

# Einfache Urinaufarbeitung zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Pentachlorphenol (PCP)

F. Susanto<sup>1</sup> und P.-J. Jansing<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lehrstuhl für klinische Biochemie und Biochemische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. H. Reinauer)

<sup>2</sup> Institut für Arbeitsmedizin an der Universität Düsseldorf und Staatlicher Gewerbeärzt Nordrhein (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Jansen)

## Zusammenfassung:

*Es wird eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Pentachlorphenol (PCP) im Urin beschrieben.*

*Zur Aufarbeitung wird die Probe nach Zugabe von 2,3,5,6-Tetrachlorphenol (TCP) als interner Standard mit n-Hexan extrahiert. Der Extrakt wird eingedampft. Die phenolischen Hydroxylgruppen werden propionyliert, wobei die Umsetzung durch Propionsäureanhydrid-Äthylacetatlösung in alkalischem Milieu erfolgt.*

*Die gaschromatographische Analyse erfolgt mittels Gaschromatographie und Elektroneneinfangdetektor. Der Meßbereich liegt zwischen 2,5 und 800 ng/ml, die Wiederfindungsrate beträgt 94–103%, im Mittel 98%. Die Präzision hat einen VK von 3,2%, die Nachweisgrenze liegt bei 2,5 ng/ml Urin.*

## Schlüsselwörter:

PCP – Derivatisierung – GC – Elektroneneinfangdetektor – biological monitoring

## Summary:

*A gas-liquid chromatographic method for determination of pentachlorophenol (PCP) in human urine has been developed. The samples are extracted with n-hexane, using 2,3,5,6-tetrachlorophenol (TCP) as internal standard. Applying a solution of propionic acid anhydride in ethylacetate phenolic hydroxy groups are propionylated in alkaline medium.*

*They are finally analysed by gas-liquid chromatography with electron-capture-detection. The measuring range is between 2.5 and 800 ng/ml. The recovery is between 94–103% (medium 98%), and the relative standard deviation at 50 ng/ml level of PCP is 3.2% (n = 7). The lower limit of detection reached 2.5 ng/ml urine.*

## Keywords:

PCP – derivatisation – GLC – electron-capture detector – biological monitoring

## Einleitung

Die Untersuchung von Pestiziden in den verschiedenen Umweltmaterialien, Geweben und Körperflüssigkeiten haben in den letzten Jahren aufgrund ihrer steigenden Verwendung und zunehmender Erkenntnisse über ihre toxischen Wirkungen besondere Bedeutung erlangt. Es ist eine große Anzahl von gaschromatographischen Arbeiten zur Analyse von verschiedenen Pestiziden erschienen (1–5).

Pentachlorphenol (PCP) wird als Fungizid und Herbizid verwendet. Nach Lauwerys (6) wird PCP größtenteils unverändert im Urin ausgeschieden. Für nicht exponierte Personen wird eine Tagesausscheidung von 2–80 µg und für beruflich exponierte Personen von 100–800 µg angegeben (1).

Voraussetzung für eine quantitative gaschromatographische Bestimmung von PCP aus biologischem Material ist eine chemische Umwandlung bzw. Derivatisierung. Das PCP wird hierfür nach Extraktion aus dem Urin mit n-Hexan direkt durch eine Propionsäureanhydrid-Äthylacetat-Lösung zum entsprechenden Propionyl-Derivat umgesetzt (Abb. 1). Pheno-

liche Hydroxylgruppen aber auch primäre und sekundäre aliphatische Aminogruppen werden unter diesen Bedingungen propionyliert und dann aufgrund ihres nunmehr lipophilen Charakters quantitativ in die organische Phase überführt. Auf diese Weise entstehen stabile Verbindungen mit guten gaschromatographischen Eigenschaften (7, 8).

## Material und Methoden

### Reagenzien

Äthylacetat p. a. (Merck), Propionsäureanhydrid puriss. (Fluka), n-Hexan Nanograde (Promochem), Natriumcarbonat p. a. (Merck), Pentachlorphenol und 2,3,5,6-Tetrachlorphenol (Supelco), Perchlorsäure konz. (Merck).

### Aufarbeitung

In ein Zentrifugenröhrchen werden 100 ng 2,3,5,6-Tetrachlorphenol (TCP) in methanolischer Lösung als interner Standard gegeben und vorsichtig unter schwachem N<sub>2</sub>-Strom

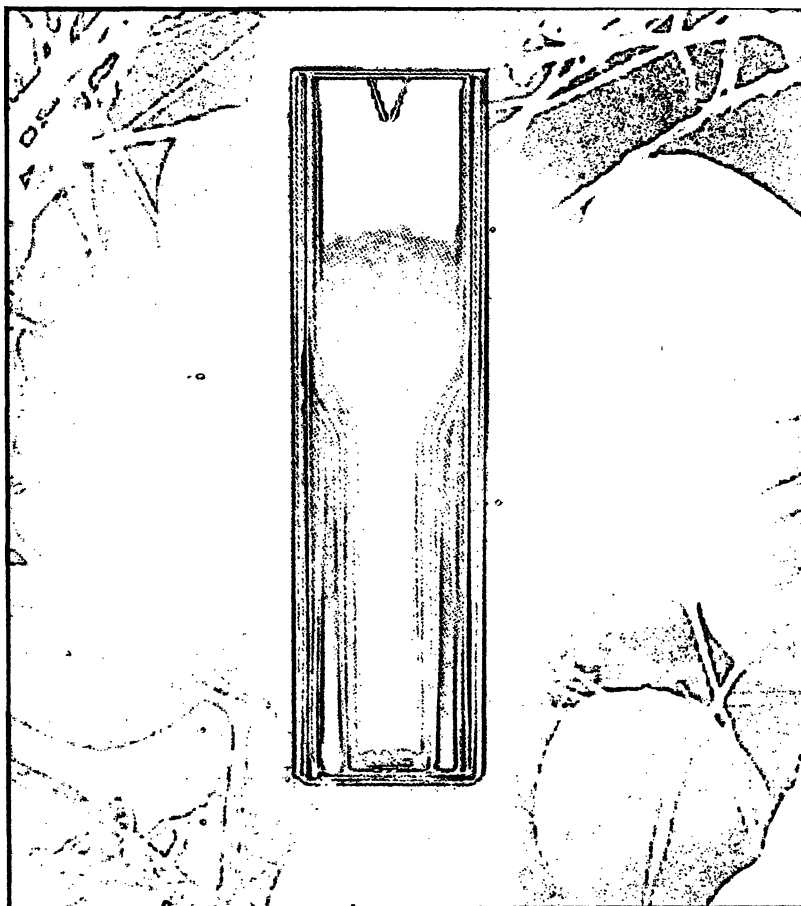
<sup>1</sup> Korrespondenz-Anschrift.

# Für Ihr Labor:

## Chromogene Substrate, eine zeitgerechte Methode in der Gerinnungsanalytik.

### Berichrom®

Antithrombin III  
Plasminogen  
 $\alpha_2$ -Antiplasmin



Zur Kontrolle des Testsystems

Normalbereich: Kontrollplasma N für Berichrom®.

Pathologischer Bereich: Kontrollplasma P für Berichrom®.

#### Das spricht für Berichrom®:

Präzise Gerinnungsanalysen am Photometer.

Direkte Aktivitätsmessung in kürzester Zeit.

Arbeiten im homologen Testsystem mit humanem  $\alpha$ -Thrombin.

Gebrauchsfertige Reagenzien, keine Verdünnung nötig, mehrfaches Einfrieren möglich.

Manuelle Zweipunktmethode und kinetische Messung.

Adaption an Analysenautomaten möglich.

Gleicher Testansatz für drei Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C).

Laborgerechte Pipettierschemata.

Auswertung in Prozent der Norm oder Internationalen Einheiten (I.U.).

Praxisgerechte Packungsgröße.

### Berichrom®

## BEHRING DIAGNOSTIKA



Behringwerke AG · Medizinische Information und Vertrieb · Postfach 800280 · 6230 Frankfurt am Main 80

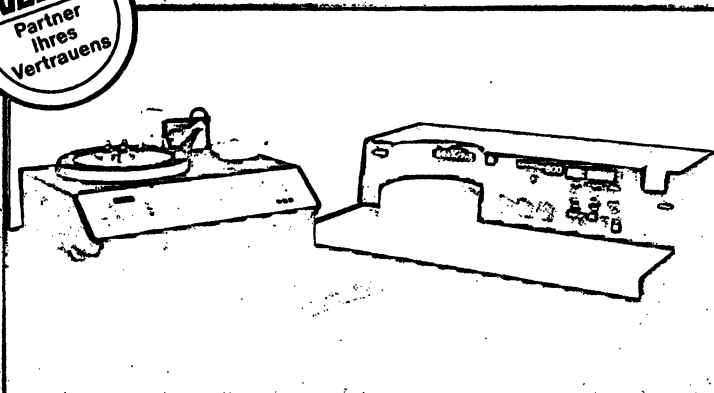
Ln 00452b

# CentrifiChem® 600 Selektiv



Für das neue Centrifi-Chem-System steht Ihnen die Firma **VOGEL** medizinische Technik und Elektronik in der Bundesrepublik Deutschland und Westberlin zur Verfügung.

Bitte fordern Sie Informationsmaterial an.



## Medizinische Technik und Elektronik

Marburger Straße 81 · Postfach 65 26 · 6300 Gießen · Tel. (06 41) 8 40 52

## LABORATORIUMS MEDIZIN

vereinigt mit **Das Medizinische Laboratorium**

Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin e.V.

Offizielles Organ des Berufsverbandes Deutscher Laborärzte e.V.

Offizielles Organ der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin

Offizielles Organ des Institutes für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e.V. (INSTAND e.V.)

Einladung  
zum  
Abonnement



Bitte senden Sie mir ab sofort 2 Ausgaben von LABORATORIUMSMEDIZIN, vereinigt mit „Das Medizinische Laboratorium“, für mich kostenlos zur Probe.

Gebe ich Ihnen 10 Tage nach Erhalt des zweiten Heftes keine gegenteilige Nachricht, bin ich mit der regelmäßigen Weiterbelieferung bis auf Widerruf einverstanden.

Ich zahle dann den Abonnentenpreis von DM 8,30 pro Ausgabe einschl. Porto-kosten und MWSt.

Ich nehme Ihr Angebot an und möchte die Probehefte an folgende Anschrift erhalten:

Name \_\_\_\_\_

Straße \_\_\_\_\_

PLZ \_\_\_\_\_

Ort \_\_\_\_\_

Datum \_\_\_\_\_

Unterschrift **X**

Sie garantieren mir, daß ich diese Vereinbarung innerhalb einer Woche durch Mitteilung an den Verlag (Anschrift nebenstehend) widerrufen kann. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

**X**

Datum und Unterschrift \_\_\_\_\_

Lab. med. 2/84

Wir laden Sie ein, diese Fachzeitschrift für 2 Monate kostenlos kennenzulernen.

Sie brauchen den ausgefüllten Coupon nur im unverschlossenen Umschlag mit 70 Pfg. frankiert zur Post zu geben und zu adressieren an:

Verlag Kirchheim + Co GmbH  
Postfach 25 24  
D-6500 Mainz 1

Sie erhalten umgehend Ihr erstes Heft.

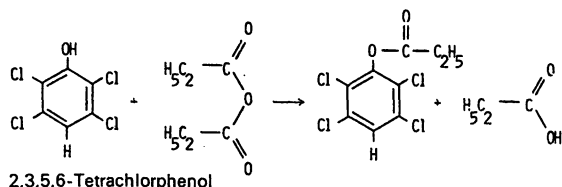
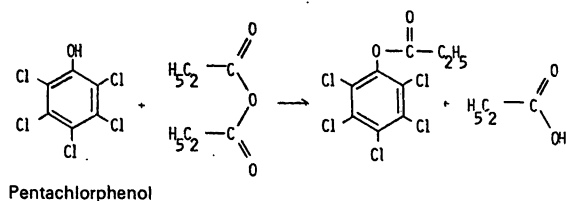


Abb. 1: Umsetzung von PCP durch eine Propionsäureanhydrid-Äthylacetat-Lösung zum entsprechenden Propionyl-derivat

zur Trockene eingedampft. 2 ml des zu untersuchenden Urins werden hinzugegeben und anschließend mit 0,4 ml 20%iger Perchlorsäure versetzt. Werden Werte oberhalb des linearen Meßbereichs bestimmt, wird der Probenurin 1:4 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach kurzem Schütteln werden 3 ml n-Hexan zur Extraktion der Probe hinzugefügt. Das durch einen Stopfen verschlossene Zentrifugenröhrchen wird 5 min lang intensiv geschüttelt und anschließend 2 min bei 450 g zentrifugiert. Die organische Phase wird in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt.

#### Derivatisierung

Der Extrakt wird mit 2 ml gesättigter Na-Carbonatlösung versetzt und kurz aufgeschüttelt. Zur Propionylierung werden 2 ml einer Lösung von 5% Propionsäureanhydrid in Äthylacetat zugesetzt.

Nach fünfminütigem Schütteln und Erwärmung der Probe auf 50°C wird kurz zentrifugiert und die organische Phase abgehoben. Die Flüssigkeit wird unter schwachem N<sub>2</sub>-Strom und Erwärmung auf 40–50°C zur Trockene eingedampft, in 0,1 ml n-Hexan aufgenommen und 1 µl davon in den Gaschromatographen injiziert.

#### Gaschromatographie

Gerät: Siemens Gaschromatograph, Serie L 350 mit gepulstem Elektroneneinfangdetektor (ECD), 10 mCi Ni<sup>63</sup> β-Ionisationsquelle.

Temperaturprogramm: 145–230°C, Rate: 1,5°C/min. Detektor- und Injektortemperatur: 300°C.

Säule: 25 m lange WGA-Quarztrennkapillarsäule, Silicon OV-1 der Fa. WGA.

Trärgas: Stickstoff, N<sub>2</sub>, 2 bar.

Split: Splitlose Injektion.

Standardlösung: Eine Lösung mit je 1 ng TCP und PCP/µl n-Hexan angesetzt und derivatisiert.

### Ergebnis und Diskussion

Die gaschromatographische Bestimmung von PCP zeigte eine lineare Eichgerade für Konzentrationen von 0–200 ng/ml

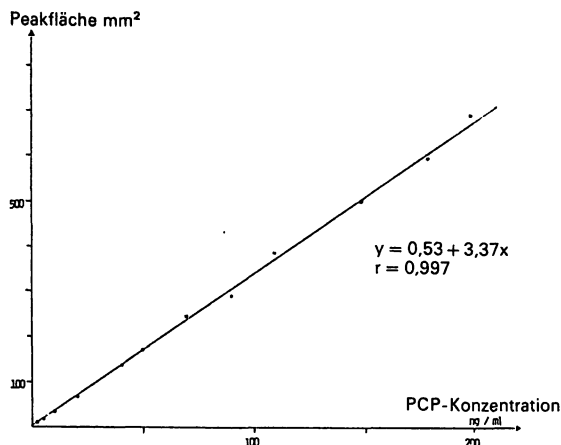


Abb. 2: Eichgerade für Konzentrationen von 0–200 ng PCP/ml Urin

Urin (Abb. 2). Nach den Ergebnissen der Eichwerte ergab sich für PCP eine Regressionsgerade  $y = 0,53 + 3,37x$ .

Der Variationskoeffizient (VK) bei 50 ng/ml Urin beträgt 3,2% (n = 7). Ein Chromatogramm der Standardlösung ist in Abb. 3 dargestellt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag für PCP bei 98%, für den internen Standard TCP bei 97,6%.

Als Nachweisgrenze ergab sich ein minimaler PCP-Gehalt von 2,5 ng/ml Urin. Da dieser Wert zuverlässig bestimmbar ist und dem in der Literatur (6) angegebenen Minimalgehalt für PCP im Urin Nichtexponierter entspricht, wurde auf eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze verzichtet, die jedoch technisch möglich ist.

Zur Überprüfung der Präzision von Tag zu Tag wurden über 2 Wochen der PCP-Gehalt der gleichen gespickten Urinprobe bestimmt sowie verschiedene mit gleichen PCP Mengen gespickte Urinproben verschiedener Personen an aufeinander folgenden Tagen gemessen. Dabei ergaben sich Werte für VK von 2,2% bzw. 3,9%. Das Chromatogramm von gespicktem Urin ist in Abb. 4 dargestellt.

Urinproben von Exponierten als Vergleich zu Nichtexponierten wären unsererseits vorgezogen worden, sind jedoch zur Zeit kaum zu erhalten. Die Überprüfung der Spezifität der Methode erfolgte durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Seit der Einführung von MAK-Werten sind die als medizinisch vertretbar angesehenen Arbeitsplatzkonzentrationen an chemischen Schadstoffen ständig abgesunken. Dies gilt auch für halogenierte aromatische Verbindungen, die als Pestizide, Fungizide und Herbizide verwandt werden.

Bis 1978 wurden steigende Mengen dieser Substanzen produziert und industriell und landwirtschaftlich angewendet. Aufgrund des weiten Anwendungsgebietes werden beruflich nicht Exponierte – wenn auch in geringem Ausmaß – mit diesen Substanzen belastet. Bis heute liegen nur wenige gesicherte Erkenntnisse über den Synergismus verschiedener Schadstoffe vor, die additive, kumulative und potenzierende Schädigungseffekte haben können.

Somit kommt einfachen und empfindlichen Verfahren zur Bestimmung der Schadstoffbelastung steigende Bedeutung zu. Während die Messung der Umweltkonzentrationen kaum Schwierigkeiten bereitet – der derzeitige MAK-Wert für PCP beträgt 0,5 mg/m<sup>3</sup> (9) – müssen wenig belastende, personenbezogene Überwachungsuntersuchungen entwickelt werden, die Aussagen über die Aufnahme und Kumulation

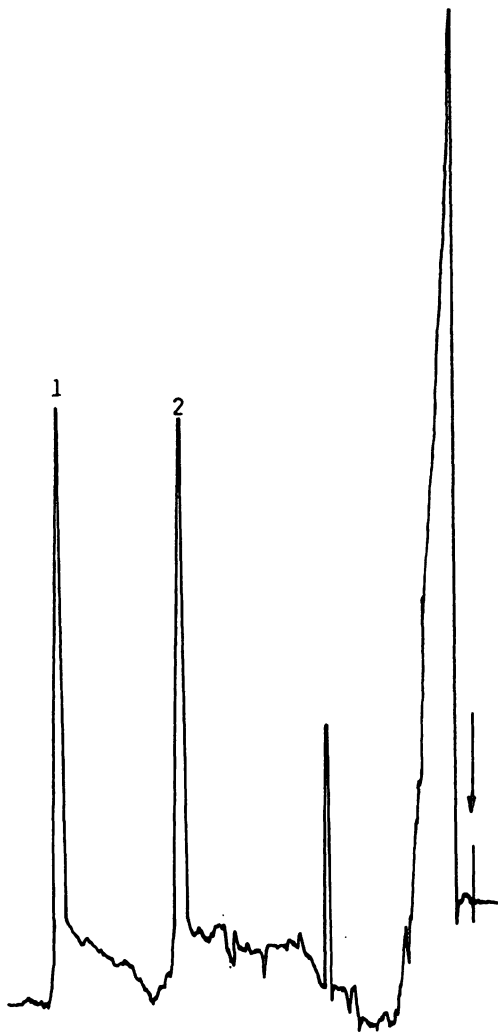


Abb. 3: Gaschromatogramm von Standardlösung mit je 1 ng TCP- (2) und PCP-propionyl-Derivat (1)

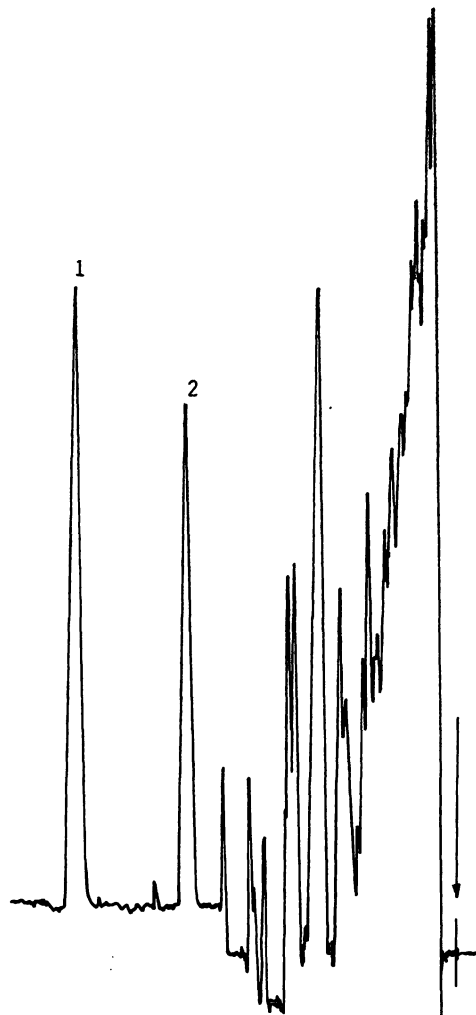


Abb. 4: Gaschromatogramm von gespicktem Urin mit je 50 ng TCP und PCP/ml. TCP- (2) und PCP-propionyl-Derivat (1)

dieser Stoffe erlauben. Deshalb ist die Urinanalyse ein sehr geeignetes Verfahren zur Überwachung der exponierten Personen als biological monitoring. Aufgrund der Empfindlichkeit dieses Verfahrens eignet sich diese Methode zur Untersuchung von PCP-exponierten Personen und erlaubt den PCP-Gehalt im Urin auch wenig Exponierter zuverlässig zu bestimmen. Die benötigten Reagentien, die zu untersuchenden Urinproben und die propionylierte Trockensubstanz können über einen langen Zeitraum bei Kühlschranktemperaturen aufbewahrt werden.

Die bisher benutzten Verfahren sind entweder sehr zeitaufwendig (2) oder verwenden gefährliche (explosive) Substanzen (1). Das hier beschriebene Verfahren bietet den Vorteil einer einfachen und ungefährlichen Aufarbeitung bei vergleichbaren Ergebnissen für Wiederfindung und Präzision.

#### Schrifttum:

1. GOSSLER, K., SCHALLER, K. H.: Eine gaschromatographische Methode zur quantitativen Bestimmung von Pentachlorphenol in Urin und Plasma. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 290, 111–112 (1973).
2. SACHMAUEROVÁ-VENINGEROVÁ, M., UHNÁK, J., SZOKOLAY, A. et al.: Identification of chlorinated phenols as degradation products of chlorinated pesticides in biological materials. *J. Chromatogr. (Amst.)* 205, 194–198 (1981).

3. BARTHEL, W. F., CURLEY, A., THRASHER, C. L., SEDLAK, V. A., AMSTRONG, R.: Determination of pentachlorophenol in blood, urine, tissue and clothing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 2, 294–298 (1969).
4. SUSANTO, F.: Schnelle Differenzierung von fast 600 Arzneimitteln, Rauschmitteln und Organophosphaten durch den kombinierten Einsatz von GC und HPLC. *Zentralblatt für die gesamte Rechtsmedizin und ihre Grenzgebiete*, 20, 19 (1980) (Abstr.).
5. DALDRUP, T. F., SUSANTO, F., MICHALKE, P.: Kombination von DC, GC (OV1 und OV 17) und HPLC (RP 18) zur schnellen Erkennung von Arzneimitteln, Rauschmitteln und verwandten Verbindungen. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 308, 413–427 (1981).
6. KAUERT, G., HIEMKE, C., KALBHEN, D. A.: Gaschromatographische Untersuchungen biogener Amine in Form ihrer Acetyl-, Propionyl-, m-Butyryl-, iso-Butyryl- und Pivalrylderivate. *Chromatographia* 12, 226–230 (1979).
7. LAUWERYS, R.: Biological Criteria for selected industrial toxic chemicals: A review. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 1, 139–172 (1975).
8. KAUERT, G., MEYER, S. V., DRASCH, G.: Die extraktive Derivatisierung von Urin zum Screening auf Arzneistoffe mit GC oder GC-MS. *Deutsche Apotheker Zeitung* 38, 2014–2016 (1981).
9. Mitteil. XVIII der Senatskommission z. Prüf. ges. schädli. Arbeitsstoffe v. 16. Juli 1982.

#### Anschrift der Verfasser:

Dr. med. F. Susanto  
Diabetes-Forschungsinstitut  
an der Universität Düsseldorf  
Biochemische Abteilung  
Auf'm Hennekamp 65  
D-4000 Düsseldorf