

**Simultanbestimmung von
Hexachlorbenzol (HCB), polychlorierten
Biphenylen (PCB 138, PCB 153, PCB 180) und
Pentachlorphenol (PCP) in Humanproben**

Rolf Eckard, Andreas K. Günsel, Lorenz Dobler,
Gerhard A. Wiesmüller

Umweltprobenbank des Bundes – Teilbank für Humanproben und
Datenbank

Universitätsklinikum Münster, Domagkstr. 11, D-48149 Münster

Inhaltsverzeichnis

1	Umweltprobenbank des Bundes	2
2	Einleitung.....	2
3	Ziel und Anwendungsbreite der Methode	2
4	Prinzip der Methode.....	2
5	Materialien	3
6	Geräte.....	3
7	Methodendurchführung	3
	7.1 Extraktion	3
	7.2 Derivatisierung	4
	7.3 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie.....	4
	7.4 Validierung	4
8	Literatur	5

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung
von Umwelt- und Humanproben**

Stand: August 2009, V 2.0

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) unter fachlicher und administrativer Koordinierung des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe.

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Einleitung

Die Zugehörigkeit verschiedener humanrelevanter Verbindungen zur Substanzklasse der chlorierten Kohlenwasserstoffe (CKWs) ist weitgehend durch deren physikochemische Eigenschaften geprägt, wobei vor allem hohe Lipophilie und geringe Biodegradation wesentliche Merkmale für deren Verteilung und Anreicherung in der Biosphäre sind. Für den Menschen ergeben sich durch Anreicherungs- und Selektionsprozesse im Verlaufe der Bioakkumulation humanspezifische Verteilungsmuster der einzelnen Verbindungen, wobei sowohl aromatische wie auch aliphatische hochchlorierte CKWs von Bedeutung sind. Unter ihnen finden sich auch HCB sowie die polychlorierten Biphenyle (PCBs) Nr. 138, 153 und 180. Vom Wirkmechanismus her sind diese Substanzen als potentiell neurotoxisch, hepatotoxisch und reproduktionstoxisch anzusehen. Auf Grund analoger physikochemischer Eigenschaften ergeben sich methodologische Grundlagen zur simultanen Bestimmung aller chlorierten Kohlenwasserstoffe im Sinne einer Profilanalyse (fingerprint).

Pentachlorphenol (PCP) gehört auf Grund seiner früheren vielfältigen Anwendung als Holzschutzmittel, Herbizid und Fungizid zu den ubiquitär nachweisbaren anthropogenen Substanzen von besonderer humantoxikologischer Bedeutung. Wie alle chlorierten Phenole zeigt PCP jedoch eine nur geringe Tendenz zur Akkumulation in der Biosphäre und zur Persistenz im menschlichen Organismus. Die feststellbare Belastung des Menschen mit chlorierten Phenolen, insbesondere PCP, ist zum Teil das Resultat primärer endogener Biotransformationsreaktionen, denen in geringem Umfang auch die persistierenden stark lipophilen Chlorkohlenwasserstoffen wie Hexachlorbenzol (HCB) oder die polychlorierten Biphenyle (PCBs) im menschlichen Organismus unterworfen sind und die zu renal eliminierbaren phenolischen Metaboliten führen.

3 Ziel und Anwendungsbreite der Methode

Die Methode ermöglicht die spezifische Erfassung und Bestimmung der Verteilungsmuster von HCB, PCP sowie PCB 138, PCB 153 und PCB 180 in lipophilen sowie von PCP in hydrophilen Humanproben. Durch Variation der spezifischen massenselektiven Detektionsbedingungen der negativ chemischen Ionisation kann die Methode auf andere halogenierte Phenole und weitere hochhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe ausgeweitet werden.

4 Prinzip der Methode

Aliquote Teile des Probenmaterials (Urinproben nach saurer Hydrolyse der entsprechenden Glucuronid-/Sulfat-Konjugate) werden bei pH-Werten kleiner pH 3 unter Zusatz von Pentachlorphenol-Ethylether (PCP-O-Et), PCB 166 und PCB 174 als innere Referenzsubstanz mit Hexan/Aceton (8:2) extrahiert, die Extrakte mit Diazomethan versetzt und nach erfolgter Methylierung und Trocknung (Na_2SO_4) über eine Florisilsäule gereinigt. Der gereinigte Extrakt wird im schwachen Vakuum vorsichtig bis fast zur

Trockne eingeengt und in ca. 50 µl Heptan aufgenommen. Pentachlorphenol als gut GC-gängiger Methylether (PCP-O-Me) und HCB sowie die PCB als unveränderte Substanz werden kapillargaschromatographisch-massenfragmentographisch in negativ-chemischer Ionisation (NCI-mode) gegen das Fragment-analoge PCP-O-Et sowie PCB 166 (Hexachlorbiphenyl) und PCB 174 (Heptachlorbiphenyl) bestimmt. Das für halogenierte aromatische Verbindungen sehr empfindliche und hochselektive massenfragmentographische Detektionsverfahren erlaubt es, geringe Probenvolumina einzusetzen sowie auf weitergehende Clean-up-Verfahren zu verzichten. Durch die Wahl von PCP-O-Et als innere Referenz in Verbindung mit den nahezu gleichartigen physikochemischen Eigenschaften von HCB, PCP-O-Me und PCP-O-Et werden etwaige Verdampfungsverluste der leicht flüchtigen Komponenten beim Einengen der Lösung reproduzierbar kompensiert.

5 Materialien

Die verwendeten Lösemittel (Hexan, Heptan, Aceton, Diäthylether, Methanol und Propanol-2) sollen analytische Qualität aufweisen; alle Chargen wie auch die eingesetzten Festchemikalien werden hinsichtlich störender Verunreinigungen überprüft und gegebenenfalls ersetzt oder gereinigt.

HCB-, PCP- und PCB-Standards können als Pestizid-Referenzmaterialien, z. B. durch Dr. S. Ehrenstorfer National Physical Laboratory, Augsburg, bezogen werden. Diazomethan in ätherischer Lösung wird in Analogie zum Standard-Verfahren aus N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (Aldrich) unter Verwendung eines Methanol/Isopropanol-Gemisches anstelle von Ethanol hergestellt. Die ätherische Diazomethan-Lösung ist bei -25°C gelagert ca. 4 Wochen verwendbar.

6 Geräte

Die Flüssig-Flüssigextraktionen werden an mechanisch bewegten Dreh-Schüttelapparaturen durchgeführt, deren Bewegungsfrequenz so

geregelt wird, dass eine Emulsionsbildung weitgehend vermieden wird. Zur Phasentrennung evtl. gebildeter Emulsionen ist eine Labor-Rotationszentrifuge mit einer Drehzahl von etwa 4000 Upm erforderlich. Das Einengen von Extrakten und das Abdampfen von Lösemitteln erfolgt mit Rotationsverdampfern unter kontrolliert reduzierten Druckverhältnissen.

Die chromatographische Trennung erfolgt durch einen temperaturkontrollierbaren kapillarsäulenbestückten Gaschromatographen mit gesplittetem Injektor-System. Als Trennsäule wird typischerweise eine 30 m-fused-silica Kapillarsäule DB-5 mit 0,25 mm I.D. eingesetzt. Für die massenspektrometrische Detektion ist ein Quadrupol-Massenspektrometer mit einer Einrichtung zur negativ chemischen Ionisation erforderlich.

7 Methodendurchführung

7.1 Extraktion

Für Blutplasma und Urin werden gleichsinnige Extraktionsverfahren eingesetzt. Entsprechend der etwa 4-fach höheren Konzentrationen von PCP in Humanblutplasma im Vergleich zu Urinproben (24-h-Urin) werden unterschiedliche Ausgangsvolumina vorgegeben. Da nur etwa 20-30% der renal ausgeschiedenen Gesamtmenge an PCP als nicht konjugierte Fraktion vorliegt, muss zur Bestimmung der Gesamtausscheidung an PCP im Urin vor Extraktion die Konjugat-Fraktion hydrolysiert werden.

7.1.1 Extraktion von Blutplasma

1 ml der Humanblutplasma-Probe werden mit 2 ml 1 n HCl angesäuert und mit 5 ml eines Hexan/Aceton (8:2) - Gemisches unter Zugabe von 0,2 ng PCP-O-Et, 0,025 ng PCB 166 und 2 ng PCB 174 in 100 µl i-Octan als innere Referenz in einem 10-ml-Sovirel-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss und teflonbeschichteter Dichtung 60 min auf einer mechanisch bewegten Dreh-Schüttelapparatur extrahiert und dann bis zur Phasentrennung zentrifugiert.

7.1.2 Hydrolyse und Extraktion von Urinproben

4 ml Urin werden mit 1 ml konz. HCl und 2 ml eines Hexan/Acetongemisches (8:2) im verschlossenen 10-ml-Sovirel-Röhrchen 3 Std auf 65°C erhitzt. Nach Abkühlen werden weitere 2 ml des Hexan/Acetongemisches sowie 2 ng PCP-O-Et (innere Referenz) in 100 µl i-Octan zugesetzt und wie bei 7.1.1 extrahiert.

7.2 Derivatisierung

Nach dem Zentrifugieren des Extraktes wird die organische Phase abgetrennt und mit 300 µl einer ätherischen Diazomethan-Lösung (Abzug!) bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Verflüchtigung überschüssigen Diazomethans unter dem Abzug wird der nun farblose Extrakt mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, Säulenchromatographisch gereinigt [1,3 g Florisil PR (60-100 mesh) in einer kleinen Glassäule (7,5 x 1,2 cm; 1,5 cm Füllhöhe); 2x mit je 5 ml Hexan eluiert], im 25-ml-Spitzkolben NS 14,5 unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer auf etwa 100 µl eingengt (Wasserbadtemperatur 40°C) und in entsprechende Sampler- bzw. Probenfläschchen zur Analyse überführt.

7.3 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

7.3.1 Durchführung der Kapillargaschromatographie

Jeweils 1-2 µl-Aliquote der vorbereiteten Extrakte werden zur gaschromatographischen Trennung injiziert.

Gaschromatographische Bedingungen:

- 30-m-fused silica Quarzkapillare DB-5, 0,25 I.D., 0,25 µm
- Splitverhältnis 1:20; Aufgabe splitless für 1 min
- Trägergas: Helium 18 psi Vordruck
- Temperatur: Einlass 290°C; Ofen 110-280°C mit Temperaturprogramm Anstieg linear 8°C/min; Transferline 285°C

Massenspektrometrische Detektionsbedingungen:

- Quadrupol-Massenfilter mit negativ chemischer Ionisation (NCI)
- Reaktionsgas: Methan 2.5; Ionenquellendruck 1,5 x 10⁻⁶ Torr optimiert
- Temperatur Ionenquelle: 150°C
- Massendetektion: NCI-MID-Descriptor bei m/e 231, 280, 286, 360 und 394

7.3.2 Charakterisierung und Quantifizierung der GC/MS-Signale

- Zuordnung der Signale nach Retention und Fragmentierung der authentischen Verbindungen.
- Quantifizierung der GC/MS-Signale im Single-Ion Modus der Signale bei m/e 280 (PCP-O-Me), m/e 286 (HCB), m/e 360 (PCB 138 und 153) sowie m/e 394 (PCB 180) durch automatische Flächenintegration; Quantifizierung durch Peakflächenvergleich gegen PCP-O-Et (m/e 231) PCB 166 (m/e 360) und PCB 174 (m/e 394) als innere Referenz gegen analoge externe Parallelstandards.

7.4 Validierung

Methodenkontrolle:

Zur Überprüfung der Methode werden in den täglichen Serien zu den Proben vergleichende Referenz- und Standardextrakte mitgeführt:

- a. quantitative gaschromatographisch-massenfragmentographische Kontrolle einer Testlösung der zu bestimmenden Komponenten
- b. Mitführung von Blank- bzw. Reagenzien-Leerwerten zur Überprüfung etwaiger externer Kontamination
- c. Überprüfung der Linearität im Messbereich durch gespikete Proben
- d. Teilnahme an Ringversuchen

Nachweisgrenze:

Die gaschromatographisch-massenfragmentographische Nachweisgrenze bei einem Signal/Rauschverhältnis von 5:1 liegt für HCB bei ca. 0,01 pg, für PCP-O-Me bei ca. 0,2 pg, für PCB 138 und 153 bei ca. 0,5 pg sowie für PCB 180 bei 0,1 pg.

Wiederholbarkeit:

Als Maß für die Wiederholbarkeit des Gesamtverfahrens von der Extraktion bis zur Detektion bei einer von Tag zu Tag - Bestimmung ergibt sich für HCB, PCP sowie PCB 138, 153 und 180 in Serumproben (n = 25) ein Variationskoeffizient von ca. 5%.

8 Literatur

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); www.umweltprobenbank.de