Braunglasfläschchen aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Die Stamm- und die Arbeitslösung des internen Standards sind bei einer Lagertemperatur von –20 °C mindestens 6 Monate haltbar.

2.4.2 Vergleichsstandards

HPMA-Stammlösung (1 g/L):

18,22 mg N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein, Dicyclohexylammoniumsalz (entsprechend 10 mg HPMA) werden in einen 10-mL-Messkolben eingewogen. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in ein 25-mL-Braunglasfläschchen überführt und bei –20 °C gelagert.

HPMA-Arbeitslösung A (10 mg/L):

1 mL der HPMA-Stammlösung wird in einen 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in 25-mL-Braunglasfläschchen aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

HPMA-Arbeitslösung B (5 mg/L):

500 µL der HPMA-Stammlösung werden in einen 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in 25-mL-Braunglasfläschchen aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

HPMA Arbeitslösung C (1 mg/L):

1 mL der HPMA-Arbeitslösung A wird in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in ein 25-mL-Braunglasfläschchen überführt und bei -20°C gelagert.

Die HPMA-Stammlösung und die HPMA-Arbeitslösungen sind bei einer Lager-temperatur von -20°C mindestens 6 Monate haltbar.

Die Vergleichsstandardlösungen werden jeweils frisch in Urin angesetzt. Hierfür wird gepoolter Urin von Nichtrauchern zentrifugiert und der abgenommene Überstand mit 1 M Salzsäure mittels eines pH-Meters auf pH 2,5 eingestellt. In 4-mL-Gewindefläschchen werden die HPMA-Arbeitslösungen A, B und C gemäß dem in Tabelle 2 dokumentierten Pipettierschema mit Poolurin verdünnt. Die Vergleichsstandardlösungen und der undotierte Poolurin werden analog den Urinproben gemäß den Abschnitten 3, 4 und 5 aufgearbeitet und analysiert.

Tab. 2. Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von HPMA in Urin.

Volumen der Arbeitslösungen			Nichtraucher- Poolurin	Endvolumen	dotierte Konzentration
A [μL]	B [μL]	C [μL]	[μL]	[μL]	[$\mu\text{g/L}$]
–	–	–	1000	1000	0
–	–	25	975	1000	25
–	–	50	950	1000	50
–	–	75	925	1000	75
–	20	–	980	1000	100
–	50	–	950	1000	250
–	100	–	900	1000	500
75	–	–	925	1000	750
100	–	–	900	1000	1000
250	–	–	750	1000	2500
500	–	–	500	1000	5000

3 Probenahme und Probenvorbereitung

Die zum Sammeln der Urinproben vorgesehenen Kunststoff-Flaschen (beachte Abschnitt 9.4) werden mit einem Reinigungsmittel (z. B. Beliclean PL1, Belimed) gespült, mit deionisiertem Wasser gründlich nachgewaschen und getrocknet. Der gesammelte Urin wird gut durchmischt und ein Aliquot von 5 mL in ein 10-mL-Polypropylenröhrchen überführt. Bis zur Analyse wird der Urin bei -20°C tiefgefroren. Die Verwendbarkeit beträgt mindestens 48 Monate.

3.1 Probenaufbereitung

Liegen tiefgefrorene Urinproben vor, werden diese bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Röhrchen mit den zu analysierenden Urinen werden mit einem Vortexer geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10°C , 3000 g, 10 min). 2–3 mL des Überstandes werden vorsichtig abgehoben und in ein 4-mL-Gewindefläschchen überführt. Mit einer 100- μL -Pipette wird 1 M Salzsäure tropfenweise zupipettiert, bis der pH-Wert der Probe auf 2,5 eingestellt ist (Kontrolle mit pH-Meter). 1 mL der Probe wird in ein 4-mL-Gewindefläschchen pipettiert, in dem 100 μL IS-Arbeitslösung vorgelegt sind.

Auf einer Festphasenextraktionsstation werden Isolute-ENV+-Kartuschen zweimal mit 1 mL Methanol und anschließend zweimal mit 1 mL verdünnter Salzsäure (pH 2,5) konditioniert. Die Proben werden mit Pasteur-Pipetten auf die Kartuschen aufgetragen. Danach werden die Kartuschen unter Atmosphärendruck einmal mit 1 mL und einmal mit 500 μL verdünnter Salzsäure (pH 2,5) gewaschen und anschließend trockengesaugt (z. B. Wasserstrahlpumpe, ca. 750 mbar, 3 min). Die Kartuschen werden unter Verwendung eines Trockenaufsatzes mit Stickstoff 5.0 trocken geblasen. Wenn die wässrige Phase von den Kartuschen augenscheinlich vollständig geblasen ist, wird der Trockenvorgang noch 2 min fortgesetzt. Die Elution erfolgt mit 2%iger Ameisensäurelösung in Methanol in ein 4-mL-Gewindefläschchen. Hierzu wird 1 mL Ameisensäurelösung aufgetragen und nach 2 min Einwirkzeit mit leicht reduziertem Druck (ca. 920 mbar) durchgesaugt, so dass eine tropfenweise Elution zu beobachten ist. Für eine vollständige Elution wird mit 200 μL Ameisensäurelösung ohne Wartezeit nacheluiert. Anschließend werden die Kartuschen (bei ca. 850 mbar) für 2 min vollständig trockengesaugt.

Das Eluat wird in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und in 1 mL 10 mM Ammoniumacetat/Methanol (80:20) aufgenommen. Das 4-mL-Gewindefläschchen wird mittels eines Vortexers kurz geschüttelt. Nach Überführung der Lösung in ein 1,2-mL-Braunglasvial erfolgt die analytische Bestimmung mittels LC/MS/MS. Werden die aufgearbeiteten Proben nicht sofort vermessen, so können diese bei -20°C für 6 Monate stabil gelagert werden.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekombination bestehend aus einer isokratischen HPLC-Pumpe und einem LC/MS/MS-System mit der Möglichkeit der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus.

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen

Trennsäule:	Material:	Stahl
	Länge:	150 mm
	innerer Durchmesser:	4,6 mm
	Säulenfüllung:	Phenomenex Synergi MAX RP 80, 4 µm
Trennprinzip:	Reversed phase	
Säulentemperatur:	50 °C, isotherm	
Autosampler-Temperatur:	10 °C	
Mobile Phasen:	Eluent A: 10 mM Ammoniumacetatpuffer, aq.	
	Eluent B: Methanol	
Flussrate:	0,8 mL/min	
Förderung:	isokratisch, Eluentenmischung: 50% A, 50% B ¹	
Laufzeit:	3,2 min	
Injektionsvolumen:	10 µL	
Detektion:	Tandem-Massenspektrometrischer Detektor	

4.2 Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Einstellungen der Ionenquelle:

Ionisationsmodus:	APCI, positiv
Temperatur:	495 °C
Collision-Activated Dissociation:	3 V
(CAD)	

¹ Ein Vormischen des Laufmittels ist ebenfalls möglich.

Discharge Needle Current (NC): 2 µA
Gas 1 (Nebulizer gas): Stickstoff, 60 psi
Gas 2 (Auxiliary gas): Stickstoff, 15 psi
Curtain Gas: Stickstoff, 50 psi

Einstellungen des Analysers:

Kollisionsgas: Stickstoff
Scan Time: 300 ms
Analytspezifische Parameter: siehe Tabelle 3

Tab. 3. Analytenspezifische MRM-Parameter.

Para- meter	Mutterion [m/z]	Tochterion [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CXP [V]	CE [V]
D ₃ -HPMA	225	133	36	350	-7,5	12	4	31
HPMA	222	117	36	350	-7,5	12	4	31
	222	91	36	350	-7,5	12	4	31

DP = declustering potential; FP = focussing potential; EP = entrance potential; CEP = Collision Cell Entrance Potential; CXP = Collision Cell Exit Potential; CE = collision energy

Sämtliche Ionenquellen- und MRM-Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender über die entsprechenden Kalibrier Routinen des verwendeten MS/MS-Systems individuell eingestellt und optimiert werden.

5 Analytische Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der HPMA werden 10 µL der nach Abschnitt 3.1 erhaltenen Probelösung in das LC/MS/MS-System injiziert. Bei jeder Analysenserie werden Qualitätskontrollproben mitanalysiert (siehe Abschnitt 8). Dabei ist mindestens jede 20. Probe einer Probenserie eine Kontrolle.

Liegen die Messwerte oberhalb des Bereichs der Kalibriergeraden (5000 µg/L; siehe Abschnitt 6), werden die Urinproben mit deionisiertem Wasser entsprechend verdünnt, erneut aufgearbeitet und vermessen.

Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 4 aufgeführten Ionenübergänge im MRM-Modus des Tandem-Massenspektrometers (APCI-positiv-Modus) aufgezeichnet.

Tab. 4. Retentionszeiten und detektierte Ionenübergänge.

Parameter	Retentionszeit [min]	Ionenübergänge (MS/MS, APCI-positiv)	
		Q 1 [m/z]	Q 3 [m/z]
D ₃ -HPMA	1,8	225	133
HPMA	1,8	222	117*
			91

Die mit * gekennzeichnete Masse wird zur quantitativen Auswertung herangezogen.

Die angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Trennsäule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen beispielhaft Chromatogramme von Urinproben eines Rauchers und eines Nicht-Rauchers.

6 Kalibrierung

Die gemäß Abschnitt 2.4.2 hergestellten Vergleichsstandardlösungen werden wie die Urinproben gemäß Abschnitt 3.1 aufbereitet und entsprechend den Abschnitten 4 und 5 flüssigkeitschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert. Die Kalibriergerade wird durch lineare Regression der Flächenverhältnisse von HPMA zu D₃-HPMA gegen die Konzentrationen des HPMA erstellt, wobei das Flächenverhältnis des undotierten Kalibrators jeweils abgezogen wird. Die Kalibrierkurve ist zwischen der Nachweisgrenze und 5000 µg/L linear.

Nach den Erfahrungen der Autoren ist es nicht notwendig, bei jeder Analysenserie eine neue Kalibrierkurve aufzunehmen. Eine erneute Kalibrierung muss jedoch spätestens dann durchgeführt werden, wenn die Ergebnisse der Kontrollproben (siehe Abschnitt 8) auf eine Systemveränderung hinweisen.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Die in der Urinprobe ermittelte Peakfläche von HPMA wird durch die Peakfläche des internen Standards D₃-HPMA dividiert. Mit dem so erhaltenen Quotienten ermittelt man über die gemäß Abschnitt 6 erstellte Kalibrierkurve die dazugehörige Konzentration von HPMA in µg pro Liter Urin.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer [27] und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren.

Zur Präzisionskontrolle werden bei jeder Analysenserie mindestens eine, idealerweise jedoch drei Harnkontrollproben mit geringer (bis 3-fache Bestimmungsgrenze), mittlerer und hoher Konzentration mit untersucht. Dabei sind mindestens 5% einer Analysenserie Kontrollproben, d. h. mindestens jede 20. Probe ist eine Kontrolle.

Da käufliches Kontrollmaterial nicht zur Verfügung steht, werden die Kontrollurine aus Nichtraucher- und Raucher-Poolurin selbst hergestellt. Die einzustellenden HPMa-Konzentrationen der Kontrollurine sollten sich nach dem zu erwartenden Konzentrationsbereich richten. Gegebenenfalls ist eine zusätzliche Dotierung möglich.

Die Sollwerte des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (z.B. an 15 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [26–28]. Abweichungen von bis zu 15% (20% an der Bestimmungsgrenze) des Sollwerts der Kontrollproben werden akzeptiert. Alternativ zu dieser festgelegten Toleranzspanne kann der Toleranzbereich des Sollwertes auch im Rahmen der Vorperiode bestimmt werden [26–28]. Bei größeren Abweichungen muss die Serie wiederholt werden, gegebenenfalls mit einer neuen Kalibrierung. Liegen Systemstörungen vor, ist eine Ursachenanalyse durchzuführen und es sind entsprechende Maßnahmen zu ergreifen. Stichprobenartig wird auch das Quantifier/Qualifier-Peakflächenverhältnis ausgewertet, für das eine Toleranz von $\pm 25\%$ akzeptiert wird.

9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Die Präzision in der Serie ($n = 10$) und die Präzision von Tag zu Tag ($n = 10$ bzw. 16) wurden jeweils in einem Urin eines Nichtrauchers, eines Passivrauchers und eines Rauchers bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tab. 5. Präzision in der Serie und von Tag zu Tag für die Bestimmung von HPMA in Urin.

Präzision	n	Mittlere Konzentration [µg/L]	Standardabweichung (rel) s_w [%]	Streubereich u [%]
<i>Nichtraucher</i>				
in Serie	10	594	0,8	1,8
von Tag zu Tag	10	594	5,9	13,3
<i>Passivraucher</i>				
in Serie	10	1632	5,7	12,9
von Tag zu Tag	16	1633	5,7	12,1
<i>Raucher</i>				
in Serie	10	2807	4,9	11,1
von Tag zu Tag	10	2814	4,3	9,7

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche in Nichtraucher-Poolurin durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 Poolproben mit 88, 166 und 333 µg HPMA pro Liter dotiert. Die HPMA-Konzentration im undotierten Poolurin betrug 142 µg/L. Die ermittelten relativen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6. Relative Wiederfindungsraten von HPMA in Poolurin nach Dotierung mit drei Konzentrationen.

Native Konzentration [µg/L]	Dotierung [µg/L]	n	mittlere rel. Wiederfindung [%]	Bereich [%]
142	88	10	97,8	92–106
142	166	10	94,8	91–102
142	333	10	95,6	95–105

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für HPMA wurden durch jeweils 10-fache Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses in Nichtraucher-Poolurin und in Wasser unter Zugrundelegung folgender Beziehungen ermittelt:

$$\begin{aligned}\text{Nachweisgrenze} &= 3 \cdot \sigma_{\text{blind}}, \\ \text{Bestimmungsgrenze} &= 10 \cdot \sigma_{\text{blind}},\end{aligned}$$

wobei σ_{blind} die Standardabweichung des mittleren Blindwertes im Bereich der Retentionszeit von HPMA darstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7. Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze für HPMA in Urin und Wasser.

Matrix	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]
Urin	6,2	20,4
Wasser	3,8	12,6

9.4 Störeinflüsse

Bei der Verwendung von Gefäßen aus bestimmten Kunststoffen wie z. B. nicht-HD-Polyethylen (HD: high density) und Polystyrol kann es zu deutlichen Verlusten von HPMA kommen, was vermutlich auf Wandadsorptionseffekte zurückzuführen ist. Unproblematisch sind dagegen Behälter aus HD-Polyethylen, Polypropylen und Glas.

10 Diskussion der Methode

Die vorliegende Methode gestattet die schnelle, hoch selektive und sensitive Quantifizierung von HPMA mittels HPLC-APCI-MS/MS bei einer Messdauer von weniger als 4 Minuten. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode sind aufgrund der Verwendung des deuteriummarkierten internen Standards als sehr gut zu bezeichnen. Für HPMA als wichtigem Entgiftungsprodukt von Acrolein steht somit ein zuverlässiges Biomonitoring-Verfahren zur Verfügung, mit dem in kurzer Zeit eine hohe Probenzahl bewältigt werden kann.

Grundlage des Verfahrens ist eine Festphasenextraktion an einem Polystyroldivinylbenzol-Copolymer-Material (Isolute ENV+, Biotage). Im Vergleich zu her-

kömmlichen SPE-Polymermaterialien wurde dieses Material einer zusätzlichen Hydroxylierung unterworfen, so dass phenolische Gruppen auf der Festphasenoberfläche für Wechselwirkungen mit dem Analyten zur Verfügung stehen. Dabei beruht die Adsorption des Analyten auf dem Polymermaterial nicht nur auf p_π oder p_π^* -Wechselwirkungen wie bei der „normalen“ Reversed Phase. Im Vergleich zu Anionenaustauscher-Kartuschen auf Silicabasis (Isolute PE-AX, Biotage) ergaben sich mit den ENV+-Kartuschen bessere Wiederfindungsraten auf Grund der unspezifischeren Wechselwirkungen. Die Werte zeigen eine höhere Reproduzierbarkeit, außerdem erfolgt die Elution schneller, weil mit fast reinem Methanol eluiert werden kann.

Der Versuch, die Proben direkt im Eluens (2%ige Ameisensäure in Methanol) auf der LC/MS/MS zu messen, scheitert daran, dass das Methanol die Chromatographie negativ beeinflusst. Aus diesem Grund werden die Proben zur Trockene eingengt und in 10 mM Ammoniumacetat/Methanol (80:20) aufgenommen. Im Vergleich zur Aufnahme direkt in Laufmittel (50:50) führt dieses Vorgehen zu besseren Peakformen.

Bei der massenspektrometrischen Messung von HPMA hat sich die Verwendung der APCI-Quelle im Vergleich zur Elektrospray (ESI)- und Turbo-Ion-Spray (TIS)-Quelle als beste Variante herausgestellt. Wegen des hohen Wasseranteils im Laufmittel sind in der APCI-Quelle Temperaturen von rund 500 °C notwendig. Der Analyt erwies sich jedoch als thermisch ausreichend stabil für Messungen unter diesen Bedingungen: Obwohl die HPMA kurzzeitig Temperaturen von ca. 200 °C ausgesetzt ist, tritt keine störende Fragmentierung bereits in der Quelle auf. Im Vergleich zur TIS-Quelle führt die Messung mit APCI zwar zu leicht reduzierter absoluter Signalintensität; das Signal/Rausch-Verhältnis ist jedoch deutlich gesteigert. Als Laufmittel der Wahl hat sich für die APCI ein 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,8) zu Methanol 50:50 (v/v) erwiesen. Daraus ergibt sich eine Ionenstärke von 5 mM. Generell lassen sich bei dieser Ionenstärke auf unterschiedlichen Säulenmaterialien hervorragende chromatographische Ergebnisse erzielen. Man erhält symmetrische, scharfe Peaks bei hoher Signalintensität; die Laufzeiten sind kurz und das Säulenmaterial wird geschont.

Ein Reagentienleerwert in Urin kann nicht direkt bestimmt werden, da kein Urin vorliegt, der frei von HPMA ist. Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist daher zwangsläufig erschwert und objektiv über das Rauschen im unmittelbaren Bereich der Retentionszeit von HPMA am besten bestimmbar. In reinem Wasser wurde keinerlei Reagentienleerwert beobachtet. Die Methode zeigt über drei Größenordnungen lineares Verhalten für HPMA.

Die Prüfung der Methode wurde unter modifizierten analytischen Bedingungen durchgeführt. So wurde eine alternative Trennsäule (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8; 4,6 × 150 mm; 5 µm) mit einem HPLC-Gradientenprogramm verwendet (0 min: A 80%, B 20% | 0–3 min: → A 40%, B 60% | 3–5 min: A 40%, B 60% | 5–6

min: A 80%, B 20% | 6–10 min: A 80%, B 20%). Dabei lag die Retentionszeit für HPMA bei 2,3 min. Ein Säulenofen und ein thermostatisierbarer Probengeber standen nicht zur Verfügung. Als Tandem-Massenspektrometer kam ein API 3000 (Fa. Applied Biosystems) unter Verwendung einer TIS-Quelle zum Einsatz. Der Prüfer der Methode konnte unter den aufgeführten Bedingungen die Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens bestätigen.

Verwendete Messgeräte:

LC/MS/MS-System, bestehend aus einem HPLC-System HP 1100 Agilent Technologies (mit den Modulen: G1312 A, Binäre Hochdruckpumpe; G1316 A, Säulenofen mit Schaltventil; G1322 A, Degasser; G1329 A, Automatischer Flüssigprobengeber mit Thermostatisierung) und einem API 2000, Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer für Atmosphärendruck-Ionisation von Applied Biosystems. Zur Auswertung wurde die Software Analyst 1.1 von Applied Biosystems verwendet.

11 Literatur

- [1] *IARC International Agency for Research on Cancer: Acrolein. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Vol. 63, 337–372 (1995).*
- [2] *G. Scherer, F. Adlkofer: Tabakrauch in der Raumluft – Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 59, 435–443 (1999).*
- [3] *H. Esterbauer, P. Eckl, A. Ortner: Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. Mutat. Res. 238, 223–233 (1990).*
- [4] *K. Uchida: Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. Teratog. Carcinog. Mutagen. 9, 109–113 (1999).*
- [5] *K. Berhane, M. Widerstein, A. Engström, J.W. Kozarich, B. Mannervik: Detoxication of base propenals and other (α,β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 1480–1484 (1994).*
- [6] *R. Sanduja, G.A. Ansari, P.J. Boor: 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. J. Appl. Toxicol. 9, 235–238 (1989).*
- [7] *I. Linhart, E. Frantik, L. Vodickova, M. Vosmanska, J. Smejkal, J. Mitera: Biotransformation of acrolein in rat: excretion of mercapturic acids after inhalation and intraperitoneal injection. Toxicol. Appl. Pharmacol. 136, 155–160 (1996).*
- [8] *R.A. Parent, D.E. Paust, M.K. Schrimpf, R.E. Talaat, R.A. Doane, H.E. Caravello, S.J. Lee, D.E. Sharp: Metabolism and distribution of [2,3- ^{14}C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites. Toxicol. Sci. 43, 110–120 (1998).*
- [9] *D.G. Mascher, H.J. Mascher, G. Scherer, E.R. Schmid: High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of 3-hydroxypropylmercapturic acid in human urine. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 750, 163–169 (2001).*
- [10] *C.M. Kaye: Biosynthesis of mercapturic acids from allyl alcohol, allyl ester and acrolein. J. Biochem. 134, 1093–1101 (1973).*

-
- [11] *R.A. Alarcon*: Studies on the in vivo formation of acrolein: 3-hydroxy-propylmercapturic acid as an index of cyclophosphamide (NSC-26271) activation. *Cancer Treat. Rep.* 60, 327–335 (1976).
- [12] *Y. Ohno, K. Ormstad*: Formation, toxicity and inactivation of acrolein during biotransformation of cyclophosphamide as studied in freshly isolated cells from rat liver and kidney. *Arch. Toxicol.* 57, 99–103 (1985).
- [13] *K. Ramu, C.S. Perry, T. Ahmed, G. Pakenham, J.P. Kehrer*: Studies on the basis for the toxicity of acrolein mercapturates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 487–498 (1996).
- [14] *R.O. Jr. Beauchamp Jr., D.A. Andjelkovich, A.D. Kligerman, K.T. Morgan, H.D. Heck*: A critical review of the literature on acrolein toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 14, 309–380 (1985).
- [15] *FL. Chung, R. Young, S.S. Hecht*: Formation of cyclic 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* 44, 990–995 (1984).
- [16] *E. Eder, D. Sebeikat, J.P. Zugelder, C. Hoffman, H. Bastian, C. Dieninger, S. Scheckenbach*: DNA adducts of allyl compounds, enals and unsaturated ketones. Significance for mutagenicity and carcinogenicity. In: K. Hemminki (Hrsg.): *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, S. 443–447 (1994).
- [17] *L. Marnett*: DNA adducts of alpha, beta-unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds. In: K. Hemminki (Hrsg.): *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*. International Agency for Research and Cancer, Lyon, S. 151–163 (1994).
- [18] *R.G. Nath, J.E. Ocampo, FL. Chung*: Detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. *Cancer Research* 56, 452–456 (1996).
- [19] *A.J. Kurtz, R.S. Lloyd*: 1,N²-deoxyguanosine Adducts of Acrolein, Crotonaldehyde, and trans-4-Hydroxynonenal Cross-link to Peptides via Schiff Base Linkage. *J. Biol. Chem.* 278, 5970–6 (2002).
- [20] *DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft*: MAK- und BAT-Werte-Liste, Mitteilung 44, Wiley-VCH, Weinheim (2008).
- [21] *H. Greim (Hrsg.)*: Acrolein. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten, 17. Lieferung. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991).
- [22] *H. Greim (Hrsg.)*: Acrolein – Nachtrag. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten, 25. Lieferung. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1997).
- [23] *G. Scherer, G. Krause, D. Mascher, E. Schmid*: Biological monitoring of the tobacco smoke-related exposure to acrolein. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 91st Annual meeting, April 1–5, 2000, San Francisco (2000).
- [24] *G. Scherer, J. Engl, M. Urban, G. Gilch, D. Janket, K. Riedel*: Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 171–183 (2007).
- [25] *S.G. Carmella, M. Chen, Y. Zhang, D.K. Hatsukami, S.S. Hecht*: Quantitation of Acrolein-Derived (3-Hydroxypropyl)mercapturic Acid in Human Urine by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry: Effects of Cigarette Smoking. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 986–990 (2007).
- [26] *Bundesärztekammer*: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dt. Ärztebl.* 105, A341–A355 (2008).
- [27] *J. Angerer und G. Lehnert*. Anforderungen an arbeitsmedizinisch-toxikologische Analysen – Stand der Technik. *Dt. Ärztebl.* 37, C1753–C1760 (1997).

[28] *J. Angerer, T. Göen, G. Lehnert*: Mindestanforderungen an die Qualität von umweltmedizinisch-toxikologischen Analysen. Umweltmed. Forsch. Prax. 3, 307–312 (1998).

Autoren: *G. Scherer, M. Urban*

Prüfer: *T. Göen*

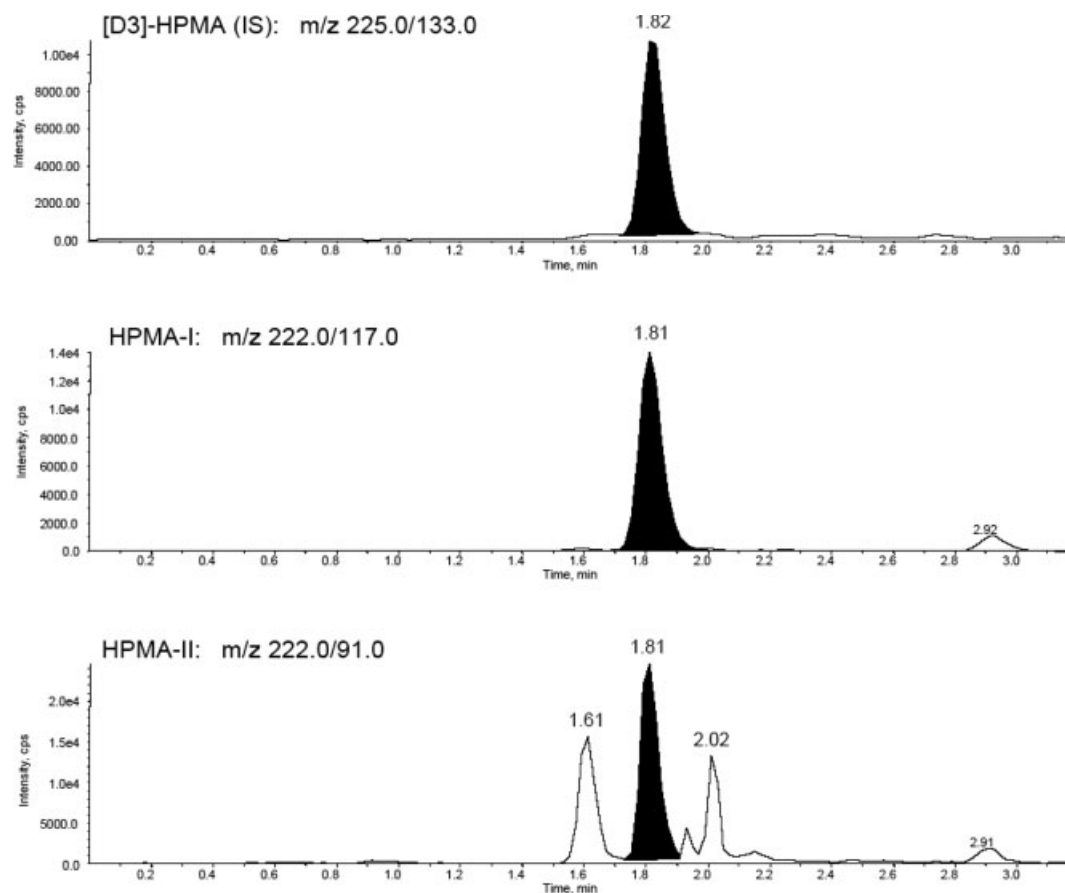


Abb. 2. Chromatogramm einer aufgearbeiteten nativen Urinprobe eines Rauchers mit einer HPMA-Konzentration von 1957 µg/L. Gezeigt sind die Massenübergangsspuren für den internen Standard (oben), den Quantifier (Mitte) und den Qualifier (unten).

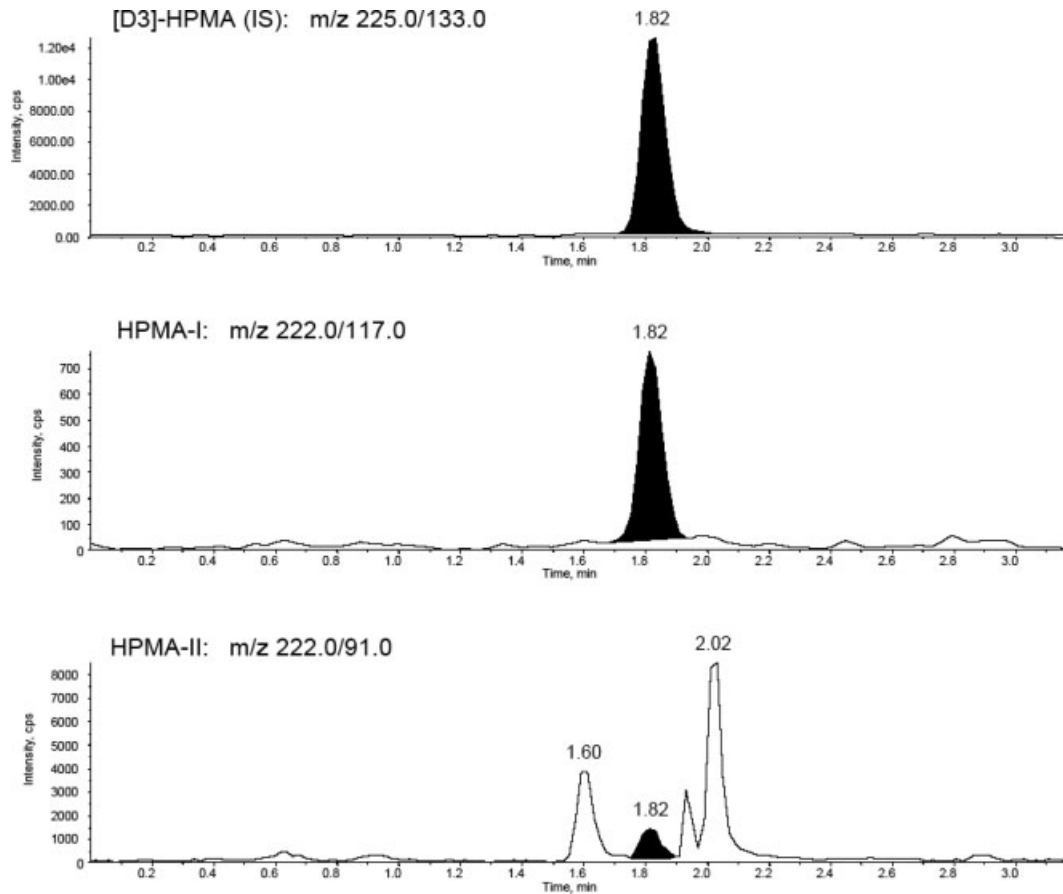


Abb. 3. Chromatogramm einer aufgearbeiteten nativen Urinprobe eines Nichtrauchers mit einer HPMA-Konzentration von 86 µg/L. Gezeigt sind die Massenübergangsspuren für den internen Standard (oben), den Quantifier (Mitte) und den Qualifier (unten).