

Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
und
Institut für Toxikologie und Umwelthygiene
der Technischen Universität München

**Bestimmung von Ethylenglykol, Glykolsäure und Oxalsäure aus
biologischen Proben mittels Gaschromatographie und
massenselektiver Detektion - Untersuchungen am
Ethylenglykol-exponierten Probanden**

Jörn Carstens

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. G. Filser

2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 15.07.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 24.07.2003 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 1999 bis Juli 2003 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J.G. Filser im Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, GmbH, Neuherberg

Herrn Prof. Dr. J.G. Filser danke ich besonders herzlich für die interessante Aufgabenstellung, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und für viele anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. Hiller danke ich sehr für die Bereitschaft, diese Arbeit an der Fakultät für Chemie zu vertreten.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Csanády und Herrn Dr. T. Faller bedanke ich mich ganz herzlich für wertvolle Hinweise bei der Erstellung dieses Manuskripts und für zahlreiche fruchtbare Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. S. Halbach und Herrn Dr. W. Kirchinger danke ich für die medizinische Unterstützung bei der Gewinnung der zahlreichen Blutproben.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Toxikokinetik“ danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre.

Ich danke allen meinen Freunden, meinen Brüdern und besonders Friederike, die mich durch die ganze Arbeit hindurch auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung herzlich danken, durch die sie mir mein Studium und auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung und Aufgabenstellung | 1 |
| 1.1 | Zielsetzung der Arbeit..... | 1 |
| 1.2 | Eigenschaften, Herstellung und Verwendung | 2 |
| 1.3 | Metabolismus und Toxizität | 3 |
| 1.3.1 | Metabolismus von Ethylenglykol | 3 |
| 1.3.2 | Toxizitätsstudien und mechanistische Untersuchungen an Versuchstieren | 5 |
| 1.3.3 | Toxizität von Ethylenglykol beim Menschen..... | 8 |
| 1.3.4 | Inhalation von Ethylenglykol und Belastung am Arbeitsplatz..... | 9 |
| 1.4 | Methoden zur Bestimmung von Ethylenglykol, Glykolsäure und Oxalsäure aus Blut, Urin und Wasser | 11 |
| 1.5 | Aufgabenstellung | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 13 |
| 2.1 | Chemikalien..... | 13 |
| 2.2 | Geräte | 13 |
| 2.3 | Proband für die Humanexposition | 15 |
| 2.4 | Analytische Methoden..... | 15 |
| 2.4.1 | Arbeitsmethoden | 15 |
| 2.4.2 | Bestimmung von Ethylenglykol | 15 |
| 2.4.2.1 | Probenaufarbeitung | 16 |
| 2.4.2.2 | Gaschromatographische Bedingungen..... | 17 |
| 2.4.2.3 | Eichung und quantitative Auswertung | 19 |
| 2.4.2.4 | Wiederfindung, Präzision und Stabilität | 20 |
| 2.4.3 | Bestimmung von Glykolsäure | 21 |
| 2.4.3.1 | Probenaufarbeitung | 21 |
| 2.4.3.2 | Gaschromatographische Bedingungen..... | 23 |
| 2.4.3.3 | Eichung und quantitative Auswertung | 24 |
| 2.4.3.4 | Wiederfindung, Präzision und Stabilität | 25 |
| 2.4.4 | Bestimmung von Oxalsäure..... | 26 |
| 2.4.4.1 | Probenaufarbeitung | 26 |
| 2.4.4.2 | Gaschromatographische Bedingungen..... | 27 |
| 2.4.4.3 | Eichung und quantitative Auswertung | 28 |

Inhalt

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.4.4 | Wiederfindung, Präzision und Stabilität | 28 |
| 2.4.4.5 | Verhältnis der Ionen m/z 263 zu 261 im Urin bei nicht-exponierten Personen | 29 |
| 2.5 | Exposition eines Probanden gegen [¹³ C ₂]Ethylenglykoldämpfe | 29 |
| 2.5.1 | Expositionssystem..... | 30 |
| 2.5.2 | Durchführung der Exposition | 30 |
| 2.5.3 | Blutabnahme und Gewinnung von Plasma..... | 31 |
| 2.5.4 | Urinsammlung | 32 |
| 2.6 | Toxikokinetische Berechnungen..... | 33 |
| 2.7 | Statistik..... | 35 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Analytische Methoden..... | 37 |
| 3.1.1 | Bestimmung von Ethylenglykol | 37 |
| 3.1.1.1 | GC/MSD-Analyse von Ethylenglykol, Propylenglykol und 1,3-Propanediol..... | 37 |
| 3.1.1.2 | Eichung und quantitative Auswertung | 45 |
| 3.1.1.3 | Validierung der Methode zur Bestimmung von Ethylenglykol..... | 48 |
| 3.1.2 | Bestimmung von Glykolsäure | 49 |
| 3.1.2.1 | GC/MSD-Analyse von Glykolsäure, [D ₆]Bernsteinsäure und 2-Hydroxyisovaleriansäure..... | 49 |
| 3.1.2.2 | Eichung und quantitative Auswertung | 56 |
| 3.1.2.3 | Validierung der Methode zur Bestimmung von Glykolsäure..... | 58 |
| 3.1.3 | Bestimmung von Oxalsäure..... | 60 |
| 3.1.3.1 | GC/MSD-Analyse von Oxalsäure und Bernsteinsäure | 60 |
| 3.1.3.2 | Eichung und quantitative Auswertung | 65 |
| 3.1.3.3 | Validierung der Methode zur Bestimmung von Oxalsäure..... | 68 |
| 3.1.3.4 | Verhältnis der Ionen m/z 263 zu 261 im Urin bei nicht-exponierten Personen | 70 |
| 3.2 | Humanexposition | 71 |
| 3.2.1 | Aufgenommene Dosis..... | 71 |
| 3.2.2 | Messungen in Plasma | 72 |
| 3.2.3 | Toxikokinetische Berechnungen..... | 73 |
| 3.2.4 | Messungen im Urin | 74 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | Diskussion | 77 |
| 4.1 | Analytische Methoden..... | 77 |
| 4.1.1 | Suche nach geeigneten Verfahren..... | 77 |
| 4.1.2 | Bestimmung von Ethylenglykol | 80 |
| 4.1.3 | Bestimmung von Glykolsäure | 82 |
| 4.1.4 | Bestimmung von Oxalsäure..... | 85 |
| 4.2 | Humanexposition | 90 |
| 4.2.1 | Expositionssystem..... | 90 |
| 4.2.2 | Messungen in Plasma und Urin | 90 |
| 4.2.3 | Gesundheitsrelevanz einer Exposition gegen EG am Arbeitsplatz..... | 93 |
| 4.3 | Ausblick..... | 93 |
| 5 | Zusammenfassung | 94 |
| 6 | Abkürzungen | 96 |
| 7 | Literatur | 98 |

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ethylenglykol ist eine wichtige Industriechemikalie. Sie wird unter anderem als Frostschutzmittel, Wärme- oder Kälte transportflüssigkeit, zur Herstellung von Kunststoffen und zur Enteisung von Flugzeugen verwendet. Hieraus resultieren nicht nur Expositionen am Arbeitsplatz, sondern es ist auch möglich, dass Teile der Allgemeinbevölkerung gegen Ethylenglykol exponiert werden.

Für die Exposition gegen Ethylenglykoldämpfe und -aerosole am Arbeitsplatz sind zwar Maximalwerte vorgeschrieben (MAK-Wert in Deutschland: 10 ppm (26 mg/m³); TLV-C in den USA: 100 mg/m³), jedoch ist bisher nicht untersucht, welche Belastungen des Organismus hieraus resultieren.

Vergiftungen infolge oraler Aufnahme von Ethylenglykol sind schon lange bekannt. Charakteristisch sind zuerst Wirkungen auf das zentrale Nervensystem, gefolgt von einer Azidose und anschließenden Nierenschäden. Die zuerst einsetzenden betäubenden Effekte werden auf Ethylenglykol selbst, die anderen vorwiegend auf die Metaboliten Glykolsäure und Oxalsäure zurückgeführt. Die Glykolsäure gilt als Verursacherin der metabolischen Azidose. Die wenig löslichen Kalziumsalze der Oxalsäure bilden vorwiegend in den Nierentubuli kristalline Niederschläge, auf welche die Nierenschädigungen zurückgeführt werden. Letztere können auch durch die metabolische Azidose hervorgerufen werden. Darüber hinaus wirkt Ethylenglykol bei Ratten und Mäusen embryotoxisch. Diese Wirkung wird durch die gebildete Glykolsäure hervorgerufen.

Beide Säuren sind auch „endogen“ vorhanden, denn sie werden durch den Intermediärstoffwechsel gebildet und direkt mit der Nahrung aufgenommen. Hieraus resultiert eine gewisse, unvermeidbare Hintergrundbelastung.

Die bisher bekannten Analysenmethoden sind weder dazu geeignet, die geringen Mengen an Ethylenglykol zu bestimmen, wie sie nach einer Exposition gegen Ethylenglykoldämpfe zu erwarten sind, noch können die aus dem Ethylenglykol gebildeten Metaboliten Glykolsäure und Oxalsäure von dem endogenen Hintergrund unterschieden werden. Um die aus Ethylenglykolexpositionen resultierenden Belastungen quantifizieren zu können, sollen deshalb im Rahmen dieser Arbeit sensitive und selektive analytische Methoden zur Bestimmung von Ethylenglykol und

Glykolsäure aus Blut sowie von Ethylenglykol, Glykolsäure und Oxalsäure aus Urin entwickelt werden. Zur Validierung der Methoden soll ein Proband gegen dampfförmiges $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Ethylenglykol exponiert werden. In den dabei gewonnenen Proben sollen die genannten Stoffe sowohl markiert (expositionsbedingt) als auch unmarkiert (Hintergrund) bestimmt werden.

1.2 Eigenschaften, Herstellung und Verwendung

Ethylenglykol (1,2-Ethandiol; CAS-Nr. 107-21-1) wird im Folgenden mit EG bezeichnet. Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 62,07 g/mol und bei 20°C eine Dichte von 1,113 g/ml. EG ist eine farblose, viskose, süß schmeckende und stark hygroskopische Flüssigkeit mit einem Schmelzpunkt von -11,5°C und einem Siedepunkt von 198°C (Falbe und Regitz, 1990). Der Dampfdruck beträgt 0,08 hPa bei 20°C (DFG, 1991). Am Arbeitsplatz kann EG sowohl als Dampf als auch als Aerosol vorliegen.

EG ist mischbar mit Wasser, Alkoholen, Aceton und vergleichbaren Ketonen sowie mit Essigsäure. Es ist schlecht löslich in Diethylether (1:200) und unlöslich in Benzol, chlorierten Kohlenwasserstoffen, Petrolether oder Ölen (Budavari *et al.*, 1996).

Hergestellt wird EG durch die Reaktion von Wasser mit Ethylenoxid, welches wiederum durch die Oxidation von Ethylen an einem Silberkatalysator gewonnen wird. Ethylen wird durch thermisches Cracken von Erdöl oder Erdgas erhalten (Falbe und Regitz, 1990). Eine weitere großtechnische Methode zur EG-Gewinnung beruht auf der Oxidation von Ethylen in der Anwesenheit von Essigsäure. Durch die anschließende Hydrolyse des Acetats entstehen EG und Essigsäure. Die Essigsäure wird dann im Prozess wieder eingesetzt (Cavender und Sowinski, 2001).

EG findet Verwendung als Frostschutzmittel, als Wärme- bzw. Kältetransportflüssigkeit, zur Enteisung von Flugzeugen und als Zusatz- / Lösungsmittel für Farben und Tinten. Weiterhin ist es ein wichtiges Ausgangsprodukt in der Kunststoffindustrie. Es dient zur Herstellung von Polyesterkunststoffen, speziell Polyethylenterephthalat (PET-Getränkeflaschen), und auch von Polyurethanen. Ferner ist es Ausgangsprodukt für die Synthesen von Dioxan, Sprengstoffen (z.B. Dinitroethylenglykol) und Glyoxal (Budavari *et al.*, 1996; Falbe und Regitz, 1990).

Die EG-Produktion in Westeuropa (EU mit Norwegen und Schweiz) lag im Jahr 2001 bei 1100 Kilotonnen (CEFIC, 2002). In den USA wurden 1995 ungefähr 2400 Kilotonnen produziert (Chemical and Engineering News, 1996, zitiert nach Staples *et al.*, 2001).

1.3 Metabolismus und Toxizität

1.3.1 Metabolismus von Ethylenglykol

EG wird vorwiegend in der Leber metabolisiert (Richardson, 1973). Der Metabolismus von EG ist in Abb. 1 dargestellt (in Anlehnung an Cavender und Sowinski, 2001; DFG, 1991). Im ersten Schritt wird EG zu Glykolaldehyd oxidiert. Dies geschieht vorwiegend im Cytosol, katalysiert durch die Alkoholdehydrogenase (von Wartburg *et al.*, 1964; Wagner *et al.*, 1983). Auch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CPY) im endoplasmatischen Reticulum sind an der Oxidation von EG beteiligt. So ergaben Inkubationsversuche mit Rattenleber-Homogenat (EG 50 mmol/l), dass EG zu ungefähr 26% durch das NADPH-abhängige mikrosomale System umgesetzt wurde (Rajagopal und Ramakrishnan, 1994). In anderen Arbeiten wurde die Beteiligung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen an der Oxidation von EG zu Formaldehyd gezeigt (Clejan und Cederbaum, 1992; Kukielka und Cederbaum, 1991; Kukielka und Cederbaum, 1995). In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass diese Umsetzung durch die vorherige Induktion des Isoenzym CYP2E1 gesteigert werden konnte.

Der Glykolaldehyd wird durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase und die cytosolische Aldehydoxidase zu Glykolsäure (GA) weiteroxidiert (Wiener und Richardson, 1988). Daneben kann Glykolaldehyd auch zu Glyoxal oxidiert werden (z.B. Loeppky und Goelzer, 2002). Schließlich ist zu erwarten, dass der Glykolaldehyd mit Thiaminpyrophosphat in „reaktiven Glykolaldehyd“ überführt und dann in der Transketolase-Reaktion zur Bildung von Ketosen (Karlson, 1974) verwendet wird und somit in den Intermediärstoffwechsel eingeht.

GA wird zu Glyoxylsäure oxidiert, ein reversibler Prozess (McChesney *et al.*, 1972), der durch die Glykolsäureoxidase katalysiert wird (Richardson und Tolbert, 1961). Dieses Enzym ist vorwiegend in den Peroxisomen lokalisiert (Jones *et al.*, 2000). Die Umwandlung von GA in Glyoxylsäure durch Lactatdehydrogenase, wie sie *in vitro*

nachgewiesen wurde, scheint *in vivo* beim Menschen keine Rolle zu spielen (Yanagawa *et al.*, 1990). Die Glyoxylsäure ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Intermediärstoffwechsel. So entsteht durch Transaminierung Glyzin (katalysiert durch Glyoxylattransaminase und andere Aminotransferasen; McChesney *et al.*, 1972; James *et al.*, 1998). Sie wird jedoch auch durch die Glykolsäureoxidase zu Oxalsäure (OA) weiteroxidiert (Richardson und Tolbert, 1961). Schließlich entsteht CO₂ als Endprodukt der EG-Oxidation (z.B. Frantz *et al.*, 1996a; Gessner *et al.*, 1961; Marshall und Cheng, 1983; McChesney *et al.*, 1971). Diskutiert wird die Bildung von Ameisensäure und CO₂ aus Glyoxylsäure (Gessner *et al.*, 1961). Ebenfalls kann CO₂ nach Reaktion von Glyoxylsäure mit der endogenen 2-Ketoglutarat zu 2-Hydroxy-3-ketoadipinsäure (in den Mitochondrien katalysiert durch das Enzym 2-Ketoglutarat:Glyoxylat Carboligase) durch anschließende Decarboxylierung entstehen (Danpure *et al.*, 1986; Schlossberg *et al.*, 1968). Eine wesentliche CO₂-Quelle dürfte auch der Intermediärstoffwechsel sein. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Intermediärprodukte nicht nur durch Transketolase-Reaktion und Transaminierung gebildet werden, sondern auch durch Aldol-Additionen der im EG-Metabolismus vorkommenden Aldehyde mit endogenen CH₂-aziden Verbindungen. Bekannt ist die 4-Hydroxy-2-Ketoglutarat als ein entsprechendes Produkt der Reaktion von Glyoxylsäure mit Brenztraubensäure (katalysiert durch 4-Hydroxy-2-Ketoglutarat Aldolase, z.B. Gupta und Dekker, 1984). In einigen Übersichten wird auch die Reaktion von Glyoxylsäure mit 2-Ketobornsteinsäure zu Oxaloäpfelsäure aufgeführt (z.B. Cavender und Sowinski, 2001; DFG, 1991). Diese Reaktion wird vermittelt durch das Enzym Oxalomalatlyase, das für Bakterien beschrieben wurde (Sekizawa *et al.*, 1966).

Es ist davon auszugehen, dass alle EG-Metaboliten mit einer Aldehydfunktion weitere für Carbonylverbindungen charakteristische Reaktionen eingehen (z.B. Bildung von Schiffchen Basen; Glomb und Monnier, 1995).

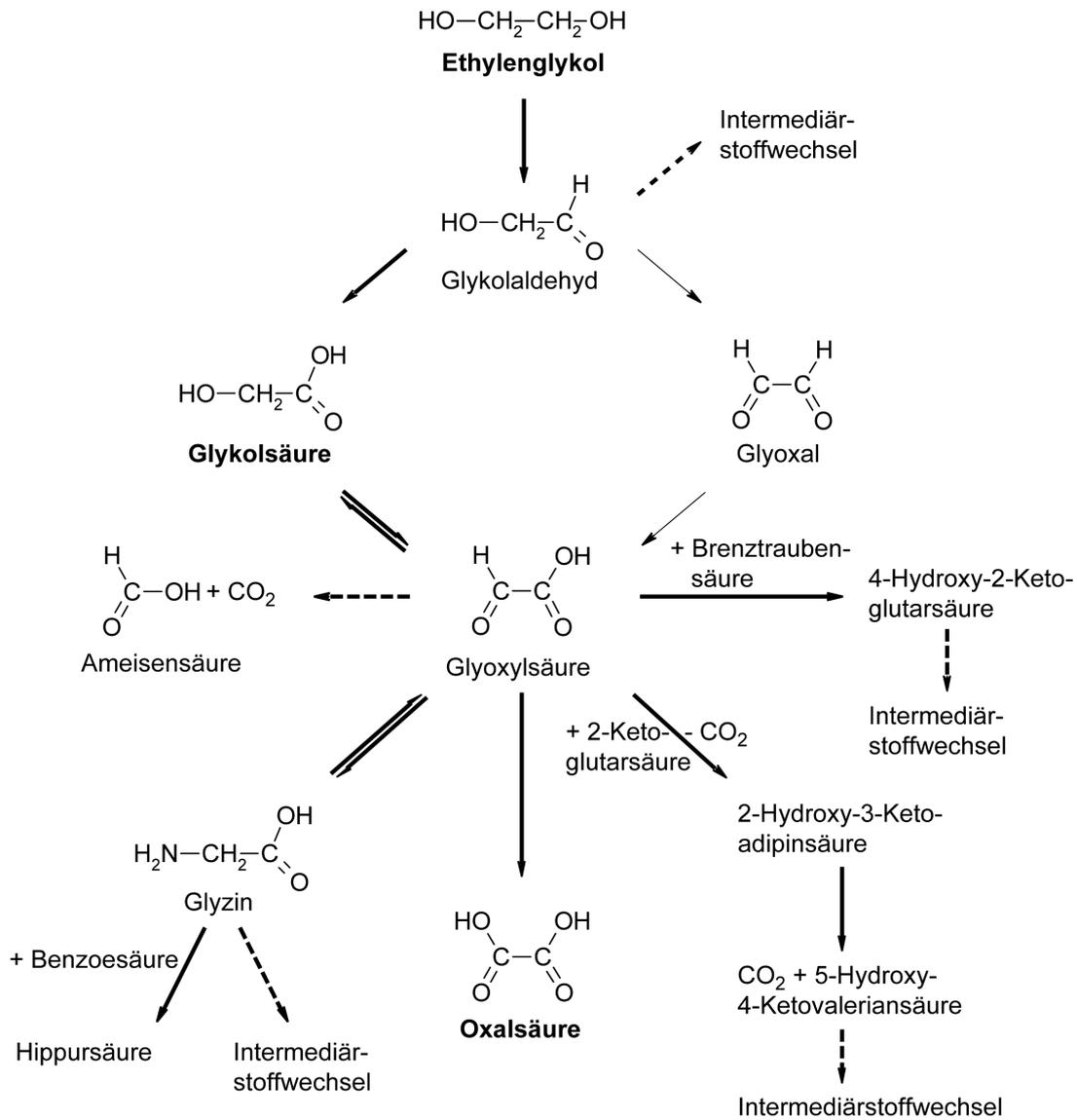


Abb. 1: Metabolismus von EG (in Anlehnung an Cavender und Sowinski, 2001; DFG, 1991)

1.3.2 Toxizitätsstudien und mechanistische Untersuchungen an Versuchstieren

Die Toxizität von EG wurde in zahlreichen Studien (Kurzzeit, Langzeit, verschiedene Endpunkte) untersucht (zusammengefasst z.B. in ATSDR, 1997). Nach Gabe hoher Dosen wurden akute Wirkungen auf das Zentralnervensystem (ZNS) beobachtet. In der Folge traten massive Nierenschäden auf (zusammengefasst in DFG, 1991). Die Dosisabhängigkeit der nephrotoxischen Effekte wurde eingehend in einer Reihe von Langzeitstudien untersucht.

In einer Zwei-Jahres-Studie mit Sprague-Dawley Ratten wurde EG im Futter in Konzentrationen von 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 4% verabreicht. Als „No-Observed-Effect Level“ (NOEL) für die Nierentoxizität wurde eine EG-Konzentration von 0,2% (entspricht ungefähr 80 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag) ermittelt (Blood, 1965). In einer anderen Zwei-Jahres-Studie wurde Fischer 344 Ratten und CD-1 Mäusen EG im Futter in Dosen von 0, 40, 200 und 1000 mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht (DePass *et al.*, 1986). Für die Ratten beobachteten die Autoren einen NOEL von 200 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag im Hinblick auf die Nierentoxizität. Bei den Mäusen wurden jedoch bei keiner Dosis klinische Effekte oder Zeichen von Toxizität festgestellt (DePass *et al.*, 1986). In einer weiteren Studie erhielten B6C3F1 Mäuse EG im Futter in Konzentrationen von 0, 1500, 3000, 6000 und 12000 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Hier wurde bei den männlichen Tieren ein NOEL für Nierentoxizität von 3000 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag gefunden (NTP, 1993). Die Nierentoxizität dürfte zum Teil auf eine metabolische Azidose zurückzuführen sein. Diese wurde beim Menschen beobachtet (siehe unten). Auch wird ausgefallenes Kalziumoxalat als ursächlich angesehen, da Schäden der Nierentubuli häufig mit einer Belastung durch präzipitiertes Kalziumoxalat korreliert werden (z.B. Williams und Wandzilak, 1989). Schließlich gibt es auch Hinweise darauf, dass die Nierentoxizität durch die reaktiven Metaboliten Glykolaldehyd und Glyoxylsäure verursacht sein könnte (Poldelski *et al.*, 2001).

In Untersuchungen zu Embryotoxizität und Teratogenität erwies sich EG als entwicklungsschädigend.

Bei peroraler Applikation von 0, 150, 500, 1000 und 2500 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag an CD Ratten während der Gestationstage 6 - 15 wurde ein NOEL von 500 mg/kg pro Tag gefunden (Neeper-Bradley *et al.*, 1995). In der gleichen Studie wurden CD-1 Mäusen 0, 50, 150, 500 und 1500 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag an den Gestationstagen 6 - 15 ebenfalls per Schlundsonde verabreicht, wobei der NOEL bei 150 mg/kg pro Tag lag. Ähnliche Ergebnisse wurden in verschiedenen weiteren Studien an Ratten und Mäusen erhalten (z.B. Tyl *et al.*, 1995a; Tyl *et al.*, 1995b; Tyl *et al.*, 1995c; Yin *et al.*, 1986). Kaninchen hingegen scheinen für die von EG ausgehende Entwicklungstoxizität weniger empfindlich zu sein. In der einen Studie, in der Weißen Neuseeländer Kaninchen 0, 100, 500, 1000 und 2000 mg EG/kg Körpergewicht pro Tag an den Gestationstagen 6 - 19 mit der Schlundsonde

verabreicht wurden, ergaben sich bei keiner Dosisgruppe entwicklungstoxische Effekte (Tyl *et al.*, 1993). In der höchsten Dosisgruppe traten bereits starke toxische Effekte bei den Muttertieren auf (Nierenschäden 82%, Tod 42%). In den niedrigeren Dosisgruppen wurden keine toxischen Effekte auf die Muttertiere gefunden.

Die entwicklungstoxischen Wirkungen von EG sind auf Metabolite zurückzuführen: In einer Studie von Carney *et al.* (1999) wurde Sprague-Dawley Ratten während der Gestationstage 6-15 täglich entweder entionisiertes Wasser (Kontrollen) oder 40,3 mmol EG/kg Körpergewicht oder 8,5 mmol GA/kg Körpergewicht per Schlundsonde verabreicht. Am Gestationstag 21 wurden die entwicklungstoxischen Wirkungen quantifiziert. Es wurden erhöhte Missbildungsraten gefunden, welche die Autoren auf die GA-Belastung zurückführten. Eine *in-vitro*-Studie mit Rattenembryokulturen zeigte jedoch nicht nur für GA sondern auch für OA ein entwicklungstoxisches Potential (Klug *et al.*, 2001). Die embryotoxischen Konzentrationen im Medium betragen 3 mmol/l für GA, 1 - 3 mmol/l für OA und lagen bei 100 - 200 mmol/l für EG selbst. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den *in-vivo*-Befunden, da toxikokinetische Untersuchungen gezeigt hatten, dass nach Verabreichung (intravenös und peroral) von $^{14}\text{C}_2$ -EG an Ratten wesentlich weniger $^{14}\text{C}_2$ -OA als $^{14}\text{C}_2$ -GA gebildet wurde. Bei Mäusen, denen ebenfalls $^{14}\text{C}_2$ -EG verabreicht worden war, wurde von den beiden Säuren ausschließlich $^{14}\text{C}_2$ -GA im Urin gefunden (Frantz *et al.*, 1996b).

In Arbeiten von Frantz *et al.* wurde die Toxikokinetik von $^{14}\text{C}_2$ -EG nach einmaliger intravenöser, peroraler und percutaner Applikation an Sprague-Dawley Ratten und CD-1 Mäusen in einem Dosisbereich von 10 - 1000 mg/kg Körpergewicht untersucht (Frantz *et al.*, 1996a; Frantz *et al.*, 1996b; Frantz *et al.*, 1996c). Als Hauptmetaboliten wurden $^{14}\text{C}_2$ -GA und $^{14}\text{CO}_2$ identifiziert. Bei höheren Dosen wurde eine Steigerung der Ausscheidung von $^{14}\text{C}_2$ -markierten Substanzen im Urin gegenüber der Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ gefunden, was auf eine Sättigung der zu $^{14}\text{CO}_2$ führenden Wege hinweist. In einer anderen Arbeit zur Toxikokinetik von EG nach peroraler Applikation konnte kein Unterschied zwischen trächtigen und nichtträchtigen Sprague-Dawley festgestellt werden (Pottenger *et al.*, 2001). Wieder wurde GA als Hauptmetabolit gefunden und OA nur in einigen Proben und in wesentlich geringeren Mengen als GA. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann berechnet werden, dass eine dem NOEL-Wert für nephrotoxische Effekte entsprechende Dosis von 80 mg EG/kg Körpergewicht zu einer maximalen GA-Blutkonzentration von 144 $\mu\text{mol/l}$ führt (lineare Extrapolation

der maximalen GA-Blutkonzentration von 271 $\mu\text{mol/l}$, erreicht nach Applikation von 150 mg EG/kg Körpergewicht; Pottenger *et al.*, 2001) Nach Gabe von 500 mg EG/kg Körpergewicht (NOEL für entwicklungstoxische Effekte von EG bei der Ratte) wurde eine maximale GA-Blutkonzentration von 1723 $\mu\text{mol/l}$ erreicht (Pottenger *et al.*, 2001). Die Toxikokinetik von inhaliertem $^{14}\text{C}_2$ -EG wurde von Marshall und Cheng (1983) an Fischer 344 Ratten untersucht. Der Hauptanteil der inhalierten Dosis wurde als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet, in Plasma und Urin wurde fast ausschließlich $^{14}\text{C}_2$ -EG gefunden.

1.3.3 Toxizität von Ethylenglykol beim Menschen

Akute Vergiftungen nach oraler Aufnahme von EG wurden immer wieder beschrieben. Hierbei war der Stoff entweder versehentlich, als Ethanolsubstitut oder in Selbstmordabsicht getrunken worden. Als kleinste tödliche Dosis werden 1,56 g/kg (1,4 ml/kg) angegeben (Andrews und Snyder, 1991). Es liegen zahlreiche Fallstudien vor (z.B. Gaultier *et al.*, 1976; Jacobsen *et al.*, 1988; Scalley *et al.*, 2002; Übersichtsartikel: Bornmann, 1954; LaKind *et al.*, 1999).

Die akute klinische EG-Vergiftung gliedert sich zeitlich in drei Stufen, wobei nicht immer alle Stufen auftreten müssen bzw. auch Überlagerungen auftreten können (z.B. Cavender und Sowinski, 2001; LaKind *et al.*, 1999):

ZNS-Phase

Diese Phase ist bei geringeren Dosen zunächst charakterisiert durch einen Rauschzustand (wie bei Ethanol). Es können Ataxie, Übelkeit, Schläfrigkeit und Krämpfe auftreten.

Kardiopulmonare Phase

Diese Phase ist durch die Azidose gekennzeichnet, die auf die metabolisch gebildeten Säuren zurückgeführt wird. Es kann zu Tachykardie, Tachypnoe, Cyanose, Gerinnungsstörungen, Hämolyse, Lungenödemen und Herzstillstand kommen. Ferner kann eine Hypokalzämie auftreten, da durch die Bildung des Metaboliten OA schwerlösliches Kalziumoxalat in verschiedenen Organen ausfallen kann.

Renale Phase

Diese Phase wird durch Polyurie, gefolgt von Oligo- und Anurie gekennzeichnet und kann sich bis zum terminalen Nierenversagen entwickeln. Sie wird durch die Bildung von cytotoxischen EG-Metaboliten ausgelöst (Säuren, Aldehyde, intratubuläres und intrazelluläres Auftreten von Kalziumoxalatkristallen). Zusätzlich wird durch die Azidose (siehe oben) Bikarbonat verbraucht, was die Anionenlücke und somit die osmotische Lücke vergrößert. Dies kann zu einem Nierenödem führen.

Im Zusammenhang mit EG-Vergiftungen gibt es auch Hinweise auf immuntoxische Effekte (Mycyk *et al.*, 2002; Zabrodskii und Germanchuk, 2000; Zabrodskii *et al.*, 2002).

1.3.4 Inhalation von Ethylenglykol und Belastung am Arbeitsplatz

Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) beträgt 10 ppm (25,7 mg/m³) für EG-Dämpfe und -aerosole (DFG, 1991). „Der MAK-Wert ist die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft am Arbeitsplatz, die nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnis auch bei wiederholter und langfristiger, in der Regel täglich 8stündiger Exposition, jedoch bei Einhaltung einer durchschnittlichen Wochenarbeitszeit von 40 Stunden (in Vierschichtbetrieben 42 Stunden je Woche von vier aufeinander folgenden Wochen) im Allgemeinen die Gesundheit der Beschäftigten nicht beeinträchtigt und diese nicht unangemessen belästigt. In der Regel wird der MAK-Wert als Durchschnittswert über Zeiträume von bis zu einem Arbeitstag oder einer Arbeitsschicht integriert“ (DFG, 2000b). Für EG gilt außerdem ein Überschreitungsfaktor von 2, das heißt der doppelte MAK-Wert (20 ppm) ist als 15-Minuten-Mittelwert erlaubt und zwar viermal pro Schicht (DFG, 2000a). In den USA existiert nur eine Spitzenbegrenzung (threshold limit value - ceiling, TLV-C) von 100 mg/m³ für EG-Aerosole, die als 15-Minuten-Mittelwert nicht überschritten werden darf (ACGIH, 2000).

Es liegen nur wenige Berichte zu toxischen Wirkungen und zur Belastung durch inhaliertes EG vor. In einer Fallstudie wird berichtet, dass 9 von 38 Frauen, die an offenen Behältern mit einer auf 105°C erhitzten Mischung aus 40% EG, 55% Borsäure und 5% Ammoniak arbeiteten (die EG-Dampfkonzentration ist nicht angegeben) unter Anfällen von Bewusstlosigkeit litten (Troisi, 1950 zitiert nach DFG,

1991). Wurden sie ins Krankenzimmer gebracht, erholten sie sich nach 5 - 10 min. Bei den 5 am häufigsten betroffenen Frauen wurde eine absolute Lymphozytose festgestellt. Bei 5 der 29 Frauen ohne Bewusstseinsausfälle wurde ein Nystagmus festgestellt.

In einer experimentellen Studie wurden männliche Probanden 4 Wochen lang täglich zwischen 20 und 22 Stunden gegen EG-Aerosole exponiert (Wills *et al.*, 1974). Die Expositionskonzentrationen betragen 3 - 67 mg EG/m³. Unter diesen Bedingungen traten außer Reizungen der Rachenschleimhäute und gelegentlichen Kopf- und Rückenschmerzen keine Anzeichen toxischer Wirkung auf. Blut- und Urinuntersuchungen (EG-Gehalt und verschiedene klinische Parameter) zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Im Rahmen dieser Studie wurde auch gegen kurzfristige Spitzenwerte von 188 mg/m³, 244 mg/m³ und 308 mg/m³ exponiert, die dann nur noch 15 min, 1 - 2 min bzw. 1 - 2 Atemzüge lang toleriert wurden.

In einer Feldstudie wurde die EG-Exposition von Personal bei der Flugzeugenteisung untersucht (Gérin *et al.*, 1997). Bei Messungen in der Umgebungsluft wurden bis zu 22 mg/m³ EG-Dampf und in drei Fällen auch EG-Nebel (76 - 190 mg/m³) gefunden. In den meisten nach Schichtende gesammelten Urinproben der exponierten Personen waren die EG-Spiegel gegenüber den nach einer mehrwöchigen, expositionsfreien bzw. -armen Periode gemessenen Werten (0 - 5 mmol/mol Kreatinin) nicht erhöht, in einigen Fällen jedoch bis zu dreifach und in einem sogar fünfundzwanzigfach. Ein Einfluss der Exposition auf die Nierenfunktion konnte nicht nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie zur beruflichen Exposition gegen EG wurden Parameter im Urin von Automechanikern und Büroangestellten (Kontrollen) verglichen (Laitinen *et al.*, 1995). In der Einatemluft der Mechaniker konnte kein EG nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 1,9 ppm). Dennoch wurde eine signifikante Erhöhung der EG-Ausscheidung im Urin nach Schichtende ($7,3 \pm 4,7$ gegenüber $1,7 \pm 0,7$ mmol/mol Kreatinin bei Kontrollen) beschrieben. Die Autoren äußerten deshalb die Vermutung, dass EG über die Haut aufgenommen wurde. Ferner wurde eine signifikante Senkung der Ausscheidung von Glykosaminoglykanen ($3,1 \pm 1,0$ gegenüber $4,7 \pm 1,9$ g/mol Kreatinin) festgestellt. Letzteren Befund werten die Autoren als einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Die Ausscheidung von OA war bei den exponierten Personen nicht-signifikant erhöht.

Eine zwischen 1981 und 1983 in den USA durchgeführte Untersuchung kam zu dem Ergebnis, dass pro Jahr ca. 1,5 Millionen Arbeiter möglicherweise gegen EG exponiert werden (NIOSH 1990, zitiert nach IPCS, 2002). Trotz der hohen Zahl an potentiell exponierten Personen gibt es bisher nur sehr wenige Daten über die EG- und OA-Ausscheidung im Urin. Es gibt keine Angaben über die Konzentrationen von EG und seinen Metaboliten im Blut oder die Ausscheidung von GA im Urin, obwohl dieser Metabolit wahrscheinlich von besonderer Bedeutung ist, da er mit dem entwicklungstoxischen Potential von EG verknüpft wird (siehe oben).

1.4 Methoden zur Bestimmung von Ethylenglykol, Glykolsäure und Oxalsäure aus Blut, Urin und Wasser

Es liegt eine Reihe von Methoden vor, die zur Bestimmung von EG, GA und OA aus Blut, Urin oder Wasser verwendet wurden. EG wurde meistens im klinischen Bereich nach Vergiftungen in Konzentrationen im mmol/l-Bereich bestimmt. Das Spektrum der Methoden ist sehr weit. Als Beispiele seien genannt: Direkte GC/FID-Bestimmung (Aarstad *et al.*, 1993), GC/MSD-Bestimmung nach Derivatisierung (Giachetti *et al.*, 1989), GC/ECD-Bestimmung nach Derivatisierung (Letzel *et al.*, 2000), ¹H-NMR-Spektroskopie (Wahl *et al.*, 1998), HPLC/UV-Bestimmung nach Derivatisierung (Vollmer *et al.*, 1996), Farbreaktionen nach Perjodat-Oxidation zu Formaldehyd (Russell *et al.*, 1969) sowie ein enzymatischer Nachweis (Blandford und Desjardins, 1994).

Ebenso ist eine Reihe unterschiedlicher Methoden für den Nachweis von GA und OA veröffentlicht worden, die durch folgende Beispiele beschrieben werden: Bestimmung von GA nach Derivatisierung mit GC/MSD (Clay und Murphy, 1977) und von OA nach Derivatisierung mit GC/FID (Wolthers und Hayer, 1982), Bestimmung von GA und OA mit HPLC und Leitfähigkeitsdetektion (Narayanan *et al.*, 1999), Bestimmung von GA mit HPLC/UV, sowohl direkt (Carney *et al.*, 1999) als auch nach Derivatisierung (Miwa *et al.*, 1996), Bestimmung von OA mit Kapillarelektrophorese und elektrochemischer Detektion (Yang *et al.*, 2000), enzymatischer Nachweis von OA (Chandran *et al.*, 2001) und von GA (Maeda-Nakai und Ichiyama, 2000) sowie eine colorimetrische Bestimmung von GA (Niederwieser *et al.*, 1978).

Um die $^{13}\text{C}_2$ -markierten Analyten von den unmarkierten unterscheiden zu können, waren für die vorliegende Arbeit massenselektive Methoden erforderlich. Ein Großteil der oben genannten Methoden war daher nicht geeignet. Die verbleibenden auf der GC/FID- oder GC/MSD-Technik basierenden Methoden hingegen waren nicht ausreichend empfindlich, so dass sie entsprechend weiterentwickelt werden mussten.

1.5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, mit denen die EG-, GA- und OA-Belastungen in Plasma und Urin nach Inhalation von EG-Dämpfen vor dem natürlichen Hintergrund bestimmt werden können. Die Exposition sollte gegen isotonenmarkiertes Material ($[^{13}\text{C}_2]$ Ethylenglykol, $^{13}\text{C}_2$ -EG) durchgeführt werden, um die expositionsbedingten Analyten ($^{13}\text{C}_2$ -EG, $^{13}\text{C}_2$ -GA und $^{13}\text{C}_2$ -OA) direkt mit den endogen vorhandenen (EG, GA und OA) vergleichen zu können. Dementsprechend mussten massenselektive Nachweismethoden entwickelt werden, die empfindlich genug sein mussten, um Konzentrationen im $\mu\text{mol/l}$ -Bereich bestimmen zu können, wie sie bei Exposition gegen geringe EG-Mengen zu erwarten waren. Ferner sollte die Probenmenge für die einzelnen Analysen möglichst klein sein, damit die Methoden später eventuell auch für Expositionen mit Ratten anwendbar sind. Soll im Rahmen eines Experiments einer Ratte mehrfach Blut entnommen werden, so können pro Zeitpunkt nur sehr geringe Mengen von 100 - 200 μl Blut gewonnen werden.

Keine der bisher bekannten Methoden erfüllte alle dieser Anforderungen. Die Eignung der zu entwickelnden Methoden zur Untersuchung der Belastung durch inhaliertes, dampfförmiges EG und seine genannten Metaboliten sollte schließlich in einem Expositionsexperiment gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

| | |
|---|---------------------------------------|
| Aceton, PESTANAL [®] , ≥99,8% | Riedel-de Haën, Seelze |
| Acetonitril, CHROMASOLV [®] für HPLC | Riedel-de Haën, Seelze |
| Benzol, zur Analyse | Merck, Darmstadt |
| Bernsteinsäure, puriss. p.a., ≥99,5% | Fluka, Buchs |
| [D ₆]Bernsteinsäure, 98 Atomprozent D | Aldrich, Steinheim |
| <i>N,O</i> -Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) mit 1% Trimethylchlorsilan, für die Gaschromatographie | Fluka, Buchs |
| <i>n</i> -Butylboronsäure, 97% | Aldrich, Steinheim |
| <i>N-tert.</i> -Butyl-dimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) mit 1% <i>tert.</i> -Butyl- dimethylchlorsilan, 97% | Aldrich, Steinheim |
| Chinolin, 98% | Aldrich, Steinheim |
| 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, 98% | Aldrich, Steinheim |
| <i>N,N</i> -Dimethylformamid, SUPRASOLV [®] | Merck, Darmstadt |
| Ethylacetat, PESTANAL [®] , ≥99,8% | Riedel-de Haën, Seelze |
| Ethylenglykol, puriss. p.a., ≥99,5% | Fluka, Buchs |
| [¹³ C ₂]Ethylenglykol, 99 Atomprozent ¹³ C | Aldrich, Steinheim |
| Glykolsäure, puriss. , ~99% | Fluka, Buchs |
| (±)-2-Hydroxyisovaleriansäure, puriss., ≥99% | Fluka, Buchs |
| Liquemin [®] N 25000 (Heparin-Natrium) | Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Methanol, LICHROSLOV [®] für Chromatographie | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Oxalsäure Dihydrat, ≥99% | Sigma, Steinheim |
| [¹³ C ₂]Oxalsäure Dihydrat, 99 Atomprozent ¹³ C | Aldrich, Steinheim |
| 1,2-Propandiol (Propylenglykol), p.a., ACS, ≥99,5% | Fluka, Buchs |
| 1,3-Propandiol, 98% | Aldrich, Steinheim |
| Salzsäure 32%, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Gase: | |
| Helium 5.0 | Linde, München |

2.2 Geräte

| | |
|---|------------------------------------|
| Gaschromatograph (GC) mit massenselektivem Detektor (MSD) bestehend aus: | Agilent Technologies, Waldbronn |
| - GC HP 5890 Series II | |
| - HP 5890 „Cool-On-Column-Injektor“ | |
| - Automatischer Probengeber HP 7673 | |
| - MSD HP5972 | |

| | |
|---|------------------------------------|
| Vorsäule, „fused silica“, deaktiviert, 0,53 mm ID, 2,5 m Länge | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Kapillarsäule HP-5MS, 0,25 mm ID, 30 m Länge, 0,25 µm Filmdicke | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Säulenverbinder „press fit“, Glas | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Software: ChemStation G1701 BA Version B02.00 | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Spektrbibliotheken: NIST98 und Wiley275 | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Thermostat DC1 mit Kühlgerät K20 (für die Proben im automatischen Probengeber) | Haake, Karlsruhe |
| Analysenwaage AB204 | Mettler-Toledo, Giessen |
| „Autosamplervials“, Klarglas, 2 ml | Wicom, Heppenheim |
| Blutgasanalysator Stat Profile pHox | Nova Biomedical, Rödermark |
| Bördelkappen, 11 mm, Aluminium, Teflon-Silikon- Septum | Wicom, Heppenheim |
| Einmalkanülen, verschiedene Größen | B. Braun, Melsungen |
| Einmalspritzen, verschiedene Größen | B. Braun, Melsungen |
| Gasprobenbeutel aus polyethylenbeschichteter Metallfolie, 2,5 l | Linde, München |
| Indikatorpapier, PEHANAL [®] , pH 1-11 | Fluka, Buchs |
| Kolbenhub-Pipetten, einstellbar | Eppendorf, Hamburg |
| Kulturröhrchen, Glas, ca. 7 ml, mit Schraubdeckel Gl 14 | Schott, Mainz |
| Kunststoffröhrchen „Falcon“, Polypropylen, 14 ml, Rundboden | BD Biosciences, Heidelberg |
| Kunststoffröhrchen „Falcon“, Polypropylen, 15 ml, Spitzboden | BD Biosciences, Heidelberg |
| Mandrins, Luer Lock, 1,3 x 32 mm | B. Braun, Melsungen |
| Messkolben, Glas, verschiedene Größen | Hirschmann, Eberstadt |
| Mikroeinsätze für Autosamplervials, Glas, 30,75 x 6 x 0,7 mm | K&K Laborbedarf, München |
| Pasteurpipetten, Glas | Hirschmann, Eberstadt |
| Pipettenspitzen, verschiedene Größen | Eppendorf, Hamburg |
| Quetschhähne nach Mohr | K&K Laborbedarf, München |
| Reaktionsgefäße „safe lock“, Polypropylen, 2 ml und 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße „safe twist“, Polypropylen, 1,7 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Schüttler Reax top | Heidolph, Schwabach |
| Spritze Hamilton Serie 800 NE, 10 µl | Hamilton, Darmstadt |
| Trockenschrank UM 200 | Memmert, Schwabach |
| Ultraschallbad Sonorex RK 103 | Bandelin electronic, Berlin |
| Vakuumentrifuge Univapo 100H mit Kältefalle Unicryo MC2 L -60°C | UniEquip, Martinsried |
| Venenverweilkanülen Introcan-W, 1,3 x 32 mm | B. Braun, Melsungen |

Weithalsflaschen, Polyethylen, 1000 ml
Zentrifuge 1-15
Zentrifuge 4K15
Zentrifuge EBA 12R

Roth, Karlsruhe
Sigma, Osterode
Sigma, Osterode
Hettich, Tuttlingen

2.3 Proband für die Humanexposition

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein gesunder, männlicher Proband gegen $^{13}\text{C}_2$ -EG-Dämpfe exponiert. Der Proband war Nichtraucher und stellte sich freiwillig zur Verfügung. Er war zum Zeitpunkt der Exposition 54 Jahre alt und wog 96 kg. Der Proband vermied zwei Tage vor und während der Exposition OA- und Ascorbinsäure-reiche Nahrung.

Die Humanexposition war von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt worden.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Arbeitsmethoden

Es wurde nach den in einem analytisch-chemischen Labor üblichen Methoden verfahren. Die Sicherheitsmaßnahmen für den Umgang mit Chemikalien und Lösungsmitteln (z.B. Abzug, Handschuhe) wurden beachtet.

2.4.2 Bestimmung von Ethylenglykol

Zur Bestimmung von EG und $^{13}\text{C}_2$ -EG wurde eine gaschromatographische Trennung mit anschließender massenselektiver Detektion gewählt. Zur Verbesserung der gaschromatographischen Trennung wurden EG und die internen Standards mit *n*-Butylboronsäure in die entsprechenden Boronsäureester umgewandelt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Als interne Standards wurden Propylenglykol (PG) und 1,3-Propandiol (1,3PD) zusammen verwendet. In den Plasmaproben wurde die Konzentration doppelt - durch Vergleich mit beiden Standards - bestimmt. Für Urin und Wasser wurden Mehrfachbestimmungen durch die parallele Aufarbeitung und Analyse dreier Aliquots der einzelnen Fraktionen durchgeführt. In diesen Fällen

wurden die Konzentrationen mit Hilfe nur jeweils des internen Standards bestimmt, bei dem weniger Störsignale in den Chromatogrammen auftraten.

2.4.2.1 Probenaufarbeitung

Plasma-, Urin- und Wasserproben aus der Exposition wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt (siehe 2.5.2, 2.5.3 und 2.5.4) und direkt vor der Aufarbeitung aufgetaut. Alle anderen Proben wurden frisch hergestellt.

Plasma

Ein Probenaliquot (100 μl) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 5 μl einer wässrigen Lösung von 525 $\mu\text{mol/l}$ PG und 525 $\mu\text{mol/l}$ 1,3PD versetzt. Zur Proteinfällung wurden 100 μl Aceton zugesetzt, 20 sec mit dem Schüttler Reax top geschüttelt und 4 min bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufbereitung in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und mit 10 μl 2 mol/l HCl versetzt. Anschließend wurden 20 μl 400 mmol/l *n*-Butylboronsäure in Aceton zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde mit 150 μl Ethylacetat extrahiert. Dazu wurde 25 sec mit dem Schüttler Reax top geschüttelt und 2 min bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein „Autosamplervial“, das einen Mikroinsert enthielt, überführt. Das Gefäß wurde gasdicht verschlossen und in den gekühlten Probenhalter (15 $^{\circ}\text{C}$) des automatischen Probengebers gestellt. Die Analyse mit Hilfe des GC/MSD ist unter 2.4.2.2 beschrieben.

Urin

Ein Probenaliquot (100 μl) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 5 μl einer wässrigen Lösung von 1050 $\mu\text{mol/l}$ PG und 1050 $\mu\text{mol/l}$ 1,3PD versetzt. Anschließend wurden 100 μl 80 mmol/l *n*-Butylboronsäure in Aceton zugesetzt und 15 min bei RT inkubiert. Ein Ansäuern der Proben war nicht erforderlich, weil die Urinproben bereits HCl enthielten (siehe 2.5.4). Danach wurde mit 150 μl Ethylacetat extrahiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie bereits für Plasma beschrieben.

Wasser

Ein Probenaliquot (100 μ l) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 5 μ l einer wässrigen Lösung 1050 μ mol/l PG und 1050 μ mol/l 1,3PD versetzt. Anschließend wurden zunächst 10 μ l 2 mol/l HCl und dann 100 μ l 80 mmol/l *n*-Butylboronsäure in Aceton zugesetzt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde mit 150 μ l Ethylacetat extrahiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie bereits für Plasma beschrieben.

2.4.2.2 Gaschromatographische Bedingungen

Die Proben wurden mit einem automatischen Probengeber in den „Cool-On-Column-Injektor“ des GC/MSD-Systems injiziert. Die exakten GC/MSD-Parameter sind in Tab. 1 angegeben. Zum Schutz der Säule vor nicht-flüchtigen Verunreinigungen und Septumpartikeln befand sich eine Vorsäule zwischen Injektor und Kapillarsäule. Die von der Säule eluierten Substanzen wurden dann mit dem MSD analysiert. Für die Bestimmung der Identität der Substanzen und ihrer Retentionszeiten wurde der „Scan-Modus“ verwendet, für die Quantifizierung der „SIM-Modus“ (selected ion monitoring). Das Detektorsignal wurde von der „ChemStation Software“ auf dem angeschlossenen Computer aufgezeichnet und gespeichert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der ChemStation Software.

Zur Bestimmung der Identität wurden wässrige Lösungen von EG, PG und 1,3PD mit einer Konzentration von ca. 500 mg/l hergestellt, mit *n*-Butylboronsäure derivatisiert und mit dem GC/MSD analysiert (Scan von m/z 40 - 200). Die Massenspektren einzelner Signale wurden mit den Massenspektren von Substanzbibliotheken verglichen und so den Substanzen zugeordnet.

Für den SIM-Modus wurden charakteristische Ionen aus den im Scan-Modus erhaltenen Massenspektren (siehe 3.1.1.1) ausgewählt (Tab. 1). Ein Ion diente zur Quantifizierung, die anderen nur zur Absicherung der Identität. Die Auswahl erfolgte nach den Gesichtspunkten Spezifität, Abundanz im Massenspektrum und Störsignale im Einzelionenchromatogramm. Aus den im Scan-Modus erhaltenen Massenspektren konnten nur ganzzahlige m/z -Werte für die Fragmente bestimmt werden. Um die Empfindlichkeit der SIM-Messung zu steigern, wurde für das Fragment, das zur Quantifizierung verwendet wurde, der m/z -Wert mit der maximalen Intensität bestimmt. Dazu wurde die zur Scan-Messung verwendete Probe mit einer SIM-Methode analysiert, bei der in Schritten von 0,1 m/z im Intervall \pm 0,5 m/z um

den ganzzahligen Wert des zu untersuchenden Fragments gemessen wurde (Oehme, 1996). Die ermittelten Werte sind in den jeweiligen Tabellen für die GC/MSD-Bedingungen angegeben. Im weiteren Text werden nicht die exakten, sondern die zugehörigen ganzzahligen m/z-Werte der Fragmente genannt.

Nach der Messung im SIM-Modus, wurden mit Hilfe der Software die Chromatogramme für einzelne Ionen dargestellt und die Signale integriert. Die Integration erfolgte mit der manuellen Integrations-Funktion der Software. Dabei wurden sowohl die Flächen als auch die Höhen der Signale bestimmt. Im Allgemeinen wurde für die weiteren Berechnungen nur die Signalfäche verwendet.

Vor jeder Messreihe wurde der MSD mit Hilfe der „Tune“-Funktion der Gerätesoftware kalibriert: Anhand des Massenspektrums der Kalibriersubstanz Perfluortributylamin variierte das Programm verschiedene Geräteparameter des MSD, um die Kalibrierung der Massenachse (m/z), die Signalbreite der einzelnen Ionen und die Empfindlichkeit des Detektors zu optimieren. Für die quantitativen Messreihen wurde die „Usertune“-Funktion der Software gewählt. Bei dieser wurde die Empfindlichkeit des Detektors für drei Ionen des Massenspektrums der Kalibriersubstanz maximiert. Die drei Ionen wurden jeweils so gewählt, dass sie den Bereich der für die Quantifizierung der Analyten und internen Standards gewählten Ionen abdeckten (Tab. 1).

| | |
|------------------------|---|
| Injektor: | Cool-On-Column-Injektor |
| Temperatur | „Track-on-oven“-Modus (d.h. die Temperatur ist immer 3°C höher als die Säulentemperatur) |
| Injektionsvolumen | 2 µl |
| GC: | HP 5890 Series II |
| Vorsäule | 2,5 m x 0,53 mm, „fused silica“, deaktiviert |
| Kapillarsäule | HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film |
| Säulentemperatur | Starttemperatur: 65°C für 2 min Heizrate 1: 2,5°C/min bis 80°C Heizrate 2: 40°C/min bis 300°C Endtemperatur: 300°C für 4,5 min Gesamtlaufzeit: 18 min |
| Trägergas | Helium |
| Trägergasdruck | 0,8 bar bei 65°C, „constant-flow“-Modus (errechneter Fluss: 1,3 ml/min) |
| GC/MSD-Interface | 300°C |
| MSD: | HP 5972 |
| Ionisation | Elektronenstoß, 70 eV |
| Massendetektion im SIM | EG-Derivat: m/z 86,2, 113,2 und 128 ¹³ C ₂ -EG-Derivat: m/z 88,2 und 130 PG- und 1,3PD-Derivat: m/z 86,2, 113,2 und 142 |

| | |
|-----------------|--|
| Quantifizierung | EG-Derivat: m/z 86,2 ¹³ C ₂ -EG-Derivat: m/z 88,2 PG- und 1,3PD-Derivat: m/z 113,2 |
| „Tunen“ des MSD | Usertune, Verwendung der Ionen m/z 69, 100, 131 |

Tab. 1: GC/MSD-Bedingungen für die Bestimmung von EG

Durch die Injektion der Proben kam es zu Ablagerungen von nicht- oder schwerflüchtigen Substanzen (*n*-Butylboronsäure aus allen Proben und möglicherweise Zucker und Lipide aus den Plasmaproben). Daher wurden zwischen den Proben wechselweise Methanol oder eine Mischung aus *N,N*-Dimethylformamid und *N,O*-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) (9/1 Vol./Vol.) injiziert. Methanol reagierte mit überschüssiger *n*-Butylboronsäure zum entsprechenden, leichtflüchtigen Butylboronsäuredimethylester. Durch das BSTFA sollten andere Verunreinigungen wie zum Beispiel die Zucker in leichtflüchtige Derivate umgewandelt werden, die dann mit dem Gasstrom aus dem GC-System herausgespült wurden.

2.4.2.3 Eichung und quantitative Auswertung

Für die Bestimmung der EG-Konzentrationen in den Proben wurde im Rahmen jeder Messreihe eine Eichung durchgeführt. Dazu wurden Eichproben in Plasma, Urin und Wasser hergestellt. Die Eichkonzentrationen wurden so gewählt, dass der bei der Messung der Proben zu erwartende Konzentrationsbereich abgedeckt wurde: Plasma 1 - 30 µmol/l, Urin 1 - 250 µmol/l, Wasser 1 - 500 µmol/l. Von den Lösungen wurden dann drei Aliquots (gleiche Menge wie für die Aufarbeitung der Proben) unabhängig voneinander aufgearbeitet und gemessen (analog zu den Expositionsproben; siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.2).

Zur Erstellung einer Eichung wurde dann jeweils das Verhältnis der Fläche des Analytensignals zur Fläche des Signals des internen Standards gebildet, dieses Verhältnis gegen die der Eichprobe zugesetzte Konzentration aufgetragen und die Steigung der Eichgeraden mittels linearer Regression (Computerprogramm Excel, Microsoft, Unterschleißheim) ermittelt. Wenn die Eichproben bereits endogene Mengen des Analyten enthielten (z.B. EG in Urin), wurde keine Nullpunktsgerade erhalten. Vielmehr repräsentierte der gefundene Y-Achsenabschnitt die Ausgangskonzentration in dem zur Eichung verwendeten Material. In einigen Fällen

trug auch ein Hintergrund aus den verwendeten Reagenzien zum Y-Achsenabschnitt bei. Dieser wurde dann durch die Messung von Proben ohne Matrix separat bestimmt und bei der weiteren Auswertung berücksichtigt. Mittels der in der Eichung erhaltenen Steigung der Eichgeraden wurde dann in den Proben die Konzentration bestimmt.

Die Nachweisgrenze wurde in Proben ohne weiteren EG-Zusatz anhand des Hintergrunds bestimmt. Lag kein Hintergrundsignal vor ($^{13}\text{C}_2\text{-EG}$), wurden stattdessen die Proben mit der niedrigsten Eichkonzentration verwendet. Es wurde jeweils die Standardabweichung bei dreifacher Messung ermittelt und mit Hilfe der Eichung in eine Konzentration umgerechnet. Diese wurde als Nachweisgrenze definiert.

2.4.2.4 Wiederfindung, Präzision und Stabilität

Für die Bestimmung der Wiederfindung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ wurden Proben mit $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in Plasma (2 und 10 $\mu\text{mol/l}$ $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$) und Urin (5 und 100 $\mu\text{mol/l}$ $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$) hergestellt. Außerdem wurden entsprechende Proben mit den gleichen $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ Konzentrationen in Wasser hergestellt. Alle Proben wurden in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und gemessen (siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.2). Die in den Wasserproben gefundene $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Menge (als Fläche unter dem Signal) wurde als 100% definiert. Die Wiederfindung ergibt sich dann als das Verhältnis der Signalfläche der Urin- oder Plasmaprobe zu der Signalfläche der entsprechenden Wasserprobe:

$$(1) \quad r_x = \frac{\text{Signalfläche}_x}{\text{Signalfläche}_{\text{Wasser}}} \cdot 100$$

r: Wiederfindung (recovery) [%]

x: Urin oder Plasma

Es wurde davon ausgegangen, dass die Wiederfindung für EG gleich der für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ ist.

Für die Bestimmung der Präzision der Aufarbeitung wurden mehrere Proben ($n = 3$ oder $n = 6$) der gleichen Konzentration (Konzentrationen wie für die Bestimmung der Wiederfindung) in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und gemessen (siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.2). Für jede dieser Proben wurde das Verhältnis der Signalflächen von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ zu internem Standard gebildet. Als Maß für die Präzision wurde der

Variationskoeffizient CV aus dem Mittelwert und der Standardabweichung berechnet (siehe auch 2.7).

Da die bei der Exposition gewonnen Proben nicht sofort analysiert wurden, sondern zunächst bei -80°C gelagert wurden, musste die Stabilität unter diesen Bedingungen geprüft werden. Es wurden je sechs Aliquots mit $10\ \mu\text{mol/l}$ $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in Plasma und $50\ \mu\text{mol/l}$ $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in Urin hergestellt. Jeweils drei Proben wurden sofort in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und analysiert (siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.2). Die verbleibenden Proben wurden 5 Wochen lang bei -80°C gelagert. Anschließend wurden sie aufgetaut, aufgearbeitet und analysiert (siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.2).

2.4.3 Bestimmung von Glykolsäure

Zur Bestimmung von GA und $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ wurde eine gaschromatographische Trennung mit anschließender massenselektiver Detektion gewählt. Um das schwerflüchtige GA mit Hilfe der Gaschromatographie von anderen Bestandteilen der Probe zu trennen, wurde das di-*tert*-Butyldimethylsilylderivat (di-TBDMS-Derivat) gebildet. Da die Reaktion unter Ausschluss von Wasser stattfinden muss, GA als kleine 2-Hydroxycarbonsäure aber auch nur sehr schlecht mit organischen Lösungsmitteln aus der wässrigen Matrix extrahiert werden kann, wurde das Wasser der Probe durch Verdampfen entfernt. Um sicherzustellen, dass bei diesem Vorgang weder GA noch der interne Standard verdampfen, wurde die Lösung zuvor mit Chinolin versetzt, um die nichtflüchtigen Chinoliniumsalze der Säuren zu erhalten. Für die Derivatisierung wurde als Lösungsmittel Acetonitril (ACN) mit 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) als Katalysator gewählt. Die Silylierungsmischung SILA bestand aus *N-tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) mit 1% *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) als weiterem Katalysator.

2.4.3.1 Probenaufarbeitung

Plasma- und Urinproben aus der Exposition wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt (siehe 2.5.3 und 2.5.4) und direkt vor der Aufarbeitung aufgetaut. Alle anderen Proben wurden frisch hergestellt.

Plasma

Ein Probenaliquot (200 µl) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 5 µl einer wässrigen Lösung von 205 µmol/l [D_6]Bernsteinsäure (D_6 -SA, interner Standard) und 8 µl 4 mol/l HCl versetzt. Zur Proteinfällung wurden 500 µl ACN zugegeben, 5 sec am Schüttler Reax geschüttelt, 10 min im Ultraschallbad behandelt, 20 sec am Schüttler Reax geschüttelt und 3 min bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Aufarbeitung in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Der Proteinrückstand wurde mit 250 µl ACN/H₂O (4/1) versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt, 20 sec am Schüttler Reax geschüttelt und 3 min bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde zum ersten Überstand hinzugefügt. Die vereinigten Überstände wurden mit 40 µl Chinolin/ACN (1/9) versetzt. Zur Entfernung des Wasser-ACN-Gemischs wurde die Probe in der Vakuumzentrifuge auf ca. 5-10 µl eingengt, dann mit 200 µl Benzol versetzt und wiederum eingengt. Nach erneuter Zugabe von 100 µl Benzol und erneutem Einengen wurden nochmals 100 µl Benzol zugesetzt und anschließend bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50 µl einer 2,5%igen Lösung von DABCO in ACN aufgenommen und mit 75 µl SILA versetzt. Die Mischung wurde 3 min im Ultraschallbad behandelt. Um einen möglichst vollständigen Ablauf der Derivatisierungsreaktion zu erzielen, wurde über Nacht (mindestens 12 h) im Trockenschrank auf 40°C erhitzt. Dann wurde die Mischung erneut für 15 sec im Ultraschallbad behandelt und zur Extraktion mit 25 µl ACN und 85 µl Hexan versetzt. Anschließend wurde 15 sec mit dem Schüttler Reax top geschüttelt und 30 sec bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) bei RT zentrifugiert. Die Proben wurden für 10 min auf Eis gestellt, wodurch sich die Hexan- von der ACN-Phase trennte. Der Überstand (Hexanphase) wurde in ein Autosamplervial, das einen Mikroeinsatz enthielt, überführt. Das Gefäß wurde gasdicht verschlossen und in den gekühlten Probenhalter (15°C) des automatischen Probengebers gestellt. Die Analyse mittels GC/MSD ist unter 2.4.3.2 beschrieben.

Urin

Ein Probenaliquot (100 µl) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 5 µl 1050 µmol/l (±)-2-Hydroxyisovaleriansäure (HIVA, als interner Standard) versetzt. Anschließend wurden 50 µl Chinolin/ACN (1/9) zugesetzt. Die weiteren Schritte wurden in der gleichen Weise durchgeführt wie für Plasma beschrieben. Bei der

Hexanextraktion der Derivate wurde nach der Phasentrennung auf Eis noch einmal 3 min bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) bei 0°C zentrifugiert. Dieser Schritt war erforderlich, um einen Feststoff abzutrennen, der beim Abkühlen der Probe in Form von farblosen Kristallnadeln ausfiel.

2.4.3.2 Gaschromatographische Bedingungen

Die Proben wurden mit einem automatischen Probengeber in den Cool-On-Column-Injektor des GC/MSD-Systems injiziert. Die exakten GC/MSD Parameter sind in Tab. 2 aufgeführt. Es gelten die gleichen allgemeinen Angaben zur Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme wie für die Bestimmung von EG (siehe 2.4.2.2).

| | |
|------------------------|--|
| Injektor: | Cool-On-Column-Injektor |
| Temperatur | Starttemperatur: 80°C für 30 sec Heizrate 1: 100°C/min bis 150°C, Halten für 1 min Heizrate 2: 100°C/min bis 300°C Endtemperatur: 300°C für 60 min |
| Injektionsvolumen | 1 µl |
| GC: | HP 5890 Series II |
| Vorsäule | 2,5 m x 0,53 mm, fused silica, deaktiviert |
| Kapillarsäule | HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film |
| Säulentemperatur | Starttemperatur: 75°C für 1,5 min Heizrate 1: 7°C/min bis 170°C Heizrate 2: 30°C/min bis 300°C Endtemperatur: 300°C für 2 min Gesamtlaufzeit: 21,4 min |
| Trägergas | Helium |
| Trägergasdruck | 1,3 bar bei 57°C, constant-flow-Modus (errechneter Fluss: 2,17 ml/min) |
| GC/MSD-Interface | 300°C |
| MSD: | HP 5972 |
| Ionisation | Elektronenstoß, 70 eV |
| Massendetektion im SIM | GA-Derivat: m/z 73, 147, 247,2 und 289 ¹³ C ₂ -GA-Derivat: m/z 73, 147, 249,2 und 291 HIVA-Derivat: m/z 73, 147, 289,3 und 331 D ₆ -SA-Derivat: m/z 73, 147, 293,3 und 335 |
| Quantifizierung | GA-Derivat: m/z 247,2 ¹³ C ₂ -GA-Derivat: m/z 249,2 HIVA-Derivat: m/z 289,3 D ₆ -SA-Derivat: m/z 293,3 |
| Tunen des MSD | Usertune, Verwendung der Ionen m/z 131, 219, 414 |

Tab. 2: GC/MSD-Bedingungen für die Bestimmung von GA

2.4.3.3 Eichung und quantitative Auswertung

Die Auswertung der Chromatogramme und die Eichung erfolgten in der gleichen Weise wie für EG beschrieben (siehe 2.4.2.3). Eine eigene Eichung für $^{13}\text{C}_2$ -GA konnte nicht erstellt werden, da $^{13}\text{C}_2$ -GA als Substanz nicht zur Verfügung stand. Deshalb wurde die für unmarkiertes GA erstellte Eichung auch für die Quantifizierung von $^{13}\text{C}_2$ -GA verwendet.

Für die Bestimmung von $^{13}\text{C}_2$ -GA musste außerdem berücksichtigt werden, dass auch das Massenspektrum des unmarkierten GA-di-TBDMS-Derivats das Ion m/z 249 enthielt, das für die Bestimmung von $^{13}\text{C}_2$ -GA verwendet wurde. Dies ist durch die natürlich vorkommenden Isotope ^{13}C , ^{29}Si und ^{30}Si zu erklären (siehe 3.1.2.1). Um den Teil der Signalfläche des Ions m/z 249 zu bestimmen, der tatsächlich durch $^{13}\text{C}_2$ -GA in der Probe verursacht wurde, wurde zunächst in einigen Proben in denen kein expositionsbedingtes $^{13}\text{C}_2$ -GA vorlag, das Verhältnis der Signalflächen m/z 249 und m/z 247 bestimmt.

$$(2) \quad A = \frac{\text{Signalfläche m/z 249}}{\text{Signalfläche m/z 247}}$$

A Verhältnis m/z 249 zu m/z 247 in Probe ohne $^{13}\text{C}_2$ -GA

Im Weiteren wurde davon ausgegangen, dass dieses Verhältnis innerhalb einer Messreihe konstant ist, sofern nicht zusätzliches $^{13}\text{C}_2$ -GA vorliegt. Wenn zusätzliches $^{13}\text{C}_2$ -GA vorliegt, muss das Verhältnis größer sein als in den Kontrollproben. Für $^{13}\text{C}_2$ -OA und OA konnte dies auch gezeigt werden, weil $^{13}\text{C}_2$ -OA als Substanz vorlag (siehe 3.1.3.2).

In den Proben, die auf $^{13}\text{C}_2$ -GA untersucht wurden, wurde dann mit Hilfe des in Gleichung (2) erhaltenen Faktors A und der für m/z 247 bestimmten Signalfläche die Signalfläche für m/z 249 berechnet, die für den Fall zu erwarten wäre, dass kein zusätzliches $^{13}\text{C}_2$ -GA vorhanden ist. Die Differenz zwischen der gemessenen und der zu erwartenden Signalfläche stellte dann die Signalfläche für das in der Probe befindliche $^{13}\text{C}_2$ -GA dar:

$$(3) \quad \text{Signalfläche}_{^{13}\text{C}_2\text{-GA}} = \text{Signalfläche m/z 249} - (A \cdot \text{Signalfläche m/z 247})$$

A Verhältnis m/z 249 zu m/z 247 in Probe ohne $^{13}\text{C}_2$ -GA

Die mittels Gleichung (3) erhaltene Signalfläche wurde dann wie bereits beschrieben mit der Signalfläche des internen Standards ins Verhältnis gesetzt und über die Eichung die entsprechende Konzentration errechnet.

2.4.3.4 Wiederfindung, Präzision und Stabilität

Für GA wurde die Wiederfindung aus Plasma oder Urin mit der direkten Derivatisierung der entsprechenden GA-Mengen aus einer Lösung in ACN verglichen. Dazu wurden Proben in Plasma (GA-Konzentration 25 µmol/l) und Urin (GA-Konzentration 250 µmol/l) hergestellt. Die Proben wurden in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und gemessen (siehe 2.4.3.1 und 2.4.3.2). Außerdem wurden Proben hergestellt, bei denen die entsprechende Menge GA direkt in 50 µl einer 2,5%igen Lösung von DABCO in ACN gelöst wurde. Diese Proben wurden dann wie oben beschrieben mit SILA derivatisiert und analysiert (siehe 2.4.3.1 und 2.4.3.2).

Die in den ACN-Proben gefundene GA-Menge (als Signalfläche, ohne Berücksichtigung des internen Standards) wurde als 100% definiert. Die Wiederfindung ergibt sich dann als das Verhältnis der Signalfläche der Urin- oder Plasmaprobe zu der Signalfläche der entsprechenden ACN-Probe:

$$(4) \quad r_x = \frac{\text{Signalfläche}_x}{\text{Signalfläche}_{\text{ACN}}} \cdot 100$$

r: Wiederfindung (recovery) [%]

x: Urin oder Plasma

Für die Bestimmung der Präzision der Aufarbeitung wurde das gleiche Verfahren verwendet wie für EG (siehe 2.4.2.4; GA-Zusatz Plasma 5 und 25 µmol/l, Urin 25 und 250 µmol/l).

Für die Überprüfung der Stabilität der Proben bei -80°C wurden je sechs Aliquots mit 25 µmol/l GA in Plasma und 250 µmol/l GA in Urin hergestellt. Jeweils drei Proben wurden sofort in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und analysiert (siehe 2.4.3.1 und 2.4.3.2). Die verbleibenden Proben wurden 5 Wochen lang bei -80°C gelagert. Anschließend wurden sie aufgetaut, aufgearbeitet und analysiert (siehe 2.4.3.1 und 2.4.3.2).

2.4.4 Bestimmung von Oxalsäure

Zur Bestimmung von OA und $^{13}\text{C}_2$ -OA wurde eine gaschromatographische Trennung mit anschließender massenselektiver Detektion gewählt. Um das schwerflüchtige OA mit Hilfe der Gaschromatographie von anderen Bestandteilen der Probe trennen zu können, wurde der di-TBDMS-Ester gebildet.

Da diese Reaktion unter Ausschluss von Wasser stattfinden muss, wurde OA zunächst mit Ethylacetat aus der angesäuerten Matrix extrahiert. Nachdem wieder die nichtflüchtigen Chinoliniumsalze der Säuren (OA und interne Standards) gebildet wurden, wurde das Lösungsmittel entfernt und die Derivatisierung mit SILA durchgeführt.

2.4.4.1 Probenaufarbeitung

Urinproben aus der Exposition wurden bis zur Analyse bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt (siehe 2.5.4). Alle anderen Proben wurden frisch hergestellt.

Urin

Ein Probenaliquot (300 μl) wurde in einem Kunststoffröhrchen (14 ml) mit 3 μl einer wässrigen Lösung von Bernsteinsäure (SA) und D_6 -SA (SA: 50000 $\mu\text{mol/l}$, D_6 -SA: 500 $\mu\text{mol/l}$) versetzt. SA diente als interner Standard für OA, D_6 -SA als interner Standard für $^{13}\text{C}_2$ -OA. Anschließend wurden 6 Tropfen konz. HCl, 300 μl 2 mol/l HCl und ca. 200 mg NaCl zugesetzt. Dann wurde zweimal mit je 1,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die Probe und das Ethylacetat wurden auf Eis vorgekühlt und die Extraktion bei 4°C im Kühlraum durchgeführt, um eine Hydrolyse des Ethylacetats zu vermeiden. Zur möglichst vollständigen Extraktion wurde die Probe 1 min von Hand, 20 sec mit dem Schüttler Reax top und noch einmal 1 min von Hand geschüttelt. Anschließend wurde die Probe 2 min bei etwa 2400 Umdrehungen/min (1000 x g) bei 0°C zentrifugiert und die organischen Phasen in Kulturröhrchen (7 ml) überführt. Zu den beiden vereinigten Extrakten wurden 70 μl Chinolin/ACN (1/9) und 250 μl Benzol zugesetzt. Die Probe wurde in der Vakuumzentrifuge auf ca. 300 μl eingengt und anschließend in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Das Kulturröhrchen wurde mit 500 μl ACN ausgespült, die ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt wurden. Darauf wurde die Probe auf ca. 5-10 μl eingengt, mit 100 μl Benzol versetzt und wiederum auf ca. 5-10 μl eingengt. Der Rückstand wurde in 50 μl einer 2,5%igen

Lösung von DABCO in ACN aufgenommen und mit 75 µl SILA versetzt. Die Mischung wurde 3 min im Ultraschallbad behandelt. Um einen möglichst vollständigen Ablauf der Derivatisierungsreaktion zu erzielen, wurde über Nacht (mindestens 12 h) im Trockenschrank auf 40°C erhitzt. Dann wurde die Mischung erneut für 15 sec im Ultraschallbad behandelt und zur Extraktion mit 25 µl ACN und 85 µl Hexan versetzt. Es wurde 15 sec mit dem Schüttler Reax top geschüttelt und 30 sec bei 14000 Umdrehungen/min (17530 x g) bei RT zentrifugiert. Die Probe wurde für 10 min auf Eis gestellt, wodurch sich die Hexan- von der ACN-Phase trennte. Der Überstand (Hexanphase) wurde in ein Autosamplervial, das einen Mikroinsert enthielt, überführt. Das Gefäß wurde gasdicht verschlossen und in den gekühlten Probenhalter (15°C) des automatischen Probengebers gestellt. Die Analyse mit Hilfe des GC/MSD ist unter 2.4.4.2 beschrieben.

2.4.4.2 Gaschromatographische Bedingungen

Die Proben wurden mit einem automatischen Probengeber in den Cool-On-Column-Injektor des GC/MSD-Systems injiziert. Die exakten GC/MSD Parameter sind in Tab. 3 angegeben. Außerdem gelten die gleichen allgemeinen Angaben zur Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme wie für die Bestimmung von EG (siehe 2.4.2.2).

| | |
|-------------------|--|
| Injektor: | Cool-On-Column-Injektor |
| Temperatur | Starttemperatur: 80°C für 30 sec Heizrate 1: 100°C/min bis 150°C, halten für 1 min Heizrate 2: 100°C/min bis 300°C Endtemperatur: 300°C für 60 min |
| Injektionsvolumen | 1 µl |
| GC: | HP 5890 Series II |
| Vorsäule | 2,5 m x 0,53 mm, fused silica, deaktiviert |
| Kapillarsäule | HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film |
| Säulentemperatur | Starttemperatur: 75°C für 1,5 min Heizrate 1: 7°C/min bis 170°C Heizrate 2: 30°C/min bis 300°C Endtemperatur: 300°C für 2 min Gesamtlaufzeit: 21,4 min |
| Trärgas | Helium |
| Trärgasdruck | 1,3 bar bei 57°C, constant-flow-Modus (errechneter Fluss: 2,17 ml/min) |
| GC/MSD-Interface | 300°C |

| | |
|------------------------|--|
| MSD: | HP 5972 |
| Ionisation | Elektronenstoß, 70 eV |
| Massendetektion im SIM | OA-Derivat: m/z 73, 147, 261,2 und 301 ¹³ C ₂ -OA-Derivat: m/z 73, 147, 263,2 und 303 SA-Derivat: m/z 73, 147, 289,3 und 331 D ₆ -SA-Derivat: m/z 73, 147, 293,3 und 335 |
| Quantifizierung | OA-Derivat: m/z 261,2 ¹³ C ₂ -OA-Derivat: m/z 263,2 SA-Derivat: m/z 289,3 D ₆ -SA-Derivat: m/z 293,3 |
| Tunen des MSD | Usertune, Verwendung der Ionen m/z 131, 219, 414 |

Tab. 3: GC/MSD-Bedingungen für die Bestimmung von OA

2.4.4.3 Eichung und quantitative Auswertung

Die Auswertung der Chromatogramme und die Eichung erfolgten in der gleichen Weise wie für EG beschrieben (2.4.2.3). Für ¹³C₂-OA wurde eine eigene Eichung erstellt.

Für die Bestimmung von ¹³C₂-OA musste außerdem berücksichtigt werden, dass auch das Massenspektrum des unmarkierten OA-di-TBDMS-Derivats das Ion m/z 263 enthielt, das für die Bestimmung von ¹³C₂-OA verwendet wurde. Dies ist durch die natürlich vorkommenden Isotope ¹³C, ²⁹Si und ³⁰Si zu erklären (siehe 3.1.3.1). Für die Bestimmung der Signalfläche die durch ¹³C₂-OA verursacht wurde, gelten die gleichen Überlegungen und Berechnungen wie für ¹³C₂-GA (2.4.3.3; in Gleichung (2) und (3) wurden statt der aufgeführten m/z-Werte 249 und 247 die m/z-Werte 263 und 261 eingesetzt). Bei der Eichung für ¹³C₂-OA konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von ¹³C₂-OA das Verhältnis der Ionen m/z 263 zu m/z 261 erhöht wurde.

2.4.4.4 Wiederfindung, Präzision und Stabilität

Die Bestimmung der Wiederfindung für OA wurde nur für Urin und in der gleichen Weise wie für GA beschrieben durchgeführt (siehe 2.4.3.4; OA-Zusatz 250 µmol/l). Es wurde angenommen, dass die Wiederfindung von ¹³C₂-OA gleich der für OA ist. Für die Bestimmung der Präzision der Aufarbeitung wurde das gleiche Verfahren verwendet wie für EG und GA (siehe 2.4.2.4; OA-Zusatz 25 und 250 µmol/l).

Die Stabilität der Proben bei längerer Aufbewahrung ist bereits bekannt (mindesten drei Monate oder länger bei -20°C , Duez *et al.*, 1996, von Unruh *et al.*, 1998) und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht erneut geprüft.

2.4.4.5 Verhältnis der Ionen m/z 263 zu 261 im Urin bei nicht-exponierten Personen

Um die Variation des Verhältnisses m/z 263/261, welches für die Bestimmung von zusätzlichem $^{13}\text{C}_2$ -OA verwendet wurde, im Urin von nicht-exponierten Personen zu prüfen, wurde von vier männlichen Personen (einschließlich des in der vorliegenden Arbeit exponierten Probanden) innerhalb von ca. 20 h zu drei verschiedenen Tageszeiten (abends, vormittags und mittags) Urin in getrennten Fraktionen gesammelt. Die Sammlung erfolgte in der gleichen Weise wie während der Exposition. Das Verhältnis der Ionen m/z 263/261 wurde für jede Fraktion in drei parallelen Messungen bestimmt. Dazu wurden Proben mit der in 2.4.4.1 und 2.4.4.2 beschriebenen Methode analysiert.

2.5 Exposition eines Probanden gegen [$^{13}\text{C}_2$]Ethylenglykoldämpfe

Es wurde ein System aufgebaut, bei dem in kurzen Zeitintervallen kleine Mengen $^{13}\text{C}_2$ -EG verdampft wurden, und dieser Dampf vom Probanden sofort eingeatmet wurde. Blut- und Urinproben wurden gesammelt, um sie später auf EG, GA und OA ($^{13}\text{C}_2$ -markiert und unmarkiert) zu untersuchen. Proben der Ausatemluft wurden auf $^{13}\text{C}_2$ -EG untersucht. Das System selbst wurde nach Expositionsende ebenfalls auf verbliebenes $^{13}\text{C}_2$ -EG untersucht.

Die injizierte und verdampfte Menge $^{13}\text{C}_2$ -EG wurde so gewählt, dass sie geringer war als die Menge, die an einem Arbeitstag (8 h) bei Arbeit unter MAK-Bedingungen (MAK-Wert: 10 ppm; Leistung 50 W, alveolare Ventilation: 20 l/min; Åstrand, 1983) aufgenommen wird (ca. 3,8 mmol; berechnet mit 25,13 l/mol Gas).

2.5.1 Expositionssystem

Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau des Expositionssystems. Ein Dreihalsrundkolben (250 ml) wurde in einem Heizpilz erwärmt. Die Lufttemperatur im Kolben, gemessen in der Mitte, ca. 4 cm über dem Boden, betrug 140°C. Ein seitlicher Anschluss des Kolbens war mit einem Septum versehen, durch welches das $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ mit einer Hamiltonspritze (10 μl) injiziert wurde. Die beiden anderen Anschlüsse waren mit kurzen Silikonschläuchen versehen, die durch Quetschhähne verschlossen wurden. Der Silikonschlauch am mittleren Anschluss war mit einer abgeschnittenen Kunststoffpipettenspitze (1 ml) als Mundstück ausgestattet.

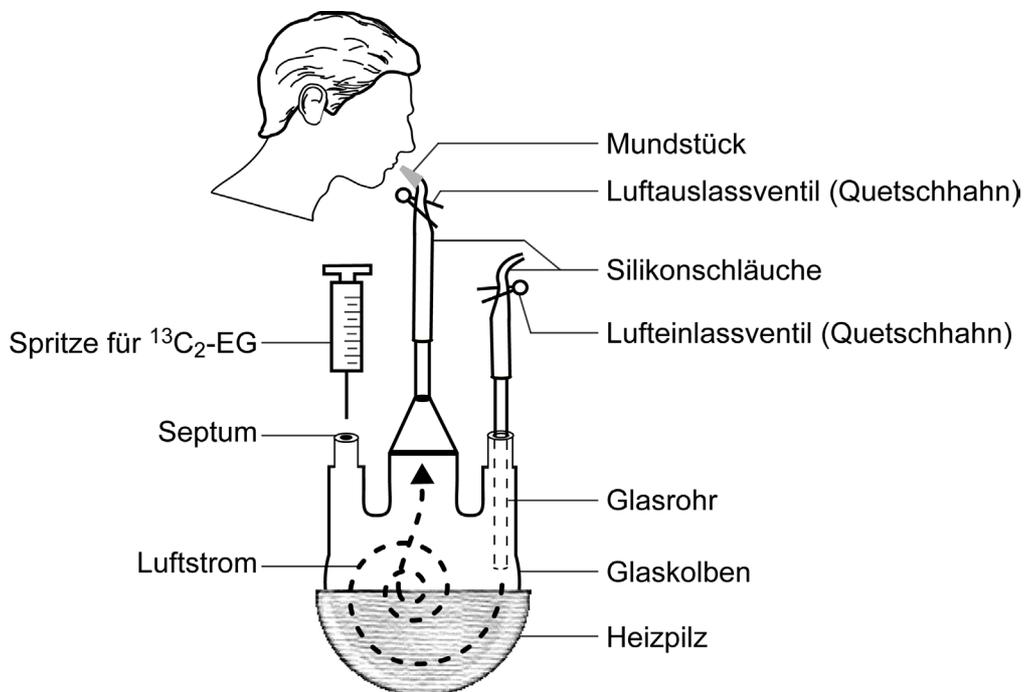


Abb. 2: Schema des Humanexpositionssystems

2.5.2 Durchführung der Exposition

Eine Stunde vor Versuchbeginn wurde der Heizpilz für den Rundkolben eingeschaltet und das System mit geöffneten Schläuchen erwärmt. Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Schläuche dann mit den Quetschhähnen verschlossen.

Alle 15 min wurden 6,6 μl $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ mit einer Hamilton-Spritze durch das Septum injiziert. Es wurde ca. 1 min gewartet bis das $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ verdampft war. Dann nahm der

Proband einen tiefen Atemzug aus dem Gefäß, indem er zuerst das Luftauslassventil und sofort danach das Lufteinlassventil öffnete. Über Letzteres strömte frische Raumluft in den Kolben nach. Am Ende des Einatemvorgangs verschloss der Proband die Schläuche wieder in umgekehrter Reihenfolge. So wurde sichergestellt, dass kein $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Dampf ins Freie gelangen konnte. Die eingeatmete Luft hielt der Proband für einige Sekunden an. Dieser Inhalationsvorgang wurde zweimal wiederholt. Die nächste Injektion von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in den Kolben und die nachfolgende Inhalation wurden nach 15 min durchgeführt. Insgesamt erfolgten 16 Injektionen/Inhalationen innerhalb von 4 h.

Zur Überprüfung auf abgeatmetes $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ wurde zweimal unmittelbar im Anschluss an den Inhalationsvorgang (elfte und sechzehnte Inhalation) Ausatemluft in polyethylenbeschichteten Gasprobenbeuteln (2,5 l) gesammelt. Die Gasprobenbeutel wurden zunächst gasdicht verschlossen. Nach Ende der Exposition wurden durch das Septum der Beutel 5 ml Wasser injiziert, um das eventuell vorhandene $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ darin zu lösen.

Um die nach der letzten Inhalation im Expositionsgefäß verbliebene Menge $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ zu bestimmen, wurde nach Beendigung der Exposition der geschlossene Glaskolben zunächst abgekühlt und dann mit 10 ml Wasser, die durch das Septum injiziert wurden, ausgespült, um das $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ darin zu lösen. Alle wässrigen Lösungen wurden bis zur Analyse auf $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ (2.4.2) bei -80°C aufbewahrt.

2.5.3 Blutabnahme und Gewinnung von Plasma

In einer Unterarmvene des Probanden wurde vor Versuchsbeginn eine Venenverweilkanüle fixiert. Diese wurde durch einen Mandrin verschlossen, um eine Verstopfung durch Blutgerinnung zu vermeiden. Vor, während und nach der Exposition wurden durch diese Kanüle mit Hilfe einer heparinisierten Einwegspritze (5 ml) Proben von je 5 ml Blut entnommen. Nach jeder Blutentnahme wurde die Kanüle durch einen neuen Mandrin verschlossen. Für die Blutentnahmen wurden folgende Zeitpunkte gewählt: Ca. 20 min vor Beginn der Exposition für die Kontrollprobe, jeweils ca. 5 min nach Beginn jeder Inhalation sowie ca. 0,3, 0,8, 2,5, 3,3, 4,3 und 5,3 h nach Beendigung der Exposition. Ca. 24 h nach Versuchsbeginn wurde noch einmal mit Hilfe einer heparinisierten Einwegspritze und einer Einwegkanüle in der Armbeuge venöses Blut (5 ml) entnommen.

Der Großteil des Blutes (ca. 4,5 ml pro Probe) wurde sofort in ein Kunststoffröhrchen (15 ml) überführt und bei 3760 Umdrehungen pro min (ca. 2500 x g) bei 0°C für 4 min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße (1,7 ml) verteilt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Das restliche Blut wurde für eine pH-Wert-Bestimmung mit dem Stat Profile pHox verwendet.

Für die Bestimmung von EG und GA wurden die Proben aufgetaut und in der in 2.4 beschriebenen Weise analysiert. Es wurde je ein Aliquot pro Zeitpunkt analysiert.

Für jede Messreihe wurden eigene Eichproben mit frisch gewonnenem Plasma hergestellt.

2.5.4 Urinsammlung

Der Proband sammelte seinen gesamten Urin fraktioniert während und bis ca. 26 h nach Ende der Exposition. Um die Fällung von schwerlöslichem Kalziumoxalat zu verhindern, waren in den Sammelgefäßen jeweils 5 ml konz. HCl vorgelegt worden. Die erste Urinprobe wurde direkt vor Beginn der Exposition genommen, um unbelasteten Kontrollurin zu gewinnen. Während der Urinabgabe wurde der pH-Wert mittels eines Indikatorpapiers gemessen. Die Fraktionen wurden zunächst maximal für 12 h bei 4°C aufbewahrt. Zur Volumenermittlung der Fraktionen wurde dann ihr Nettogewicht bestimmt, wobei eine Dichte von 1 g/ml angenommen wurde. Von jeder Fraktion wurde ein Teil zur sofortigen OA-Bestimmung verwendet (siehe 2.4.4). Außerdem wurden zweimal ca. 14 ml von jeder Fraktion in Kunststoffröhrchen (15 ml) bei -80°C bis zur weiteren Analyse (EG und GA) eingefroren.

Für die Bestimmung von EG und GA wurden die Proben aufgetaut und in der in 2.4 beschriebenen Weise analysiert. Bei allen Bestimmungen (EG, GA und OA) wurden je drei Aliquots pro Fraktion parallel analysiert. Aus den ermittelten Konzentrationen wurde durch Multiplikation mit dem Volumen der entsprechenden Urinfraktion die ausgeschiedene Menge berechnet.

Für jede Messreihe wurden eigene Eichproben mit frisch gewonnenem Urin hergestellt. Für die OA-Messungen wurde der vor der Exposition gesammelte Urin verwendet. Für die später durchgeführten Bestimmungen von EG und GA wurde zum Eichen jeweils Urin frisch gesammelt (ebenfalls unter Vorlage von konz. HCl).

2.6 Toxikokinetische Berechnungen

Zur toxikokinetischen Analyse der $^{13}\text{C}_2$ -EG-Plasmakonzentrationen wurde ein Ein-Kompartiment-Modell verwendet (Filser, 1996). Für $^{13}\text{C}_2$ -EG wurden das Verteilungsvolumen V_D , die Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht (C_{SS} ; „steady state“) und die Eliminationskonstante k bzw. die Halbwertszeit berechnet.

Nach beendeter Inhalation sinkt die $^{13}\text{C}_2$ -EG-Konzentration ab. Der resultierende Konzentrationsverlauf wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$(5) \quad c(t) = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

| | |
|----------|--|
| $c(t)$: | Konzentration des Analyten [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt t nach Expositionsende |
| C_0 : | Konzentration des Analyten [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt $t = 0$ (= Expositionsende) |
| k : | Eliminationskonstante [min^{-1}] |
| t : | Zeit [min] |

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eliminationskonstante k für $^{13}\text{C}_2$ -EG dadurch erhalten, dass mit Hilfe des Programms SigmaPlot der Firma Jandel Scientific (Erkrath) die allgemeine Funktion (5) an die vorletzten vier Messpunkte angepasst wurde.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten „ k “ des beobachteten Konzentrationsabfalls von $^{13}\text{C}_2$ -GA im Plasma wurden nur die vorletzten drei Messwerte herangezogen.

Die jeweilige Halbwertszeit $t_{1/2}$ ergibt sich dann als:

$$(6) \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

| | |
|-------------|--|
| $t_{1/2}$: | Halbwertszeit [min] |
| k : | Eliminationskonstante für $^{13}\text{C}_2$ -EG bzw. Geschwindigkeitskonstante für $^{13}\text{C}_2$ -GA [min^{-1}] |

Die $^{13}\text{C}_2$ -EG-Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht (C_{SS}) wurde mittels Gleichung (7) berechnet:

$$(7) \quad C_{SS} = 2 \cdot c_{t_{1/2}}$$

| | |
|-----------------|---|
| C_{SS} : | Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht [$\mu\text{mol/l}$] |
| $c_{t_{1/2}}$: | Plasmakonzentration [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt $t = t_{1/2}$ |

C_{ss} wird bei genügend langer Exposition erreicht, wenn die Eliminationsgeschwindigkeit gleich der Inhalationsgeschwindigkeit v wird.

Die Inhalationsgeschwindigkeit v wurde als Durchschnittswert erhalten, indem die eingeatmete $^{13}\text{C}_2$ -EG-Menge durch die Expositionsdauer (4 h) dividiert wurde. Aus C_{ss} , v und k wurde das auf die EG-Plasmakonzentration bezogene Verteilungsvolumen V_D wie folgt berechnet:

$$(8) \quad V_D = \frac{v}{C_{ss} \cdot k}$$

| | |
|------------|--|
| V_D : | Verteilungsvolumen [l] |
| v : | Inhalationsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/\text{min}$] |
| C_{ss} : | Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht [$\mu\text{mol}/\text{l}$] |
| k : | Eliminationskonstante [min^{-1}] |

Als Maß für die Belastung kann neben den Plasmakonzentrationen der markierten Analyten auch die Fläche unter der jeweiligen Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC: area under the curve) betrachtet werden. Die AUC für den Zeitraum der Blutprobensammlung wurde mit Hilfe der Sehnen-Trapez-Formel berechnet (z.B. Bronstein und Semendjajew, 1976):

$$(9) \quad \text{AUC}_{i=0}^n = \frac{t_{i+1} - t_i}{2} \cdot (c_i + c_{i+1})$$

| | |
|------------------------|--|
| $\text{AUC}_{i=0}^n$: | area under the curve [$\text{min} \cdot \mu\text{mol}/\text{l}$] von $t = 0$ bis $t = n$ (n entspricht dem vorletzten Messwert; der letzte Messwert betrug 0) |
| t_i : | Zeitpunkt der Probennahme i [min], $t_0 = 0$ min (Expositionsbeginn) |
| c_i : | Konzentration des Analyten in der Plasmaprobe i [$\mu\text{mol}/\text{l}$] |

Die AUC für die Zeit nach der vorletzten Messung wurde unter Annahme berechnet, dass die Elimination des Analyten aus dem Blut nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft. Für die Konzentration des Analyten im Plasma nach der vorletzten Probennahme gilt dann entsprechend Gleichung (5) mit $C_0 = c_n$ (Konzentration bei der vorletzten Probennahme). Die Fläche unter der Kurve für die Zeit nach der vorletzten Probennahme ergibt sich dann aus Gleichung (10):

$$(10) \quad AUC_n^\infty = \int_{t_n}^{\infty} c_n \cdot e^{-k \cdot t} dt = \frac{c_n}{k} \quad \text{mit } t > t_n$$

- AUC_n^∞ : area under the curve von $t = n$ bis $t = \infty$ [min · $\mu\text{mol/l}$]
 c_n : Konzentration des Analyten im Plasma [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt t_n
 k : Eliminationskonstante [min^{-1}]

Die Gesamt-AUC ist dann die Summe aus (9) und (10):

$$(11) \quad AUC_0^\infty = AUC_0^n + AUC_n^\infty$$

2.7 Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Formeln verwendet, um den arithmetischen Mittelwert MW (12), die Standardabweichung SD (13) sowie den Variationskoeffizienten CV (14) zu berechnen (z.B. Sachs, 2002):

$$(12) \quad MW = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} x_i}{n}$$

- MW: Mittelwert über n Messungen des Wertes x
 x_i : i -ter Einzelwert
 n : Anzahl der Messungen

$$(13) \quad SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - MW)^2}{n - 1}}$$

- SD: Standardabweichung
 x_i : i -ter Einzelwert
MW: Mittelwert über n Messungen des Wertes x
 n : Zahl der Messungen

$$(14) \quad CV = \frac{SD}{MW} \cdot 100\%$$

- CV: Variationskoeffizient in %
SD: Standardabweichung
MW: Mittelwert über n Messungen des Wertes x

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde bei der Bestimmung der Standardabweichungen die Fehlerfortpflanzung nach Gauß zugrunde gelegt (z.B. Sachs, 2002). Für die Verknüpfung zweier Werte durch Addition oder Subtraktion ($z = x \pm y$) gilt:

$$(15) \quad SD_z = \sqrt{(SD_x)^2 + (SD_y)^2}$$

SD_z : Standardabweichung des Werts z
 SD_x : Standardabweichung des Werts x
 SD_y : Standardabweichung des Werts y

Für die Verknüpfung zweier Werte durch Multiplikation oder Division ($z = x \cdot y$, $z = x / y$) gilt:

$$(16) \quad SD_z = \sqrt{\left(\frac{SD_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{SD_y}{y}\right)^2} \cdot z$$

SD_z : Standardabweichung des Werts z
 SD_x : Standardabweichung des Werts x
x: Mittelwert x
 SD_y : Standardabweichung des Werts y
y: Mittelwert y
z: Mittelwert z

Um im Rahmen der Stabilitätsprüfungen zu testen, ob sich die Messwerte der direkt gemessenen Proben von denen der gelagerten Proben signifikant unterscheiden oder nicht, wurde der t-Test durchgeführt. Dazu wurde das Computerprogramm Prism Version 3.0c der Firma GraphPad Software (San Diego, USA) verwendet. Der t-Test wurde als nicht-gepaart und zweiseitig durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analytische Methoden

3.1.1 Bestimmung von Ethylenglykol

Das vicinale Diol EG bildete mit der *n*-Butylboronsäure einen cyclischen Ester (Abb. 3), der mit Ethylacetat aus dem wässrigen Medium extrahiert und anschließend durch gaschromatographische Trennung mit massenselektiver Detektion bestimmt werden konnte.

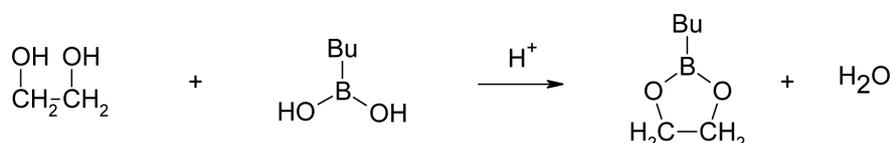


Abb. 3: Reaktion von EG mit *n*-Butylboronsäure

3.1.1.1 GC/MSD-Analyse von Ethylenglykol, Propylenglykol und 1,3-Propandiol

Wässrige Proben von EG und von den internen Standards PG und 1,3PD in Konzentrationen von ca. 500 mg/l wurden derivatisiert und im Scan-Modus mit dem GC/MSD analysiert (entsprechend 2.4.2.1 und 2.4.2.2). In Abb. 4, Abb. 6 und Abb. 8 sind die entsprechenden Massenspektren mit den dazugehörigen Referenzspektren aus der Spektrenbibliothek abgebildet. Die Molekülonen und die Ionen der Fragmente, die noch das Boratom enthalten, sind durch das charakteristische Isotopenverhältnis für Bor ($^{10}\text{B}/^{11}\text{B} \approx 1/4$) leicht zu identifizieren. Die aufgeführten *m/z*-Angaben beziehen sich jeweils auf Moleküle, die ^{11}B enthalten.

EG

Im Massenspektrum ist das Molekülion (M, *m/z* 128, $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{BO}_2]^{+\bullet}$) zu finden (Abb. 4). Außerdem liegen als charakteristische Ionen die Fragmente *m/z* 113 $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{BO}_2]^+$, *m/z* 99 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{BO}_2]^+$ und *m/z* 86 $[\text{C}_3\text{H}_7\text{BO}_2]^{+\bullet}$ vor, die durch den Verlust von CH_3^\bullet (M - 15), $\text{C}_2\text{H}_5^\bullet$ (M - 29) bzw. C_3H_6 (M - 42) aus der Butylkette zu erklären sind (siehe Abb. 5).

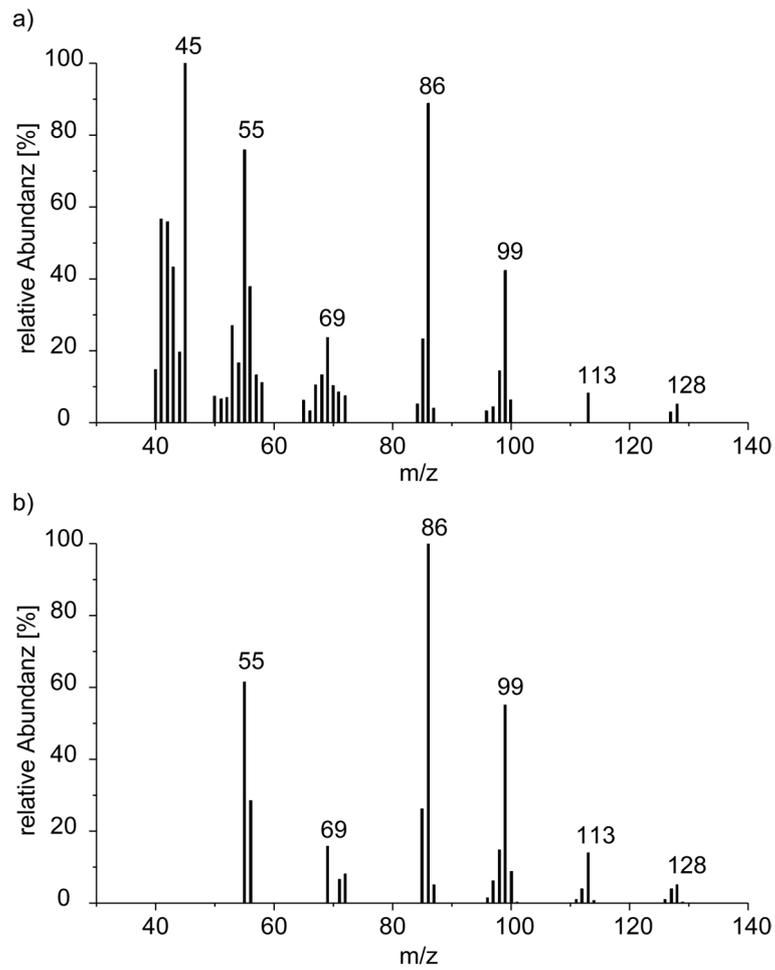


Abb. 4 a): Massenspektrum des Butylboronsäureesters von EG

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (Wiley275)

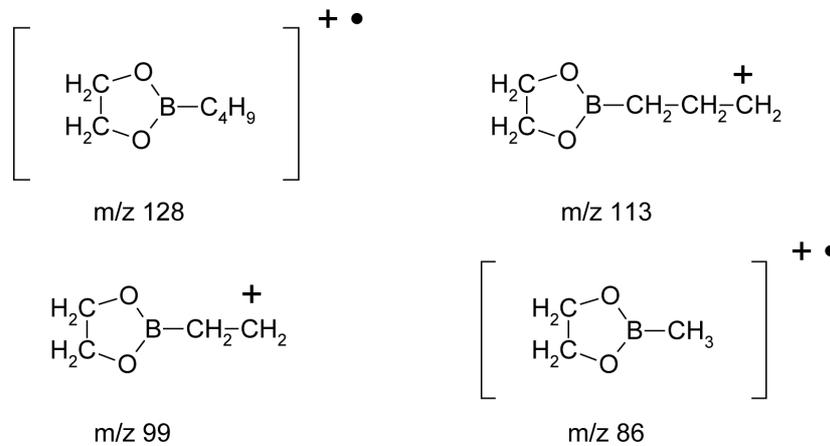


Abb. 5: Molekülion und charakteristische Fragmente des Butylboronsäureesters von EG

Als Ion für die Quantifizierung von EG wurde m/z 86 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des EG-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 113 und m/z 128 registriert. Das Massenspektrum für das $^{13}\text{C}_2$ -EG-Derivat ist nicht abgebildet. Die Ionen sind jeweils um zwei Masseneinheiten schwerer (m/z 88, 101, 115 und 130). Für die Quantifizierung von $^{13}\text{C}_2$ -EG wurde m/z 88 verwendet, für die Absicherung der Identität das Molekülion m/z 130.

PG

Im Massenspektrum ist das Molekülion (M, m/z 142, $[\text{C}_7\text{H}_{15}\text{BO}_2]^+$) zu finden (Abb. 6). Außerdem liegen als charakteristische Ionen die Fragmente m/z 127 $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BO}_2]^+$, 113 $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{BO}_2]^+$ und m/z 100 $[\text{C}_4\text{H}_9\text{BO}_2]^+$ vor, die durch den Verlust von $\text{CH}_3\cdot$ (M - 15), $\text{C}_2\text{H}_5\cdot$ (M - 29) bzw. C_3H_6 (M - 42) aus der Butylkette zu erklären sind (siehe Abb. 7).

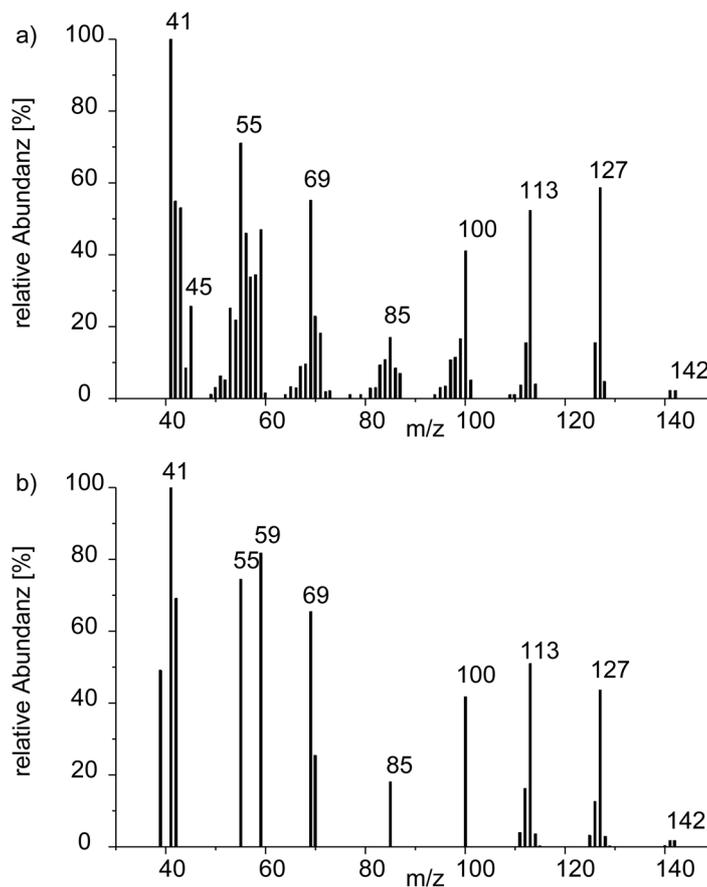


Abb. 6 a): Massenspektrum des Butylboronsäureesters von PG

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (Wiley275)

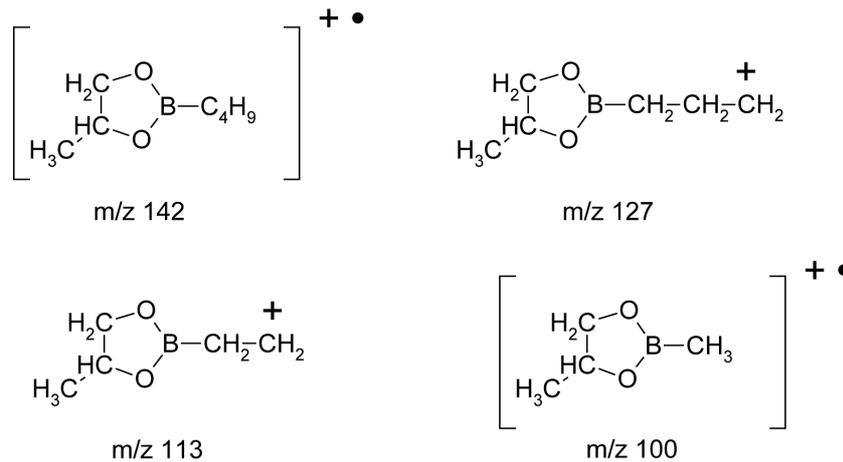


Abb. 7: Molekülion und charakteristische Fragmente des Butylboronsäureesters von PG

Als Ion für die Quantifizierung von PG wurde m/z 113 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des PG-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 86 und m/z 142 registriert.

1,3PD

Im Massenspektrum ist das Molekülion (M, m/z 142, $[\text{C}_7\text{H}_{15}\text{BO}_2]^+ \bullet$) zu finden (Abb. 8). Außerdem liegen als charakteristische Ionen die Fragmente m/z 127 $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BO}_2]^+$, 113 $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{BO}_2]^+$ und m/z 100 $[\text{C}_4\text{H}_9\text{BO}_2]^+ \bullet$ vor, die durch den Verlust von $\text{CH}_3 \bullet$ (M - 15), $\text{C}_2\text{H}_5 \bullet$ (M - 29) bzw. C_3H_6 (M - 42) aus der Butylkette zu erklären sind (siehe Abb. 9). Das im Gegensatz zum Massenspektrum des PG-Derivats viel stärker vertretene Fragment m/z 85 $[\text{C}_3\text{H}_6\text{BO}_2]^+$ entsteht durch den Verlust von $\text{C}_4\text{H}_9 \bullet$, also durch eine α -Spaltung, bei der die Butylgruppe am Boratom abgespalten wird. Für das Boronsäurederivat von 1,3PD lag in den zur Verfügung stehenden Spektrenbibliotheken (Wiley275 und NIST98) kein Referenzspektrum vor. Daher wird hier das Spektrum des Boronsäurederivats von 1,3PD aus einer Arbeit von Raksit und Punani (1997) abgebildet.

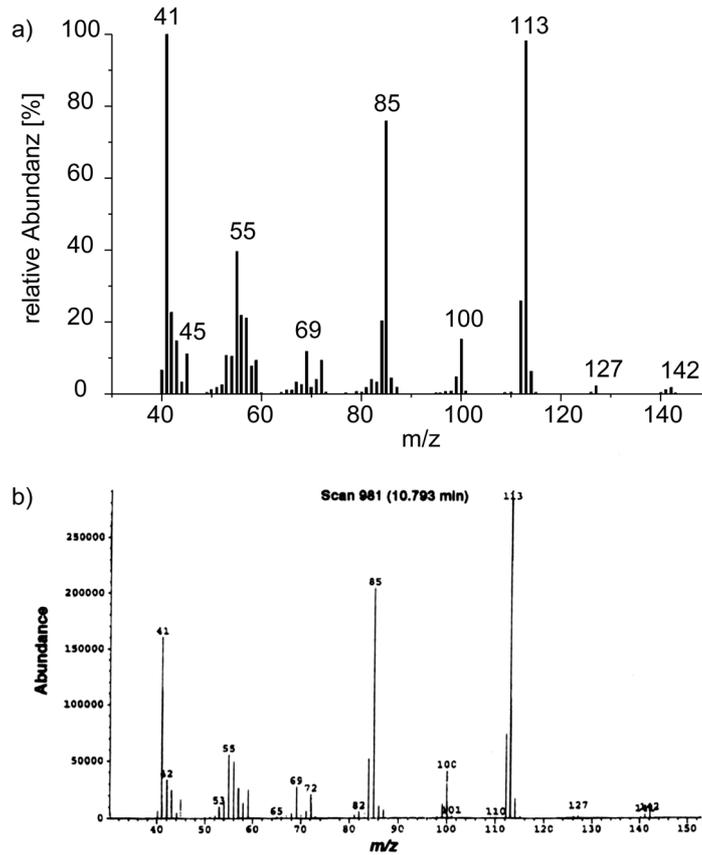


Abb. 8 a): Massenspektrum des Butylboronsäureesters von 1,3PD

b): Referenzmassenspektrum entnommen aus Raksit und Punani, 1997

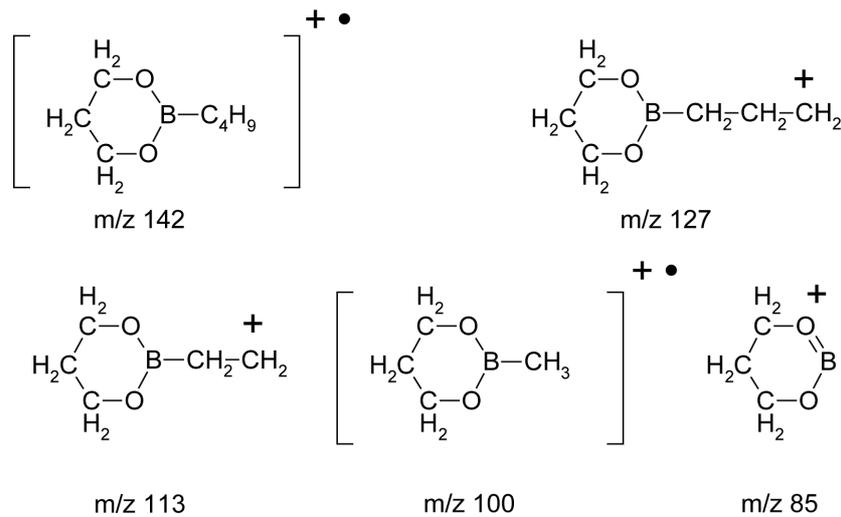


Abb. 9: Molekülion und charakteristische Fragmente des Butylboronsäureesters von 1,3PD

Als Ion für die Quantifizierung von 1,3PD wurde m/z 113 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des 1,3PD-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 86 und m/z 142 registriert.

Mit Hilfe der oben festgelegten Ionen wurden dann die Retentionszeiten der Substanzen bestimmt. Plasma- und Urinproben wurden in der in 2.4.2.1 und 2.4.2.2 beschriebenen Weise aufgearbeitet und analysiert. In Abb. 10 bis Abb. 12 sind entsprechende Beispielchromatogramme von SIM-Messungen wiedergegeben. Typische Retentionszeiten für die in Tab. 1 angegebenen Bedingungen waren für das EG-Derivat und das $^{13}\text{C}_2$ -EG-Derivat ca. 6,1 min, für das PG-Derivat ca. 6,7 min und für das 1,3PD-Derivat ca. 8,9 min. Durch Alterung der Säule und Kürzen der Säule wegen Verunreinigungen, die durch die Vorsäule nicht vollständig zurückgehalten wurden, kam es bei älteren Säulen zu einer geringen Veränderung der Retentionszeiten (wie auch in Abb. 12). Dies führte aber nicht zu einer Verschlechterung der Trennung. Innerhalb eines einzelnen Experiments waren die Retentionszeiten jeweils stabil.

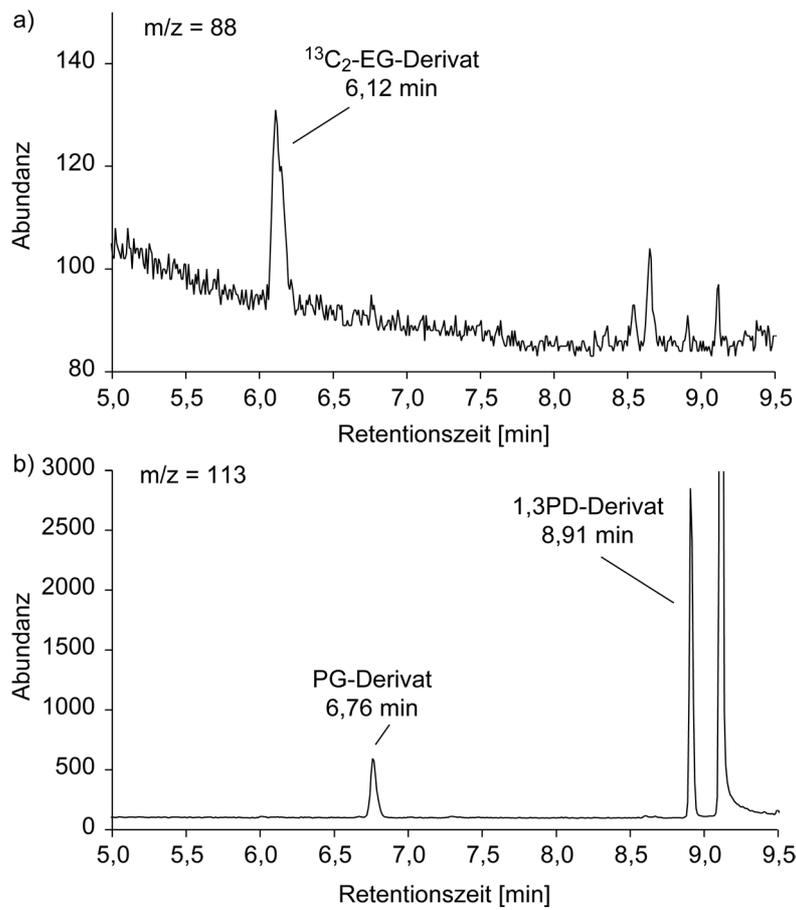


Abb. 10: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma, Konzentrationen: $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$: 2 $\mu\text{mol/l}$, PG und 1,3PD: 25 $\mu\text{mol/l}$

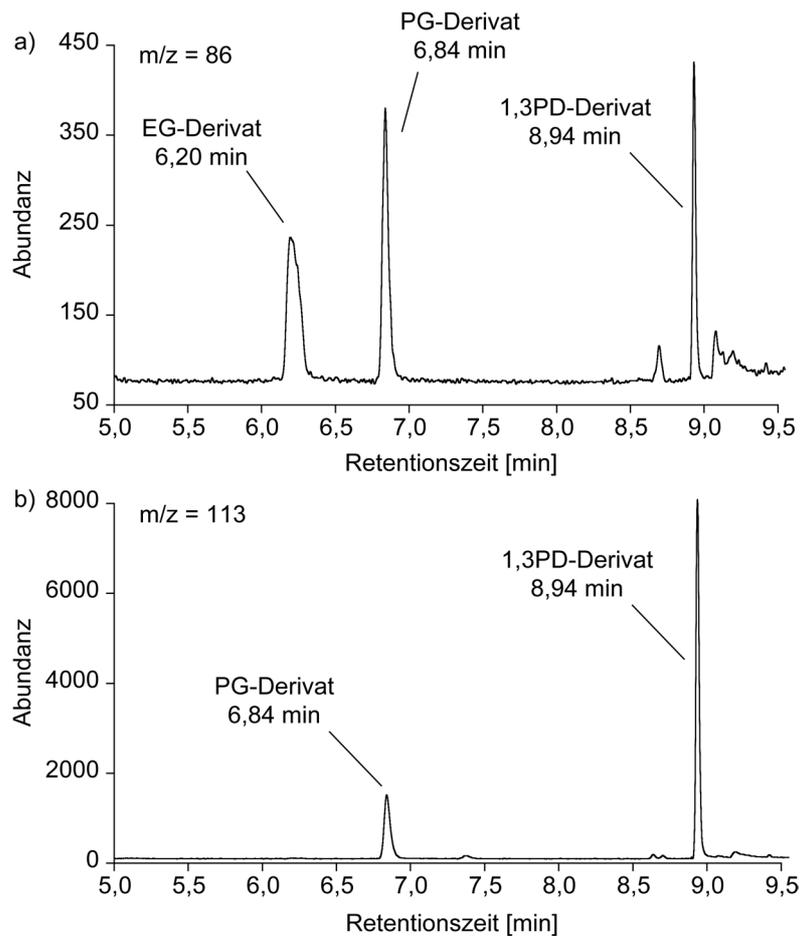


Abb. 11: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von EG aus Urin, Konzentrationen: EG: 5 $\mu\text{mol/l}$, PG und 1,3PD: 50 $\mu\text{mol/l}$

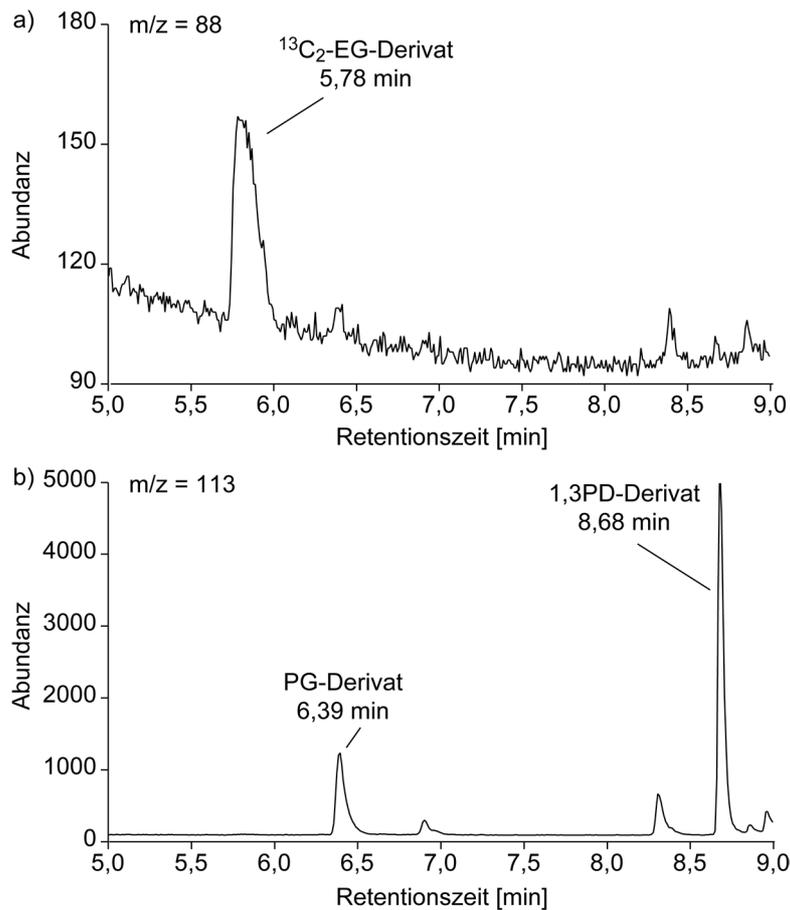


Abb. 12: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Urin, Konzentrationen: $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$: 5 $\mu\text{mol/l}$, PG und 1,3PD: 50 $\mu\text{mol/l}$

3.1.1.2 Eichung und quantitative Auswertung

Wie in 2.4.2.3 beschrieben wurden Eichungen für die Bestimmung von EG und $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ durchgeführt. Entsprechende Eichgeraden aus Plasma, Urin und Wasser sind in Abb. 13 bis Abb. 16 abgebildet. Die Qualitäten der Eichungen für die zwei internen Standards PG und 1,3PD waren sehr ähnlich, weshalb jeweils nur eine Eichgerade gezeigt wird. Der Y-Achsenabschnitt in Abb. 14 ist durch das endogene EG in dem zur Eichung verwendeten Urin bedingt (Konzentration 15,6 $\mu\text{mol/l}$). Im Rahmen dieser Eichmessungen wurden auch folgende Nachweisgrenzen bestimmt: EG aus Urin 1,1 $\mu\text{mol/l}$; $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma 0,6 $\mu\text{mol/l}$, aus Urin 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und aus Wasser 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Als Nachweisgrenze für EG aus Plasma wurde in Vorversuchen (nicht abgebildet) 7,6 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Der relativ hohe Wert ist bedingt durch ein Hintergrundsignal im Plasma, das von Messung zu Messung stark schwankte.

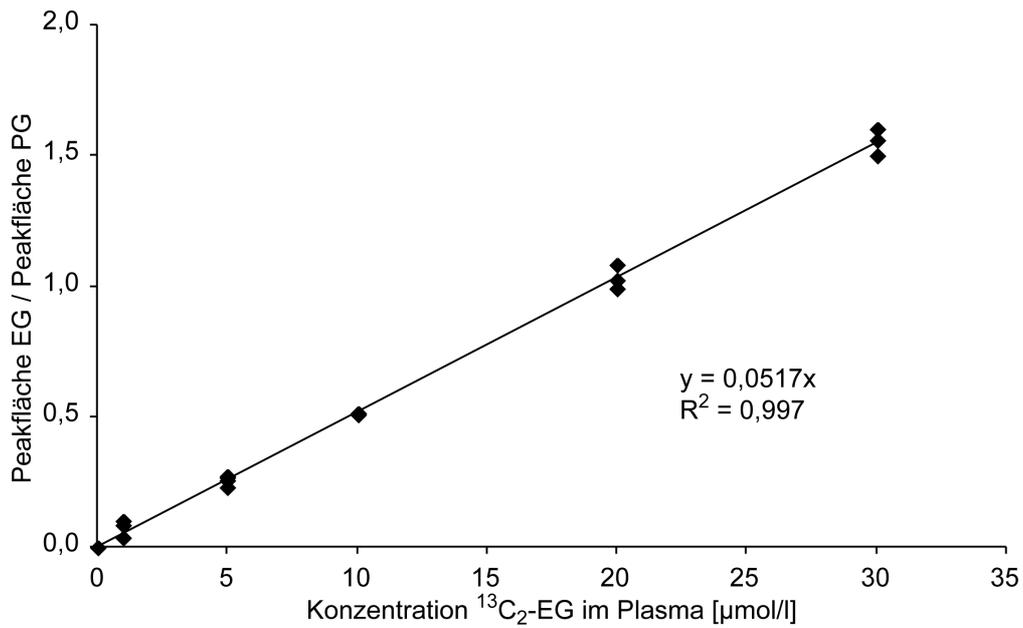


Abb. 13: Eichung für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma im Bereich zwischen 1 und 30 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards PG: 5 $\mu\text{mol/l}$)

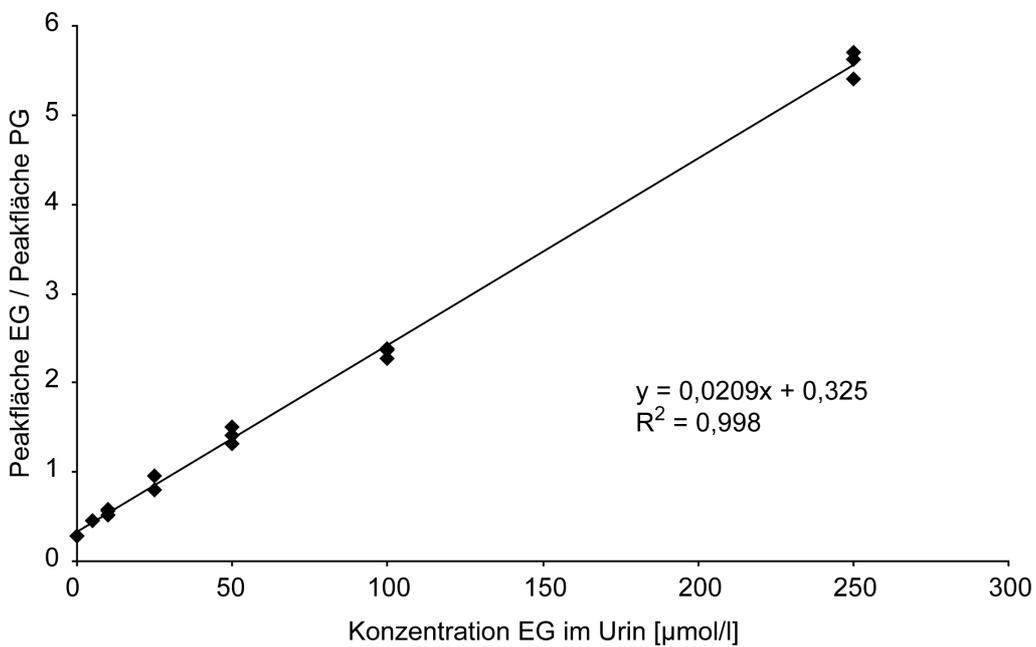


Abb. 14: Eichung für EG aus Urin im Bereich zwischen 5 und 250 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards PG: 50 $\mu\text{mol/l}$)

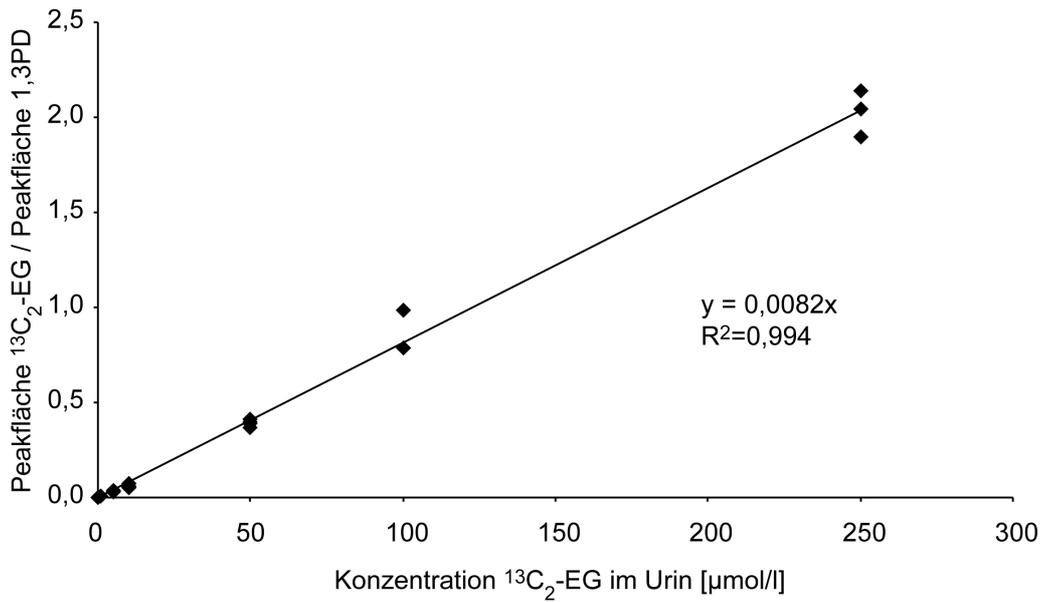


Abb. 15: Eichung für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Urin im Bereich zwischen 1 und 250 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards 1,3PD: 50 $\mu\text{mol/l}$)

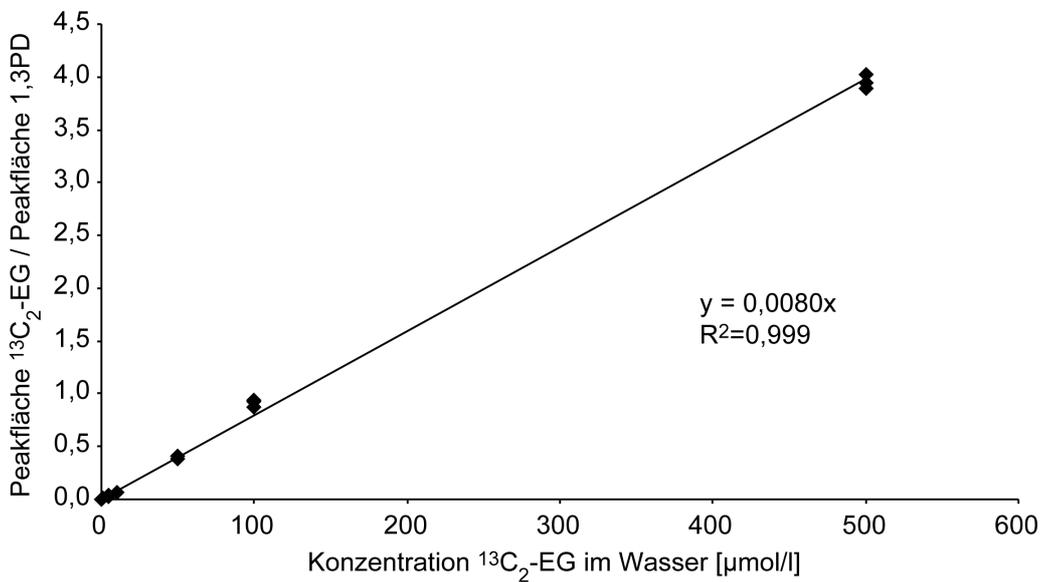


Abb. 16: Eichung für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Wasser im Bereich zwischen 1 und 500 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards 1,3PD: 50 $\mu\text{mol/l}$)

3.1.1.3 Validierung der Methode zur Bestimmung von Ethylenglykol

Wiederfindung

In Tab. 4 sind die Daten für die Wiederfindung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma- und Urinproben im Vergleich zu Wasserproben beschrieben, die in der in 2.4.2.4 beschriebenen Weise gewonnen wurden. Die Mittelwerte für die Signalflächen wurden aus drei bzw. sechs parallelen Aufarbeitungen berechnet.

| Matrix | Konzentration $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ | n | Wiederfindung (MW \pm SD) |
|--------|---|---|-----------------------------|
| Plasma | 2 $\mu\text{mol/l}$ | 3 | 101 \pm 8% |
| Plasma | 10 $\mu\text{mol/l}$ | 3 | 94 \pm 8% |
| Urin | 5 $\mu\text{mol/l}$ | 6 | 95 \pm 13% |
| Urin | 100 $\mu\text{mol/l}$ | 6 | 94 \pm 17% |

Tab. 4: Wiederfindung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma und Urin im Vergleich zu Wasser

Präzision

Wie in 2.4.2.4 beschrieben wurden die Variationskoeffizienten CV der Verhältnisse der Signalflächen Analyt/Standard als Maß für die Präzision der Analyse von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ bestimmt. Dazu wurden mehrere Aliquots einer Lösung parallel aufgearbeitet und anschließend gemessen. In Tab. 5 sind die Ergebnisse für den internen Standard PG angegeben. Die Ergebnisse für 1,3PD waren sehr ähnlich.

| Matrix | Konzentration $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ | n | Signalflächen $^{13}\text{C}_2\text{-EG/PG}$ (MW \pm SD) | CV |
|--------|---|---|---|----|
| Plasma | 2 $\mu\text{mol/l}$ | 6 | 0,106 \pm 0,0035 | 3% |
| Plasma | 10 $\mu\text{mol/l}$ | 3 | 0,565 \pm 0,0071 | 1% |
| Urin | 5 $\mu\text{mol/l}$ | 6 | 0,111 \pm 0,0033 | 3% |
| Urin | 100 $\mu\text{mol/l}$ | 6 | 2,204 \pm 0,0353 | 2% |

Tab. 5: Präzision der Bestimmung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ aus Plasma und Urin

Stabilität

Wie in 2.4.2.4 beschrieben wurden Lösungen von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in Plasma und Urin hergestellt und auf mehrere Proben verteilt. Ein Teil der Proben wurde sofort gemessen, ein Teil wurde 5 Wochen lang bei -80°C aufbewahrt und dann aufgetaut

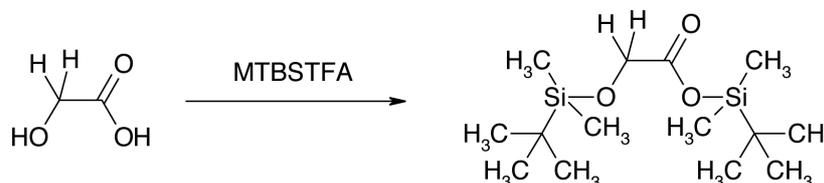
und gemessen. In Tab. 6 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für das Verhältnis der Signalflächen für $^{13}\text{C}_2$ -EG/PG dieser Messungen wiedergegeben. Ein t-Test (nicht-gepaart, zweiseitig, $P < 0,05$) zeigte, dass es jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab.

| Matrix | Konzentration $^{13}\text{C}_2$ -EG | Signalflächen $^{13}\text{C}_2$ -EG/PG (MW \pm SD) | |
|--------|-------------------------------------|--|--------------------|
| | | sofort gemessen | nach Lagerung |
| Plasma | 10 $\mu\text{mol/l}$ | 0,550 \pm 0,0068 | 0,562 \pm 0,0105 |
| Urin | 50 $\mu\text{mol/l}$ | 2,299 \pm 0,0406 | 2,249 \pm 0,0646 |

Tab. 6: Signalflächen $^{13}\text{C}_2$ -EG/PG in frischen und gelagerten Proben; $n = 3$

3.1.2 Bestimmung von Glykolsäure

Durch die Derivatisierung mit MTBSTFA wurde aus GA das di-TBDMS-Derivat gebildet (Abb. 17), das nach gaschromatographischer Trennung mit massenselektiver Detektion bestimmt werden konnte.



MTBSTFA: *N*-tert-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid

Abb. 17: Reaktion von GA mit MTBSTFA

3.1.2.1 GC/MSD-Analyse von Glykolsäure, [D₆]Bernsteinsäure und 2-Hydroxyisovaleriansäure

Lösungen von GA, D₆-SA und HIVA in ACN mit einer Konzentration von ca. 100 mg/l wurden mit MTBSTFA derivatisiert und im Scan-Modus mit dem GC/MSD analysiert (entsprechend 2.4.3.1 und 2.4.3.2). In Abb. 18, Abb. 21 und Abb. 23 sind die entsprechenden Massenspektren mit den dazugehörigen Referenzspektren aus der Spektrenbibliothek abgebildet.

GA

Weil die TBDMS-Derivate sehr leicht zerfallen, liegt das Molekülion (M , m/z 304, $[C_{14}H_{32}O_3Si_2]^+$) im Massenspektrum nicht vor. Als charakteristische Ionen enthält das Massenspektrum die Fragmente m/z 289 $[C_{13}H_{29}O_3Si_2]^+$ und m/z 247 $[C_{10}H_{23}O_3Si_2]^+$, die durch den Verlust von CH_3^\bullet ($M - 15$) oder $C_4H_9^\bullet$ ($M - 57$) durch α -Spaltung aus einer der TBDMS-Gruppen zu erklären sind (Abb. 19 zeigt jeweils eine Möglichkeit). Die Ionen m/z 189, 147, 115, 75 und 73 können als Zerfallsprodukte der TBDMS-Gruppen erklärt werden (Abb. 20; siehe auch z.B. Little, 1999; Marcell *et al.*, 1985).

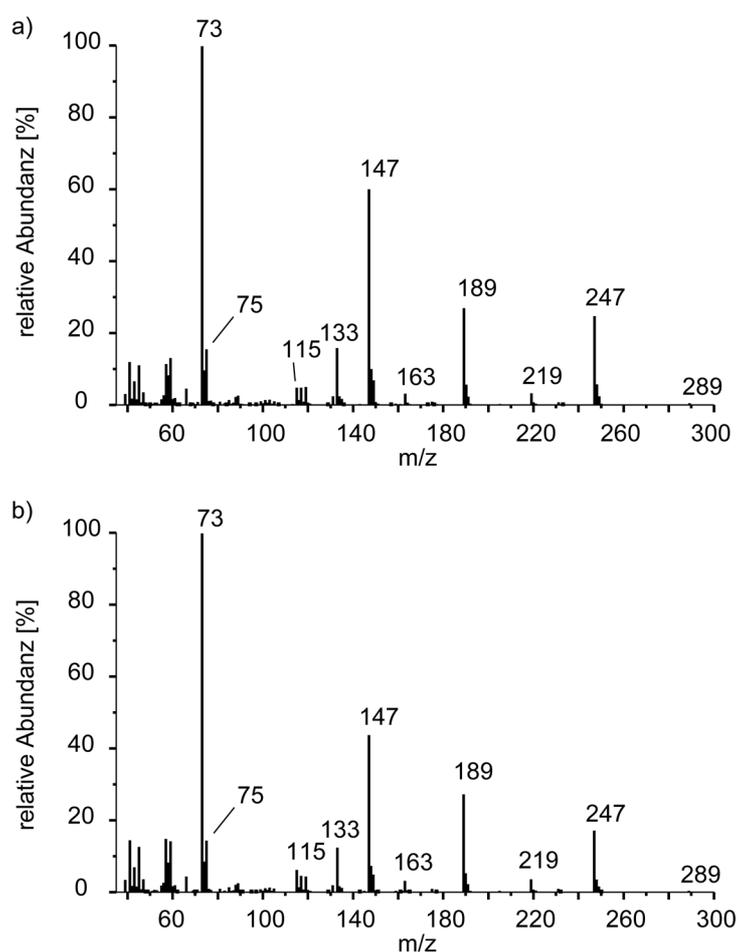


Abb. 18 a): eigenes Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats von GA

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (NIST98)

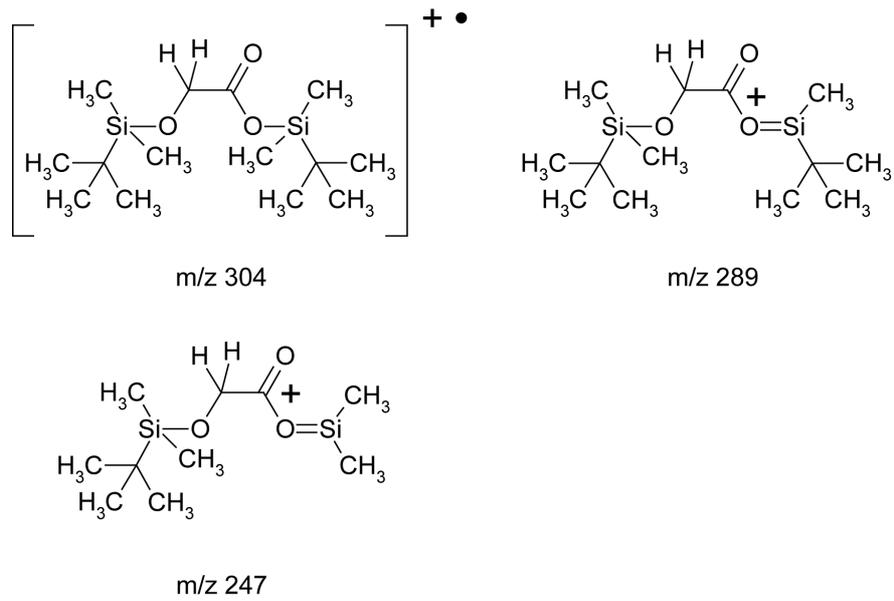


Abb. 19: Molekülion und charakteristische Fragmente des di-TBDMS-Derivats von GA

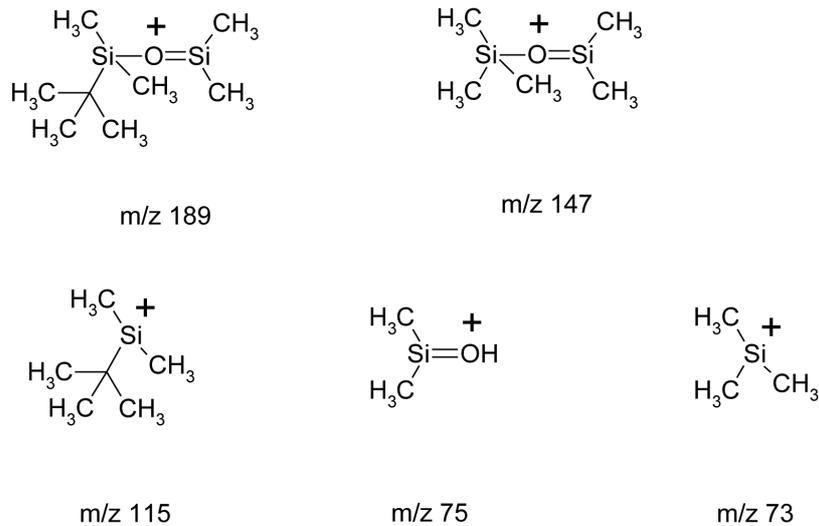


Abb. 20: Ionen die als Fragmente von di-TBDMS-Derivaten erscheinen

Als Ion für die Quantifizierung von GA wurde $m/z \ 247$ gewählt (für $^{13}\text{C}_2$ -GA entsprechend $m/z \ 249$). Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des GA-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen $m/z \ 289$, 147 und 73 ($^{13}\text{C}_2$ -GA $m/z \ 291$) registriert.

HIVA

Wieder liegt das Molekülion (M, m/z 346, $[C_{17}H_{38}O_3Si_2]^{+}$) im Massenspektrum nicht vor. Als charakteristische Ionen enthält das Massenspektrum die Fragmente m/z 331 $[C_{16}H_{35}O_3Si_2]^{+}$ und m/z 289 $[C_{13}H_{29}O_3Si_2]^{+}$, die durch den Verlust von CH_3^{\bullet} (M - 15) oder $C_4H_9^{\bullet}$ (M - 57) durch α -Spaltung aus einer der TBDMS-Gruppen zu erklären sind (Abb. 22 zeigt jeweils eine Möglichkeit). Die Ionen m/z 189, 147, 115, 75 und 73 können als Zerfallsprodukte der TBDMS-Gruppen erklärt werden (Abb. 20).

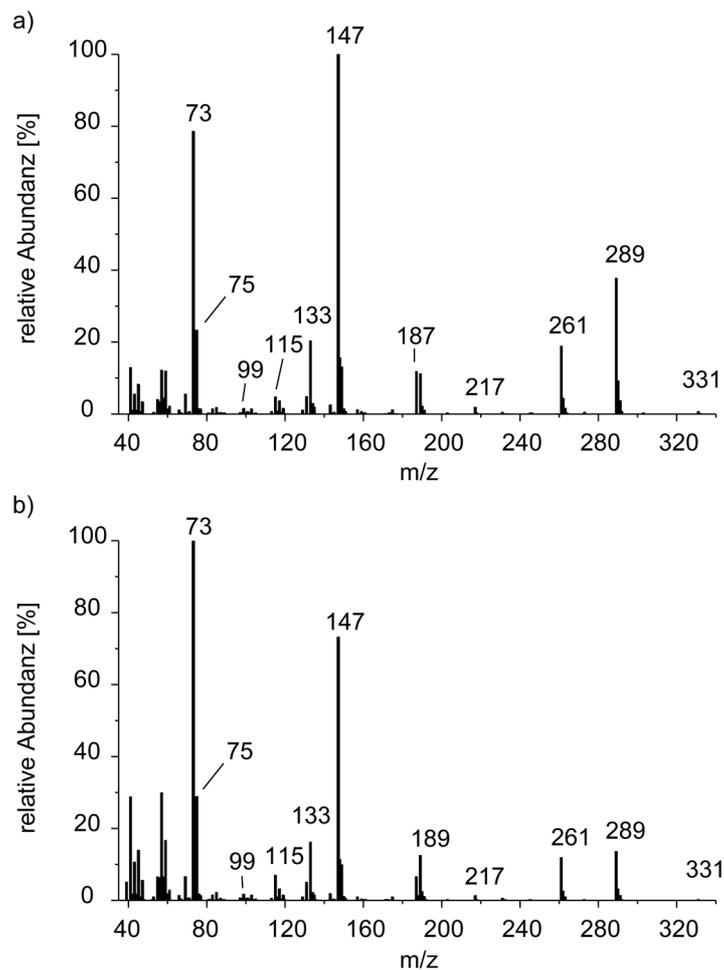


Abb. 21 a): Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats von HIVA

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (NIST98)

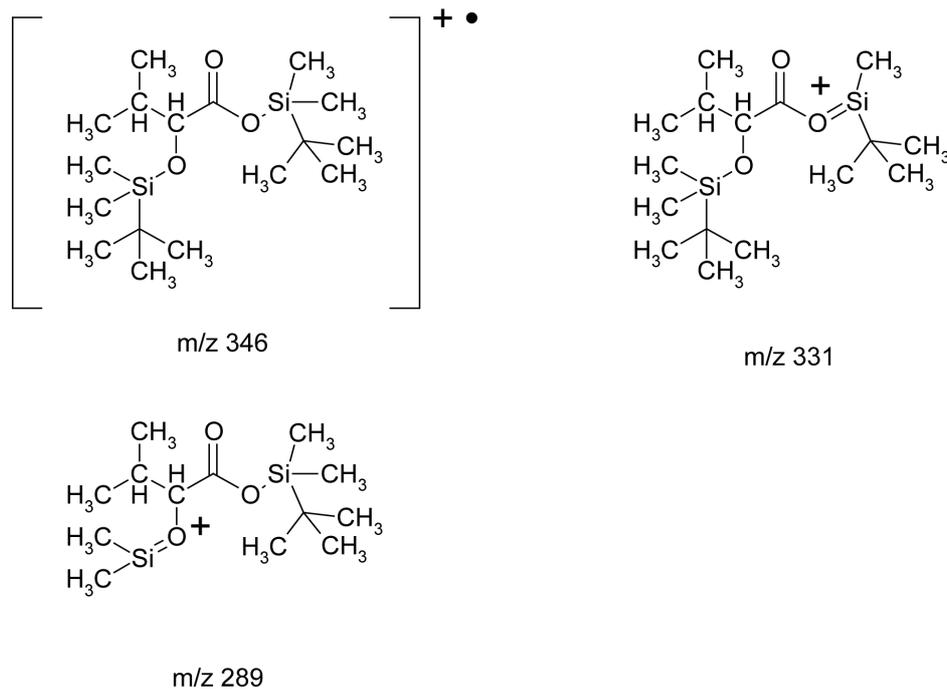


Abb. 22: Molekülion und charakteristische Fragmente des di-TBDMS-Derivats von HIVA

Als Ion für die Quantifizierung von HIVA wurde m/z 289 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des HIVA-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 331, 147 und 73 registriert.

D₆-SA

Wieder liegt das Molekülion (M, m/z 350, [C₁₆H₃₀D₄O₄Si₂]⁺) im Massenspektrum nicht vor. Als charakteristische Ionen enthält das Massenspektrum die Fragmente m/z 335 [C₁₅H₂₇D₄O₄Si₂]⁺ und m/z 289 [C₁₂H₂₁D₄O₄Si₂]⁺, die durch den Verlust von CH₃[•] (M - 15) oder C₄H₉[•] (M - 57) durch α-Spaltung aus einer der TBDMS-Gruppen zu erklären sind (Abb. 24 zeigt jeweils eine Möglichkeit). Die Ionen m/z 189, 147, 76 und 73 können als Zerfallsprodukte der TBDMS-Gruppen erklärt werden (Abb. 20, m/z 76 als [(CH₃)₂SiOD]⁺ statt m/z 75). Für das di-TBDMS-Derivat von D₆-SA lag in den zur Verfügung stehenden Spektrenbibliotheken (Wiley275 und NIST98) kein Referenzspektrum vor. Ein Massenspektrum für das di-TBDMS-Derivat von unmarkierter SA und das entsprechende Referenzspektrum sind in 3.1.3 abgebildet.

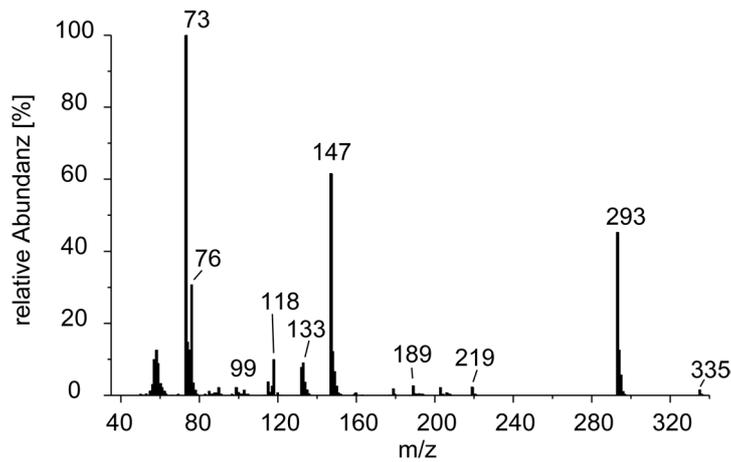


Abb. 23: Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats von D₆-SA

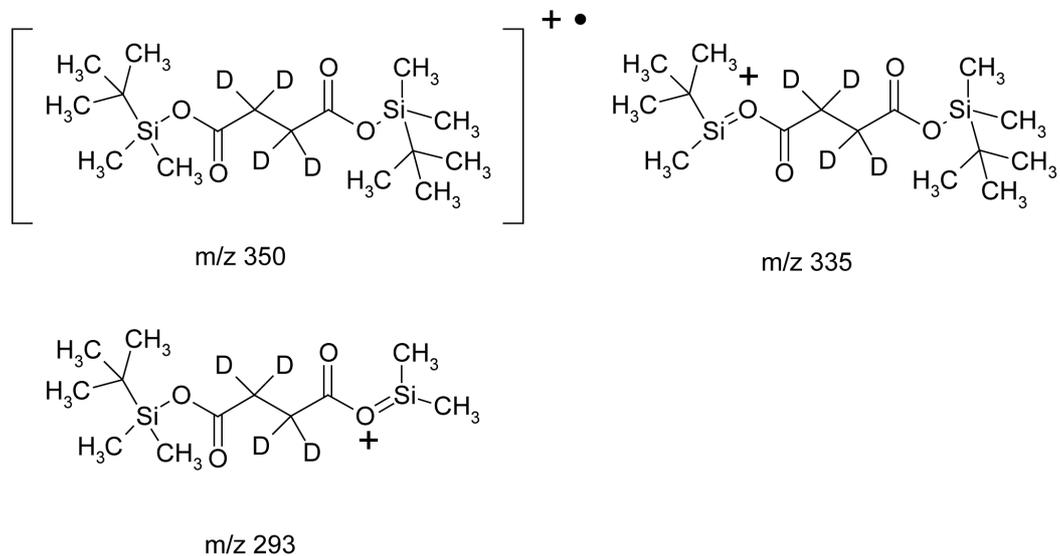


Abb. 24: Molekülion und charakteristische Fragmente des di-TBDMS-Derivats von D₆-SA

Als Ion für die Quantifizierung von D₆-SA wurde m/z 293 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des D₆-SA-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 335, m/z 147 und m/z 73 registriert.

Mit Hilfe der oben festgelegten Ionen wurden dann die Retentionszeiten der Substanzen bestimmt. Plasma- und Urinproben wurden in der in 2.4.3.1 und 2.4.3.2 beschriebenen Weise aufgearbeitet und analysiert. In Abb. 25 und Abb. 26 sind Beispielchromatogramme für Plasma- und Urinproben wiedergegeben. Typische Retentionszeiten für die in Tab. 2 angegebenen Bedingungen waren für das

GA-Derivat 12,9 min, für das D₆-SA-Derivat 16,4 min und für das HIVA-Derivat 14,6 min. Die Detektion des Ions m/z 249 (Abb. 25b und Abb. 26b) auch ohne den Zusatz von ¹³C₂-GA ergibt sich durch die natürliche Isotopenverteilung (siehe auch 3.1.2.2). Sofern das ¹³C₂-GA-Derivat in der Probe war, trat es bei der gleichen Retentionszeit auf wie das GA-Derivat. Das Störsignal kurz nach dem des GA-Derivats (siehe Abb. 25 und Abb. 26) konnte chromatographisch nicht besser abgetrennt werden und wurde bei der Integration des GA-Signals entsprechend berücksichtigt. Die Menge der störenden Verbindung in den Proben war nicht ausreichend, um mit der Aufnahme eines Chromatogramms im Scan-Modus und durch Vergleich mit der Spektrenbibliotheken die Identität klären zu können.

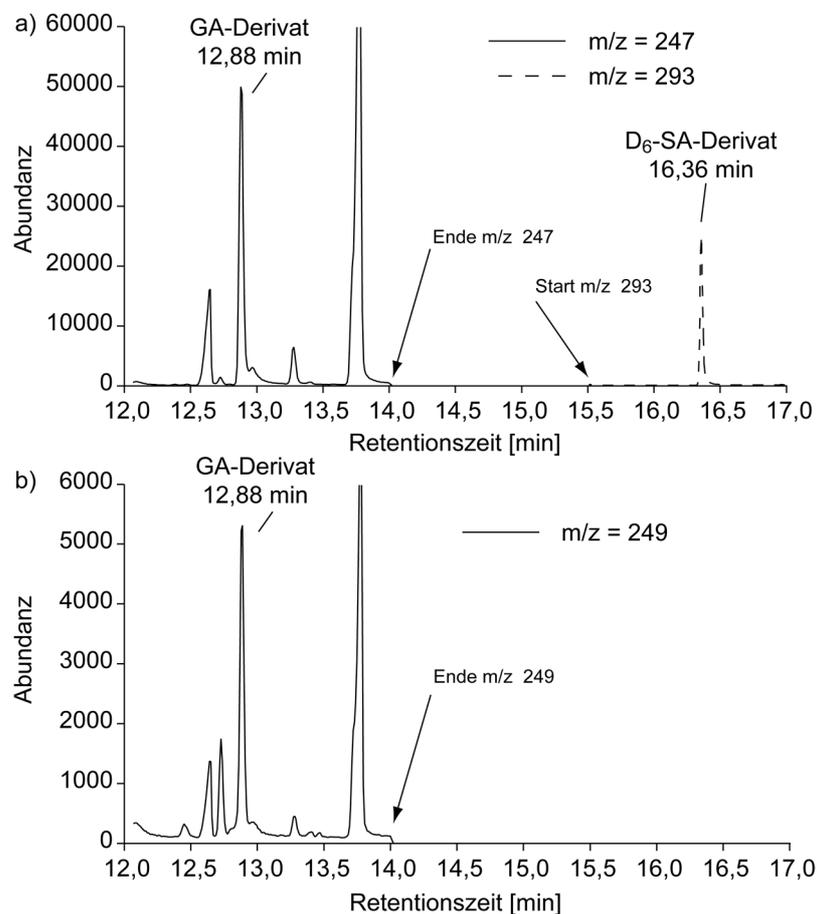


Abb. 25: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von GA aus Plasma, Konzentrationen: GA: 5 µmol/l, D₆-SA: 5 µmol/l

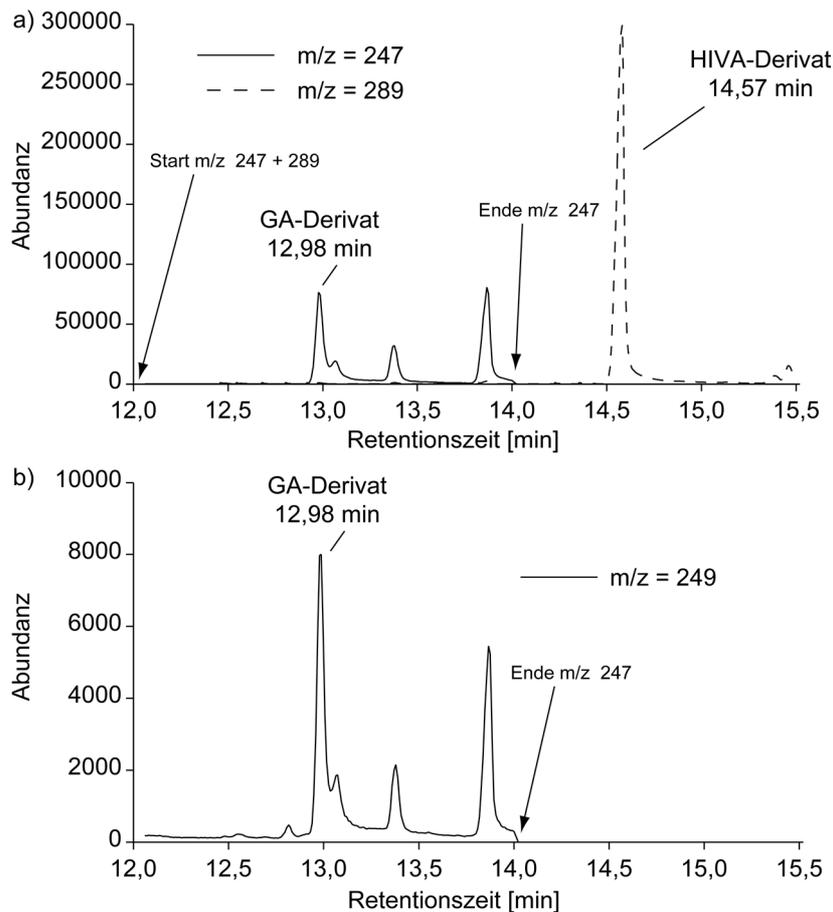


Abb. 26: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von GA aus Urin, Konzentrationen: GA: 25 $\mu\text{mol/l}$, HIVA: 500 $\mu\text{mol/l}$

3.1.2.2 Eichung und quantitative Auswertung

Wie in 2.4.3.3 beschrieben wurden Eichungen für die Bestimmung von GA durchgeführt. Da $^{13}\text{C}_2$ -GA nicht als Substanz zur Verfügung stand, wurde die Eichung mit GA auch für die Quantifizierung von $^{13}\text{C}_2$ -GA verwendet. Im Massenspektrum des GA-Derivats (siehe Abb. 18, Abb. 25b und Abb. 26b) ist auch das Ion m/z 249 zu finden, das für die Bestimmung von $^{13}\text{C}_2$ -GA verwendet wurde. Dies ist durch das natürliche Vorkommen von Isotopen mit höheren Massenzahlen (vor allem ^{13}C , ^{29}Si und ^{30}Si) zu erklären. Für das Ion mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Si}_2^+$ (m/z 247) lassen sich viele Isotopenkombinationen konstruieren, die zur m/z -Zahl 249 führen. Mit Hilfe des Softwareprogramms ISOFORM (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) wurde für die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Si}_2$ berechnet, dass die Intensität des Ions m/z 249 ungefähr 9,4% von der Intensität des

Ions m/z 247 betragen müsste. Dieser Umstand wurde bei der Messung von $^{13}\text{C}_2$ -GA wie in 2.4.3.3 beschrieben durch die Bestimmung des Verhältnisses 249/247 in jedem einzelnen Experiment berücksichtigt.

Ebenso kommt im Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats des unmarkierten SA das Ion m/z 293 vor. Die Intensität beträgt aber nach Berechnung mit dem Softwareprogramm ISOFORM nur 0,3% der Intensität des Ions m/z 289 und wurde daher vernachlässigt.

Eichgeraden für GA sind in Abb. 27 und Abb. 28 abgebildet. Der Y-Achsenabschnitt in der Geradengleichung in Abb. 27 repräsentiert die Konzentration von endogenem GA im zur Herstellung der Eichproben verwendeten Plasma (in diesem Fall $32,2 \mu\text{mol/l}$). In Abb. 28 ergibt sich entsprechend eine endogene GA-Konzentration von $88,3 \mu\text{mol/l}$ im für die Eichproben verwendeten Urin. Als Nachweisgrenze im Plasma wurden $1,2 \mu\text{mol/l}$ für GA und $0,8 \mu\text{mol/l}$ für $^{13}\text{C}_2$ -GA bestimmt; im Urin entsprechend $32,6 \mu\text{mol/l}$ und $2,9 \mu\text{mol/l}$.

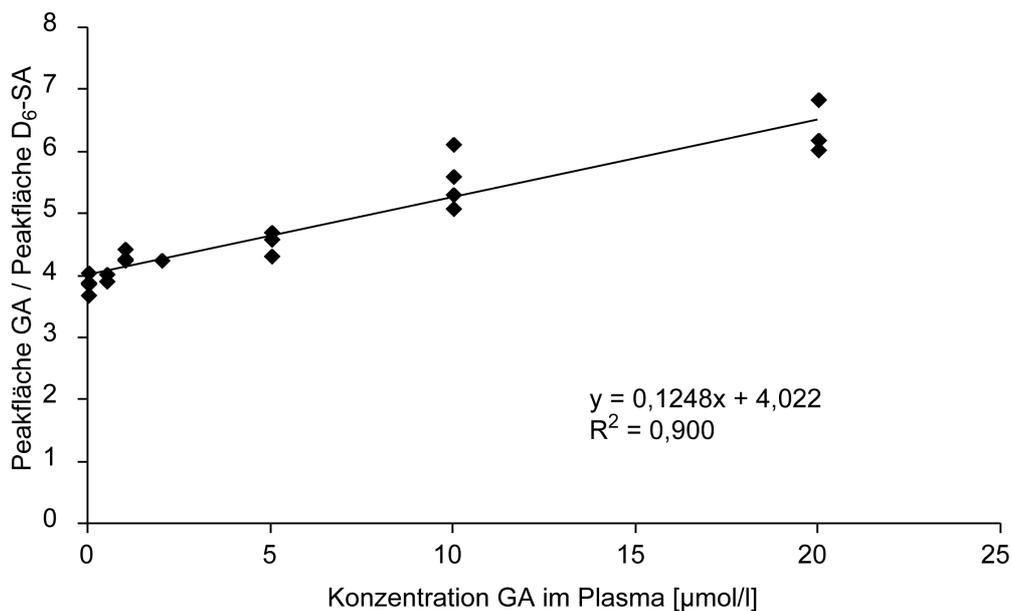


Abb. 27: Eichung für GA aus Plasma im Bereich zwischen $0,5$ und $20 \mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards D_6 -SA: $5 \mu\text{mol/l}$)

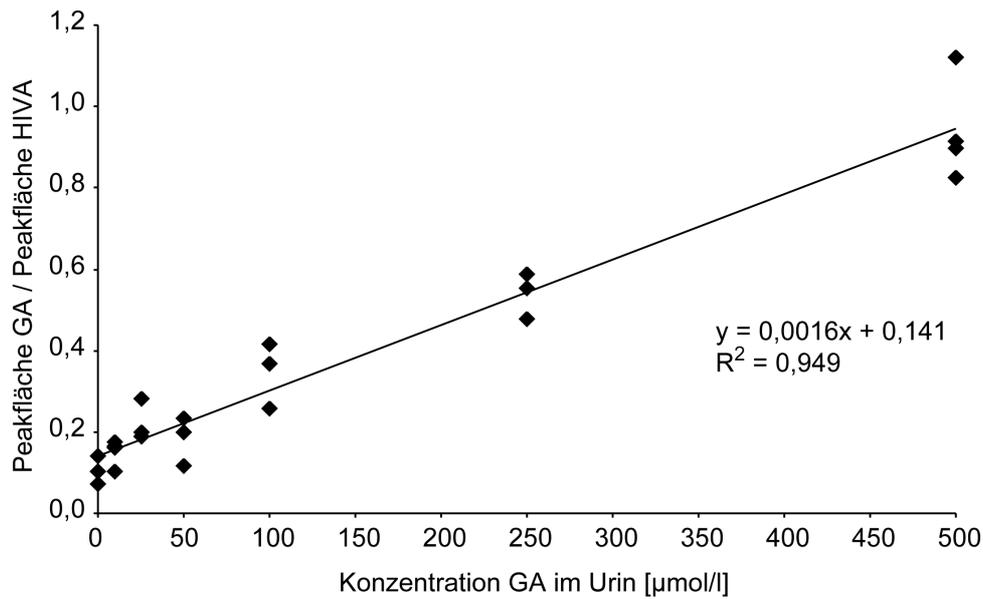


Abb. 28: Eichung für GA aus Urin im Bereich zwischen 10 und 500 µmol/l (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards HIVA: 500 µmol/l)

3.1.2.3 Validierung der Methode zur Bestimmung von Glykolsäure

Wiederfindung

In Tab. 7 sind die Daten für die Wiederfindung von GA aus Plasma- und Urinproben im Vergleich zu Lösungen in ACN beschrieben, die in der in 2.4.3.4 beschriebenen Weise gewonnen wurden.

| Matrix | Konzentration GA | n | Wiederfindung |
|--------|------------------|---|---------------|
| Plasma | 25 µmol/l | 2 | 83 - 121%* |
| Urin | 250 µmol/l | 3 | 51 ± 4%** |

Tab. 7: Wiederfindung von GA aus Plasma und Urin im Vergleich zu Lösungen in ACN (*: nur als Bereich wegen n = 2; **: MW ± SD)

Präzision

Wie in 2.4.3.4 beschrieben wurden Variationskoeffizienten CV als Maß für die Präzision der Analyse von GA bestimmt. Dazu wurden mehrere Aliquots einer Lösung parallel aufgearbeitet und anschließend gemessen.

| Matrix | Konzentration GA | n | Signalflächen GA/Standard (MW ± SD) | CV |
|--------|------------------|---|--|----|
| Plasma | 5 µmol/l | 3 | 2,694 ± 0,1193 | 4% |
| Plasma | 25 µmol/l | 3 | 4,056 ± 0,2452 | 6% |
| Urin | 25 µmol/l | 6 | 0,188 ± 0,0035 | 2% |
| Urin | 250 µmol/l | 3 | 0,415 ± 0,0169 | 4% |

Tab. 8: Präzision der Bestimmung von GA aus Plasma und Urin (Standard: D₆-SA für Plasma und HIVA für Urin)

Stabilität

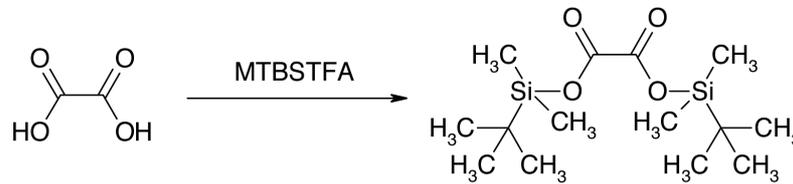
Wie in 2.4.3.4 beschrieben wurden Lösungen von GA in Plasma und Urin hergestellt und auf mehrere Proben verteilt. Ein Teil der Proben wurde sofort gemessen, ein Teil wurde 5 Wochen bei -80°C aufbewahrt und dann aufgetaut und gemessen. In Tab. 9 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für das Verhältnis der Signalflächen für GA/Standard dieser Messungen wiedergegeben. Ein t-Test (nicht-gepaart, zweiseitig, P<0,05) zeigte, dass es jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab.

| Matrix | Konzentration GA | Signalflächen GA/Standard (MW ± SD) | |
|--------|------------------|-------------------------------------|----------------|
| | | sofort gemessen | nach Lagerung |
| Plasma | 25 µmol/l | 4,265 ± 0,0709 | 4,282 ± 0,0514 |
| Urin | 250 µmol/l | 0,415 ± 0,0098 | 0,413 ± 0,0111 |

Tab. 9: Signalflächen ¹³C₂-GA/Standard in frischen und gelagerten Proben (n = 3, Standard: D₆-SA für Plasma und HIVA für Urin)

3.1.3 Bestimmung von Oxalsäure

Nach der Extraktion wurde OA mit MTBSTFA zum di-TBDMS-Derivat umgesetzt (Abb. 29), das nach gaschromatographischer Trennung mit massenselektiver Detektion bestimmt wurde.



MTBSTFA: *N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid

Abb. 29: Reaktion von OA mit MTBSTFA

3.1.3.1 GC/MSD-Analyse von Oxalsäure und Bernsteinsäure

Lösungen von OA und SA in ACN mit einer Konzentration von ca. 100 mg/l wurden mit MTBSTFA derivatisiert und im Scan-Modus mit dem GC/MSD analysiert (entsprechend 2.4.4.1 und 2.4.4.2). In Abb. 30 und Abb. 32 sind die entsprechenden Massenspektren mit den dazugehörigen Referenzspektren aus der Spektrenbibliothek abgebildet. Das Massenspektrum von D₆-SA wurde bereits in 3.1.2.1 abgebildet und interpretiert (Abb. 23 und Abb. 24).

OA

Weil die TBDMS-Derivate sehr leicht zerfallen, liegt das Molekülion (M, m/z 318, [C₁₄H₃₀O₄Si₂]⁺) im Massenspektrum nicht vor. Als charakteristische Ionen enthält das Massenspektrum die Fragmente m/z 303 [C₁₃H₂₇O₄Si₂]⁺ und m/z 261 [C₁₀H₂₁O₄Si₂]⁺, die durch den Verlust von CH₃[•] (M - 15) oder C₄H₉[•] (M - 57) durch α-Spaltung aus einer der TBDMS-Gruppen zu erklären sind (Abb. 31 zeigt jeweils eine Möglichkeit). Die Ionen m/z 189, 147, 115, 75 und 73 können als Zerfallsprodukte der TBDMS-Gruppen erklärt werden (Abb. 20).

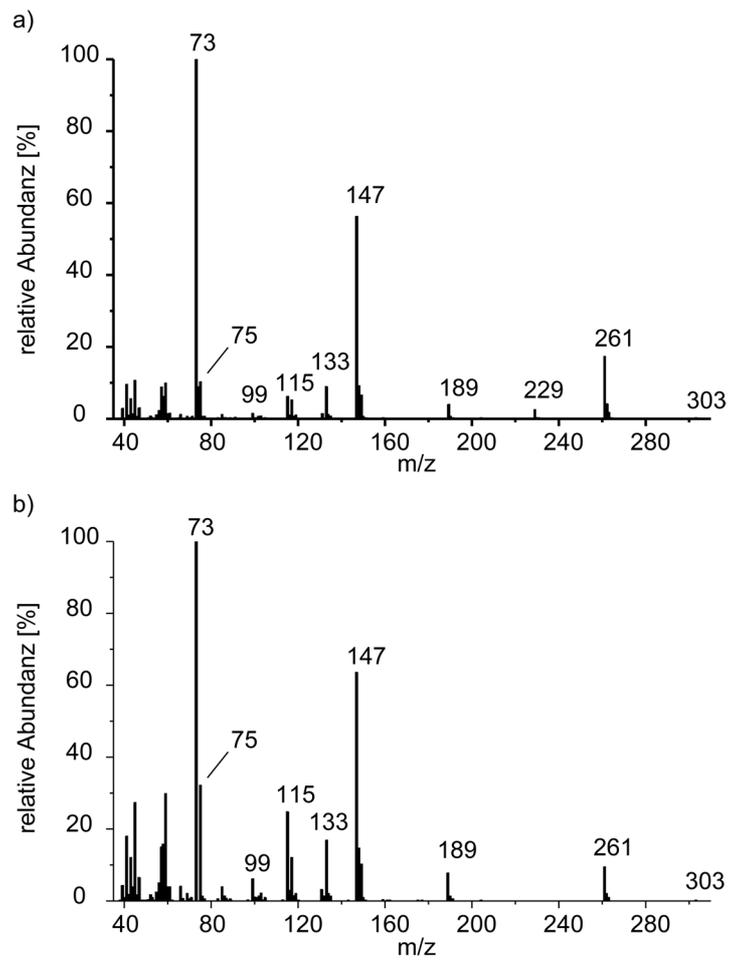


Abb. 30 a): Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats von OA

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (NIST98)

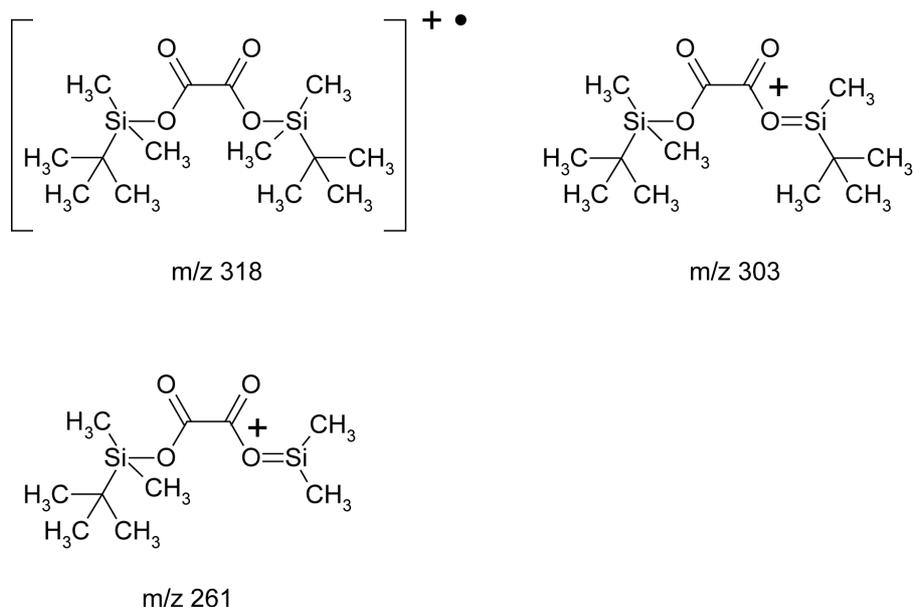


Abb. 31: Molekülion und charakteristische Fragmente des di-TBDMS-Derivats von OA

Als Ion für die Quantifizierung von OA wurde m/z 261 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des OA-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 303, 147 und 73 registriert. Für das $^{13}\text{C}_2$ -OA-Derivat wurden entsprechend m/z 263 und 305 gewählt.

SA

Wieder liegt das Molekülion (M, m/z 346, $[\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Si}_2]^{++}$) im Massenspektrum nicht vor. Als charakteristische Ionen enthält das Massenspektrum die Fragmente m/z 331 $[\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{Si}_2]^+$ und m/z 289 $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{Si}_2]^+$, die durch den Verlust von CH_3^\bullet (M - 15) oder $\text{C}_4\text{H}_9^\bullet$ (M - 57) durch α -Spaltung aus einer der TBDMS-Gruppen zu erklären sind (Abb. 33 zeigt jeweils eine Möglichkeit). Die Ionen m/z 189, 147, 75 und 73 können als Zerfallsprodukte der TBDMS-Gruppen erklärt werden (Abb. 20).

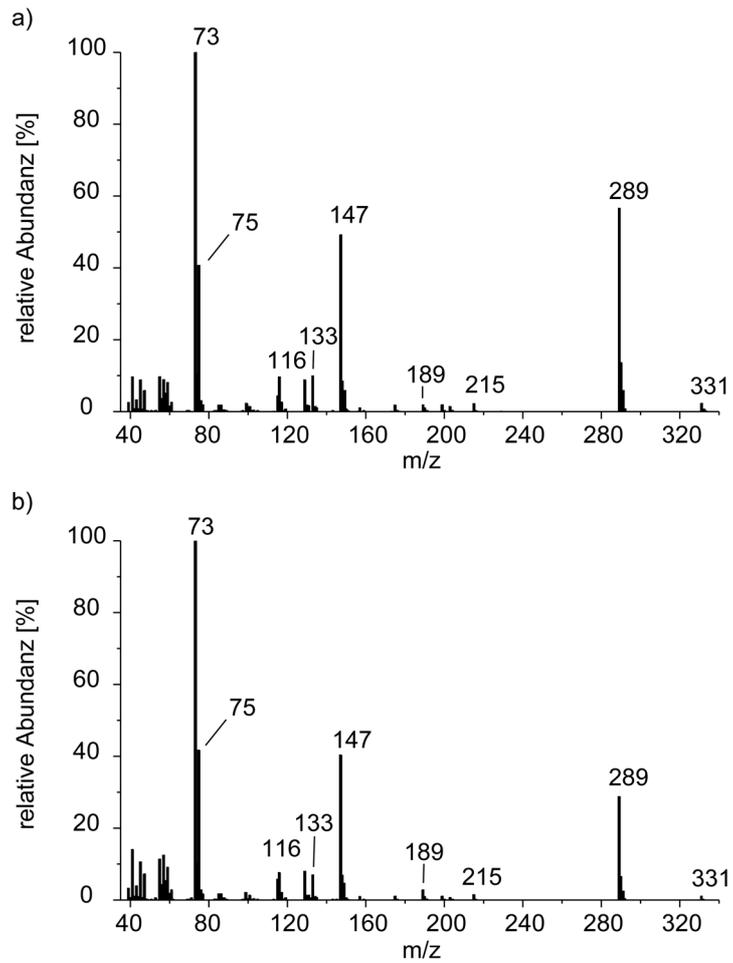


Abb. 32 a): Massenspektrum des di-TBDMS-Derivats von SA

b): Referenzmassenspektrum aus der Bibliothek (NIST98)

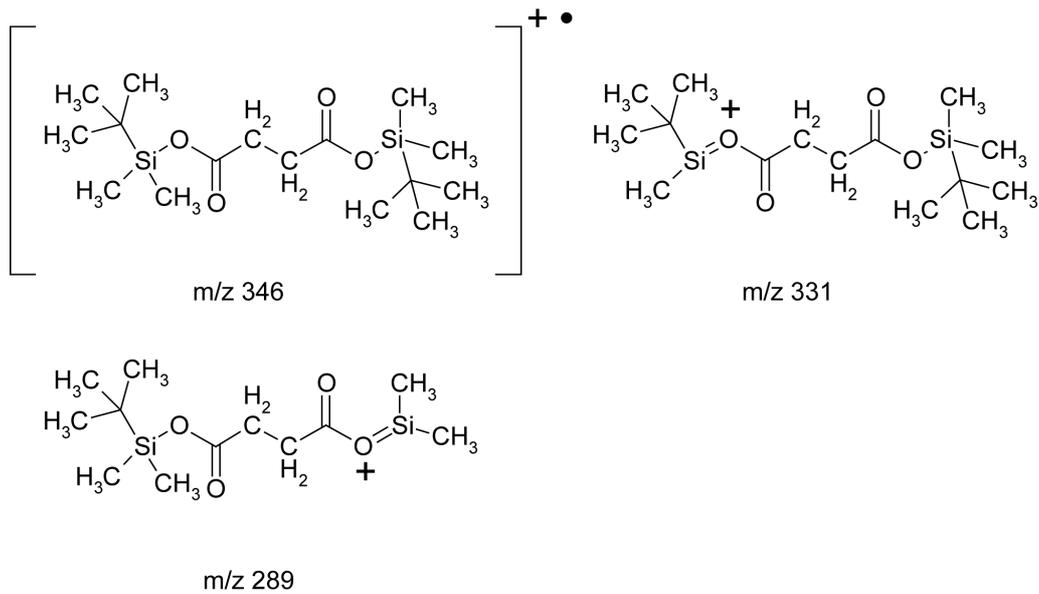


Abb. 33: Molekülion und charakteristische Fragmente des di-TBDMS-Derivats von SA

Als Ion für die Quantifizierung von SA wurde m/z 289 gewählt. Um auch in den im SIM-Modus aufgenommenen Chromatogrammen die Identität des SA-Signals abzusichern, wurden zusätzlich die Ionen m/z 331, 147 und 73 registriert.

Mit Hilfe der oben festgelegten Ionen wurden dann die Retentionszeiten der Substanzen bestimmt. Urinproben wurden in der in 2.4.4.1 und 2.4.4.2 beschriebenen Weise aufgearbeitet und analysiert. In Abb. 34 sind Beispielchromatogramme einer Urinprobe wiedergegeben. Alle Einzelionenchromatogramme resultieren aus der gleichen Messung einer Probe. Typische Retentionszeiten für die in Tab. 3 angegebenen Bedingungen waren für das OA-Derivat 13,60 min, für das SA-Derivat 16,40 min und das D_6 -SA-Derivat 16,36 min. Die Retentionszeit für das D_6 -SA-Derivat war immer etwas kürzer als die des undeuterten SA-Derivats. Dieser Effekt ist bekannt und wird als „inverser Isotopeneffekt“ bezeichnet. Er wird dadurch erklärt, dass die C-D-Bindungen kürzer sind als die C-H-Bindungen (Wade, 1999). Die Detektion des Ions m/z 263 (Abb. 34c) auch ohne den Zusatz von $^{13}\text{C}_2$ -OA ergibt sich durch die natürlichen Isotopenverteilung (siehe auch 3.1.3.2). Sofern das $^{13}\text{C}_2$ -OA-Derivat in der Probe war, trat es bei der gleichen Retentionszeit auf wie das OA-Derivat.

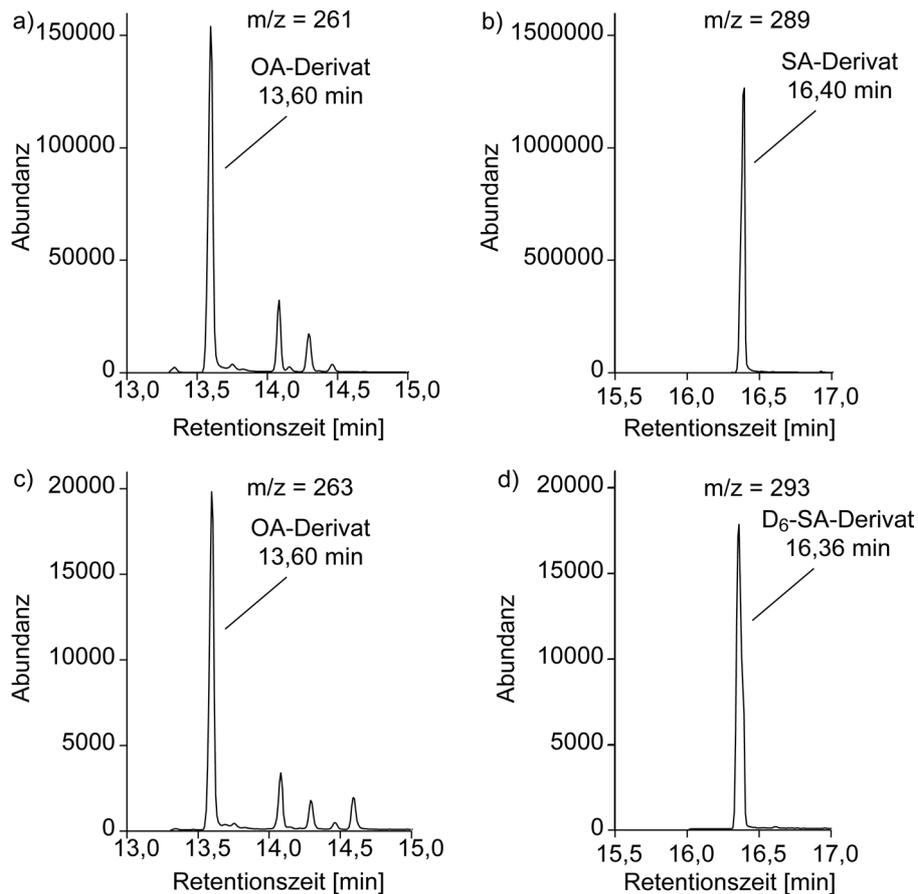


Abb. 34: Beispielchromatogramme einzelner Ionen bei der Bestimmung von OA aus einer Urinprobe, Konzentrationen OA: 50 $\mu\text{mol/l}$, SA: 500 $\mu\text{mol/l}$, D₆-SA: 5 $\mu\text{mol/l}$

3.1.3.2 Eichung und quantitative Auswertung

Wie in 2.4.4.3 beschrieben wurden Eichungen für die Bestimmung von OA und $^{13}\text{C}_2$ -OA durchgeführt. Im Massenspektrum von OA (siehe Abb. 30 und Abb. 34c) ist auch das Ion m/z 263 zu finden, das für die Bestimmung von $^{13}\text{C}_2$ -OA verwendet wurde. Dies kann durch das natürliche Vorkommen von Isotopen mit höheren Massenzahlen (vor allem ^{13}C , ^{29}Si und ^{30}Si) erklärt werden. Für das Ion mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{Si}_2^+$ (m/z 261) lassen sich viele Isotopenkombinationen konstruieren, die zu m/z 263 führen. Mit Hilfe des Softwareprogramms ISOFORM wurde für die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{Si}_2$ berechnet, dass die Intensität des Ions m/z 263 ungefähr 9,6% von der Intensität des Ions m/z 261 betragen müsste. Dieser Umstand wurde bei der Messung von $^{13}\text{C}_2$ -OA wie in 2.4.4.3 beschrieben durch die Bestimmung des Verhältnisses 263/261 in jedem einzelnen Experiment

berücksichtigt. Die erhaltenen Eichgeraden sind in Abb. 35 und Abb. 36 abgebildet. Der Y-Achsenabschnitt in der Geradengleichung in Abb. 35 repräsentiert die Konzentration von endogenem OA im zur Herstellung der Eichproben verwendeten Urin (in diesem Fall 167,6 $\mu\text{mol/l}$). Der Y-Achsenabschnitt in der Geradengleichung in Abb. 36 ist dadurch zu erklären, dass der zur Eichung verwendete Urin endogenes OA enthielt und somit auch das Ion m/z 263 gebildet wurde (siehe oben). Als Nachweisgrenze für OA aus Urin wurde 17,2 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Die Nachweisgrenze für $^{13}\text{C}_2$ -OA wurde auf Grundlage des Verhältnisses der Ionen m/z 263 zu m/z 261 mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt (siehe Abb. 37).

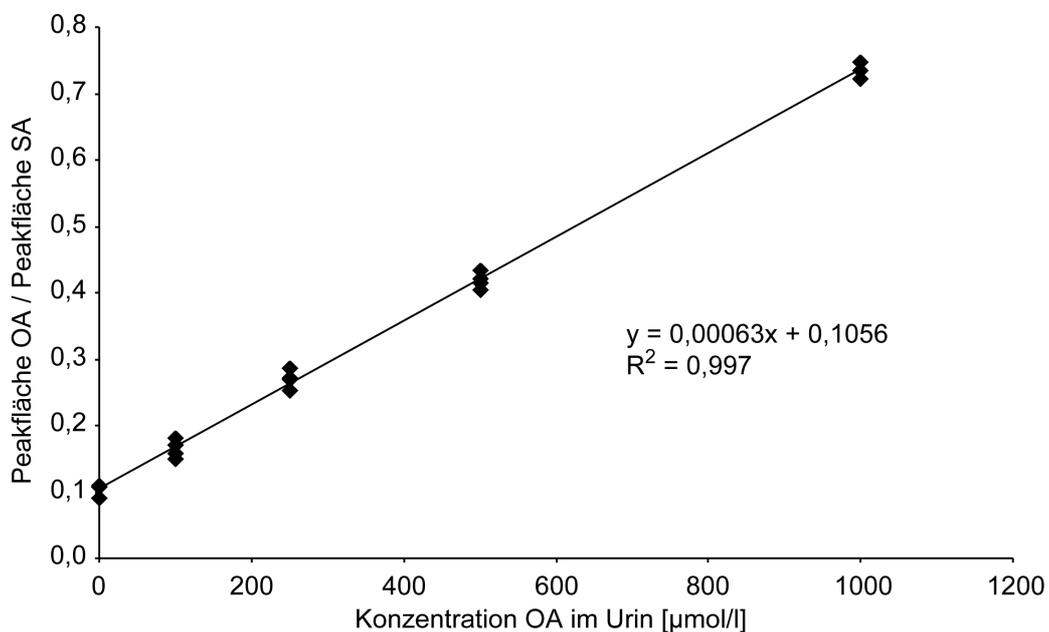


Abb. 35: Eichung für OA aus Urin im Bereich zwischen 100 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards SA: 500 $\mu\text{mol/l}$)

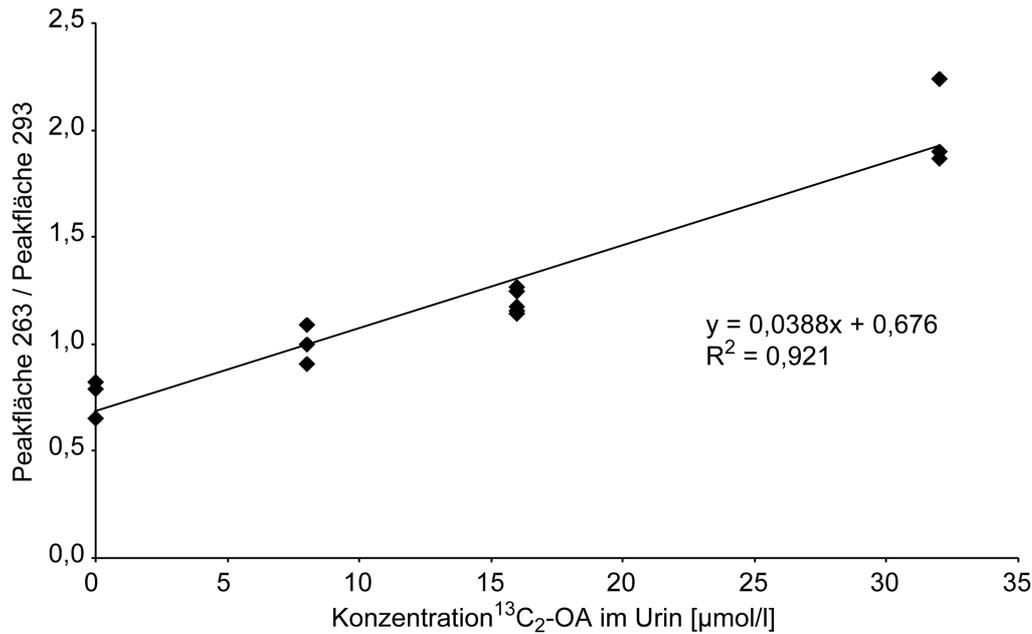


Abb. 36: Eichung für $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ aus Urin im Bereich zwischen 8 und 32 $\mu\text{mol/l}$ (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen; Konzentration des internen Standards $\text{D}_6\text{-SA}$: 5 $\mu\text{mol/l}$)

Abb. 37 zeigt, dass ein Zusatz an $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ auch zu einer linearen Verschiebung des Verhältnisses der Ionen m/z 263 zu 261 (entsprechender m/z -Wert des $^{12}\text{C}_2\text{-OA}$) führte. Der Y-Achsenabschnitt ist wieder durch das Ion m/z 263 aus dem Massenspektrum von OA zu erklären (siehe oben). Der in Abb. 37 gezeigte Effekt wurde für die Quantifizierung von $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ vor dem Hintergrund des aus der natürlichen Isotopenverteilung des OA-Derivats resultierenden Ions m/z 263 (siehe 2.4.4.3) sowie für die Bestimmung der Nachweisgrenze für $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ aus Urin genutzt. Da die endogene OA-Konzentration in den in der Exposition gewonnenen Urinproben nicht konstant war, konnte die in Abb. 37 gezeigte lineare Beziehung nicht direkt als Eichung für die Bestimmung der $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ -Konzentration in den bei der Exposition gewonnenen Proben verwendet werden.

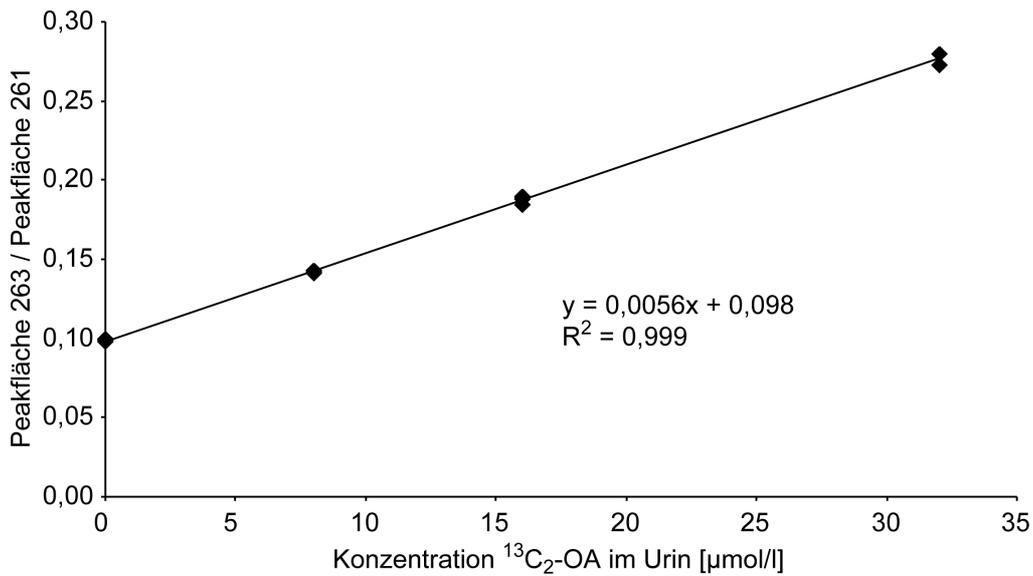


Abb. 37: Verhältnis der Signalflächen für m/z 263 und 261, erhalten durch Zusatz verschiedener ¹³C₂-OA-Konzentrationen zu einer Urinfraktion (alle Konzentrationen wurden mindestens dreimal gemessen)

3.1.3.3 Validierung der Methode zur Bestimmung von Oxalsäure

Wiederfindung

In Tab. 10 sind die Daten für die Wiederfindung von OA aus Urinproben im Vergleich zu Lösungen in ACN angegeben, die in der in 2.4.4.4 beschriebenen Weise gewonnen wurden. Die Mittelwerte für die Signalflächen wurden aus drei Messungen berechnet.

| Matrix | Konzentration OA | n | Wiederfindung (MW ± SD) |
|--------|------------------|---|-------------------------|
| Urin | 250 µmol/l | 3 | 25 ± 3% |

Tab. 10: Wiederfindung von OA aus Urin im Vergleich zu Lösungen in ACN

Präzision

Wie in 2.4.4.4 beschrieben wurden Variationskoeffizienten CV als Maß für die Präzision der Analyse von OA berechnet. Dazu wurden mehrere Aliquots einer Lösung parallel aufgearbeitet und anschließend gemessen.

| Matrix | Konzentration OA | n | Signalflächen OA/D ₆ -SA (MW ± SD) | CV |
|--------|------------------|---|--|----|
| Urin | 25 µmol/l | 6 | 0,009 ± 0,0005 | 6% |
| Urin | 250 µmol/l | 3 | 0,084 ± 0,0048 | 6% |

Tab. 11: Präzision der Bestimmung von OA Urin

3.1.3.4 Verhältnis der Ionen m/z 263 zu 261 im Urin bei nicht-exponierten Personen

Um die Variation des Verhältnisses m/z 263/261 im Urin von nicht-exponierten Personen zu prüfen, wurde wie in 2.4.4.5 beschrieben von vier männlichen Personen (einschließlich des zu einem früheren Zeitpunkt exponierten Probanden, für den die Ergebnisse der Glykolexposition gezeigt werden; siehe 3.2) zu drei verschiedenen Tageszeiten Urin gesammelt. Die bei der Bestimmung des Verhältnisses m/z 263/261 erhaltenen Werte sind in Tab. 12 angegeben. Die Schwankung ist sehr gering, daher kann wie in 2.4.4.3 angegeben das Verhältnis m/z 263/261 zur Bestimmung von $^{13}\text{C}_2\text{-OA}$ verwendet werden.

| Person | Fraktion | Verhältnis Ionen m/z 263/261 | |
|--------|------------|-------------------------------------|------|
| | | Mittelwert \pm Standardabweichung | CV |
| A | abends | 0,112 \pm 0,0013 | 1% |
| A | vormittags | 0,111 \pm 0,0019 | 1% |
| A | mittags | 0,108 \pm 0,0006 | 1% |
| A | gesamt | 0,111 \pm 0,0021 | 2% |
| B | abends | 0,102 \pm 0,0004 | 0,4% |
| B | vormittags | 0,100 \pm 0,0013 | 1% |
| B | mittags | 0,099 \pm 0,0023 | 2% |
| B | gesamt | 0,100 \pm 0,0016 | 2% |
| C | abends | 0,114 \pm 0,0016 | 1% |
| C | vormittags | 0,115 \pm 0,0008 | 1% |
| C | mittags | 0,119 \pm 0,0009 | 1% |
| C | gesamt | 0,116 \pm 0,0025 | 2% |
| D | abends | 0,094 \pm 0,0019 | 2% |
| D | vormittags | 0,104 \pm 0,0017 | 2% |
| D | mittags | 0,096 \pm 0,0019 | 2% |
| D | gesamt | 0,098 \pm 0,0050 | 5% |

Tab. 12: Verhältnisse der Ionen m/z 263/261 ohne $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Exposition; morgens, mittags, abends: jeweils drei Proben der gleichen Fraktion gemessen; gesamt: Mittelwert über alle Messungen der Person; Person A: Proband, der im Rahmen dieser Arbeit exponiert wurde

3.2 Humanexposition

Ein Proband wurde nach den in 2.5 beschriebenen Bedingungen gegen $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Dämpfe exponiert. Er berichtete über keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens während oder nach der Exposition.

3.2.1 Aufgenommene Dosis

Zur Bestimmung der aufgenommenen Dosis, mussten von der ins System applizierten Dosis das zum Expositionsende eventuell verbliebene und das möglicherweise exhalierete $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ subtrahiert werden. Nach der elften und der sechzehnten Inhalation war die Ausatemluft des Probanden gesammelt worden. In dieser konnte kein $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ nachgewiesen werden (Nachweisgrenze als Konzentration in der Ausatemluft $0,015 \text{ ppm}^a$). Die eingesetzte Gesamtmenge betrug $1.894 \text{ mmol } ^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ ($16 \times 6,6 \mu\text{l } ^{13}\text{C}_2\text{-EG}$). Nach der Exposition wurden $0,460 \text{ mmol } ^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ als Rückstand im System gefunden. Die vom Probanden aufgenommene Dosis betrug also $1,434 \text{ mmol } ^{13}\text{C}_2\text{-EG}$. Die entsprechende Dosis pro kg Körpergewicht betrug $0,96 \text{ mg/kg}$.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Exposition kann auf eine achtstündige Exposition am Arbeitsplatz übertragen werden. Dazu muss die aufgenommene Dosis durch das Gesamtvolumen der eingeatmeten Luft geteilt werden. Bei einer Leistung von 50 W beträgt die alveoläre Ventilation 20 l/min (für einen 70 kg Mensch, Åstrand, 1983). Innerhalb von 8 h werden also 9600 l Luft eingeatmet. Daraus ergibt sich, dass bei einer achtstündigen Exposition gegen $3,8 \text{ ppm}$ ($149 \mu\text{mol/l}$) in der Atemluft die selbe $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Menge aufgenommen würde wie in der vorliegenden Arbeit in 4 h . Die Konzentration von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in der Ausatemluft des Probanden lag unterhalb der Nachweisgrenze von $0,015 \text{ ppm}$. Somit wurden weniger als $0,2\%$ des inhalierten $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ während der vierstündigen Exposition abgeatmet ($[100 \times 0,015]/[3,8 \times 2]$).

^a Berechnung unter Verwendung von: Molvolumen Gas $25,13 \text{ l/mol}$; Volumen Gasprobe $2,5 \text{ l}$; vollständige Extraktion mit 5 ml Wasser; Nachweisgrenze $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ in Wasser $0,3 \mu\text{mol/l}$.

3.2.2 Messungen in Plasma

Der Mittelwert der pH-Werte der Blutproben des Probanden betrug $7,45 \pm 0,024$ und lag somit etwas höher als der pH-Wert für arterielles Blut, der mit 7,37 bis 7,43 angegeben wird (Thews *et al.*, 1991).

Die Konzentrations-Zeitverläufe von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ und $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ im Plasma des Probanden sind in Abb. 38 und Abb. 39 dargestellt. Während der Exposition stieg die $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Konzentration nahezu linear an. Die höchste $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Konzentration wurde mit $11,0 \mu\text{mol/l}$ nach 4,3 h gemessen. Vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Exposition wurde kein $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ im Plasma gefunden.

In keiner Plasmaprobe konnte unmarkiertes EG oberhalb der Nachweisgrenze ($7,6 \mu\text{mol/l}$) nachgewiesen werden.

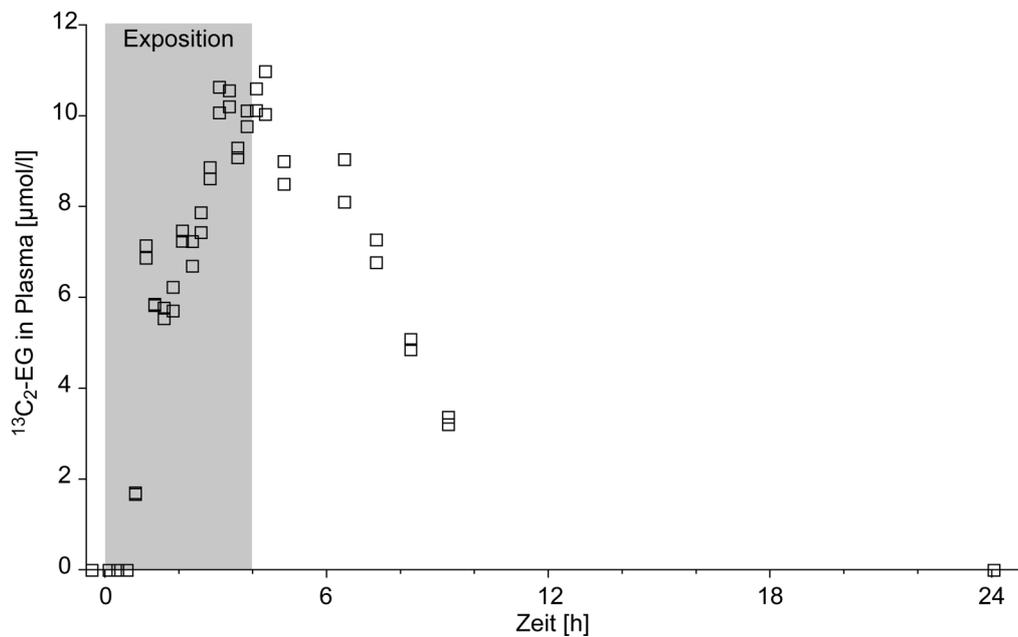


Abb. 38: $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ im Plasma des Probanden während und nach Exposition gegen $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Dämpfe (zwei Symbole pro Messpunkt wegen Verwendung zweier interner Standards; siehe 2.4.2)

Die höchste $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ -Konzentration wurde mit $0,9 \mu\text{mol/l}$ nach $4,8 \text{ h}$ gemessen. Vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Exposition wurde kein $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ mehr im Plasma gefunden. Die Konzentration von unmarkiertem GA im Plasma wurde in allen Proben bestimmt. Der Mittelwert betrug $25,8 \pm 3,71 \mu\text{mol/l}$.

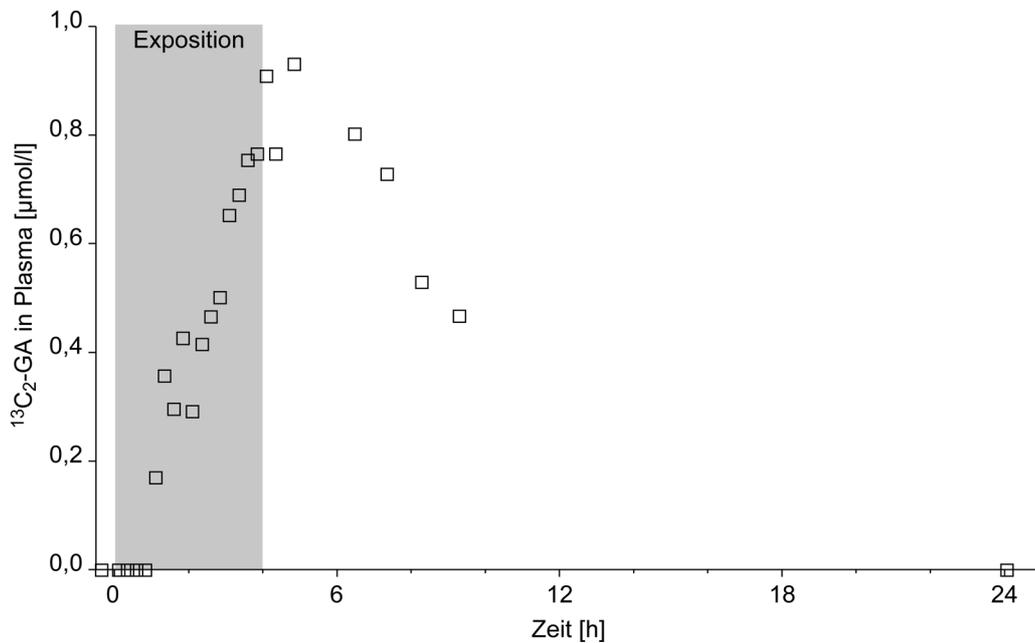


Abb. 39: $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ im Plasma des Probanden während und nach Exposition gegen $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Dämpfe

3.2.3 Toxikokinetische Berechnungen

In der in 2.6 beschriebenen Weise wurden die Eliminationskonstante von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ bzw. die Geschwindigkeitskonstante des Konzentrationsabfalls von $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ und die entsprechenden Plasma-Halbwertszeiten berechnet. Für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ wurden $0,00557 \text{ min}^{-1}$ bzw. $2,1 \text{ h}$ und für $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ $0,004045 \text{ min}^{-1}$ bzw. $2,9 \text{ h}$ erhalten. Eine Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht C_{SS} und das Verteilungsvolumen V_{D} konnten nur für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ berechnet werden, da die Aufnahmezeit für $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ nicht konstant war, aber auch nicht aus den vorliegenden Daten bestimmt werden konnte. Als $^{13}\text{C}_2\text{-EG-C}_{\text{SS}}$ wurde $14,4 \text{ mmol/l}$ Plasma für die vorliegende Aufnahmezeit ($^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ $358 \mu\text{mol/h}$) errechnet. Als Verteilungsvolumen V_{D} für $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ ergaben sich 75 l oder $0,78 \text{ l/kg}$ Körpergewicht. Dieser Wert passt zu den von Eder *et al.* (1998) zusammengefassten Daten ($0,5 - 0,8 \text{ l/kg}$) und deutet darauf hin, dass sich das

sehr gut wasserlösliche EG hauptsächlich im Körperwasser verteilt. Ferner wurden die AUCs in Plasma berechnet: $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ 4,5 (mmol/l) x min; $^{13}\text{C}_2\text{-GA}$ 0,4 (mmol/l) x min.

3.2.4 Messungen im Urin

Die pH-Werte der gesammelten Urinfraktionen betragen 6 bis 7,5 und lagen somit im physiologischen Bereich, der mit 4,8 bis 7,5 angegeben wird (Geigy, 1975).

In Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42 sind die kumulativen Ausscheidungen von EG, GA und OA sowie von den entsprechenden markierten Substanzen abgebildet. Die Ausscheidung der endogenen Substanzen war annähernd linear (Ausscheidungsraten siehe Tab. 14). Die Ausscheidung von $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ und seinen markierten Metaboliten war nach 20 h weitestgehend abgeschlossen.

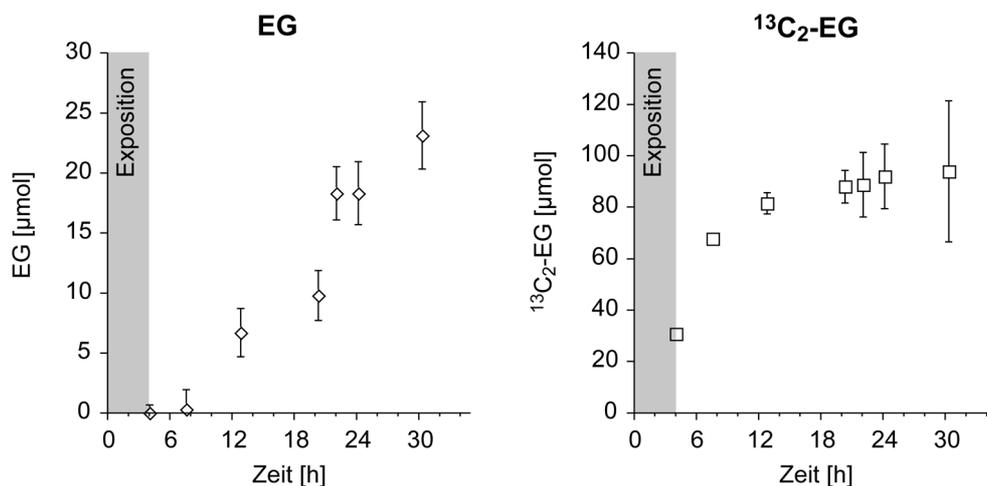


Abb. 40: Endogenes EG und $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ im Urin des Probanden nach Exposition gegen $^{13}\text{C}_2\text{-EG}$ -Dämpfe; kumulative Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen für drei Messungen pro Probe

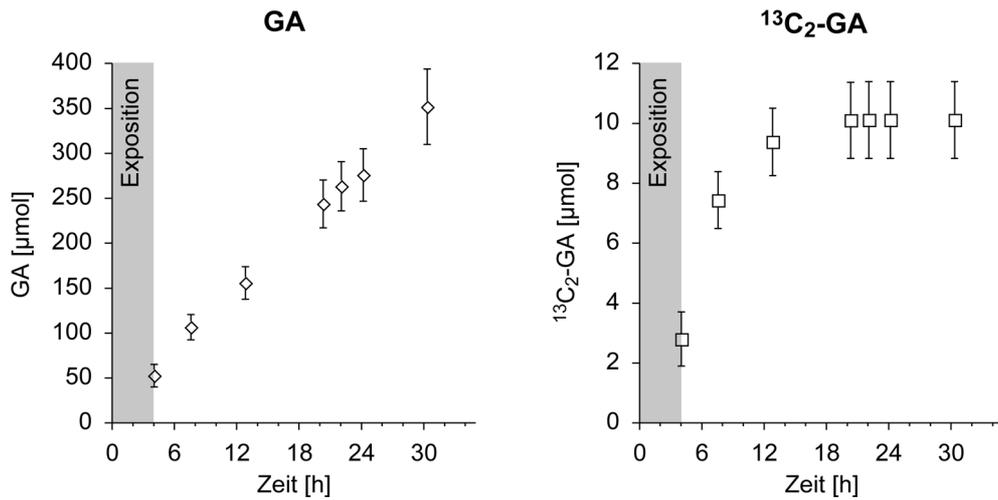


Abb. 41: Endogenes GA und ¹³C₂-GA im Urin des Probanden nach Exposition gegen ¹³C₂-EG-Dämpfe; kumulative Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen für drei Messungen pro Probe

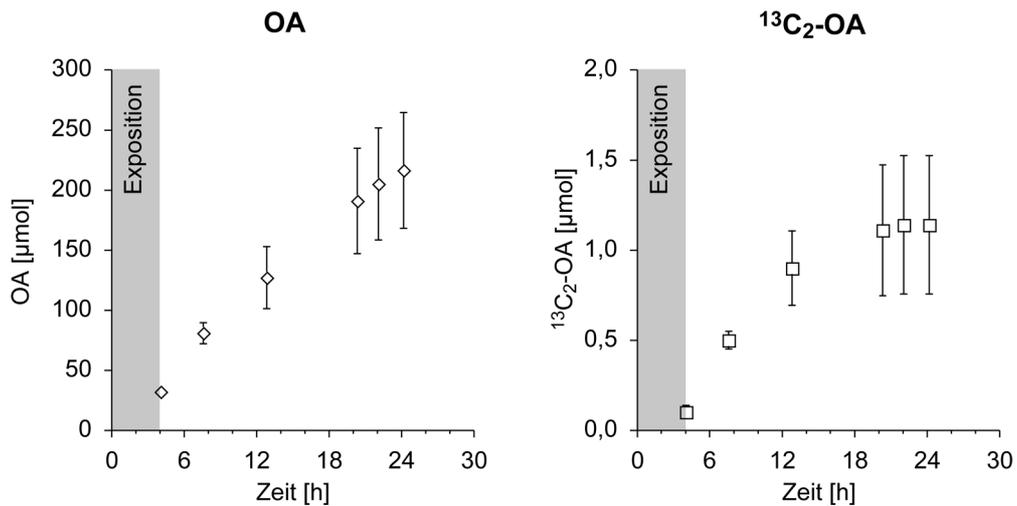


Abb. 42: Endogenes OA und ¹³C₂-OA im Urin des Probanden nach Exposition gegen ¹³C₂-EG-Dämpfe; kumulative Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen für drei Messungen pro Probe

In Tab. 13 sind die im Urin ausgeschiedenen Mengen der markierten Analyten als Anteil an der inhalierten Dosis angegeben. Die Summe der drei Substanzen im Urin machte nur ca. 7,2% der gesamten Dosis aus. Die restlichen 92,8% mussten sich also auf andere Metaboliten oder andere Ausscheidungswege verteilen.

| | ¹³ C ₂ -EG | ¹³ C ₂ -GA | ¹³ C ₂ -OA |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Menge im Urin [μmol] | 91,3 | 10,1 | 1,13 |
| Anteil von der inhalierten Dosis (1,43 mmol ¹³ C ₂ -EG) | 6,4% | 0,7% | 0,08% |

Tab. 13: ¹³C₂-EG, ¹³C₂-GA und ¹³C₂-OA im Urin als Anteil der inhalierten Dosis

In Tab. 14 sind die in 24 h im Urin ausgeschiedenen endogenen Analyten sowie die ausgeschiedenen markierten Stoffe als Anteil der endogenen Mengen wiedergegeben. Der Wert für ¹³C₂-EG ist mit über 500% sehr hoch, was daran liegt, dass kaum endogenes EG im Urin vorliegt.

| | EG | GA | OA |
|--|------|------|------|
| endogen (unmarkiert) [μmol/24 h] | 18,2 | 274 | 215 |
| ¹³ C ₂ -markiert als Anteil der endogenen Menge | 502% | 3,7% | 0,5% |

Tab. 14: EG, GA und OA im Urin sowie ¹³C₂-EG, ¹³C₂-GA und ¹³C₂-OA als Anteil der endogenen Stoffe

4 Diskussion

4.1 Analytische Methoden

4.1.1 Suche nach geeigneten Verfahren

Eine Reihe analytischer Verfahren wurde auf ihre Eignung zur Bestimmung von EG, GA und OA geprüft, aber wegen unterschiedlicher Gründe wieder fallen gelassen.

Die gaschromatographische Trennung von GA und OA erfordert die Überführung der schwerflüchtigen Säuren in leichter flüchtige Derivate. Hierzu werden meistens Veresterungen oder Silylierungen durchgeführt (z.B. Blau und Darbre, 1993). Bei der Silylierung werden dissoziierbare Protonen der OH-Gruppen durch Silylgruppen ersetzt, das heißt aus Säuren werden Silylester und aus Alkoholen und Phenolen werden Silylether. Eine wichtige Voraussetzung für die Silylierung ist, dass die Proben wasserfrei sind, da das Silylierungsreagenz sonst auch mit dem Wasser reagieren würde. Für EG ist eine Derivatisierung nicht unbedingt erforderlich (z.B. Edinboro *et al.*, 1993). Durch Derivatisierung kann aber die Detektion im MSD durch die größeren Fragmente verbessert werden. Außerdem ist es möglich, die unpolaren Derivate von EG auf dem gleichen GC-System zu trennen wie die ebenfalls unpolaren Silyl-Derivate von GA und OA.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde zunächst versucht, die von Yao und Porter (1996) veröffentlichte Methode für die Bestimmung von EG und GA aus Serum (bei EG-Vergiftungen) um die Bestimmung von OA zu erweitern. Anschließend sollte geprüft werden, ob mit dieser Methode die erforderliche Empfindlichkeit erreicht werden kann. In den Arbeiten von Yao und Porter wurden die Serumproben deproteiniert und das Wasser aus den Proben unter Säurekatalyse mit 2,2-Dimethoxypropan (Dimethylketal des Aceton) zu Methanol und Aceton umgesetzt. Diese Lösungsmittel sowie der Überschuss an 2,2-Dimethoxypropan wurden abgedampft und die Proben anschließend silyliert. Die Derivate von EG und GA wurden gaschromatographisch getrennt und mit einem FID (Derivatisierung mit BSTFA, Yao und Porter, 1996) oder mit einem MSD detektiert (Derivatisierung mit MTBSTFA, Porter *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit gelangen die Derivatisierung und Detektion von OA bei hohen Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{mol/l}$ aus Wasser). Eine ausreichende Empfindlichkeit

konnte aber für alle drei Analyten nicht erzielt werden. Vermutlich reagierte ein Teil der Analyten unter den sauren Bedingungen der chemischen Wasserentfernung mit den Produkten dieser Reaktion (EG zum Ketal von Aceton, die Säuren zu den entsprechenden Methylestern). Diese unerwünschten Derivate verdampften dann wahrscheinlich beim Entfernen von Aceton, Methanol und überschüssigem 2,2-Dimethoxypropan. Fiel dieser Effekt bei höheren Konzentrationen vielleicht nicht ins Gewicht, verhinderte er doch die weitere Herabsetzung der Nachweisgrenze.

Als nächstes wurde versucht, zumindest die zwei Säuren in einem Schritt zu bestimmen. GA ist als kleinste 2-Hydroxycarbonsäure nur sehr schlecht mit organischen Lösungsmitteln aus der wässrigen Matrix extrahierbar (Mardens *et al.*, 1992). Das Wasser würde aber bei einer Silylierung stören. Daher wurde versucht, die Säuren mit Diazomethan in die entsprechenden Methylester zu überführen, diese dann zu extrahieren und mit dem GC/MSD zu analysieren. Beispiele für die Darstellung und Verwendung von Diazomethan zur Veresterung und GC-Trennung von Fettsäuren sind z.B. bei Schlenk und Gellerman (1960), Pace-Asciak (1989) und Müller (1996) zu finden. Mit dieser Methode gelang es ebenfalls nicht, eine ausreichende Empfindlichkeit für den Nachweis von GA und OA zu erzielen. Mögliche Gründe sind, dass die entsprechenden Methylester zu flüchtig sind und bei der weiteren Probenaufbereitung zumindest teilweise verdampften, oder dass die Ester zu leicht wieder hydrolysiert wurden.

Daher wurde versucht, durch die Derivatisierung mit Phenyl Diazomethan die schwerer flüchtigen Benzylester zu erhalten. Die Darstellung von Phenyl Diazomethan erfolgte nach der Methode von Song *et al.* (2000). Beispiele für die Verwendung von Phenyl Diazomethan zur Veresterung und GC-Trennung von Fettsäuren sind z.B. bei Klemm *et al.* (1973), Doms (1977) sowie Schatowitz und Gercken (1987) zu finden. Da der Benzylester von GA ein breit verschmiertes Signal zeigte, wurde die Probe zusätzlich mit BSTFA versetzt, um das TMS-Ether/Benzylester-Derivat (TMS: Trimethylsilyl-) von GA zu erhalten. Dadurch wurde die Signalschärfe deutlich verbessert. Allerdings konnte trotzdem die erforderliche Empfindlichkeit nicht erreicht werden, da im Chromatogramm gleichzeitig mit dem GA-Derivat ein Störsignal erschien, dessen Massenspektrum die zur Quantifizierung des GA-Derivats ausgewählten charakteristischen Ionen enthielt. Dieses Signal war auch nach Destillation des Phenyl Diazomethans noch vorhanden. Sein Massenspektrum deutete

auf Stilben hin, das als Nebenprodukt sowohl bei der Darstellung von Phenyldiazomethan als auch bei der Derivatisierungsreaktion vorstellbar ist.

Ebenfalls ohne Erfolg verliefen Vorversuche zur Veresterung mit Diazopropan bzw. mit Alkoholen (Methanol, *n*-Propanol und *t*-Butanol) sowie zur Derivatisierung mit einem Gemisch von Pentafluorpropansäureanhydrid und Pentafluorpropanol (siehe z.B. Blau und Darbre, 1993).

Als nächstes wurde versucht, GA und OA nach Entfernen des Wassers der Probe in der Vakuumzentrifuge mit MTBSTFA zu silylieren. Mit ausreichender Empfindlichkeit gelang dies aus wässrigen Lösungen sowohl für GA als auch für OA, aus biologischen Proben dagegen nur für GA (siehe 4.1.3). Wurde den wässrigen Lösungen von OA Kalzium zugesetzt (Konzentration 3,8 mmol/l, entspricht der Summe der Konzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} im Plasma, Geigy, 1975), so wurde die OA-Bestimmung ebenfalls gestört. Durch den Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Na_2SO_4 ließ sich dieser Effekt in den wässrigen Proben zumindest teilweise wieder aufheben. Möglicherweise bildete sich beim Trocknen schwerlösliches Kalziumoxalat, das dann für die Derivatisierung nicht mehr zugänglich war. Versuche, den biologischen Proben Komplexbildner wie EDTA, F^- oder SO_4^{2-} zuzusetzen oder das Kalzium mittels Ionenaustauschern zu entfernen, waren jedoch nicht erfolgreich. Daher wurde dann OA vor der Derivatisierung zuerst extrahiert (siehe 4.1.4).

Silylierung von GA und OA mit MTBSTFA

Für die Derivatisierung der Säuren wurde als Reagenz MTBSTFA gewählt, um die TBDMS-Derivate zu erhalten. Die einfacheren TMS-Derivate, die durch kürzere Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Trennung charakterisiert sind, waren weniger geeignet, weil diese Derivate im Massenspektrometer stärker zerfallen. Die Fragmente, die noch das C_2 -Grundgerüst der Säuren enthielten und für die Unterscheidung zwischen $^{13}\text{C}_2$ -markierten und unmarkierten Analyten erforderlich sind, waren nur in sehr geringen Intensitäten im Massenspektrum vorhanden. Die TBDMS-Derivate sind durch höhere Hydrolysebeständigkeit als die entsprechenden TMS-Derivate und durch die charakteristischen (M - 57)-Fragmente (Molekülion minus m/z 57) gekennzeichnet (z.B. Schwenk *et al.*, 1984), die das C_2 -Grundgerüst noch enthalten.

Für die Bildung der TBDMS-Derivate wurde MTBSTFA mit TBDMSCl als Katalysator verwendet (als fertige Mischung 99/1 (Vol./Vol.) erworben). MTBSTFA zeichnet sich durch hohe Reaktivität und unproblematische, im GC sehr leicht flüchtige Nebenprodukte aus (Übersicht in: van Look *et al.*, 1995).

Für die Silylierung werden im allgemeinen ACN, *N,N*-Dimethylformamid oder Pyridin als Lösungsmittel sowie unter Umständen die Verwendung von sterisch anspruchsvollen Basen als Katalysator empfohlen (z.B. van Look *et al.*, 1995). Als Basen wurden in dieser Arbeit DABCO und 4-Dimethylaminopyridin getestet. Eine Lösung von 2,5% DABCO in ACN erwies sich als wirksamste Kombination. Für die Reaktion waren milde Bedingungen (40°C über Nacht) besser als eine kürzere Inkubationszeit bei höheren Temperaturen (1 - 2 h bei 90°C).

Über dieses bekannte Verfahren hinausgehend wurde zusätzlich die anschließende Extraktion der Derivate mit Hexan neu eingeführt. Dadurch wurde verhindert, dass polare Verunreinigungen, vor allem nicht oder nur teilweise derivatisierte Säuren auf die GC-Säule gelangten. Diese könnten dann nämlich bei einer folgenden Probeninjektion mit dem Überschuss an Derivatisierungsmittel reagieren und das Messergebnis verfälschen. Um das Gemisch aus den Komponenten ACN, MTBSTFA und Hexan in zwei flüssige Phasen zu trennen, war es erforderlich, die Proben auf 0°C abzukühlen.

4.1.2 Bestimmung von Ethylenglykol

Nachdem die Methode von Yao und Porter (1996 und 1999) verworfen worden war (Nachweisgrenze 160 µmol/l Porter *et al.*, 1999), wurden die in der Literatur bekannten Methoden erneut geprüft.

Colorimetrische Nachweise (z.B. Russell *et al.*, 1969, nach Perjodat-Oxidation zu Formaldehyd, keine Nachweisgrenze), Enzymatische Nachweise (z.B. Blandford und Desjardins, 1994, Nachweisgrenze 1 mmol/l aus Serum) und die HPLC/UV-Bestimmung nach Derivatisierung mit Benzoessäureanhydrid (Nachweisgrenze 161 µmol/l aus Serum, Vollmer *et al.*, 1996) sind nicht geeignet, zwischen isotoopenmarkierten und unmarkierten Analyten zu unterscheiden. Für die Bestimmung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Nachweisgrenze aus Serum oder Urin 250 µmol/l, Wahl *et al.*, 1998) wäre zwar die Erkennung isotoopenmarkierter Analyten theoretisch möglich (Kopplung ¹H mit ¹³C, Hesse *et al.*, 1995), ist aber praktisch

vermutlich nicht durchführbar, da die hohe Nachweisgrenze von Wahl *et al.* (1998) bereits durch Störsignale verursacht wurde.

Gute Empfindlichkeit zeigten die Methoden zur Bestimmung von EG bei der Migration aus PET-Flaschen (Kashtock und Breder, 1980; Morelli-Cardoso *et al.*, 1997). Kashtock und Breder (1980) gaben zwar eine Empfindlichkeit von 1,6 $\mu\text{mol/l}$ an, benötigen aber ein Probenvolumen von 200 ml und eine Aufkonzentration der Probe um das zweihundertfache. Die Empfindlichkeit bei Morelli-Cardoso *et al.* (1997) wurde mit 24,2 $\mu\text{mol/l}$ angegeben. In beiden Fällen wurden allerdings nur wässrige Lösungen, die neben EG nur Ethanol oder Essigsäure enthielten, ohne Reinigung in den GC injiziert und mit dem FID analysiert. Für biologisches Material sind ebenfalls GC/FID-Methoden veröffentlicht, bei denen die Proben ohne weitere Aufarbeitung in den GC injiziert wurden (z.B. Aarstad *et al.*, 1993, Nachweisgrenze ca. 500 $\mu\text{mol/l}$ aus Serum und Urin). Sie können aber nicht für die Bestimmung mittels MSD herangezogen werden, da Verunreinigungen des GC und des MSD zu erwarten sind. Ferner ist anzunehmen, dass underivatisiertes EG im MSD so stark fragmentiert werden würde, dass charakteristische Fragmente für die Bestimmung nicht in ausreichender Intensität zur Verfügung stehen würden.

Eine andere Methode für die EG-Bestimmung beruht auf der Derivatisierung mit Pivalinsäureanhydrid und anschließender GC/MSD-Analyse (Maurer *et al.*, 2001). Allerdings ist die angegebene Nachweisgrenze mit 161 $\mu\text{mol/l}$ aus Urin für die Erfordernisse der vorliegenden Arbeit zu hoch. Pottenger *et al.* (2001) derivatisierten EG mit Pentafluorbenzoesäurechlorid vor der Bestimmung mittels GC/MSD (Nachweisgrenzen für $^{13}\text{C}_2$ -EG 1,6 $\mu\text{mol/l}$ aus Blut und 15,6 $\mu\text{mol/l}$ aus Urin). Das Verfahren erfordert einen Reinigungsschritt (Extraktion) der Blutproben. Außerdem läuft die Derivatisierungsreaktion an der Phasengrenze Toluol/Blut bzw. Toluol/Urin ab. Zum gaschromatographischen Nachweis des Pentafluorbenzoesäureesters wurde auch ein „Electron Capture Detector“ verwendet mit der Nachweisgrenze 0,3 $\mu\text{mol/l}$ aus Urin (Letzel *et al.*, 2000). Hiermit wäre aber keine Unterscheidung zwischen isotoopenmarkierten und unmarkierten Analyten möglich. Letzel *et al.* (2000) trennten EG vor der Derivatisierung mittels Festphasenextraktion von der Probe, geben aber die Art der Phase nicht an. Auch nach der Reaktion mussten die Proben erneut durch Festphasenextraktion gereinigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Derivatisierung zu einem cyclischen Boronsäureester vorgezogen, da hier die Reaktion direkt im wässrigen Milieu

vorgenommen werden kann. Entsprechende Arbeiten für die EG-Bestimmung aus biologischen Proben wurden beispielsweise von Houzé *et al.* (1993; Phenylboronsäure, GC/FID, Nachweisgrenze 16,1 µmol/l) und Giachetti *et al.* (1989; *n*-Butylboronsäure, GC/MSD, Nachweisgrenze 80,6 µmol/l) sowie zur Bestimmung aus Wasser von Raksit und Punani (1997; *n*-Butylboronsäure, GC/MSD, Nachweisgrenze 0,5 µmol/l) veröffentlicht. Ausgehend von diesen Arbeiten wurde die vorliegende Methode entwickelt. Zunächst wurden *n*-Butylboronsäure und Phenylboronsäure als mögliche Reagenzien verglichen. Bei ähnlicher Ausbeute zeichneten sich die *n*-Butylboronate von EG und den internen Standards (PG und 1,3PD) durch kürzere Retentionszeiten aus. Die längeren Retentionszeiten der Phenylboronate führten nicht zu einer besseren Auftrennung am GC. Daher wurden *n*-Butylboronsäure für die weitere Methodenentwicklung verwendet. Verglichen mit den bisher veröffentlichten Methoden zur Bestimmung von EG nach Derivatisierung mittels *n*-Butylboronsäure ist das hier entwickelte Verfahren experimentell einfacher. Darüber hinaus sind die Nachweisempfindlichkeiten (¹³C₂-EG aus Plasma 0,6 µmol/l, aus Urin 0,1 µmol/l, aus Wasser 0,3 µmol/l, EG aus Urin 1,1 µmol/l) gleich (Wasser) bzw. besser als die bisher veröffentlichten und ausreichend für die Anforderungen an die zu entwickelnden Methoden. Außerdem wurde die benötigte Probenmenge auf 100 µl reduziert und die Probenaufarbeitung im Vergleich zu den bisher bekannten Methoden vereinfacht. Die höhere Nachweisgrenze von EG im Vergleich zu ¹³C₂-EG kann durch das EG-Hintergrundsignal in den Leerproben erklärt werden. Die relativ hohe Nachweisgrenze von EG aus Plasma (7,6 µmol/l) wurde zusätzlich durch ein starkes Rauschen des Hintergrundsignals verursacht. Dieses wurde wahrscheinlich durch einen Bestandteil der Plasmaproben verursacht, der auf der Säule zurückblieb und auch durch die Reinigungsschritte nicht vollständig entfernt werden konnte. Bei ¹³C₂-EG trat kein Hintergrundsignal auf.

4.1.3 Bestimmung von Glykolsäure

Zahlreiche Methoden zur Bestimmung von GA aus biologischen Proben sind bereits bekannt und im Folgenden kurz zusammengefasst. Narayanan *et al.* (1999) gaben für die Bestimmung von GA aus Plasma und Urin mittels HPLC und Leitfähigkeitsmessung eine Nachweisgrenze von 0,7 µmol/l an. Hagen *et al.* (1993) beschrieben die Bestimmung von GA aus Plasma und Urin mittels „high-performance

ion chromatography“ (HPIC) und Leitfähigkeitsmessung (Nachweisgrenze 0,7 µmol/l). Allerdings ist der Nachweis durch die Leitfähigkeitsmessung sehr unspezifisch und erlaubt auch nicht die Unterscheidung zwischen isotopenmarkierten und endogenen Analyten. Gleiches gilt für die GA-Bestimmung Plasma aus Serum durch HPLC/UV (keine Nachweisgrenze, Carney *et al.*, 1999) und aus Urin durch HPLC/UV nach Derivatisierung mit 2-Nitrophenylhydrazinhydrochlorid, (Nachweisgrenze ca. 0,5 µmol/l, Miwa *et al.*, 1996). Auch mit dem auf einer Enzymreaktion beruhenden GA-Nachweis aus Plasma und Urin von Maeda-Nakai und Ichiyama (2000; keine Angaben zur Nachweisgrenze) und dem colorimetrischen Nachweis von GA aus Urin von Niederwieser *et al.* (1978; keine Angaben zur Nachweisgrenze) kann die ¹³C₂-Markierung nicht neben dem unmarkierten Hintergrund erkannt werden.

Grundsätzlich geeignet wären die folgenden GC-Methoden, wobei die FID- in MSD-Methoden umgewandelt werden müssten: Schatowitz und Gercken (1988) berichteten über die Bestimmung von GA aus Blut und Urin mittels GC/FID nach Derivatisierung mit Benzylbromid. Zuvor erfolgte eine aufwändige Probenreinigung mittels Kationenaustauschersäulchen (keine Angaben zur Nachweisgrenze). Ebenfalls eine Reinigung mit Kationenaustauschern erfordert die Methode von Husek und Matucha (1997; Derivatisierung mit Chlorameisensäureethylester, GC/FID, keine Nachweisgrenze). Die Extraktion mit einem Anionenaustauscher erfolgte bei Chalmers und Watts (1972; Silylierung, GC/FID, keine Angaben zur Nachweisgrenze). Dietzen *et al.* (1997) gaben für die Bestimmung von GA aus Urin mit Extraktion (dreimal mit Diethylether, dann dreimal mit Tetrahydrofuran), Silylierung und GC/FID-Analyse eine Nachweisgrenze von 118 µmol/l^b an. Mardens *et al.* (1992) zeigten für die Bestimmung von GA aus Urin, dass die Extraktion mittels Anionenaustauscher der Extraktion mit Ethylacetat weit überlegen ist (Silylierung, GC/FID, keine Angaben zur Nachweisgrenze). Yan *et al.* (1997) berichteten über die Bestimmung von GA aus Plasma durch GC/MSD nach Bildung der Methylester mit Methanol/BF₃, machten aber keine Angaben zur Nachweisgrenze. Kim *et al.* (1989) beschrieben die GC/MSD-Bestimmung von GA aus Speichel und Urin nach Festphasenextraktion (Chromosorb P) und Silylierung (keine Angaben zur

^b Originalangabe 5 µg/mg Kreatinin; Umrechnung erfolgt hier unter der Annahme von: 1,8 g Kreatinin/24 h; 1 l Urin/24 h für Männer (Geigy, 1975)

Nachweisgrenze). Von Clay und Murphy (1977) wurde die Extraktion mit Diethylether, Silylierung und GC/MSD-Analytik beschrieben (keine Angaben zur Nachweisgrenze). Pottenger *et al.* (2001) bestimmten GA aus Blut und Urin durch Extraktion mit *tert*-Butylmethylether, Silylierung und GC/MSD (Nachweisgrenzen für $^{13}\text{C}_2$ -GA aus Blut 27 $\mu\text{mol/l}$ und aus Urin 12 $\mu\text{mol/l}$). Für die bereits oben erwähnte Methode von Yao und Porter lag die Nachweisgrenze für GA aus Serum bei 130 $\mu\text{mol/l}$ (Porter *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Bestimmung von GA eine sehr einfache Methode entwickelt, die auf der GC/MSD-Analytik nach Derivatisierung mit MTBSTFA beruht. Verglichen mit obigen Methoden hat sie den Vorteil, dass außer der Abtrennung der Proteine kein weiterer Reinigungsschritt erforderlich ist. Die Nachweisgrenzen lagen bei 1,2 $\mu\text{mol GA/l}$ Plasma bzw. 32,6 $\mu\text{mol GA/l}$ Urin. Die entsprechenden Nachweisgrenzen für $^{13}\text{C}_2$ -GA lagen bei 0,8 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 2,9 $\mu\text{mol/l}$. Der Unterschied zwischen den Nachweisgrenzen von $^{13}\text{C}_2$ -GA und GA im Urin rührte daher, dass das Signal für das Ion m/z 249 ca. ein Zehntel des Signals für das Ion m/z 247 betrug (siehe 3.1.2.1). Für Plasma konnte nur eine geringe Steigerung der Empfindlichkeit durch die $^{13}\text{C}_2$ -Markierung erreicht werden. Das größere Rauschen des Ions m/z 249 verglichen mit dem des Ions m/z 247 ist möglicherweise auf die Anwesenheit weiterer Stoffe im Plasma zurückzuführen, die an der gleichen Stelle eluierten wie das GA-Derivat und deren Massenspektrum zwar m/z 249 aber nicht m/z 247 enthielt.

Interne Standards

Als interne Standards wurden D_6 -SA und HIVA verwendet. Der chemisch ähnlichste Standard wäre Milchsäure gewesen. Es zeigte sich aber, dass das Derivatisierungsreagenz SILA stark mit Milchsäure (oder einer anderen Substanz, die zur identischen Retentionszeit die gleichen charakteristischen Fragmente im Massenspektrum enthielt) verunreinigt war. Daher wurde die Verwendung von Milchsäure verworfen. Für Plasma wurde D_6 -SA als Standard herangezogen, da es gleichzeitig als Standard für OA diente (siehe 4.1.4). Bei der GA-Bestimmung aus Urin zeigte sich jedoch, dass das Signal des di-TBDMS-Derivats von D_6 -SA durch das des di-TBDMS-Derivats von Harnstoff überlagert wurde. Daher wurde hier die 2-Hydroxycarbonsäure HIVA gewählt. HIVA ist nur in sehr viel niedrigeren

Konzentrationen als GA im Urin zu finden (z.B. GA ca. 469 $\mu\text{mol/l}^{\circ}$ und HIVA ca. 74 $\mu\text{mol/l}^{\circ}$ in: Schatowitz und Gercken, 1988). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration (500 $\mu\text{mol/l}$) war es nicht erforderlich, isotope markiertes HIVA zu verwenden.

Zur Methodenentwicklung

Vor der Derivatisierung wurden die nach Proteinfällung erhaltenen Überstände der Plasmaproben bzw. die Urinproben in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um zu verhindern, dass GA und auch die internen Standards bei diesem Schritt teilweise verdampfen, wurde die Probe zuvor alkalisch gemacht. Dafür wurden verschiedene Basen getestet (Chinolin, 2-Dimethylaminoethanol, 4-(2-Hydroxyethyl)-morpholin, Lithiumhydroxid, Pyridin, Tetrabutylammoniumhydroxid, Tetramethylguanidin und Triethylamin). Chinolin erwies sich als am wirksamsten. Möglicherweise sublimierten die GA- und SA-Salze einiger anderer Basen unter den Bedingungen in der Vakuumzentrifuge teilweise. Vor allem bei den stärkeren Basen besteht auch die Gefahr einer Zersetzung der Analyten (speziell bei Erwärmung der Proben, siehe z.B. Kumps *et al.*, 1999). Zur vollständigen Trocknung wurde Benzol zugegeben, um die letzten Spuren von Wasser als azeotropes Gemisch mit Benzol zu entfernen. Es wurde nicht das weniger giftige Ethanol verwendet, weil dann möglicherweise die Gefahr der Bildung von flüchtigen Ethylestern bestanden hätte. Es sollte für die Zukunft geprüft werden, ob Benzol durch Toluol ersetzt werden kann.

4.1.4 Bestimmung von Oxalsäure

Zunächst werden die bereits bekannten Methoden zur Bestimmung von OA vorgestellt. Narayanan *et al.* (1999) gaben für die Bestimmung von OA aus Plasma und Urin mittels HPLC und Leitfähigkeitsmessung eine Nachweisgrenze von 0,6 $\mu\text{mol/l}$ an. Hagen *et al.* (1993) beschrieben die Bestimmung von OA aus Plasma und Urin mittels HPIC und Leitfähigkeitsmessung (Nachweisgrenze für Plasma 0,5 $\mu\text{mol/l}$). Chandran *et al.* (2001) bestimmten OA aus Urin mit Oxalat-Oxidase (Nachweisgrenze 40 $\mu\text{mol/l}$). Für die OA-Bestimmung aus Plasma mit dieser

[°] Originalangaben GA: 260 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und HIVA: 40.9 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin; Umrechnung erfolgt hier unter der Annahme von: 1,8 g Kreatinin/24 h; 1 l Urin/24 h für Männer (Geigy, 1975)

Methode wurde eine Nachweisgrenze von 2,5 $\mu\text{mol/l}$ angegeben (Thakur *et al.*, 2000). Nach Yang *et al.* (2000) wurde OA aus Urin durch Verwendung von Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion bestimmt (Nachweisgrenze 1 $\mu\text{mol/l}$). Ensafi und Kazemzadeh (2000) konnten OA aus Abwasser und aus wässrigen Spinatextrakten mit Hilfe der „flow injection catalytic-spectrometric determination“ bestimmen (OA als Katalysator für die Oxidation von Brillantkresylblau durch Kaliumdichromat, Nachweisgrenze 0,06 $\mu\text{mol/l}$). Alle bisher genannten Methoden sind nicht geeignet, isotopenmarkierte Analyten von unmarkierten zu unterscheiden. Dies ist mit den folgenden GC-Methoden grundsätzlich möglich. Die GC/FID-Methoden müssten dazu auf GC/MSD umgestellt werden.

Nach Mardens *et al.* (1992) gelang bei der Bestimmung von OA aus Urin die Extraktion mit Ethylacetat, nicht jedoch die Extraktion mittels Anionenaustauscher (anschließend jeweils Silylierung, GC/FID, keine Angaben zur Nachweisgrenze). Eine Extraktion mit einem Anionenaustauscher erfolgte bei Chalmers und Watts (1972; Silylierung, GC/FID, keine Angaben zur Nachweisgrenze). Dietzen *et al.* (1997) berichteten über die Bestimmung von OA aus Urin mit Extraktion, Silylierung und GC/FID (keine Angaben zur Nachweisgrenze). Nach Wolthers und Hayer (1982) konnte OA in Plasma und Urin nach Extraktion mit Ethylacetat und Silylierung mit dem GC/FID bestimmt werden (keine Angaben zur Nachweisgrenze). Gelot *et al.* (1980) wiesen OA in Plasma und Urin mit GC/FID nach Extraktion mit Diethylether aus der zuvor eingetrockneten Probe und Veresterung mit Isopropanol/HCl nach (Nachweisgrenzen: 7,5 $\mu\text{mol/l}$, Plasma; 20 $\mu\text{mol/l}$, Urin). Yan *et al.* (1997) berichteten über die Bestimmung von OA aus Plasma durch GC/MSD nach Bildung der Methylester mit Methanol/ BF_3 (Nachweisgrenze 10,5 $\mu\text{mol/l}$). Ebenfalls GC/MSD-Analyse von Methylestern beschrieben Liebich und Gesele (1999; Derivatisierung von OA aus Urin mit Trimethyloxoniumtetrafluorborat, keine Angaben zur Nachweisgrenze). Kim *et al.* (1989) beschrieben die GC/MSD-Bestimmung von OA aus Speichel und Urin nach Festphasenextraktion (Chromosorb P) und Silylierung (keine Angaben zur Nachweisgrenze). In von von Unruh *et al.* (1998) durchgeführten Versuchen zur gastrointestinalen Absorption von $^{13}\text{C}_2$ -OA erfolgte die Bestimmung im Urin mittels GC/MSD nach Extraktion mit Ethylacetat und Silylierung (Nachweisgrenze für $^{13}\text{C}_2$ -OA 0,8 $\mu\text{mol/l}$). Pottenger *et al.* (2001) beschrieben die Bestimmung von OA aus Blut und Urin durch Extraktion mit

tert-Butylmethylether, Silylierung und GC/MSD-Analytik (Nachweisgrenzen für $^{13}\text{C}_2$ -OA aus Blut 53 $\mu\text{mol/l}$ und aus Urin 22 $\mu\text{mol/l}$).

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode baut auf den Veröffentlichungen von Wolthers und Hayer (1982) und von Unruh *et al.* (1998) auf. Im Wesentlichen unterscheidet sich das hier vorgestellte Verfahren von den genannten dadurch, dass beim Entfernen des Extraktionsmittels Ethylacetat Chinolin zugegeben wurde, wodurch Verluste von Analyt und Standard verringert wurden. Außerdem wurde bei diesem Schritt durch Benzol-Zugabe eine quantitative Wasserentfernung erzielt. Schließlich wurde durch eine zweite *n*-Hexan-Extraktion eine weitere Aufreinigung des Analyten erreicht. Als Nachweisgrenzen aus Urin wurden 17,2 $\mu\text{mol/l}$ für OA und 0,2 $\mu\text{mol/l}$ für $^{13}\text{C}_2$ -OA gefunden. Wie schon bei GA und $^{13}\text{C}_2$ -GA ist der Nachweis der $^{13}\text{C}_2$ -markierten Substanz wesentlich empfindlicher (siehe oben). Die Wiederfindung für OA war mit 25% relativ niedrig. Entscheidend sind jedoch die Präzision der Methode und die Linearität der Eichung. Beides wurde durch die Verwendung der internen Standards SA und D₆-SA gewährleistet. Die Methode ist ausreichend empfindlich und genau, um die Belastung durch metabolisch gebildetes $^{13}\text{C}_2$ -OA nach Exposition gegen geringe Mengen $^{13}\text{C}_2$ -EG neben dem endogenen OA-Hintergrund im Urin zu bestimmen.

Interne Standards

Als interne Standards wurden SA und D₆-SA verwendet. SA wurde gewählt, weil es wie OA eine kurzkettige Dicarbonsäure ist. Die verwendete SA-Konzentration (500 $\mu\text{mol/l}$) ist ausreichend höher als die durch endogenes SA im Urin verursachte Konzentration (z.B. ca. 35 $\mu\text{mol/l}$ ^d in: Schatowitz und Gercken, 1988).

Zuvor wurde Malonsäure als interner Standard geprüft. Malonsäure wird auch in der Literatur als Standard für die Bestimmung von OA verwendet (z.B. von Unruh *et al.*, 1998; Wolthers und Hayer, 1982). In eigenen Vorversuchen wurden jedoch nach der Derivatisierung der Malonsäure mit MTBSTFA zwei Derivate gefunden, ein di-TBDMS- und ein tri-TBDMS-Derivat. Das di-TBDMS-Derivat konnte eindeutig durch das Referenzspektrum aus der Spektrenbibliothek identifiziert werden. Das Massenspektrum des tri-TBDMS-Derivats zeigte unter anderem die charakteristischen

^d Originalangabe SA: 19.5 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin; Umrechnung erfolgt hier unter der Annahme von: 1,8 g Kreatinin/24 h; 1 l Urin/24 h für Männer (Geigy, 1975)

Fragmente m/z 431 ($M - 15$), 389 ($M - 57$), 147, 75 und 73 (siehe z.B. 3.1.2.1). Das Auftreten des tri-TBDMS-Derivats kann durch die Bildung eines Enols aus dem di-TBDMS-Derivat erklärt werden, das dann erneut silyliert werden kann (Abb. 43).

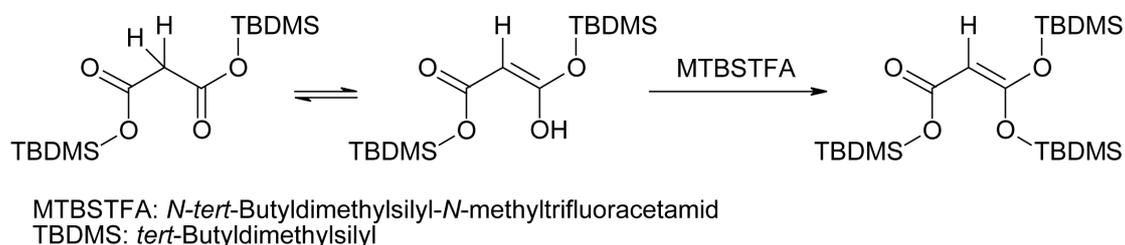


Abb. 43: di-TBDMS- und tri-TBDMS-Derivat von Malonsäure

Solche Derivatisierungsreaktionen sind für ähnliche Verbindungen schon beschrieben worden (Little, 1999). Das Verhältnis der zwei Derivate war abhängig von den Reaktionsbedingungen. So konnte z.B. durch die Verwendung der Base Pyridin als Lösungsmittel bei der Derivatisierung das Gleichgewicht in Richtung des tri-TBDMS-Derivats verschoben werden, was wiederum die Vermutung der Bildung des Enols stützt. Da es jedoch nicht einfach war, ein konstantes Verhältnis der zwei Derivate zueinander zu erhalten, wurde Malonsäure als Standard verworfen.

Zur Methodenentwicklung

Ein Teil der Probleme, die sich bei der Methodenentwicklung für die Bestimmung von OA ergaben, wurde bereits im allgemeinen Teil weiter oben diskutiert (siehe 4.1.1). In der in dieser Arbeit entwickelten Methode wurde OA aus der angesäuerten und mit NaCl gesättigten wässrigen Phase mittels Ethylacetat extrahiert. Dabei zeigte sich, dass die Proben nicht zu stark angesäuert werden dürfen und die Extraktion unter Kühlung erfolgen sollte, um eine Hydrolyse des Ethylacetats zu vermeiden. Allerdings war es auch erforderlich, die Proben ausreichend anzusäuern, um OA vollständig zu protonieren (pK_{S1} 1,23, pK_{S2} 4,19; Lide, 1999). Bei der anschließenden Entfernung des Lösungsmittels wurde wie schon im Fall von GA Chinolin zugesetzt, um Verluste durch Verdampfung der Analyten zu verhindern. Ebenso wurde wieder Benzol verwendet, um das durch Ethylacetat mitextrahierte Wasser vollständig zu entfernen. Die Bedingungen für die Verwendung von MTBSTFA und die abschließende Hexanextraktion wurden bereits allgemein weiter oben diskutiert.

Bestimmung von OA aus Plasma

Eine geeignete Methode für die Quantifizierung von OA und $^{13}\text{C}_2$ -OA aus Plasma konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Es gelang nicht die Ergebnisse von Wolthers und Hayer (1982) nachzuvollziehen. Die Wiederfindung von OA und $^{13}\text{C}_2$ -OA war auch innerhalb eines Versuches sehr unterschiedlich. Dies wurde leider nicht durch den internen Standard SA (und auch D_6 -SA) kompensiert, da dessen Wiederfindung konstant war. Wolthers und Hayer (1982) verwendeten Malonsäure als Standard, welche aber aus den oben genannten Gründen in dieser Arbeit nicht verwendet wurde.

Die Bildung von Kalziumoxalat sollte bei der Extraktion aus angesäuerten Lösungen ($\text{pH} \leq 1$) keine Rolle spielen. Die Möglichkeit der Adsorption von OA an die Wand der teilweise verwendeten Glasgeräte wurde durch Versuche ausgeschlossen, bei denen zur Probenaufbereitung ausschließlich Kunststoffgeräte verwendet wurden. Auch bereitete die Bestimmung aus Wasser oder Urin mit Glas keine Probleme. Eine mögliche Fehlerquelle ist die Bindung von OA an Proteine im Plasma. Daher wurden zum einen die Entfernung der Proteine durch Fällung mit ACN bei saurem oder neutralem pH, durch Fällung mit konzentrierter HCl sowie durch Ultrafiltration vor der Extraktion mit Ethylacetat untersucht. Zum anderen wurde die Extraktion mit Ethylacetat in Anwesenheit der mit konzentrierter HCl gefällten Proteine durchgeführt (so auch angegeben von Wolthers und Hayer, 1982). Die beste Wiederfindung zeigte die Fällung mit ACN bei neutralem pH nach Verdünnen der Plasmaprobe mit einem Phosphatpuffer ($\text{pH} 7$) vor der Extraktion. Aber auch unter diesen Bedingungen variierte die Wiederfindung für OA zu stark, als dass D_6 -SA als interner Standard hätte verwendet werden können. Möglicherweise ist dies durch die unterschiedlichen pK_S -Werte zu erklären, die vermutlich einen Einfluss auf die Proteinbindung haben (OA: $\text{pK}_{\text{S}1} 1,23$, $\text{pK}_{\text{S}2} 4,19$; MA: $\text{pK}_{\text{S}1} 2,83$, $\text{pK}_{\text{S}2} 5,69$; SA: $\text{pK}_{\text{S}1} 4,16$, $\text{pK}_{\text{S}2} 5,61$; Lide, 1999).

Da jedoch unabhängig von der Wiederfindung für OA das Verhältnis der Ionen $m/z 263/261$ konstant blieb, könnte die Methode grundsätzlich für die Bestimmung von OA unter Verwendung von zugesetzter $^{13}\text{C}_2$ -OA als Standard herangezogen werden.

4.2 Humanexposition

4.2.1 Expositionssystem

Wegen der Kosten für $^{13}\text{C}_2$ -markiertes EG wurde die Exposition nicht in einem „offenen System“ durchgeführt (Dietz, 1993; Filser *et al.*, 2000). Dazu hätte nämlich ein kontinuierlicher Gasstrom mit einer konstanten $^{13}\text{C}_2$ -EG-Konzentration erzeugt werden müssen, der dem Probanden als Atemquelle gedient hätte. Ein „offenes System“ hätte den Bedingungen am Arbeitsplatz am ehesten entsprochen. Um mittels des eingesetzten geschlossenen Systems aus Glas diesen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden in kurzen Zeitintervallen kleine Mengen $^{13}\text{C}_2$ -EG verdampft, die vom Probanden sofort vollständig eingeatmet wurden. Nachdem die Plasmahalbwertszeit von $^{13}\text{C}_2$ -EG 2,1 h betrug und die Pause zwischen den Inhalationsvorgängen nur 15 min, kann von einer „quasikontinuierlichen“ Exposition ausgegangen werden.

Unter den gewählten Expositionsbedingungen (Erwärmung bis auf 140°C) konnte eine Zersetzung des in das System applizierten $^{13}\text{C}_2$ -EG ausgeschlossen werden. In einem geschlossenen Stahlzylinder begann die Zersetzung von EG erst bei 350 - 400°C (Herndon und Reid, 1928). Die Zündtemperatur von EG wird mit ca. 400°C angegeben (IPCS, 2002). Auch die Dampfdruckkurve von EG konnte bis zum Siedepunkt bestimmt werden, ohne dass Zersetzung eintrat (verschiedene Arbeiten zusammengefasst in Stull, 1947). Nur die Angaben von Gallagher und Hibbert (1937), dass bei der Dampfdruckbestimmung ab 165°C eine Zersetzung von EG einsetzte, stehen dazu im Widerspruch. Dieser Befund ist möglicherweise auf Siedeverzüge zurückzuführen, wie sie von Taylor und Rinckenbach (1926) bei der Dampfdruckbestimmung von EG beschrieben worden sind.

4.2.2 Messungen in Plasma und Urin

Hintergrund-EG

In zwei Veröffentlichungen von einer Arbeitsgruppe (Russell *et al.*, 1969; Wills *et al.*, 1974) wurden EG-Konzentrationen im Serum von Nichtexponierten im Bereich zwischen 0,1 und 3,4 mmol/l angegeben. Diese Konzentrationen erscheinen sehr hoch, da in der vorliegenden Arbeit im Plasma oberhalb der Nachweisgrenze von 7,6 $\mu\text{mol/l}$ kein EG nachweisbar war. Wahrscheinlich ist der große Unterschied zu

den beiden älteren Arbeiten darauf zurückzuführen, dass in diesen eine sehr unspezifische Methode angewandt wurde, die auf der Oxidation von EG mit Perjodat zu Formaldehyd und dessen colorimetrischer Bestimmung beruht.

Die EG-Ausscheidung im Urin des Probanden während der in dieser Arbeit durchgeführten Exposition betrug 18,2 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$. Der Wert befindet sich im Bereich der von anderen Autoren angegebenen Konzentrationen (0 - 63,7 $\mu\text{mol}/24\text{ h}^{\text{e}}$, Gérin *et al.*, 1997; 3,5 - 76,6 $\mu\text{mol}/24\text{ h}^{\text{e}}$, Letzel *et al.*, 2000; 27,1 $\mu\text{mol}/24\text{ h}^{\text{e}}$ (Mittelwert), Laitinen *et al.*, 1995; 10,7 $\mu\text{mol}/24\text{ h}^{\text{e}}$ (Mittelwert), Laitinen *et al.*, 1997). Die Angaben von Wills *et al.* (1974) für EG-Konzentrationen im Urin von Kontrollen scheinen mit ca. 270 - 1240 $\mu\text{mol}/\text{l}$ als zu hoch und können wie die entsprechenden Serumkonzentrationen mit der unspezifischen Methode erklärt werden (siehe oben).

Hintergrund-GA

Im Plasma des Probanden betrug der Mittelwert des GA-Spiegels über alle während der Exposition gewonnenen Proben $25,8 \pm 3,7\ \mu\text{mol}/\text{l}$. In der Literatur sind für GA in Humanplasma, -serum oder auch Plasma-Ultrafiltrat Angaben von 3,6 - 32,9 $\mu\text{mol}/\text{l}$ zu finden (Schatowitz und Gercken, 1988 Petrarulo *et al.*, 1991 Hagen *et al.*, 1993 Maeda-Nakai und Ichiyama, 2000 Chalmers *et al.*, 1984). Der in dieser Arbeit gefundene Wert liegt am oberen Rand der angegebenen Konzentrationen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass speziell bei der Bestimmung aus Ultrafiltrat die GA-Konzentration niedriger sein dürfte als bei der Bestimmung aus Plasma, weil zu erwarten ist, dass bei der Gewinnung von Plasma-Ultrafiltrat proteingebundenes GA verloren geht. Ferner wurde in den Arbeiten, die niedrigere Werte angeben, Plasma bzw. Serum von nüchternen Probanden verwendet.

Die GA-Ausscheidung im Urin des Probanden betrug 274 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ und befindet sich somit in dem in der Literatur für Gesunde angegebenen Bereich von 75 - 1065 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (Chalmers *et al.*, 1984; Hagen *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1993; Maeda-Nakai und Ichiyama, 2000; Marangella *et al.*, 1992; Niederwieser *et al.*, 1978;

^e nur eine Probe pro Tag genommen, Originalangaben bezogen auf Kreatinin, die Umrechnung auf 24 h erfolgt hier unter der Annahme einer Kreatininausscheidung von 1,8 g/24 h (Geigy, 1975)

Wandzilak *et al.*, 1991). Ein Vergleich mit der EG-Ausscheidung, die in etwa um den Faktor 15 kleiner war, zeigt, dass der Hauptanteil des endogenen GA nicht aus dem endogenen EG entstehen kann.

Hintergrund-OA

Für gesunde Erwachsene werden OA-Ausscheidungen im Urin von 86 - 622 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ angegeben (Chalmers *et al.*, 1984; Hagen *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1993; Keßler *et al.*, 2002; Maeda-Nakai und Ichiyama, 2000; Marangella *et al.*, 1992; Siener und Hesse, 2002; von Unruh *et al.*, 1998; Wandzilak *et al.*, 1991). Die OA-Ausscheidung des Probanden im Expositionsexperiment lag mit 215 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ im Rahmen dieser Werte.

$^{13}\text{C}_2$ -markierte Substanzen

Die Verwendung von $^{13}\text{C}_2$ -EG zur Exposition war erforderlich, um die Konzentrationen von $^{13}\text{C}_2$ -EG und $^{13}\text{C}_2$ -GA im Plasma sowie die Ausscheidung von $^{13}\text{C}_2$ -EG, $^{13}\text{C}_2$ -GA und $^{13}\text{C}_2$ -OA im Urin zu quantifizieren.

Die ermittelte Halbwertszeit für $^{13}\text{C}_2$ -EG im Plasma liegt mit 2,1 h deutlich unter den Werten (3 - 8,6 h), die nach EG-Vergiftungen gemessen wurden (zusammengefasst in Eder *et al.*, 1998). Das gleiche gilt für die Halbwertszeit von $^{13}\text{C}_2$ -GA (2,9 h). Für GA war nach einer Vergiftung mit EG eine Halbwertszeit von 7 h berichtet worden (Jacobsen *et al.*, 1988). Bei EG-Vergiftungen liegen die Konzentrationen von EG und GA im millimolaren Bereich. Hieraus könnten die Unterschiede zu den in dieser Arbeit gefundenen Werten erklärt werden: Zum einen ist zu erwarten, dass der EG-Metabolismus bei so hohen Konzentrationen gesättigt ist, wie es im Tierversuch gezeigt wurde (Frantz *et al.*, 1996c; Marshall, 1982). Zum anderen könnte die Elimination über die Niere durch bereits eingetretene Nierenschäden beeinträchtigt gewesen sein.

Die Ausscheidung von $^{13}\text{C}_2$ -EG, $^{13}\text{C}_2$ -GA und $^{13}\text{C}_2$ -OA im Urin war innerhalb von 24 h nach Expositionsbeginn abgeschlossen. Von der inhalierten Dosis (1,43 mmol \cong 0,96 mg/kg) wurden 6,4% als $^{13}\text{C}_2$ -EG, 0,7% als $^{13}\text{C}_2$ -GA und 0,08% als $^{13}\text{C}_2$ -OA ausgeschieden. Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Ratte erhalten. Nach oraler Gabe von 10 mg/kg $^{13}\text{C}_2$ -EG mittels Schlundsonde an weibliche Sprague-

Dawley Ratten wurden 14,6% der Dosis als $^{13}\text{C}_2$ -EG, 1,4% als $^{13}\text{C}_2$ -GA und 0,4% als $^{13}\text{C}_2$ -OA im Urin wiedergefunden (Pottenger *et al.*, 2001). EG wird offenbar hauptsächlich im Intermediärstoffwechsel zu anderen Metaboliten biotransformiert (siehe Abb. 1). Dies wird an der Bildung von CO_2 deutlich, das den Hauptmetabolit von EG darstellt. Bei der Ratte wurden innerhalb von vier Tagen etwa 40% (Frantz *et al.*, 1996c) bzw. 60% (Marshall und Cheng, 1983) der verabreichten $^{14}\text{C}_2$ -EG Dosis als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet.

4.2.3 Gesundheitsrelevanz einer Exposition gegen EG am Arbeitsplatz

Die vom Probanden inhalierte Menge $^{13}\text{C}_2$ -EG entspricht einer achtstündigen Arbeitsplatzexposition gegen eine konstante EG-Konzentration von 3,8 ppm. Eine Extrapolation der im Urin gefundenen Mengen $^{13}\text{C}_2$ -GA und $^{13}\text{C}_2$ -OA auf eine achtstündige Exposition gegen 10 ppm EG (MAK-Wert) ergibt gegenüber der Hintergrundausscheidung eine expositionsbedingte Erhöhung der GA-Ausscheidung um 9,7% und der OA-Ausscheidung um 1,3%.

Berücksichtigt man den endogenen GA- bzw. OA-Hintergrund, so lassen diese ersten Ergebnisse für eine EG-Exposition unter Einhaltung des MAK-Werts (10 ppm EG über 8 h) keine Gefährdung durch die Metaboliten GA und OA erkennen.

4.3 Ausblick

Die vorläufigen Expositionsergebnisse dieser Arbeit müssen durch weitere Expositionen bestätigt werden. Hierdurch werden interindividuelle Unterschiede erfasst, die den Metabolismus beeinflussen können, wie zum Beispiel eine unterschiedliche Enzymausstattung.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob und inwieweit beim Umgang mit flüssigem EG eine Aufnahme über die Haut stattfindet und welche Belastung durch die Metaboliten GA und OA daraus resultiert.

Die hierdurch gewonnenen toxikokinetischen Daten sollen für eine Risikobewertung herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Ethylenglykol (EG) ist eine wichtige Industriechemikalie, die unter anderem zur Flugzeugenteisung, als Frostschutzmittel und zur Herstellung von Polyesterkunststoffen verwendet wird. Hohe Dosen von EG wirken nephrotoxisch und - im Tierversuch - embryotoxisch. Diese Effekte werden auf die Metaboliten Glykolsäure (GA) und Oxalsäure (OA) zurückgeführt. Beide Säuren werden auch im Intermediärstoffwechsel gebildet und sind Bestandteil der Nahrung, weshalb sie in Plasma und Urin der Allgemeinbevölkerung nachweisbar sind. Eine Bewertung des Gesundheitsrisikos, das durch eine EG-Exposition am Arbeitsplatz hervorgerufen wird, erfordert die Ermittlung der hierdurch bewirkten Belastungen durch GA und OA. Quantitative Untersuchungen hierzu wären durch Exposition gegen $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Ethylenglykol ($^{13}\text{C}_2$ -EG) möglich, liegen aber bisher nicht vor. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ausreichend empfindliche, auf der GC/MSD-Technik basierende Methoden zur Bestimmung von $^{13}\text{C}_2$ -EG, $^{13}\text{C}_2$ -GA und $^{13}\text{C}_2$ -OA zu entwickeln und ihre erfolgreiche Anwendung anhand der Inhalationsexposition eines Freiwilligen gegen $^{13}\text{C}_2$ -EG zu demonstrieren.

Zur Bestimmung von EG wurde dieses zuerst mittels *n*-Butylboronsäure verestert, sodann mit Ethylacetat extrahiert und mit dem GC/MSD analysiert. Als interne Standards wurden Propylenglykol und 1,3-Propandiol verwendet. Folgende Nachweisgrenzen wurden gefunden: EG aus Urin 1,1 $\mu\text{mol/l}$; $^{13}\text{C}_2$ -EG aus Plasma 0,6 $\mu\text{mol/l}$, aus Urin 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und aus Wasser 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Die Wiederfindung (\pm Standardabweichung) von $^{13}\text{C}_2$ -EG betrug aus Plasma $101 \pm 8\%$ (2 $\mu\text{mol/l}$) bzw. $94 \pm 8\%$ (10 $\mu\text{mol/l}$), aus Urin $95 \pm 13\%$ (5 $\mu\text{mol/l}$) bzw. $94 \pm 17\%$ (100 $\mu\text{mol/l}$). Die Präzision wurde als Variationskoeffizient der parallelen Mehrfachaufarbeitung einer Probe mit 3% (2 $\mu\text{mol/l}$ Plasma) bzw. 1% (10 $\mu\text{mol/l}$ Plasma) und 3% (5 $\mu\text{mol/l}$ Urin) bzw. 2% (100 $\mu\text{mol/l}$ Urin) bestimmt. Bei -80°C eingefrorene Proben waren für mindestens 5 Wochen stabil.

Für die Bestimmung von GA wurde zunächst das Wasser der Probe durch Verdampfen entfernt. Dann wurde mit *N-tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) silyliert, das Derivat mit Hexan extrahiert und mit dem GC/MSD analysiert. Als interne Standards wurden $[\text{D}_6]$ Bernsteinsäure (D_6 -SA) für die Bestimmung aus Plasma und (\pm)-2-Hydroxyisovaleriansäure für die

Bestimmung aus Urin verwendet. Die Nachweisgrenzen im Plasma lagen bei 1,2 µmol/l für GA und 0,8 µmol/l für $^{13}\text{C}_2$ -GA, im Urin bei 32,6 µmol/l und 2,9 µmol/l. Als Wiederfindung von GA wurden 83 - 121% (25 µmol/l Plasma) und $51 \pm 4\%$ (250 µmol/l Urin) bestimmt. Die Präzision der Bestimmung von GA betrug 4% (5 µmol/l Plasma) bzw. 6% (25 µmol/l Plasma) und 2% (25 µmol/l Urin) bzw. 4% (250 µmol/l Urin). Bei -80°C eingefrorene Proben waren für mindestens 5 Wochen stabil.

Für OA wurde nur eine Methode zur Bestimmung aus Urin entwickelt. Nach Extraktion mittels Ethylacetat aus der angesäuerten Probe und Verdampfen des Lösemittels wurde wieder mit MTBSTFA derivatisiert, das Produkt mit Hexan extrahiert und mit dem GC/MSD analysiert. Als interne Standards wurden Bernsteinsäure für OA und D_6 -SA für $^{13}\text{C}_2$ -OA verwendet. Als Nachweisgrenzen wurden 17,2 µmol/l für OA und 0,2 µmol/l für $^{13}\text{C}_2$ -OA bestimmt. Die Wiederfindung betrug $25 \pm 3\%$ (250 µmol/l), die Präzision 6% (25 µmol/l) bzw. 6% (250 µmol/l). Bei -80°C ist OA in Urin wochenlang haltbar.

Zur Exposition des Probanden gegen $^{13}\text{C}_2$ -EG-Dämpfe wurde ein selbst entworfenes gläsernes Expositionssystem verwendet. Der Proband (96 kg) inhalierte 1,43 mmol $^{13}\text{C}_2$ -EG innerhalb von 4 h. Die gleiche Menge EG wird bei einer achtstündigen Exposition gegen 3,8 ppm unter Arbeitsplatzbedingungen (Leistung 50 W) inhaliert.

Im Plasma des Probanden wurden $^{13}\text{C}_2$ -EG und $^{13}\text{C}_2$ -GA sowie endogenes GA gefunden. Die Spitzenkonzentration von $^{13}\text{C}_2$ -EG betrug 11,0 µmol/l, die von $^{13}\text{C}_2$ -GA 0,9 µmol/l. Die Durchschnittskonzentration von GA betrug 25,8 µmol/l. Die Plasmahalbwertszeiten betragen 2,1 h für $^{13}\text{C}_2$ -EG und 2,9 h für $^{13}\text{C}_2$ -GA.

Im Urin wurden alle drei Substanzen markiert und unmarkiert gefunden. Innerhalb von 24 h wurden 91,3 µmol $^{13}\text{C}_2$ -EG, 10,1 µmol $^{13}\text{C}_2$ -GA und 1,13 µmol $^{13}\text{C}_2$ -OA ausgeschieden. Diese Mengen entsprachen 6,4%, 0,70% und 0,08% der inhalierten Dosis $^{13}\text{C}_2$ -EG. An unmarkierten (endogenen) Substanzen wurden 18,2 µmol EG/24 h, 274 µmol GA/24 h und 215 µmol OA/24 h ausgeschieden.

Diese ersten Ergebnisse lassen kein Gesundheitsrisiko durch die Metaboliten GA und OA erkennen, sofern die maximale Arbeitsplatzkonzentration von 10 ppm EG (MAK-Wert, 8 h/d, 5 d/Woche) nicht überschritten wird.

6 Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| ACN | Acetonitril |
| AUC | area under the curve |
| BSTFA | <i>N,O</i> -bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid |
| c | Konzentration |
| C _{SS} | Konzentration im Fließgleichgewicht (steady state) |
| CV | Variationskoeffizient |
| CYP | Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase |
| d | Tag(e) |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EG | Ethylenglykol |
| eV | Elektronenvolt |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| g | Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) |
| GA | Glykolsäure |
| GC | Gaschromatograph |
| HIVA | 2-Hydroxyisovaleriansäure (2-hydroxyisovaleric acid) |
| HPIC | Hochleistungsenchromatographie (high performance ion chromatography) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography) |
| k | Eliminationskonstante |
| m | Masse (der Ionen im Massenspektrometer) |
| M | Molekülion |
| MAK | Maximale Arbeitsplatzkonzentration |
| min | Minuten(n) |
| MS | Massenspektrometer |
| MSD | massenselektiver Detektor |
| MTBSTFA | <i>N-tert</i> -Butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid |
| MW | Mittelwert |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance) |

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| OA | Oxalsäure |
| 1,3PD | 1,3-Propandiol |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PG | Propylenglykol (1,2-Propandiol) |
| PP | Polypropylen |
| ppm | parts per million |
| r | Wiederfindung (recovery) |
| R ² | Korrelationskoeffizient im Quadrat |
| SA | Bernsteinsäure (succinic acid) |
| SD | Standardabweichung |
| sec | Sekunde(n) |
| SILA | Silylierungsmischung MTBSTFA mit 1% TBDMSCl |
| SIM | selected ion monitoring |
| t | Zeit |
| TBDMS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl- |
| TBDMSCl | <i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid |
| TMS | Trimethylsilyl- |
| TLV-C | threshold limit value - ceiling |
| UV | Ultraviolett(detektor) |
| V | Volumen |
| Vol. | Volumen |
| v | Aufnahmerate |
| V _D | Verteilungsvolumen |
| W | Watt |
| z | Ionenladung |
| ZNS | Zentralnervensystem |

7 Literatur

Aarstad, K.; Dale, O.; Aakervik, O.; Øvrebø, S.; Zahlsen, K.:
A rapid gas chromatographic method for determination of ethylene glycol in serum
and urine

Journal of Analytical Toxicology, 17, 218-221 (1993)

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists:
Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices
Cincinnati, (2000)

Andrews, L.S.; Snyder, R.:
Toxic effects of solvents and vapors
in: Amdur, M.O.; Doull, J.; Klaassen, C.D. (Hrsg.) "Cassarett and Doull's Toxicology:
The Basic Science of Poisons", Pergamon Press, New York, 4. Aufl., 703-704 (1991)

Åstrand, I.:
Effects of physical exercise on uptake, distribution and elimination of vapors in man
in: Fiserova-Bergerova, V. (Hrsg.) "Modeling of Inhalation Exposure to Vapors:
Uptake, Distribution and Elimination", CRC Press, Boca Raton, Band 2, 107-130
(1983)

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry:
Toxicological Profile for Ethylene Glycol and Propylene Glycol
Atlanta (1997)

Blandford, D.E.; Desjardins, P.R.:
A rapid method for measurement of ethylene glycol
Clinical Biochemistry, 27, 25-30 (1994)

Blau, K.; Darbre, A.:
Esterification
in: Blau, K.; Halket, J. (Hrsg.) "Handbook of Derivatives for Chromatography", John
Wiley & Sons, Chichester, 2. Aufl., 11-30 (1993)

Blood, F.R.:
Chronic toxicity of ethylene glycol in the rat
Food and Cosmetics Toxicology, 3, 229-234 (1965)

Bornmann, G.:
Grundwirkungen der Glykole und ihre Bedeutung für die Toxizität (I)
Arzneimittelforschung, 4, 643-646 (1954)

Bronstein, I.N.; Semendjajew, K.A.:
Taschenbuch der Mathematik
Verlag Harri Deutsch, Zürich, Frankfurt/Main, Thun, 16. Aufl. (1976)

- Budavari, S.; O'Neil, M.J.; Smith, A.; Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F. (Hrsg.):
The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals
Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, 12. Aufl. (1996)
- Carney, E.W.; Freshour, N.L.; Dittenber, D.A.; Dryzga, M.D.:
Ethylene glycol developmental toxicity: unraveling the roles of glycolic acid and
metabolic acidosis
Toxicological Sciences, 50, 117-126 (1999)
- Cavender, F.L.; Sowinski, E.J.:
Glycols
in: Bingham, E.; Cohrssen, B., Powell, C.H. (Hrsg.) "Patty's Toxicology", John Wiley
& Sons, Inc., New York, Band 7, 5. Aufl., 1-71 (2001)
- CEFIC, European Chemical Industry Council:
Capacity and Production Data
am 17.02.2003 heruntergeladen von
<http://www.petrochemistry.net/facts/2002capacity01.html> (2002)
- Chalmers, R.A.; Tracey, B.M.; Mistry, J.; Griffiths, K.D.; Green, A.; Winterborn,
M.H.:
L-Glyceric aciduria (primary hyperoxaluria type 2) in siblings in two unrelated
families
Journal of Inherited Metabolic Disease, 7, 133-134 (1984)
- Chalmers, R.A.; Watts, R.W.E.:
The quantitative extraction and gas-liquid chromatographic determination of organic
acids in urine
Analyst, 97, 958-967 (1972)
- Chandran, P.; Thakur, M.; Pundir, C.S.:
Improved determination of urinary oxalate with alkylamine glass bound barley
oxalate oxidase
Journal of Biotechnology, 85, 1-5 (2001)
- Clay, K.L.; Murphy, R.C.:
On the metabolic acidosis of ethylene glycol intoxication
Toxicology and Applied Pharmacology, 39, 39-49 (1977)
- Clejan, L.A.; Cederbaum, A.I.:
Structural determination of alcohol substrates to be oxidized to formaldehyde by rat
liver microsomes
Archives of Biochemistry and Biophysics, 298, 105-113 (1992)
- Danpure, C.J.; Purkiss, P.; Jennings, P.R.; Watts, R.W.E.:
Mitochondrial damage and the subcellular distribution of 2-oxoglutarate:glycolate
carboligase in normal human and rat liver and in the liver of a patient with primary
hyperoxaluria type I
Clinical Science, 70, 417-425 (1986)

DePass, L.R.; Garman, R.H.; Woodside, M.D.; Giddens, W.E.; Maronpot, R.R.; Weil, C.S.:

Chronic toxicity and oncogenicity studies of ethylene glycol in rats and mice
Fundamental and Applied Toxicology, 7, 547-565 (1986)

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft:

Ethylenglykol

in: Greim, H. (Hrsg.) "Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten", Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, (1991)

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft:

Ethylenglykol, Nachtrag

in: Greim, H. (Hrsg.) "Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten", Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, (2000a)

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft:

MAK- und BAT-Wert-Liste 2000

Wiley-VCH, Weinheim, (2000b)

Dietzen, D.J.; Wilhite, T.R.; Kenaky, D.N.; Milliner, D.S.; Smith, C.H.; Landt, M.:

Extraction of glyceric and glycolic acids from urine with tetrahydrofuran: utility in detection of primary hyperoxaluria

Clinical Chemistry, 43, 1315-1320 (1997)

Doms, E.K.:

Gaschromatographische Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren von C₁ bis C₅

einschliesslich der Milchsäure als Benzylester unter Verwendung von

Phenyldiazomethan als Benzylierungsmittel - Bestimmung der Milchsäure in Silagen

Journal of Chromatography, 140, 29-39 (1977)

Duez, P.; Kumps, A.; Mardens, Y.:

GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method

Clinical Chemistry, 42, 1609-1615 (1996)

Eder, A.F.; McGrath, C.M.; Dowdy, Y.G.; Tomaszewski, J.E.; Rosenberg, F.M.;

Wilson, R.B.; Wolf, B.A.; Shaw, L.M.:

Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis

Clinical Chemistry, 44, 168-177 (1998)

Edinboro, L.E.; Nanco, C.R.; Soghioan, D.M.; Poklis, A.:

Determination of ethylene glycol in serum utilizing direct injection on a wide-bore capillary column

Therapeutic Drug Monitoring, 15, 220-223 (1993)

Ensafi, A.A.; Kazemzadeh, A.:

Flow injection spectrophotometric determination of ultra trace amounts of oxalic acid

Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 367, 590-592 (2000)

Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.):

Chemie Lexikon / Römpp

Band 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Aufl. (1990)

Filser, J.G.:

Toxikokinetik

in: Greim, H.; Deml, E. (Hrsg.) "Toxikologie", VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Aufl., 13-40 (1996)

Filser, J.G.; Schmidbauer, R.; Rampf, F.; Baur, C.M.; Pütz, C.; Csanády, G.A.:

Toxicokinetics of inhaled propylene in mouse, rat, and human

Toxicology and Applied Pharmacology, 169, 40-51 (2000)

Frantz, S.W.; Beskitt, J.L.; Grosse, C.M.; Tallant, M.J.; Dietz, F.K.; Ballantyne, B.:

Pharmacokinetics of ethylene glycol I. - Plasma disposition after single intravenous, peroral, or percutaneous doses in female Sprague-Dawley rats and CD-1 mice

Drug Metabolism and Disposition, 24, 911-921 (1996a)

Frantz, S.W.; Beskitt, J.L.; Grosse, C.M.; Tallant, M.J.; Dietz, F.K.; Ballantyne, B.:

Pharmacokinetics of ethylene glycol II. - Tissue distribution, dose-dependent elimination, and identification of urinary metabolites following single intravenous, peroral or percutaneous doses in female Sprague-Dawley rats and CD-1 mice

Xenobiotica, 26, 1195-1220 (1996b)

Frantz, S.W.; Beskitt, J.L.; Tallant, M.J.; Zourelis, L.A.; Ballantyne, B.:

Pharmacokinetics of ethylene glycol III. - Plasma disposition and metabolic fate after single intravenous, peroral or percutaneous doses in the male Sprague-Dawley rat

Xenobiotica, 26, 515-539 (1996c)

Gallaughher, A.F.; Hibbert, H.:

Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. LV. Vapor pressures of polyethylene glycols and their derivatives

Journal of the American Chemical Society, 59, 2521-2525 (1937)

Gaultier, M.; Conso, F.; Rudler, M.; Leclerc, J.P.; Mellerio, F.:

Intoxication aiguë par l'éthylène glycol

European Journal of Toxicology, 9, 373-379 (1976)

Geigy Documenta:

Wissenschaftliche Tabellen

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Aufl. (1975)

Gelot, M.A.; Lavoue, G.; Belleville, F.; Nabet, P.:

Determination of oxalates in plasma and urine using gas chromatography

Clinica Chimica Acta, 106, 279-285 (1980)

Gérin, M.; Patrice, S.; Bégin, D.; Goldberg, M.S.; Vyskocil, A.; Adib, G.; Drolet, D.; Viau, C.:

A study of ethylene glycol exposure and kidney function of aircraft de-icing workers
International Archives of Occupational and Environmental Health, 69, 255-265
(1997)

Gessner, P.K.; Parke, D.V.; Williams, R.T.:

Studies in detoxification. 86. The metabolism of ¹⁴C-labelled ethylene glycol
Biochemistry Journal, 79, 482-489 (1961)

Giachetti, C.; Zanolò, G.; Assandri, A.; Polletti, P.:

Determination of cyclic butylboronate esters of some 1,2- and 2,3-diols in plasma by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry
Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 18, 592-597 (1989)

Glomb, M.A.; Monnier, V.M.:

Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the maillard reaction
The Journal of Biological Chemistry, 270, 10017-10026 (1995)

Gupta, S.C.; Dekker, E.E.:

Malyl-CoA formation in the NAD⁺-, CoASH-, and α -ketoglutarate dehydrogenase-dependent oxidation of 2-keto-4-hydroxyglutarate
Journal of Biological Chemistry, 259, 10012-10019 (1984)

Hagen, L.; Walker, V.R.; Sutton, R.A.L.:

Plasma and urinary oxalate and glycolate in healthy subjects
Clinical Chemistry, 39, 134-138 (1993)

Herndon, L.R.; Reid, E.E.:

The decomposition of organic compounds at high temperatures and pressures
Journal of the American Chemical Society, 50, 3066-3073 (1928)

Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.:

Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1995)

Holmes, R.P.; Goodman, H.O.; Hart, L.J.; Assimos, D.G.:

Relationship of protein intake to urinary oxalate and glycolate excretion
Kidney International, 44, 366-372 (1993)

Houzé, P.; Chaussard, J.; Harry, P.; Pays, M.:

Simultaneous determination of ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol and 2,3-butylene glycol in human serum and urine by wide-bore column gas chromatography
Journal of Chromatography - Biomedical Applications, 619, 251-257 (1993)

Husek, P.; Matucha, P.:

Simple approach for analysis of plasma oxo-, hydroxy- and dicarboxylic acids
Journal of Chromatography B, 693, 499-502 (1997)

IPCS, International Programme on Chemical Safety:
Ethylene glycol: Human Health Aspects
World Health Organisation, Geneva (2002)

Jacobsen, D.; Hewlett, T.P.; Webb, R.; Brown, S.T.; Ordinario, A.T.; McMartin, K.E.:

Ethylene glycol intoxication: evaluation of kinetics and crystalluria
The American Journal of Medicine, 84, 145-152 (1988)

James, M.O.; Yan, Z.; Cornett, R.; Jayanti, V.M.K.M.; Henderson, G.N.; Davydova, N.; Katovich, M.J.; Pollock, B.; Stacpoole, P.W.:

Pharmacokinetics and metabolism of [¹⁴C]dichloroacetate in male Sprague-Dawley rats

Drug Metabolism and Disposition, 26, 1134-1143 (1998)

Jones, J.M.; Morrell, J.C.; Gould, S.J.:

Identification and characterization of HAOX1, HAOX2, and HAOX3, three human peroxisomal 2-hydroxy acid oxidases

Journal of Biological Chemistry, 275, 12590-12597 (2000)

Karlson, P.:

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Aufl. (1974)

Kashtock, M.; Breder, C.V.:

Migration of ethylene glycol from polyethylene terephthalate bottles into 3% acetic acid

Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 63, 168-172 (1980)

Keßler, T.; Jansen, B.; Hesse, A.:

Effect of blackcurrant-, cranberry- and plum juice consumption on risk factors associated with kidney stone formation

European Journal of Clinical Nutrition, 56, 1020-1023 (2002)

Kim, K.R.; Hahn, M.K.; Zlatkis, A.; Horning, E.C.; Middleditch, B.S.:

Simultaneous gas chromatography of volatile and non-volatile carboxylic acids as *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives

Journal of Chromatography, 468, 289-301 (1989)

Klemm, H.-P.; Hintze, U.; Gercken, G.:

Quantitative preparation and gas chromatography of short and medium chain fatty acid benzyl esters (C₁-C₁₂)

Journal of Chromatography, 75, 19-27 (1973)

Klug, S.; Mercker, H.-J.; Jäckh, R.:

Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis

Toxicology in Vitro, 15, 635-642 (2001)

- Kukielka, E.; Cederbaum, A.I.:
Oxidation of ethylene glycol to formaldehyde by rat liver microsomes. Role of cytochrome P-450 and reactive oxygen species
Drug Metabolism and Disposition, 19, 1108-1115 (1991)
- Kukielka, E.; Cederbaum, A.I.:
Increased oxidation of ethylene glycol to formaldehyde by microsomes after ethanol treatment: role of oxygen radicals and cytochrome P450
Toxicology Letters, 78, 9-15 (1995)
- Kumps, A.; Duez, P.; Genin, J.; Mardens, Y.:
Gas chromatography-mass spectrometry analysis of organic acids: Altered quantitative response for aqueous calibrators and dilute urine specimens
Clinical Chemistry, 45, 1297-1300 (1999)
- Laitinen, J.; Liesivuori, J.; Savolainen, H.:
Exposure to glycols and their renal effects in motor servicing workers
Occupational Medicine (London), 45, 259-262 (1995)
- Laitinen, J.; Liesivuori, J.; Savolainen, H.:
Biological monitoring of occupational exposure to 1-methoxy-2-propanol
Journal of Chromatography B, 694, 93-98 (1997)
- LaKind, J.S.; McKenna, E.A.; Hubner, R.P.; Tardiff, R.G.:
A review of the comparative mammalian toxicity for ethylene glycol and propylene glycol
Critical Reviews in Toxicology, 29, 331-365 (1999)
- Letzel, S.; Gündel, J.; Schaller, K.H.; Angerer, J.:
Biomonitoring von Glykol-belasteten Personen - Kapillargaschromatographische Bestimmung von Ethylenglykol und 1,2-Propylenglykol im Harn
Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin, 35, 160-162 (2000)
- Lide, D.R. (Hrsg.):
CRC Handbook of Chemistry and Physics
CRC Press, Boca Raton, 80. Aufl. (1999)
- Liebich, H.M.; Gesele, E.:
Profiling of organic acids by capillary gas chromatography-mass spectrometry after direct methylation in urine using trimethyloxonium tetrafluoroborate
Journal of Chromatography A, 843, 237-245 (1999)
- Little, J.L.:
Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them
Journal of Chromatography A, 844, 1-22 (1999)
- Loepky, R.N.; Goelzer, P.:
Microsome-mediated oxidation of *N*-nitrosodiethanolamine (NDELA), a bident carcinogen
Chemical Research in Toxicology, 15, 457-469 (2002)

- Maeda-Nakai, E.; Ichiyama, A.:
A spectrophotometric method for the determination of glycolate in urine and plasma with glycolate oxidase
Journal of Biochemistry (Tokyo), 127, 279-287 (2000)
- Marangella, M.; Petrarulo, M.; Vitale, C.; Cosseddu, D.; Linari, F.:
Plasma and urine glycolate assays for differentiating the hyperoxaluria syndromes
The Journal of Urology, 148, 986-989 (1992)
- Marcell, P.D.; Stabler, S.P.; Podell, E.R.; Allen, R.H.:
Quantitation of methylmalonic acid and other dicarboxylic acids in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry
Analytical Biochemistry, 150, 58-66 (1985)
- Mardens, Y.; Kumps, A.; Planchon, C.; Wurth, C.:
Comparison of two extraction procedures for urinary organic acids prior to gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Chromatography - Biomedical Applications, 577, 341-346 (1992)
- Marshall, T.C.:
Dose-dependent disposition of ethylene glycol in the rat after intravenous administration
Journal of Toxicology and Environmental Health, 10, 397-402 (1982)
- Marshall, T.C.; Cheng, Y.S.:
Deposition and fate of inhaled ethylene glycol vapor and condensation aerosol in the rat
Fundamental and Applied Toxicology, 3, 175-181 (1983)
- Maurer, H.H.; Peters, F.T.; Paul, L.D.; Kraemer, T.:
Validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the antifreezes ethylene glycol and diethylene glycol in human plasma, after microwave-assisted pivalylation
Journal of Chromatography B, 754, 401-409 (2001)
- McChesney, E.W.; Golberg, L.; Harris, E.S.:
Reappraisal of the toxicology of ethylene glycol IV. - The metabolism of labelled glycollic and glyoxylic acid in the rhesus monkey
Food and Cosmetics Toxicology, 10, 655-670 (1972)
- McChesney, E.W.; Golberg, L.; Parekh, C.K.; Russell, J.C.; Min, B.H.:
Reappraisal of the toxicology of ethylene glycol II. - Metabolism studies in laboratory animals
Food and Cosmetics Toxicology, 9, 21-38 (1971)
- Miwa, H.; Yamamoto, M.; Kan, K.; Futata, T.; Asano, T.:
High-performance liquid chromatographic measurements of urinary hydroxycarboxylic acids as an index for the metabolic control in non-insulin-dependent diabetic patients
Journal of Chromatography B, 679, 1-6 (1996)

Morelli-Cardoso, M.H.W.; Tabak, D.; Cardoso, J.N.; Pereira, A.S.:
Application of capillary gas chromatography to the determination of ethylene glycol migration from PET bottles in Brazil
Journal of High Resolution Chromatography, 20, 183-185 (1997)

Müller, H.W.:
Diazomethane as a highly selective fatty acid methylation reagent for use in gas chromatographic analysis
Journal of Chromatography B, 679, 208-209 (1996)

Mycyk, M.B.; Drendel, A.; Sigg, T.; Leikin, J.B.:
Leukemoid response in ethylene glycol intoxication
Veterinary and Human Toxicology, 44, 304-306 (2002)

Narayanan, L.; Moghaddam, A.P.; Taylor, A.G.; Sudberry, G.L.; Fisher, J.W.:
Sensitive high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of low levels of dichloroacetic acid and its metabolites in blood and urine
Journal of Chromatography B, 729, 271-277 (1999)

Neeper-Bradley, T.L.; Tyl, R.W.; Fisher, L.C.; Kubena, M.F.; Vrbanic, M.A.; Losco, P.E.:
Determination of a no-observed-effect level for developmental toxicity of ethylene glycol administered by gavage to CD rats and CD-1 mice
Fundamental and Applied Toxicology, 27, 121-130 (1995)

Niederwieser, A.; Matasovic, A.; Leumann, E.P.:
Glycolic acid in urine. A colorimetric method with values in normal adult controls and in patients with primary hyperoxaluria
Clinica Chimica Acta, 89, 13-23 (1978)

NTP, National Toxicology Program:
Toxicology and carcinogenesis studies of ethylene glycol in B6C3F1 mice.
U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC (1993)

Oehme, M.:
Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen: Grundlagen und Anwendungen
Hüthig, Heidelberg, (1996)

Pace-Asciak, C.R.:
One step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatography
Journal of Lipid Research, 30, 451-454 (1989)

Petrarulo, M.; Marangella, M.; Linari, F.:
High-performance liquid chromatographic determination of plasma glycolic acid in healthy subjects and in cases of hyperoxaluria syndromes
Clinica Chimica Acta, 196, 17-26 (1991)

- Poldelski, V.; Johnson, A.; Wright, S.; Rosa, V.D.; Zager, R.A.:
Ethylene glycol-mediated tubular injury: identification of critical metabolites and injury pathways
American Journal of Kidney Diseases, 38, 339-348 (2001)
- Porter, W.H.; Rutter, P.W.; Yao, H.H.:
Simultaneous determination of ethylene glycol and glycolic acid in serum by gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Analytical Toxicology, 27, 591-597 (1999)
- Pottenger, L.H.; Carney, E.W.; Bartels, M.J.:
Dose-dependent nonlinear pharmacokinetics of ethylene glycol metabolites in pregnant (GD10) and nonpregnant Sprague-Dawley rats following oral administration of ethylene glycol
Toxicological Sciences, 62, 10-19 (2001)
- Rajagopal, G.; Ramakrishnan, S.:
Hepatic metabolism of ethylene glycol (EG) and its relevance to ethanol as antidote in EG toxicity
Indian Journal of Pharmacology, 26, 108-111 (1994)
- Raksit, A.; Punani, S.:
Gas Chromatographic-mass spectrometric investigation of aliphatic glycols in environmental samples
Journal of Chromatographic Science, 35, 489-494 (1997)
- Richardson, K.E.:
The effect of partial hepatectomy on the toxicity of ethylene glycol, glycolic acid and glycine
Toxicology and Applied Pharmacology, 24, 530-538 (1973)
- Richardson, K.E.; Tolbert, N.E.:
Oxidation of glycolic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase
Journal of Biological Chemistry, 236, 1280-1284 (1961)
- Russell, J.C.; McChesney, E.W.; Golberg, L.:
Reappraisal of the toxicology of ethylene glycol I. - Determination of ethylene glycol in biological material by a chemical method
Food and Cosmetics Toxicology, 7, 107-113 (1969)
- Sachs, L.:
Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 10. Aufl. (2002)
- Scalley, R.D.; Ferguson, D.R.; Piccaro, J.C.; Smart, M.L.; Archie, T.E.:
Treatment of ethylene glycol poisoning
American Family Physician, 66, 807-812 (2002)

- Schatowitz, B.; Gercken, G.:
Benzyl esters of C₂-C₂₀ fatty acids and metabolically relevant carboxylic acids -
Preparation and gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Chromatography, 409, 43-54 (1987)
- Schatowitz, B.; Gercken, G.:
Simultaneous determination of C₂-C₂₂ non-esterified fatty acids and other
metabolically relevant carboxylic acids in biological material by gas chromatography
of their benzyl esters
Journal of Chromatography, 425, 257-268 (1988)
- Schlenk, H.; Gellerman, J.L.:
Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale
Analytical Chemistry, 32, 1412-1414 (1960)
- Schlossberg, M.A.; Richert, D.A.; Bloom, R.J.; Westerfeld, W.W.:
Isolation and identification of 5-hydroxy-4-ketovaleric acid as
a product of α -ketoglutarate:glyoxylate carboligase
Biochemistry, 7, 333-337 (1968)
- Schwenk, W.F.; Berg, P.J.; Beaufriere, B.; Miles, J.M.; Haymond, M.W.:
Use of t-butyltrimethylsilylation in the gas chromatographic/mass spectrometric
analysis of physiologic compounds found in plasma using electron-impact ionisation
Analytical Biochemistry, 141, 101-109 (1984)
- Sekizawa, Y.; Maragoudakis, M.E.; King, T.E.; Cheldelin, V.H.:
Glutamate biosynthesis in an organism lacking a Krebs tricarboxylic acid cycle. V.
Isolation of alpha-hydroxy-gamma-ketoglutarate (HKG) in *Acetobacter suboxydans*
Biochemistry, 5, 2392-2398 (1966)
- Siener, R.; Hesse, A.:
The effect of different diets on urine composition and the risk of calcium oxalate
crystallisation in healthy subjects
European Urology, 42, 289-296 (2002)
- Song, F.; Darbeau, R.W.; White, E.H.:
Interception of deaminatively generated benzyl carbenium ions by acetone
Journal of Organic Chemistry, 65, 1825-1829 (2000)
- Staples, A.C.; Williams, J.B.; Craig, G.R.; Roberts, K.M.:
Fate, effects and potential environmental risks of ethylene glycol: a review
Chemosphere, 43, 377-383 (2001)
- Stull, D.R.:
Vapor pressure of pure substances. Organic compounds
Industrial and Engineering Chemistry, 39, 517-540 (1947)
- Taylor, C.A.; Rinkenbach, W.H.:
Ethylene glycol - An evaluation of available information on the physical properties of
this compound
Industrial and Engineering Chemistry, 18, 676-678 (1926)

- Thakur, M.; Goyal, L.; Pundir, C.S.:
Discrete analysis of plasma oxalate with alkylamine glass bound sorghum oxalate oxidase and horseradish peroxidase
Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 44, 77-88 (2000)
- Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.:
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4. Aufl. (1991)
- Tyl, R.W.; Ballantyne, B.; Fischer, L.C.; Fait, D.L.; Savine, T.A.; Dodd, D.E.; Klonne, D.R.; Pritts, I.M.:
Evaluation of the developmental toxicity of ethylene glycol aerosol in the CD rat and CD-1 mouse by whole-body exposure
Fundamental and Applied Toxicology, 24, 57-75 (1995a)
- Tyl, R.W.; Ballantyne, B.; Fisher, L.C.; Fait, D.L.; Dodd, D.E.; Klonne, D.R.; Pritts, I.M.; Losco, P.E.:
Evaluation of the developmental toxicity of ethylene glycol aerosol in CD-1 mice by nose-only exposure
Fundamental and Applied Toxicology, 27, 49-62 (1995b)
- Tyl, R.W.; Fisher, L.C.; Kubena, M.F.; Vrbanic, M.A.; Losco, P.E.:
Assessment of the developmental toxicity of ethylene glycol applied cutaneously to CD-1 mice
Fundamental and Applied Toxicology, 27, 155-166 (1995c)
- Tyl, R.W.; Price, C.J.; Marr, M.C.; Myers, C.B.; Seely, J.C.; Heindel, J.J.; Schwetz, B.A.:
Developmental toxicity of ethylene glycol by gavage in New Zealand white rabbits
Fundamental and Applied Toxicology, 20, 402-412 (1993)
- van Look, G.; Sichem, G.; Heberle, J.:
Silylating Agents
Fluka Chemie AG, Buchs, 2. Aufl. (1995)
- Vollmer, P.A.; Harty, D.C.; Erickson, N.B.; Balhon, A.C.; Dean, R.A.:
Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography
Journal of Chromatography B, 685, 370-374 (1996)
- von Unruh, G.E.; Langer, M.A.W.; Paar, D.W.; Hesse, A.:
Mass spectrometric-selected ion monitoring assay for an oxalate absorption test applying [¹³C₂]oxalate
Journal of Chromatography B, 716, 343-349 (1998)
- von Wartburg, J.-P.; Bethune, J.L.; Vallee, B.L.:
Human liver-alcohol dehydrogenase. Kinetic and physicochemical properties
Biochemistry, 3, 1775-1782 (1964)

- Wade, D.:
Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules
Chemico-Biological Interactions, 177, 191-217 (1999)
- Wagner, F.W.; Burger, A.R.; Vallee, B.L.:
Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes
Biochemistry, 22, 1857-1863 (1983)
- Wahl, A.; Azaroual, N.; Imbenotte, M.; Mathieu, D.; Forzy, G.; Cartigny, B.; Vermeersch, G.; Lhermitte, M.:
Poisoning with methanol and ethylene glycol: ¹H NMR spectroscopy as an effective clinical tool for diagnosis and quantification
Toxicology, 128, 73-81 (1998)
- Wandzilak, T.R.; Hagen, L.E.; Hughes, H.; Sutton, R.A.L.; Smith, L.H.; Williams, H.E.:
Quantitation of glycolate in urine by ion-chromatography
Kidney International, 39, 765-770 (1991)
- Wiener, H.L.; Richardson, K.E.:
The metabolism and toxicity of ethylene glycol
Research Communications in Substances of Abuse, 9, 77-87 (1988)
- Williams, H.E.; Wandzilak, T.R.:
Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes
The Journal of Urology, 141, 742-749 (1989)
- Wills, J.H.; Coulston, F.; Harris, E.S.; McChesney, E.W.; Russell, J.C.; Serrone, D.M.:
Inhalation of aerosolized ethylene glycol by man
Clinical Toxicology, 7, 463-476 (1974)
- Wolthers, B.G.; Hayer, M.:
The determination of oxalic acid in plasma and urine by means of capillary gas chromatography
Clinica Chimica Acta, 120, 87-102 (1982)
- Yan, Z.; Henderson, G.N.; James, M.O.; Stacpoole, P.W.:
Determination of dichloroacetate and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Chromatography B, 703, 75-84 (1997)
- Yanagawa, M.; Maeda-Nakai, E.; Yamakawa, N.; Yamamoto, I.; Kawamura, J.; Tada, S.; Ichiyama, A.:
The formation of oxalate from glycolate in rat and human liver
Biochimica et Biophysica Acta, 1036, 24-33 (1990)

Yang, W.-C.; Dai, Y.-Q.; Yu, A.-M.; Chen, H.-Y.:
Simultaneous determination of polycarboxylic acids by capillary electrophoresis with
a copper electrode
Journal of Chromatography A, 867, 261-269 (2000)

Yao, H.H.; Porter, W.H.:
Simultaneous determination of ethylene glycol and its major toxic metabolite,
glycolic acid, in serum by gas chromatography
Clinical Chemistry, 42, 292-297 (1996)

Yin, L.; Liu, C.; Shih, L.; Po, K.:
A study on the teratogenic action of ethylene glycol in rats
Chinese Journal of Preventive Medicine, 20, 289-290 (1986)

Zabrodskii, P.F.; Germanchuk, V.G.:
Immunotoxic effects during acute ethylene glycol poisoning
Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 130, 967-968 (2000)

Zabrodskii, P.F.; Kirichuk, V.F.; Osipov, O.V.:
In vitro effects of alcohols and their metabolites on antibody-forming activity of T
and B lymphocytes
Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 133, 258-260 (2002)