



Medizinische Hochschule
Hannover



Proteinadduktbestimmungen in Globinproben nach
möglicher akzidenteller Exposition gegenüber
Epichlorhydrin (Bad Münden, 09.09.2002)

*Bericht an das Niedersächsische
Ministerium für Inneres und Sport*

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

¹ Institut für Arbeitsmedizin, MHH

² Institut für Klinische Pharmakologie, MHH

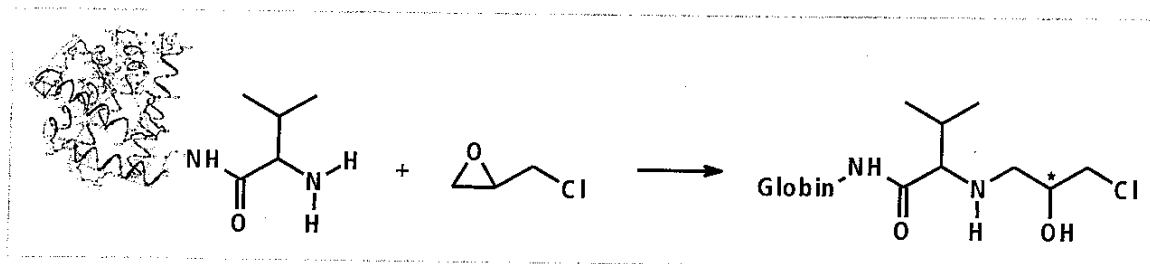
1 Einleitung

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 Münde (Deister) durch einen Zugunfall mehr als 30 Tonnen Epichlorhydrin (ECH) freigesetzt. In einer Biomonitoring-Untersuchung war zu prüfen, ob eine innere Belastung mit Proteinaddukten des Epichlorhydrins im Zusammenhang mit dem Bahnunfall nachweisbar 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 (Hindsø Landin 2000). Da das CHPV jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand spezifisch für eine ECH-Belastung ist, wurde das Primäraddukt als Zielparameter für das Biomonitoring ausgewählt.

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



2 Probenahme und Lagerung

Am 10.01.2007 erfolgte die Lieferung von 20 Globinproben aus dem Institut für Arbeitsmedizin der Universität Göttingen. Am 28.03.2007 wurden weitere 308 Proben asserviert. Alle Proben wurden bei -28 °C bis zur Analyse gelagert. Probenahme, Proteinisolierung und zwischenzeitliche Lagerung des biologischen Materials erfolgte durch den Auftraggeber, ebenso die Auswahl der insgesamt 328 Proben.

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 Wichtung):

- 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

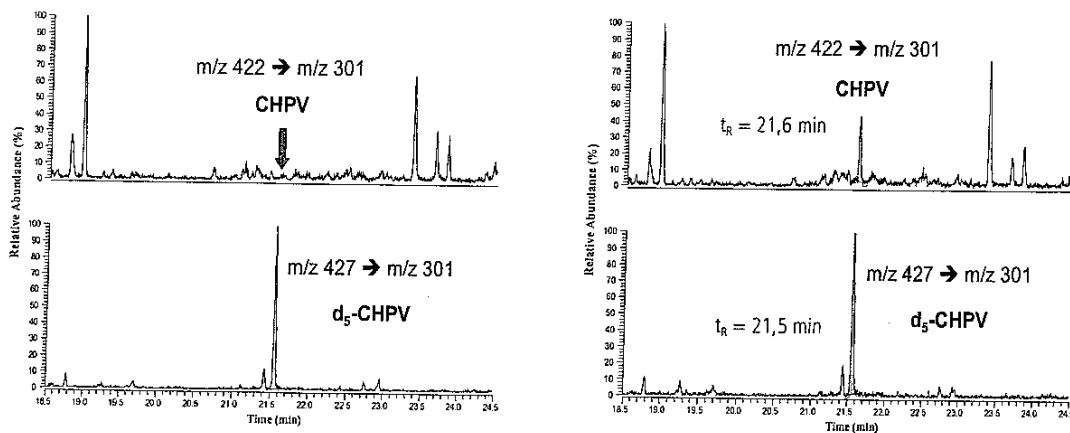
Bestimmungsgrenze
(Kalibriergeradenverfahren nach DIN EN 32 645)

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 **drei** der insgesamt 328 untersuchten Proben konnte CHPV als Addukt des Epichlorhydrins in einer Konzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze von 25 pmol/g Globin nachgewiesen werden. Die CHPV-Konzentration in diesen Proben betrug **35, 38 bzw. 45 pmol/g Globin**. Mindestens zwei der drei unter Punkt 3 genannten Identifizierungskriterien (Retentionszeit, S/N-Verhältnis, Isomerensignal) waren in diesen Fällen erfüllt.

In weiteren 11 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.

Die Ergebnisse der Biomonitoring-Untersuchungen sind als Anhang beigefügt.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Das eingesetzte Biomonitoring-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 drei der 328 Proben positiv. Über die Exposition der betreffenden Personen (Dauer des Aufenthalts am Unfallort, Entfernung vom Unfallort) liegen dem Institut für Arbeitsmedizin der MHH keine Informationen vor, so dass keine weitergehenden Betrachtungen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Analyseergebnissen und individueller Expositionssituation erfolgen können.

Hinsichtlich einer arbeitsmedizinisch-toxikologischen Bewertung wird derzeit eine Stellungnahme durch eine wissenschaftliche Arbeitsgruppe unter Koordination durch Herrn MR Dr. M. Csicsaky (Nds. Ministerium für Soziales, Frauen, Familie und Gesundheit) formuliert. Nach aktueller Bewertung beträgt die Schätzobergrenze für das rechnerisch ermittelte zusätzliche Lebenszeit-Krebsrisiko nach einmaliger Exposition gegenüber Epichlorhydrin, die zu einem Adduktspiegel von 20 pmol/g Globin führt, etwa $1,6 \times 10^{-8}$. Dieses Zusatzrisiko ist als sehr gering zu bewerten.

Hannover, den 11.10.2007

Prof. Dr. med. R. Wrbitzky

Prof. Dr. med. D.O. Stichtenoth

PD 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 den Bundesgrenzschutz vom 18. September 2003. Autoren: M. Bader, W. Rosenberger, R. Wrbitzky. Gutachten über die Biomonitoringbefunde von Einsatzkräften des Bundesgrenzschutzes nach akzidenteller Exposition gegenüber Epichlorhydrin durch den Zugunfall in Bad Münder 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

Abschlußbericht

zum Untersuchungsprogramm zur Bewertung der Folgen des Gefahrgutunfalls in Bad Münden (09.09.02) für die Einsatzkräfte der Bundespolizei

1 Allgemein

1.1 Projektleiter

Prof. Dr. med. E. Hallier und PD Dr. rer. nat. M. Müller
Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Universitätsmedizin Göttingen

1.2 Projektvorhaben

Zur Bewertung der Folgen des Gefahrgutunfalls in Bad Münden (09.09.02) für die Einsatzkräfte der Bundespolizei wird ein Untersuchungsprogramm durchgeführt.

1.3 Projektlaufzeit

01.10.2006 – 01.12.2007

1.4 Förderungsvolumen

€ 25.239,28

1.5 Koordination und finanzielle Unterstützung des Untersuchungsprogrammes

Bundespolizeipräsidium Nord, Ärztlicher und sicherheitstechnischer Dienst

Ärztlicher- und Sicherheitstechnischer Dienst
des Bundespolizeipräsidiums Nord
Postfach 1124
24569 Bad Bramstedt

Zur Kenntnis

M.P.G.

Müseler, Med DR

1.6 Kooperationspartner

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

2 Projektverlauf

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

2.1 Probenahme, Probenvorbereitung, Probentransport, Probeneingang

Die Probenahme und Isolierung des Globins erfolgte durch die Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover (Abteilungsvorstand: Prof. Dr. med. R. Wrbitzky, Laborleiter: Dr. rer. nat. M. Bader). Dabei handelte es sich um Globine, die zwischen Juli und September 2006 aus tiefgefrorenem Erythrocytenlysat (-80° C, seit Probenahme 2002) gewonnen wurden. 172 Globinproben wurden der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Universitätsmedizin Göttingen, zur Verfügung gestellt. Der Eingang aller Proben wurde dokumentiert (Probeneingangsbücher) und die Globine wurden bis zur Analyse bei -80° C gelagert.

2.2 Hämoglobinadduktbestimmung

2.2.1 Das Verfahren zur Bestimmung des Epichlorhydrin-Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV)

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Verfahren (Hindso Landin et al. 1996, van Sittert 1996) war eine neue für Felduntersuchungen geeignete Methode zur Bestimmung des ECH-spezifischen Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV) entwickelt und validiert worden (Müller et al. 2005, Anlage 1). Das dem Verfahren zugrunde liegende analytische Prinzip ist ein modifizierter Edman-Abbau und die anschließende Anreicherung, Aufreinigung und Bestimmung von DHPV mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Negativer Chemischer Ionisierung (GC-NCI-MS). Dabei ergibt sich für den Bereich von 20 – 2000 pmol DHPV/g

Globin eine lineare Kalibrierfunktion (z.B. $y = 0,0008x + 0,0029$; $R^2 = 0,998$) (Abb. 1); die Nachweisgrenze liegt bei 10 pmol DHPV/g Globin.

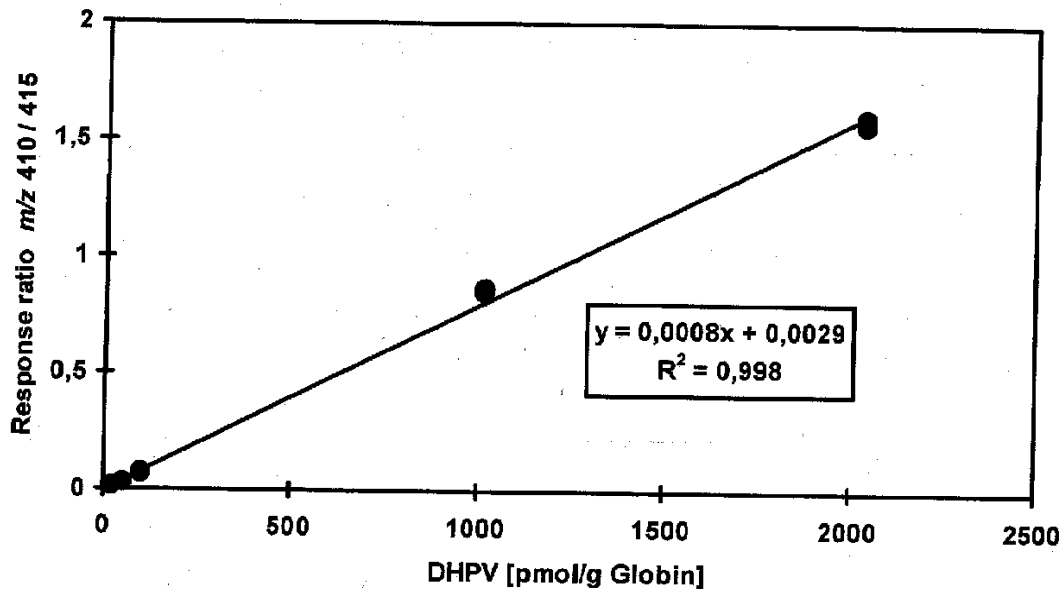


Abbildung 1: Kalibrierfunktion von DHPV (20 – 2000 pmol/g Globin)

Im Rahmen 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.

2.2.2 *Routinemessungen und interne Qualitätssicherung*

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).

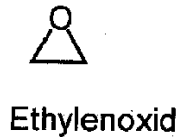
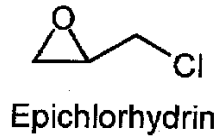
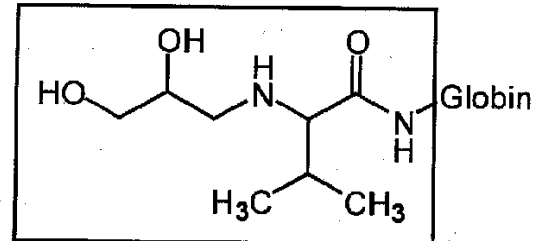
Zur internen Qualitätssicherung wurden für jede Teilmeßreihe von 7 Globinproben zusätzlich ein Kalibrierstandard (50 pmol DHPV/g Globin) oder ein mit 100 µM Glycidol modifiziertes Nichtraucheroglobin (Müller et al. 2005) analysiert.

In der Routine wurden 100 mg Globin für die Analyse eingesetzt. Bei sieben Globinproben stand nur eine reduzierte Probenmenge aufgrund vorangegangener Analysen der Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung. Die vorhandenen Globinmengen wurden vollständig eingesetzt.

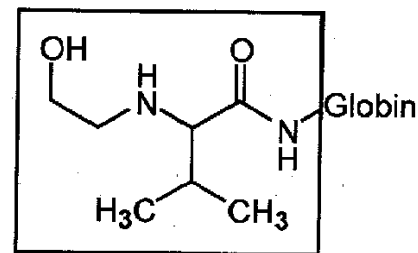
Alle 172 analysierten Proben waren auswertbar. Unter den ausgewerteten Datensätzen befand sich keine Probe mit einer Belastung (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Eine Liste der untersuchten Proben ist als Anlage 2 beigefügt.

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. 2)

Ausgangssubstanz**Hämoglobinaddukt**

DHPV



HEV

Abbildung 2: 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 entsprechen 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 Literatur

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

Müller M, Schettgen T, Bünger J, Hallier E, Angerer J (2004): Influence of the human glutathione S-transferase T1 activity on the N²-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, 531 - 533

Van Sittert NJ (1996): N²-Cyanoethyl-Valin, N²-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

Abschlußbericht

zum Forschungsvorhaben

„Hämoglobinaddukte von Epichlorhydrin – Landespolizei“

Prof. Dr. med. E. Hallier und PD Dr. rer. nat. M. Müller

Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Universitätsmedizin Göttingen

Abschlußbericht

zum Forschungsvorhaben „Hämoglobinaddukte von Epichlorhydrin – Landespolizei“

1 Allgemein

1.1 Projektleiter

Prof. Dr. med. E. Hallier und PD Dr. rer. nat. M. Müller
Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Universitätsmedizin Göttingen

1.2 Projektvorhaben

Zur Bewertung der Folgen des Gefahrgutunfalls in Bad Münden (09.09.02) für die Einsatzkräfte der Landespolizei wird ein Forschungsvorhaben durchgeführt.

1.3 Projektlaufzeit

01.10.2006 – 15.12.2007

1.4 Förderungsvolumen

€ 8.070,70

1.5 Koordination und finanzielle Unterstützung des Untersuchungsprogrammes

Zentrale Polizeidirektion, Dezernat 22

1.6 Kooperationspartner

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

2 Projektverlauf

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

2.1 Probenahme, Probenvorbereitung, Probentransport, Probeneingang

Die Probenahme und Isolierung des Globins erfolgte durch die Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover (Abteilungsvorstand: Prof. Dr. med. R. Wrbitzky, Laborleiter: Dr. rer. nat. M. Bader). Dabei handelte es sich um Globine, die zwischen Juli und September 2006 aus tiefgefrorenem Erythrocytenlysat (-80° C, seit Probenahme 2002) gewonnen wurden. 55 Globinproben wurden der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Universitätsmedizin Göttingen, zur Verfügung gestellt. Der Eingang aller Proben wurde dokumentiert (Probeneingangsbücher) und die Globine wurden bis zur Analyse bei -80° C gelagert.

2.2 Hämoglobinadduktbestimmung

2.2.1 Das Verfahren zur Bestimmung des Epichlorhydrin-Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV)

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Verfahren (Hindso Landin et al. 1996, van Sittert 1996) war eine neue für Felduntersuchungen geeignete Methode zur Bestimmung des ECH-spezifischen Hämoglobinadduktes N-2,3-Dihydroxypropyl-Valin (DHPV) entwickelt und validiert worden (Müller et al. 2005, Anlage 1). Das dem Verfahren zugrunde liegende analytische Prinzip ist ein modifizierter Edman-Abbau und die anschließende Anreicherung, Aufreinigung und Bestimmung von DHPV mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Negativer Chemischer Ionisierung (GC-NCI-MS). Dabei ergibt sich für den Bereich von 20 – 2000 pmol DHPV/g

Globin eine lineare Kalibrierfunktion (z.B. $y = 0,0008x + 0,0029$; $R^2 = 0,998$) (Abb. 1); die Nachweisgrenze liegt bei 10 pmol DHPV/g Globin.

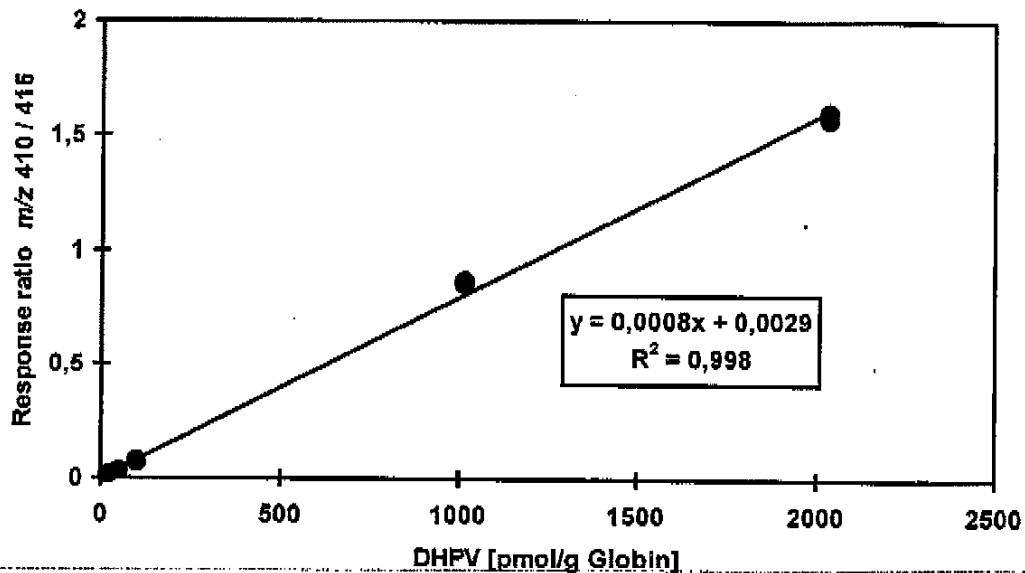


Abbildung 1: Kalibrierfunktion von DHPV (20 – 2000 pmol/g Globin)

Im Rahmen 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.

2.2.2 *Routinemessungen und interne Qualitätssicherung*

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 7 Globinproben zusätzlich ein Kalibrierstandard (50 pmol DHPV/g Globin) oder ein mit 100 µM Glycidol modifiziertes Nichtraucheroglobin (Müller et al. 2005) analysiert.

In der Routine wurden 100 mg Globin für die Analyse eingesetzt. Bei zwölf Globinproben stand nur eine reduzierte Probenmenge aufgrund vorangegangener Analysen der Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung. Die vorhandenen Globinmengen wurden vollständig eingesetzt.

Alle 55 analysierten Proben waren auswertbar. Unter den ausgewerteten Datensätzen befand sich keine Probe mit einer Belastung (Nachweisgrenze: 10 pmol DHPV/g Globin). Eine Liste der untersuchten Proben ist als Anlage 2 beigelegt.

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. 2)

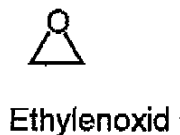
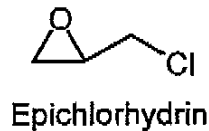
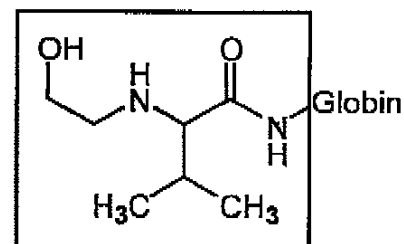
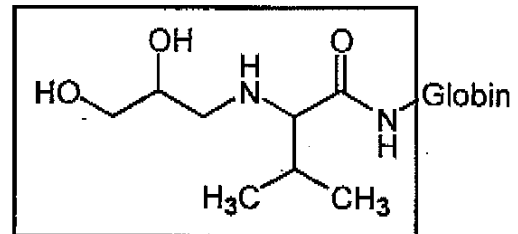
Ausgangssubstanz**Hämoglobinaddukt**

Abbildung 2: 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 entsprechen 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 Literatur

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

Müller M, Schettgen T, Büniger J, Hallier E, Angerer J (2004): Influence of the human glutathione S-transferase T1 activity on the N²-hydroxyethylvaline adduct levels in non-smokers and smokers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, Suppl 1, R 140

Müller M, Betov V, de Meijere A, Büniger 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, 531 - 533

Van Sittert NJ (1996): N²-Cyanoethyl-Valin, N²-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

Entwicklung eines neuen Biomonitoring- verfahrens zur Bestimmung des Hämoglobin- adduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin nach einer Epichlorhydrinexposition

M. Müller¹, V. Belov², A. de Meijere², J. Büniger¹, B. Emmert¹, A. Heutelbeck¹, E. Hallier¹

¹Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin, Georg-August-Universität Göttingen; ²Kadem Custom Chem GmbH und Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen

Fragestellung und 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

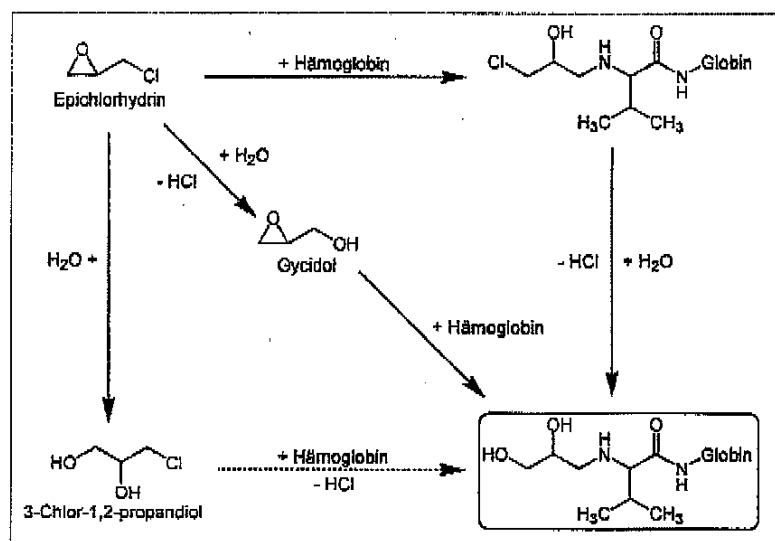


Abb. 1: Bildung des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin (DHPV) aus Epichlorhydrin

P032

Posterbeiträge - Biomonitoring I

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 Nichtraucherhämolyats mit ansteigenden Konzentrationen Glycidol (25 bis 500 µM) inkubiert. Die DHPV-Gehalte der Inkubationen wurden doppelt bestimmt.

Ergebnisse

Für das neue Verfahren wurden die klassischen Val-Leu-Dipeptidadduktstandards (van Sittert 1996) weiterentwickelt. Durch Einführung von stabilen Isotopen (13C5, 15N) in das Valin entsteht eine Synthesepattform für beliebige Adduktstandards von Alkylanzien. Im vorliegenden Fall wurde der N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin (13C5,15N)-Leu-Anilid dargestellt. Damit kann zum ersten Mal das Prinzip der Isotopenverdünnung für Val-Leu-Dipeptidadduktstandards eingesetzt werden; die interne Standardisierung mit Hilfe des N2-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.

P 039

Posterbeiträge – Biomonitoring I

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

- 1 van Sittert NJ: N2-Cyanoethyl-Valin, N2-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. Grelm H; Weinheim, Wiley-VCH, 1996, 12. Lieferung
- 2 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 12003; 7: 1859–1865