Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

Identifizierung und Quantifizierung der PVC Weichmachermetabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure im Plasma mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nirgül Usta

aus
Ludwigsburg
2006

Dekan:	Professor Dr. C. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Luft
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C.H. Gleiter

gewidmet
meinen Eltern und
meinem Bruder Engin

ABSTRACT ZUR DISSERTATION, vorgelegt von Nirgül Usta

Identifizierung und Quantifizierung der PVC Weichmachermetabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure im Plasma mittels Gaschromatographie - Massenspektrometrie

Phthalate werden als Weichmacher bei der Herstellung des Kunststoffes Polyvinylchlorid (PVC) eingesetzt. Sie besitzen die Eigenschaft, den Kunststoff flexibler und gleichzeitig strapazierfähiger zu machen. Aus diesem Grund begegnen uns Phthalate überall im Alltag, wie z.B. in der Kleidung, als Verpackungsmaterial, aber vor allem in der Medizin werden die Eigenschaften von Weichmachern genutzt. Die Belastung der gesamten Bevölkerung ist allgegenwärtig. Die größte Aufnahme von DEHP (Di(2-ethylhexyl) Phthalat) erfolgt über Nahrungsmittel, aufgrund des Verpackungsmaterials. Für Patienten, die in dauerndem Kontakt mit DEHP-haltigem PVC stehen wie z.B. Dialysepatienten und intensivpflichtige Früh- und Neugeborene besteht eine aussergewöhnlich hohe Exposition.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der PVC – Weichmachermetabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure im Plasma mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie zu entwickeln und zu validieren.

Des Weiteren sollte anhand dieser Methode eine klinische Studie zum Vorkommen von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure bei Hämodialysepatienten und Kontrollpersonen entwickelt werden. Dazu wurden Plasmaproben von 124 gesunden Kontrollpersonen und 104 Dialysepatienten nach Validierung der Methode untersucht. Die Proben der Dialysepatienten wiesen die DEHP Metabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure auf, nicht hingegen die Proben der Kontrollpersonen.

Anhand der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die DEHP Metabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure im Plasma von Dialysepatienten nachgewiesen und quantifiziert.

1 Einleitung 1

1.1 Weichmacher 1
1.2 Belastung durch DEHP 2
1.2.1 Belastung der Allgemeinbevölkerung: 2
1.2.2 Belastung durch Medizinprodukte 3
1.3 Metabolisierung 4
1.4 Toxizität 6
1.5 Analytik 8
1.6 Ziel dieser Arbeit 9

2 Material und Methoden 10

2.1 Reagenzien und Geräte 10
2.1.1 Reagenzien 10
2.1.2 Geräte 11
2.2 Probenaufarbeitung 11
2.2.1 Entwicklung der Probenaufarbeitung 11
2.2.2 Endgültige Probenaufarbeitung 12
2.3 Festphasenextraktion mittels C18 Säulen 13
2.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) 13
2.4.1 GC-MS-System 13
2.4.2 GC-MS Methode 13
2.4.3 GC-MS Messung 14
2.4.4 Gaschromatograph 15
2.4.5 Massenspektrometer 15
2.5 Untersuchungsmaterial 16
2.6 Eichkurven 16
2.7 Unpräzision 16

3 Ergebnisse 17

3.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung 17
3.1.1 Optimierte Aufarbeitung 18
3.2 Massenspektren und Ionenchromatogramme. 19
3.3 Eichkurven 22
3.4 Bestimmung der Unpräzision 25
3.5 Klinische Studie 25

4 Diskussion 27

4.1 Bestimmung der Exposition 28

4.2 Bestimmung von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure 30
4.3 Schlussfolgerung..... 31

5 Zusammenfassung 33

6 Literatur 34

7 Abkürzungen 43

8 Danksagung 44

9 Lebenslauf 45

1 EINLEITUNG

1.1 Weichmacher

Phthalate werden als Weichmacher bei der Herstellung des Kunststoffes Polyvinylchlorid (PVC) eingesetzt. Sie besitzen die Eigenschaft, den Kunststoff flexibler und gleichzeitig strapazierfähiger zu machen. Aus diesem Grund begegnen uns Phthalate überall im Alltag, wie z.B. in der Kleidung, als Verpackungsmaterial, als Kinderspielzeug, in der Elektrobranche oder als Bodenbelag. Aber vor allem in der Medizin werden die Eigenschaften von Weichmachern genutzt. Allein in Deutschland werden jährlich rund 30000 Tonnen PVC (grösstenteils Weich-PVC) im Medizinsektor verbraucht [1;2].

Die Eigenschaften von Di(2-ethylhexyl) Phthalat (DEHP) -haltigem PVC, wie z.B. die Flexibilität bei gleichzeitiger Stabilität, Temperaturbeständigkeit bei hohen und tiefen Temperaturen, Biokompatibilität und Lagerungsfähigkeit erfüllen die hohen Anforderungen im medizinischen Bereich und ermöglichen somit ein breites Einsatzspektrum zum größten Teil in Form von Beuteln und Schlauchsystemen für die verschiedensten Anwendungen wie z.B. für Infusionen, Dialyseverfahren, Bluttransfusionen, maschinelle Beatmung sowie enterale und parenterale Ernährung.

Der Grund für den weitreichenden Einsatz dieser Stoffe im medizinischen Bereich liegt darin, dass sie eine der Hauptanforderungen und zwar die Sterilisierbarkeit der verwendeten Materialien ausreichend erfüllen. PVC-Produkte sind mit allen gängigen Methoden wie Dampf-, Ethylenoxid- oder Strahlensterilisierung behandelbar. Weitere Vorteile sind ihre Transparenz, welches Füllhöhe und Inhalt überprüfen lässt. Des Weiteren ermöglicht ihr gutes Rückstellvermögen invasive Eingriffe und das Abriebverhalten ihren Einsatz in Rollerpumpen. Von großem Vorteil ist ihre Kälteelastizität, wodurch

sie nach dem Auftauen weich und flexibel bleiben. Daher kommen sie vor allem bei Transfusionen von gefrorenem Frischplasma zum Einsatz.

Unter den 300 verschiedenen Weichmachern macht die Gruppe der Phthalate 90% des Marktanteils der gesamten Weichmacherproduktion in Westeuropa aus. 1998 stellt Di(2ethylhexyl)Phthalat (DEHP) allein 50% der Gesamtproduktion dar. Vor allem in Medizinprodukten kommt überwiegend DEHP zum Einsatz, da es die meisten technischen und medizinischen Anforderungen gut erfüllt, vielseitig einsetzbar ist und gleichzeitig kostengünstig produziert werden kann.

1.2 Belastung durch DEHP

1.2.1 Belastung der Allgemeinbevölkerung:

DEHP ist nicht nur in der Umwelt sowie auch in alltäglichen Produkten zu finden, eine Belastung der gesamten Bevölkerung ist allgegenwärtig. Die Aufnahme von DEHP über die Atemluft oder das Trinkwasser wird aber im Allgemeinen als gering eingestuft [3]. Die größte Einnahmequelle von DEHP liegt in Nahrungsmitteln [4;3].

DEHP und das analoge Adipat DEHA (Di(2-ethylhexyl) Adipat wurde in vielen Lebensmitteln und Lebensmittelprodukten wie Fisch, Fleisch, Milch, Ölen und Babynahrung nachgewiesen [5;6]. Grund hierfür ist die Kontamination der Nahrungsmittel durch den Austritt von Weichmachern aus Verpackungsfolien der Lebensmittel. In manchen Lebensmitteln wurden Werte zwischen 0,11 und 0,18 mg DEHP/kg Lebensmittel gemessen [7] und bei sehr fetthaltigen Lebensmitteln erhielt man sogar Werte zwischen 31 und 150 mg/kg Lebensmittel [8].

Die durchschnittliche Gesamtbelastung der Allgemeinbevölkerung durch DEHP durch Nahrungsmittel und eingeatmete Luft wird auf 5 - 30 µg DEHP/kg Körpergewicht/Tag geschätzt [8].

Bei Kleinkindern kommt eine zusätzliche Belastung durch Kauen und Saugen an DEHP-haltigem Spielzeug hinzu. Da DEHP von der amerikanischen Umweltschutzbehörde (United States Environmental Protection Agency, EPA) in die Kategorie „B2, wahrscheinlich cancerogen für Menschen“ eingestuft wurde, senkten 1986 die Spielzeughersteller in den USA den DEHP Anteil auf unter 3%, während in anderen Ländern noch bis zu 34% Trockengewicht DEHP Anteile eingesetzt wurden [9;10]. 1999 entschied die Komission der Europäischen Gemeinschaften die Herstellung und den Vertrieb von Weich-PVC enthaltendem Kinderspielzeug, zu untersagen [11].

1.2.2 Belastung durch Medizinprodukte

Für Patienten, die in dauerndem Kontakt mit DEHP-haltigem PVC stehen, bedeutet der Umgang eine zusätzliche Belastung. Diese ist abhängig von der mechanischen Inanspruchnahme (Dehnen, Quetschen, Biegen, Schütteln) der Materialien, der Kontaktzeit und Lipophilie der Lösungen [12]. Das Herauslösen von DEHP aus den Materialien wird verstärkt durch hohe Temperaturen, starke mechanische Beanspruchung und lipidhaltige Emulsionen [13] oder Blut.

Besonders gefährdet sind Dialysepatienten und intensivpflichtige Früh- und Neugeborene. Da Dialysepatienten aufgrund ihrer Erkrankung ständig Kontakt mit medizinischen Schlauchsystemen haben und die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen über die Niere entfällt, ist somit ihre DEHP-Belastung höher. Intensivpflichtige Früh- und Neugeborene erfahren bei gleicher absoluter Belastung aufgrund ihres geringen Körpergewichtes eine höhere Belastung pro kg/Körpergewicht. Auch das Stillen führt zu einer zusätzlichen Belastung bei Neugeborenen, da die fetthaltige Milch hohe

Konzentration an DEHP enthält. Die Aufnahme für Säuglinge liegt bei 0,021 mg/kg/Tag [14].

1.3 Metabolisierung

Sämtliche Aufnahmemöglichkeiten von DEHP wurden in einer Vielzahl von Studien bei Primaten [15] und Säugetieren [16] untersucht. Für den Menschen allerdings gibt es bisher nur eine Studie über die orale Aufnahme von DEHP von zwei Kontrollpersonen [17]. Hinweise für die indirekte

Aufnahme über die Haut [18], die Atemwege [19] und nach medizinischen Eingriffen [20;21] zeigten, dass auch der menschliche Organismus über die bereits beschriebenen Wege DEHP aufnehmen kann.

Ein altersabhängiger Metabolismus von DEHP konnte durch verschiedene Studien bei Tier [22] und Mensch [20;23;24] nachgewiesen werden. Dabei beobachtete man einen erhöhten Plasmaspiegel an MEHP (Mono(2-ethylhexyl)Phthalat) bei Frühgeborenen nach Bluttransfusion im Gegensatz zu reifen Neugeborenen [3].

Die Resorption des DEHP erfolgt nach Hydrolyse durch Lipasen in MEHP und 2-Ethylhexanol im Intestinum. Im Gegensatz zu den Nagetieren besteht beim Menschen die Möglichkeit einer vollständigen Hydrolyse von DEHP zu Phthalsäure und 2-Ethylhexanol, da im menschlichen Plasma nach DEHP Belastung Phthalsäure nachgewiesen werden konnte [25].

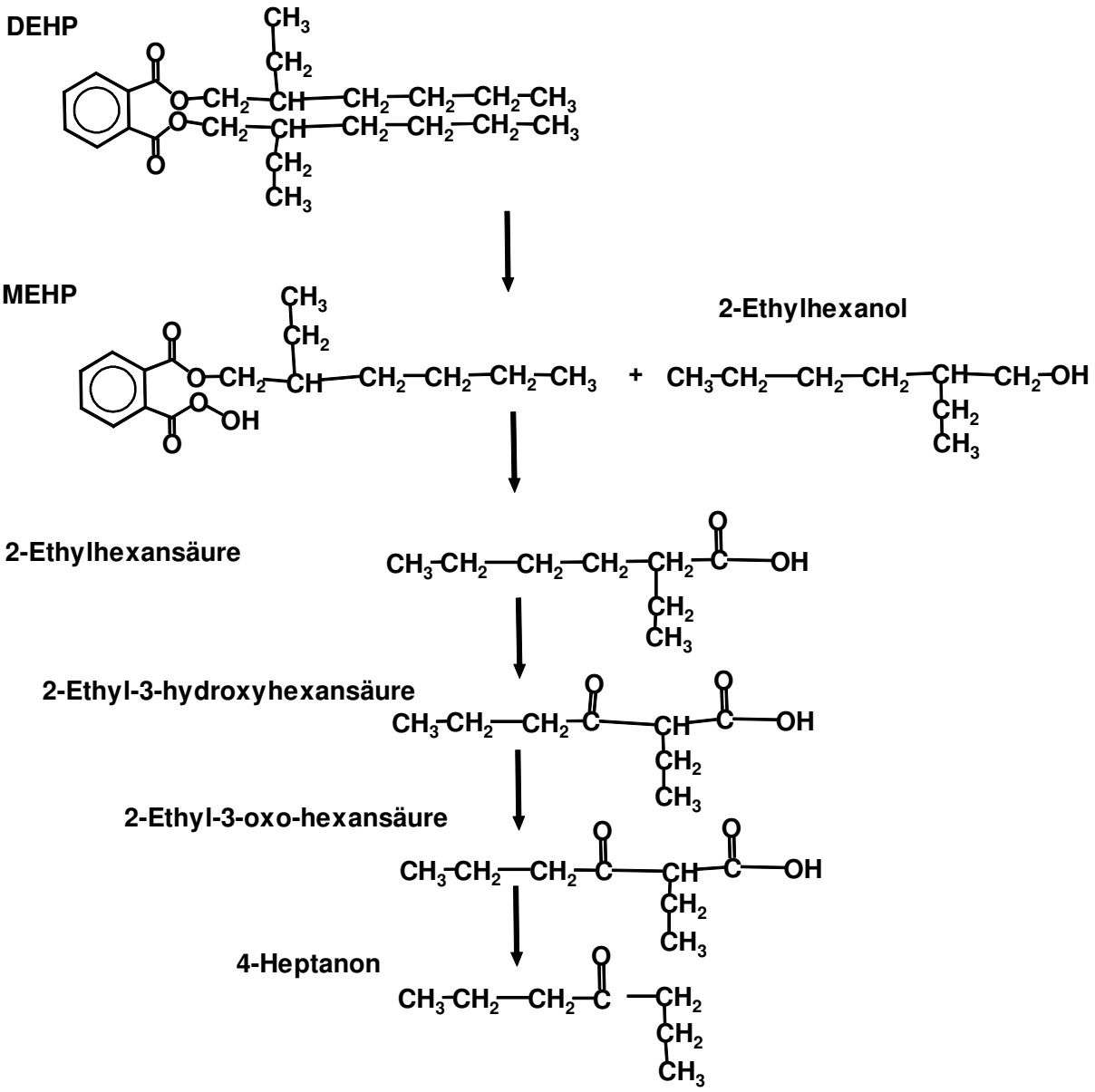
Im Gegensatz zum Metabolismus von MEHP gibt es über den Metabolismus von 2-Ethylhexanol nur wenige veröffentlichte Arbeiten [26].

Bereits 1975 konnten Albro et al. [26] zeigen, dass eine weitere Metabolisierung von 2-Ethylhexansäure bei Ratten über ω- und ω-1-Oxidation erfolgt und 2- Ethyl-1,6-hexandicarbonsäure hier der Hauptmetabolit ist. Zum

ersten Mal wurden in dieser Arbeit 4- und 2-Heptanon als Zwischenprodukte der DEHP Metabolisierung beschrieben.

Im menschlichen Organismus unterliegt DEHP einer starken Metabolisierung, daher darf man die DEHP Metabolite bei der Gesamtbewertung nicht außer acht lassen. Aufgrund der Hydrolyse enstehen aus DEHP die Metabolite MEHP und 2-Ethylhexanol, welche wiederum einer weiteren Metabolisierung unterliegen. MEHP oxidiert dabei zu Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) Phthalat und Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) Phthalat [27;28]. Der Hauptmetabolit der Oxidation von 2-Ethylhexanol dagegen ist 4-Heptanon [29]. Diese fast vollständige Metabolisierung wird auch durch die Arbeit von Pollack et al. [25] bestätigt, bei der das Verhältnis von DEHP, MEHP und Phthalat im Blut von Hämodialysepatienten bestimmt wurde. Das Verhältnis von MEHP zu DEHP schwankte dabei zwischen 0,3 und 6,1 und das Verhältnis von Phthalat zu DEHP zwischen 0,5 und 31,6.

Zur Bestimmung der DEHP Exposition ist vor allem die Herkunftsmöglichkeit der Oxidationsprodukte zu berücksichtigen. Das Metabolit Ethylhexanol kann sowohl vom Abbau des DEHP stammen, als auch von di(2-ethylhexyl) Adipat (DEHA). DEHA wird überwiegend in Folien im Lebensmittelbereich eingesetzt [30].



1.4 Toxizität

Der Nachweis von DEHP und anderen Phthalaten in Geweben und Organen von Mensch [31;32] und Tier [15;33] führte dazu, dass in den letzten 30 Jahren versucht wurde, die Toxizität und das gesundheitliche Risiko durch DEHP Belastung einzuschätzen [34;35].

Im Organismus wird DEHP vorwiegend in der Leber angesammelt und abgebaut. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass DEHP oder seine

Metabolite zu Leberveränderungen führen können [36;37]. DEHP-Gabe führte zu einer reversiblen Lebervergrösserung [38]. Weitere Veränderungen waren die Verminderung der Leberfunktion, Nekrosenbildung und histologische Veränderungen [39]. DEHP führt zu einer verstärkten Bildung von Peroxisomen in der Leber [8].

1982 wurde in der U.S. National Toxicology (NTP) eine Studie publiziert, in der gezeigt wurde, dass DEHP zu einer höheren Inzidenz von hepatozellulären Carcinomen bei Mäusen und Ratten führte [81].

Auf die Hoden hat DEHP eine toxische Wirkung, in dem es zu Verkleinerung, Abnahme von Zahl und Qualität der Spermien, testiculärer und epididymaler Atrophie, Abnahme des Zinkgehaltes sowie Tumoren führen kann. Besonders während der fetalen und neonatalen Periode reagieren die Reproduktionsorgane besonders empfindlich gegen geringe Konzentrationen an DEHP [40;41]. Bei den weiblichen Reproduktionsorganen verlängerte DEHP die Zyklusdauer, unterdrückte oder verzögerte die Ovulation, verkleinerte die präovulatorischen Follikel, unterdrückte oder verminderte die Estradiolproduktion, reduzierte das Gewicht von Ovarien und Uterus sowie die Fertilität [42;43-55]. In Tierversuchen wurde dabei eine DEHP-Dosis zwischen 1 und 3 g/kg Nahrungsmittel appliziert.

DEHP und seine Metabolite können die Plazentaschranke passieren und können somit fetotoxisch und teratogen wirken [56;57-60]. Dies kann zur Abnahme der Implantation, Spontanaborten, histologischen Veränderungen an Leber, Niere und Hoden, Gewichtsabnahme von Niere und Hoden, Malformation von Skelett, Herz und Niere, Hydrocephalus und zum Absterben des Foeten führen [61;57;62]. Ausschlaggebend für die toxische Wirkung von DEHP sind die Metabolite MEHP, 2-Ethylhexanol und 2-Ethylhexansäure [63;58], die im Körper der Mutter entstehen und die Plazenta passieren können.

In einem weiteren Tierversuch zeigten Ratten nach oraler Gabe von 2,15 mg DEHP/kg Körpergewicht dreimal pro Woche über einen Zeitraum von einem

Jahr eine deutliche Verschlechterung Nierenfunktion mit erhöhten Kreatininwerten und ein vermehrtes Auftreten von Zysten [64]. Diese Dosis liegt jedoch unterhalb der Dosis, der z.B. Hämodialysepatienten ausgesetzt sein können.

Nach dem Bericht von Roth et al. [65] beobachtete man ungewöhnliche Lungenveränderungen bei drei Frühgeborenen. Diese wurden künstlich mit PVC - Schläuchen beatmet. Als eines dieser Frühgeborenen verstarb, konnte in der Lunge DEHP nachgewiesen werden. Nach Austausch der PVC - Schläuche gegen Ethylen/Vinylacetat – Schläuche zeigte sich bei den anderen eine Verbesserung.

1.5 Analytik

Seit vielen Jahren ist die Gaschromatographie – Massenspektrometrie eine Domäne in der Analytik organischer Säuren, Hydroxy- und Oxosäuren [66]. Die Analyse kann entweder mit Serum bzw. Plasma [67] oder mit Urin [66] nach Enteiweißung mit Isopropanol, Ethanol, Trichloressigsäure oder Perchlorsäure durchgeführt werden.

In der Probenvorbereitung wird neben der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Diethylether, Ethylacetat und Ethylacetat/Diethylether [68] auch die flüssig/flüssig Verteilungschromatographie mit Kieselgel oder Chromosorb P [69] gefüllten Säulen für sehr polare Metabolite durchgeführt. Auch die Festphasenextraktion mit den verschiedensten Phasen hat sich etabliert [66;70]. Als interne Standards und zur Quantifizierung wurden Substanzen wie Troponsäure [68], trans-Zimtsäure [71], Hexadecandicarbonsäure [69], oder 2-Oxocapronsäure [67], eingesetzt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der PVC – Weichmachermetabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure im Plasma mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie zu entwickeln und zu validieren.

Des Weiteren soll anhand dieser Methode eine klinische Studie zum Vorkommen von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure bei Hämodialysepatienten und Kontrollpersonen entwickelt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien und Geräte

2.1.1 Reagenzien

- Firma Sigma-Aldrich, Steinheim:
  N-methyl-N-(tert.-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MBDSTFA)
  Pyridin, wasserfrei, 99,8%ig
  Zimtsäure
  2-Ethylhexansäure

- Firma Sigma-Aldrich, Steinheim:
  4-Dimethylaminopyridin (DMAP)

- Firma Merck, Darmstadt:
  Methanol
  Ethylacetat
  Ether
  Isooctan
  Perchlorsäure

- Firma ICT Handels GmbH, Frankfurt
  C18 Festphasenextraktionssäulen
  Bond Elut LRC 500mg

2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen (Prof. Dr. M. E. Maier) von Frau D. Stübe synthetisiert [29].

2.1.2 Geräte

Reagenzgläser, spitze Zentrifugengläser, Pyrex®-Kulturröhrchen mit teflonbeschichtetem Deckel: Firma VETTER, Ammerbuch

- Zentrifuge Rotanta/ RPC: Firma Hettich, Kehlheim
- Vortex Reax 2000 Seriennummer: 59237712: Firma Heidolph, Kehlheim
- Ultraschallgerät Sonrex RK100 Typ 43084: Firma BANDELIN, Berlin
- Heizblock Reakti- Therm Module Typ 18940: Firma PIERCE, Rockford, USA
- Rotationsvakuumkonzentrator: Firma Christ, Osterode
  Kühlfalle: ALPHA 2-4, Typ 100 402
  Vakuumzentrifuge: ALPHA RVC, Typ 100 000
- Mikroliter-Zentrifugenröhrchen PP- Mikrocentrifuge tubes Charge: 00470108: Firma Greiner Labortechnik
- Tischzentrifuge Mikroliter Typ 2020: Firma Hettich, Tuttlingen
- GC-Injektionsflasche mit Einsatz und Deckel 1ml-Injektionsflasche, 0,25ml- Glasmikroeinsatz, Bördelkappen: Firma Ziemer, Mannheim

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Entwicklung der Probenaufarbeitung

Um eine optimale Bestimmung der 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure zu erreichen, wurden verschiedene Methoden erprobt und bis zur endgültigen Aufarbeitung immer wieder verfeinert.

Die Proben wurden zuerst (1ml Serum) mit 2ml Perchlorsäure (1:10 mit Wasser verdünnt) enteiweißt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde auf C18 Festphasenextraktionssäulen pipettiert. Die Säulen wurden zuvor mit 3x1ml Methanol und 3x1ml H_2O konditioniert. Die Elution der Säulen erfolgte

mit 2x1ml Diethylether/Ethylacetat (1:1 Mischungsverhältnis). Das Eluat wurde mit ca. 650 µl NaOH auf einen pH-Wert von 7-9 eingestellt und anschließend lyophilisiert. Dabei herrscht ein Temperaturgefälle zwischen Vakuumzentrifuge (+60°C) und Kühlfalle (-80°C) von 140°C unter einem Druck von 15 mbar im Rotationsvakuumkonzentrator.

Als nächster Schritt folgte die Umsetzung mit 100µl (N-methyl-N-(tert.-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide) MBDSTFA / Isooctan (1:1) zu dem entsprechenden (tert.-Butyldimethylsilyl) tBDMS-Derivat. Dazu wurden Proben mit einem Stickstoffstrom abgeblasen und gleichzeitig 1h bei 60°C im Heizblock erhitzt. Die Proben konnten nach Abkühlen in Eppendorfgefäße umpipettiert, abzentrifugiert und nach Abkühlung in GC vials pipettiert werden.

Um eine möglichst vollständige Umsetzung zu erreichen wurden mehrere Testversuche mit unterschiedlichen Derivatisierung-Zeiten und –Temperaturen durchgeführt, z.B. 1h bei 80°C, 2h bei 60°C.

2.2.2 Endgültige Probenaufarbeitung

500µl Plasma wurden mit 50µl wässriger Zimtsäurelösung (24µl/mg) als interner Standard versetzt und mit 700µl 3%iger Perchlorsäure enteiweißt. Dieses homogene Gemisch wurde zwischendurch immer wieder kräftig geschüttelt und anschließend 10min bei 4000U/min zentrifugiert.

Die C18 Festphasenextraktionssäulen wurden mit 2ml Methanol konditioniert und mit 2x2ml H_2O gespült, der Überstand aus der Zentrifuge in die Säulen überführt und mit 1ml H_2O verdünnt. Nach dem Durchlauf der Proben wurde zweimal mit 3ml H_2O nachgespült. Anschließend wurde mit 2ml eines Ether/Ethylacetatgemisches eluiert. Es bildeten sich zwei Phasen, in der unteren befand sich noch Restwasser. Das Eluat wurde nochmals zentrifugiert und die obere Phase in ein mit 40µl 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, Sigma Chemie, Deisenhofen) versehenes Pyrexglas überführt. Danach wurden die Proben unter einem Stickstoffstrom vorsichtig abgeblasen und mit 100µl

MBDSTFA / Acetonitril (2:1) 45 min bei 85°C erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Proben in GC vials pipettiert und zur Analyse im GC-MS bereitgestellt.

2.3 Festphasenextraktion mittels C18 Säulen

Die Messung der Substanzen in der GC-MS könnte durch andere Stoffe beeinflusst werden. Die Festphasenextraktion dient der Absonderung und Reinigung der Substanzen. Somit kann man das Risiko vermindern, dass die Ergebnisse durch andere Substanzen verfälscht werden. Zur Auswaschung und Isolierung der Moleküle dienen die entsprechenden Lösungsmittel.

2.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

2.4.1 GC-MS-System

Gaschromatograph HP 5890 Series II
Automatischer Probengeber mit Steuereinheit HP 7673 A
Mass Selective Detector HP 5971 Series
Zentrale Steuereinheit „ChemStation“ HP 9000/300 mit Diskettenlaufwerk

2.4.2 GC-MS Methode

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) stellt eine der wichtigsten Techniken dar, mit deren Hilfe organische Säuren sowohl im Urin als auch im Serum nachgewiesen werden können. Bei der Fragmentation des Ions entsteht ein Massenspektrum. Mittels GC-MS können Metabolite sicher identifiziert werden, welches Ziel dieser Arbeit ist.

2.4.3 GC-MS Messung

Stoffgemische, die sich verdampfen lassen, können durch die Gaschromatographie getrennt werden. Dabei dient ein Gas als mobile Phase und eine Lösung als stationäre Phase. Die wichtigsten Bestandteile eines Gaschromatographen sind der Probeninjektor, die Säule und der Detektor.
Innerhalb des Massenspektrometers befindet sich eine Vakuum-Kammer, in die eine kleine Menge der zu untersuchenden Verbindungen mit Hilfe des Trägergases (Helium) gelangt und über die Trennsäule des GC-Ofens geführt wird. Die Probe verteilt sich in der Säule zwischen der stationären Phase und der mobilen Phase, dem Trägergas. Der Detektor befindet sich am Säulenende und registriert die getrennten Substanzen. Zur Auswertung werden die Daten an einen Rechner weitergeleitet. Aufgrund dieser Daten kann der Rechner mittels eines Schreibers ein Chromatogramm erstellen.

Bei der Massenspektrometrie werden die Moleküle mit energiereichen Elektronen (70eV) beschossen, die die Abgabe eines Elektrons aus dem ungeladenen Molekül bewirken (Elektronenstoss-Ionisierung). Durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons bekommen die Moleküle eine elektrische Ladung. Durch die Ionisation entstehen Molekül- bzw. Fragmentionen. In der Ionenquelle werden diese zu hohen Geschwindigkeiten beschleunigt und zu einem dünnen Ionenstrahl gebündelt. Im elektromagnetischen Feld kommt es zur Trennung der Molekül- und Fragmentionen entsprechend ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses (m/z). Dabei steht „m“ für die Masse und „z“ für die Ladung. Die Häufigkeit, mit der ein Ion mit bestimmter Massenzahl auftritt, drückt sich in der Intensität des Signals aus. Man setzt das stärkste Signal (Peak) gleich 100% und bezieht alle Peaks darauf. Dies führt zur relativen Höhe der Peaks [72]. Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Methode erfolgte die GC-MS-Messung im „Single-Ion-Monitoring“ Modus (sim). Bei dieser Betriebsart werden statt des gesamten Massenbereichs (scan) nur einzelne selektive Ionen erfasst. Durch die längere Messzeit für jedes einzelne Ion wird dessen Nachweisempfindlichkeit um ein Vielfaches gesteigert [73].

2.4.4 Gaschromatograph

Säule:	Rtx200(60m x 0,25 mm x 0,25µm)
	Firma Restek, Sulzbach, Deutschland
Säulenvordruck:	84 kPa, Helium
Injektion:	280°C
Temperaturprogramm:	
Ausgangstemperatur:	100°C
Heizrate:	5°C/min bis 280°C für 15 Minuten
Ausheizen:	60°C/min bis 310°C für 10 Minuten

2.4.5 Massenspektrometer

Identifizierung (scan-Modus) und Quantifizierung (SIM-Modus) der folgenden Ionen (m/z)

2-Ethylhexansäure:	m/z 201 (Quantifizierung
	m/z 129 (Identifizierung)
2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure:	m/z 217 (Quantifizierung) (mono-tBDMS Derivat)
	m/z 199 (Identifizierung)
	m/z 187 (Quantifizierung) (di-tBDMS Derivat)
	m/z 331 (Identifizierung)
Zimtsäure:	m/z 205 (Quantifizierung), m/z131 (Identifizierung)

Elektronenstossionisation:	70 eV
Transferlinetemperatur:	310°C

2.5 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung dienten Plasmaproben von 124 gesunden Kontrollpersonen und 104 Hämodialysepatienten nach Validierung der Methode. Im Falle der Hämodialysepatienten handelte es sich um monatliche Blutbild-Kontrolluntersuchungen, die Kontrollproben stammten von routinemäßigen Blutbild-Kontrolluntersuchungen. Alle Proben wurden anonymisiert und konnten nicht rückverfolgt werden. Diese Untersuchungen dienten der Optimierung der Methode. Für die Patienten bedeutete es keine zusätzliche Blutentnahme.

2.6 Eichkurven

Es wurde eine Eichkurve aus 5 Proben hergestellt. Diese enthielten die Reinsubstanzen 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure und den internen Standard Zimtsäure. Die Konzentration der Reinsubstanzen war von Probe 1 bis 5 kontinuierlich ansteigend und wurden wie bereits in 2.2.2 geschildert, aufbereitet.

Zur genaueren Quantifizierung durchliefen zuerst die Proben für die Eichkurve die GC-MS-Messung, anschliessend die Versuchsproben.

2.7 Unpräzision

Die Unpräzision in der Serie wurde mit zehnmaliger Auswertung von Plasmaproben in verschiedenen Konzentrationen und Aufbereitungen, wie in 2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Aus den gemessenen Konzentrationen wurden die Standardabweichungen und der Variationskoeffizient ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung

Hauptziel dieser Arbeit war es, eine GC-MS Methode zu entwickeln und damit 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure im Serum nachzuweisen. Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden die Proben mit Perchlorsäure enteiweißt und mit Hilfe von C18 Festphasenextraktionssäulen einer erneuten Vor - Trennung unterzogen. Zur Elution diente ein Gemisch aus Diethylether und Ethylacetat. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert, was sich allerdings als sehr zeitintensiv erwies und auch nicht zu den gewünschten Ergebnissen führte. Zur Derivatisierung wurde MBDSTFA in einer 1:1 Mischung mit Isooctan eingesetzt. Verschiedene Zeit- und Temperaturabläufe wurden zur Optimierung erprobt.

Bei der endgültigen Probenaufarbeitung konnte auf die Lyophilisierung verzichtet werden. Die Proben wurden nach Enteiweißung mit Perchlorsäure 10 Minuten zentrifugiert. Die Festphasenextraktionsäulen wurden mit Methanol und Wasser konditioniert. Danach wurden die Proben aus der Zentrifuge auf die C18 Säulen überführt. Die Elution erfolgte mit Ether/Ethylacetat (1:1). Die Zusammensetzung von MBDSTFA/Acetonitril (2:1) diente zur Derivatisierung der Proben 45 Minuten bei 85°C.

3.1.1 Optimierte Aufarbeitung

Die Versuche ergaben, dass mit folgendem Versuchsprotokoll die Prozessierung der Proben optimiert werden konnte.

Dazu waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

1.	500 µl Serum + 50 µl interner Standard Zimtsäure
2.	Enteiweißung mit 700 µl Perchlorsäure, 5 Minuten stehen lassen
3.	10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugieren
4.	C18 Säule mit 2 x 2 ml MeOH konditionieren
5.	Mit 2 x 2 ml H_2O spülen
6.	Proben mit 1 ml H_2O verdünnt langsam über Säule laufen lassen
7.	Mit 2 x 3 ml H_2O nachspülen
8.	Elution mit 2 ml Ether/Ethylacetat (1:1)
9.	Obere Phase in Pyrex – Gläser mit 40µl DMAP abpipettieren
10.	Unter Stickstoffzufuhr langsam abblasen
11.	Umsetzung 45 Minuten bei 85°C mit 100 µl MBDSTFA/Acetonitril (2:1)
12.	In GC vials pipettieren

3.2 Massenspektren und Ionenchromatogramme.

Die (tert.-Butyldimethylsilyl) t-BDMS-Derivate organischer Säuren weisen im Massenspektrum ein charakteristisches [M-57] Ion auf, welches aus der Abspaltung der C(CH3)-Gruppe des tBDMS-Esters entsteht. Das ihn begleitende [M-15] Ion stammt aus der Abspaltung der Methyl-Gruppe und besitzt eine deutlich geringere Intensität.
Zur Analyse von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure wurde Zimtsäure als interner Standard eingesetzt.

Die Aufarbeitung der Proben wurde so optimiert, dass bei der Umsetzung von 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure mit MBDSTFA/Pyridin überwiegend das di-tBDMS Derivat der Hydroxysäure entstand. Das mono-tBDMS Derivat konnte in keiner der untersuchten Plasmaproben nachgewiesen werden.

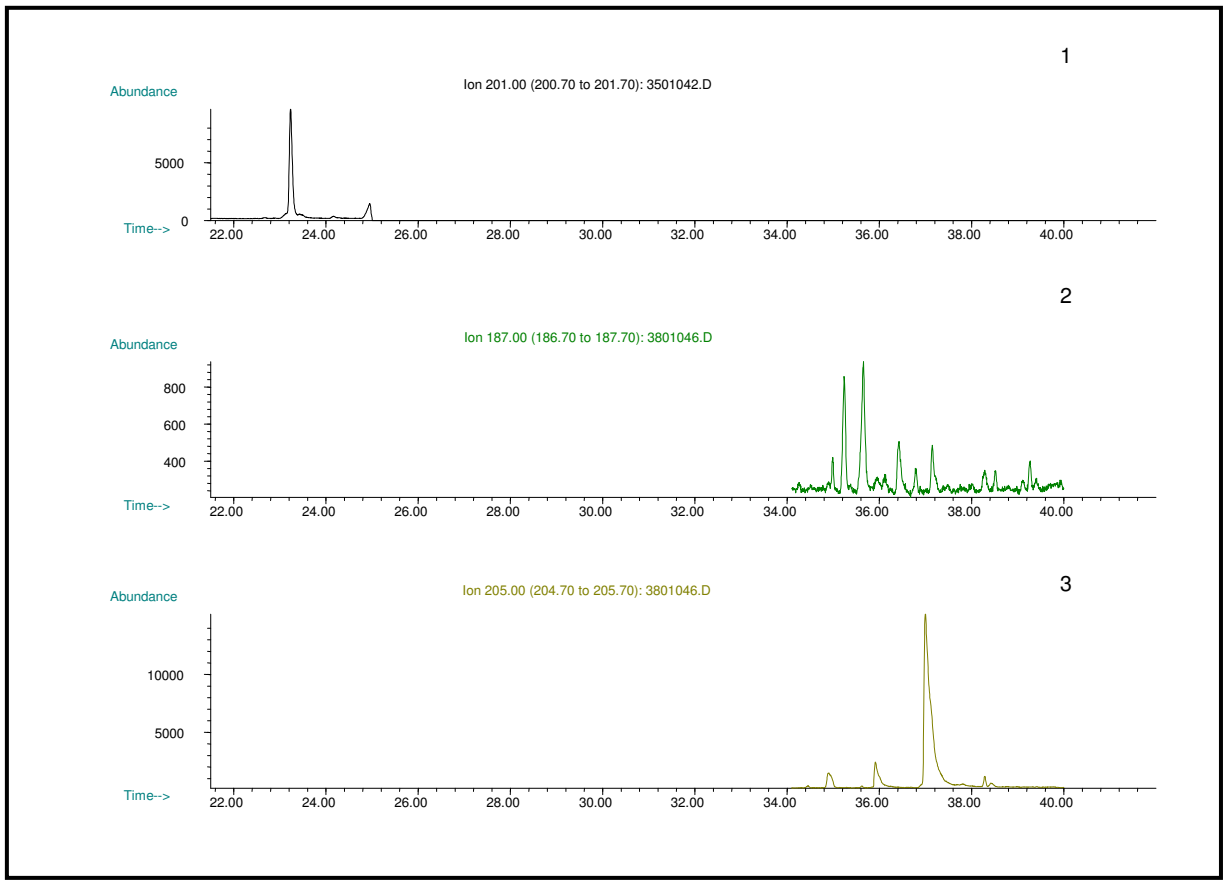


Abbildung 1:

Die Quantifizierung für 2-Ethylhexansäure erfolgte mit den Ionen m/z 201 (oben), für 2-Ethyl-3-hydrohexansäure m/z 187 (Mitte) und für den internen Standard Zimtsäure m/z 205 (unten). Zur Identifizierung wurden die Ionen m/z 129, m/z 331 bzw. m/z 131 benutzt.

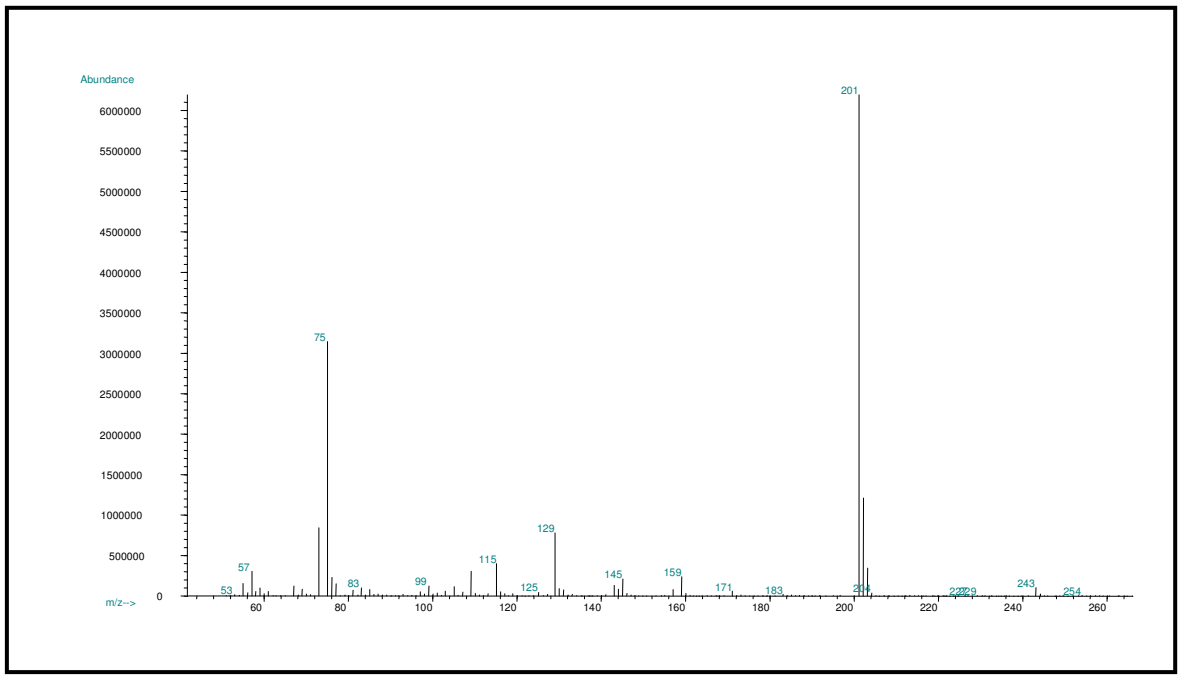


Abbildung 2: 2-Ethylhexansäure

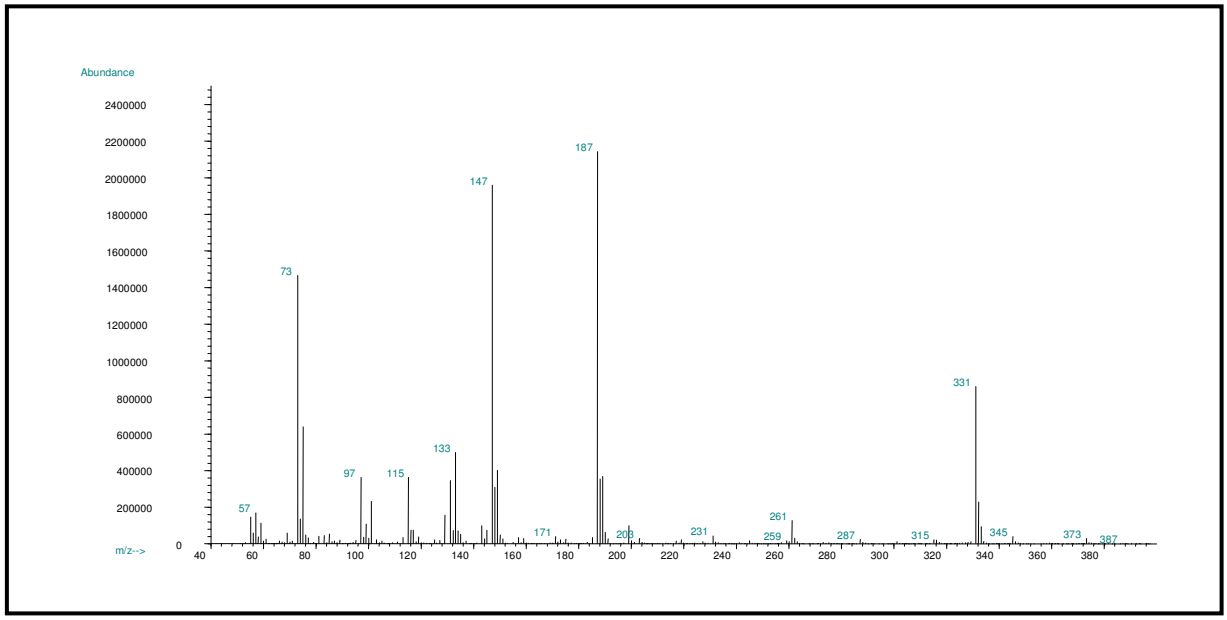


Abbildung 3: 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure

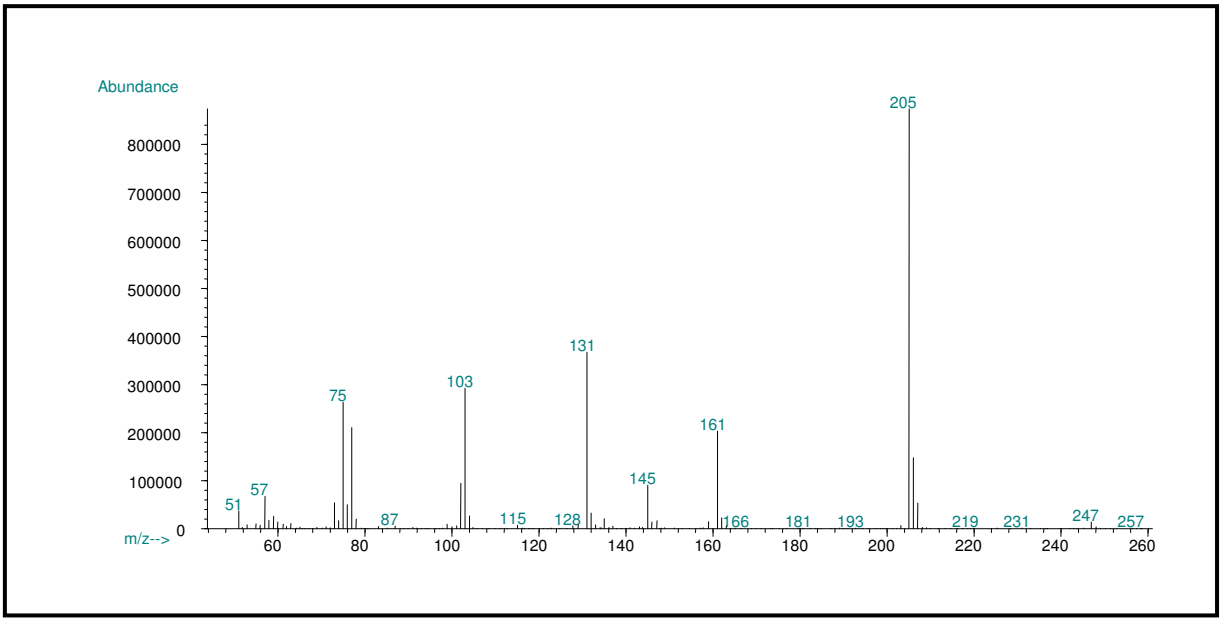


Abbildung 4: Interner Standard Zimtsäure

3.3 Eichkurven

Die vom Gaschromatographen aufgezeichneten Peaks werden durch charakteristische Retentionszeiten identifiziert und der entsprechenden organischen Säure zugeordnet.

Die Eichkurven entstehen durch die Berechnung der Regressionsgeraden. Hierbei wurde der Quotient aus Peakfläche der jeweiligen Substanz und Peakfläche des internen Standards gebildet. Die Regressionsgerade mit der Formel y = mx wird aus den Flächenquotienten der einzelnen Konzentrationen erstellt.

MM: Eichkurven mit Stammlösung so verdünnt, dass Eichlösungen mit folgenden Konzentrationen entstanden:
Eich 1: 258 µg/L
Eich 2: 515 µg/L
Eich 3: 773 µg/L

Eich 4: 1030 µg/L

Ergebnis: r = 0,9982

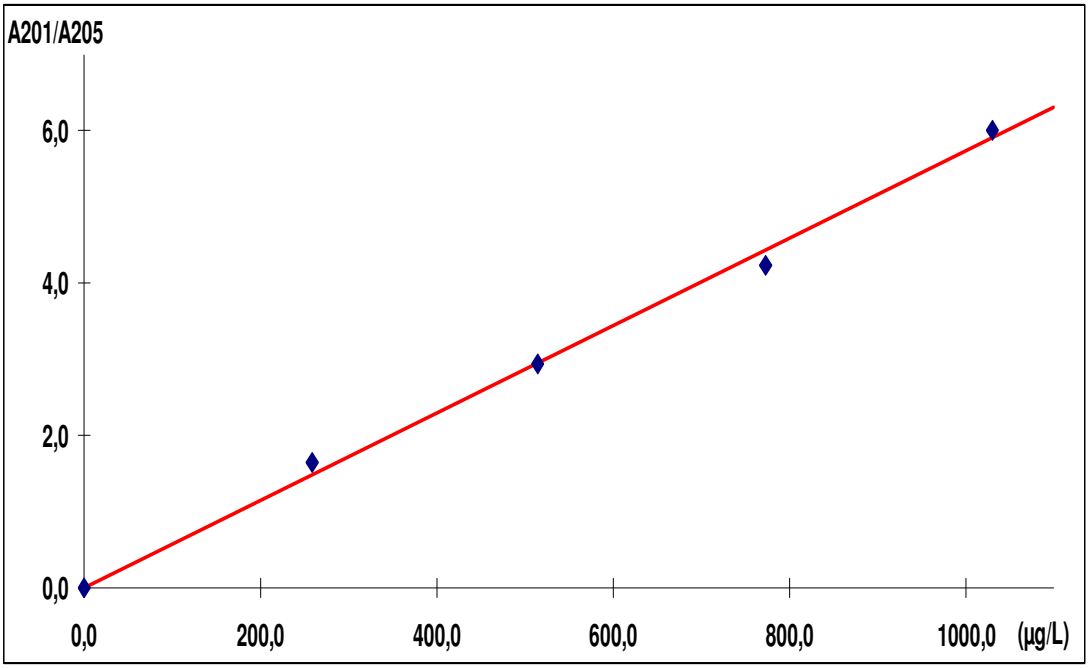


Abbildung 5: Eichkurve 2-Ethylhexansäure

MM: Eichkurven mit Stammlösung so verdünnt, dass Eichlösungen mit folgenden Konzentrationen entstanden:

Eich 1: 242 µg/L

Eich 2: 484 µg/L

Eich 3: 726 µg/L

Eich 4: 968 µg/L

Ergebnis: r = 0,9923

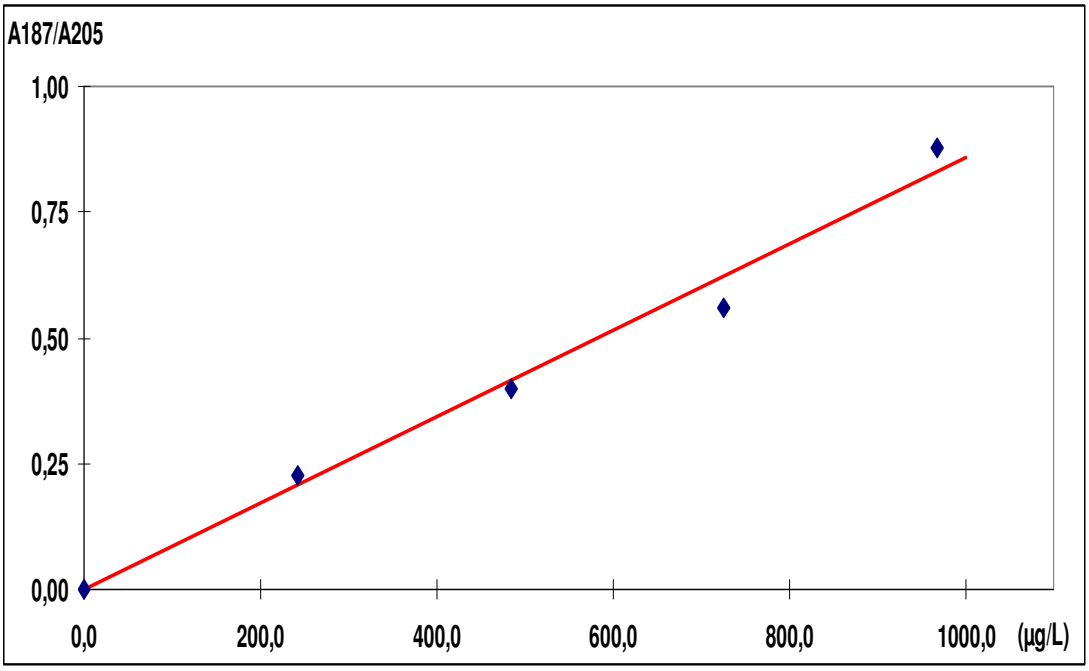


Abbildung 6: Eichkurve 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure

Die Eichkurven für 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure waren im Bereich von 50 µg/l bis 1000 µg/l linear mit Korrelationskoeffizienten r=0,9923 und 0,9982.

3.4 Bestimmung der Unpräzision

Verschiedene Plasmaproben dienten der Präzision der Serie. Dazu wurden die Proben in Zehnfachbestimmung analysiert, um Mittelwert und Standardabweichungen zu erfassen.
Die relative Standardabweichungen lagen für 2-Ethylhexansäure (430µg/) bei 6,6% und für 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure (174µg/l) bei 7,2%.

3.5 Klinische Studie

Plasmaproben von 124 Kontrollpersonen und 104 Hämodialysepatienten wurden nach Optimierung der Methode (s. 2.2.2) untersucht. In allen Proben konnte 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure nachgewiesen werden. Jedoch konnte 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure in den Proben der Kontrollpersonen nicht nachgewiesen werden und 2-Ethylhexansäure war deutlich niedriger im Vergleich zu den Werten der Hämodialysepatienten.

Die 2-Ethylhexansäure war bei Hämodialysepatienten mit 527,7 ± 32,4 µg/l (MW ± SEM) deutlich höher als bei den Kontrollpersonen 357,6 ± 16,7 µg/l (MW ± SEM).

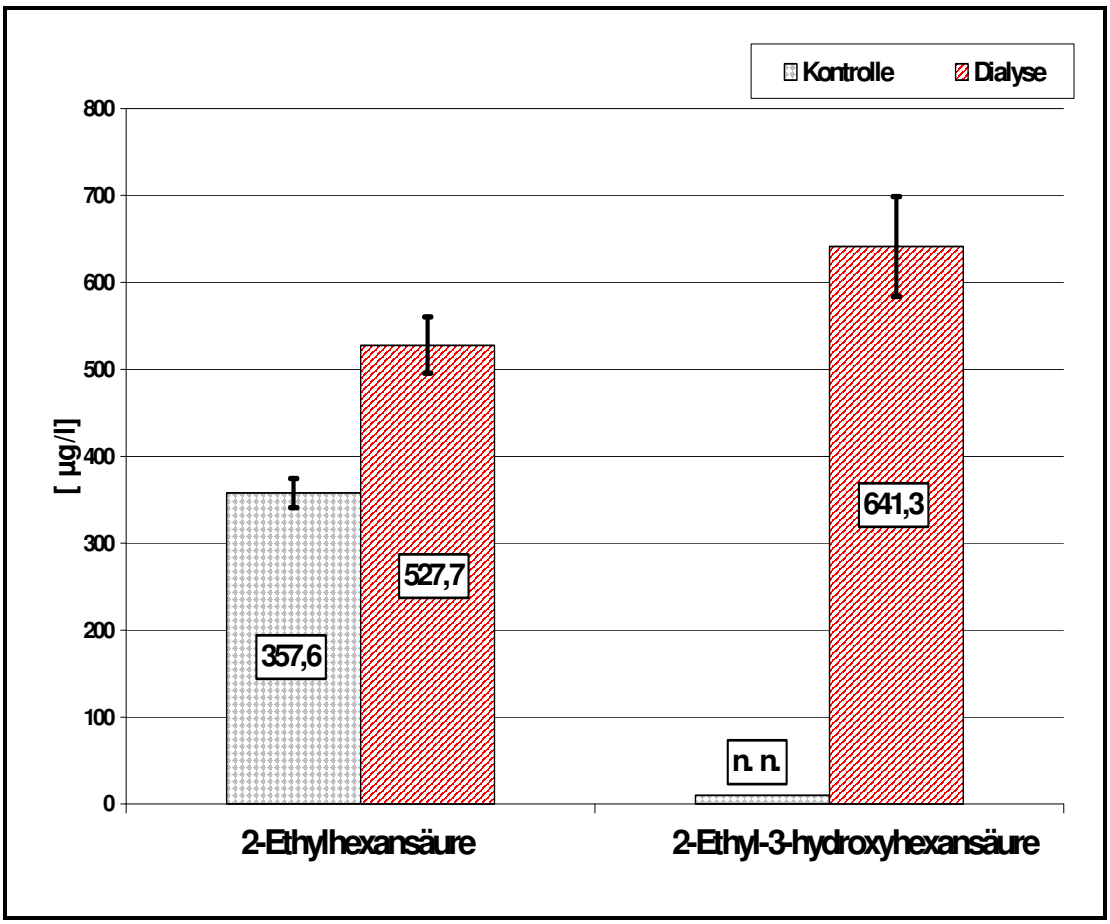


Abbildung 1: Konzentration von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure bei Dialysepatienten und Kontrollpersonen (MW ± SEM) (n.n.= nicht nachweisbar)

4 DISKUSSION

DEHP (Di(2-ethylhexyl) Phthalat) ist sowohl in der Umwelt als auch in Produkten des alltäglichen Bedarfs weit verbreitet, was eine gewisse Exposition der gesamten Bevölkerung bedeutet. In den 70er Jahren führten Berichte, dass DEHP bei Nagetieren zu Lebertumoren führen kann, zu großen Diskussionen. Über den genauen Mechanismus gab es aber noch nicht genügend Untersuchungen. In Tierversuchen konnte man neue Erkenntnisse über den Metabolismus und die toxische Wirkung der Metabolite gewinnen. Dabei konnten Untersuchungen zum Metabolismus von DEHP bei Ratten Mitte der 70er Jahre oxidierte MEHP (Mono(2-ethylhexyl) Phthalat) Metabolite aufweisen. Zudem fand man heraus, dass beim Abbau des Hydrolyseproduktes 2-Ethylhexanol verschiedene ß-, ω- und ω1- Oxidationsprodukte gebildet wurden, die mittels gaschromatographisch – massenspektrometrischer (GC-MS) Methoden nachgewiesen werden konnten [26]. An verschiedenen Organsystemen, wie Leber, Lunge, Niere und Reproduktionsorgane konnten toxische Wirkungen anhand von Tierversuchen, nachgewiesen werden [36], zum Beispiel führte die Gabe von DEHP zur Zunahme der Peroxisomen in der Leber von Ratten und Mäusen [8].

Entsprechende Untersuchungen im Bezug zum Menschen fehlten allerdings. Es ist bekannt, dass DEHP im menschlichen Körper einer starken Metabolisierung unterliegt [74]. DEHP wird durch Lipasen im Darmtrakt zu MEHP und 2-Ethylhexanol oxidiert [13]. Das MEHP wiederum wird durch Cytochrom P450 – abhängige Enzyme weiter oxidiert [75]. Dabei werden die C6- und C2 – Seitenketten durch ω – Oxidation und die C6 –Seitenkette durch ω1 – Oxidation zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen oxidiert. Durch weitere Oxidation werden sie zu Ketonen und Dicarbonsäuren. Bisher sind 26 MEHP Metabolite identifiziert und nach der Nomenklatur von Albro et al. [75] als MEHP Metabolite I bis XXVI klassifiziert. 1973 wurden fünf dieser Metabolite zum ersten Mal im Urin von Ratten identifiziert [76]. Untersuchungen

von Peck et al. [77] lieferten den Nachweis dieser ersten fünf Metabolite (I-V) im Urin des Menschen.
Hinsichtlich der Ausscheidung der Metabolite beim Menschen gibt es unterschiedliche Aussagen. Nach i.v. Gabe von DEHP war bei Albro et al. [75] hauptsächlich der Metabolit IX (36%), das Mono (2-Ethyl-5-hydroxyhexyl) Phthalat, gefolgt von MEHP (18%), Metabolit VI und VII (je 12%), zu finden. Schmid et al. [17] hingegen fanden nach oraler Belastung durch DEHP die Metabolite IX und XII (je 25-40%), gefolgt von VII (20-24%) und MEHP (6-13%). Dirven et al. [78] fanden bei Arbeitern einer PVC-Anlage abweichende Werte. Die Hauptmetabolite waren hier die Metabolite IX und VI (52%), gefolgt von V (22%) und MEHP (26%).

Ein weiterer Schritt in der Metabolisierung erfolgt nach Hydrolyse von DEHP zu MEHP und 2-Ethylhexanol gefolgt von einer weiteren Oxidation von 2-Ethylhexanol. Über die Oxidation des entsprechenden Aldehyds wird das 2-Ethylhexanol zu 2-Ethylhexansäure umgewandelt. Bereits 1975 konnten Albro et al. [26] zeigen, dass eine weitere Metabolisierung von 2-Ethylhexansäure in Ratten über ω – und ω1 – Oxidation erfolgt und 2-Ethyl-1,6-hexandicarbonsäure der Hauptmetabolit ist. Zum ersten Mal wurden in dieser Arbeit anhand von 4- und 2-Heptanon ß – Oxidationsprodukte beschrieben.

Untersuchungen zum Metabolismus von 2-Ethylhexanol und 2-Ethylhexansäure folgten erst in den 90er Jahren [26]. Diese werden z.B. als Konservierungsstoffe in der Holz verarbeitenden Industrie benutzt [79].

4.1 Bestimmung der Exposition

2-Ethylhexansäure dient in der Holzbranche als Konservierungsmittel. Kröger et al. [79] untersuchten an Arbeitern verschiedener Sägewerke die Belastung an 2-Ethylhexansäure durch Messung der Ausscheidung im Urin. Dazu wurde der Urin von 24 Arbeitern im Laufe des Arbeitstages bis zum nächsten Tag gesammelt und ausgewertet. Zum Vergleich wurden Kontrollproben von

Arbeitern des Sägewerkes genommen, die nicht in Kontakt mit dem Metabolit standen. 2-Ethylhexansäure trat in einer Konzentration in Höhe von 81-90% im Urin auf. Bei den Arbeitern, die aufgrund ihrer Arbeit diesem Metabolit ausgesetzt waren, fand man Konzentrationen zwischen 10 und 5400 µg/g Kreatinin im Urin.

1985 berichteten Schmid und Schlatter [17] über die orale Einnahme von 30 mg DEHP durch zwei Versuchspersonen. 11-15 % der aufgenommenen Menge wurden hauptsächlich in Form von Metaboliten im Urin ausgeschieden.

Dirven [78] erforschte die DEHP Belastung von Arbeitern eines PVC verarbeitenden Betriebes. Dabei wurden die Konzentration von vier Metaboliten genauer untersucht: Mono (2-Ethylhexyl) Phthalat (MEHP), Mono (5-carboxy-2-ethylpentyl) Phthalat, Mono (2-ethyl-5-oxohexyl) Phthalat und Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) Phthalat. Neun Arbeiter dieser PVC Bootsfabrik waren Maximalwerten von 1,2mg/m3 DEHP in der Luft ausgesetzt. Die Urinproben wurden im Laufe des Arbeitstages gesammelt und ausgewertet. Alle zeigten erhöhte Metabolitkonzentrationen im Urin. Die gemessenen Konzentration an Metaboliten im Urin (in nmol/mmol) lagen zu Beginn des Arbeitstages für MEHP bei 35,6, für den Metabolit VI bei 10,5, für Metabolit IX bei 30,2 und den Metabolit V bei 24,4. Am Ende des Arbeitstages betrugen die gemessenen Werte für MEHP 49,5, für den Metabolit VI 24,9, den Metabolit IX 57,9 und den Metabolit V 29,3.

Neugeborene auf der Intensivstation, die Austauschtransfusionen bekamen, hatten nach Berichten von Plonait et al. [24] Urinkonzentrationen von 2-Ethylhexansäure zwischen 127 und 416 µl/l. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von 28 Kontrollpersonen untersucht. Ihre 2-Ethylhexanwerte lagen bei 56 ± 14 µg/l bzw. 68 ± 38 µg/g Kreatinin. Somit war deutlich zu sehen, dass ihre Werte wesentlich geringer waren als die mit zusätzlicher Belastung. Untersuchungen im Urin wiesen höhere Werte für 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure (105 ± 81 µg/l) als für 2-Ethylhexansäure auf. Dies ließ

vermuten, dass 2-Ethylhexansäure nicht der Endmetabolit im Abbau von DEHP im Menschen ist.

Ein weiteres Abbauprodukt von DEHP ist das Mono(2-ethylhexyl) Phthalat MEHP, welches nach Hydrolyse durch Lipasen entsteht [13]. Untersuchungen zeigten, dass in der Reihenfolge Nagetier, Primat und Mensch das Ausmaß der Hydrolyse abnimmt [15]. Mensch und Ratte besitzen Lipasen im Plasma, die DEHP in MEHP und 2-Ethylhexanol spalten können [13]. Nach intravenöser DEHP Belastung konnte im menschlichen Plasma Phthalsäure nachgewiesen werden [25]. Dies zeigte, dass im Gegensatz zu Nagetieren beim Menschen eine vollständige Hydrolyse des DEHP zu Phthalsäure und 2-Ethylhxanol erfolgt.

4.2 Bestimmung von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure

Die Optimierung der Methode und Identifizierung der Substanzen gelang mit der Kombination der Studien von Liebich et al. [66], Hoffmann et al. [69], Duez et al., Deisinger et al. [80] und Kim et al. [71], Hoffman et al. [67] beschrieben das Enteiweißen der Plasmaproben zur Analyse mit Perchlorsäure, Isopropanol, Ethanol, oder Trichloressigsäure. Zur weiteren Vorbereitung der Proben führten Duez et al. [68] eine Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Ethylacetat, Diethylether oder Ethylacetat/Diethylether durch. Zur zusätzlichen Extraktion der Substanzen benutzten Hoffmann et al. [69] auch die flüssig/flüssig Verteilungschromatographie. Dabei handelte es sich um mit Kieselgel oder Chromosorb P gefüllte Säulen für sehr polare Metabolite. Bei Untersuchungen von Liebich et al. [66] setzte sich die Festphasenextraktion mittels C18 Säulen durch. Sie eignete sich gut zur Trennung verschiedener Substanzen voneinander. Dabei handelte es sich um einen Verteilungsprozess zwischen einer festen und einer flüssigen Phase. Trans-Zimtsäure wurde von Kim et al. [71] als interner Standard zur Quantifizierung eingesetzt. Als Derivat kam tert.-Butyldimethylsilyl (tBDMS) zum Einsatz. Deisinger et al. [80] bestimmten 2-Ethylhexansäure nach

Extraktion mit Ethylacetat als Methylesther und Plonait et al [24] bestimmten das TMS-Derivat mittels GC-MS.

Die Derivatisierung mit MBDSTFA/Acetonitril/DMAP ergab das entsprechende tBDMS-Derivat. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um das di-tBDMS. Keines der untersuchten Plasmaproben wies das mono-tBDMS auf.

Nachdem die Probenaufarbeitung entwickelt und optimiert war, die Derivatisierung und gaschromatographische Trennung abgeschlossen waren, musste die massenspezifische Analyse optimiert werden. Im Massenspektrum war ein [M-57] Ion sichtbar, begleitet von einem weniger intensiven [M-15] Ion. Beide Ionen sind charakteristisch für t-BDMS Derivate organischer Säuren.

4.3 Schlussfolgerung

Aus der vorliegenden Arbeit können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

Plasmaproben von 124 gesunden Kontrollpersonen und 104 Dialysepatienten wurden nach Validierung der Methode untersucht.

Alle Proben der Dialysepatienten wiesen die DEHP Metabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure auf. In den Proben der Kontrollpersonen konnte 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure nicht nachgewiesen werden.

Die 2-Ethylhexansäure war mit 527,7 ± 32,4 µg/l (MW ± SEM) im Vergleich zu den Kontrollpersonen mit 357,6 ± 16,7 µg/l, deutlich erhöht.

Für 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäzre waren die Eichkurven im Bereich von 50 µg/l bis 1000 mg/l linear mit einem Korrelationskoeffizienten zwischen r = 0,9923 und 0,9982. Für 2-Ethylhexansäure (430 µg/l) lag der

Variationskoeffizient bei 6,6%, für 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure (174µg/l) bei 7,2%. Das Signal-Rauschverhältnis der Ionen zur Quantifizierung (m/z 201 und 187) war größer als 8 für beide Säuren bei einer Konzentration von 50 µg/l. Damit liegt sie deutlich unter dem Wert der bisher im Plasma gefundenen Werte.

Somit wies diese Methode eine gute Präzision und Sensitivität auf. Die erhöhte Sensitivität und Spezifität wurde bei der Quantifizierung der GC-MS Messung durch den „Single-Ion-Monitoring“ Modus ermöglicht.

Anhand der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die DEHP Metabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure im Plasma von Dialysepatienten nachgewiesen und quantifiziert. Mit diesem Arbeitsprotokoll könnten nun weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. was die Kanzerogenität von Weichmachern angeht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Phthalate werden als Weichmacher bei der Herstellung des Kunststoffes Polyvinylchlorid (PVC) eingesetzt. Sie besitzen die Eigenschaft, den Kunststoff flexibler und gleichzeitig strapazierfähiger zu machen. Aus diesem Grund begegnen uns PVC-Produkte überall im Alltag, wie z.B. in der Kleidung, als Verpackungsmaterial, aber vor allem in der Medizin werden die Eigenschaften von Weichmachern genutzt. Die Belastung der gesamten Bevölkerung ist allgegenwärtig. Die größte Aufnahme von DEHP erfolgt über Nahrungsmitteln, aufgrund des Verpackungsmaterials. Für Patienten, die in dauerndem Kontakt mit DEHP-haltigem PVC stehen wie z.B. Dialysepatienten und intensivpflichtige Früh- und Neugeborene besteht eine aussergewöhnlich hohe Exposition.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der PVC – Weichmachermetabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure im Plasma mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie zu entwickeln und zu validieren.

Des Weiteren sollte anhand dieser Methode eine klinische Studie zum Vorkommen von 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure bei Hämodialysepatienten und Kontrollpersonen entwickelt werden. Dazu wurden Plasmaproben von 124 gesunden Kontrollpersonen und 104 Dialysepatienten wurden nach Validierung der Methode untersucht. Die Proben der Dialysepatienten wiesen die DEHP Metabolite 2-Ethylhexansäure und 2-Ethyl-3-hydroxyhexansäure auf, nicht hingegen die Proben der Kontrollpersonen.

6 LITERATUR

1. Bruder A, Lindner S, Mügge J, Saffert R, Spindler E.PVC - der Werkstoff für Medizinprodukte. Swiss Plastics 21: 5-10 (1999)
2. Produktinformationen Nr.1: Wissenswertes über PVC. 1-12. 2000. 53113 Bonn, Deutschland, PVCplus Kommunikations GmbH.
3. Tickner, J. A. The Use of Di-2-Ethylhexyl Phthalate in PVC Medical Devices: Exposure, Toxicity, und Alternatives. Lowell Center for Sustainable Production. 1999. University of Massachusetts, Lowell, USA.
4. Doull J, Cattley R, Elcombe C, et al.A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. Regul Toxicol Pharmacol 29: 327-357 (1999)
5. Loftus NJ, Woollen BH, Steel GT, Wilks MF, Castle L.An assessment of the dietary uptake of di-2-(ethylhexyl) adipate (DEHA) in a limited population study. Food Chem Toxicol 32: 1-5 (1994)
6. Castle L, Gilbert J, Eklund T.Migration of plasticizer from poly(vinyl chloride) milk tubing. Food Addit Contam 7: 591-596 (1990)
7. Petersen JH, Breindahl T.Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. Food Addit Contam 17: 133-141 (2000)
8. Huber WW, Grasl Kraupp B, Schulte Hermann R.Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. Crit Rev Toxicol 26: 365-481 (1996)
9. National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-ethylhexyl) Phthalate. 2000. National Institute of Environmental Health Sciences; Research Triangle Park, NC, USA.
10. Marin ML, Lopez J, Sanchez A, Vilaplana J, Jimenez A.Analysis of potentially toxic phthalate plasticizers used in toy manufacturing. Bull Environ Contam Toxicol 60: 68-73 (1998)

11. European Commission. Commission Decision of 20 May 2003 amending Decision 1999/815/EC concerning measures prohibiting the placing on the market of toys and childcare articles intended to be placed in the mouth by children under three years of age made of soft PVC containing certain phthalates. 2003/368/EC, Official Journal L 125, 12-13. 2003.
12. Sasakawa S, Mitomi Y.Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) content of blood or blood components stored in plastic bags. Vox Sang 34: 81-86 (1978)
13. Peck CC, Odom DG, Albro PW, Jess DA, Barrett BB.Effect of heat on the conversion of di-2-ethylhexyl phthalate to mono-2-ethylhexyl phthalate in human plasma. Transfusion 21: 163-166 (1981)
14. Center for Devices and Radiological Health and U.S.Food and Drug Administration. Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) released from PVC Medical Devices. Center for Devices and Radiological Health, U. S. Food and Drug Administration 12709 Twinbrook Parkway Rockville MD 20852. http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf (verified April 21st, 2002). 2001.
15. Rhodes C, Orton TC, Pratt IS, et al.Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2- ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. Environ Health Perspect 65: 299-307 (1986)
16. Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA.Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. Toxicol Appl Pharmacol 115: 216-223 (1992)
17. Schmid P, Schlatter C.Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. Xenobiotica 15: 251-256 (1985)
18. Barber ED, Teetsel NM, Kolberg KF, Guest D.A comparative study of the rates of in vitro percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. Fundam Appl Toxicol 19: 493-497 (1992)
19. Liss GM, Albro PW, Hartle RW, Stringer WT.Urine phthalate determinations as an index of occupational exposure to phthalic anhydride

and di(2-ethylhexyl)phthalate. Scand J Work Environ Health 11: 381-387 (1985)

20. Sjoberg PO, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP.Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di- (2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. Transfusion 25: 424-428 (1985)
21. Mettang T, Thomas S, Kiefer T, et al.The fate of leached di(2-ethylhexyl)phthalate in patients undergoing CAPD treatment. Perit Dial Int 16: 58-62 (1996)
22. Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L.Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. Acta Pharmacol Toxicol Copenh 56: 30-37 (1985)
23. Sjoberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J.Dispositions of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. Eur J Clin Invest 15: 430-436 (1985)
24. Plonait SL, Nau H, Maier RF, Wittfoht W, Obladen M.Exposure of newborn infants to di-(2-ethylhexyl)-phthalate and 2- ethylhexanoic acid following exchange transfusion with polyvinylchloride catheters. Transfusion 33: 598-605 (1993)
25. Pollack GM, Buchanan JF, Slaughter RL, Kohli RK, Shen DD.Circulating concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. Toxicol Appl Pharmacol 79: 257-267 (1985)
26. Albro PW.The metabolism of 2-ethylhexanol in rats. Xenobiotica 5: 625-636 (1975)
27. Dirven HA, van den Broek PH, Arends AM, et al.Metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in urine samples of workers in polyvinylchloride processing industries. Int Arch Occup Environ Health 64: 549-554 (1993)
28. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J.On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and

secondary phthalate metabolites in human urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 784: 169-182 (2003)

29. Wahl HG, Hong Q, Stube D, Maier ME, Haring HU, Liebich HM.Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B 758: 213-219 (2001)
30. Mercer A, Castle L, Comyn J, Gilbert J.Evaluation of a predictive mathematical model of di-(2- ethylhexyl) adipate plasticizer migration from PVC film into foods

    [published erratum appears in Food Addit Contam 1991: 125. Food Addit Contam 7: 497-507 (1990)
31. Jaeger RJ, Rubin RJ.Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. N Engl J Med 287: 1114-1118 (1972)
32. Wallin RF, Klamer B, Nicora RW, Thompson CR.Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolism in animals and post-transfusion tissue levels in man. Bull Parenter Drug Assoc 28: 278-287 (1974)
33. Kluwe WM.Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. Environ Health Perspect 45: 3-9 (1982)
34. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M.Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. Am J Ind Med 39: 100-111 (2001)
35. Parkerton TF, Konkel WJ.Application of quantitative structure--activity relationships for assessing the aquatic toxicity of phthalate esters. Ecotoxicol Environ Saf 45: 61-78 (2000)
36. Lundgren B, Meijer J, Birberg W, Pilotti A, DePierre JW.Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases in mouse liver by peroxisome proliferators, with special emphasis on structural analogues of 2-ethylhexanoic acid. Chem Biol Interact 68: 219-240 (1988)

37. Ganning AE, Brunk U, Edlund C, Elhammer A, Dallner G.Effects of prolonged administration of phthalate ester on the liver. Environ Health Perspect 73: 251-258 (1987)
38. David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D.Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2- ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. Toxicol Sci 50: 195-205 (1999)
39. Jacobson MS, Kevy SV, Grand RJ.Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. J Lab Clin Med 89: 1066-1079 (1977)
40. Gray TJ, Gangolli SD.Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. Environ Health Perspect 65: 229-235 (1986)
41. Li LH, Jester WFJ, Orth JM.Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. Toxicol Appl Pharmacol 153: 258-265 (1998)
42. Seth PK, Srivastava SP, Agarwal DK, Chandra SV.Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on rat gonads. Environ Res 12: 131-138 (1976)
43. Agarwal DK, Lawrence WH, Autian J.Antifertility and mutagenic effects in mice from parenteral administration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). J Toxicol Environ Health 16: 71-84 (1985)
44. Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J.Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. J Toxicol Environ Health 26: 39-59 (1989)
45. Berman E, Laskey JW.Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. Reprod Toxicol 7: 349-358 (1993)
46. Laskey JW, Berman E.Steroidogenic assessment using ovary culture in cycling rats: effects of bis(2-diethylhexyl)phthalate on ovarian steroid production. Reprod Toxicol 7: 25-33 (1993)
47. Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ.Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. Toxicol Appl Pharmacol 128: 224-228 (1994)

48. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ.Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. Toxicol Appl Pharmacol 128: 216-223 (1994)
49. Bolon B, Bucci TJ, Warbritton AR, Chen JJ, Mattison DR, Heindel JJ.Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. Fundam Appl Toxicol 39: 1-10 (1997)
50. Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB.Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. Toxicol Sci 46: 282-293 (1998)
51. Ohtani H, Miura I, Ichikawa Y.Effects of dibutyl phthalate as an environmental endocrine disruptor on gonadal sex differentiation of genetic males of the frog Rana rugosa. Environ Health Perspect 108: 1189-1193 (2000)
52. Kawaguchi M, Funabashi T, Aiba S, Kimura F.Butyl benzyl phthalate, an endocrine disrupter, inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion under an insulin-induced hypoglycaemic state in ovariectomized rats. J Neuroendocrinol 14: 486-491 (2002)
53. Lamb JC4, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR.Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. Toxicol Appl Pharmacol 88: 255-269 (1987)
54. Treinen KA, Heindel JJ.Evidence that MEHP inhibits rat granulosa cell function by a protein kinase C-independent mechanism. Reprod Toxicol 6: 143-148 (1992)
55. Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ.Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. Toxicol Appl Pharmacol 106: 334-340 (1990)
56. Singh AR, Lawrence WH, Autian J.Maternal-fetal transfer of 14C-di-2-ethylhexyl phthalate and 14C-diethyl phthalate in rats. J Pharm Sci 64: 1347-1350 (1975)

57. Parkhie MR, Webb M, Norcross MA.Dimethoxyethyl phthalate: embryopathy, teratogenicity, fetal metabolism and the role of zinc in the rat. Environ Health Perspect 45: 89-97 (1982)
58. Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K.Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. Environ Health Perspect 65: 249-254 (1986)
59. Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, et al.Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of Di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. Toxicol Sci 45: 212-224 (1998)
60. Kihlstrom I.Placental transfer of diethylhexyl phthalate in the guinea-pig placenta perfused in situ. Acta Pharmacol Toxicol Copenh 53: 23-27 (1983)
61. Sharpe RM.Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. Toxicol Lett 120: 221-232 (2001)
62. Lee HY, Kalmus GW, Levin MA.Effects of phthalate esters (plasticizers) on chick embryos and chick embryonic cells. Growth 38: 301-312 (1974)
63. Ritter EJ, Scott WJ, Jr., Randall JL, Ritter JM.Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol, 2- ethylhexanoic acid, and valproic acid, and potentiation by caffeine. Teratology 35: 41-46 (1987)
64. Crocker JF, Safe SH, Acott P.Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. J Toxicol Environ Health 23: 433-444 (1988)
65. Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, et al.Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. Eur J Pediatr 147: 41-46 (1988)
66. Liebich HM, Först C.Basic Profiles of Organic Acids in Urine. J Chromatogr 525: 1-14 (1990)
67. Hoffmann GF, Sweetman L.O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime-trimethylsilyl ester derivatives for sensitive identification and quantitation of aldehydes, ketones, and oxoacids in biological fluids. Clin Chim Acta 199: 237-242 (1991)

68. Duez P, Kumps A, Mardens Y.GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. Clin Chem 42: 1609-1615 (1996)
69. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L.Quantitative Analysis for Organic Acids in Biological Samples: Batch Isolation Followed by Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis. Clin Chem 35: 587-595 (1989)
70. Thompson JA, Markey SP.Quantitative Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Comparison of Isolation Methods. Anal Chem 47: 1313-1321 (1975)
71. Kim KR, Kim JH, Jeong DH, Paek DJ, Liebich HM.Gas chromatographic profiling analysis of urinary organic acids from nonsmokers and smokers. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 701: 1-8 (1997)
72. Flaminio LM, De Angelis L, Ferazza M, Marinovich M, Galli G, Galli CL.Leachability of a new plasticizer tri-(2-ethylhexyl)- trimellitate from haemodialysis tubing. Int J Artif Organs 11: 435-439 (1988)
73. Goulas AE, Kontominas MG.Migration of dioctyladipate plasticizer from food-grade PVC film into chicken meat products: effect of gamma-radiation. Z Lebensm Unters Forsch 202: 250-255 (1996)
74. Peck CC, Albro, P.W, et al.Metabolism and extraction of the plasticizer di-e-ethylhexyl phthalte in man. Clin Res 26: 101 A (1978)
75. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB.Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. Environ Health Perspect 45: 19-25 (1982)
76. Albro PW, Thomas R, Fishbein L.Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats. Isolation and characterization of the urinary metabolites. J Chromatogr 76: 321-330 (1973)
77. Peck CC, Albro PW.Toxic potential of the plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. Environ Health Perspect 45: 11-17 (1982)

78. Dirven HA, van den Broek PH, Jongeneelen FJ.Determination of four metabolites of the plasticizer di(2- ethylhexyl)phthalate in human urine samples. Int Arch Occup Environ Health 64: 555-560 (1993)
79. Kroger S.Gas chromatographic determination of 2-ethylhexanoic acid in urine as its pentafluorobenzyl ester. Analyst 114: 1647-1648 (1989)
80. Deisinger PJ, Boatman RJ, Guest D.Metabolism of 2-ethylhexanol administered orally and dermally to the female Fischer 344 rat. Xenobiotica 24: 429-440 (1994)
81. National Toxicology Program (NTP). Carcinogenesis bioassay of di-(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). Tech Rep Ser 217. 1982. Research Triangle Park, NC, USA.

7 ABKÜRZUNGEN

DEHP	Di(2ethylhexyl) Phthalat
DEHA	Di(2-ethylhexyl) Adipat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
MBDSTFA	N-methyl-N-(tert.-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide
MEHP	Mono(2-ethylhexyl) Phthalat
PVC	Polyvinylchlorid
TBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl

8 DANKSAGUNG

Folgenden Personen möchte ich meinen Dank aussprechen:

- Herrn Professor Dr. Dieter Luft für die Überlassung des Themas.

- Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl für die eingehende Betreuung und die Unterstützung bei der Auswertung der Studie.

- Claudia Peterfi, sowie Roman Werner, Josef Wöll und allen Mitarbeitern des Zentral- und Stoffwechsellabors für ihre Hilfe und Geduld bei den Laborarbeiten.

9 LEBENSLAUF

Nirgül Usta

Geburtsdatum:	09.09.1975
Geburtsort:	Ludwigsburg
Eltern:	Vater, Mehmet Usta Mutter, Veliye Usta, geb. Tulu
Geschwister:	Bruder, Dr. med. Engin Usta
Schulbildung:	1982-1986 Grundschule 1986-1996 Ernst-Sigle-Gymnasium Kornwestheim 1996 Allgemeine Hochschulreife
Studium:	1997 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung 1999 Zahnärztliche Vorprüfung 17. Juni 2003 Staatsexamen
Beruflicher Werdegang:	September 2003 Vorbereitungsassitentin in der Zahnarztpraxis Dres. Merkle, Ditzingen September 2005 Entlastungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dres. Merkle, Ditzinge