

Biomonitoring von Einsatzkräften der Zentralen Polizeidirektion Hannover nach möglicher akzidenteller Exposition gegenüber Epichlorhydrin (Bad Münder, 09.09.2002)

Nachuntersuchung der Proben mittels GC-MS/MS

- Bericht -

M. Bader¹, R. Wrbitzky¹,
D. Tsikas², D.O. Stichtenoth²

¹ Abteilung Arbeitsmedizin, MHH

² Abteilung Klinische Pharmakologie, MHH

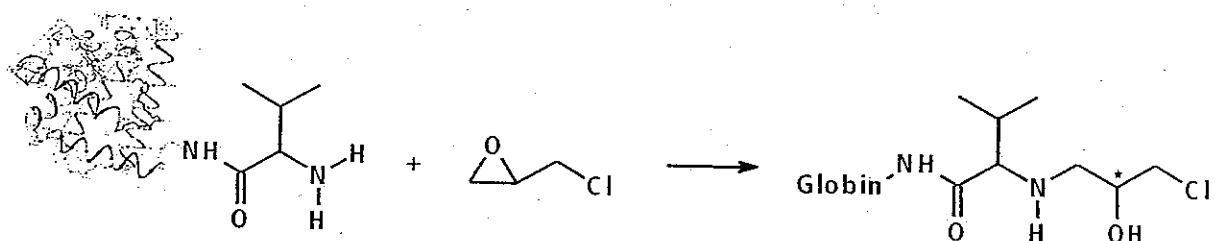
1 Einleitung

Epichlorhydrin (ECH, CAS-Nr. 106-89-8) ist ein unter Normalbedingungen farb- und geruchloses Gas, das von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als krebserzeugend in die Kategorie 2 eingestuft ist ("Stoffe, die als krebserzeugend für den Menschen anzusehen sind, weil durch hinreichende Erkenntnisse aus Langzeit-Tierversuchen oder Hinweise aus Tierversuchen und epidemiologischen Untersuchungen davon auszugehen ist, dass sie einen nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko leisten.") (DFG 2006).

Am 09. September 2002 wurden in Bad Münden (Deister) durch einen Zugunfall mehr als 30 Tonnen Epichlorhydrin (ECH) freigesetzt. Zur Sicherung der Unfallstelle waren insgesamt 55 Beamte der Landespolizei im Einsatz. Im Rahmen einer Biomonitoring-Untersuchung war zu prüfen, ob bei den Einsatzkräften eine innere Belastung mit Epichlorhydrin nachgewiesen werden kann, die als Nachweis einer Exposition im Zusammenhang mit dem Bahnunfall in Bad Münden zu interpretieren ist.

Als Untersuchungsparameter wurde *N*-(3-Chlor-2-hydroxypropyl)-Valin (CHPV) im Erythrocyten analysiert. CHPV entsteht als sogenanntes "Primäraddukt" durch die kovalente Bindung von Epichlorhydrin an die in allen vier Globinketten des Hämoglobins endständige (*N*-terminale) Aminosäure Valin (Abb. 1). Aus dem Primäraddukt CHPV können durch Hydrolyse und weitere Nebenreaktionen Folgeprodukte gebildet werden (Hindso Landin 2000). Da das CHPV jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand spezifisch für ECH ist, wurde das Primäraddukt als Zielparameter des Biomonitoring ausgewählt (s. Bericht an die Bezirksregierung Hannover vom 18. September 2003).

Abb. 1: Bildung von CHPV aus der kovalenten Bindung von ECH an Globin



2 Probenahme und Lagerung

Die Probenahme des biologischen Materials (N = 55 Personen) erfolgte in der Poliklinik der Abteilung Arbeitsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover im Zeitraum zwischen dem 17.09.2002 und dem 17.12.2002, d.h. in einem Intervall von acht Tagen bis maximal fünfzehn Wochen nach dem Gefahrgutunfall (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht der Probenahmezeitpunkte und Anzahl untersuchter Personen

| Datum | Anzahl Personen | Datum | Anzahl Personen | Datum | Anzahl Personen |
|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| 17.09.2002 | | 26.09.2002 | | 29.10.2002 | |
| 18.09.2002 | | 27.09.2002 | | 30.10.2002 | |
| 19.09.2002 | | 09.10.2002 | | 17.12.2002 | |
| 20.09.2002 | | 18.10.2002 | | Gesamtzahl | 55 |

Den Untersuchungsteilnehmern wurden jeweils zwei EDTA-stabilisierte Vollblutproben (2 x 7,5 mL) mittels Einmalbesteck entnommen; darüber hinaus wurde jeweils eine Spontanurinprobe gesammelt und in eine 10 mL-Urinmonovette überführt.

Die Proben wurden zunächst im Kühlschrank der Poliklinik bei 4°C gelagert und nach maximal zwei Stunden in das Biomonitoring-Labor der Abteilung Arbeitsmedizin überführt. Aus je einer der Blutproben wurde sofort eine Globinisolierung (ca. 300 - 400 mg) gemäß der abteilungsinternen Standardarbeitsanweisung "Isolierung von Globin aus EDTA-Blut" vom 13.09.2002 durchgeführt.

In einem Fall konnte aus der Ursprungsprobe nur eine geringe Menge Globin isoliert werden, so dass für die hier durchgeführte Nachuntersuchung keine ausreichende Proteinmenge zur Verfügung stand.

Prinzip des Verfahrens: Die Erythrocytenfraktion wird durch eine Zentrifugation vom Plasma separiert, mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und danach mit destilliertem Wasser lysiert. Zur Vervollständigung der Hämolyse wird die Probe bei -28°C für mindestens 24 h eingefroren. Zelluläre Bestandteile präzipitieren nach Zugabe

von saurem Isopropanol und werden durch eine Zentrifugation vom hämoglobinhaltigen Überstand getrennt. Die Globinfraction wird mit Ethylacetat ausgefällt. Nach wiederholter Resuspension des Proteins in Ethylacetat bzw. n-Heptan und Zentrifugation wird das Präzipitat im Vakuumexsikkator getrocknet und bei -80°C gelagert.

Der Plasmaüberstand nach der ersten Zentrifugation wurde in eine neue EDTA-Monovette überführt und zusammen mit der zweiten, unbehandelten EDTA-Vollblutprobe und der Urinprobe bei -80°C zur Asservierung eingefroren. Von jedem Untersuchungsteilnehmer wurden somit ca. 300 - 400 mg Globinpräzipitat, 5 mL Erythrocytenlysat, 3 mL Plasma, 7,5 mL Vollblut sowie 8 mL Spontanurin asserviert.

3 Probenaufarbeitung und analytische Bestimmung

Zur Analyse der Proteinaddukte des Epichlorhydrins wurden die Proteine einem sogenannten N-Alkyl-Edman-Abbau unterworfen. Das zugrunde liegende Verfahren ist in der Methodensammlung "Analysen in biologischem Material" der Deutschen Forschungsgemeinschaft als Standardarbeitsanweisung beschrieben (DFG 1996) und wurde zur Analyse von CHPV adaptiert (Bader et al. 2007).

Prinzip des Verfahrens: Etwa 100 mg Globin werden in Formamid gelöst und nach Zugabe von Natriumhydroxid, Pentafluorphenylisothiocyanat und internem Standard (d_5 -ECH-markiertes Globin) für ca. 16 h bei Raumtemperatur durchmischt. Anschließend erfolgt eine Temperierung der Proben für 90 min bei 45°C, um die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure vom Globin und die Cyclisierungs- bzw. Umlagerungsreaktionen zum Pentafluorphenylthiohydantoin zu optimieren. Die Proben werden zweimal mit Diethylether extrahiert. Die Extrakte werden im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt, in Toluol aufgenommen, mit hochreinem Wasser und Natriumcarbonatlösung gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt. Durch Zugabe von Essigsäureanhydrid/Triethylamin wird die Hydroxypropylgruppe acetyliert. Anschließend wird die Derivatisierungslösung im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt, in n-Hexan aufgenommen und mit einer Methanol/Wasser-Mischung extrahiert und erneut zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 30 µL Toluol aufgenommen. 1 µL dieser Lösung wird mittels Gaschromatographie-Tandem-

Massenspektrometrie ("Triple-Quadrupol"-Technik) im Selected-Reaction-Monitoring- (SRM)-Modus analysiert. Zur externen Kalibrierung wird ein Dipeptidstandard, N-(3-Chlor-2-hydroxypropyl)-Valin-Leucin-anilid (Fa. Bachem, Schweiz), eingesetzt.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Arbeitsbedingungen:

Säule: Optima-1-MS, 30 m x 0,25 mm (0,25 µm Film), Ofenprogramm: 80°C, 1 min isotherm, 8°C/min → 340°C, 1 min isotherm, Injektor : 120°C, 10°C/s → 320°C, 4 min isotherm, Trägergas: Helium 5.0, 1 mL/min const., Ionenquelle: 180°C, Reaktandgas: Methan 5.5 (530 Pa), Ionisierungsenergie: 100 eV, Kollisionsgas: Argon 5.0 (0,27 Pa), Kollisionsenergie: 15 eV, Messzeit: 100 ms/Ion im SRM-Modus, Elektronenmultiplier: 2800 V.

Für die quantitative Auswertung wurde das Massenfragment $m/z = 301$ herangezogen (Abb. 2). Die Signalzuordnung und damit die analytische Identifizierung des CHPV erfolgte im Weiteren nach den Kriterien (mit absteigender Wichtigung):

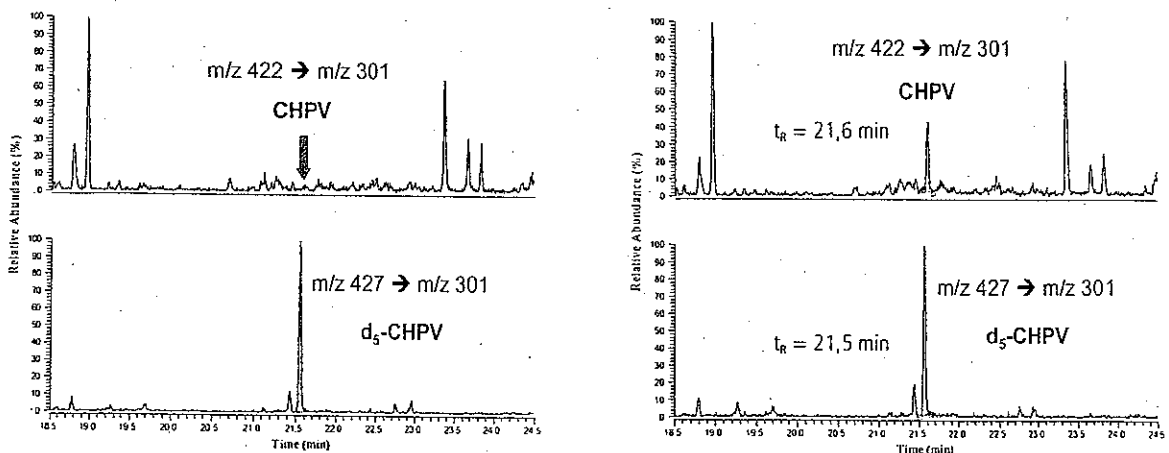
- 1) Chromatographische Retentionszeit R_t : Geprüft wurde die Übereinstimmung der Retentionszeit des ausgewerteten Signals (= Zeit zwischen Probeninjektion und Signal) mit der Retentionszeit des synthetischen CHPV aus den Kalibriergeraden.
- 2) Signal/Rausch-Verhältnis S/N : Als untere Grenze des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde ein Wert von 5 zugrunde gelegt.
- 3) Isomersignal: Durch das chirale Kohlenstoffatom am C2 des Adduktes werden bei Inkubation von Globin und ECH grundsätzlich zwei stereoisomere Addukte im Verhältnis von etwa 10 : 1 erhalten. Die Auswertung der Chromatogramme und die Ermittlung der analytischen Qualitätskriterien erfolgte auf der Basis des intensiveren Signals. Ein Nachweis des kleineren Isomersignals in einer Probe stützt die Analyse des CHPV qualitativ.

Die Methodvalidierung ergab folgende verfahrensspezifische Kenndaten:

| | |
|--|-------------------------|
| Nachweisgrenze (Kalibriergeradenverfahren nach DIN EN 32 645) | 10 pmol/g Globin |
| Bestimmungsgrenze (Kalibriergeradenverfahren nach DIN EN 32 645) | 25 pmol/g Globin |
| Präzision in der Serie (c = 100 pmol/g Globin, N = 9) | 10 % |
| Präzision von Tag zu Tag (c = 100 pmol/g Globin, N = 14) | 14 % |
| Vertrauensbereich (c = 100 pmol/g Globin, N = 14) | 30 % |

Als eindeutig nachgewiesen und quantifizierbar gelten demnach Adduktkonzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze von 25 pmol/g Globin. Ergebnisse zwischen der Nachweisgrenze (10 pmol/g Globin) und der Bestimmungsgrenze sind aus analytischer Sicht unsicher und daher nicht zur arbeitsmedizinisch-toxikologischen Bewertung geeignet (Kromidas 1999).

Abb. 2: GC-MS/MS-Chromatogramme einer **unbelasteten Referenz-Globinprobe** (links) und einer **Globinprobe mit einem Adduktgehalt von 25 pmol/g (Kalibrierstandard)** (rechts). In den oberen Chromatogrammen ist das Meßsignal des Zielparameters CHPV dargestellt, in den unteren Chromatogrammen das in allen Proben enthaltene Signal des internen Standards. In der unbelasteten Probe ist kein CHPV-Signal erkennbar (Leerwert).



4 Ergebnisse des Biomonitoring

In **zwei** der insgesamt 54 untersuchten Proben (in einem Fall war keine ausreichende Globinmenge für die hier durchgeführte Nachuntersuchung isolierbar gewesen) konnte CHPV als Addukt des Epichlorhydrins in einer Konzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze von 25 pmol/g Globin nachgewiesen werden. Die CHPV-Konzentration in diesen Probe betrug **30 bzw. 31 pmol/g Globin**. Zwei der unter Punkt 3 genannten Identifizierungskriterien (Retentionszeit, S/N-Verhältnis) waren in diesen Fällen erfüllt, die Probenahme erfolgte am [REDACTED] d.h. etwa eine Woche nach dem Gefahrgutunfall.

In weiteren 5 Proben wurden Messsignale beobachtet, die einer CHPV-Konzentration zwischen der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze entsprechen. In diesen Fällen ist eine Quantifizierung aus analytischer Sicht aufgrund des großen Fehlerintervalls nicht sinnvoll. Darüber hinaus sind nicht alle Identifizierungskriterien in diesen Proben durchgängig erfüllt, so dass die Signalzuordnung fehlerbehaftet sein kann. Daher wurde in diesen Fällen von einer quantitativen Auswertung abgesehen.

5 Zusammenfassung und Diskussion

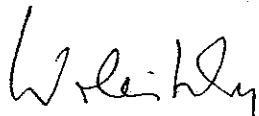
Das eingesetzte Biomonitoring-Verfahren entspricht hinsichtlich der nasschemischen Probenaufbereitung dem im Bericht an die Bezirksregierung Hannover vom 18. September 2003. Dieses Verfahren konnte durch die Verwendung eines GC-Tandem-MS („Triple-Quadrupol-Technik“) in seiner Spezifität verbessert und etwa um den Faktor 10 empfindlicher gemacht werden. Somit lassen sich Proteinaddukte des Epichlorhydrins bis zu einer Konzentration von 25 pmol/g Globin (Bestimmungsgrenze) quantitativ bestimmen. In diesem Bereich beträgt der relative Fehler einer Analyse definitionsgemäß 33 %. Die mittlere Nachweisgrenze des Verfahrens beträgt 10 pmol/g Globin. Analysenergebnisse zwischen der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze lassen sich aufgrund des großen relativen Fehlers nicht quantitativ interpretieren, so dass für den vorliegenden Bericht nur Ergebnisse oberhalb der Bestimmungsgrenze als Nachweis einer Exposition gegenüber Epichlorhydrin gewertet wurden.

Das im Rahmen der „Bad-Münder-Studie“ untersuchte *N*-(3-Chlor-2-hydroxypropyl)-Valin (CHPV) bildet sich nach derzeitigem Kenntnisstand spontan, d.h. ohne vorherige enzymatische Aktivierung des ECH, z.B. unter *in-vitro*-Bedingungen in Hämolysat aus Humanblut. Es ist davon auszugehen, dass diese Anbindung auch unter *in-vivo*-Bedingungen nach inhalativer Aufnahme von Epichlorhydrin stattfindet. Eine natürliche Expositionsquelle für ECH ist nicht bekannt, so dass der Nachweis des CHPV im Sinne einer Exposition im Zusammenhang mit dem Gefahrgutunfall in Bad Münder interpretiert werden kann.

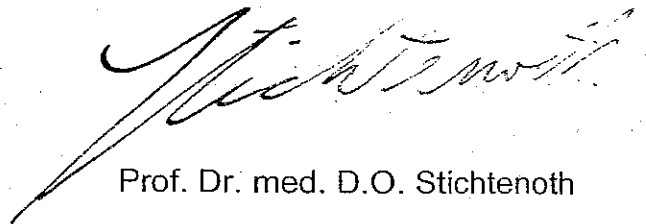
Dieser Nachweis war in insgesamt zwei der 54 untersuchten Proben positiv. Diese Personen waren nach eigenen Angaben zur Evakuierung und Absperrung zeit- und ortsnah am Unfallgeschehen eingesetzt:

| | Beginn der Tätigkeit ██████████ | Ende der Tätigkeit am ██████████ | mittlere Entfernung vom Tankwaggon ca. |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| ██████████ | ██████████ | ██████████ | 50 m (1 h), dann 500 – 2000 m |
| ██████████ | ██████████ | ██████████ | 50 m, dann 150 m |

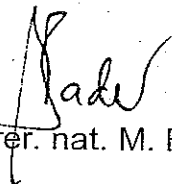
Hannover, den 19.06.2007



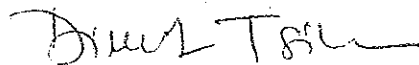
Prof. Dr. med. R. Wrbitzky



Prof. Dr. med. D.O. Stichtenoth



Dr. rer. nat. M. Bader



PD Dr. rer. nat. D. Tsikas

Literatur

Bader M, Rosenberger W, Gutzki FM, Tsikas D, Stichtenoth DO, Wrbitzky R (2007) Gaschromatographisch-massenspektrometrisches Verfahren zur Untersuchung von Hämoglobinaddukten für das Biomonitoring von Epichlorhydrin. Posterpräsentation. 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. (DGAUM), 21.-24. März 2007, Mainz

Bericht an die Bezirksregierung Hannover vom 18. September 2003. Autoren: M. Bader, W. Rosenberger, R. Wrbitzky. Gutachten über die Biomonitoringbefunde von Einsatzkräften der Bezirksregierung Hannover nach akzidenteller Exposition gegenüber Epichlorhydrin durch den Zugunfall in Bad Münden am 09.09.2002

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (1996) *N*-2-Cyanoethylvalin, *N*-2-Hydroxyethylvalin, *N*-Methylvalin. in: Greim H (Hrsg.), Angerer J, Schaller KH (Bearb.) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2. Analysen in biologischem Material. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Loseblattsammlung, 12. Lfg., Wiley-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2006) MAK- und BAT-Werte-Liste 2006. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 42, Wiley-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Hindso Landin H (2000) Biomonitoring of Epichlorohydrin and some related compounds. Dissertation. Department of Molecular Genome Research, Stockholm University, Sweden

Kromidas S (1999) Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim