

Einfache Urinaufarbeitung zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Pentachlorphenol (PCP)

F. Susanto¹ und P.-J. Jansing²

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

² Institut für Arbeitsmedizin an der Universität Düsseldorf und Staatlicher Gewerbeamt 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-Äthylacetat-Lösung in alkalischer Milieo 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 Lauwers (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-

lische 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 N₂-Strom

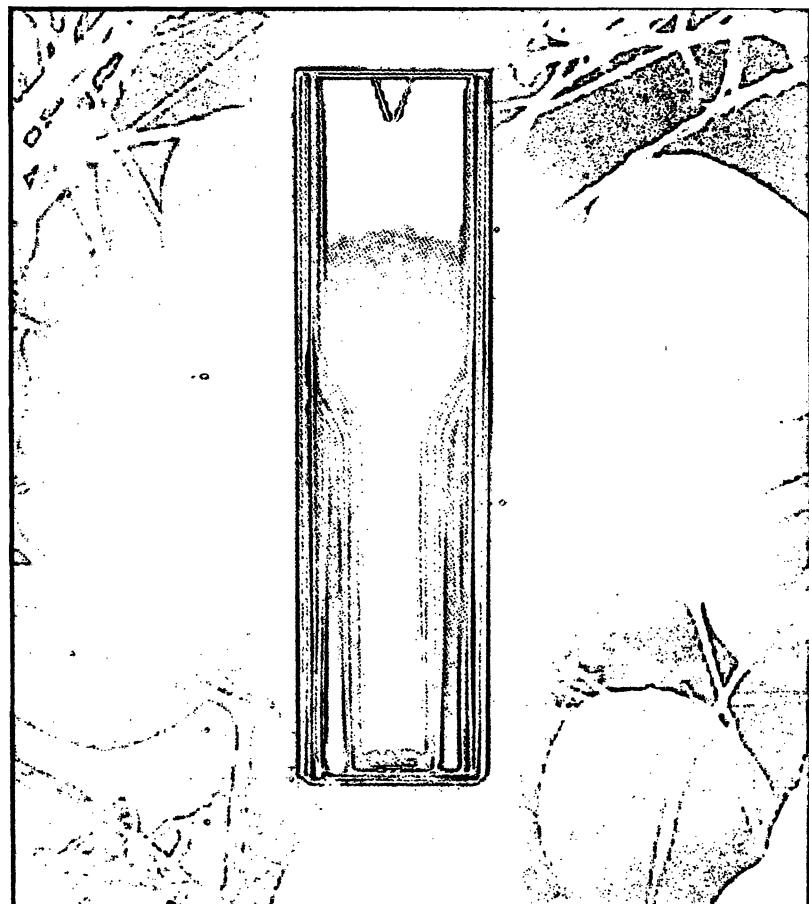
¹ Korrespondenz-Anschrift.

Für Ihr Labor:

Chromogene Substrate, eine zeitgerechte
Methode in der Gerinnungsanalytik.



Antithrombin III
Plasminogen
 α_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
 α -Thrombin.

Gebrauchsfertige Reagenzien,
keine Verdünnung nötig, mehrfaches
Einfrieren möglich.

Manuelle Zweipunktmethode
und kinetische Messung.

Adaption an Analysenauto-
maten 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 Packungs-
größe.

Berichrom®

BEHRING DIAGNOSTIKA

Behringwerke AG · Medizinische Information und Vertrieb · Postfach 800 280 · 6230 Frankfurt am Main 80

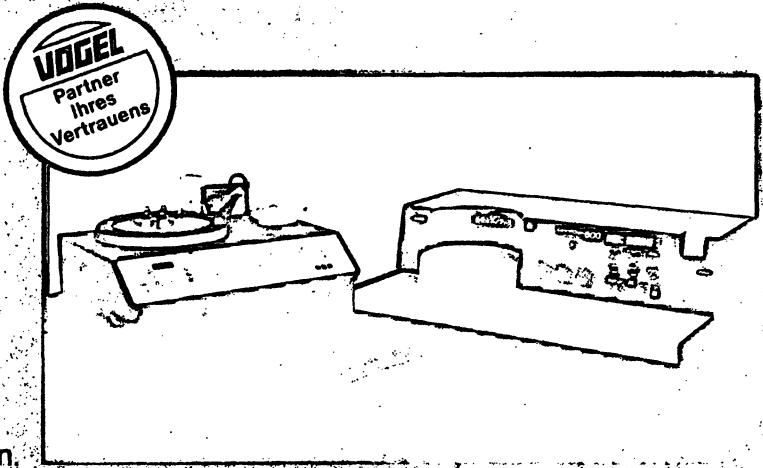
BEHRING
Gesellschaft

CentriflChem® 600 Select

baker
INSTRUMENTS

Für das neue CentriflChem-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 Abonnementpreis 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 Fachzeit-
schrift für 2 Monate kostenlos
kennenzulernen.

Sie brauchen den ausgefüllten
Coupon nur im unverschlosse-
nen Umschlag mit 70 Pfg. fran-
kiert zur Post zu geben und zu
adressieren an:

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

Sie erhalten umgehend Ihr er-
stes Heft.

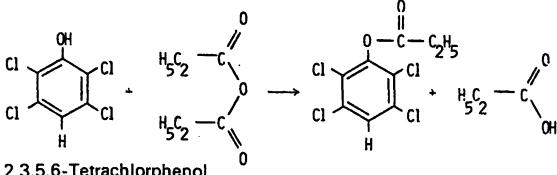
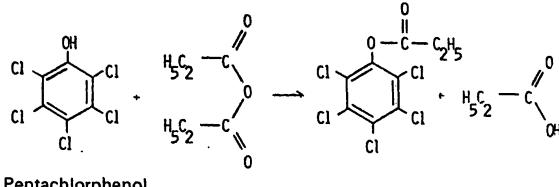


Abb. 1: Umsetzung von PCP durch eine Propionsäureanhydrid-Äthylacetat-Lösung zum entsprechenden Propionyl-derivat

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 H₂O verdünnt. Nach kurzem Schütteln werden 3 ml n-Hexan zur Extraktion der Probe hinzugefügt. Das durch einen Stopfen verschlossene Zentrifugenröhren wird 5 min lang intensiv geschüttelt und anschließend 2 min bei 450 g zentrifugiert. Die organische Phase wird in ein weiteres Zentrifugenröhren 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 N₂-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 Ni⁶³ 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.

Trägergas: Stickstoff, N₂, 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

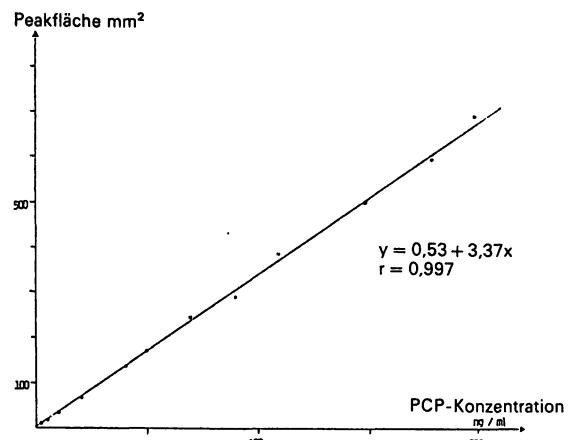


Abb. 2: Eichgerade für Konzentrationen von 0–200 ng PCP/ml Urin

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 gespikten Urinprobe bestimmt sowie verschiedene mit gleichen PCP Mengen gespeckte Urinproben verschiedener Personen an aufeinander folgenden Tagen gemessen. Dabei ergaben sich Werte für VK von 2,2% bzw. 3,9%. Das Chromatogramm von gespiktem 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/Massenpektrometrie. 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 Anwendungsbereiches 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 potenziierende 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/m³ (9) – müssen wenig belastende, personenbezogene Überwachungsuntersuchungen entwickelt werden, die Aussagen über die Aufnahme und Kumulation

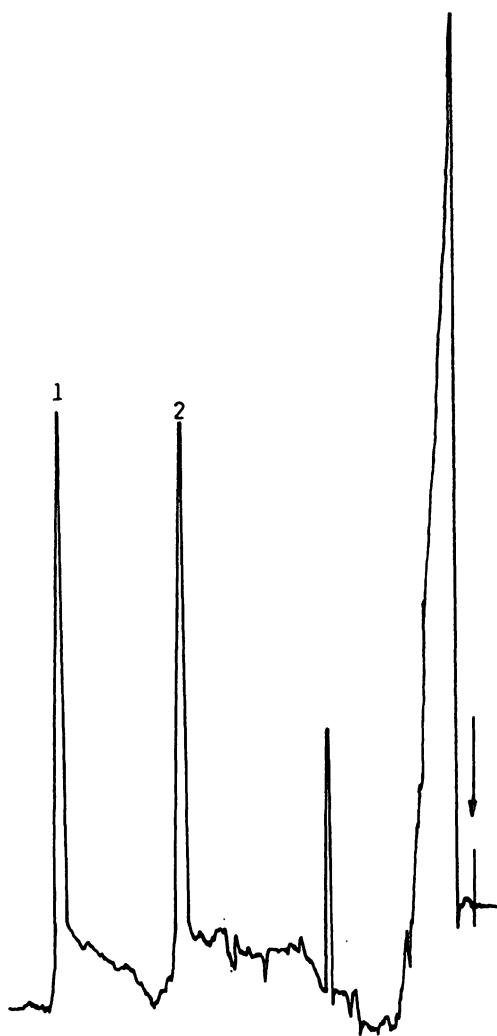


Abb. 3: Gaschromatogramm von Standardlösung mit je 1 ng TCP- (2) und PCP-propionyl-Derivat (1)

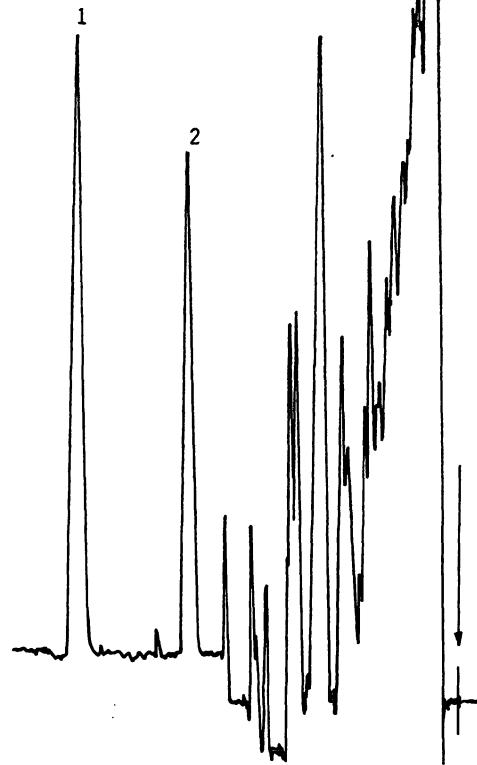


Abb. 4: Gaschromatogramm von gespiktem Urin mit je 50 ng TCP und PCP/ml. TCP- (2) und PCP-propionyl-Derivat (1)

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 Reagenzien, die zu untersuchenden Urinproben und die propionyierte Trockensubstanz können über einen langen Zeitraum bei Kühlsschranktemperaturen 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.

Schriftum:

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 chlorinate 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, 294–299 (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).

7. KAUERT, G., HIEMKÉ, C., KALBHEN, D. A.: Gaschromatographische Untersuchungen biogener Aminen in Form ihrer Acetyl-, Propionyl-, m-Butryl-, iso-Butyryl- und Pivalylderivate. Chromatographia 12, 226–230 (1979).

6. 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. schädl. 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