

Monohydroxybutenyl- mercaptursäure (MHBMA) und Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA)



Anwendbarkeit Bestimmung in Urin

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

Zusammenfassung

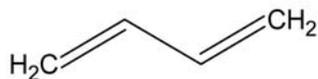
Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die Bestimmung von Monohydroxybutenylmercaptursäure (MHBMA) und Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA), zwei Hauptmetaboliten des 1,3-Butadiens, im Urin von beruflich oder umweltbedingt belasteten Personen. MHBMA und DHBMA werden nach Ansäuern des Urins mittels einer Festphasenextraktion von störenden Matrixkomponenten abgetrennt. Anschließend werden die Analyten hochleistungsflüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels tandem-massenspektrometrischer Detektion quantifiziert. Die Ionisierung erfolgt dabei mittels negativer APCI (atmospheric pressure chemical ionisation). Die Kalibrierung erfolgt mit dotierten Nichtraucher-Poolurinproben im Konzentrationsbereich 0,5–500 µg/L (MHBMA) bzw. 50,0–1250 µg/L (DHBMA). Zur Quantifizierung werden die strukturanalogen deuterierten Reinsubstanzen als interne Standards verwendet ([D₆]-MHBMA und [D₇]-DHBMA).

Monohydroxybutenylmercaptursäure (MHBMA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 4,1\%$
	Streubereich	$u = 10,5\%$
bei einer dotierten Konzentration von $7,35 \mu\text{g}$ MHBMA pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 7,5\%$
	Streubereich	$u = 15,7\%$
bei einer dotierten Konzentration von $37,6 \mu\text{g}$ MHBMA pro Liter Urin und $n = 21$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate	$r = 93,7\%$ bei $0,5 \mu\text{g/L}$
	und	$95,2\%$ bei $2 \mu\text{g/L}$
Bestimmungsgrenze:	$2,73 \mu\text{g}$ MHBMA pro Liter Urin	

Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 0,8\%$
	Streubereich	$u = 2,1\%$
bei einer dotierten Konzentration von $496,5 \mu\text{g}$ DHBMA pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 5,7\%$
	Streubereich	$u = 11,9\%$
bei einer dotierten Konzentration von $394,8 \mu\text{g}$ DHBMA pro Liter Urin und $n = 21$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate	$r = 95,3\%$ bei $50 \mu\text{g/L}$
	und	$73,6\%$ bei $1000 \mu\text{g/L}$
Bestimmungsgrenze:	$75,9 \mu\text{g}$ DHBMA pro Liter Urin	

1,3-Butadien

1,3-Butadien gehört zu den wichtigsten chemischen Grundstoffen und wird vor allem für die Gummierstellung allein und als Copolymer zusammen mit Styrol eingesetzt [1]. Die Jahresproduktion weltweit beträgt mehr als 5 Millionen Tonnen. Für die Umwelt und den Menschen wichtige Expositionsquellen sind Autoabgase [2] und die Verbrennung fossiler Brennstoffe (vor allem durch Gebäudeheizung). Pro gefahrenem Kilometer gibt ein PKW ca. 6 mg 1,3-Butadien ab [1]. Heizungsab-

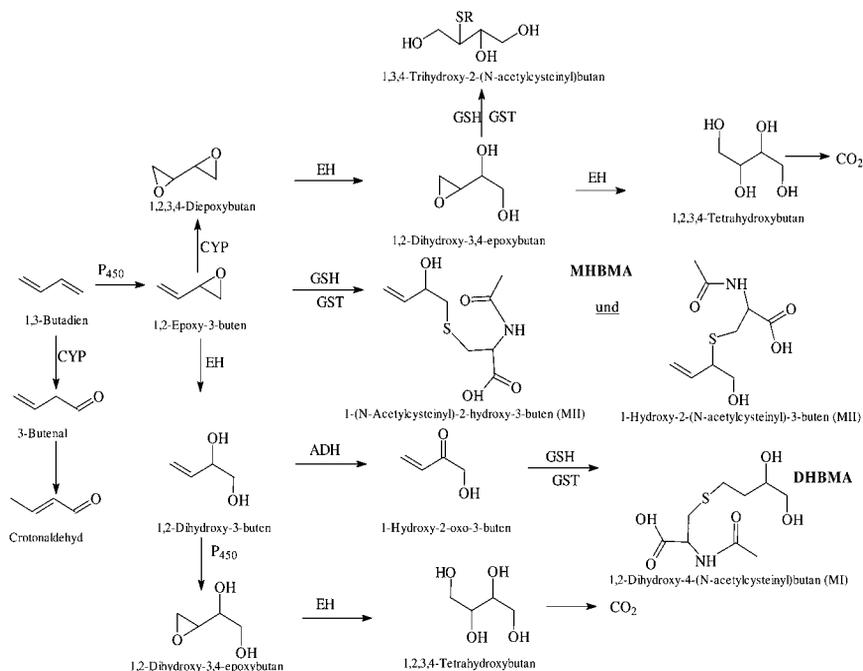


Abb. 1. Metabolismusschema für 1,3-Butadien [11].
 (SR = N-Acetylcysteinyl-Rest; GST = Glutathion-S-Transferase; GSH = Glutathion; EH = Epoxidhydrilase; CYP = Cytochrom P450, ADH = Alkoholdehydrogenase)

gas enthält 33 mg/m³. Die Halbwertszeit von 1,3-Butadien in der Außenluft wird auf ca. 4 h geschätzt [3]. In Stadtluft beträgt die Konzentration je nach Verkehrsdichte 1 bis 20 µg/m³ [4, 5]. Für Innenraumluft ist der Tabakrauch eine wichtige Quelle für 1,3-Butadien. Für verrauchte Räume wurden 1,3-Butadienkonzentrationen zwischen 2,7 und 19 µg/m³ berichtet [1, 6, 7]. Für den vom Raucher inhalierten Hauptstromrauch wurden 1,3-Butadienmengen von 16 bis 75 µg/Zigarette ermittelt [7]. Die Exposition mit 1,3-Butadien durch Nahrung (Werte im unteren ppb-Bereich) und Trinkwasser dürfte von untergeordneter Bedeutung sein [5, 8].

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat 1,3-Butadien als „wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft [1]. Die Kommission hat 1,3-Butadien in Kategorie 1 („krebserzeugend beim Menschen“) eingestuft [9, 10]. Eine ausführliche Abhandlung der toxikologischen Aspekte des 1,3-Butadiens ist in der Begründung der MAK-Kommission nachzulesen [10].

Ein Metabolismusschema für 1,3-Butadien ist in Abbildung 1 gezeigt [11]. Die ersten Schritte der Metabolisierung von 1,3-Butadien bestehen in der Oxidation zu

den entsprechenden Epoxiden (1,2-Epoxy-3-buten und 1,2,3,4-Diepoxybutan) und ungesättigten Aldehyden (3-Butenal, Crotonaldehyd). Die reaktiven Epoxide können prinzipiell mit zellulären Makromolekülen wie Proteinen und DNA zu Addukten reagieren oder mittels Epoxidhydrolasen zu Hydroxymetaboliten verstoffwechselt werden. Einen wichtigen Stoffwechselweg der reaktiven Zwischenprodukte des 1,3-Butadiens stellt die enzymatisch von Glutathion-S-Transferasen (GST) vermittelte (oder spontane) Konjugation mit Glutathion (GSH) dar. Diese Konjugate werden weiter umgebaut zu Mercaptursäuren. Für 1,3-Butadien wurden bislang drei Mercaptursäuren identifiziert: Erstens die Monohydroxybutenylmercaptursäure (MHBMA, teilweise in der Literatur als MII bezeichnet), welches ein Isomerenmisch aus 1-Hydroxy-2-(N-acetylcysteinyl)-3-buten und 1-(N-Acetylcysteinyl)-2-hydroxy-3-buten ist, zweitens die Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA oder MI, systematischer Name 1,2-Dihydroxy-4-(N-acetylcysteinyl)butan) und drittens das 1,3,4-Trihydroxy-2-(N-acetylcysteinyl)butan.

Zum Zwecke des Biomonitorings werden in der Regel die Metaboliten MHBMA und DHBMA im Urin bestimmt. Es ist anzunehmen, dass DHBMA das Ausmaß der Hydrolyse von 1,2-Epoxy-3-buten zum 1,2-Dihydroxy-3-buten anzeigt, bevor letzteres (wahrscheinlich nach Oxidation zum ungesättigten 1-Hydroxy-2-oxo-3-buten) mit GSH konjugiert. Im Gegensatz dazu zeigt MHBMA die direkte Detoxifizierung von 1,2-Epoxy-3-buten durch Konjugation mit GSH an [12, 13]. Das metabolische Verhältnis der Urinmetaboliten nach 1,3-Butadienexposition DHBMA/(DHBMA+MHBMA) ist deutlich speziesabhängig und beträgt für Mensch und Affe ca. 0,9 [12–15], für die Ratte 0,25–0,5 und für die Maus 0,2–0,4 [12, 14]. Mit steigender 1,3-Butadienexposition wird das metabolische Verhältnis bei verschiedenen Spezies kleiner [11, 14, 15].

Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen von arbeits- und umweltmedizinischen Untersuchungen nachgewiesenen MHBMA- bzw. DHBMA-Konzentrationen.

Tab. 1. MHBMA- und DHBMA-Konzentrationen im Urin beruflich und umweltbedingt belasteter Personen.

Kollektiv	n =	Konzentration MHBMA [$\mu\text{g/L}$]	Konzentration DHBMA [$\mu\text{g/L}$]	Literatur
Arbeitsmedizinische Untersuchungen				
Stark exponierte Arbeiter	7	–	Mittel 3200 \pm 1600	[14]
Mittelstark exponierte Arbeiter	3	–	Mittel 1390 \pm 550	[14]
Nicht exponierte Arbeiter	10	–	Mittel 630 \pm 190	[14]
Kontrollen	9	–	Mittel 320 \pm 70	[14]
Styrol-Butadien-Gummi Arbeiter	30	Bereich < 0,1–962	Bereich 60–26207	[11]
1,3-Butadien-Monomer Arbeiter	23	Bereich < 0,1–44	Bereich 52–3522	[11]
Nicht exponierte Kontrollen	24	Bereich < 0,1–8,2	Bereich 197–1211	[11]
Umweltmedizinische Untersuchungen				
Raucher	10	Mittel 86,4 \pm 14,0	Mittel 644 \pm 90	[15]
Nichtraucher	10	Mittel 12,5 \pm 1,0	Mittel 459 \pm 72	[15]



Autoren: *G. Scherer* und *M. Urban*

Prüfer: *W. Völkel*

Monohydroxybutenyl- mercaptursäure (MHBMA) und Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA)



Anwendbarkeit: Bestimmung in Urin

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

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
 - 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	Nachweisgrenzen
9.4	Störeinflüsse
10	Diskussion der Methode
11	Literatur

1 Grundlage des Verfahrens

Monohydroxybutenylmercaptursäure (MHBMA) und Dihydroxybutylmercaptursäure (DHBMA) werden nach Ansäuern des Urins mittels einer Festphasenextraktion von störenden Matrixkomponenten abgetrennt. Anschließend werden die Analyten hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels tandem-massenspektrometrischer Detektion quantifiziert. Die Ionisierung erfolgt dabei mittels negativer APCI. Kalibriert wird mit Hilfe von Vergleichsstandardlösungen, die in Poolurin von Nichtrauchern angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Zur Quantifizierung werden die strukturanalogen deuterierten Reinsubstanzen [D₆]-MHBMA und [D₇]-DHBMA als interne Standards verwendet.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

LC/MS/MS-System, bestehend aus binärer Hochdruckpumpe, Säulenofen mit Schaltventil, Entgaser, automatischem Flüssigprobengeber mit Thermostatisierung und einem tandem-massenspektrometrischen Detektor mit APCI, sowie einem PC-System zur Datenauswertung.

Kompressor (z. B. Manglitz Modell 4000 KCT-401-100-M.H.)

Membranluftrockner (z. B. Whatman Modell 64-01)

Stickstoffgenerator (z. B. Whatman Modell 75-72)

HPLC-Säule:

Atlantis dC18, Länge: 150 mm; innerer Durchmesser: 4,6 mm; Teilchendurchmesser: 3 µm (z. B. Waters) mit C18 Vorsäule, Länge: 4 mm; innerer Durchmesser: 3 mm und Vorsäulenhalter (z. B. Phenomenex)

Reagenzglasschüttler (z. B. Vortex, Carl Roth)

Variabel einstellbare Pipetten: 10–100 μL , 100–1000 μL , 1000–5000 μL (z. B. Eppendorf Variipetten)

Messkolben: 10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL

Bechergläser: 20 mL, 150 mL

100-mL-Messzylinder

4-mL-Glasfläschchen, graduiert, mit Schraubverschluss (z. B. Zefa Laborservice)

25-mL-Braunglasfläschchen

0,5–2-L-Polyethylenflaschen zur Urinsammlung bei Humanproben

10-mL-Polyethylenröhrchen zur Portionierung

Rotationsverdampfer (z. B. Büchi Labortechnik Rotavapor R-134)

Vakuumpumpe (z. B. Büchi Labortechnik)

Festphasenextraktionssäulen (z. B. Waters Oasis HLB, 500 mg, 6 mL, Nr. 186000115)

Festphasenextraktionsstation (z. B. Separtis VacMaster 20 mit Einsatz und Trockenaufsatz 121-2016 und Isolute PTFE-Kanüle mit Absperrhahn Nr. 121-0001)

Vakuumentrifuge (z. B. Jouan Speedvac Concentrator)

Rollenmischer

Filtersystem 0,22 μm (z. B. Millipore GS)

100- μL -Microvials (z. B. Agilent Technologies)

Vollpipetten: 20 mL, 50 mL, 100 mL (z. B. Brand)

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

Begasungssystem mit vier 250-mL-Waschflaschen

Vorrichtung zum Einengen unter Stickstoffstrom (z. B. Reacti-Therm, Pearce)

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien sind von Analysenqualität (p. a.) oder reiner.

(R)/(S)-N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl)-2-propenyl-L-cystein/(R)/(S)-N-Acetyl-S-(2-hydroxy)-3-butenyl-L-cystein, MHBMA (z. B. Toronto Research Chemicals Nr. A179005)



(R)/(S)-N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl)-2-propenyl-L-cystein-D₆/(R)/(S)-N-Acetyl-S-(2-hydroxy)-3-butenyl-L-cystein-D₆, [D₆]-MHBMA (z. B. Toronto Research Chemicals Nr. A179007)

N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxybutyl)-L-cystein, DHBMA (z. B. Toronto Research Chemicals Nr. A173710)

N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxybutyl)-L-cystein-D₇, [D₇]-DHBMA (z. B. Toronto Research Chemicals Nr. A173712)

Salzsäure 32% (z. B. Roth, Best. Nr. P 074.1)

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

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

Ammoniak 3.8, wasserfrei (z. B. Linde Nr. 4930795)

Stickstoff 5.0 (z. B. Linde)

Deionisiertes Wasser (z. B. Seradest Reinstwasseranlage)

Methanol, für die HPLC (z. B. Promochem Code 3041)

Essigsäureethylester, für die Rückstandsanalytik (z. B. Promochem Code 1191.1)

Acetonitril, für die HPLC (z. B. Merck Nr. 1.00030.9010)

2.3 Lösungen

4 M Salzsäure:

In einem 250-mL-Messkolben werden ca. 100 mL Wasser vorgelegt und mittels Vollpipette 100 mL Salzsäure (32%) vorsichtig zupipettiert. Nach dem Pipettieren der konzentrierten Salzsäure die Pipette mehrfach mit dem Kolbeninhalt nachspülen, um Reste von Chlorwasserstoff aus dem Pipettenkörper zu entfernen. Anschließend den Kolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und ist über 6 Monate verwendbar.

1 M Salzsäure:

In einen mit ca. 250 mL Wasser gefüllten 500-mL-Messkolben werden mittels Vollpipette 50 mL Salzsäure (32%) zupipettiert. Nach dem Pipettieren der konzentrierten Salzsäure die Pipette mehrfach mit dem Kolbeninhalt nachspülen, um Reste von Chlorwasserstoff aus dem Pipettenkörper zu entfernen. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird bei +4–6 °C im Kühlschrank aufbewahrt und ist über 6 Monate verwendbar.

2%ige Ameisensäure pH 2,0 für die HPLC:

In einem 1000-mL-Messkolben werden ca. 500 mL deionisiertes Wasser vorgelegt und mittels einer Vollpipette 20 mL Ameisensäure einpipettiert. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird durch ein 0,22 µm Filter filtriert.

Die Lösung wird bei +4–6 °C im Kühlschrank gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 1 Woche.

Salzsäure pH 2,0:

Zu 1000 mL deionisiertem Wasser wird in einem Becherglas unter ständiger pH-Kontrolle mit einem pH-Meter tropfenweise 1 M Salzsäure zupipettiert, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einem verschließbaren Glasgefäß gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 1 Woche.

Ethylacetat (ammoniakgesättigt) mit 20% MeOH (V/V):

Eine mit 250 mL Ethylacetat gefüllte Waschflasche wird an zweiter Stelle in ein Begasungssystem integriert, welches aus vier Waschflaschen besteht. Die erste und dritte Flasche ist leer. Die vierte Flasche wird mit Wasser zu 2/3 gefüllt. Alle Flaschen werden durch Klammern gesichert. Die erste Flasche wird an das Druckventil einer Ammoniakflasche angeschlossen. Das Ventil wird für 3 min geöffnet. In einem 250-mL-Messkolben werden 50 mL Methanol vorgelegt und mit der frisch hergestellten Lösung bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und ist über 1 Woche verwendbar.

0,5% Acetonitril in Salzsäure pH 2,0:

In einem 100-mL-Messkolben werden 0,5 mL Acetonitril vorgelegt. Der Kolben wird mit Salzsäure pH 2,0 bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Verwendbarkeit der Lösung beträgt 1 Woche.

2.4 Vergleichsstandards

2.4.1 Interner Standard

[D₆]-MHBMA Stammlösung:

10,0 mg (R)/(S)-N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl)-2-propenyl)-L-cystein-D₆/(R)/(S)-N-Acetyl-S-(2-hydroxy)-3-butenyl)-L-cystein-D₆ werden in einen 10-mL-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (1 g/L).



[D₇]-DHBMA Stammlösung:

10,0 mg N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxy-butyl)-L-cystein-D₇ werden in einen 10-mL-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (1 g/L).

[D₆]-MHBMA Arbeitslösung ISTD I:

100 µL der [D₆]-MHBMA Stammlösung werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (10 mg/L).

[D₇]-DHBMA Arbeitslösung ISTD II:

100 µL der [D₇]-DHBMA Stammlösung werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (10 mg/L).

Die Stamm- und Arbeitslösungen der Internen Standards werden in 25-mL-Braunglasfläschchen bei -18 °C eingefroren und sind unter diesen Bedingungen mindestens 12 Monate stabil.

2.4.2 Vergleichsstandards

MHBMA-Stammlösung:

10,0 mg (R)/(S)-N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl)-2-propenyl)-L-cystein/(R)/(S)-N-Acetyl-S-(2-hydroxy)-3-butenyl)-L-cystein werden in einen 10-mL-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (1 g/L).

DHBMA-Stammlösung:

10,0 mg N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxy-butyl)-L-cystein werden in einen 10-mL-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (1 g/L).

MHBMA-Arbeitslösung I:

100 µL der MHBMA-Stammlösung werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (10 mg/L).

MHBMA-Arbeitslösung II:

100 µL der MHBMA-Arbeitslösung I werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (100 µg/L).

DHBMA-Arbeitslösung:

100 µL der DHBMA-Stammlösung werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (10 mg/L).

Die Stamm- und Arbeitslösungen der Vergleichsstandards werden in 25-mL-Braunglasfläschchen bei -18 °C eingefroren und sind unter diesen Bedingungen mindestens 12 Monate stabil.

Zur Herstellung der Vergleichsstandardlösungen verfährt man wie folgt:

Tiefgefrorener Humanpoolurin wird über Nacht aufgetaut. Sobald dieser Raumtemperatur aufweist, wird er intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 °C, 2000 g, 10 min). Ein 20-mL-Aliquot des Überstandes wird in einem Becherglas mittels pH-Meter unter ständigem Schwenken zuerst unter tropfenweise Zugabe von 4 M Salzsäure auf pH 3,0–2,5, dann mit 1 M Salzsäure genau auf pH 2,0 eingestellt (siehe auch Abschnitt 3.1). Es werden in 10-mL-PE-Röhrchen jeweils die in Tabelle 2 genannten Volumina der MHBMA-Arbeitslösungen I und II, der DHBMA-Arbeitslösung und der Lösungen des Internen Standards ISTD I und II einpipettiert und unter schwachem Stickstoffstrom ohne Heizung zur Trockene eingengt. Anschließend werden jeweils 2 mL des angesäuerten Mischurins in die Röhrchen pipettiert und diese auf einem Rollenmischer mindestens 10 min durchmischt, um eine vollständige Lösung der Standardsubstanzen im Urin zu gewährleisten (Pipettierschema siehe Tabelle 2).

Die so erhaltenen Vergleichsstandardlösungen werden entsprechend Abschnitt 3.1 aufbereitet, wobei die Arbeitsschritte vor der Festphasenextraktion für die Vergleichsstandardlösungen entfallen, diese werden also direkt zur Festphasenextraktion eingesetzt.

Tab. 2. Pipettierschema zur Herstellung der Vergleichsstandardlösungen in Humanurin.

Volumen der Arbeitslösungen		Volumen der Dotierlösungen der Internen Standards		Volumen des Mischurins (eingestellt auf pH 2,0)	Konzentration der Vergleichsstandards		
MHBMA	DHBMA	[D ₆]-MHBMA	[D ₇]-DHBMA		MHBMA	DHBMA	
I [µL]	II [µL]	ISTD I [µL]	ISTD II [µL]	[mL]	[µg/L]	[µg/L]	
–	25	25	100	100	2	1,25	125
–	50	50	100	100	2	2,5	250
–	100	100	100	100	2	5,0	500
–	250	250	100	100	2	12,5	1250
10	–	500	100	100	2	50	2500
25	–	750	100	100	2	125	3750
100	–	–	100	100	2	500	–
250	–	–	100	100	2	1250	–



3 Probenahme und Probenvorbereitung

Die zur Urinsammlung verwendeten Polyethylen-Flaschen werden mit einem Reinigungsmittel gespült und mit bidestilliertem Wasser nachgewaschen. Die Proben werden nach der Sammlung aliquotiert (5–10 mL Probe in 10-mL-Röhrchen) und bis zur Analyse tiefgefroren (–18 °C). Eine Stabilisierung findet nicht statt. Die Verwendbarkeit beträgt mindestens 6 Monate.

3.1 Probenaufbereitung

Die tiefgefrorenen Urinproben werden über Nacht aufgetaut. Sobald diese Raumtemperatur aufweisen, werden sie intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 °C, 2000 g, 10 min). Der Überstand wird vorsichtig abgehoben, in ein neues 10-mL-Röhrchen überführt und der pH-Wert unter ständigem Schwenken zuerst mit 4 M Salzsäure auf pH 3,0–2,5, dann mit 1 M Salzsäure genau auf pH 2,0 eingestellt. Die Elektrode des pH-Meters taucht während der gesamten pH-Einstellung in das Proberöhrchen ein. Die Einstellung des pH-Wertes gilt dann als abgeschlossen, wenn sich der pH-Wert über die Dauer von mind. 20 Sekunden ohne Schütteln nicht mehr ändert. Für eine Doppelbestimmung aus Humanurin werden in 10-mL-PE-Röhrchen jeweils 100 µL [D₆]-MHBMA Arbeitslösung ISTD I (10 mg/L) und 100 µL [D₇]-DHBMA Arbeitslösung ISTD II (10 mg/L) einpipettiert und unter schwachem Stickstoffstrom ohne Heizung zur Trockene eingengt. Anschließend werden jeweils 2 mL zentrifugierter Humanurin in die Röhrchen pipettiert und diese auf einem Rollenmischer mindestens 10 min durchmischt, um eine vollständige Lösung der beiden internen Standards im Urin zu gewährleisten.

Anschließend erfolgt eine Festphasenextraktion an dem Polymermaterial Oasis HLB (500-mg-Kartusche, 6 mL). Die Kartuschen werden hierfür zunächst mit 2 × 6 mL Ethylacetat, 2 × 6 mL Methanol und 2 × 6 mL verdünnter Salzsäure pH 2,0 konditioniert. Nach vollständigem Aufbringen der Probe bei Atmosphärendruck werden die Kartuschen nacheinander mit 3 × 3 mL verdünnter Salzsäure pH 2,0 und 6 mL der Lösung von 0,5% Acetonitril in verdünnter Salzsäure pH 2,0 gewaschen und trockengesaugt (550 mbar, 3 min). Anschließend werden die Kartuschen zentrifugiert (10 °C, 500 g, 10 min) und mit Hilfe des Trockenaufsatzes mit Stickstoff trockengeblasen. Der Vordruck an der Stickstoffflasche wird dazu auf 2,0 bar eingestellt. Wenn die wässrige Phase vollständig von der Kartusche gepresst wurde, wird das Trocknen noch 2 min fortgesetzt.

Die Elution erfolgt mit der Lösung von 20% Methanol in ammoniakgesättigtem Ethylacetat (V/V) in ein 4-mL-Gläschen. Hierzu werden 5 mL der Lösung aufgebracht und nach 1 min Einwirkzeit mit leicht reduziertem Druck bei 920 mbar durchgesaugt, so dass eine tropfenweise Elution zu beobachten ist. Um eine voll-

ständige Elution zu erreichen, werden die Kartuschen bei 550 mbar für 2 min vollständig trockengesaugt. Die Probe wird mittels Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und in 100 µL 2%ige Ameisensäure/Methanol 70:30 (V/V) aufgenommen. Anschließend erfolgt die analytische Bestimmung mittels LC/MS/MS. Abbildung 2 zeigt die Probenaufarbeitung in Form eines Fließschemas.



4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekombination bestehend aus einem HPLC-System mit binärer Pumpe, Säulenofen, Entgaser und automatischem Probengeber, sowie einem Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer mit Möglichkeit der negativen APCI.

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen

Trennsäule:	Material:	Stahl
	Länge:	150 mm
	innerer Durchmesser:	4,6 mm
	Säulenfüllung:	Atlantis dC ₁₈ , 3 µm, 100 Å
Trennprinzip:	Reversed phase	
Temperatur:	50 °C	
Detektion:	Tandem-Massenspektrometrischer Detektor	
Mobile Phase:	Eluent A: 2%ige Ameisensäure pH 2,0, aq. Eluent B: Methanol	
Gradient:	siehe Tabelle 3	

Tab. 3. Gradientenprogramm der binären Pumpe.

Zeit (min)	Eluent A Vol. %	Eluent B Vol. %
0,00	70	30
1,00	70	30
4,00	10	90
5,00	10	90
5,01	70	30
10,00	70	30

Stopzeit:	10 Minuten		
Flussrate:	1 mL/min		
Autosampler:	Kühlung:	10 °C	
	Injektionsvolumen:	10 µL	

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

4.2 Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Einstellungen der Ionenquelle:

Ionisationsmodus:	APCI negativ
Source-Temperature:	495 °C
Curtain gas pressure:	50 psi
Needle current (NC):	-2 µA
Nebulizer Gas (GAS 1):	70 psi
Auxiliary/Heater Gas (GAS 2):	20 psi

Einstellungen des Analysers: siehe Tabelle 4

Tab. 4. Analyser-Einstellungen.

Parameter	[D ₇]- DHBMA	DHBMA		[D ₆]- MHBMA	MHBMA	
Übergang	257,2 → 128,0	250,0 → 121,0	250,0 → 75,0	238,2 → 109,0	232,0 → 103,0	232,0 → 73,0
Messzeit [ms]	200	200	200	200	200	200
DP [V]	-31	-56	-56	-26	-31	-31
FP [V]	-80	-190	-190	-60	-330	-330
EP [V]	9,5	8,0	8,0	10,0	6,0	6,0
CEP [V]	-8,0	-52	-52	-10	-10	-10
CXP [V]	-8	-6	-14	-8	-24	-8
CE [V]	-20	-22	-36	-12	-14	-34

DP = declustering potential, FP = focussing potential, EP = entrance potential, CEP = collision cell entrance potential, CXP = collision cell exit potential, CE = collision energy.

Die aufgelisteten Messbedingungen sind für die eingesetzte Gerätekonfiguration ermittelt worden und müssen für Geräte anderer Hersteller gemäß deren Angaben optimiert werden.

5 Analytische Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung werden 10 µL der Probelösung auf die Trennsäule injiziert. Bei jeder Analysenserie von 18 Proben werden 2 Qualitätskontrollproben unterschiedlicher Konzentration mitanalysiert. Pro Tag wird ein Reagentienleerwert bestimmt. Für jede Realprobe werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Liegen die ermittelten Messwerte außerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierkurve, erfolgt vor einer erneuten Aufbereitung und Messung eine entsprechende Verdünnung des Urins mit deionisiertem Wasser (z. B. 1:10). Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 5 aufgeführten Ionenübergänge im MRM-Modus des Tandem-Massenspektrometers (APCI-negativ-Modus) aufgezeichnet.



Tab. 5. Retentionszeiten und detektierte Ionenübergänge.

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenübergänge (MS/MS, APCI-neg.-Modus)	
		Q 1	Q 3
[D ₇]-DHBMA	2,19	257,2	128,0*
DHBMA	2,20	250,0	121,0*
			75,0
[D ₆]-MHBMA	2,97	238,2	109,0*
MHBMA	3,01	232,0	103,0*
			73,0

Die mit * gekennzeichneten Massen werden zur quantitativen Auswertung herangezogen.

Die in Tabelle 5 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen.

In Abbildung 3a und 3b sind beispielhaft die Chromatogramme zweier Urine (ein Raucher und ein Nichtraucher) abgebildet.

6 Kalibrierung

Es wird eine Matrixkalibrierung mit gemäß Tabelle 2 dotiertem und Abschnitt 3.1 aufgearbeitetem Kontrollurin und den in Abschnitt 4.1 und 4.2 aufgelisteten Geräteparametern durchgeführt. Die Kalibriergerade wird durch lineare Regression der Flächenverhältnisse von MHBMA/[D₆]-MHBMA bzw. DHBMA/[D₇]-DHBMA gegen die dotierte Konzentration von MHBMA bzw. DHBMA erstellt. Die Konzentration ohne Dotierung wird jeweils subtrahiert. Bei Einsatz von 2 mL Probe wurde

an dem beschriebenen Analysengerät ein linearer Messbereich von 1,25 bis 1250 µg/L (für MHBMA), bzw. von 125 bis 3750 µg/L (für DHBMA) ermittelt. Es ist nicht notwendig, bei jeder Analysenserie eine vollständige Kalibriergerade aufzunehmen. Neue Kalibriergeraden sollten erstellt werden, wenn die Ergebnisse der Qualitätssicherung systematische Abweichungen erkennen lassen, Systemveränderungen vorgenommen wurden oder längere Zeit keine Analysen mehr durchgeführt worden sind.

Beispiele für Kalibriergeraden sind in Abbildung 4 gezeigt.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Die Konzentration der Probe in µg/L lässt sich aus der Kalibrierfunktion ($y = mx + t$) nach folgender Formel berechnen:

Konzentration der Probe [µg/L] = $(y-t)/m$

mit y : Peakflächen-Verhältnis: Analyt/ISTD

t : Achsenabschnitt der Leerwert-korrigierten Kalibrierfunktion
(siehe Abschnitt 6)

m : Steigung der Kalibrierfunktion

Ermittelte Reagenzienleerwerte sind von den Analysenergebnissen der Realproben zu subtrahieren. Gegebenenfalls kann die Berechnung auch über die Auswertungssoftware des LC/MS/MS-Systems erfolgen (z.B. Analyst-Software von Applied Biosystems). Falls eine Probe vor der Aufbereitung verdünnt wurde, ist die nach obiger Formel errechnete Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer [16, 17] und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit (Präzision von Tag zu Tag) werden selbst hergestellte Poolurinproben von Rauchern und Nichtrauchern als Kontrollproben mitgeführt. Der „Sollwert“ und die Toleranzbereiche dieses Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorstudie ermittelt (Präzision in Serie mit $n = 5$). Pro Tag wird ein Reagenzienleerwert bestimmt. Zwei Kontrollproben mit 2 unterschiedlichen Konzentrationen (z.B. Raucher-, Nichtraucherpool) werden bei jeder Aufarbeitungsserie von jeweils 18 eigentlichen Proben mitgeführt, um Systemveränderungen zu registrieren. Eine der Kontrollproben wird vor den 18 Proben

vermessen, die zweite Kontrollprobe nach den 18 Realproben. Eine Standardlösung der Analyten wird pro 100 Injektionen vermessen. Die mitgeführte Standardprobe entspricht einem Mix aus den 4 Einzelstandards mit einer Konzentration der einzelnen Komponenten von 2,5 mg/L. Sollten die Ergebnisse der Qualitätskontrollproben systematische Abweichungen erkennen lassen, muss gemäß Abschnitt 6 erneut kalibriert werden.



9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde mittels undotierten Humanurins bestimmt. Für die Präzision in Serie wurden je ein Raucher- und ein Nichtraucherurin fünfmal gemäß den vorhergehenden Abschnitten aufgearbeitet und analysiert. Die Präzision von Tag zu Tag wurde wie folgt bestimmt: Über einen Zeitraum von 5 Wochen wurde an 21 Tagen je ein Aliquot eines Raucher- und eines Nichtraucherpoolurins einmal pro Tag gemäß den vorhergehenden Abschnitten aufgearbeitet und analysiert.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tab. 6. Präzision für MHBMA- und DHBMA-Bestimmungen in Humanurin.

	n	Konzentration [µg/L]	Variations- koeffizient [%]	Streubereich [%]
MHBMA				
<i>Nichtraucher</i>				
In der Serie	5	7,35	4,1	10,5
Tag zu Tag	21	37,6	7,5	15,7
<i>Raucher</i>				
In der Serie	5	9,35	6,3	16,2
Tag zu Tag	21	18,4	13,4	27,9
DHBMA				
<i>Nichtraucher</i>				
In der Serie	5	496,5	0,8	2,1
Tag zu Tag	21	394,8	5,7	11,9
<i>Raucher</i>				
In der Serie	6	238,1	1,0	2,6
Tag zu Tag	21	219,8	4,2	8,7

9.2 Richtigkeit

Für Humanurin wurde die Richtigkeit durch Dotierexperimente von Nichtraucher-poolproben ermittelt. Dazu wurden jeweils 5 Poolproben mit 2,5 und 10 ng MHBMA im Ansatz von 5 mL dotiert. Für DHBMA betragen die Dotiermengen 250 und 5000 ng. Diese Proben wurden anschließend entsprechend Abschnitt 3 und 4 aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7. Richtigkeit von MHBMA- und DHBMA-Bestimmungen in Humanurin ($n = 5$, Ausgangskonzentration: 4,27 $\mu\text{g/L}$, bzw. 476,4 $\mu\text{g/L}$).

Aufdotierte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Relative Wiederfindung [%] (Variationskoeffizient [%])	
	MHBMA	DHBMA
0,5	93,7 (8,1)	–
2,0	95,2 (6,1)	–
50	–	95,3 (4,6)
1000	–	73,6 (2,9)

9.3 Nachweisgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses aus 10 Nichtraucher-Poolurinproben bestimmt unter Zugrundelegung folgender Beziehungen:

$$\text{Nachweisgrenze } (X^*) = 3 \sigma_{\text{blind}}$$

$$\text{Bestimmungsgrenze} = 10 \sigma_{\text{blind}}$$

wobei σ_{blind} die Standardabweichung des mittleren Blindwertes bei der Retentionszeit der jeweiligen Mercaptursäure darstellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von MHBMA und DHBMA in Humanurin.

Analyt	NWG [$\mu\text{g/L}$]	BSG [$\mu\text{g/L}$]
MHBMA	0,91	2,73
DHBMA	23,0	75,9

NWG = Nachweisgrenze, BSG = Bestimmungsgrenze

9.4 Störeinflüsse

Die chromatographische Trennung der Analyten durch ein Gradientenprogramm ist nicht nur auf Grund der unterschiedlichen Polaritäten der Analyten notwendig, sondern dient vor allem zur Abtrennung störender Matrixkomponenten. Die Verwendung des stark sauren HPLC-Lösungsmittelgemisches erlaubt auf der verwendeten C18- Säule mit 3 μm -Teilchen eine vergleichsweise gute Retention, so dass durch Vergleich der Peakformen und Retentionszeiten des nativen Metaboliten mit denen des internen Standards eine eindeutige Zuordnung der Peaks möglich wird. Das Isomerengemisch von MHBMA wird mit dieser Chromatographie nicht vollständig getrennt (siehe Abbildung 3a und 3b). In dieser Methode wird die Summe der beiden MHBMA-Isomeren ausgewertet.

Eine hohe Spezifität ist durch die Detektion von Tochterionen mittels LC/MS/MS gewährleistet. Als weitere Identifikationskriterien können die deuterierten Standards und ihre jeweiligen Retentionszeiten (unmittelbar vor den Analyten) herangezogen werden.

Als kritischer Schritt ist die Trocknung der SPE-Kartuschen vor der Elution anzusehen. Eine unvollständige Trocknung kann zu unkontrollierten Verlusten an Analyten führen. Es muss daher auf eine vollständige Trocknung der SPE-Kartuschen geachtet werden.

Nach unserer bisherigen Erfahrung sind MHBMA und DHBMA im Urin, der bei -25°C gelagert wird, für mindestens 12 Monate stabil.

10 Diskussion der Methode

Die neu entwickelte Methode zur Bestimmung von Mercaptursäuren des 1,3-Butadiens gestattet die schnelle, hoch selektive und sensitive Quantifizierung von gleichzeitig 2 Mercaptursäuren mittels HPLC/APCI-MS/MS mit einer Messdauer von weniger als 10 Minuten. Diese klassischen Entgiftungsprodukte stehen somit einem Monitoring zur Verfügung, mit dem in kurzer Zeit eine relativ hohe Probenzahl bewältigt werden kann. Aufgrund der einfachen Probenvorbereitung können bis zu 60 Proben pro Woche als Doppelansätze bestimmt werden. Grundlage des Verfahrens ist eine einfache Festphasenextraktion an einem Polymermaterial. Die Adsorption der Analyten auf dem Polymermaterial können nur aus $\pi\pi$ oder $\pi\pi^*$ -Wechselwirkungen bestehen („normale“ Reversed Phase-Chromatographie). Die Analyten sollten daher auf Grund ihrer hohen Polarität relativ leicht und vor allem unspezifisch gebunden sein. Die für eine konstante Wiederfindung geforderten gleich bleibenden Flussraten lassen sich bei der Festphasenextraktion von Hand nur durch Vakuumkontrolle mittels eines Vakuum-Controllers erzielen. Es zeigt sich, dass die Mercaptursäuren eine ausreichende thermische Stabilität für Messun-



gen mit APCI aufweisen. Wegen des hohen Wasseranteils im Laufmittel sind in der Ionenquelle Temperaturen von 500 °C notwendig. Dadurch erreichen die Analyten kurzzeitig Temperaturen von ca. 200 °C. Dennoch tritt keine messbare Fragmentierung bereits in der Quelle auf. Die Messung mit APCI hat gegenüber der TIS (Turbo Ion Spray)-Quelle einige Vorteile: Mit höheren Flussraten von 1000 µL/min und Säulendurchmessern von 4,6 mm lassen sich relativ kurze Laufzeiten von 10 min erreichen, das Signal/Rausch-Verhältnis ist bei APCI jedoch deutlich verbessert. Allerdings ist die absolute Intensität der Signale leicht reduziert.

Die Kalibrierung als auch die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgt aus Nichtraucherurin. Da kein Urin vorliegt, der frei von 1,3-Butadien-Mercaptursäuren ist, führt dies zwangsläufig zu einer Überbewertung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, wenn diese mit der Leerwertmethode bestimmt werden. Besser bestimmt werden können diese objektiv über das Signal/Rausch-Verhältnis.

Die Methode zeigt über 3 Größenordnungen lineares Verhalten für alle Analyten. Die Selektivität ist durch die Aufnahme von Fullscan-Massenspektren im Rahmen der „Quantitative Optimization“ bestätigt worden.

Im Verlauf der Methodenentwicklung konnte ein eindeutiger Einfluss der eingesetzten Urinmenge auf die Wiederfindung gezeigt werden. Bei Verwendung größerer Urinmengen nimmt die Wiederfindung deutlich ab, was darauf hindeutet, dass dann Bindungsstellen der Kartuschen überwiegend von Matrixbestandteilen belegt werden und somit für eine Retention der Analyten nicht mehr zur Verfügung stehen.

Verwendete Messgeräte:

HPLC-System HP 1100 von Agilent Technologies mit den Modulen G1312 A, G1314 A, G1316 A, G1322 A und G1329 A und einem Tandem Quadrupol Massenspektrometer mit APCI-Quelle API 2000, sowie der Auswertesoftware „Analyst“ von Applied Biosystems.

11 Literatur

- [1] *International Agency for Research on Cancer (IARC): 1,3-Butadiene. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: World Health Organization, Lyon (1992).*
- [2] *N. Pelz, A. M. Dempster und P. R. Shore: Analysis of low molecular weight hydrocarbons including 1,3-butadiene in engine exhaust gases using an aluminum oxide porous-layer open-tubular fused-silica column. J. Chromatogr. Sci. 28, 230–235 (1990).*
- [3] *L. I. Cote und S. P. Bayard: Cancer risk assessment of 1,3-Butadiene. Environ. Health Perspect. 86, 149–153 (1990).*

- [4] *L. Löfgren und G. Petersson*: Butenes and butadiene in urban air. *Sci. Total Environ.* 116, 195–201 (1992).
- [5] *International Agency for Research on Cancer (IARC)*: Some Chemicals used in plastics and elastomers. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to Humans. World Health Organisation, Lyon (1986).
- [6] *G. Löfroth, R. M. Burton, L. Forehand, S. K. Hammond, R. L. Seila, R. B. Zweidinger und J. Lewtas*: Characterization of environmental tobacco smoke. *Environ. Sci. Technol.* 23, 610–614 (1989).
- [7] *K. D. Brunnemann, M. R. Kagan, J. E. Cox und D. Hoffmann*: Analysis of 1,3-butadiene and other selected gas-phase components in cigarette mainstream and sidestream smoke by gas chromatography – mass selective detection. *Carcinogenesis* 11, 1863–1868 (1990).
- [8] *T. P. McNeal und C. V. Breder*: Headspace gas chromatographic determination of residual 1,3-butadiene in rubber-modified plastics and its migration from plastic containers into selected foods. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 70, 18–21 (1987).
- [9] *Deutsche Forschungsgemeinschaft*: MAK- und BAT-Werte-Liste 2006, Mitteilung 42, Wiley-VCH, Weinheim (2006).
- [10] *H. Greim (Hrsg.)*: 1,3-Butadien. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. Lieferungen 9, 10, 26, Wiley-VCH, Weinheim (1983, 1984, 1998).
- [11] *N. J. van Sittert, H. J. J. Megens, W. P. Watson und P. J. Boogaard*: Biomarkers of exposure to 1,3-butadiene as a basis for cancer risk assessment. *Toxicol. Sci.* 56, 189–202 (2000).
- [12] *P. J. Sabourin, L. T. Burka, W. E. Bechtold, A. R. Dahl, M. D. Hoover, I. Y. Chang und R. F. Henderson*: Species differences in urinary butadiene metabolites; identification of 1,2-dihydroxy-4-(N-acetylcysteinyl)butane, a novel metabolite of butadiene. *Carcinogenesis* 13, 1633–1638 (1992).
- [13] *P. J. Boogaard, N. J. van Sittert und H. J. J. Megens*: Urinary metabolites and haemoglobin adducts as biomarkers of exposure to 1,3-butadiene: a basis for 1,3-butadiene cancer risk assessment. *Chem. Biol. Interact.* 135–136, 695–701 (2001).
- [14] *W. E. Bechtold, M. R. Strunk, I. Y. Chang, J. B. Ward Jr. und R. F. Henderson*: Species differences in urinary butadiene metabolites: Comparisons of metabolite ratios between mice, rats, and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 44–49 (1994).
- [15] *M. Urban, G. Gilch, G. Schepers, E. Van Miert und G. Scherer*: Determination of the major mercapturic acids of 1,3-butadiene in human and rat urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 796, 131–140 (2003).
- [16] *Bundesärztekammer*: Qualitätssicherung der quantitativen Bestimmungen im Laboratorium. Neue Richtlinien der Bundesärztekammer. *Dt. Ärztebl.* 85, A699–A712 (1988).
- [17] *Bundesärztekammer*: Ergänzung der „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“. *Dt. Ärztebl.* 91, C159–C161 (1994).

Autoren: *G. Scherer und M. Urban*

Prüfer: *W. Völkel*



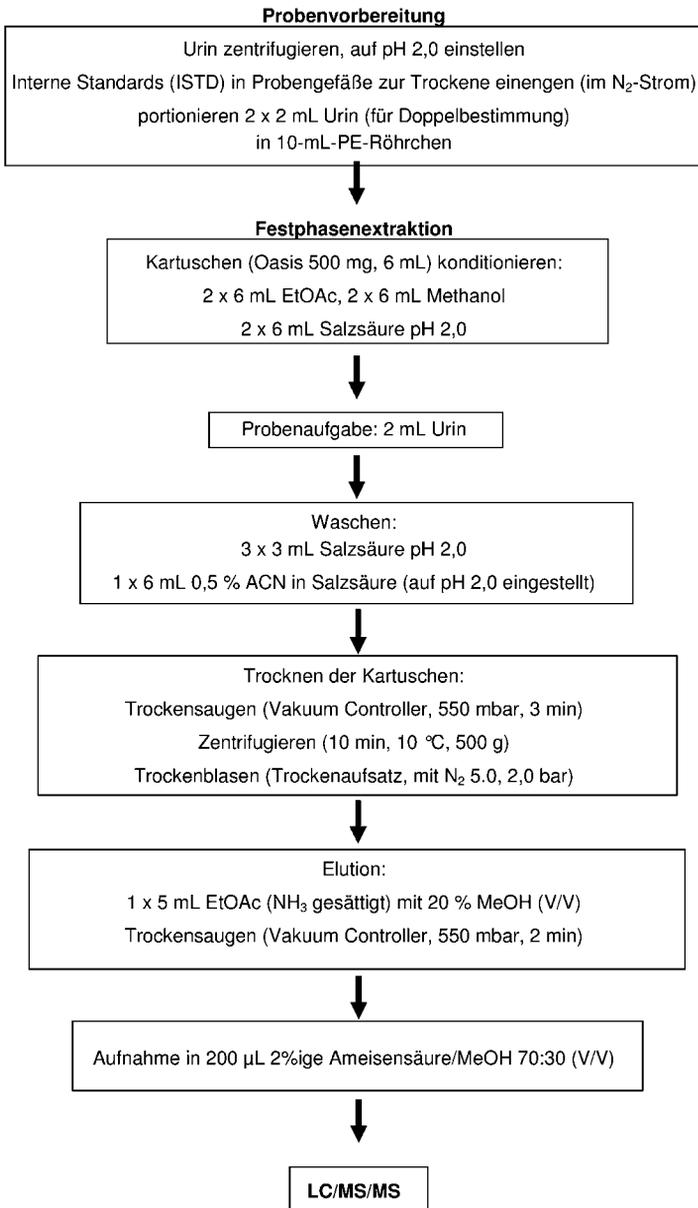


Abb. 2. Methodenfließschema.

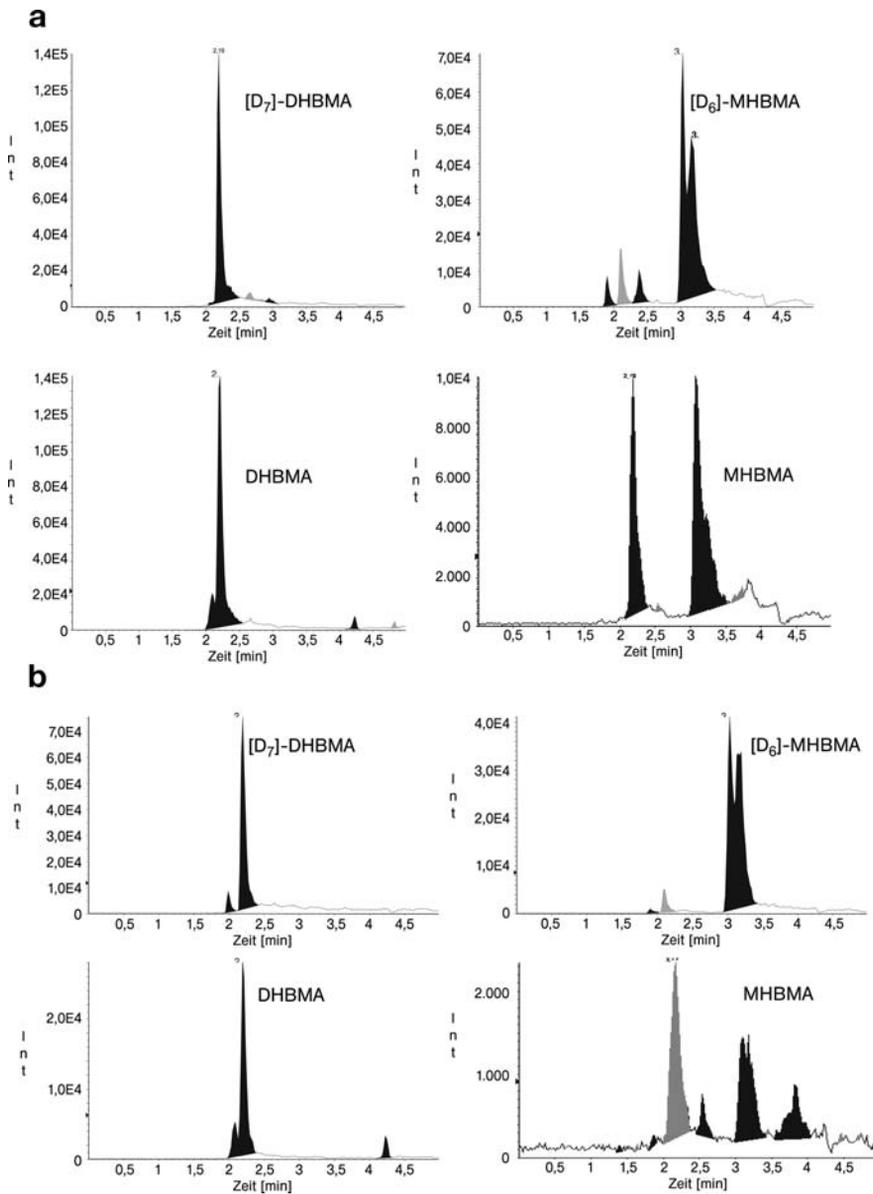


Abb. 3. Beispiel-Chromatogramme: **a.** Raucher: 11,43 $\mu\text{g/L}$ MHBMA; 424,81 $\mu\text{g/L}$ DHBMA; **b.** Nichtraucher: 1,63 $\mu\text{g/L}$ MHBMA; 112,3 $\mu\text{g/L}$ DHBMA.

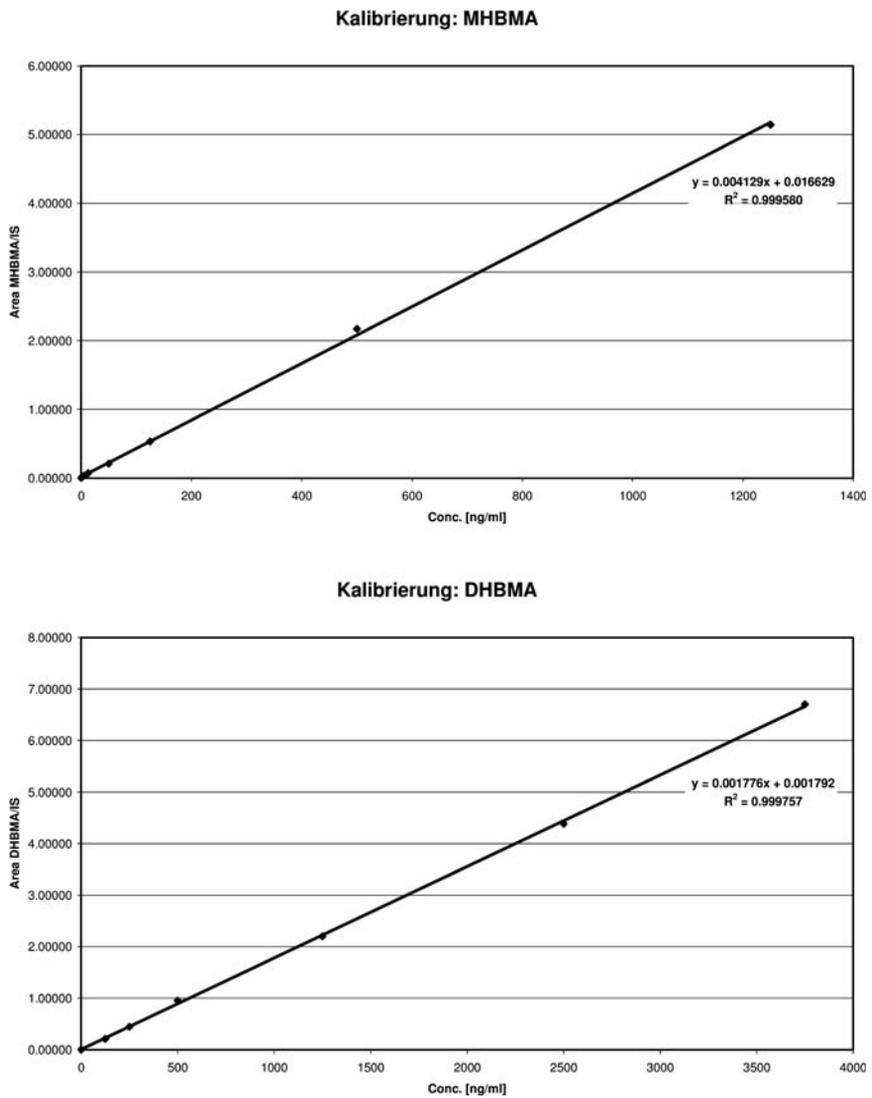


Abb. 4. Kalibriergeraden für MHBMA und DHBMA. Es wurde eine Matrixkalibrierung durchgeführt.