

Abschlußbericht

zum Projekt

**„Biological Monitoring von Epichlorhydrin: individuelle
Hämoglobinaddukte und hGSTT1-1-Aktivitäten“**

**Prof. Dr. med. E. Hallier und PD Dr. rer. nat. M. Müller
Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin der Georg-August-Universität Göttingen**

Zusammenfassung

Im Rahmen des mehrphasigen Untersuchungsprogramms zur Gesundheitsfolgenabschätzung des Bahngefahrgutunfalls in Bad Münde wurde das Projekt „Biological Monitoring von Epichlorhydrin: individuelle Hämoglobinaddukte und hGSTT1-1-Aktivitäten“ durchgeführt.

Hierzu wurde eine neue für Felduntersuchungen geeignete Methode zur Bestimmung des ECH-spezifischen Hämoglobinadduktes *N*-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV) mit einer Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin entwickelt und validiert. Als Summenparameter deckt DHPV die drei möglichen Reaktionswege des Epichlorhydrins mit menschlichem Hämoglobin vollständig ab und erscheint daher zur Messung als toxikologischer Endpunkt besonders geeignet.

Insgesamt wurden 409 Globine unter Beachtung einer internen Qualitätssicherung untersucht, davon stammten 328 aus unmittelbar nach dem Unfallgeschehen im Herbst 2002 gewonnenen Hämolysaten und 81 aus im März / April 2003 gewonnenen Hämolysaten. Von 409 analysierten Proben waren 406 Datensätze auswertbar; 3 Proben konnten trotz mehrfacher Untersuchungen aufgrund einzelprobenspezifischer Störungen nicht ausgewertet werden. Keines der 406 analysierten und ausgewerteten Globine wies eine Belastung auf (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Lagerungsversuche mit modifiziertem Nichtraucherhämolysat und isoliertem Globin zeigten keine lagerungsbedingten Verluste des DHPV-Adduktes über eine Lagerungszeit von 4 bzw. 6 Monaten. Im Vergleich zum unmittelbar strukturverwandten Ethylenoxid läßt sich die Abwesenheit belasteter Proben bei einer analytischen Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin dahingehend deuten, daß eine mögliche Exposition auf jeden Fall unterhalb der unvermeidbaren endogenen Exposition des Menschen gegen Ethylenoxid (37 - 75 pmol *N*-Hydroxyethylvalin/g Globin) liegt.

Die humane Glutathion-S-Transferase T1 (hGSTT1-1) ist eines der wichtigsten Enzyme für die Verstoffwechslung von industriell genutzten Chemikalien. Von ihr umgesetzte Chemikalien sind z.B. wichtige Schädlingsbekämpfungsmittel, Lösungsmittel und Ausgangsstoffe der Kunststoffherstellung. Aufgrund von Strukturanalogien darf davon ausgegangen werden, daß auch Epichlorhydrin von der hGSTT1-1 metabolisiert wird. Im Rahmen des Projektes wurden von 292 Personen die individuellen hGSTT1-1-Aktivitäten bestimmt und die kompletten Datensätze dem NLGA zur umweltepidemiologischen Auswertung und zur Befundmitteilung übermittelt.

1.6 Kooperationspartner

Blutabnahme und Logistik (Vorphase zum beantragten Vorhaben):

Fachbereich Gesundheit des Landkreises Hameln-Pyrmont (Amtsärztin Fr. Dr. Tödt)

Unterauftrag zur Probenkonditionierung: Blutspendedienst Springe

Externe Qualitätssicherung (Interlaborvergleich):

Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover (Abteilungsmitglied: Prof. Dr. med. R. Wrbitzky, Laborleiter: Dr. rer. nat. M. Bader)

- Umweltepidemiologie: NLGA, Abteilung „Umweltmedizin, Umwelthygiene und Umweltepidemiologie“

2 Projektverlauf

Im folgenden wird der Verlauf des Projektes anhand einzelner Punkte dargestellt.

2.1 Probenahme, Probentransport, Probeneingang

Im Zeitraum vom 10.03.2003 bis 02.04.2003 wurden von 333 Personen vom Fachbereich Gesundheit des Landkreises Hameln-Pyrmont (Amtsärztin Fr. Dr. Tödt) Blutproben für die Hämoglobinadduktbestimmung gewonnen, hieraus vom Blutspendedienst Springe Hämolysate hergestellt, diese eingefroren und über eine Kühlkette an die Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin der Georg-August-Universität Göttingen geliefert. Die weitere Lagerung der Hämolysate erfolgte bei -80°C .

Parallel dazu wurden von 333 Personen vom Fachbereich Gesundheit des Landkreises Hameln-Pyrmont (Amtsärztin Fr. Dr. Tödt) Blutproben für die hGSTT1-1-Phänotypisierung gewonnen. 41 dieser Proben wurden vom Blutspendedienst Springe versehentlich eingefroren und damit für die weitere Analyse unbrauchbar, 292 Proben wurden wie vorgesehen bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 48 Stunden in die Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin der Georg-August-Universität Göttingen gebracht.

Am 04.02.2004 wurden 328 im Herbst 2002 zur Hämoglobinadduktbestimmung gewonnene und bei -20°C im NLGA gelagerte Hämolysate über eine Kühlkette an die Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin der Georg-August-Universität Göttingen geliefert. Der Eingang aller Proben wurde dokumentiert (Probeneingangsbücher) und entsprechende Auszüge der Probeneingangsbücher in Kopie dem NLGA übermittelt.

2.2 hGSTT1-1-Phänotypisierung

Die humane Glutathion-S-Transferase T1 (hGSTT1-1) ist eines der wichtigsten Enzyme für die Verstoffwechslung von industriell genutzten Chemikalien. Von ihr umgesetzte Chemikalien sind z.B. wichtige Schädlingsbekämpfungsmittel, Lösungsmittel und Ausgangsstoffe der Kunststoffherstellung. Aufgrund von Strukturanalogien darf davon ausgegangen werden, daß auch Epichlorhydrin von der hGSTT1-1 metabolisiert wird.

Abhängig von ihrem Erbgut unterscheiden sich die Menschen in ihren hGSTT1-1-Aktivitäten. 10 - 22 % der europäischen Bevölkerung verfügen über eine geringe, 44 - 50 % über eine mittlere und 33 - 43 % über eine hohe hGSTT1-1-Aktivität.

Im allgemeinen trägt die menschliche hGSTT1-1-Aktivität neben einer Vielzahl von anderen Enzymen zur Entgiftung des Körpers von Fremdstoffen bei. Die Bedeutung einer geringen oder hohen hGSTT1-1-Aktivität kann immer nur im Zusammenhang mit anderen Befunden und auf den jeweiligen Stoff bezogen interpretiert werden.

Direkt nach dem Probeneingang wurde aus einem Aliquot jeder Blutprobe der Hämoglobingehalt bestimmt (Merckotest[®] Hämoglobin). Aus den verbleibenden Proben wurde Erythrozytenlysate hergestellt (Müller et al. 2002) und bei -80°C gelagert.

292 Personen wurden bis April 2004 phänotypisiert und die kompletten Datensätze (Anlage 1) zur umweltepidemiologischen Auswertung und zur Befundmitteilung dem NLGA übermittelt.

2.3. Hämoglobinadduktbestimmung

2.3.1 Globinisolierung

Ausgehend von 333 im März / April 2003 gewonnenen Hämolysatproben und 328 unmittelbar nach dem Unfallgeschehen gewonnenen Proben wurden aus der jeweili-

gen Hämolysatprobe ~ 400 mg Globin isoliert (van Sittert 1996). Der Rest jedes Hämolysats (1 – 2 ml) wird als Rückstellprobe bei –80° C bzw. –20° C gelagert. Die isolierten Globine werden bei –20° C gelagert; ihre Adduktspiegel gelten als stabil (van Sittert 1996).

Globalinquote zu je 150 – 200 mg Globin von 77 vom NLGA ausgewählten Personen (Hämolysatgewinnung unmittelbar nach dem Unfallgeschehen im Herbst 2002) wurden im September 2004 an die Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, zu Händen von Herrn Dr. Bader, verschickt.

2.3.2 Aufbau eines Verfahrens zur Bestimmung des Epichlorhydrin-Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Verfahren (Hindso Landin et al. 1996, van Sittert 1996) sollte eine neue für Felduntersuchungen geeignete Methode zur Bestimmung des ECH-spezifischen Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV) entwickelt und validiert werden. Das dem Verfahren zugrunde liegende analytische Prinzip sollte ein modifizierter Edman-Abbau und die anschließende Anreicherung, Aufreinigung und Bestimmung von DHPV sein. Hierzu müssen geeignete Referenzstandards synthetisiert und charakterisiert (Massenspektrometrie, Kernresonanzspektroskopie) werden. Mit Hilfe dieser Standards kann eine Kalibrierung für das DHPV in der Analysenmatrix Globin unter den Bedingungen des modifizierten Edman-Abbaus und der anschließenden Aufreinigung des Hämoglobinadduktes (Hindso Landin et al. 1996) erfolgen. Für den Nachweis des DHPV ist der Einsatz von Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS) im selected ion-Modus (SIM) nach erfolgter Elektronenstoß- oder chemischer Ionisierung (EI bzw. CI) vorgesehen. Die Methodenentwicklung beinhaltet die Validierung (Nachweisgrenze, Richtigkeit, Störeinflüsse, Präzision in der Serie, Präzision von Tag zu Tag) und die interne und externe Qualitätssicherung der Analysenergebnisse.

2.3.2.1 Synthesen von Referenzsubstanzen

In der Literatur werden zwei Typen von Referenzsubstanzen zur Kalibrierung für den modifizierten Edman-Abbau unterschieden: Aminosäureaddukte und N-alkylierte Di-peptidanilide (Val-Leu-Anilide).

Da für das Aminosäureaddukt DHPV bzw. sein Pentafluorphenylthiohydantoinderivat in der Literatur Synthesen beschrieben worden waren (Rydberg et al. 1993, Hindso Landin et al. 1996), wurden zunächst diese genutzt. Dabei zeigte es sich, daß sich mit der Synthese nach Rydberg et al. (1993) das gewünschte Aminosäureaddukt DHPV nicht darstellen ließ. Die von Hindso Landin (1996) vorgeschlagene, aus mehreren Reaktionsschritten zu einer sogenannten „Eintopfreaktion“ zusammengefaßte Synthese des DHPV-Pentafluorphenylthiohydantoin schlug ebenfalls fehl. Eigene Syntheseansätze zur direkten Umsetzung des Valins mit den Alkylantien Gycidol, 3-Brom-1,2-propandiol und Glyceraldehyd (mit anschließender Reduktion) ergaben ebenfalls nicht das gewünschte Produkt.

In einer Kooperation mit dem Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen (Arbeitskreis Prof. Dr. A. de Meijère) und der Kadem Custom GmbH (Laborleiter: Dr. V. Belov) konnten die für die Analytik des DHPV erforderlichen *N*-alkylierten Dipeptidanilide ohne und mit Markierung mit stabilen Isotopen (^{13}C , ^{15}N) dargestellt und charakterisiert (Massenspektrometrie, Kernresonanzspektroskopie) werden (Abb. 1).

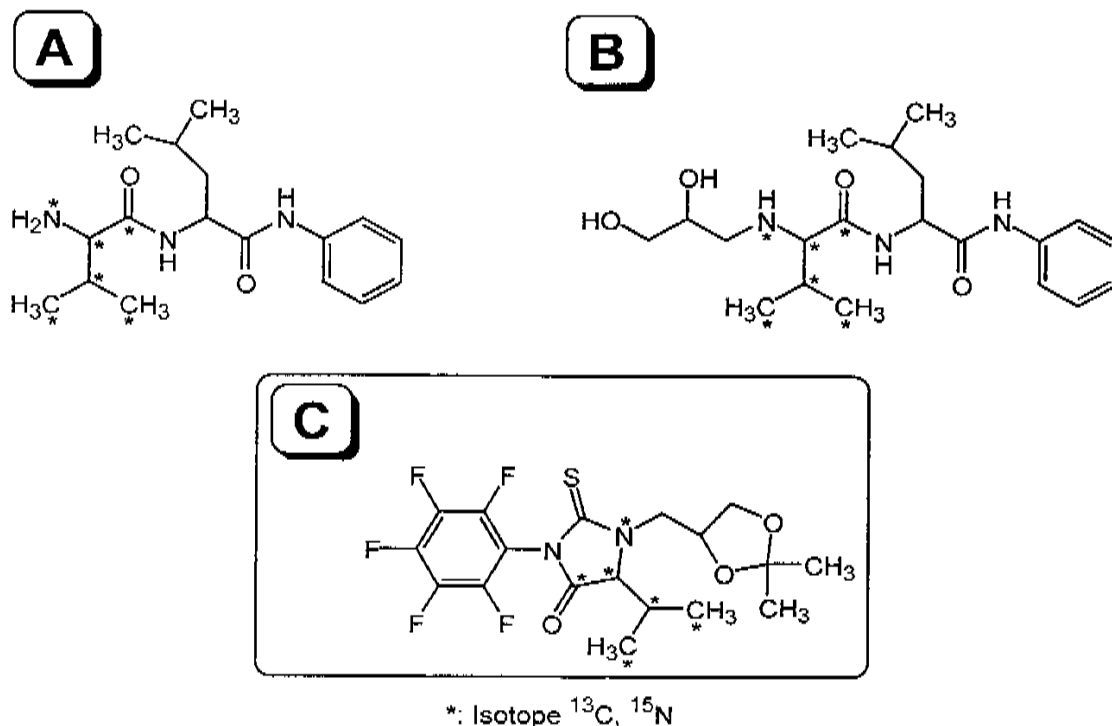


Abbildung 1: Neuartige Adduktstandards: Valin($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N)-Leucin-Anilid (A), *N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-Valin($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N)-Leucin-Anilid (B), DHPV-Derivat (C)

Die im Rahmen des Projektes erstmals synthetisierten isotopenmarkierten *N*-alkylierten Dipeptidanilide stellen eine wesentliche Innovation für die Analytik von Hämoglobinaddukten dar, daher wurden die Syntheseverfahren in Absprache mit dem NLGA bereits veröffentlicht (Belov et al. 2005; Anlage 2).

2.3.2.2 Analytische Methodenentwicklung

Ausgehend von Standardverfahren der Deutschen Forschungsgemeinschaft zum Nachweis von Hämoglobinaddukten (van Sittert 1996) wurde eine neue Methode zum Nachweis von DHPV entwickelt. Das nach dem modifizierten Edman-Abbau isolierte DHPV wird in einem abschließenden Schritt mit Aceton zum Ketal derivatisiert (Paulsson et al. 2003) (Abb. 1C). Das so erhaltene Derivat läßt sich nach gaschromatographischer Abtrennung und Elektronenstoßionisierung bis zu einer Nachweisgrenze von 50 pmol DHPV/g Globin detektieren. Durch den Einsatz der Negativen Chemischen Ionisierung (NCI) und eine Aufkonzentrierung der Proben auf ein Endvolumen von 10 µl wird eine Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin erreicht. Allerdings macht das geringe Endvolumen eine personal- und zeitaufwendige manuelle Probenaufgabe erforderlich.

Für das neue Verfahren wurden die klassischen Val-Leu-Dipeptidadduktstandards (van Sittert 1996) weiterentwickelt. Durch Einführung von stabilen Isotopen ($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N) in das Valin entsteht eine Synthesepattform für beliebige Adduktstandards von Alkylantien (Belov et al. 2005). Im vorliegenden Fall wurde der DHPV-($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N)-Leu-Anilid (Abb. 1B) dargestellt. Damit konnte zum ersten Mal das Prinzip der Isotopenverdünnung für Val-Leu-Dipeptidadduktstandards eingesetzt werden; die bisherige interne Standardisierung mit Hilfe des N^2 -Ethoxyethyl-Val-Ala-Anilids entfällt. Die Methodik der Isotopenverdünnung verbessert die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der Analysen in der Routine erheblich und senkt die Anfälligkeit für Störeinflüsse. Für den Bereich von 20 – 2000 pmol DHPV/g Globin ergibt sich eine lineare Kalibrierfunktion (z.B. $y = 0,0008x + 0,0029$; $R^2 = 0,998$) (Abb. 2).

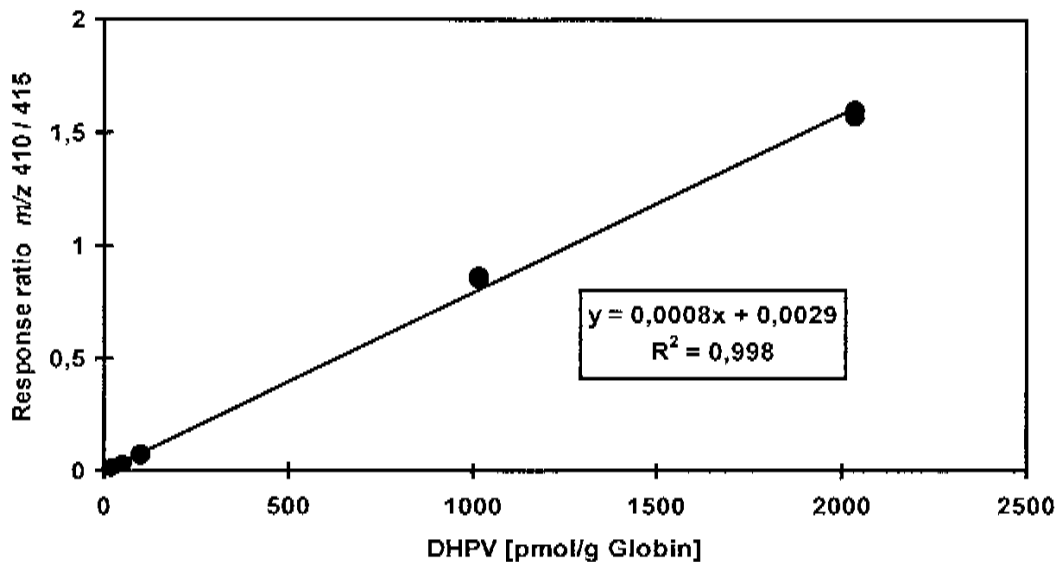


Abbildung 2: Kalibrierfunktion von DHPV (20 – 2000 pmol/g Globin)

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Analysenmethode in der Praxis war als Kriterium ursprünglich eine Differenzierung zwischen Raucher- und Nichtraucherglobinen vorgesehen gewesen. In der Literatur (Hindso Landin et al. 1997) fanden sich Mittelwerte von Raucherglobinen in deutschen Kollektiven > 10 pmol DHPV/g Globin ($21,1 \pm 17,1$ pmol DHPV/g Globin ($n=7$) bzw. $13,1 \pm 12,4$ pmol DHPV/g Globin ($n=8$)); die Mittelwerte von Nichtraucherkollektiven lagen knapp unter 10 pmol DHPV/g Globin ($7,3 \pm 2,7$ pmol DHPV/g Globin ($n=8$) bzw. $6,8 \pm 3,2$ pmol DHPV/g Globin ($n=3$)). Eigene Untersuchungen an drei Raucherglobinen (Zigarettenkonsum: 10 – 40 Zigaretten/d) ergaben keine nachweisbaren DHPV-Spiegel (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin).

In der Studie von Hindso Landin et al. (1997) wurde die Bildung von DHPV in Raucherglobinen mit der Aufnahme der Epichlorhydrinmetabolite Gycidol und 3-Chlor-1,2-propandiol aus dem Zigarettenrauch (Schumacher et al. 1977) in Verbindung gebracht. In der aktuellen Liste der Zusatzstoffe für Tabakprodukte (www.verbraucherministerium.de 2004) sind beide Stoffe nicht aufgeführt. Glycerin, ein putativer Precursor für Gycidol, wird noch von einigen Herstellern eingesetzt, spielt aber gegenüber dem 1,2-Propylenglykol als Zusatzstoff nur eine untergeordnete Rolle. 1,2-Propylenglykol bildet aufgrund seiner abweichenden chemischen Struktur keine DHPV-Addukte mit Hämoglobin. Die mangelnde Exposition im Zigarettenrauch kann zur

Erklärung unserer negativen Befunde und der starken Schwankungen der DHPV-Spiegel in den alten Untersuchungen (unterschiedliche Exposition gegenüber Zusatzstoffen in Abhängigkeit von der gerauchten Marke) dienen.

Um dennoch die Eignung des analytischen Verfahrens zum Nachweis von DHPV aus Hämoglobin zu belegen, wurden *in vitro*-Untersuchungen zur Hämoglobinadduktbildung durchgeführt. Hierzu wurden Aliquote eines Nichtraucherhämolysats mit ansteigenden Konzentrationen Glycidol (25 – 500 μM) inkubiert. Wie für ein direkt wirkendes Alkylans zu erwarten, zeigte sich eine dosisabhängige lineare Erhöhung der DHPV-Adduktspiegel ($y = 1,9434x + 45,851$; $R^2 = 0,99$) (Abb. 3). Damit konnte erstmals die Bindungskinetik von Glycidol an menschliches Hämoglobin *in vitro* demonstriert werden (Müller et al. 2005; Anlage 3).

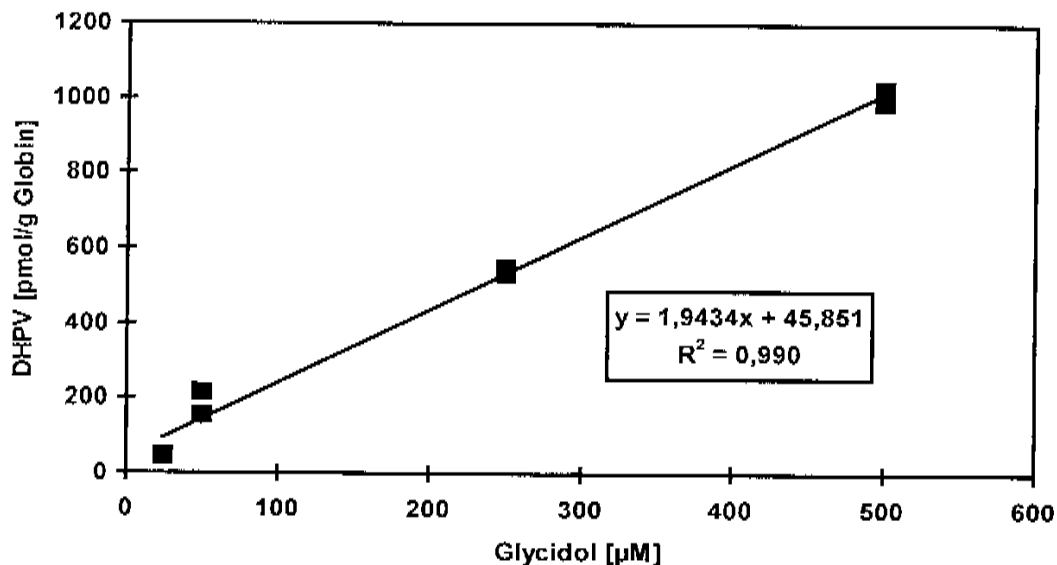


Abbildung 3: DHPV-Adduktbildung in Inkubationen eines Nichtraucherhämolysats mit ansteigenden Konzentrationen Glycidol (25 – 500 μM)

Die prinzipielle Anwendbarkeit des neuen Verfahrens zum Nachweis des DHPV aus modifiziertem Hämoglobin konnte durch diese Ergebnisse belegt werden. Die erreichte Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin) darf als ausreichend betrachtet werden, um eine Belastung nachzuweisen. So wurden im Tierversuch in Ratten nach einer einmaligen Gabe von 432 μmol Epichlorhydrin/kg Körpergewicht i.p. nach 30 Tagen noch Adduktspiegel von 44 pmol DHPV/g Globin nach-

gewiesen, was einem Adduktspiegel unmittelbar nach Exposition von 88 pmol DHPV/g Globin entspricht (Hindso Landin et al. 1996).

Die begonnenen *in vitro*-Untersuchungen sollen unabhängig vom hier beschriebenen Projekt im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit vertieft und auf das 3-Chlor-1,2-propandiol sowie das Epichlorhydrin selbst ausgedehnt werden.

Zum Abschluß der analytischen Methodenentwicklung wurde die Präzision in der Serie in zwei unabhängigen Meßreihen bestimmt. Für die erste Meßreihe ergab sich bei $n = 6$ Bestimmungen des Kalibrierstandards 50 pmol DHPV/g Globin eine relative Standardabweichung s_w von 6,88 % und ein Streubereich u von 17,7 %. Die zweite Meßreihe wies in sehr guter Übereinstimmung mit der ersten Meßreihe eine relative Standardabweichung s_w von 7,23 % und ein Streubereich u von 18,6 % auf. Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag für den Kalibrierstandard 50 pmol DHPV/g Globin zeigte bei $n = 6$ Bestimmungen eine relative Standardabweichung s_w von 38,1 % und einen Streubereich u von 97,9 % auf. Die erzielten Präzisionen befinden sich in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur (van Sittert 1996) für die Bestimmungsmethode des nah verwandten Adduktes *N*-Hydroxyethylvalin (HEV) beschriebenen Präzisionen.

2.3.3 *Routinemessungen und interne Qualitätssicherung*

Nach Absprache mit dem NLGA wurden zunächst 158 Globine untersucht. Dabei handelte es sich um 77 Proben der vom NLGA ausgewählten Personen, von denen Globinaliquots an die Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, zu Händen von Herrn Dr. Bader, verschickt worden waren (Hämolysatgewinnung unmittelbar nach dem Unfallgeschehen im Herbst 2002). Zu Vergleichszwecken wurden 77 Globine derselben Personen, die aus den im März / April 2003 gewonnenen Hämolysaten isoliert worden waren, analysiert. Globine von vier weiteren Personen, isoliert aus im März / April 2003 gewonnenen Hämolysaten, wurden ebenfalls untersucht.

Für jede Meßreihe (ca. 30 Globinproben) wurde eine Kalibrierung (20 – 1000 pmol DHPV/g Globin) vorgenommen. Jeder Kalibrierstandard und jede Globinprobe wurden zweifach analysiert (Doppelbestimmung).

Zur internen Qualitätssicherung wurden für jede Teilmeßreihe von 15 Globinproben zusätzlich ein Kalibrierstandard (50 pmol DHPV/g Globin) oder ein mit 25 µM Glycidol modifiziertes Nichtraucheroglobin analysiert.

Von 158 analysierten Proben waren die Messungen in 3 Fällen trotz mehrfacher Untersuchung aufgrund einzelprobenspezifischer Störungen nicht auswertbar.

Unter den verbleibenden 155 ausgewerteten Datensätzen befand sich keine Probe mit einer Belastung (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Eine Liste der untersuchten Proben ist als Anlage 4 beigefügt.

Die restlichen 251 Globine (Hämolysatgewinnung unmittelbar nach dem Unfallgeschehen im Herbst 2002) wurden ebenfalls wie oben beschrieben untersucht. Unter allen 251 ausgewerteten Datensätzen befand sich keine Probe mit einer Belastung (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Eine Liste der untersuchten Proben ist als Anlage 5 beigefügt.

2.3.4 Externe Qualitätssicherung

Das neu entwickelte Verfahren soll als Standardverfahren Eingang in die entsprechende Methodensammlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft finden. In diesem Rahmen erfolgt eine Prüfung der Methode durch den Arbeitskreis „Analysen in biologischem Material“ der DFG-Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (Vorsitz: Prof. Dr. J. Angerer, Universität Erlangen). Dazu wird das Verfahren in der Regel von zwei unabhängigen Laboratorien nachgestellt und die analytischen Kenndaten werden überprüft.

2.3.5 Lagerungsversuche

Um die Stabilität des DHPV während der erfolgten Lagerung der Hämolysatproben abschätzen zu können, wurde Nichtraucherhämolysat mit 50 µM Glycidol behandelt. Die Lagerung von Aliquots des modifizierten Hämolysats erfolgte bei -20° C bzw. -80° C. Aus diesen Aliquots wurde jeweils frisch isoliertes Globin im Rahmen der Routinemessungen in regelmäßigen Abständen (jeweils ca. 1 Monat) analysiert. Für das DHPV ließen sich nach 4 Monaten Lagerungszeit unabhängig von der Lagerungstemperatur keine lagerungsbedingten Verluste nachweisen.

Zusätzlich wurden Aliquots von mit 25 µM Glycidol modifiziertem und bei -20° C gelagertem Nichtraucherglobin in regelmäßigen Abständen (ca. 1 Monat) untersucht. Für das DHPV ließ sich nach 6 Monaten Lagerungszeit keine lagerungsbedingten Verluste nachweisen.

2.4 Interne und externe Kommunikation

2.4.1 Projektbesprechungen

- 1) Projektbesprechung am 20.08.2003 im NLGA zur Vorbereitung der öffentlichen Informationsveranstaltung in Bad Münden (Teilnehmer: Herren Prof. Dr. A. Windorfer (NLGA), Dr. R. Suchenwirth (NLGA), M. Hoopmann (NLGA), PD Dr. M. Müller (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen))
- 2) Projektbesprechung am 01.12.2003 in der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin in Göttingen: mündlicher Sachstandsbericht (Teilnehmer: Herren M. Hoopmann (NLGA), M. Funcke (NLGA), Prof. Dr. E. Hallier (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen), PD Dr. M. Müller (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen))
- 3) Projektbesprechung am 20.02.2004 im NLGA zur Koordinierung der Laboruntersuchungen (Teilnehmer: Herren Prof. Dr. A. Windorfer (NLGA), Dr. R. Suchenwirth (NLGA), M. Hoopmann (NLGA), M. Funcke (NLGA), Frau Prof. Dr. R. Wrbitzky (Abt. Arbeitsmedizin der MHH), Herren Dr. M. Bader (Abt. Arbeitsmedizin der MHH), Prof. Dr. E. Hallier (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen), PD Dr. M. Müller (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen))
- 4) Projektbesprechung am 10.12.2004 in der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin in Göttingen: mündlicher Sachstandsbericht (Teilnehmer: Herren M. Hoopmann (NLGA), Prof. Dr. E. Hallier (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen), PD Dr. M. Müller (Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen))

2.4.2 Öffentliche Informationsveranstaltungen und Expertengespräche

- 1) Öffentliche Informationsveranstaltung am 20.08.2003 in Bad Münder (Teilnehmer für die Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen: PD Dr. M. Müller)
- 2) Expertengespräch am 27.05.2004 im NLGA (Teilnehmer für die Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen: Prof. Dr. E. Hallier, PD Dr. M. Müller)
- 3) Öffentliche Informationsveranstaltung am 07.06.2004 in Bad Münder (Teilnehmer für die Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen: Prof. Dr. E. Hallier, PD Dr. M. Müller)
- 4) Informationsgespräch am 29.08.2005 in Bad Münder (Teilnehmer für die Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen: PD Dr. M. Müller)

2.4.3 Medientermine

- 1) Pressetermin mit Herrn Dorndorf (Deister-Anzeiger / HNA / Neue Presse) am 03.09.2004 in der Abt. Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Göttingen (Teilnehmer: Prof. Dr. E. Hallier, PD Dr. M. Müller)

3. Toxikologische Interpretation: Vergleich zum *N*-Hydroxyethylvalin (HEV)

Eine dem Epichlorhydrin nahe verwandte Substanz ist das Ethylenoxid, genauer gesagt bildet das Ethylenoxid eine Hälfte des Epichlorhydrinmoleküls. Genau wie das Epichlorhydrin kann Ethylenoxid mit dem menschlichen Hämoglobin reagieren. Die resultierenden Hämoglobinaddukte DHPV aus Epichlorhydrin und *N*-Hydroxyethylvalin (HEV) aus Ethylenoxid weisen eine noch größere Ähnlichkeit miteinander als die Ausgangssubstanzen auf; so kann man das DHPV auch als um eine CH₂OH-Gruppe erweitertes HEV betrachten (Abb. 4)

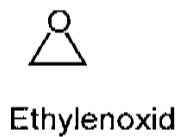
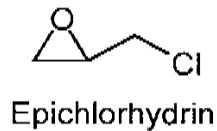
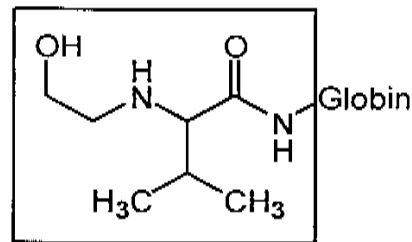
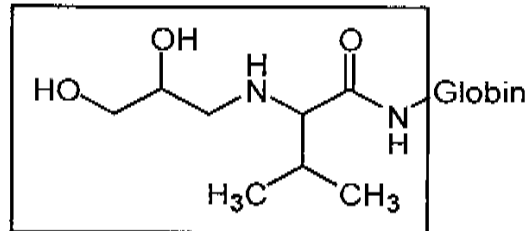
AusgangssubstanzHämoglobinaddukt

Abbildung 4: Vergleich der Strukturen von Epichlorhydrin und Ethylenoxid und der resultierenden Hämoglobinaddukte

Ethylenoxid bildet sich im menschlichen Körper z.B. aus Ethylen, welches von Pflanzen und Bakterien in die Umgebung abgegeben und vom Menschen mit der Atemluft und der Nahrung aufgenommen wird. Entsprechend läßt sich in jedem Menschen ein endogener, unvermeidbarer Adduktspiegel nachweisen. Diese Hämoglobinadduktspiegel liegen für Nichtraucher je nach Entgiftungskapazität – und hier ist insbesondere der hGSTT1-1-Status zu berücksichtigen – zwischen 37 pmol HEV/g Globin (Median, höchste hGSTT1-1-Aktivität) und 75 pmol HEV/g Globin (Median, fehlende hGSTT1-1-Aktivität). Raucher (10 – 20 Zigaretten / Tag) weisen in Abhängigkeit von ihrem hGSTT1-1-Status dreifach höhere HEV-Spiegel auf (Müller et al. 2004). Die für Nichtraucher beschriebenen Adduktspiegel entsprächen einer Exposition gegenüber einer permanenten Ethylenoxidkonzentration von 10 bzw. 19 ppb, wenn das Ethylenoxid ausschließlich inhalativ aufgenommen würde. Zum Vergleich: die Technische Richtkonzentration von Ethylenoxid am Arbeitsplatz lag mit 1 ppm (= 1000 ppb) um den Faktor 100 bzw. 50 höher.

Übertragen auf das strukturverwandte Epichlorhydrin läßt sich die Abwesenheit belasteter Proben bei einer analytischen Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin dahingehend deuten, daß eine mögliche, nicht nachweisbare Exposition sicher unterhalb der unvermeidbaren endogenen Exposition gegen Ethylenoxid liegt.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen des mehrphasigen Untersuchungsprogramms zur Gesundheitsfolgenabschätzung des Bahngefahrzutunfalls in Bad Mündel wurde das Projekt „Biological Monitoring von Epichlorhydrin: individuelle Hämoglobinaddukte und hGSTT1-1-Aktivitäten“ durchgeführt.

Hierzu wurde eine neue für Felduntersuchungen geeignete Methode zur Bestimmung des ECH-spezifischen Hämoglobinadduktes *N*-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV) mit einer Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin entwickelt und validiert. Als Summenparameter deckt DHPV die drei möglichen Reaktionswege des Epichlorhydrins mit menschlichem Hämoglobin vollständig ab und erscheint daher zur Messung als toxikologischer Endpunkt besonders geeignet (Abb. 5).

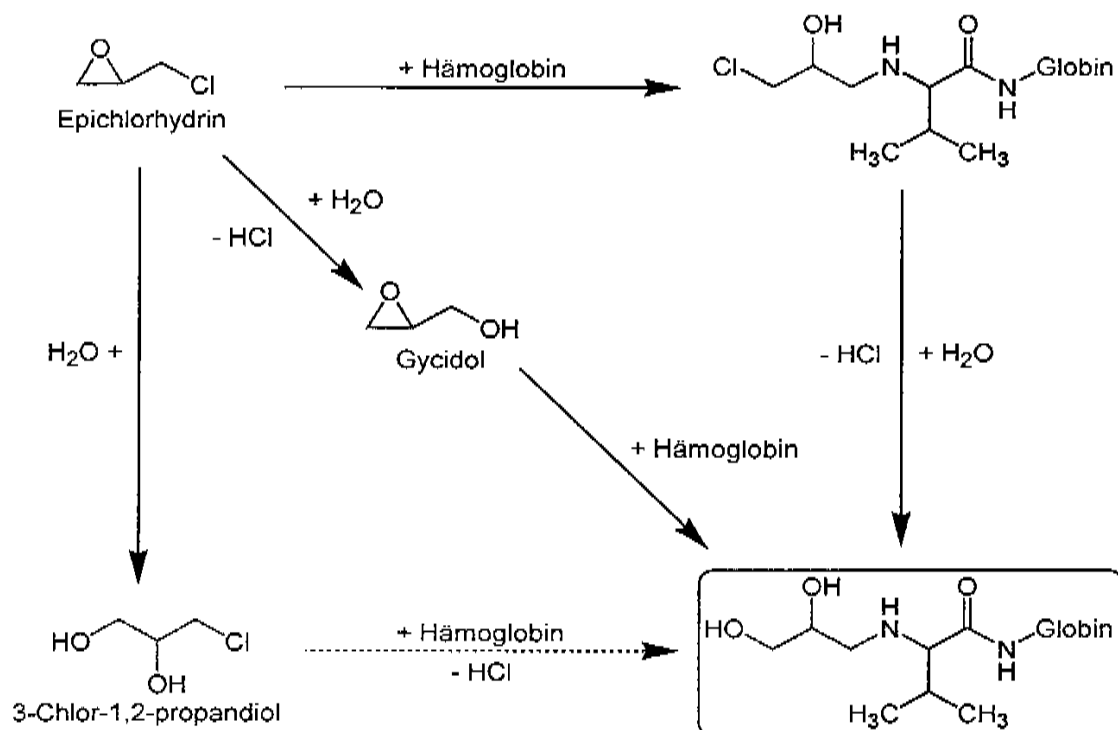


Abbildung 5: Reaktionswege von Epichlorhydrin mit menschlichem Hämoglobin

Insgesamt wurden 409 Globine unter Beachtung einer internen Qualitätssicherung untersucht, davon stammten 328 aus unmittelbar nach dem Unfallgeschehen im Herbst 2002 gewonnenen Hämolysaten und 81 aus im März / April 2003 gewonnenen Hämolysaten. Von 409 analysierten Proben waren 406 Datensätze auswertbar; 3 Proben konnten trotz mehrfacher Untersuchungen aufgrund einzelprobenspezifischer Störungen nicht ausgewertet werden. Keines der 406 analysierten und ausgewerteten Globine wies eine Belastung auf (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Lagerungsversuche mit modifiziertem Nichtraucherhämolysat und isoliertem Globin zeigten keine lagerungsbedingten Verluste des DHPV-Adduktes über eine Lagerungszeit von 4 bzw. 6 Monaten. Im Vergleich zum unmittelbar strukturverwandten Ethylenoxid läßt sich die Abwesenheit belasteter Proben bei einer analytischen Nachweisgrenze von 10 pmol DHPV/g Globin dahingehend deuten, daß eine mögliche Exposition auf jeden Fall unterhalb der unvermeidbaren endogenen Exposition des Menschen gegen Ethylenoxid (37 - 75 pmol *N*-Hydroxyethylvalin/g Globin) liegt. Die humane Glutathion-S-Transferase T1 (hGSTT1-1) ist eines der wichtigsten Enzyme für die Verstoffwechslung von industriell genutzten Chemikalien. Von ihr umgesetzte Chemikalien sind z.B. wichtige Schädlingsbekämpfungsmittel, Lösungsmittel und Ausgangsstoffe der Kunststoffherstellung. Aufgrund von Strukturanalogien darf davon ausgegangen werden, daß auch Epichlorhydrin von der hGSTT1-1 metabolisiert wird. Im Rahmen des Projektes wurden von 292 Personen die individuellen hGSTT1-1-Aktivitäten bestimmt und die kompletten Datensätze dem NLGA zur umweltepidemiologischen Auswertung und zur Befundmitteilung übermittelt.

5 *Literatur*

Belov VN, Müller M, Ignatenko O, Hallier E, de Meijère A (2005): Facile access to isotopically labeled valylleucyl anilides as biomarkers for the quantification of hemoglobin adducts to toxic electrophiles. *Eur J Org Chem* 2005, 5094 - 5099

Hindso Landin H, Osterman-Golkar S, Zorcec V, Törnquist M (1996): Biomonitoring of epichlorohydrin by hemoglobin adducts. *Anal Biochem* 240, 1 - 6

Müller M, Bünger J, Voss M, Westphal G, Ruhnau P, Hallier E (2002): Phenotyping of human glutathione S-transferase hGSTT1-1: a comparison of two ex vivo routine procedures. Arch Toxicol 76, 634 – 642

Müller M, Schettgen T, Bünger J, Hallier E, Angerer J (2004): Influence of the human glutathione S-transferase T1 activity on the N^2 -hydroxyethylvaline adduct levels in non-smokers and smokers. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369, Suppl 1, R 140

Müller M, Belov V, de Meijere A, Bünger J, Emmert B, Heutelbeck A, Hallier E (2005): Entwicklung eines neuen Biomonitoringverfahrens zur Bestimmung des Hämoglobinadduktes N -(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin nach einer Epichlorhydrinexposition. Verh Dt Ges Arbeitsmed 45, eingereicht

Paulsson B, Athanassiadis I, Rydberg P, Törnqvist M (2003): Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography / tandem mass spectrometric analysis. Rapid Commun Mass Spectrom 17, 1859 - 1865

Rydberg P, Lüning B, Wachtmeister CA, Törnqvist M (1993): Synthesis and characterization of N -substituted valines and their phenyl- and pentafluorophenylthiohydantoin. Acta Chem Scand 47, 813 - 817

Schumacher JN, Green CR, Best FW, Newell MP (1977): Smoke composition. An extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. J Agric Food Chem 25, 310 - 320

Van Sittert NJ (1996): N^2 -Cyanoethyl-Valin, N^2 -Hydroxyethyl-Valin, N -Methyl-Valin (zum Nachweis einer Belastung / Beanspruchung durch Acrylnitril, Ethylenoxid sowie methylierende Substanzen) in: Deutsche Forschungsgemeinschaft: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material; hrsg. v. Greim H; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 12. Lieferung

www.verbraucherministerium.de 2004

Anlage ?

FULL PAPER

DOI: 10.1002/ejoc.200500429

Facile Access to Isotopically Labelled Valylleucyl Anilides as Biomarkers for the Quantification of Hemoglobin Adducts to Toxic Electrophiles

Vladimir N. Belov,^[a,b] Michael Müller,^[c] Oleg Ignatenko,^[a,d] Ernst Hallier,^[c] and Armin de Meijere^{*,[a,b]}

Keywords: Isotopic labelling / Toxicology / Peptidomimetics / Biomarkers / Hemoglobin adducts

An easy and efficient synthesis of valylleucyl anilide (HVal-LeuNIIPh) and labelled HVal(¹³C₅,¹⁵N)LeuNIIPh has been developed. Derivatization of these substances with oxirane, acrylonitrile, epichlorohydrin, glyceraldehyde and other aldehydes gives a series of reference substances and internal standards for the quantitative evaluation of human exposure to toxic electrophiles by quantitative determination of their

hemoglobin adducts. Coupling of *N*-Z-*N*-Me-Val(¹³C₅,¹⁵N)OH with HLeuNIIPh followed by hydrogenolysis affords *N*-Me-Val(¹³C₅,¹⁵N)LeuNHPH for quantification of the exposure to methylating agents.

(© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, Germany, 2005)

Introduction

Human exposure to toxic electrophilic substances may be monitored by measuring hemoglobin (Hb) adducts with these compounds or their reactive metabolites.^[1] In blood, electrophilic toxicants may attack all possible nucleophilic centers of Hb. All four chains of human Hb have the same *N*-terminal valine residue. Therefore, detection and quantitative determination of *N*-modified valine termini in Hb may serve as a cumulative index for human exposure to alkylating agents, Michael acceptors (acrylonitrile) and other electrophilic pollutants. Classical Edman degradation^[2] has been used as a simple and sensitive procedure for cleaving off and analyzing *N*-terminal amino acid residues in proteins. Modified terminal *N*-alkylated valine residues in Hb were shown to be released easily in the reaction with phenyl or perfluorophenyl isothiocyanate.^[1a,1b,3] Spontaneous cyclization and cleavage of the corresponding *N*-alkyl-

(perfluoro)phenylthiohydantoin under basic conditions followed by their extractive separation led to the development of the so-called "*N*-alkyl" Edman procedure for GC-MS quantification of Hb adducts.^[4] This very helpful method has been adopted in many laboratories around the world and recommended for official use in Germany.^[5]

However, up to now there was no uniform set of reference substances and internal standards for this method. For this purpose, *N*-modified valine derivatives which mimic the whole Hb molecule have been used.^[6] To combine a reference substance and an internal standard in one chemical entity, the method of isotopic dilution is often applied for quantification. For example, a Swedish group reported the chemical transformations of radioactively labelled (³H and ¹⁴C) and deuterated samples of epichlorohydrin followed by their conjugation with globin to prepare standard globins.^[1d] A similar methodology with sulfur mustard-[D₈] and [³⁵S] sulfur mustard has also been reported by another group.^[4d] Incorporation of a (radioactive) label into the "variable" part of the molecule attached to the terminal valine residue is inconvenient for monitoring various toxic electrophiles, and therefore this approach has not been pursued any further. For routine use, it would be much better to develop an analytical procedure in which isotopic dilution with stable isotopes incorporated into the valine residue is adopted. Farmer et al. had reported about monitoring the exposure to acrylonitrile. Their quantification was based on *N*-(2-cyanoethyl)-[D₈]Val-Leu-Ser-OH which may be synthesized from the commercially available [D₈]valine, but a synthetic procedure was not published.^[4a,4b]

To establish a new reference set, we incorporated another commercially available labelled *L*-valine [HVal(¹³C₅,¹⁵N)OH]^[7] into the "classical" HValLeuNHPH standards.^[8] Labelling with ¹³C and ¹⁵N is advantageous, because it al-

[a] Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, Tammannstrasse 2, 37077 Göttingen, Germany
Fax: + 49-551-399475

E-mail: Armin.deMeijere@chemie.uni-goettingen.de

[b] KAdemCustomChem. GmbH, Brombeerweg 13, 37077 Göttingen, Germany
Fax: + 49-551-23423

[c] Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Georg-August-Universität Göttingen, Waldweg 37, 37073 Göttingen, Germany
Fax: + 49-551-396184
E-mail: mmuelle3@gwdg.de

[d] Department of Organic Chemistry, St. Petersburg State University, Universitetskii Pr. 26, 198504 St. Petersburg, Petrodvorets, Russia
E-mail: ol20011@yandex.ru

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.eurjoc.org> or from the author.

ters physical properties of the standards (GC and HPLC retention times) much less than (per)deuteration, thus reducing the risk that the labelled standard will give a separate peak in GC or HPLC traces and complicate the calibration procedure when applying the isotopic dilution technique. In addition, D-labelled substances tend to exchange D vs. H, especially in acidic or alkaline media which are often used in the extraction procedures prior to instrumental analysis.

Here we report general procedures for the (reductive) alkylation and Michael addition of HVal($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N)LeuNHPh which may find wide use. Some unlabelled compounds of this type are commercially available,^[9] but their synthesis has never been published. The easy production and derivatization of labelled and unlabelled HValNHPh reported here opens a toolbox for preparing a new series of internal standards for various biomonitoring procedures.

Results and Discussion

The labelled and unlabelled dipeptide precursors **7/7*** were prepared according to the sequence summarized in Scheme 1.^[10]

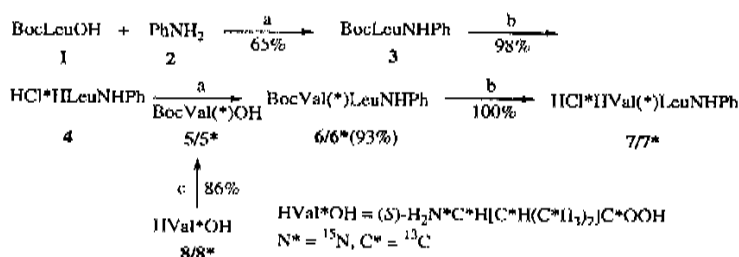
Coupling of BocLeuOH with 7-aza-1-hydroxybenzotriazole (HOBt) followed by the reaction with aniline (**2**) gave the amide **3**. Deprotection of **3** with a solution of HCl in EtOAc produced the amine **4** as a hydrochloride, and subsequent amidation of the (labelled) BocVal(*)OH (**5/5*)^[11] with **4** afforded the intermediate **6/6*** in excellent yield. Deprotection of the amino group in **6/6*** resulted in the final dipeptide **7/7***, which was isolated as the hydrochloride as well, and it was used for further transformations as such. All reactions, except the first one with inexpensive BocLeuOH and aniline, were found to be high yielding. To further reduce the costs of reagents, it is possible to perform this coupling of **1** and **2** with inexpensive *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) or *N*-hydroxysuccinimide, instead of the more expensive HOBt. In this case the yield was only insignificantly lower (60 vs. 65%).**

Reactions of **7/7*** with various alkylating agents were used to mimic the corresponding transformations of the *N*-

valine terminus in hemoglobin (Scheme 2). Epichlorohydrin (ECH) which is an important monomer for the production of epoxide resins, as an alkylating agent has been classified as a category 2 carcinogen and allergen.^[12] Alkylation of **7** (as a free base) with ECH leads to the compound **10** which mimics the initially formed Iib adduct of ECH. However, another modified Hb was found in vivo after exposure to ECH. It is represented by compound **11** with a hydroxy group instead of a chlorine atom. A plausible explanation for this fact is that in vivo, ECH also metabolizes to 3-chloro-1,2-propanediol or glycidol. All three compounds may react with the terminal valine residue of Hb, and their further transformations may end up with the single stable product *N*-(2,3-dihydroxypropyl)valine.^[13] For a quantification of ECH exposure, in addition to compound **10/10***, the diol **11/11*** was synthesized. Towards that, the reductive alkylation of **7/7*** with racemic glyceraldehyde was applied,^[13] to give a mixture of two diastereomers in 49% yield. Similarly, reductive alkylations of **7/7*** with benzaldehyde and butanal afforded the corresponding model compounds **9** and **12** as mimics of the alkylation products of Hb by benzyl and butyl halides.

In these reductive alkylations, sodium (triacetoxy)-borohydride in dichloroethane consistently gave better results than $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ in methanol. However, attempted reductive alkylations of **7** with formaldehyde and acetaldehyde each gave inseparable mixtures of the starting compound, *N*-monoalkyl and *N,N*-dialkyl derivatives. Similar complications in the reductive alkylations with formaldehyde^[6] and other aldehydes are known.^[14] Nevertheless, reductive alkylation is a much more reliable method for the preparation of the analytical standards modelling the alkylated Hb termini. Alkyl and benzyl halides do not react selectively enough, and always produce mixtures of *N*-alkyl- and *N,N*-dialkylvalines, as well as *N,N,N*-trialkylammonium salts.

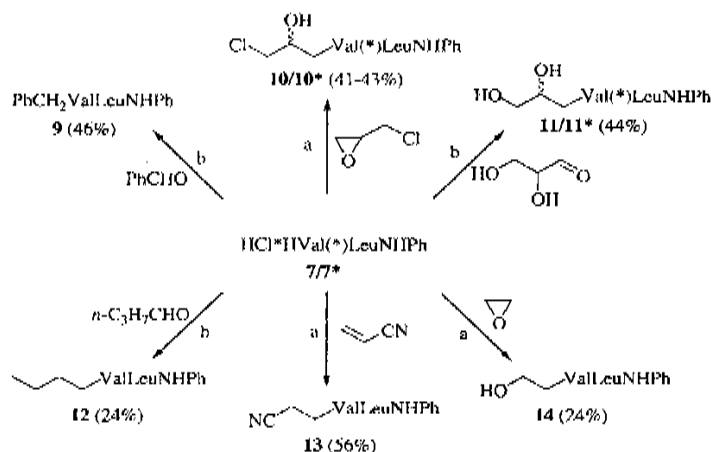
Another very strong alkylating agent, oxirane (ethylene oxide), produces the important reference compound **14**. The very toxic and reactive monomer acrylonitrile, readily reacts with **7** and by way of a Michael addition gives *N*-(2-cyanoethyl)valine **13**. Preparative yields of the reference substances in Scheme 2 are far from being quantitative. Our goal was to get pure substances, and inevitable losses during



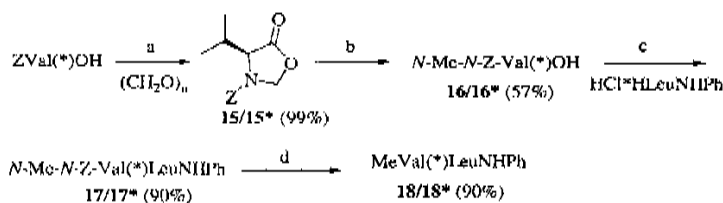
Scheme 1. Synthesis of the dipeptide precursor(s) **7/7***: a) 7-aza-1-hydroxybenzotriazole (HOBt), *N*-(3-dimethylamino)propyl-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC-HCl), *i*Pr₃NEt, CH₂Cl₂; b) 4 M HCl in EtOAc, CH₂Cl₂; c) di-*tert*-butyl pyrocarbonate (Boc₂O), *t*BuOH, aq. NaOH, 16 h, room temp.

FULL PAPER

V. N. Belov, M. Müller, O. Ignatenko, E. Hallier, A. de Meijere



Scheme 2. Synthesis of (labelled) analytical standards from HCl·HVal(*)LeuNHPh: a) i -Pr₂NEt, EtOH, room temp. 3 d; b) water/1,2-dichloroethane, 4-Å molecular sieves, Et₃N, then NaBH(OAc), 35 °C, 2–5 h.



Scheme 3. Synthesis of MeVal(*)LeuNHPh via oxazolidinone 16: a) camphor-10-sulfonic acid (CSA), toluene, reflux, 30 min; b) Et₃SiH, TFA, CHCl₃, room temp., 3 d; c) EDC·HCl, i -Pr₂NEt, CH₂Cl₂, HOBT, DMAP, room temp., overnight; d) H₂, 10% Pd/C, EtOH.

the purification to some extent explain the low isolated yields which refer to thoroughly purified materials obtained after column chromatography and recrystallization.

Another important reference is compound 18/18* with the *N*-methylated valine terminus. It may be used for the evaluation of human exposure to hazardous methylating agents such as diazomethane, iodomethane and dimethyl sulfate. Direct synthesis of MeValLeuSerOH from HValLeuSerOH^[15] by reductive alkylation with formaldehyde and Na(CN)BH₃ has been reported to be inconvenient, because it was necessary to apply "semipreparative" HPLC for the separation of the monomethylated product from by-products and an unknown impurity which was present in the starting material.^[6] Therefore, another route was followed, along which *N*-Me-*N*-Z-ValOH (16) was first prepared in two steps from ZValOH via (*S*)-3-*Z*-4-isopropyl-oxazolidin-5-one (15) applying a known protocol (Scheme 3).^[16] Coupling of *N*-Me-*N*-Z-ValOH with HCl·HLeuNHPh followed by hydrogenolysis produces MeValLeuNHPh in high overall yield and purity. The same route was used for the synthesis of the labelled internal standard MeValLeuNHPh.

The constitution and purity of the unlabelled final reference compounds were confirmed by elemental analyses. Predictably, this method did not work for the labelled standards, if, after combustion, the contents of carbon dioxide

and nitrogen were measured by physical methods, in which the calibrations were made with unlabelled carbon dioxide and nitrogen. For example, measuring thermal conductivities of carbon dioxide and nitrogen during their GC determination or IR intensities of the preselected CO₂ and N₂ bands consistently gave values of carbon and nitrogen contents which were too low. Therefore, labelled standards were characterized by mass and NMR spectrometry.

Conclusions

An easy and efficient synthesis of HValLeuNHPh and labelled HVal(¹³C,¹⁵N)LeuNHPh along with exemplified procedures of their (reductive) alkylation with aldehydes and their nucleophilic addition to reactive Michael acceptors has made a variety of internal standards and reference substances easily available. Analytical chemists engaged in determinations of hemoglobin adducts to toxic substances using the method of isotopic dilution may apply this protocol in their own work and synthesize various new reference sets depending on the nature of a hazardous electrophile. Successful application of the compound 11 in a highly sensitive analytical procedure for the determination of epichlorohydrin exposure has already been described.^[17]

Experimental Section

General Remarks: Melting points (uncorrected) were determined in capillaries using a Büchi 510 apparatus. Routine NMR spectra were recorded with Varian MERCURY-300 and MERCURY-200 spectrometers at 300 (1H) and 75.5 MHz (13C and API), as well as at 200 (1H) and 50.3 MHz (13C and API), respectively. All spectra are referenced to tetramethylsilane as an internal standard ($\delta = 0$ ppm) using the signals of the residual protons of deuterated solvents: 7.26 for CHCl₃, 2.50 for [D₃]DMSO and 3.30 for [D₄]MeOH. Multiplicities of signals are described as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, sept = septuplet, m_c = centrosymmetrical multiplet. Coupling constants (*J*) are given in Hz. EI-MS were recorded with MAT 95 (70 eV) and ESI-MS with LCQ spectrometers (Fa. Finnigan). IR: Bruker IFS 66 (FT-IR) spectrophotometer, measured as KBr pellets or oils between KBr plates. Analytical TLC was performed on Macherey-Nagel ready-to-use plates AluGram Sil G/UV₂₅₄; detection with UV light (254 nm), development with molybdotriphosphoric acid solution (5% in EtOH) or 0.5% aq. KMnO₄. Column chromatography: Merck silica gel, grade 60, 230–400 mesh. Elemental analyses were carried out at the Mikroanalytisches Laboratorium des Instituts für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-University of Göttingen. Solvents were purified according to standard procedures. Organic solutions were dried over MgSO₄. All reactions were carried out with magnetic stirring, unless stated otherwise.

The procedures used for the preparation of the compounds 3, 4, 6, 6*, 7, 7*, 17, 18, 18* are given in the Supporting Information to this article and published electronically (for details see also the footnote on the first page of this article).

Benzyl (S)-4-Isopropyl-5-oxooxazolidine-3-carboxylate (15/15*)^[18] and **N-benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valine (N-Z-N-McValOH, 16/16*)^[19]** were synthesized starting from ZValOH (Fluka) or ZVal¹OH^[20] according to a previously reported general method^[9] (Scheme 3).

N-Benzylvalylleucyl Anilide (9): To a solution of compound 7 (342 mg, 1.00 mmol) and *i*Pr₃N₃ (129 mg, 1.00 mmol) in 1,2-dichloroethane (DCE, 20 mL), was added molecular sieves (4 Å, 15 g) followed by freshly distilled benzaldehyde (212 mg, 2.00 mmol). After stirring for 30 min at room temperature, NaBH(OAc)₃ (424 mg, 2.00 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Then it was filtered, the molecular sieves were washed several times with dichloromethane, the combined filtrates (200 mL) were washed once with saturated aq. solution of NaHCO₃ (100 mL) and dried. After evaporation of the solvent in vacuo, the residue was separated by column chromatography on silica gel (50 g) eluting with chloroform/methanol (50:1) to afford 9 (180 mg, 46%), m.p. 131–133 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 0.96 (d, *J* = 6.8, 3 H), 0.99 (br. d, *J* = 6.8, 6 H), 1.59–1.76 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.89 (m, *J* = 6.9, 1 H, CHMe₂ in Val), 2.91 (d, *J* = 6.2, 1 H, CHNH₂ in Val), 3.59 (d, *J* = 12.5, 1 H, PhCHH), 3.79 (d, *J* = 13.1, 1 H, PhCHH), 4.63 (dd, *J* = 5.0 and 9.4 Hz, 1 H, CFNH in Leu), 7.09 (tm, *J* = 7.5 and 1.2 Hz, 1 H, 4-H_A), 7.17–7.34 (m, 7 H), 7.29 (tm, *J* = 7.5, 2 H, 3-H_A), 7.54 (dm, *J* = 7.5, 2 H, 2-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, ppm): δ = 19.2, 19.8, 22.0, 23.4, 26.1, 32.9, 42.3 (C11), 53.3 (C11), 53.4 (CH), 68.4 (C11), 121.4 (CH), 125.4 (CH), 128.1 (CH), 129.4 (C11), 129.5 (CH), 129.8 (C11), 139.6 (C_{ipso}), 141.0 (C_{ipso}), 172.9 (CO), 176.6 (CO). MS (ESI, positive mode): *m/z* (%) = 813 (100) [2M + Na⁺], 791 (27) [2M + H⁺], 418 (25) [M + Na⁺], 396 (19) [M + H⁺], negative mode: 440 (87) [M + HCO₂], 394 (100) [M - H⁻]. IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3278, 3145, 3064,

2958, 2871, 1666, 1641, 1606, 1551, 1501, 1468, 1444, 1385, 1367, 1311, 1249, 1157, 1028. C₂₆H₃₂N₄O₂·0.25H₂O (400.04): calcd. C 72.09, H 8.38, N 10.51; found C 72.22, H 8.39, N 10.42.

(2R,5S)-N-(3-Chloro-2-hydroxypropyl)valylleucyl Anilide (10): To a solution of compound 7 (342 mg, 1.00 mmol) and *i*Pr₃N₃ (129 mg, 1.00 mmol) in EtOH (10 mL), was added epichlorohydrin (97.5 mg, 1.00 mmol), and the reaction mixture was left to stand for 3 days. After concentration in vacuo, the residue was separated by chromatography on silica gel (50 g), eluting with CH₂Cl₂/EtOH/conc. aq. NH₃ (250:5:1) to afford 10 (163 mg, 41%) as a mixture of 2 diastereomers (1:1); m.p. 95 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.9–1.0 (m, 12 H), 1.59–1.76 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.94 (m, *J* = 6.9, 1 H, CHMe₂ in Val), 2.58–2.65 (m, *J*_{AB} = 13, 1 H, CHHN), 2.72–2.79 (m, *J*_{AB} = 13, 1 H, CHHN), 2.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CHNH₂ in Val), 3.58 (m, 2 H, ClCH₂), 3.84 (m, 1 H, CHOH), 4.61 (m, 1 H, CHNH in Leu), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, 4-H_A), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, ppm): δ = 19.9, 19.0, 19.7, 21.8, 21.9, 23.5, 26.1, 32.7, 42.2 (CH₂), 42.3 (CH₂), 52.6 (CH₂), 52.8 (CH₂), 53.4 (CH), 53.5 (CH), 69.6 (CH), 70.1 (C11), 71.6 (CH), 121.5 (C11), 125.4 (CH), 129.8 (C11), 139.5 (C_{ipso}), 141.0 (C_{ipso}), 173.1 (CO), 176.3 (CO). MS (CI, NH₃): *m/z* (%) = 400 (19) and 398 (62) [M + H⁺], 242 (100), 209 (69). IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3290, 2959, 1643, 1603, 1548, 1500, 1468, 1445, 1388, 1310, 1249, 1197, 1075. C₂₆H₃₂N₄O₂Cl (397.93): calcd. C 60.38, H 8.05, N 10.57; found C 60.65, H 7.90, N 10.51.

(2R,5S)-N-(3-Chloro-2-hydroxypropyl)valyl(¹³C₅,¹⁵N)leucyl Anilide (10*): The title product was obtained similarly to the unlabelled compound 10 and isolated in 43% yield; m.p. 95 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.97 (dm, 6 H, *J* = 126, ¹³CH₃ in Val), 0.99 (d×2, *J* = 6.5, 6 H, Me in Leu), 1.59–1.79 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.96 (dm, *J* = 12.5, 1 H, ¹³CHMe₂ in Val), 2.62 (m, *J*_{AB} = 13, 1 H, CHHN), 2.74 (m, *J*_{AB} = 13, 1 H, CHHN), 2.91 (dm, *J* = 12.5, ¹³CHNH₂ in Val), 3.58 (m, 2 H, ClCH₂), 3.84 (m, 1 H, CHOH), 4.61 (m, 1 H, CHNH in Leu), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, 4-H_A), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, only chemical shifts of the labelled atoms are given, ppm): δ = 18.9, 19.1 (d×2, *J* = 36), 19.8 (br. d, *J* = 35), 32.8 (q, *J* = 36), 69.9 (m), 176.6 (d, *J* = 50). MS (ESI, positive mode): *m/z* (%) = 829 (100) [2M + Na⁺], 426 (27) [M + Na⁺]; negative mode: 448 (100) [M + 2Na - H⁻].

(2R,5S)-N-(2,3-Dihydroxypropyl)valylleucyl Anilide (11): To a solution of compound 7 (365 mg, 1.07 mmol) in water (5 mL) was added racemic dimer of glyceraldehyde (Fluka, 340 mg, 3.78 mmol) followed by 1,2-dichloroethane (DCE, 100 mL), Et₃N (0.142 mL, 1.00 mmol) and molecular sieves (4 Å, 17 g). The round-bottomed reaction flask was rotated on a rotary evaporator (without vacuum) for 2 h, then NaBH(OAc)₃ (1.20 g, 5.66 mmol) was added in one portion, and rotation was continued at 35 °C (bath temp.) for 2 h. TLC of the reaction mixture indicated complete consumption of the starting material and two new poorly resolved spots with lower *R_f* values (CH₂Cl₂/MeOH/conc. aq. NH₃, 100:7:1). The reaction mixture was filtered through a fritted glass filter, and the filter cake was washed with several portions of DCE (until the product spots could not be detected any more on the TLC plate). The combined organic solutions (ca. 350 mL) were washed with sat. aq. NaHCO₃ and then with brine (100 mL each). After drying and removal of the solvent in vacuo, the oily residue was subjected to chromatography on silica gel (50 g) eluting with CH₂Cl₂/MeOH/conc. aq. NH₃, 100:7:1. Compound 11 (*R_f* = 0.2) was isolated as an oil (0.22 g) which crystallized from a CHCl₃/hexane mixture to give 0.18 g (44%) of a colorless solid (1:1 mixture of 2 diastereomers).

FULL PAPER

V. N. Belov, M. Müller, O. Ignatenko, F. Hallier, A. de Meijere

The diastereomer with the higher R_f value was isolated from the bead fraction; its ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.96 (d, J = 6.8), 0.97 (d, J = 6.0), 0.98 (d, J = 7.5), 0.99 (d, J = 6.0) (Σ, 12 H), 1.60–1.78 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.99 (m, J = 6.4, 1 H, C/HMe₂ in Val), 2.58 (dd, J_{AB} = 12, J_{AX} = 6.7, 1 H, C/H₂N), 2.69 (dd, J_{AB} = 12, J_{AX} = 3.8, 1 H, C/H₂N), 2.89 (d, J = 6.4 Hz, 1 H, C/H₂N in Val), 3.54 (d, J = 6.0 Hz, 2 H, CH₂OH), 3.72 (m, 2 H, CHO), 4.60 (dd, J = 4.5 and 10, 1 H, C/HNH in Leu), 7.08 (t, J = 7.5 and 1, 1 H, 4-H_A), 7.30 (tm, J = 7.8, 2 H, 3-H_A), 7.54 (dm, J = 7.8, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃+CD₃OD, mixture of 2 diastereomers, ppm): δ = 0.73–0.82 (Σ, 12 H, 4×Me), 1.48 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.86 (m, 1 H, C/HMe₂ in Val), 2.36 (dd, J_{AB} = 12.5, J_{AX} = 6.6, C/H₂N), 2.45 (m), 2.56 (dd, J_{AB} = 12.4, J_{AX} = 3.4, Σ 2 H, C/H₂N), 2.69 and 2.72 (d×2, J = 5, Σ 1 H, CHNH in Val), 3.31–3.48 (m, 2 H, CH₂OH), 3.55 (m, 1 H, CH₂OH), 4.20 (m, 1 H, C/HNH in Leu), 6.91 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 4-H_A), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.33 (d, J = 7.4 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃+CD₃OD, mixture of 2 diastereomers, ppm): δ = 17.4, 17.6, 18.9, 21.0, 22.5, 24.5, 31.0, 40.9 (CH₂), 50.8 (CH₂), 51.52 (CH₂), 51.56 (CH), 64.1 (CH₂), 64.3 (CH₂), 68.2 (CH), 68.5 (CH), 70.4 (CH), 70.5 (CH), 120.0 (CH), 124.19 (CH), 128.5 (CH), 137.4 (C_{qu}), 171.4 (CO), 174.7 (CO), 174.8. MS (CI, NH₃): m/z (%) = 380 (100) [M + H⁺], 226 (10), 209 (22), C₂₀H₃₃N₃O₄ (379.50); calcd. C 63.30, H 8.76, N 11.07; found C 63.08, H 9.02, N 11.04.

12R/S)-N-(2,3-Dihydroxypropyl)valyl(¹³C,¹⁵N)leucyl Anilide (11)*:

The title product was obtained as described for the unlabelled compound 11 and isolated in 41% yield. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.96 (dm, J = 12.8, 6 H, ¹³CH₃ in Val), 0.97 and 0.99 (d×2, J = 5.5, 6 H, Me in Leu), 1.62 and 1.71 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.96 (dm, J = 12.0, 1 H, ¹³C/HMe₂ in Val), 2.49–2.75 (m, 2 H), 2.92 (dm, J = 12.0, ¹³C/HNH₂ in Val), 3.57 (m, 2 H, ¹³C/CH₂), 3.67 (m, 1 H, CHO), 4.60 (m, 1 H, C/HNH in Leu), 7.08 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 4-H_A), 7.29 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, only chemical shifts of the labelled atoms are given, ppm): δ = 18.8, 19.0 (d×2, J = 35), 19.8 (d, J = 35), 32.7 (q, J = 35), 69.9 (m), 176.7 (d, J = 51). MS (ESI, positive mode): m/z (%) = 793 (100) [M + Na⁺], 771 (19) [2M + H⁺], 408 (8) [M + Na⁺], 386 (18) [M + H⁺]; negative mode: 430 (19) [M + 2Na⁺ - H⁺], 384 (100) [M - H⁺].

N-Butylvalylleucyl Anilide (12): The title compound was prepared from 1 mmol of **7**, 3 mmol of freshly distilled butanal and 3 mmol of NaBH(OAc)₃ according to the method described above for compound **9**, yield 86 mg (24%), m.p. 135–137 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.9–1.0 (m, 15 H), 1.38 (m, 2 H), 1.48 (m, 2 H), 1.60–1.78 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.82 (m, J = 6.4, 1 H, C/HMe₂ in Val), 2.53 (m, 2 H, CH₂N), 2.92 (d, J = 8 Hz, 1 H, CHNH in Val), 4.62 (dd, J = 5 and 10 Hz, 1 H, CHNH in Leu), 7.09 (tm, J = 7.5 and 1, 1 H, 4-H_A), 7.28 (tm, J = 7.8, 2 H, 3-H_A), 7.55 (dm, J = 7.8, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, ppm): δ = 14.3, 19.4, 19.6, 21.5 (CH₂), 22.0, 23.5, 26.1, 32.8, 33.0 (CH₂), 42.2 (CH₂), 52.6 (CH₂), 53.4 (CH), 69.4 (CH), 121.3 (CH), 125.4 (CH), 129.8 (CH), 139.6 (C_{qu}), 172.8 (CO). MS (ESI, positive mode): m/z (%) = 745 (73) [2M + Na⁺], 362 (100) [M + H⁺]; negative mode: 360 (100) [M - H⁺]. IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3271, 3146, 3093, 2957, 2931, 2871, 1665, 1640, 1608, 1553, 1501, 1467, 1444, 1386, 1312, 1250, 1179, C₂₁H₃₅N₃O₂ (361.52); calcd. C 69.81, H 9.70, N 11.63; found C 69.87, H 9.93, N 11.54.

N-(2-Cyanoethyl)valylleucyl Anilide (13): The title compound was synthesized from equivalent amounts of **7** and acrylonitrile in the presence of *i*Pr₃NH₂ (1 equiv.) in EtOH as described for product **10**,

yield 56%, m.p. 145 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.9–1.1 (m, 12 H), 1.58–1.80 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.90 (m, J = 6.4, 1 H, C/HMe₂ in Val), 2.59 (t, J_{AB} = J_{BX} = 8, 2 H, X-part of the ABX₂-system, CH₂CN/CH₂NH), 2.78 (A-part of the ABX₂-system, J_{AB} = 13, C/HNH/C/H₂CN), 2.83 (B-part of the ABX₂-system, J_{AB} = 13, C/HNH/C/H₂NH), 2.93 (d, J = 8 Hz, 1 H, C/HNH in Val), 4.58 (dd, J = 5 and 10 Hz, 1 H, C/HNH in Leu), 7.09 (t, J = 7.5 and 1, 1 H, 4-H_A), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, ppm): δ = 18.9, 19.1 (CH₂), 19.8, 21.8, 23.5, 26.2, 32.7, 42.0 (CH₂), 45.2 (CH₂), 53.5 (CH), 69.2 (CH), 120.4 (CN), 121.4 (CH), 125.3 (CH), 129.8 (CH), 139.6 (C_{qu}), 172.9 (CO), 176.5 (CO). MS (EI): m/z (%) = 358 (5) [M⁺], 315 (8) [M⁺ - C₂H₅], 224 (9), 191 (8), 125 (100). IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3274, 3204, 3146, 3094, 2957, 2929, 2872, 2851, 2247, 1667, 1637, 1607, 1552, 1494, 1468, 1443, 1386, 1368, 1313, 1277, 1243, 1178, 1157, 1109, 1081, C₂₀H₃₀N₄O₂ (358.48); calcd. C 67.04, H 8.38, N 15.64; found C 66.99, H 8.41, N 15.58.

N-(2-Hydroxyethyl)valylleucyl Anilide (14): This compound was synthesized from **7** (342 mg, 1.00 mmol) and oxirane (44 mg, 1.00 mmol, 237 mg of 18.6% solution in THF) in the presence of *i*Pr₃NH₂ (1 mmol) in EtOH (10 mL) as described for the product **10**, yield 84 mg (24%), m.p. 119 °C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 0.9–1.0 (m, 12 H), 1.59–1.79 (m, 3 H, CH₂ and CH in Leu), 1.96 (m, J = 6.4, 1 H, C/HMe₂ in Val), 2.63 (m, 2 H, CH₂NH), 2.91 (d, J = 5.6 Hz, 1 H, CHNH in Val), 3.64 (t, J = 5.6 Hz, 2 H, CH₂OH), 4.60 (dd, J = 5 and 10 Hz, 1 H, C/HNH in Leu), 7.08 (t, J = 7.4 and 1, 1 H, 4-H_A), 7.29 (t, J = 8.1 Hz, 2 H, 3-H_A), 7.54 (d, J = 8 Hz, 2 H, 3-H_A). ¹³C NMR (75.5 MHz, [D₄]MeOH, ppm): δ = 18.9, 19.7, 19.8, 21.9, 23.5, 26.1, 32.7, 42.3 (CH₂), 51.8 (CH₂), 53.5 (CH), 62.2 (OCH₂), 69.7 (CH), 121.4 (CH), 125.4 (CH), 129.8 (CH), 139.6 (C_{qu}), 173.2 (CO), 176.7 (CO). MS (ESI, positive mode): m/z (%) = 771 (100) [2M + Na⁺], 699 (100) [2M + H⁺], 350 (28) [M + H⁺]; negative mode: 394 (100) [M + HCOO⁻], 348(48) [M - H⁺]. IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3298, 3144, 3089, 2960, 2871, 1668, 1642, 1606, 1551, 1501, 1468, 1444, 1387, 1368, 1313, 1176, 1155, 1059, C₁₉H₂₁N₃O₃ (349.47); calcd. C 65.33, H 8.88, N 12.03; found C 65.10, H 8.60, N 11.82.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. R. Machinck and his co-workers for recording NMR spectra, to Dr. H. Frauendorf, Mrs. G. Udvarnoki and Mrs. G. Krökel for measuring of the numerous mass spectra, to Mr. F. Hambloch for elemental analyses, and to Dr. B. Kniecium for his careful reading of the final version of this manuscript.

- [1] For a review see: a) M. Törnqvist, C. Fred, J. Haglund, H. Helleberg, B. Paulsson, P. Rydberg, *J. Chromatogr. B* **2002**, *778*, 279–308; b) H. H. Landin, T. Grummt, C. Laurent, A. Bates, *Mutat. Res.* **1997**, *381*, 217–226; c) H. H. Landin, D. Segerbäck, C. Damberg, S. Osterman-Golkar, *Chem.-Biol. Interact.* **1999**, *117*, 49–64; d) J. Angerer, M. Bader, A. Krämer, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1998**, *71*, 14–18; e) M. Müller, A. Krämer, J. Angerer, E. Hallier, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1998**, *71*, 499–502; f) J. Lewalter, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1996**, *68*, 519–530; g) H. H. Landin, S. Osterman-Golkar, V. Zorroc, M. Törnqvist, *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 1–6; h) L. Ehrenberg, K. D. Hiesche, S. Osterman-Golkar, I. Wennberg, *Mutat. Res.* **1974**, *24*, 83–103; i) S. Osterman-Golkar, L. Ehrenberg, D. Segerbäck, I. Hällström, *Mutat. Res.* **1976**, *34*, 1–10; j) H. G. Neumann, H. Baur, R. Wirsing, *Arch. Toxicol. Suppl.* **1980**, *3*, 69–77; k) P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 507–518.

- [2] P. Edman, A. Henschen, in: *Protein Sequence Determination* (Ed.: S. B. Needleman), Springer, Berlin, 1975, 237–279.
- [3] M. Törnqvist, J. Mowrer, S. Jensen, L. Ehrenberg, *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 255–266.
- [4] a) A. D. Yates, T. Grummt, M. Törnqvist, P. B. Farmer, F. J. van Dam, H. van Mossel, H. M. Schoemaker, S. Osterman-Golkar, C. Uebel, Y. S. Tang, A. H. Zwinderman, A. T. Natarajan, L. Ehrenberg, *Mutat. Res.* **1991**, *250*, 483–497; b) M. Törnqvist, A. I. Magnusson, P. B. Farmer, Y. S. Tang, A. M. Jeffery, L. Wazneh, G. D. T. Beulink, H. van der Waal, N. J. van Sittert, *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 357–360; c) L. Bergmark, C. I. Calleman, F. He, L. G. Costa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, *120*, 45–54; d) A. Fiddler, D. Noort, A. L. de Jong, H. C. Trap, L. P. de Jong, H. P. Benschop, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 788–792; e) R. Thier, J. Iewalter, M. Kempkes, S. Selinski, T. Bruning, H. M. Bolt, *Occup. Environ. Med.* **1999**, *56*, 197–202; f) P. Regemann, R. J. Sram, H. G. Neumann, *Arch. Toxicol.* **2001**, *74*, 680–687; g) R. Tavares, H. Borba, M. Monteiro, M. J. Proenca, N. Lynce, J. Rueff, L. Bailey, G. M. A. Sweetman, L. M. Lawrence, P. B. Farmer, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2655–2660; h) L. M. Lawrence, G. M. Sweetman, R. Tavares, P. B. Farmer, *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1996**, *16*, 139–148.
- [5] N. J. van Sittert, in: Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG Arbeitsgruppe "Analytische Chemie", 12. Lieferung (Meth.-Nr. 1, Hämoglobin-Addukte) **1996**, 2, 1–21 (D1–D9).
- [6] For a comparative study, see: P. Rydberg, B. Luning, C. A. Wachtmeister, L. Eriksson, M. Törnqvist, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 570–581.
- [7] HVal(¹³C,¹⁵N)OH with 98.5 atom.% ¹⁵N and 98.6 atom.% ¹³C (98.9% t-form) is produced by ISOTEC Inc. (USA) and was purchased from SIGMA-ALDRICH.
- [8] The amino acid sequence of Hb at the N-terminus starts from H-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Tys.
- [9] E. g., from the BACHEM company (Switzerland).
- [10] Throughout this manuscript, compound numbers marked with an asterisk * denote substances with the Val(¹³C,¹⁵N) fragment.
- [11] BocVal*OH was synthesized from HVal(¹³C,¹⁵N)OH (ref.^[7]) according to the general method described by O. Keller, W. F. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth.* **1985**, *63*, 160–169.
- [12] Deutsche Forschungsgemeinschaft, Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area, *List of MAK and BAT Values*, **2004**, Rep. No. 40.
- [13] Reductive alkylation of another dipeptide - N^ε-alanylhistidine with glyceraldehyde has been reported, but without practically important experimental details: N. Mori, Y. Bai, H. Ueno, J. M. Manning, *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 49–64.
- [14] Unlike with aldehydes, cyclopentanone and cyclohexanone, reductive alkylation with sterically more congested ketones affords the single product of monoalkylation (V. Belov, unpublished results).
- [15] Purchased from the BACHEM company (Switzerland).
- [16] L. Aurelio, J. S. Box, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, M. M. Sleebis, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2652–2667.
- [17] M. Müller, V. N. Belov, A. de Meijere, J. Bünger, B. Emmert, A. Heutelbeck, E. Hallier, *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* **2005**, *40*, 171.
- [18] a) D. Ben-Ishai, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5736–5738; b) R. L. Dorow, D. F. Gingrich, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 467–470; c) P. Allevi, M. Anastasia, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7663–7666; d) G. V. Reddy, G. V. Rao, D. S. Iyengar, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2653–2656.
- [19] a) Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. A. Kityushkin, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1962**, *11*, 1955–1961 (*Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* **1962**, *11*, 2046–2054); b) P. A. Plattner, K. Vogler, R. O. Studer, P. Quitt, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 927–935; c) A. Haseoka, Y. Nishikimi, Y. Nakayama, K. Kamiyama, M. Nakao, K. Miyagawa, O. Nishimura, M. Fujino, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 322–336; d) J. W. Skiles, V. Fuchs, C. Miao, R. Sorcek, K. G. Grozinger, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 641–662; e) G. V. Reddy, D. S. Iyengar, *Chem. Lett.* **1999**, *4*, 299–300.
- [20] Isotopically labelled ZVal*OH was prepared from HVal*OH (ref.^[7]) and ZOSu: I. M. Pastor, P. Västilä, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4031–4045.

Received: June 13, 2005

Published Online: October 12, 2005

Anlage 3**Entwicklung eines neuen Biomonitoringverfahrens zur Bestimmung des Hämoglobinadduktes *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin nach einer Epichlorhydrinexposition**

Müller M¹, Belov V², de Meijere A², Bünger J¹, Emmert B¹, Heutelbeck A¹, Hallier E¹

¹Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Georg-August-Universität Göttingen

²Kadem Custom Chem GmbH und Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen

Fragestellung / Ziel der Studie

Epichlorhydrin ist ein wichtiges Monomer zur Herstellung von Epoxidharzen und Elastomeren in der Kunststoffindustrie sowie für die Produktion von Glycerin. Die Substanz, ein direkt wirkendes Alkylans, ist als krebserzeugend (DFG-Kategorie 2) und hautsensibilisierend eingestuft. Neben der inhalativen Aufnahme kann eine Resorption über die Haut erfolgen. Epichlorhydrin wird zu 3-Chlor-1,2-propandiol und Glycidol metabolisiert (Abb. 1). Alle drei Verbindungen können mit nukleophilen Gruppen in DNA und Proteinen reagieren und bilden dasselbe Hämoglobinaddukt *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin (DHPV). Daher ist dieses Addukt als Summenparameter zur Erfassung einer Epichlorhydrinexposition besonders geeignet. Ziel der Studie war die Entwicklung eines neuen, hochempfindlichen Biomonitoringverfahrens zum Nachweis von DHPV.

Methoden

Die Dipeptide Valin-Leucin-Anilid, Valin (¹³C₅, ¹⁵N)-Leucin-Anilid, *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin-Leucin-Anilid und *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin(¹³C₅, ¹⁵N)-Leucin-Anilid wurden von der Firma Kadem Custom Chem GmbH, Göttingen, synthetisiert. Die neue Methode basiert auf dem modifizierten Edman-Abbau von Hämoglobinaddukten (van Sittert (1996)). Das so isolierte DHPV wird in einem letzten Schritt mit Aceton zum Ketal derivatisiert (Paulsson et al. (2003)). Die Quantifizierung des DHPV erfolgt durch eine Isotopenverdünnung von Nichtraucher-Poolglobinproben hinzugefügten Dipeptidadduktstandards. Dabei wird das DHPV-Derivat mit Hilfe der GC-NCI-MS nachgewiesen. Die Kalibrierung basiert auf Doppelbestimmungen und umfaßt den Bereich von 20 – 2000 pmol DHPV/g Globin.

In ersten *in vitro*-Versuchen zur Hämoglobinadduktbildung wurden Aliquote eines Nichtraucherhämolysats mit ansteigenden Konzentrationen Glycidol (25 – 500 µM) inkubiert. Die DHPV-Gehalte der Inkubationen wurden doppelt bestimmt.

Anlage 3*Ergebnisse*

Für das neue Verfahren wurden die klassischen Val-Leu-Dipeptidadduktstandards (van Sittert (1996)) weiterentwickelt. Durch Einführung von stabilen Isotopen ($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N) in das Valin entsteht eine Synthesepattform für beliebige Adduktstandards von Alkylantien. Im vorliegenden Fall wurde der *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin($^{13}\text{C}_5$, ^{15}N)-Leu-Anilid dargestellt. Damit kann zum ersten Mal das Prinzip der Isotopenverdünnung für Val-Leu-Dipeptidadduktstandards eingesetzt werden; die interne Standardisierung mit Hilfe des *N*²-Ethoxyethyl-Val-Ala-Anilids entfällt.

Nach erfolgtem modifizierten Edman-Abbau wird das isolierte DHPV in einem letzten Schritt mit Aceton zum Ketal derivatisiert (Paulsson et al. (2003)) und mittels GC-NCI-MS nachgewiesen. Für den Bereich von 20 – 2000 pmol DHPV/g Globin ergibt sich eine lineare Kalibrierfunktion ($y = 0,0008x + 0,0029$; $R^2 = 0,998$). Die Nachweisgrenze liegt bei 10 pmol DHPV/g Globin.

In ersten *in vitro*-Versuchen zur Hämoglobinadduktbildung wurden Aliquote eines Nichtraucherhämolyats mit ansteigenden Konzentrationen Glycidol (25 – 500 μM) inkubiert. Wie für ein direkt wirkendes Alkylans zu erwarten, zeigte sich eine dosisabhängige lineare Erhöhung der DHPV-Adduktspiegel ($y = 1,9434x + 45,851$; $R^2 = 0,99$). Damit konnte erstmals die Bindungskinetik von Glycidol an menschliches Hämoglobin *in vitro* demonstriert werden.

Schlußfolgerungen

Das neu entwickelte hochempfindliche Verfahren wird zur Zeit in die tägliche Meßroutine eingeführt. Es soll zum Nachweis einer Epichlorhydrinexposition und für weitere mechanistische Studien zur Globinadduktbildung Verwendung finden.

Literatur

van Sittert NJ: *N*²-Cyanoethyl-Valin, *N*²-Hydroxyethyl-Valin, *N*-Methyl-Valin (zum Nachweis einer Belastung / Beanspruchung durch Acrylnitril, Ethylenoxid sowie methylierende Substanzen) in: Deutsche Forschungsgemeinschaft: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material; hrsg. v. Greim H; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 1996, 12. Lieferung

Paulsson B, Athanassiadis I, Rydberg P, Törnqvist M: Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography / tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, (2003), 1859 - 1865

Anlage 3

Schlüsselwörter: Epichlorhydrin, Edman-Abbau, *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin
Keywords: epichlorohydrin, Edman degradation, *N*-(2,3-dihydroxypropyl) valine

PD Dr. rer. nat. Michael Müller
 Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin
 der Georg-August-Universität Göttingen
 Waldweg 37, D-37073 Göttingen
 Tel. 0551/398044, Fax 0551/396184
mmuelle3@gwdg.de

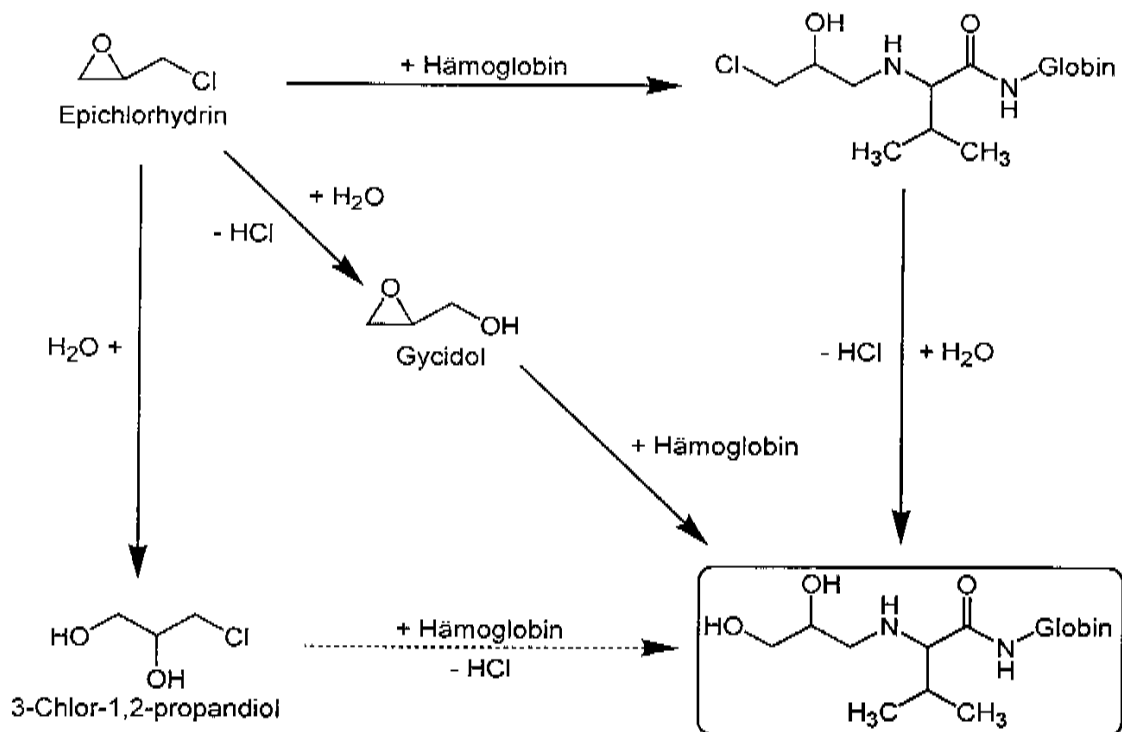


Abbildung 1:

Bildung des Hämoglobinadduktes *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin (DHPV) aus Epichlorhydrin