

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Blei und seine Verbindungen – Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure in Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion

Biomonitoring-Methode

T. Göen^{1,2,*}, L. Weißflog¹, M. Blaszkewicz³, G. Baumhoer³, T. Schettgen⁴, P. Dewes⁴, A. Hartwig^{5,*}, MAK Commission^{6,*}

¹ Methodenentwicklung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

² Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

³ Methodenprüfung, Leibniz-Institut für Arbeitsforschung, TU Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund

⁴ Methodenprüfung, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Uniklinik RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen

⁵ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* E-Mail: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Keywords: Blei; δ -Aminolävulinsäure; ALA; Biomonitoring; Urin; HPLC-FLD

Citation Note: Göen T, Weißflog L, Blaszkewicz M, Baumhoer G, Schettgen T, Dewes P, Hartwig A, MAK Commission. Blei und seine Verbindungen – Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure in Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2018 Okt;3(4):2208-2224]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2026. https://doi.org/10.34865/bi743992d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 06 Mrz 2026

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi743992d0022>

Manuskript abgeschlossen: 24 Nov 2016

Erstveröffentlichung (Online): 19 Okt 2018

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Lead and its compounds – Determination of δ -aminolevulinic acid in urine by HPLC with fluorescence detection

[Blei und seine Verbindungen – Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure in Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion]

Biomonitoring Methods in German Language

T. Göen^{1,*}, L. Weißflog², M. Blaszekwicz³, G. Baumhoer³, T. Schettgen⁴, P. Dewes⁴, A. Hartwig^{5,*}, MAK Commission^{6,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi743992d0022

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area verified the presented biomonitoring method.

The method described hereinafter permits the determination of δ -aminolevulinic acid (ALA) in urine as a biological marker of effect to assess exposure to lead. An indicator of such exposure is the increased urinary excretion of ALA caused by lead-induced inhibition of the enzyme δ -aminolevulinic acid dehydratase. The determination of ALA in urine is based on a condensation reaction of ALA with formaldehyde and acetylacetone yielding a pyrrolizine derivate, which can be sensitively detected using fluorescence detection. 6-Amino-5-oxohexanoic acid is used as an internal standard. Calibration standards are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed.

The method was extensively validated and the reliability data were confirmed by two independent laboratories, which have established and cross-checked the whole procedure.

Keywords

Blei; δ -Aminolävulinsäure; ALA; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; HPLC; Fluoreszenzdetektion

Author Information

¹ Entwickler der Methode und Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestr. 9–11, 91054 Erlangen

² Entwickler der Methode, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestr. 9–11, 91054 Erlangen

³ Prüfer der Methode, Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund

⁴ Prüfer der Methode, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Uniklinik RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen

⁵ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* E-Mail: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Blei und seine Verbindungen – Bestimmung von δ -Aminolävulinsäure in Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	Blei und seine Verbindungen
Analytisches Messprinzip:	Flüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion
Abgeschlossen im:	November 2016

Übersicht über die mit dieser Methode erfassbaren Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
Blei	7439-92-1	δ -Aminolävulinsäure (5-Amino-4-oxopentansäure)	106-60-5
Anorganische Bleiverbindungen, u. a.			
Blei(II)carbonat	598-63-0		
Blei(II)oxid	1317-36-8		
Blei(II)sulfat	7446-14-2		
Blei(II)sulfid	1314-87-0		

Zusammenfassung

Die vorliegende Methode dient der Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure (ALA) in Urin als biologischer Effektmarker für eine Bleiexposition. Hintergrund ist die erhöhte Ausscheidung von ALA im Urin durch eine bleiinduzierte Hemmung des Enzyms δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase. Die Bestimmung der ALA im Urin beruht hierbei auf einer Kondensationsreaktion von ALA, Formaldehyd und Acetylaceton zu einem Pyrrolizinderivat, welches mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion sensitiv erfasst werden kann. Als interner Standard wird 6-Amino-5-oxohexansäure eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in gleicher Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

δ -Aminolävulinsäure (ALA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,25 bzw. 0,95 mg ALA pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	$s_w = 5,95 \%$ bzw. 3,40 % $u = 14,1 \%$ bzw. 8,0 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 5,7 bzw. 11,7 mg ALA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$s_w = 7,2 \%$ bzw. 6,5 % $u = 16,4 \%$ bzw. 14,8 %
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,25 bzw. 0,95 mg ALA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$r = 108$ bzw. 114 %
Nachweisgrenze:	10 μg ALA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	30 μg ALA pro Liter Urin	

Allgemeine Informationen zur δ -Aminolävulinsäure (ALA) als Biomarker einer Bleiexposition. Blei und seine anorganischen Verbindungen (außer Bleiarsenat und Bleichromat) werden von der Kommission als Kanzerogene der Kategorie 2 und als Keimzellmutagene der Kategorie 3A eingestuft. Daher kann für Blei auch kein MAK-Wert abgeleitet werden [DFG 2018]. Eine Zusammenfassung der toxikologischen Eigenschaften von Blei kann den arbeitsmedizinisch-toxikologischen Begründungen der Kommission entnommen werden [Greim 2000; Greim 2004; Greim 2007].

Die δ -Aminolävulinsäure (ALA) ist ein körpereigener Stoff, der im blutbildenden System gebildet wird. Unter Wirkung des Enzyms δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase wird die Bildung von Porphobilinogen, dem Grundbaustein des Blutfarbstoffes Häm, aus der ALA katalysiert. Eine innere Bleibelastung führt zur Hemmung des Enzyms δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase und damit zu einer Störung der Häm-biosynthese. Gleichzeitig führt dies zu einer Anreicherung von ALA im Organismus und somit zu einer erhöhten ALA-Ausscheidung über den Urin. Der gemessene Gehalt an ALA im Urin lässt in der Regel auch eine Aussage über die Höhe der Bleiexposition zu [Lehnert und Henschler 1989]. Die Bestimmung der ALA im Urin stellt damit im Gegensatz zu den Belastungsparametern einen biologischen Effektparameter dar. Im Jahr 2001 wurde der BAT-Wert für die ALA im Urin allerdings ausgesetzt, da eine Bestimmung der ALA aus methodischen und praktikablen Gründen (u. a. wegen der langen Latenzzeit, der Unspezifität und geringen Nachweisempfindlichkeit der damaligen Verfahren) als nicht mehr empfehlenswert galt [Lehnert und Greim 2001]. Der damals gültige BAT-Wert lag bei 15 mg ALA je Liter Urin, wobei für Frauen im gebärfähigen Alter ein niedrigerer Wert von 6 mg ALA je Liter Urin abgeleitet worden war [Lehnert und Henschler 1989]. In Deutschland gibt es seitdem keinen gültigen Beurteilungswert mehr für den Gehalt an ALA im Urin. Bei Bleiexpositionen wird daher generell eine Bestimmung des Bleigehaltes im Blut empfohlen, wofür auch gültige Grenz- und Referenzwerte abgeleitet wurden

[Drexler und Hartwig 2014]. Dennoch bietet eine Bestimmung der ALA-Ausscheidung die Möglichkeit, einen der empfindlichsten biologischen Effekte einer Bleiexposition spezifisch zu diagnostizieren.

In anderen Ländern, wie beispielsweise in Österreich, ist die Bestimmung der ALA im Urin bei Bleibelastung nach wie vor üblich und es existieren dort auch Beurteilungswerte für diesen Parameter. Die Entwicklung und Validierung eines leistungsfähigen und robusten Analyseverfahrens zur Bestimmung von ALA im Urin ist daher notwendig.

Die in dieser Methode verwendete Umsetzung der ALA wurde erstmals von Okayama et al. [1988] beschrieben. Bei der ablaufenden Reaktion reagiert die ALA mit zwei Acetylacetonmolekülen und einem Formaldehydmolekül unter Ringschließung zu einem Pyrrolizinderivat (2,6-Diacetyl-1,5-dimethyl-7-(2-carboxyethyl)-3H-pyrrolizin), das fluorimetrisch detektiert wird. Obwohl die zugrundeliegende Reaktion bereits 1890 von dem deutschen Chemiker Arthur Hantzsch beschrieben wurde, klärten erst Kajiware et al. [1993] die Struktur des ALA-Derivates auf. Die Reaktion der ALA zum Pyrrolizinderivat ist in Abbildung 1 dargestellt.

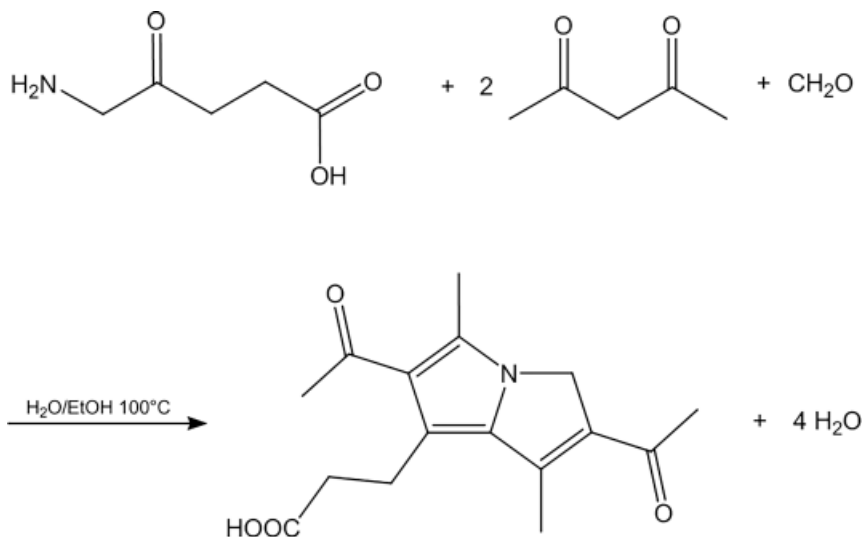


Abb. 1 Umsetzung der ALA zum Pyrrolizinderivat.

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	2212
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	2213
2.1	Geräte	2213
2.2	Chemikalien	2213
2.3	Lösungen	2213
2.4	Interner Standard	2214
2.5	Vergleichsstandards	2214
3	Probenahme und Probenaufbereitung	2215
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	2215
4.1	Flüssigkeitschromatographie	2216
4.2	Fluoreszenzdetektion	2216
5	Analytische Bestimmung	2216
6	Kalibrierung	2216
7	Berechnung der Analysenergebnisse	2217
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung	2217
9	Beurteilung des Verfahrens	2217
9.1	Präzision	2217
9.2	Richtigkeit	2218
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	2219
9.4	Störeinflüsse	2219
10	Diskussion der Methode	2221
11	Literatur	2221
12	Anhang	2223

1 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode dient der Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure (ALA) in Urin als biologischer Effektmarker für eine Bleiexposition. Hintergrund ist die erhöhte Ausscheidung von ALA im Urin durch eine bleiinduzierte Hemmung des Enzyms δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase. Die Bestimmung der ALA im Urin beruht hierbei auf einer Kondensationsreaktion von ALA, Formaldehyd und Acetylaceton zu einem Pyrrolizinderivat, welches mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion sensitiv erfasst werden kann. Als interner Standard wird 6-Amino-5-oxohexansäure eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in gleicher Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- HPLC-Anlage mit Pumpe, Autosampler und Fluoreszenzdetektor (z. B. Merck HITACHI)
- HPLC-Säule: LiCrospher® PAH LiChroCART® 250-3, 250 × 3 mm, 5 µm (z. B. Merck)
- Vortex-Mischer (z. B. Scientific Industries)
- Wasserbad, thermostatisierbar (z. B. GFL)
- Ultraschallbad
- Mikroliterpipetten, variabel zwischen 10 und 100 µL sowie zwischen 100 und 1000 µL (z. B. Eppendorf)
- Verschiedene Pipetten (z. B. Eppendorf)
- Verschiedene Messkolben und Bechergläser (z. B. VWR)
- 8 mL-Schraubgläser mit Deckel und PTFE-kaschierten Septen (z. B. Brand)
- 1,8 mL-Schraubgläser mit Deckel und PTFE-kaschierten Septen (HPLC-Vial; z. B. VWR)

2.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- δ -Aminolävulinsäure, Hydrochlorid (z. B. Merck, Nr. 1.24802)
- 6-Amino-5-oxohexansäure, Hydrochlorid (z. B. MolPort, Nr. 021-780-066)
- Acetylaceton, zur Synthese (z. B. Merck, Nr. 8.00023)
- Formaldehyd, 37 % (z. B. Merck, Nr. 1.04003)
- Methanol (z. B. Carl Roth, Nr. 7342.1)
- Essigsäure, 100 % (z. B. Merck, Nr. 1.00063)
- Ethanol, absolut, vergällt mit 1 % Methylethylketon (z. B. Merck, Nr. 1.00974)
- Deionisiertes Wasser

2.3 Lösungen

Formaldehydlösung (10 %)

In einem 100 mL-Messkolben werden genau 54 mL deionisiertes Wasser vorgelegt und langsam mit 20 mL der 37%igen Formaldehydlösung versetzt.

Acetylacetonlösung (15 %)

In einem 50 mL-Messkolben werden 6 mL Acetylaceton mit 4 mL Ethanol und 30 mL deionisiertem Wasser gemischt. Die Lösung wird anschließend zum vollständigen Vermischen für einige Minuten ins Ultraschallbad gestellt.

2.4 Interner Standard

Stammlösung I (800 mg/L)

20 mg 6-Amino-5-oxohexansäure (Hydrochlorid) werden in einem 20 mL-Messkolben genau eingewogen und in deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Unter Berücksichtigung des molaren Verhältnisses zum Hydrochlorid resultiert für die Stammlösung I des internen Standards eine Konzentration von 800 mg/L.

Stammlösung II (80 mg/L)

2 mL der Stammlösung I des internen Standards werden in einen 20 mL-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Arbeitslösung (5 mg/L)

0,5 mL der Stammlösung II des internen Standards werden in einen 20 mL-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei –20 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens 1 Jahr ohne nennenswerte Verluste haltbar.

2.5 Vergleichsstandards

Stammlösung (1000 mg/L)

12,8 mg δ -Aminolävulinsäure (Hydrochlorid) werden in einen 10 mL-Messkolben genau eingewogen und in deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Unter Berücksichtigung des molaren Verhältnisses zum Hydrochlorid resultiert für die Stammlösung eine Konzentration von 1000 mg/L.

Arbeitslösung (100 mg/L)

1 mL der Stammlösung wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Poolurin bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei –20 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens 6 Monate ohne nennenswerte Verluste haltbar.

Vergleichsstandards

Die Vergleichsstandardlösungen werden in Poolurin von unbelasteten Personen der Allgemeinbevölkerung angesetzt. Zur Herstellung werden Spontanurinproben der Probanden in einem geeigneten Gefäß gesammelt, gut durchmischt und bei –20 °C gelagert.

Aus der Arbeitslösung der δ -Aminolävulinsäure werden durch Verdünnen mit Poolurin Vergleichsstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 10 mg/L

ALA nach dem in Tabelle 1 dokumentierten Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird der verwendete Poolurin mitgeführt.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung von Vergleichsstandards zur Bestimmung der ALA in Urin.

Vergleichsstandard	Volumen der Arbeitslösung	Endvolumen des Vergleichsstandards	Konzentration ALA
	[μ L]	[mL]	[mg/L]
K0	0	10	0
K1	5	10	0,05
K2	10	10	0,10
K3	25	10	0,25
K4	50	10	0,50
K5	100	10	1,0
K6	200	10	2,0
K7	500	10	5,0
K8	1000	10	10,0

3 Probenahme und Probenaufbereitung

Die Urinproben werden in verschließbaren Kunststoffbehältern gesammelt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Auf diese Weise ist der Urin mindestens ein halbes Jahr haltbar.

Vor der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Es werden $25\text{ }\mu\text{L}$ der Probe in ein braunes 8 mL -Schraubgläschen pipettiert und mit $25\text{ }\mu\text{L}$ der Arbeitslösung des internen Standards, $1,75\text{ mL}$ der 15%igen Acetylacetonlösung und $225\text{ }\mu\text{L}$ der 10%igen Formaldehydlösung versetzt. Anschließend wird das Glas verschlossen und die Lösung für etwa 30 s auf dem Vortex-Mischer gut durchmischt. Für die Derivatisierung wird die Probe anschließend für 60 min im Wasserbad bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um die Derivatisierung zu stoppen wird die Probe im Anschluss in einer lichtgeschützten Box im Eiswasser für ca. 30 min abgekühlt.

Nach dem Abkühlen wird jeweils 1 mL der Probenlösung in braune $1,8\text{ mL}$ -Schraubvials überführt und mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion analysiert. Bei allen Arbeitsschritten ist zu beachten, dass die Proben möglichst lichtgeschützt aufbewahrt werden sollten.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekopplung bestehend aus einem Flüssigkeitschromatographie-System (HPLC) mit Autosampler, einem Fluoreszenzdetektor und Datenverarbeitungssystem.

4.1 Flüssigkeitschromatographie

Säule:	Säulenfüllung:	LiCrospher® PAH LiChroCART®250-3
	Innerer Durchmesser:	3,0 mm
	Partikelgröße:	5 µm
	Länge:	250 mm
Trennprinzip:	Umkehrphase (Reversed Phase)	
Mobile Phase:	Methanol/Wasser/Eisessig (50/50/1, V/V/V)	
Flussrate:	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen:	10 µL	
Fließmittelprogramm:	isokratisch	

4.2 Fluoreszenzdetektion

Anregung:	363 nm
Detektion:	473 nm

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 3 aufgearbeiteten Urinproben werden jeweils 10 µL der derivatisierten Probenlösung in das HPLC-System injiziert. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit (Retentionszeiten: t_R (ALA) = 6,7 min; t_R (interner Standard) = 8,3 min). Bei jeder Analysenserie werden eine Qualitätskontrollprobe und ein Reagenzienleerwert, bestehend aus bidestilliertem Wasser, mitanalysiert. Es werden die Peakflächen des Analyten und des internen Standards registriert.

Die angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen. Abbildung 2 (im Anhang) zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer Standardlösung in Poolurin.

6 Kalibrierung

Die Vergleichsstandards in Poolurin (siehe Abschnitt 2.5) werden analog zu den Urinproben gemäß Abschnitt 3 aufgearbeitet und entsprechend den Abschnitten 4 und 5 analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die Konzentration des jeweiligen Vergleichsstandards aufgetragen wird. Die Linearität der Kalibriergerade wurde zwischen der Nachweisgrenze und einem ALA-Gehalt von 10 mg/L positiv geprüft. Abbildung 3 (im Anhang) zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade in Poolurin.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Bestimmung des Analytgehaltes einer Probe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards berechnet und in die nach Abschnitt 6 erstellte Kalibrierfunktion eingesetzt. Der Achsenabschnitt der Kalibriergerade ist durch den physiologischen Hintergrundgehalt an ALA in dem zur Kalibrierung eingesetzten Poolurin bedingt und wird bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Eventuelle Reagenzienleerwerte sind durch Subtraktion zu berücksichtigen. Die Analytkonzentrationen werden in mg/L erhalten.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieses Bandes verfahren [Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014]. Zur Präzisionskontrolle wird in jeder Analysenserie Qualitätskontrollmaterial mit untersucht, welches eine bekannte und konstante Konzentration an ALA aufweist. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss es selbst hergestellt werden.

Dazu wird Poolurin mit einer definierten Menge an ALA dotiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [Bader et al. 2010].

9 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Validierung der Methode in zwei unabhängigen Laboren bewiesen.

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurden Poolurinproben von beruflich nicht belasteten Personen mit einer ALA-Standardlösung dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die dotierten ALA-Konzentrationen betrugen 0,25 mg/L, 0,95 mg/L, 5,0 mg/L sowie 10 mg/L. Bei achtfacher Bestimmung dieser Urinproben ergaben sich die in Tabelle 2 dokumentierten Präzisionen in Serie.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde durch Aufarbeitung und Messung von G-EQUAS Ringversuchsmaterial RV 53A und RV 53B an acht verschiedenen Tagen ermittelt. Die so ermittelten Präzisionen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

2218 Biomonitoring Methods

Tab. 2 Präzisionen in Serie für die Bestimmung von ALA im Urin (n = 8).

Material	Dotierte Konzentration [mg/L]	Ermittelter Wert [mg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
Dotierter Urin	0	0,33	–	–
	0,25	0,62	5,95	14,1
	0,95	1,45	3,40	8,0
	5,0	5,56	4,93	11,7
	10	10,4	6,24	14,8

Tab. 3 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von ALA im Urin (n = 10).

Material	Referenzwert [mg/L]	Ermittelter Wert [mg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
RV 53A	5,7	5,18	7,23	16,4
RV 53B	11,7	11,4	6,54	14,8

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde Poolurin von beruflich unbelasteten Personen mit ALA in einer Konzentration von 0,25 mg/L sowie 0,95 mg/L dotiert, in acht Aliquote geteilt und analysiert. Unter Berücksichtigung des im Urin vorhandenen Hintergrundgehaltes (0,33 mg/L) ergaben sich die in Tabelle 4 angegebenen relativen Wiederfindungsraten. Zudem wurde das Ringversuchsmaterial RV 53A und RV 53B (German External Quality Assessment Scheme; G-EQUAS) zehnfach aufgearbeitet und analysiert und aus den ermittelten Werten die mittlere relative Wiederfindung errechnet.

Tab. 4 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung der ALA in Urin (n = 10).

Material	Dotierte Konzentration [mg/L]	Ermittelter Wert [mg/L]	Mittlere rel. Wiederfindung [%]	Bereich [%]
Dotierter Urin	0,25	0,62	108	98,7–118
	0,95	1,45	114	108–121
RV 53A	5,7	5,2	93,2	79,6–105
RV 53B	11,7	11,4	99,2	88,4–105

Darüber hinaus wurde mit der beschriebenen Methode mehrfach erfolgreich an den Ringversuchen der DGAUM zur Bestimmung von ALA im Urin teilgenommen. Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5 Ringversuchsergebnisse zur Bestimmung von ALA im Urin.

Material	Ergebnis [mg/L]	Sollwert (Toleranzbereich) [mg/L]	Richtigkeit [%]
RV 53A	5,3	5,7 (4,5–6,9)	92,9
RV 53B	11,6	11,7 (10,2–13,2)	99,1
RV 54A	2,8	2,8 (2,2–3,4)	100
RV 54B	15,5	14,2 (12,1–16,3)	109
RV 55A	4,1	4,3 (3,4–5,2)	95,3
RV 55B	2,3	2,5 (1,9–3,1)	92,0

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze wurde aus dem dreifachen Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt und die Bestimmungsgrenze analog aus dem neunfachen Signal-Rausch-Verhältnis.

Unter den angegebenen Bedingungen der Probenaufbereitung und analytischen Bestimmung ergaben sich für die Bestimmung von ALA in Urin eine Nachweisgrenze von 10 µg/L und eine Bestimmungsgrenze von 30 µg/L.

9.4 Störeinflüsse

In der Literatur ist beschrieben, dass die ALA in wässriger Lösung lediglich bei saurem pH-Wert stabil ist und bei physiologischem pH-Wert rasch abgebaut wird [Elfsson et al. 1999; Gadmar et al. 2002]. Dies wirft auch die Frage nach der Stabilität des Biomarkers im Urin und der Möglichkeit des Ansäuerns des Urins zur Stabilisierung der ALA auf, wie dies in einer früheren Methode der Arbeitsgruppe beschrieben wurde [Angerer und Schaller 1978]. Elfsson et al. [1999] untersuchten den Abbau der ALA in wässrigem Medium bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten und fanden sowohl eine Temperatur- als auch eine pH-Abhängigkeit der Abbaureaktion. Allerdings ist der Abbau der ALA eine Reaktion 2. Ordnung, so dass die Halbwertszeit

von der Ausgangskonzentration abhängt. Von Elfsson et al. [1999] wurden sehr hohe ALA-Konzentrationen von bis zu 10 g/L für die Untersuchungen herangezogen, die im Bereich des Human-Biomonitorings irrelevant sind. So liegt bei einer Konzentration von 10 g ALA/L die Halbwertszeit für den ALA-Abbau bei pH 7,4 und 37 °C bei 3 h, bei einer im Biomonitoringbereich gegebenenfalls zu erwartenden Konzentration von 10 mg ALA/L bei >120 d.

Die von den Entwicklern der Methode durchgeführten Tests zur Stabilität des Analyten bestätigen diese Berechnung. Für die Stabilitätstests wurde Urin mit unterschiedlichen ALA-Konzentrationen dotiert und der pH-Wert auf pH = 7 bzw. pH = 2 eingestellt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte direkt bzw. nach 5 d oder 28 d Lagerung bei +4 °C bzw. -20 °C. Im Rahmen einer 28-tägigen Lagerung ist keine Abhängigkeit der ALA-Stabilität vom pH-Wert bzw. der Lagerungstemperatur zu erkennen, durchaus aber die durch die Abbaukinetik 2. Ordnung beschriebene Abhängigkeit des Analytabbaus von der Ausgangskonzentration. Wegen Unsicherheiten aufgrund der nur einmaligen Durchführung der Lagerungsversuche, wird eine Ansäuerung des Urins auf einen pH-Wert von 2 und eine Lagerung der zu messenden Urinproben bzw. der Standardlösungen bei -20 °C empfohlen.

Auch die Dotierlösung des internen Standards sollte bei -20 °C gelagert werden, da sie sich bei Lagerung im Kühlschrank (+4 °C) nach einigen Wochen abbaut. Grundsätzlich zeigt sich selbst bei einer Lagerung bei -20 °C ein Abbau des internen Standards. Bei wiederholten Tau-Gefrier-Zyklen über einen Zeitraum von zwei Jahren lag der Abbau bei etwa 30–40 %.

Bei den aufgearbeiteten Urinproben wirkt sich eine längere Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichteinwirkung nachteilig auf das Messergebnis aus. Aus diesem Grund sollten die Proben nach der Aufarbeitung stets lichtgeschützt aufbewahrt und möglichst zeitnah vermessen werden.

Im Rahmen der Probenaufbereitung kam es bei einem der Prüfer der Methode aufgrund der hohen Derivatisierungstemperatur (100 °C) in Verbindung mit der Flüchtigkeit des Acetylacetons bei einigen Proben zu Verlusten, die zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führten. Eine Derivatisierung in Headspace-Gläschen mit gasdichten Crimp-Verschlüssen führte in diesem Fall zu einer erheblich verbesserten Präzision und Richtigkeit der Methode. Auch die Entwickler der Methode untersuchten die Derivatisierung in Headspace-Gläschen mit gasdichtem Crimp-Verschluss. Es wurden ALA-Standards in Urin mit einer Konzentration von 10 mg/L aufgearbeitet und vermessen. Im Labor der Methodenentwickler konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Wiederfindung festgestellt werden. Trotzdem sollten Anwender der Methode bei unzureichender Methodenpräzision die Verwendung von Gläsern mit Crimp-Verschlüssen für die Derivatisierung in Betracht ziehen.

Bei der Überprüfung von Matrixeffekten stellte einer der Prüfer fest, dass die Methode bei einem Individualurin mit hohem Kreatiningehalt zu Überbefunden führte, wobei im Chromatogramm im Bereich des Analyten und des IS keine sichtbaren Störpeaks zu erkennen waren. Eine Überprüfung dieses Sachverhalts ergab, dass nicht der hohe Kreatiningehalt sondern eher die Verwendung eines gealterten Derivatisierungsreagenz (4–5 Wochen alt) der ausschlaggebende Faktor für die höheren Wiederfindungsraten war. Demnach empfiehlt sich die Verwendung einer möglichst tagesfrisch angesetzten Derivatisierungslösung.

10 Diskussion der Methode

Die vorgelegte Methode beruht auf der Arbeit von Okayama [1988] und erlaubt die präzise und nachweisstarke Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure (ALA) in Urin als biologischen Effektmarker für eine Bleiexposition. Die Einführung eines internen Standards hat die analytischen Zuverlässigkeitsdaten bezüglich Linearität, Wiederfindung, Präzision und Empfindlichkeit gegenüber den bereits von der Kommission publizierten Methoden deutlich verbessert.

Verwendete Messgeräte: Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekopplung bestehend aus einem Flüssigkeitschromatographie-System (HPLC) mit Autosampler, einem Fluoreszenzdetektor und einem Datenverarbeitungssystem.

11 Literatur

- Angerer J, Schaller KH, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (1978) δ -Aminolävulinsäure. In: Pilz W, Angerer J, Schaller KH, Henschler D (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 2. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bihememetabd0002a>
- Bader M, Barr D, Göen Th, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J und Hartwig A (Hrsg): Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärztebl 111: A1583–1618
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2018) MAK- und BAT-Werte-Liste 2018, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung Nr. 54, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527818396>
- Drexler H, Hartwig A (Hrsg) (2014) Addendum zu Blei und seine Verbindungen (außer Bleiarсенat, Bleichromat und Alkylbleiverbindungen). Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), Biologische Leitwerte (BLW) und Biologische Arbeitsstoff-Referenzwerte (BAR), 21. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bb743992d0021>
- Elfsson B, Wallin I, Eksborg S, Rudaeus K, Ros AM und Ehrsson H (1999) Stability of 5-aminolävulinic acid in aqueous solution. Eur J Pharm Sci 7(2): 87–91
- Gadmar OB, Moan J, Scheie E, Ma LW und Peng Q (2002) Stability of 5-aminolävulinic acid in solution. J Photochem Photobiol B 67(3): 187–193
- Greim H (Hrsg) (2000) Blei und seine anorganischen Verbindungen, außer Bleiarсенat und Bleichromat. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 31. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.mb743992d0031>

2222 Biomonitoring Methods

- Greim H (Hrsg) (2004) Blei und seine anorganischen Verbindungen (einatembare Fraktion). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 38. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.mb743992d0038>
- Greim H (Hrsg) (2007) Blei und seine anorganischen Verbindungen (einatembare Fraktion). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 43. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.mb743992d0043>
- Kajiwaru M, Hara K, Takatori K, Matsumoto K (1993) Revised structure of a delta-aminolevulinic acid derivative. *Clin Chem* 39(9): 1867–1871
- Lehnert G, Henschler D (Hrsg) (1989) Blei und seine Verbindungen (außer Bleiarsenat, Bleichromat und Alkylbleiverbindungen). Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), 4. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bb743992d0004>
- Lehnert G, Greim H (Hrsg) (2001) Blei und seine Verbindungen (außer Bleiarsenat, Bleichromat und Alkylbleiverbindungen). Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), 10. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bb743992d0010>
- Okayama A (1988) Fluorimetric determination of urinary delta-aminolevulinic acid by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization. *J Chromatogr* 426(2): 365–369

Entwickler der Methode: Th. Göen, L. Weißflog

Prüfer der Methode: M. Blaszkewicz, G. Baumhoer, Th. Schettgen, P. Dewes

Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: Th. Göen

Vorsitzende der „Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: A. Hartwig

Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft: MAK Commission

12 Anhang

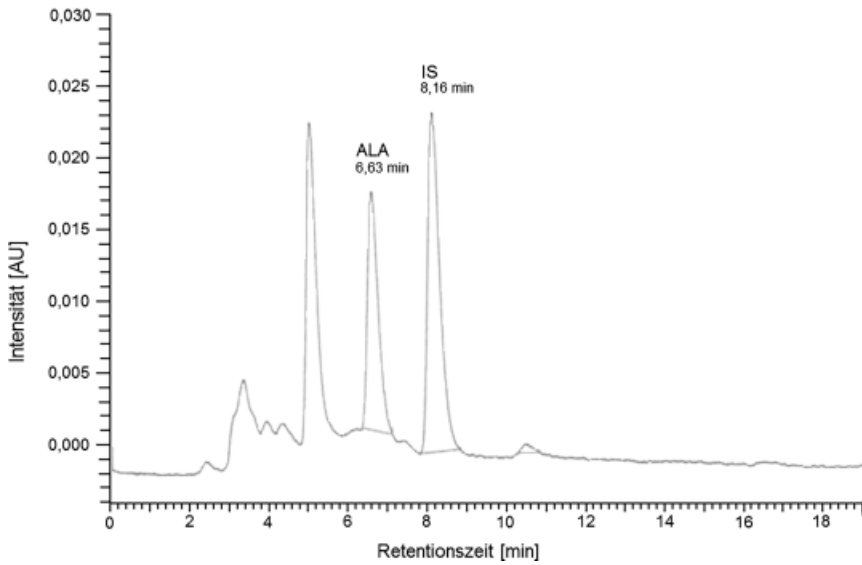


Abb. 2 Chromatogramm einer Standardlösung mit einem ALA-Gehalt von 0,1 mg/L in Poolurin.

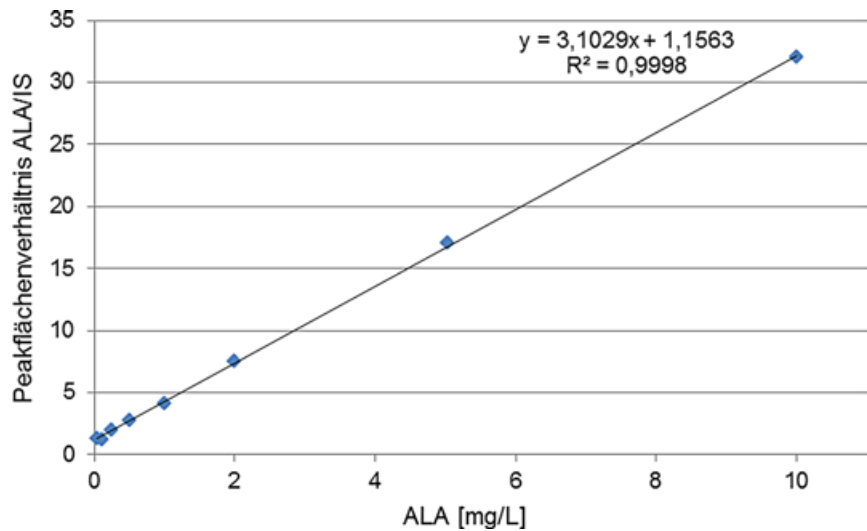


Abb. 3 Kalibriergerade für ALA im Konzentrationsbereich von 0,5–10 mg/L.