

Alkylierende Substanzen – Bestimmung von Hämoglobin-Addukten als *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin, *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes mittels GC-MS/MS

Keywords

Alkylierende Substanzen;
Hämoglobin-Addukte;
n-Alkylvaline; *N*-(2-Hydroxypropyl)valin; *N*-(2-Hydroxyethyl)valin; *N*-(2-Cyanoethyl)valin; *N*-Benzylvalin;
N-(2-Carbamoylethyl)valin;
N-(2-Carbonamidethyl)valin;
GC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

T. Christ¹
D. Ellrich¹
G. Leng¹
C. Schmidtkunz¹
W. Gries¹
F. Pilz²
G. Scherer²
T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SIT-SER-GS-BLM – Institut für Biomonitoring, Chempark Geb. Q 18, 51368 Leverkusen

² Methodenprüfung, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg

³ 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

⁴ 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

⁵ 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)

Citation Note:

Christ T, Ellrich D, Leng G, Schmidtkunz C, Gries W, Pilz F, Scherer G, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Alkylierende Substanzen – Bestimmung von Hämoglobin-Addukten als *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin, *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes mittels GC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Sep;8(3):Doc073. https://doi.org/10.34865/bi33488d8_3or

Manuskript abgeschlossen:
29 Okt 2020

Publikationsdatum:
29 Sep 2023

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](#).



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 developed and verified the presented biomonitoring method. Alkylating substances play an important role in many industrial processes and include *n*-alkyl and benzyl halides, α,β -unsaturated carbonyl compounds, epoxides, alkylnitrosamines, chloroalkyl ethers, dialkyl sulfates as well as alkyl alkane sulfonates. As alkylating substances are mainly used in industry, most exposure occurs in the workplace. The general population is primarily exposed through cigarette smoke, which contains a variety of alkylating substances. In addition, certain foods, especially highly heated, starchy foods, are a source of exposure to acrylamide, another alkylating substance. The aim of this work was to develop a selective method to simultaneously determine the adducts of different alkylating substances with the *N*-terminal valine of haemoglobin, namely *N*-methylvaline, *N*-ethylvaline, *N*-propylvaline, *N*-butylvaline,

N-(2-hydroxypropyl)valine, *N*-(2-hydroxyethyl)valine, *N*-(2-cyanoethyl)valine, *N*-benzylvaline, and *N*-(2-carbamoyl-ethyl)valine. The method has been comprehensively validated, and the reliability data have been confirmed by replication and verification of the procedure in a second, independent laboratory. For the determination of the adducts at the *N*-terminal valine of haemoglobin, erythrocytes are isolated from whole blood and subjected to lysis. Globin is precipitated from the haemoglobin solution and, after the addition of *N*-(2-ethoxyethyl)valine-alanine-anilide as internal standard, the alkylated *N*-terminal valines are derivatised and cleaved off by a modified Edman degradation using pentafluorophenyl isothiocyanate. The corresponding pentafluorophenyl thiohydantoin derivatives are extracted with *tert*-butyl methyl ether, washed, and analysed by GC-MS/MS. The good precision and accuracy data show that the method is reliable and accurate. The method is both selective and sensitive, and the limits of detection between 10 and 70 pmol/g globin are sufficient to determine occupational exposure and, for some analytes, exposure of the general population to the respective alkylating substances.

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Erythrozytenfraktion des Vollblutes
Analytisches Messprinzip	Gaschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff ^{a)}	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Diazomethan	334-88-3		
Dimethylsulfat	77-78-1		
Methylchlorid (Chlormethan)	74-87-3		
Methylbromid (Brommethan)	74-83-9		
Methyliodid (Iodmethan)	74-88-4	<i>N</i> -Methylvalin	2566-32-7
Bis(chlormethyl)ether	542-88-1		
Monochlordimethylether	107-30-2		
<i>N</i> -Nitrosodimethylamin (NDMA)	62-75-9		
<i>N</i> -Nitrosomethylethylamin (NMEA)	10595-95-6		
Diethylsulfat	64-67-5		
Ethylbromid (Bromethan)	74-96-4		
Ethyliodid (Iodethan)	75-03-6		
Ethylmethansulfonat	62-50-0	<i>N</i> -Ethylvalin	64991-31-7
Acrylnitril	107-13-1		
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	55-18-5		
<i>N</i> -Nitrosomethylethylamin (NMEA)	10595-95-6		
Dipropylsulfat	598-05-0		
Propylbromid (1-Brompropan)	106-94-5		
Propyliodid (1-Iodpropan)	107-08-4	<i>N</i> -Propylvalin	90600-07-0
<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamin (NDPA)	621-64-7		

Dibutylsulfat	625-22-9		
Butylbromid (1-Brombutan)	109-65-9		
Butyliodid (1-Iodbutan)	542-69-8	N-Butylvalin	62765-47-3
N-Nitrosodi-n-butylamin (NDBA)	924-16-3		
Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)	75-56-9		
Propylen	115-07-1	N-(2-Hydroxypropyl)valin	91147-54-5
Ethylenoxid	75-21-8		
Ethylen	74-85-1	N-(2-Hydroxyethyl)valin	21768-51-4
Acrylnitril	107-13-1	N-(2-Cyanoethyl)valin	51078-49-0
Benzylchlorid	100-44-7		
Benzylbromid	100-39-0	N-Benzylvalin	15363-84-5
Benzyliodid	620-05-3		
Acrylamid	79-06-1	N-(2-Carbamoyl)ethyl)valin	51078-53-6

^{a)} Gegebenenfalls können weitere, nicht aufgeführte Arbeitsstoffe zu den mit dieser Methode bestimmbareren Hämoglobin-Addukten führen

Zuverlässigkeitskriterien

N-Methylvalin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,2\%$ bzw. $4,3\%$
	Streubereich	$u = 13,4\%$ bzw. $11,1\%$
	bei einem Adduktspiegel von 625 pmol bzw. 2499 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,4\%$ bzw. $3,6\%$
	Streubereich	$u = 6,2\%$ bzw. $9,3\%$
	bei einem Adduktspiegel von 625 pmol bzw. 2499 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 101\%$ bzw. 105%
	bei einem Adduktspiegel von 625 pmol bzw. 2499 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.)	$r = 81\%$ bzw. 106%
	bei einem Adduktspiegel von 625 pmol bzw. 2499 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	50 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	170 pmol N-Methylvalin pro Gramm Globin	

N-Ethylvalin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 8,1\%$ bzw. $4,6\%$
	Streubereich	$u = 20,8\%$ bzw. $11,8\%$
	bei einem Adduktspiegel von 564 pmol bzw. 2257 pmol N-Ethylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,8\%$ bzw. $6,4\%$
	Streubereich	$u = 27,8\%$ bzw. $16,5\%$
	bei einem Adduktspiegel von 564 pmol bzw. 2257 pmol <i>N</i> -Ethylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 102\%$ bzw. 103%
		bei einem Adduktspiegel von 564 pmol bzw. 2257 pmol <i>N</i> -Ethylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.)	$r = 108\%$ bzw. 113%
		bei einem Adduktspiegel von 564 pmol bzw. 2257 pmol <i>N</i> -Ethylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen
Nachweisgrenze:	15 pmol <i>N</i> -Ethylvalin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	50 pmol <i>N</i> -Ethylvalin pro Gramm Globin	

***N*-Propylvalin**

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,8\%$ bzw. $1,2\%$
	Streubereich	$u = 4,1\%$ bzw. $2,7\%$
		bei einem Adduktspiegel von 515 pmol bzw. 2058 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin und $n = 10$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 3,1\%$ bzw. $2,9\%$
	Streubereich	$u = 7,6\%$ bzw. $7,1\%$
		bei einem Adduktspiegel von 515 pmol bzw. 2058 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin und $n = 7$ Bestimmungen
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 99\%$ bzw. 101%
		bei einem Adduktspiegel von 515 pmol bzw. 2058 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin und $n = 10$ Bestimmungen
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.)	$r = 101\%$ bzw. 99%
		bei einem Adduktspiegel von 515 pmol bzw. 2058 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin und $n = 7$ Bestimmungen
Nachweisgrenze:	15 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	50 pmol <i>N</i> -Propylvalin pro Gramm Globin	

***N*-Butylvalin**

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,4\%$ bzw. $2,8\%$
	Streubereich	$u = 6,2\%$ bzw. $7,2\%$
		bei einem Adduktspiegel von 473 pmol bzw. 1892 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 0,8\%$ bzw. $3,8\%$
	Streubereich	$u = 2,1\%$ bzw. $9,8\%$
		bei einem Adduktspiegel von 473 pmol bzw. 1892 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 100\%$ bzw. 98%
		bei einem Adduktspiegel von 473 pmol bzw. 1892 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin und $n = 6$ Bestimmungen

Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 473 pmol bzw. 1892 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 93\%$ bzw. 110%
Nachweisgrenze:	15 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	50 pmol <i>N</i> -Butylvalin pro Gramm Globin	

***N*-(2-Hydroxypropyl)valin**

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$ bzw. $5,5\%$
	Streubereich	$u = 12,6\%$ bzw. $14,1\%$
	bei einem Adduktspiegel von 468 pmol bzw. 1871 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,4\%$ bzw. $5,7\%$
	Streubereich	$u = 6,2\%$ bzw. $14,7\%$
	bei einem Adduktspiegel von 468 pmol bzw. 1871 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 468 pmol bzw. 1871 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 96\%$ bzw. 92%
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 468 pmol bzw. 1871 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 90\%$ bzw. 102%
Nachweisgrenze:	10 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	30 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin pro Gramm Globin	

***N*-(2-Hydroxyethyl)valin**

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,2\%$ bzw. $4,3\%$
	Streubereich	$u = 13,4\%$ bzw. $11,1\%$
	bei einem Adduktspiegel von 508 pmol bzw. 2034 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$ bzw. $6,0\%$
	Streubereich	$u = 12,6\%$ bzw. $15,4\%$
	bei einem Adduktspiegel von 508 pmol bzw. 2034 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 508 pmol bzw. 2034 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 100\%$ bzw. 95%
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 508 pmol bzw. 2034 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 103\%$ bzw. 111%
Nachweisgrenze:	20 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	70 pmol <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin pro Gramm Globin	

N-(2-Cyanoethyl)valin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,5\%$ bzw. $5,4\%$
	Streubereich	$u = 6,4\%$ bzw. $13,9\%$
	bei einem Adduktspiegel von 481 pmol bzw. 1926 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,9\%$ bzw. $2,7\%$
	Streubereich	$u = 17,7\%$ bzw. $6,9\%$
	bei einem Adduktspiegel von 481 pmol bzw. 1926 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 103\%$ bzw. 103%
	bei einem Adduktspiegel von 481 pmol bzw. 1926 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.)	$r = 96\%$ bzw. 114%
	bei einem Adduktspiegel von 481 pmol bzw. 1926 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	15 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	60 pmol N-(2-Cyanoethyl)valin pro Gramm Globin	

N-Benzylvalin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,0\%$ bzw. $1,5\%$
	Streubereich	$u = 5,1\%$ bzw. $3,9\%$
	bei einem Adduktspiegel von 395 pmol bzw. 1581 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,6\%$ bzw. $2,6\%$
	Streubereich	$u = 17,0\%$ bzw. $6,7\%$
	bei einem Adduktspiegel von 395 pmol bzw. 1581 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.)	$r = 99\%$ bzw. 96%
	bei einem Adduktspiegel von 395 pmol bzw. 1581 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.)	$r = 79\%$ bzw. 100%
	bei einem Adduktspiegel von 395 pmol bzw. 1581 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	10 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	30 pmol N-Benzylvalin pro Gramm Globin	

N-(2-Carbamoylethyl)valin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,8\%$ bzw. $5,1\%$
	Streubereich	$u = 20,1\%$ bzw. $13,1\%$
	bei einem Adduktspiegel von 435 pmol bzw. 1741 pmol N-(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,8\%$ bzw. $4,6\%$
	Streubereich	$u = 14,9\%$ bzw. $11,8\%$
	bei einem Adduktspiegel von 435 pmol bzw. 1741 pmol N-(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	

Richtigkeit (Präzision in der Serie):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 435 pmol bzw. 1741 pmol <i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 99\%$ bzw. 99 %
Richtigkeit (Präzision von Tag zu Tag):	Wiederfindung (rel.) bei einem Adduktspiegel von 435 pmol bzw. 1741 pmol <i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin und n = 6 Bestimmungen	$r = 82\%$ bzw. 100 %
Nachweisgrenze:	70 pmol <i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin	
Bestimmungsgrenze:	200 pmol <i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin pro Gramm Globin	

2 Allgemeine Informationen zu den alkylierenden Substanzen

Alkylierende Substanzen spielen in vielen industriellen Prozessen eine wichtige Rolle und schließen Vertreter der *n*-Alkylhalogenide, Benzylhalogenide, Epoxide, Chloralkylether, Dialkylsulfate und Alkylalkansulfonate, Alkylnitrosamide und Alkylnitrosamine sowie der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen (z. B. Acrylamid) ein (Törnqvist et al. 2002). Sie werden beispielsweise als Lösungsmittel (z. B. Alkylhalogenide) und Insektizide (z. B. Methylbromid) verwendet oder bei der Herstellung bestimmter organischer Chemikalien (z. B. Acrylnitril, Benzylchlorid, Diethyl- und Dimethylsulfat, Ethylenoxid, Propylenoxid) (IARC 1999) sowie in der Synthese verschiedener Aroma- und Duftstoffe (z. B. 1-Brompropan) eingesetzt (NTP 2003). 1-Brompropan kommt auch bei der Präzisionsreinigung und als Entfettungsmittel zum Einsatz (NTP 2003). Das ozonabbauende Methylbromid wird trotz seines Verbots im Montrealer Protokoll weiterhin in vielen Ländern als Begasungsmittel in Treibhäusern, bei der Lagerung und dem Transport von Gütern sowie als Sterilisationsmittel auf landwirtschaftlich genutzten Böden eingesetzt (Barry et al. 2012; Budnik et al. 2012). Zur Sterilisation medizinischer Instrumente und Materialien wird Ethylenoxid benutzt. Aus Acrylamid werden Polyacrylamide hergestellt, die als Flockungsmittel in der Wasseraufbereitung oder auch in Dispersionsfarben und -lacken verwendet werden (Herth et al. 2015). Acrylnitril dient als Rohstoff für die Herstellung von Kunststoffen und Kunstfasern und wird zudem als Insektizid eingesetzt (Brazdil 2012).

1,2-ungesättigte Alkene und ihre Epoxide Die 1,2-ungesättigten Alkene und ihre Epoxide liegen gasförmig (Ethen, Ethylenoxid, Propen) oder flüssig (Propylenoxid) vor (IFA 2023) und werden in großen Mengen im Europäischen Wirtschaftsraum hergestellt oder in diesen importiert (Ethylen und Propylen >10 000 000 t/a, Ethylenoxid und Propylenoxid >1 000 000 t/a) (ECHA 2023 e, f, g, h). Die Substanzen werden industriell als Ausgangsprodukte für die Herstellung von Polymeren und weiteren Chemikalien sowie als Laborchemikalien eingesetzt.

Ethylen ist ein brennbares, ubiquitäres Gas, das bei der Verbrennung organischen Materials entsteht. Es ist ein Reifungshormon bei Pflanzen und wird auch von Säugetieren, einschließlich Menschen, endogen gebildet. Ethylen ist einer der wichtigsten Synthesebausteine der chemischen Industrie und eine im Großmaßstab hergestellte Petrochemikalie. Mehr als 80 % des Ethylens werden für die Herstellung von Ethylenoxid, Ethylendichlorid und Polyethylen verwendet (Zimmermann und Walzl 2009).

Ethylenoxid wird als Sterilisationsmittel in der Medizintechnik und zur Begasung von Silos, Lagerräumen oder Containern eingesetzt, wobei diese Anwendungen streng reguliert sind. Darüber hinaus wird es zu Ethylenglykol und Ethylenglykolethern umgesetzt und für die Herstellung von Polyesterfasern verwendet (Rebsdats und Mayer 2001). Im Organismus von Mensch und Tier kann Ethylenoxid aus endogenem Ethylen gebildet werden (Filser et al. 1992). Auch kommt es natürlicherweise im Erdgas vor und wurde in Zigarettenrauch und in Dieselabgasen nachgewiesen (Rebsdats und Mayer 2001).

Propylen ist wie Ethylen eine der wichtigen Grundchemikalien der chemischen Industrie und wird in großem Maßstab hergestellt. Propylen wird zum einen als Heizgas für die Wärmeerzeugung oder als Gas für das Brennschneiden eingesetzt, zum anderen für die Herstellung einer Vielzahl chemischer Produkte. Der größte Teil des produzierten Propylens wird zu Polypropylen umgesetzt, aber auch zu Propylenoxid, Acrylsäure, Acrylnitril und Cumol (Zimmermann 2013).

Propylenoxid wird größtenteils zu Polyetherpolyolen verarbeitet, die zur Produktion von Polyurethanen verwendet werden. Des Weiteren wird es für die Herstellung von Propylenglykolen und Propylenglykolethern eingesetzt. In einem geringeren Ausmaß wird Propylenoxid direkt verwendet, u. a. als Begasungsmittel für Agrarprodukte. Eine berufliche Exposition findet sich daher vorwiegend bei Arbeitern der chemischen Industrie (Baer et al. 2012).

Die hier angeführten 1,2-ungesättigten Alkene und ihre Epoxide werden am Arbeitsplatz vor allem über die Atemwege aufgenommen, Ethylenoxid kann aus wässrigen Lösungen oder aus der Gasphase auch dermal aufgenommen werden. Ein Teil der inhalativ aufgenommenen Alkene wird unverändert abgeatmet, ein weiterer im Fettgewebe gespeichert und ein dritter in der Leber zu den 1,2-Epoxiden metabolisiert. Diese werden, katalysiert durch Epoxidhydrolase, in die entsprechenden Diole überführt, die weiteroxidiert oder in konjugierter Form ausgeschieden werden können. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Detoxifizierung der Epoxide durch Reaktion mit Glutathion (IFA 2023). Nur ein kleiner Teil der aufgenommenen bzw. gebildeten Epoxide reagiert unter Adduktbildung mit körpereigenen Makromolekülen, dabei ist die Reaktivität des 1,2-Epoxypropans etwa vierfach geringer als die des Ethylenoxids (Pauwels und Veulemans 1998).

Eine Exposition der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung gegen die 1,2-ungesättigten Alkene und ihre Epoxide geschieht vor allem durch Rauchen und Passivrauchen (Scherer et al. 2022).

Alkylsulfate Bei den Alkylsulfaten handelt es sich um farblose Flüssigkeiten, die im Europäischen Wirtschaftsraum nur als Intermediat hergestellt werden (Dimethylsulfat) oder in Mengen von > 1 t/a bis < 10 t/a hergestellt oder in diesen importiert werden (Diethylsulfat, Dipropylsulfat und Dibutylsulfat). Die Alkylsulfate werden sowohl in der Industrie als auch im Labor als Alkylierungsreagenzien eingesetzt (ECHA 2021 b, c, 2022 b, 2023 d; RÖMPP-Redaktion 2023). In Deutschland dürfen Dimethylsulfat und Diethylsulfat allerdings als besonders gefährliche krebserzeugende Stoffe in der industriellen Produktion nur in geschlossenen Anlagen hergestellt oder verwendet werden (Bundesregierung Deutschland 2010).

Dimethylsulfat und Diethylsulfat können bei Exposition sowohl über die Atemwege als auch über die Haut aufgenommen werden. Beim Dimethylsulfat ist von einer schnellen Hydrolyse im Blut bzw. in den primär betroffenen Organsystemen, eventuell sogar schon vor der Resorption, auszugehen. Neben der Hydrolyse zu Monomethylsulfat, Methanol und Schwefelsäure ist die Reaktion mit Glutathion und die Addition an körpereigene Makromoleküle bedeutsam (IFA 2023). Diethylsulfat weist – verglichen mit Dimethylsulfat – eine höhere Hydrolysestabilität auf (Kolesnikov et al. 1977). Von Ratten wird Diethylsulfat unabhängig von der Verabreichungsart zu Ethylmercaptursäure verstoffwechselt (Kaye 1974). Von einer Ethylierung körpereigener Makromoleküle ist auszugehen.

Auch für Dipropylsulfat und Dibutylsulfat sind eine inhalative und dermale Aufnahme nach Exposition anzunehmen. Da die Hydrolysegeschwindigkeit in wässrigem Medium vom Dimethylsulfat zum Dibutylsulfat abnimmt (Kolesnikov et al. 1977) und die Lipidlöslichkeit zunimmt, ist bei den höhermolekularen Substanzen von einer ansteigenden Resorbierbarkeit des intakten Moleküls auszugehen. Dipropylsulfat und Dibutylsulfat sollten ebenfalls mit Glutathion zu den entsprechenden Mercaptursäuren verstoffwechselt werden und als Alkylanzien mit Makromolekülen reagieren. Eine Exposition der Allgemeinbevölkerung mit Alkylsulfaten ist nicht zu erwarten.

Benzylhalogenide Benzylchlorid und Benzylbromid liegen als farblose Flüssigkeiten vor, Benzyljodid bei Raumtemperatur als farblose bis gelbe Nadeln, die bei 24,5 °C schmelzen. Benzylchlorid wird in Mengen von ≥ 10 t/a bis < 100 t/a im Europäischen Wirtschaftsraum hergestellt oder in diesen importiert, während Benzylbromid nur als Intermediat produziert wird. Zu Herstellung oder Import von Benzyljodid liegen keine Informationen auf der Website der Europäischen Chemikalienagentur vor. Die Benzylhalogenide werden sowohl in der Industrie als auch im Labor als Benzylierungsreagenzien eingesetzt (ECHA 2020 b, 2021 e, 2022 c; RÖMPP-Redaktion 2023), stellen also Ausgangsstoffe oder Intermediate bei der Herstellung anderer Chemikalien dar.

Benzylchlorid findet Verwendung als Grundchemikalie und Zwischenprodukt und wird beispielsweise zu Benzylalkohol, zu Phthalsäurebenzylestern (z. B. Benzylbutylphthalat als Weichmacher), zu Phenyllessigsäure via Benzylcyanid (synthetisches Penicillin) und zu quartären Ammoniumsalzen (Desinfektionsmittel und Phasentransferkatalysatoren)

sowie zu anderen Zwischenprodukten (z. B. für Aroma- und Farbstoffe) weiterverarbeitet. Eine direkte Anwendung des Benzylchlorids als Endprodukt ist nicht bekannt (Lipper et al. 2017).

Benzylchlorid wird über den Atemtrakt und über die Haut effektiv resorbiert. Angaben zum Benzylchloridstoffwechsel des Menschen liegen derzeit nicht vor. Im Tierversuch an Mäusen und Affen wurde die schnelle Verstoffwechslung unter Bildung von Benzylmercaptursäure, Benzylalkohol und Benzaldehyd sowie Hippursäure und die Ausscheidung dieser Metaboliten mit dem Harn nachgewiesen (Hall und James 1986). Als alkylierende Verbindung reagiert Benzylchlorid zudem mit Makromolekülen unter Adduktbildung. So wurde die alkylierende Wirkung auf die DNA *in vivo* an Mäusen nachgewiesen (Walles 1981).

Eine analoge Verstoffwechslung sowie eine alkylierende Wirkung auf Makromoleküle ist auch für Benzylbromid zu erwarten (IFA 2023) und auch für Benzyljodid, für das bislang keine Daten vorliegen, wahrscheinlich.

Alkylhalogenide Die monosubstituierten *n*-Alkylhalogenide sind polare, aber nicht hydrophile Substanzen, deren Siedepunkte mit zunehmender Kettenlänge sowie mit zunehmendem Atomgewicht des Halogensubstituenten ansteigt. Bei Raumtemperatur liegen Methylchlorid, Methylbromid und Methyljodid dementsprechend gasförmig vor, während es sich bei Ethylbromid, Ethyljodid, Propylbromid, Propyljodid, Butylbromid und Butyljodid um zumeist leichtflüchtige Flüssigkeiten handelt.

Methylchlorid wird in Mengen von $\geq 1000\ 000$ t/a im Europäischen Wirtschaftsraum hergestellt oder in diesen importiert, Methyljodid in Mengen von ≥ 100 t/a bis < 1000 t/a, Butylbromid in Mengen von ≥ 10 t/a bis < 100 t/a sowie Propylbromid in Mengen von ≥ 1 t/a bis < 10 t/a (ECHA 2018 a, 2021 d, 2022 a, 2023 c). Methylbromid, Ethylbromid, Ethyljodid und Propyljodid werden im Europäischen Wirtschaftsraum nur als Intermediate hergestellt und es liegen keine Informationen auf der Website der Europäischen Chemikalienagentur zu den produzierten oder verwendeten Mengen vor (ECHA 2018 b, 2019, 2020 a, 2021 a).

Methylchlorid wird industriell als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Di- und Trichlormethan, Siliconen, Zelluloseethern (u. a. Methylzellulose), kationischen Polymeren und quartären Ammoniumverbindungen verwendet. Methylchlorid wird auch für die Synthese von Organometallverbindungen wie Methylolithium, Trimethylaluminium oder Methylzinnverbindungen eingesetzt, die wiederum als Intermediate in der Feinchemikalienproduktion und als Katalysatoren in der Polymerherstellung dienen. Darüber hinaus wird Methylchlorid als Laborchemikalie eingesetzt (Ohligschläger et al. 2019). Methylbromid wird sowohl natürlich (Ozeanemissionen, Vegetation) als auch anthropogen (Verbrennung von Biomasse und Biokraftstoffen, Einsatz als Begasungsmittel, Verwendung als Industrie- und Laborchemikalie) freigesetzt (Saltzman et al. 2022; Yoffe et al. 2013). Industriell wird Methylbromid als Alkylierungsmittel, vor allem für die Herstellung von Pharmazeutika verwendet (Yoffe et al. 2013). Der Einsatz als Schädlingsbekämpfungsmittel zur Begasung von Containern, zur Bekämpfung tierischer Holzschädlinge im Bauwesen sowie zur Entwesung von Agrarflächen ist aufgrund von Anwendungsbeschränkungen rückläufig (ECHA 2021 a). Methyljodid wird als Intermediat in der Herstellung von Pharmazeutika und Pestiziden und allgemein als Methylierungsmittel in der organischen Synthese verwendet. Methyljodid wird zudem von Meeresalgen gebildet und aus den Ozeanen freigesetzt und lässt sich darüber hinaus in Verbrennungsabgasen nachweisen (IARC 1977).

Ethylbromid und Ethyljodid werden in erster Linie als Alkylanzien in chemischen Synthesen eingesetzt, sowohl im Labor als auch zur Herstellung von Arzneimitteln und weiteren Substanzen (ECHA 2019, 2020 a; RÖMPP-Redaktion 2023).

Propylbromid wird als Lösungsmittel für Fette, Wachse oder Harze oder als Intermediat bei der Synthese von Pharmaka, Insektiziden, quartären Ammoniumverbindungen, Geschmacksstoffen oder Duftstoffen eingesetzt (Hartwig 2011). Propyljodid wird ebenfalls als Laborchemikalie vermarktet und ist als Substanz für die Herstellung pharmazeutischer Produkte registriert (ECHA 2018 b).

Butylbromid wird als Alkylanz bei der Herstellung von Arzneimitteln und Duftstoffen verwendet (RÖMPP-Redaktion 2023). Butyljodid dient der Einführung von Butylgruppen in der organischen Synthese (Pattenden 1991).

Die Hauptaufnahmewege für Methylchlorid, Methylbromid, Methyljodid, Ethylbromid sowie Propylbromid sind Atemtrakt und Haut. Butylbromid wird hauptsächlich über den Atemtrakt aufgenommen (IFA 2023). Die Ausscheidung findet zu einem geringen Teil durch Abatmung der unveränderten Substanzen statt, ein weiterer Teil wird oxidativ verstoffwechselt. Der Hauptstoffwechselweg verläuft über die Glutathion-S-Transferase (GSTT1-1)-vermittelte Konjugation des Alkylrests mit Glutathion. Aufgrund des genetischen Polymorphismus der GSTT1-1 gibt es schnelle und langsame Metabolisierer sowie Nicht-Metabolisierer. Das gebildete Alkylcystein wird anschließend mit dem Urin ausgeschieden (IFA 2023).

Chloralkylether Bis(chlormethyl)ether und Monochlordimethylether sind farblose, leichtflüchtige Flüssigkeiten, die in der organischen Synthese hauptsächlich für Alkylierungen verwendet werden (RÖMPP-Redaktion 2023). Bis(chlormethyl)ether wird als Reagenz in der Produktion von Plastik, Ionenaustauscherharzen und Polymeren eingesetzt. Monochlordimethylether wird industriell als Alkylierungsmittel und Lösungsmittel zur Herstellung von Dodecylbenzylchlorid, Hydrophobierungsmitteln, Ionenaustauscherharzen und Polymeren verwendet, sowie als Reagenz für Chlormethylierungen (NTP 2021).

Als besonders gefährliche krebserzeugende Stoffe dürfen sie in der chemischen Industrie in Deutschland nur in geschlossenen Anlagen hergestellt oder verwendet werden. Für Forschungs- und Analysezwecke darf mit beiden Substanzen in den dafür erforderlichen Mengen offen umgegangen werden (Bundesregierung Deutschland 2010). Bis(chlormethyl)ether und Monochlordimethylether werden vor allem über den Atemtrakt aufgenommen. Mit dermalen Bioverfügbarkeit ist nicht zu rechnen, da die Substanzen bei Hautkontakt vor bzw. während der Penetration abreaktieren (Hydrolyse und/oder Alkylierung von Gewebestandteilen). Es ist davon auszugehen, dass der Hauptanteil des aufgenommenen Bis(chlormethyl)ethers bzw. Monochlordimethylethers an der Eintrittsstelle in den Organismus praktisch sofort zu Formaldehyd und Salzsäure (Bis(chlormethyl)ether) bzw. Methanol, Formaldehyd und Salzsäure (Monochlordimethylether) hydrolysiert wird. Der nicht hydrolysierte inhalede Anteil kann systemisch aufgenommen werden, was unter anderem zur Bildung von Hämoglobin-Addukten (Hb-Addukten) führen kann.

N-Nitrosodialkylamine Die *N*-Nitrosodialkylamine (*N*-Nitrosodimethylamin, *N*-Nitrosodiethylamin, *N*-Nitrosomethylethylamin, *N*-Nitrosodi-*n*-propylamin, *N*-Nitrosodi-*n*-butylamin) werden nach der Gefahrstoffverordnung zu den besonders gefährlichen und hochpotenten krebserzeugenden Stoffen gezählt (AGS 2018). Aus diesem Grund besitzen sie keine technisch-industrielle Bedeutung. In reiner Form werden die genannten *N*-Nitrosodialkylamine nur zu wissenschaftlichen Zwecken hergestellt oder eingesetzt.

In Arbeitsbereichen, in denen *N*-Nitrosodialkylamine auftreten, entstehen diese unter bestimmten Reaktionsbedingungen prozessbedingt aus sekundären Aminen und nitrosierenden Agenzien. Dies ist unter anderem in der Metallindustrie und der chemischen Industrie, der Gummi- und der Lederindustrie sowie in Gießereien der Fall (AGS 2018).

Die gebildeten *N*-Nitrosodialkylamine können über die Atemwege und bei Hautkontakt auch dermal aufgenommen werden. Auch die Aufnahme von Vorläufern mit nachfolgender Nitrosierung *in vivo* kann zur beruflichen Belastung beitragen. Die aufgenommenen *N*-Nitrosodialkylamine werden vollständig resorbiert. Metabolisch werden u. a. hochreaktive Alkyldiazonium-Ionen gebildet, die biologische Makromoleküle (wie DNA, RNA und Proteine) alkylieren (IFA 2023).

Die Allgemeinbevölkerung kann über Nahrungs- und Genussmittel gegen die genannten *N*-Nitrosodialkylamine oder ihre Vorläufer exponiert sein.

Alkylalkansulfonate Ethylmethansulfonat, als ein Vertreter der Alkylalkansulfonate, ist eine farblose Flüssigkeit, die sich in Wasser unter Bildung von Ethanol und Methansulfonsäure zersetzt (Cumming und Walton 1970). Ethylmethansulfonsäure wird vor allem in der Molekularbiologie eingesetzt, um Punktmutationen zu erzeugen. Zudem kann es als produktionsbedingte Verunreinigung in dem antiviralen Arzneimittel Virazept® vorkommen und so bei Patienten zu einer Exposition führen. Bei Untersuchungen an Mäusen, Ratten und Affen stellten Lavé et al. (2009) fest, dass Ethylmethansulfonat nach oraler Aufnahme gut resorbiert wurde und dass die Menge der gebildeten Hb-Addukte proportional zur verabreichten Dosis anstieg.

Acrylnitril ist eine farblose, leichtflüchtige Flüssigkeit, die zur spontanen Polymerisation neigt (IFA 2023). Im Europäischen Wirtschaftsraum werden zwischen 1 000 000 t/a und 10 000 000 t/a hergestellt oder in diesen importiert (ECHA 2023 b). Mehr als die Hälfte des Acrylnitrils wird zur Produktion von Polyacrylnitrilfasern für die Textilindustrie verwendet, weitere 15 % zur Herstellung von Acrylnitril-Butadien-Styrol sowie Styrol-Acrylnitril-Copolymeren für die Autoindustrie eingesetzt. Auf die Herstellung von Acrylamid und Adiponitril werden weitere 15 % verwendet, während etwa 18 % in der Gummiindustrie sowie zur Produktion weiterer Polymere eingesetzt werden (EU 2004).

Die Allgemeinbevölkerung ist gegen Acrylnitril vor allem über das Rauchen exponiert (Scherer et al. 2022), wobei im Rauch einer Zigarette 3 bis 15 µg Acrylnitril nachgewiesen wurden (Hoffmann et al. 2001).

Am Arbeitsplatz wird Acrylnitril hauptsächlich inhalativ und dermal aufgenommen. Aufgenommenes Acrylnitril kann direkt oder nach Epoxidierung sowie unter Abspaltung der Cyanogruppe mit Glutathion reagieren und mit dem Urin ausgeschieden werden. Das durch Epoxidierung gebildete Cyanoethylenoxid reagiert als elektrophiles Agens auch mit körpereigenen Makromolekülen unter Adduktbildung (IFA 2023).

Acrylamid ist ein farbloser Feststoff, der zur spontanen Polymerisation neigt (IFA 2023). Im Europäischen Wirtschaftsraum werden zwischen 100 000 t/a und 1 000 000 t/a hergestellt oder in diesen importiert (ECHA 2023 a). Acrylamid wird vorwiegend für die Produktion von Polyacrylamiden eingesetzt, die als Dispersions- und Flockungsmittel unter anderem in der Trinkwasseraufbereitung Verwendung finden. Darüber hinaus werden hochmolekulare Polyacrylamide für verschiedene Zwecke chemisch modifiziert und danach als Ionentauscher, Verdickungsmittel oder Hilfsmittel in der Papierindustrie eingesetzt. Zudem wird Acrylamid bei der Synthese von Farben, als Copolymer für verschiedene Kunststoffe sowie als Abdichtungsmittel in der Bauindustrie benutzt. In Forschungslaboratorien wird Acrylamid zur Herstellung von Polyacrylamidgelen für die Elektrophorese verwendet (Schettgen 2006).

Acrylamid entsteht auch beim Erhitzen stärkehaltiger Lebensmittel mit geringem Wassergehalt (Tareke et al. 2002), so dass die Allgemeinbevölkerung über die Ernährung exponiert ist. Eine zusätzliche Exposition gegen Acrylamid ist durch das Rauchen gegeben (Scherer et al. 2022). Im Rauch einer Zigarette sind 0,24 bis 0,90 µg Acrylamid nachgewiesen worden (Esposito et al. 2022).

Acrylamid wird sowohl oral, dermal als auch inhalativ schnell resorbiert und aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit im gesamten Körper verteilt. Die Metabolisierung verläuft im Wesentlichen Glutathion-abhängig, wobei entweder Acrylamid direkt (unter Bildung von *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)cystein) oder nach vorheriger Epoxidierung zum Glycidamid umgesetzt wird. Das Epoxid bildet mit Glutathion *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein und *N*-Acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein. Sowohl Acrylamid als auch sein Epoxid können zudem mit Hämoglobin unter Adduktbildung reagieren (IFA 2023).

Diazomethan ist ein gelbes, chemisch instabiles Gas, das sich in Kontakt mit Wasser langsam zu Methanol und Stickstoff zersetzt (IFA 2023). Seine industrielle Anwendung ist durch die hohe Reaktivität und Toxizität begrenzt. Daher wird Diazomethan vor allem auf Laborebene als Methylierungsmittel eingesetzt (Greim 1997). In vitro konnte bei direkter Einwirkung von Diazomethan eine Methylierung der DNA nachgewiesen werden (Friedman et al. 1965; Kriek und Emmelot 1964). Die Methylierung weiterer Makromoleküle kann nicht ausgeschlossen werden (Greim 1997).

Die Kommission hat viele der alkylierenden Arbeitsstoffe bewertet. Monochlordimethylether und Bis(chlormethyl)ether sind von der Kommission in die Kanzerogenitäts-Kategorie 1 eingestuft. Acrylamid, Acrylnitril, Bromethan, 1-Brompropan, Benzylchlorid, Diazomethan, Dimethylsulfat, Diethylsulfat, Ethylenoxid, Iodmethan, sowie *N*-Nitrosodi-*n*-butylamin, *N*-Nitrosodiethylamin, *N*-Nitrosodimethylamin, *N*-Nitrosodi-*n*-propylamin und *N*-Nitrosomethylethylamin sind als Kanzerogene der Kategorie 2 und Brommethan, Chlorethan sowie Ethylen als Kanzerogene der Kategorie 3 eingestuft (DFG 2023).

Eine Übersicht über die Einstufungen der betrachteten alkylierenden Arbeitsstoffe durch die Kommission ist in [Tabelle 1](#) gegeben. Details können den toxikologisch-arbeitsmedizinischen Begründungen entnommen werden (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527600418>; <https://series.publisso.de/de/pgseries/overview/mak/dam>).

Tab. 1 Einstufung alkylierender Substanzen durch die Kommission

Arbeitsstoff	MAK-Wert	H-, S-Markierung	KanzKat	SchwGr	KmutKat	BW
Acrylamid		H; Sh	2		2	EKA
Acrylnitril		H; Sh	2			EKA
Benzylchlorid		H	2			
Bis(chlormethyl)ether			1			
Bromethan		H	2			
Brommethan	1 ml/m ³ Spzbg: I(2)		3	C		
1-Brompropan		H	2			
Chlormethan	10 ml/m ³ Spzbg: II(1)			D		
Diazomethan			2			
Diethylsulfat		H	2		2	
Dimethylsulfat		H	2			EKA
1,2-Epoxypropan	2 ml/m ³ Spzbg: I(2)	Sh	4	C		EKA
Ethylen			3			EKA nicht festgelegt
Ethylenoxid		H	2		2	EKA
Iodmethan		H	2			
Monochlordimethylether			1			
N-Nitrosodi- <i>n</i> -butylamin		H	2			
N-Nitrosodiethylamin		H	2			
N-Nitrosodimethylamin		H	2			
N-Nitrosodi- <i>n</i> -propylamin		H	2			
N-Nitrosomethylethylamin		H	2			

BW: Beurteilungswerte in biologischem Material (BAT/EKA/BLW/BAR); EKA: Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe; H: Gefahr durch Hautresorption; KanzKat: Kanzerogenitäts-Kategorie (siehe DFG 2023, Abschnitt III); KmutKat: Keimzellmutagenitäts-Kategorie (siehe DFG 2023, Abschnitt IX); MAK: maximale Arbeitsplatzkonzentration; SchwGr: Schwangerschaftsgruppe (siehe DFG 2023, Abschnitt VIII); Sh: Gefahr der Sensibilisierung der Haut; Spzbg: Spitzenbegrenzungs-Kategorie (Überschreitungsfaktor)

Alkylierende Verbindungen sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität bedeutende Gefahrstoffe. Bei den *n*-Alkylhalogeniden und den Benzylhalogeniden steigt die Stabilität der Halogen-Kohlenstoff-Bindung in der Reihe I < Br < Cl < F stark an, so dass aliphatische Fluorverbindungen keine alkylierende Aktivität aufweisen (van Sittert et al. 1996). Alkylierende Verbindungen reagieren als Elektrophile im Organismus u. a. mit den *N*-terminalen Aminosäuren von Peptiden und Proteinen. Die Addukte werden entweder durch nukleophile Substitution (z. B. Alkylhalogenide, Epoxide, Dialkylsulfate) oder durch 1,4-Addition (z. B. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen) gebildet (Törnqvist et al. 2002). Die nukleophile Substitutionsreaktion ist schematisch am Beispiel des Propylens und die Additionsreaktion am Beispiel des Acrylamids in [Abbildung 1](#) dargestellt.

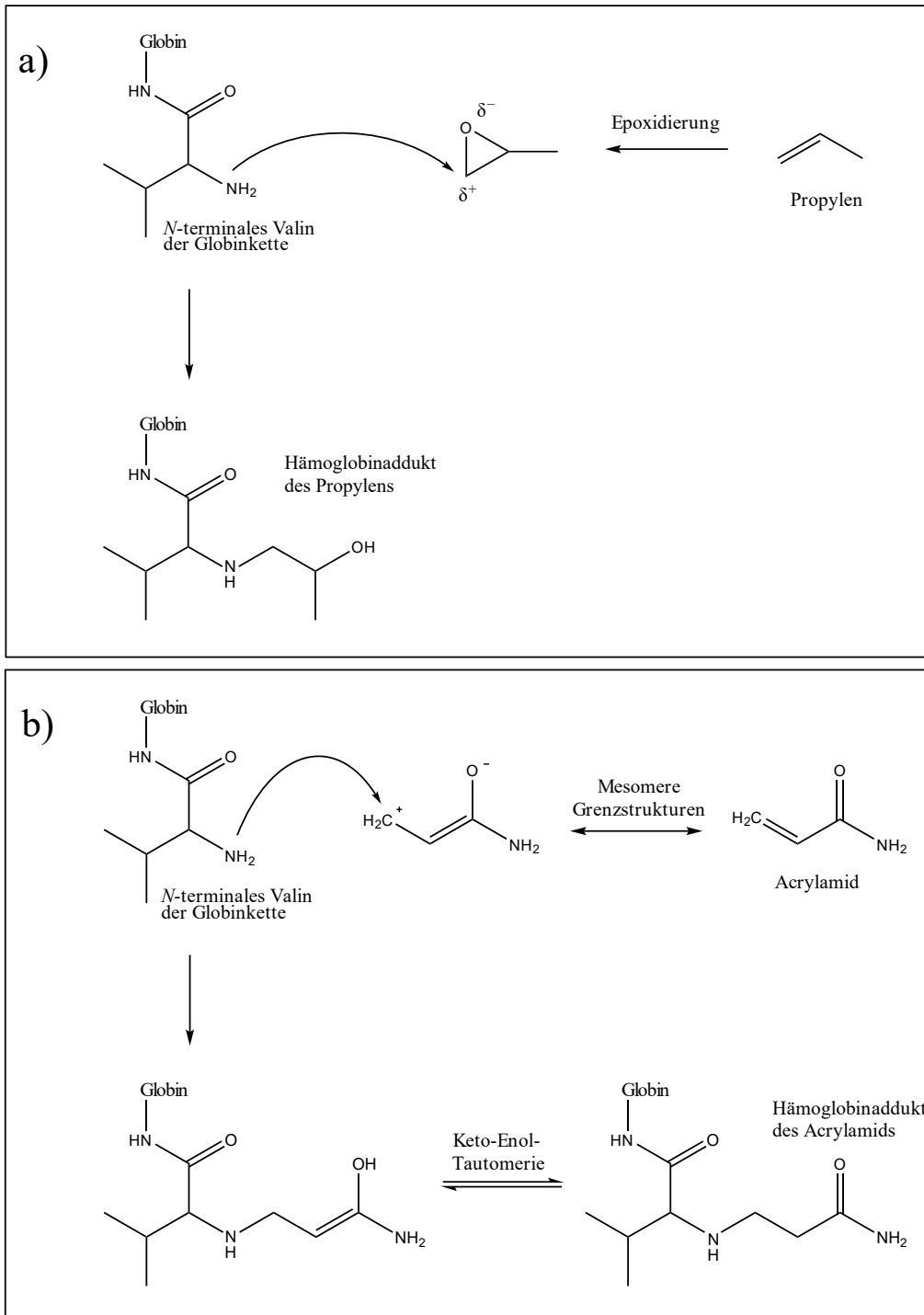


Abb. 1 Mechanismen der Adduktbildung am *N*-terminalen Valin des Hämoglobins: a) nukleophile Substitution am Beispiel des Propylens und b) Michael-Addition (1,4-Addition) am Beispiel des Acrylamids

Die Reaktionsprodukte der alkylierenden Substanzen mit dem Hämoglobin (Hb-Addukte) werden häufig für ein Biomonitoring zur Beurteilung von Expositionen herangezogen. Dabei handelt es sich um Addukte am *N*-terminalen Valin des Globins bzw. Hämoglobins, wobei das *N*-terminale Valin der β -Kette aufgrund seines niedrigeren pK_s -Wertes ($pK_s = 6,8$) etwas reaktiver ist, als das der α -Kette ($pK_s = 7,8$) (Törnqvist et al. 2002).

Die Stabilität des Hämoglobins wird durch die Adduktbildung nicht beeinflusst (Neumann et al. 1993) und da die gebildeten Hb-Addukte auch nicht repariert werden (Törnqvist und Landin 1995), wird ihre Eliminierung nur durch die Lebensdauer der Erythrozyten (ca. 120 Tage) bestimmt. Nach unfallartigen Ereignissen ist es in diesem Zeitraum aufgrund der Eliminationskinetik erster Ordnung auch möglich, auf die Höhe der ursprünglichen Gefahrstoffexposition rückzuschließen (Bader et al. 2012; Bader und Wrbitzky 2006; Leng und Gries 2014). Vorrangig stellen die Hb-Addukte aber Langzeitbiomarker dar, die die kumulative innere Exposition eines Gefahrstoffes über einen Zeitraum von etwa vier Monaten widerspiegeln und somit ein wichtiges und effektives Instrument für die Risikobeurteilung sind (Boogaard et al. 1999; Sabbioni und Day 2022; Törnqvist und Landin 1995). **Abbildung 2** zeigt die Strukturen der mit dieser Methode bestimmbaren Valinaddukte. In **Tabelle 2** sind exemplarisch Spiegel dieser Addukte bei beruflich belasteten Personen sowie der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung zusammengestellt.

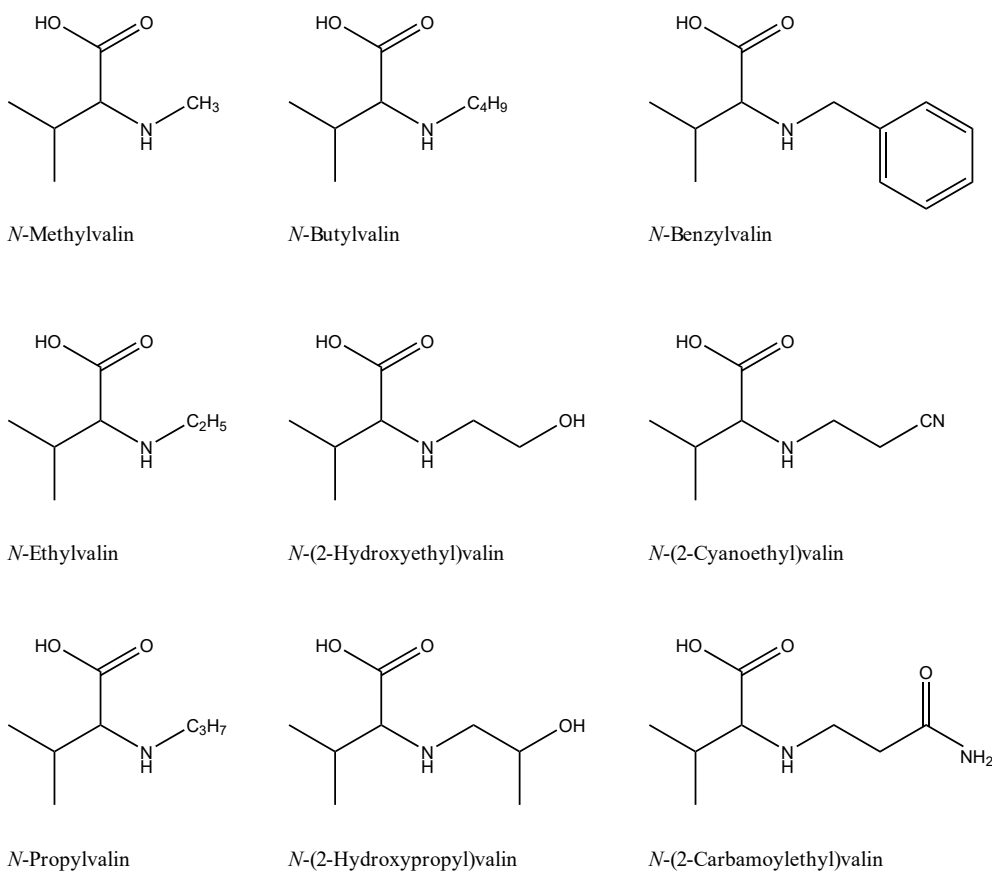


Abb. 2 Strukturformeln der mit dieser Methode bestimmbaren Addukte

Tab. 2 Hb-Adduktspiegel bei beruflich belasteten Personen sowie bei Personen der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung

Studienkollektiv	Personenanzahl und Raucherstatus	Arbeitsstoff	Analyt	Adduktspiegel [pmol/g Globin]		Literatur
				Mittelwert (±SD)	Bereich	
Tensidherstellung für die Textilindustrie	Arbeiter (38 R; 24 NR)	Dimethylsulfat	N-Methylvalin	609 ^{a)}	n. a.–9697	Schettgen et al. 2004
	Kontrollen (2 R; 8 NR)	–		509 ^{a)}	n. a.–677	
Allgemeinbevölkerung	45 R	–	N-Methylvalin	997 ± 203	–	Carmella et al. 2002
	29 NR			904 ± 149	–	
Allgemeinbevölkerung	39 R	–	N-Ethylvalin	3,76 ± 2,77	–	
	28 NR			2,50 ± 1,65	–	
Arbeitsplätze mit möglicher Propylenoxidexposition	Arbeiter (18)	Propylenoxid	N-(2-Hydroxypropyl)-valin	10 ^{a)}	0–18	Ball et al. 2005
Styrolherstellung (SMPO-Verfahren)	Arbeiter vor Anlagenwartung (27)	Propylenoxid	N-(2-Hydroxypropyl)-valin	40,2 ± 8,0	–	Boogaard et al. 1999
	Arbeiter nach Anlagenwartung (19)			45,3 ± 8,0	–	
Glykol- und Glykoetherherstellung	Arbeiter (20)	Ethylenoxid	N-(2-Hydroxyethyl)-valin	92 ± 25	12–320	
	Kontrollen (23 NR)	–		22 ± 5	6–49	
Allgemeinbevölkerung	26 R	–	N-(2-Hydroxyethyl)-valin	200 ± 113	38–501	Bailey et al. 1988
	23 NR			52,1 ± 20,5	22–106	
Exposition gegen Ethylenoxid nach Unfall	Arbeiter (5 R; 1 NR)	Ethylenoxid	N-(2-Hydroxyethyl)-valin	1210 ± 777 ^{c)}	522–2396 ^{c)}	Bader et al. 2012
				177 ± 85 ^{d)}	30–276 ^{d)}	
Exposition gegen Ethylen nach Unfall	Arbeiter und Einsatzkräfte (863)	Ethylen	N-(2-Hydroxyethyl)-valin	99 ^{b)}	< BG ^{b)} –949	Leng und Gries 2014
Exposition gegen Acrylnitril nach Unfall	Arbeiter und Einsatzkräfte (863)	Acrylnitril	N-(2-Cyanoethyl)valin	98 ^{b)}	< BG ^{b)} –1924	
Polymerisationsanlage	Arbeiter Instandhaltung (9 NR)	Acrylnitril	N-(2-Cyanoethyl)valin	1984 ± 2066	93,9–5746	Tavares et al. 1996
	Arbeiter kontinuierliche Polymerisation (7 NR)			2276 ± 1338	635–4604	
	Kontrollen (Büro) (11 NR)			–	31,1 ± 18,5	
Allgemeinbevölkerung, Veganer	6 NR	–	N-Benzylvalin	0,22 ^{a)}	0,06–0,37	Gauch et al. 2022
	6 R			0,09 ^{a)}	0,05–0,14	
Allgemeinbevölkerung, Veganer	6 NR	–	N-(2-Carbamoylethyl)-valin	25,9 ^{a)}	16,4–41,9	
	6 R			69,0 ^{a)}	22,0–770	
Tunnelbau, chemische Verpressung	Arbeiter (210)	Acrylamid, N-Methylolacrylamid	N-(2-Carbamoylethyl)-valin	–	< 80–17700	Hagmar et al. 2001
	Kontrollen (18 NR)	–	–	–	20–70	

BG: Bestimmungsgrenze; NR: Nichtraucher; R: Raucher; SMPO: Styrolmonomer und Propylenoxid

^{a)} Median

^{b)} Werte < BG (für N-(2-Hydroxyethyl)valin: 86 pmol/g Globin, für N-(2-Cyanoethyl)valin: 41 pmol/g Globin) wurden als BG/2 in die Berechnung einbezogen

^{c)} Probenahme Tag 1–4 nach Exposition

^{d)} Probenahme Tag 162–166 nach Exposition

3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren beruht auf der Methode von van Sittert (1996) und erfasst in einem Analysenlauf die Adduktspiegel der *N*-terminalen Hb-Addukte *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin, *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoyl)ethylvalin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes.

Zur Bestimmung der Addukte des *N*-terminalen Valins im Hämoglobin werden die Erythrozyten vom Vollblut abgetrennt und lysiert. Das Globin wird aus der Hämoglobininlösung ausgefällt und die alkylierten *N*-terminalen Valine werden unter Zusatz von *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilid als internem Standard mit Pentafluorphenylisothiocyanat derivatisiert und durch einen modifizierten Edman-Abbau abgespalten. Die entstandenen Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate werden mit *tert*-Butylmethylether extrahiert, gewaschen und die aufgearbeiteten Proben mittels GC-EI-MS/MS bestimmt. Zur Kalibrierung wird Poolglobin von beruflich nicht belasteten Nichtrauchern eingesetzt, das mit Lösungen von Dipeptidstandards versetzt wird, die die addukttragenden letzten beiden *N*-terminalen Aminosäuren der Hämoglobinkette simulieren und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- GC-MS/MS-System (z.B. Bruker 456) mit CTC PAL-Autosampler und Bruker EVOQ TQ-MS sowie Steuerungs- und Auswertesoftware (Bruker Corporation, Billerica, USA)
- Kapillartrennsäule (z.B. Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Nr. 13623, Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe) oder DB-5ms Ultra Inert, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Nr. 122-5532UI, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) oder Optima 5 HT, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Nr. REF 726106.30, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren))
- EDTA-Monovetten[®] mit Kanülen (z.B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Analysenwaage (z.B. Sartorius AG, Göttingen)
- Kreisschüttler (z.B. Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Laborzentrifuge (z.B. ROTANTA 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Labortiefkühlschrank (≤ -18 °C)
- Schüttelwasserbad (z.B. JULABO GmbH, Seelbach)
- Laborschüttler (z.B. VXR basic Vibrax[®], IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen) mit Schüttleraufsatz für Reagenzgläser (z.B. VX 2, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
- Stickstoffevaporator (z.B. Nr. C103199, TurboVap[®] LV, Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden)
- Wasseraufbereitungsanlage (z.B. Milli-Q[®] IQ 7000 Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Dispensette[®] III, 2,5–25 ml (z.B. Nr. 4700 150, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Dispensette[®] III, 1–10 ml (z.B. Nr. 4700 140, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Dispensette[®] III, 0,2–2 ml (z.B. Nr. 4700 120, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Multipette[®] mit CombiTips[®] (z.B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Variable Pipette, 1–100 µl mit passenden Pipettenspitzen (z.B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Transferpipetten, 3,5 ml (z.B. Nr. 86.1171, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 10-ml-, 100-ml- und 1000-ml-Messkolben (z.B. witeg Labortechnik GmbH, Wertheim)
- Eindampfröhrchen, 5 ml (z.B. Nr. 55.526, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

- 15-ml-Reagenzgläser mit Gewinde (z. B. Nr. 3561103, schuett-biotec GmbH, Göttingen)
- Teflonkaschierte Schraubverschlüsse, 18 mm (z. B. Nr. 2924011, Duran[®], Schott AG, Mainz)
- 50-ml-Zentrifugenröhrchen (z. B. Nr. 62.548.004, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Reagenzgläser, 10 ml (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Silopren[™]-Stopfen, 12,5 mm × 16,5 mm × 20 mm (z. B. A. Vogt GmbH & Co. KG, Arnsherg)
- Rollrandflasche, N 8, 200 µl (z. B. Nr. 70286, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- Bördelkappen, N 8 (z. B. Nr. 702025, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)

4.2 Chemikalien

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

Referenzmaterialien

- *N*-Methylvalin-Leucin-Anilid (z. B. Nr. 4019919, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-Ethylvalin-Leucin-Anilid (z. B. Auftragssynthese, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N-n*-Propylvalin-Leucin-Anilid (Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen)
- *N-n*-Butylvalin-Leucin-Anilid (z. B. Auftragssynthese, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-((*R,S*)-2-Hydroxypropyl)valin-Leucin-Anilid (z. B. Nr. 4025561, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-(2-Hydroxyethyl)valin-Leucin-Anilid (z. B. Nr. 4025019, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-(2-Cyanoethyl)valin-Leucin-Anilid (z. B. Nr. 4019925, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-Benzylvalin-Leucin-Anilid (z. B. Auftragssynthese, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-(2-Carbamoylethyl)valin-Leucin-Anilid (z. B. Nr. 4025471, Bachem Biochemica, Heidelberg)
- *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilid (z. B. Auftragssynthese, Bachem Biochemica, Heidelberg)

Sonstige Chemikalien

- *tert*-Butylmethylether (z. B. Nr. 177040010, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Ethanol (z. B. Nr. 100983, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethylacetat (z. B. Nr. 07137, Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
- Formamid (z. B. Nr. F-7503, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumcarbonat (z. B. Nr. 71351, Fluka[™] von Honeywell Deutschland Holding GmbH, Offenbach)
- Natriumchlorid (z. B. Nr. 106404, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natronlauge, 1 mol/l (z. B. Nr. 109137, Merck KGaA, Darmstadt)
- Pentafluorphenylisothiocyanat (z. B. Nr. 76755, Fluka[™] von Honeywell Deutschland Holding GmbH, Offenbach)
- 2-Propanol, ≥ 99,8 % (z. B. Nr. 33539-M, Merck KGaA, Darmstadt)
- Salzsäure, 1 mol/l (z. B. Nr. 109057, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Toluol (z. B. Nr. 1.08389, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- Helium 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)
- Argon 5.3 (z. B. Linde GmbH, Pullach)
- Stickstoff (z. B. Linde GmbH, Pullach)

4.3 Lösungen

- Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)
9 g Natriumchlorid werden in einen 1000-ml-Messkolben eingewogen. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist drei Monate haltbar.

- Natriumcarbonat-Lösung (0,1 mol/l)
1,06 g Natriumcarbonat werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist drei Monate haltbar.

- Salzsäures 2-Propanol (50 mmol/l)
In einen 1000-ml-Messkolben werden etwa 500 ml 2-Propanol vorgelegt und 50 ml Salzsäure (1 mol/l) zugegeben. Der Messkolben wird anschließend mit 2-Propanol bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist ein Jahr haltbar.

- Ammoniakfreies Formamid (pH \approx 7)
Sofern erforderlich werden durch Entgasen mit Stickstoff flüchtige Amine und freies Ammoniak aus dem Formamid ausgetrieben. Dazu wird für mindestens eine Stunde Stickstoff über eine Metallfritte eingeleitet. Ein angefeuchtetes Lackmuspapier darf im Dampfraum keine flüchtigen alkalischen Verbindungen mehr anzeigen.

4.4 Vergleichsstandards

- *N*-Methylvalin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-Methylvalin/l)
19,2 mg *N*-Methylvalin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-Ethylvalin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-Ethylvalin/l)
20,0 mg *N*-Ethylvalin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-Propylvalin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-Propylvalin/l)
20,9 mg *N*-Propylvalin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-Butylvalin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-Butylvalin/l)
21,7 mg *N*-Butylvalin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-((*R,S*)-2-Hydroxypropyl)valin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-((*R,S*)-2-Hydroxypropyl)valin/l)
21,8 mg *N*-((*R,S*)-2-Hydroxypropyl)valin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-(2-Hydroxyethyl)valin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-(2-Hydroxyethyl)valin/l)
21,0 mg *N*-(2-Hydroxyethyl)valin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-(2-Cyanoethyl)valin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-(2-Cyanoethyl)valin/l)
21,5 mg *N*-(2-Cyanoethyl)valin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

- *N*-Benzylvalin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-Benzylvalin/l)
23,7 mg *N*-Benzylvalin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- *N*-(2-Carbamoylethyl)valin-Leucin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-(2-Carbamoylethyl)valin/l)
22,6 mg *N*-(2-Carbamoylethyl)valin-Leucin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Dotierlösung I (6 µmol/l)
Je 0,1 ml der neun Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Dotierlösung II (0,6 µmol/l)
1 ml der Dotierlösung I wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Dotierlösung III (0,06 µmol/l)
0,1 ml der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die ethanolischen Lösungen der Referenzsubstanzen sind bei –18 °C mindestens ein Jahr haltbar (Schettgen et al. 2016).

4.5 Interne Standards (ISTDs)

- *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilid-Stammlösung (0,6 mmol *N*-(2-Ethoxyethyl)valin/l)
20,1 mg *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- ISTD-Dotierlösung (6 µmol *N*-(2-Ethoxyethyl)valin/l)
1 ml der *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilid-Stammlösung werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die ethanolischen Lösungen des internen Standards sind bei –18 °C mindestens ein Jahr haltbar (Schettgen et al. 2016).

4.6 Kalibrierstandards

Jeweils 100 mg (± 5 mg) Poolglobin von beruflich nicht belasteten Nichtrauchern werden in 50-ml-Röhrchen eingewogen und in 1,5 ml ammoniakfreiem Formamid gelöst. Zu diesen Lösungen werden die einzelnen Dotierlösungen nach dem in [Tabelle 3](#) gegebenen Schema hinzupipettiert. Die Kalibrierstandards werden anschließend entsprechend den Proben aufgearbeitet, beginnend mit der Zugabe von Natronlauge und Derivatisierungsreagenz (siehe [Abschnitt 5.2](#)). Nach weiterer Aufarbeitung werden sie gemäß [Abschnitt 6](#) analysiert.

Solange die in jeder analytischen Serie mitgeführten Qualitätskontrollproben unauffällig sind und ansonsten nichts am Messgerät geändert wurde (wie beispielsweise Kürzen der Säule), muss nicht arbeitstäglich kalibriert werden.

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin, *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Dotierlösung III [µl]	ISTD-Dotierlösung [µl]	Adduktspiegel [pmol/g Globin]
0	–	–	–	100	0
1	–	–	25	100	15
2	–	–	50	100	30
3	–	–	100	100	60

Tab. 3 (Fortsetzung)

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Dotierlösung III [µl]	ISTD-Dotierlösung [µl]	Adduktspiegel [pmol/g Globin]
4	–	20	–	100	120
5	–	30	–	100	180
6	–	75	–	100	450
7	12,5	–	–	100	750
8	30	–	–	100	1800
9	75	–	–	100	4500

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Nach Desinfektion der Punktionsstelle werden mit Hilfe einer EDTA-Monovette® 5 ml venöses Vollblut entnommen. Das Entnahmeröhrchen wird direkt nach Blutentnahme mehrmals umgeschwenkt. Anschließend wird die Blutprobe 10 min bei $800 \times g$ zentrifugiert, um die Erythrozyten vom Blutplasma zu trennen. Der Plasmaüberstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Die Erythrozytenfraktion wird mit 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung versetzt, mehrmals umgeschwenkt und erneut für 10 min bei $800 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Dieser Waschvorgang wird wiederholt, bis der Überstand klar und farblos ist. Frische Blutproben müssen erfahrungsgemäß dreimal gewaschen werden.

Zur Hämolyse werden die Erythrozyten anschließend in 2,5 ml hochreinem Wasser aufgenommen und für mindestens 60 min bei -18°C eingefroren.

5.2 Probenaufbereitung

Isolierung des Globins

Etwa 2,5 ml Erythrozytenlysat werden in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und 15 ml des salzsauren 2-Propanols zugegeben. Nach kurzem Schütteln wird die Probe für 10 min bei $3300 \times g$ und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt und das Globin durch Zusatz von 10 ml Ethylacetat ausgefällt.

Um eine vollständige Fällung zu gewährleisten, wird mindestens 15 min gewartet und die Suspension kurz aufgeschüttelt. Die Prüfer der Methode empfehlen, die Probe mindestens eine Stunde im Kühlschrank stehenzulassen und erst dann kräftig zu schütteln, um eine vollständige Globinfällung zu erreichen. Anschließend wird die Probe bei $2500 \times g$ und 10°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert und verworfen. Das Globinpellet wird zweimal, gegebenenfalls auch drei- bis viermal, mit jeweils 10 ml Ethylacetat gewaschen, bis der Überstand farblos ist. Die Prüfer der Methode haben nach den Waschschrinen mit Ethylacetat einen weiteren Waschschrin mit 5 ml *n*-Hexan eingefügt. Bei den Waschschrinen muss darauf geachtet werden, dass das Pellet auf dem Kreisschüttler gut resuspendiert wird, bevor die Probe für 5 min bei $2500 \times g$ und 10°C zentrifugiert wird. Der Überstand wird jeweils dekantiert und das Pellet schließlich über Nacht im Abzug trocknen gelassen.

Derivatisierung des Globins

In ein Gewindereagenzglas werden 100 mg (± 5 mg) Globin eingewogen und mit 1,5 ml ammoniakfreiem Formamid versetzt. Um eine homogene Lösung zu erhalten wird die Probe für 15 min auf dem Laborschüttler geschüttelt. Anschließend werden 100 µl der ISTD-Dotierlösung, 40 µl Natronlauge (1 mol/l), sowie 20 µl Pentafluorphenylisothiocyanat zur

Lösung pipettiert. Die Probe wird durchmischt und anschließend eine Stunde bei 80 °C im Schüttelwasserbad temperiert. In diesem Inkubationsschritt wird durch modifizierten Edman-Abbau die endständige Aminosäure des Globins abgespalten. Dabei erfolgt zunächst die Reaktion des addukttragenden *N*-terminalen Valins mit Pentafluorphenylisothiocyanat zu einem Thiocarbamoylderivat. Unter Abspaltung der Globinkette erfolgt dann die Zyklisierung des Thiocarbamoylderivats zum Thiazolinderivat. Dieses wird letztlich durch Erhitzen in ein stabileres Pentafluorphenylthiohydantoin umgelagert (Abbildung 3) und stellt den Analyt dar.

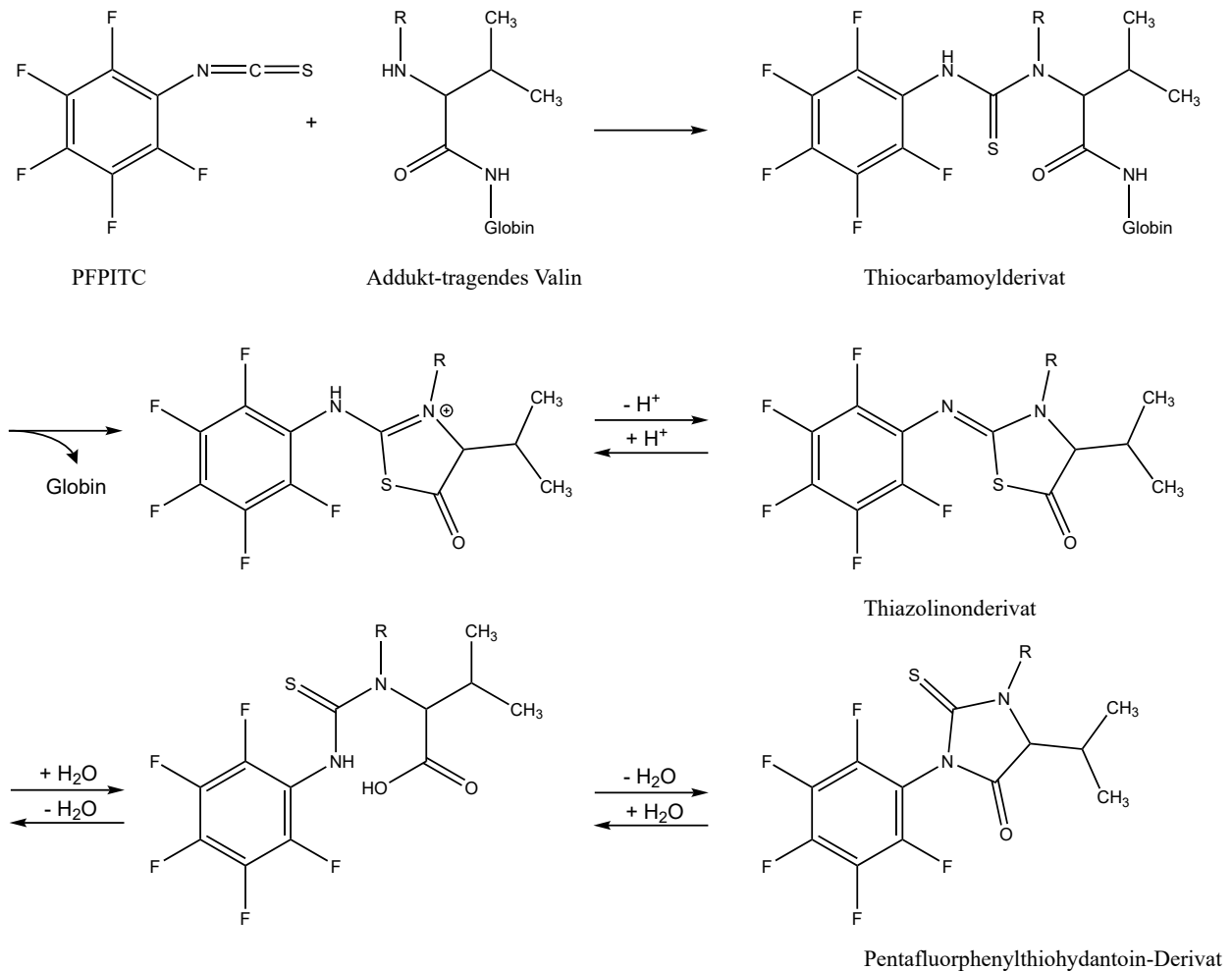


Abb. 3 Mechanismus des modifizierten Edman-Abbaus

Extraktion und Reinigung

Nach Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wird diese mit Natriumchlorid gesättigt und zweimal mit 3 ml *tert*-Butylmethylether extrahiert. Zur besseren Phasendurchmischung wird die Probe jeweils für 10 min auf einem Laborschüttler geschüttelt (2500 rpm). Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation der Probe für 5 min bei $2500 \times g$ und 10 °C. Die Etherphasen werden in einem Reagenzglas vereinigt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Dies dauert bei einem Gasstrom von 1,6 l/min und 35 °C etwa 20 min.

Der hellbraune Rückstand wird in 500 µl Toluol gelöst und zuerst mit 2 ml hochreinem Wasser (Milli-Q®) und anschließend mit 2 ml Natriumcarbonat-Lösung (0,1 mol/l) gewaschen. Dazu wird die Probe jeweils für 10 min auf

dem Laborschüttler gut durchmischt und nach jedem Waschschrift für 5 min bei 2500 × g und 10 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase des ersten Waschschrifts wird verworfen. Nach dem zweiten Waschschrift wird die Toluolphase wasserfrei abgenommen und in ein 5-ml-Eindampfröhrchen überführt.

Unter Stickstoffstrom wird die Lösung zur Trockene eingengt (etwa 20 min bei 1,6 l/min und 45 °C). Der hellbraune Rückstand wird in 100 µl Toluol aufgenommen, vollständig gelöst und die Lösung in ein 200 µl Rollrandfläschchen überführt. Von der so aufgearbeiteten Probe wird 1 µl in das GC-MS/MS-System injiziert.

5.3 Probenlagerung

Die Abtrennung der Erythrozyten vom Blutplasma muss möglichst sofort nach der Blutabnahme erfolgen, da nur die Abtrennung intakter Erythrozyten die Anwendbarkeit der Methode gewährleistet. Die Erythrozytenlysate sollten direkt zur Isolierung des Globins verwendet werden. Eine Lagerung der Erythrozytenlysate kann selbst bei Lagerungstemperaturen < -18 °C zu einer Bildung von Artefakten führen (siehe [Abschnitt 11.4](#)). Im Gegensatz dazu kann das trockene, isolierte Globin bei -18 °C mindestens drei Monate gelagert werden.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem CTC PAL-Autosampler und einem Bruker 456-Gaschromatographen gekoppelt mit einem Bruker EVOQ TQ-MS.

6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Rxi-5Sil MS (5 % Diphenyl/95 % Dimethylpolysiloxan)
	Länge:	30 m
	Innendurchmesser:	0,25 mm
	Filmstärke:	0,25 µm
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 80 °C, 1 min isotherm, dann Anstieg mit 15 °C/min auf 220 °C, dann Anstieg mit 5 °C/min auf 265 °C, dann Anstieg mit 20 °C/min auf 280 °C, 2 min bei Endtemperatur
	Injektor:	280 °C
	Transfer-Line:	280 °C
Trägergas:	Helium 5.0	Flussrate: 1,4 ml/min, konstant
Injektion:	Injektionsvolumen:	1 µl (pulsed, 16 psi für 60 s), 1 min splitlos; dann 4 min Split 1 : 100, anschließend Split 1 : 25
Septumspülung:		3 ml/min
Purge time:		1 min off

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	EI+
Filament:	40 µA
Elektronenenergie:	70 eV
Kollisionsgas:	Argon 5.3 (2 mTorr)
Quellentemperatur:	250 °C

Elektronenmultiplier:	1200 V–2000 V
Betriebsart:	Single Reaction Monitoring (SRM)
Kalibriergas:	PFTBA (FC-43)

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das von ihm eingesetzte System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter sind für das hier verwendete System bestimmt und optimiert worden.

In [Tabelle 4](#) sind die Retentionszeiten und die SRM-Übergänge für die einzelnen Analyten aufgeführt. Die Retentionszeiten sind Orientierungswerte, die sich aufgrund von Säulenverkürzung oder -charge ändern können.

Tab. 4 Retentionszeiten und SRM-Parameter für die untersuchten Analyten und den internen Standard

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [<i>m/z</i>]		Kollisionsenergie (CE) [V]
		Q1	Q3	
N-Methylvalin	10,70	338	295,8	12
N-Ethylvalin	10,81	352	309,8	12
N-Propylvalin	11,32	366	351,6	10
N-Butylvalin	11,93	380	364,9	15
N-(2-Ethoxyethyl)valin (ISTD)	12,20	396	334,9	18
N-(2-Hydroxypropyl)valin	12,66	364	321,9	12
N-(2-Hydroxyethyl)valin	12,99	308	193,9	22
N-(2-Cyanoethyl)valin	13,11	377	281,9	18
N-Benzylvalin	15,31	414	91,0	18
N-(2-Carbamoylethyl)valin	16,02	378	362,9	12

Von den Prüfern der Methode wurden zusätzliche Fragmentierungen als Qualifier ermittelt. Da das verwendete GC-MS/MS-System mit dem von den Methodenentwicklern verwendeten System vergleichbar aber nicht identisch war (Shimadzu AOC-20i/s-Gaschromatograph mit Rxi-5Sil MS-Säule (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe) und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Shimadzu TQ-8050, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)), wurden Kollisionsenergie und Dwell time für das von den Prüfern der Methode verwendete GC-MS/MS-System separat optimiert (siehe [Tabelle 5](#)).

Tab. 5 Retentionszeiten und MRM-Parameter für die untersuchten Analyten und internen Standards (Daten aus der Methodenprüfung)

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [<i>m/z</i>]		Status	Kollisionsenergie (CE) [V]	Dwell time [ms]
		Q1	Q3			
N-Methylvalin	7,006	338,0	296,1	Quantifier	9	48,3
			310,0	Qualifier	9	
			277,0	Qualifier	21	
N-Ethylvalin	7,118	352,0	310,2	Quantifier	9	48,7
			56,2	Qualifier	21	
			324,0	Qualifier	6	
N-Propyl- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N-Valin (ISTD) ^{a)}	7,609	372,0	356,1	Quantifier	12	48,7
			314,3	Qualifier	21	
			326,7	Qualifier	6	

Tab. 5 (Fortsetzung)

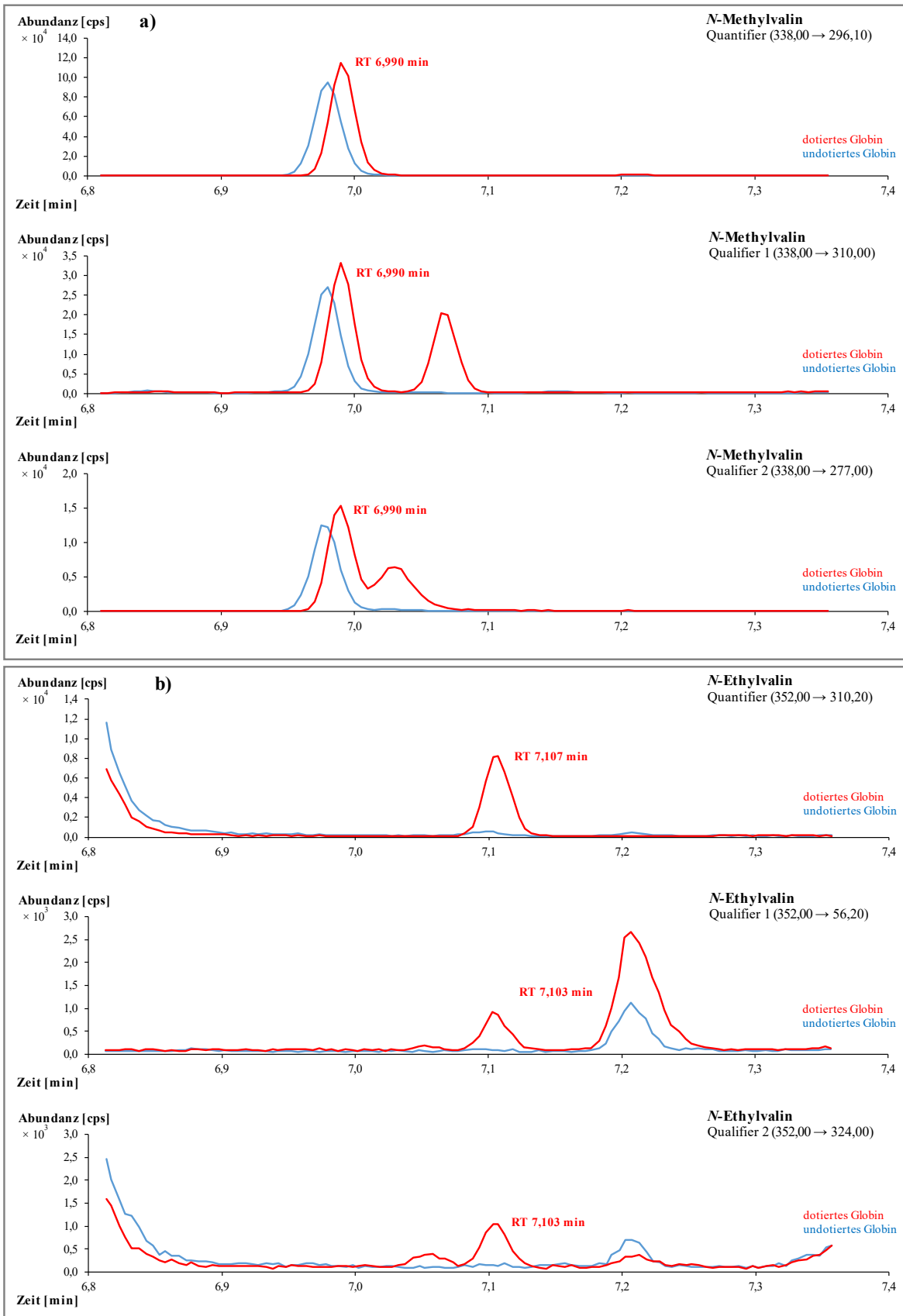
Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [<i>m/z</i>]		Status	Kollisionsenergie (CE) [V]	Dwell time [ms]
		Q1	Q3			
N-Propylvalin	7,612	366,0	351,2	Quantifier	6	48,7
			308,7	Qualifier	21	
			324,2	Qualifier	6	
N-Butylvalin	8,331	380,0	365,2	Quantifier	15	48,7
			347,4	Qualifier	6	
			309,2	Qualifier	24	
N-(2-Ethoxyethyl)valin (ISTD)	8,572	396,0	334,7	Quantifier	15	48,7
			73,1	Qualifier	6	
			307,8	Qualifier	12	
N-(2-Hydroxypropyl)valin-1	9,136	364,0	322,1	Quantifier	9	32,0
			349,0	Qualifier	18	
			274,9	Qualifier	21	
N-(2-Hydroxypropyl)valin-2	9,171	364,0	322,1	Quantifier	9	32,0
			349,0	Qualifier	18	
			274,9	Qualifier	21	
N-(2-Hydroxyethyl)valin	9,474	308,0	194,0	Quantifier	24	32,0
			86,9	Qualifier	24	
			60,0	Qualifier	24	
N-(2-Cyanoethyl)valin	9,663	377,0	335,1	Quantifier	18	32,0
			54,1	Qualifier	15	
			282,3	Qualifier	6	
N-Benzylvalin	12,017	414,0	91,1	Quantifier	21	98,7
			372,1	Qualifier	9 ^{b)}	
			173,2	Qualifier	18 ^{b)}	
N-(2-Carbamoylethyl)valin	12,648	378,0	363,1	Quantifier	9	98,7
			55,1	Qualifier	21	
			309,0	Qualifier	21	

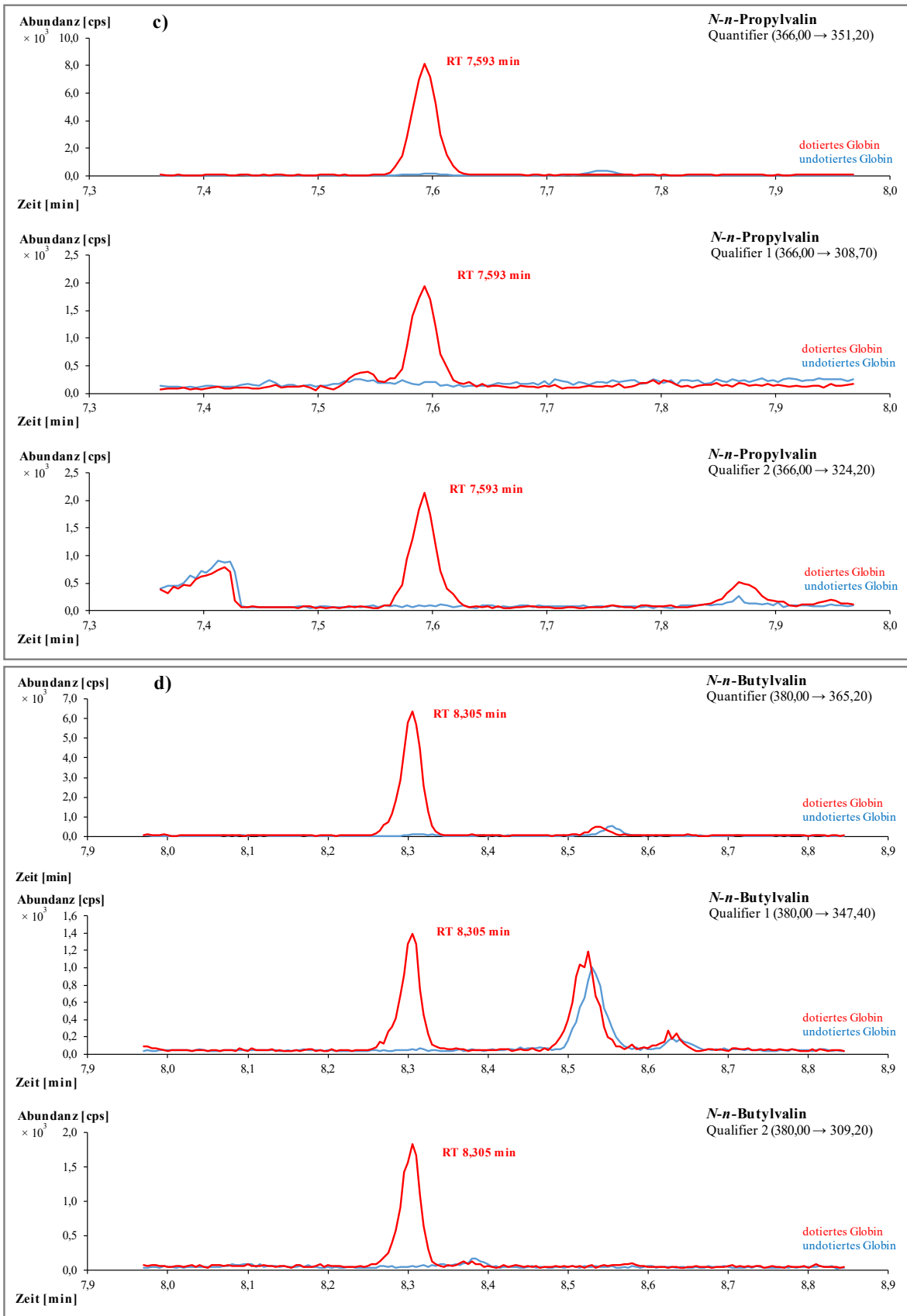
a) von den Prüfern der Methode zusätzlich verwendeter ISTD (siehe Abschnitt 12)

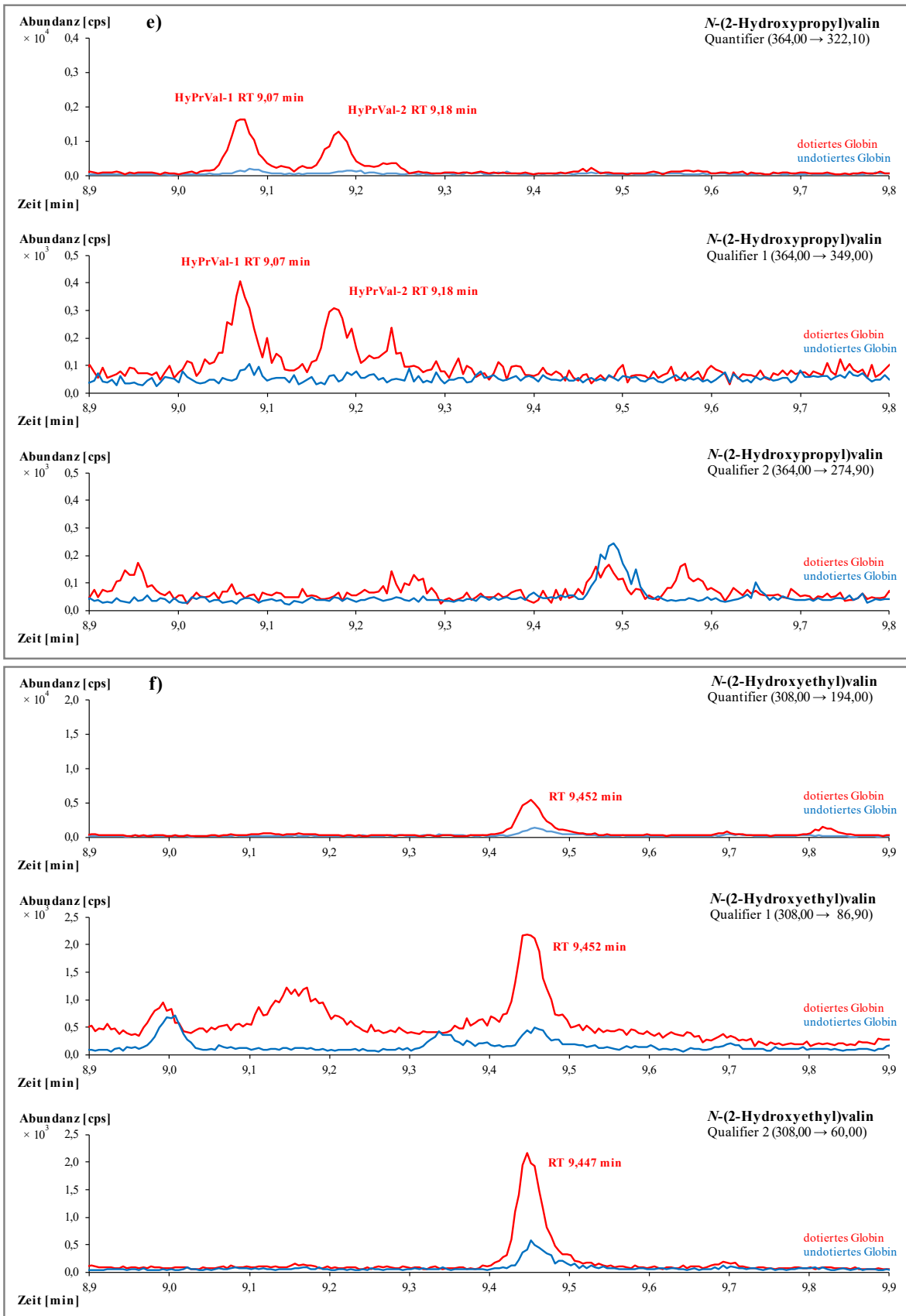
b) bei niedrigen Adduktspiegeln können beide Qualifier nicht gut integriert werden

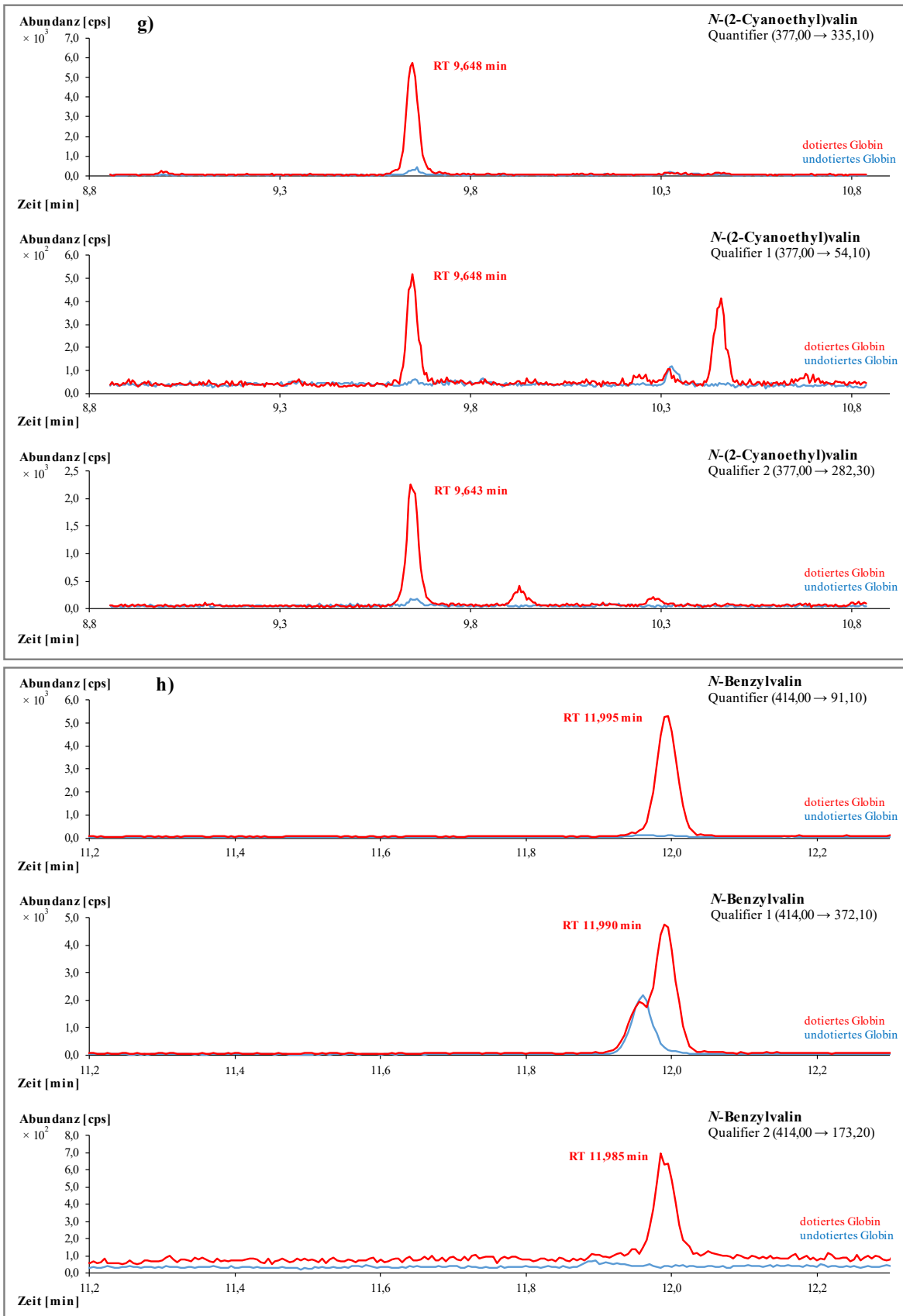
7 Analytische Bestimmung

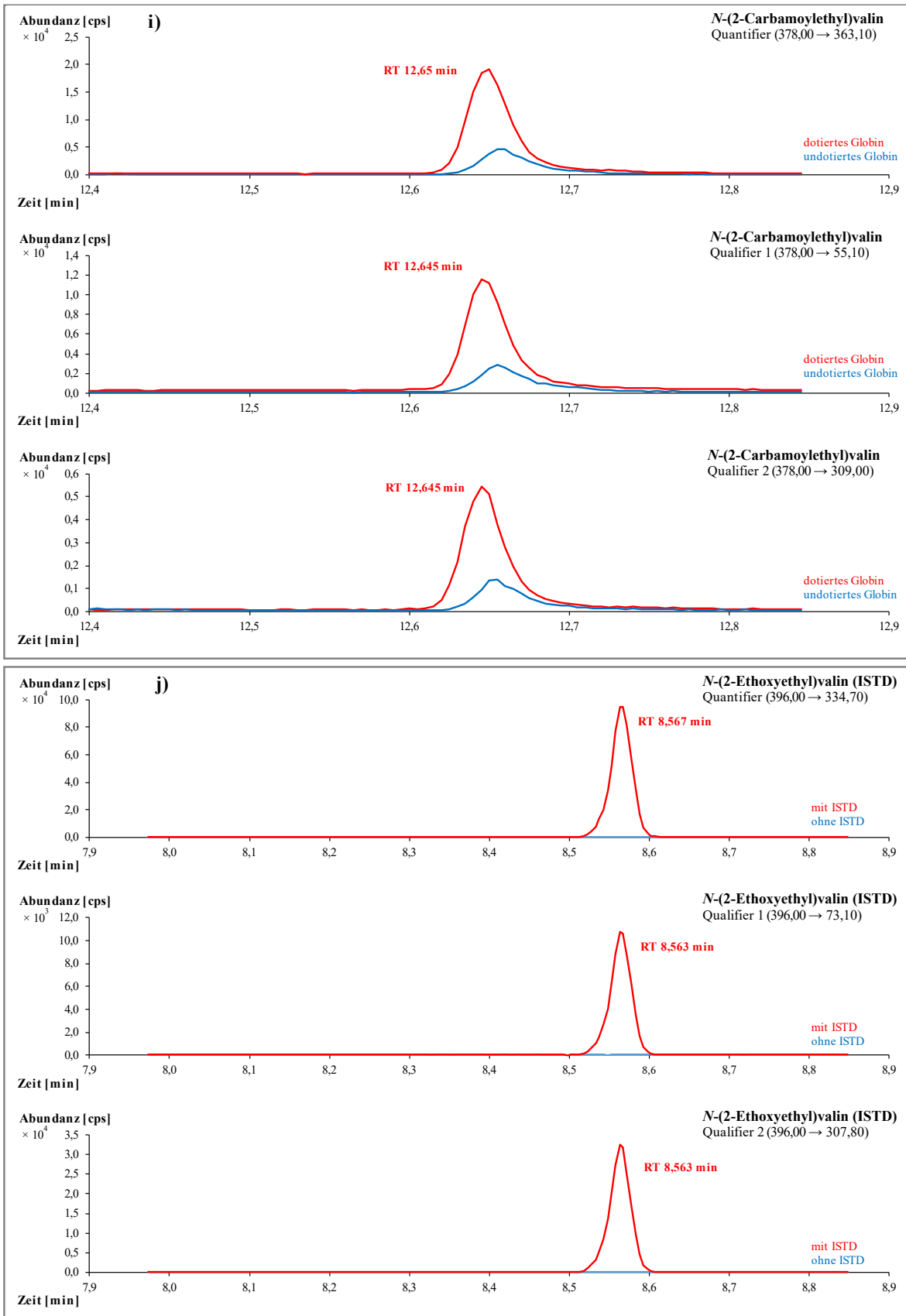
Die angegebenen Geräteparameter werden eingestellt und 1 µl der zu analysierenden Probe in das GC-MS/MS-System injiziert. Exemplarische Chromatogramme für die einzelnen Analyten sind in [Abbildung 4](#) dargestellt (Chromatogramme aus der externen Methodenprüfung). Die Adduktspiegel der dotierten Globine liegen bei 30 pmol/g Globin (N-(2-Hydroxypropyl)valin und N-Benzylvalin), 50 pmol/g Globin (N-Ethylvalin, N-Propylvalin, N-Butylvalin), 60 pmol/g Globin (N-(2-Cyanoethyl)valin), 70 pmol/g Globin (N-(2-Hydroxyethyl)valin), 100 pmol/g Globin (N-(2-Carbamoylethyl)valin) und 170 pmol/g Globin (N-Methylvalin).











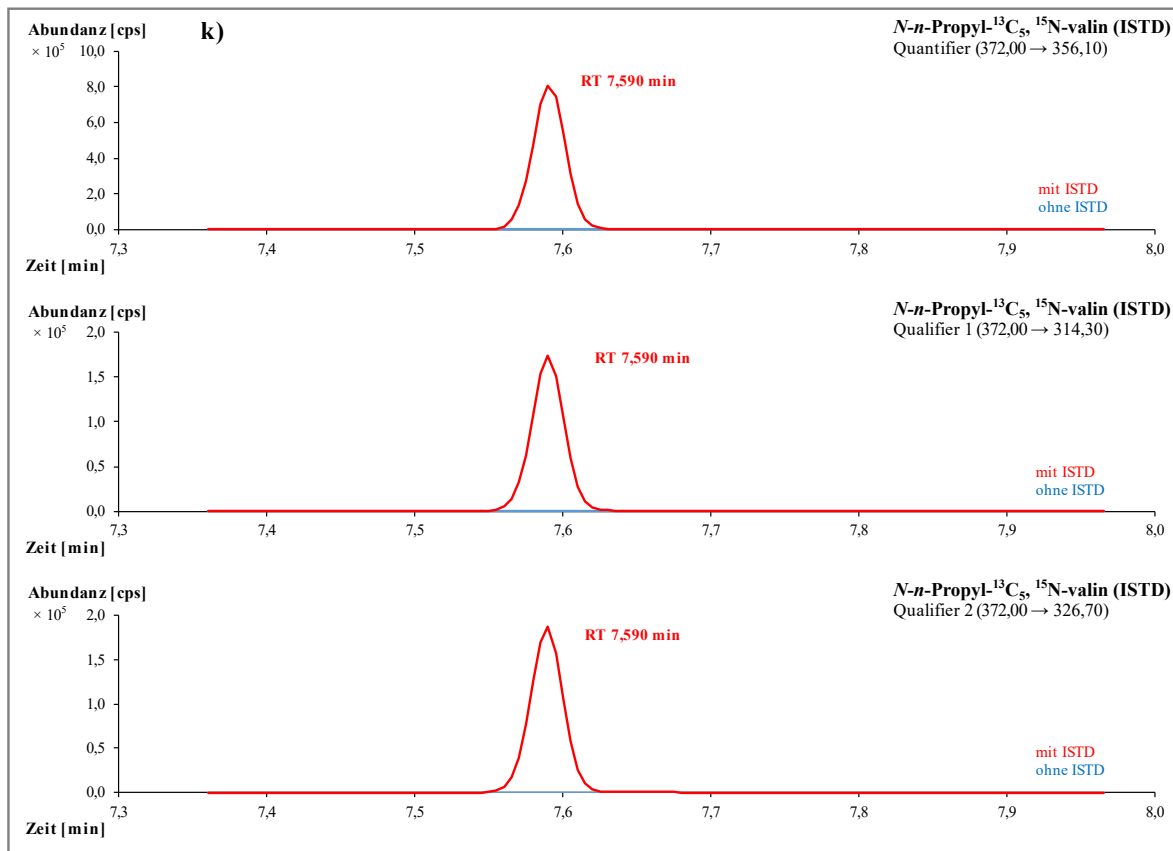


Abb. 4 Chromatogramme für a) *N*-Methylvalin, b) *N*-Ethylvalin, c) *N*-Propylvalin, d) *N*-Butylvalin, e) *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, f) *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, g) *N*-(2-Cyanoethyl)valin, h) *N*-Benzylvalin, i) *N*-(2-Carbamoylethyl)valin, j) *N*-(2-Ethoxyethyl)valin (ISTD) und k) *N*-Propyl-¹³C₅, ¹⁵N-valin (ISTD) in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes

8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die durch Dotierung von humanem Globin erhalten werden (siehe [Abschnitt 4](#)). Zur Derivatisierung des Globins wird den Kalibrierstandards Natronlauge und Derivatisierungsreagenz zugesetzt (siehe [Abschnitt 5.2](#)). Nach weiterer Aufarbeitung werden sie gemäß [Abschnitt 6](#) analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Quotienten der Peakflächen der jeweiligen Valinaddukte und des ISTDs gegen die dotierten Adduktspiegel aufgetragen werden.

Die Linearität der Analysenmethode wurde – je nach Addukt – zwischen einem unteren Wert von 12 bis 19 pmol/g Globin und einem oberen Wert von 3600 bis 5700 pmol/g Globin getestet. Die dabei erzielten Korrelationskoeffizienten waren alle > 0,99. Leerwerte müssen durch Subtraktion berücksichtigt werden. Insbesondere bei *N*-Methylvalin finden sich hohe endogene Hintergrundgehalte in humanem Globin.

Exemplarische Kalibriergeraden für die einzelnen Analyten sind in [Abbildung 5](#) dargestellt. Dabei ist der untere Adduktspiegelbereich (bis etwa 30–40 pmol/g Globin) jeweils zusätzlich dargestellt.

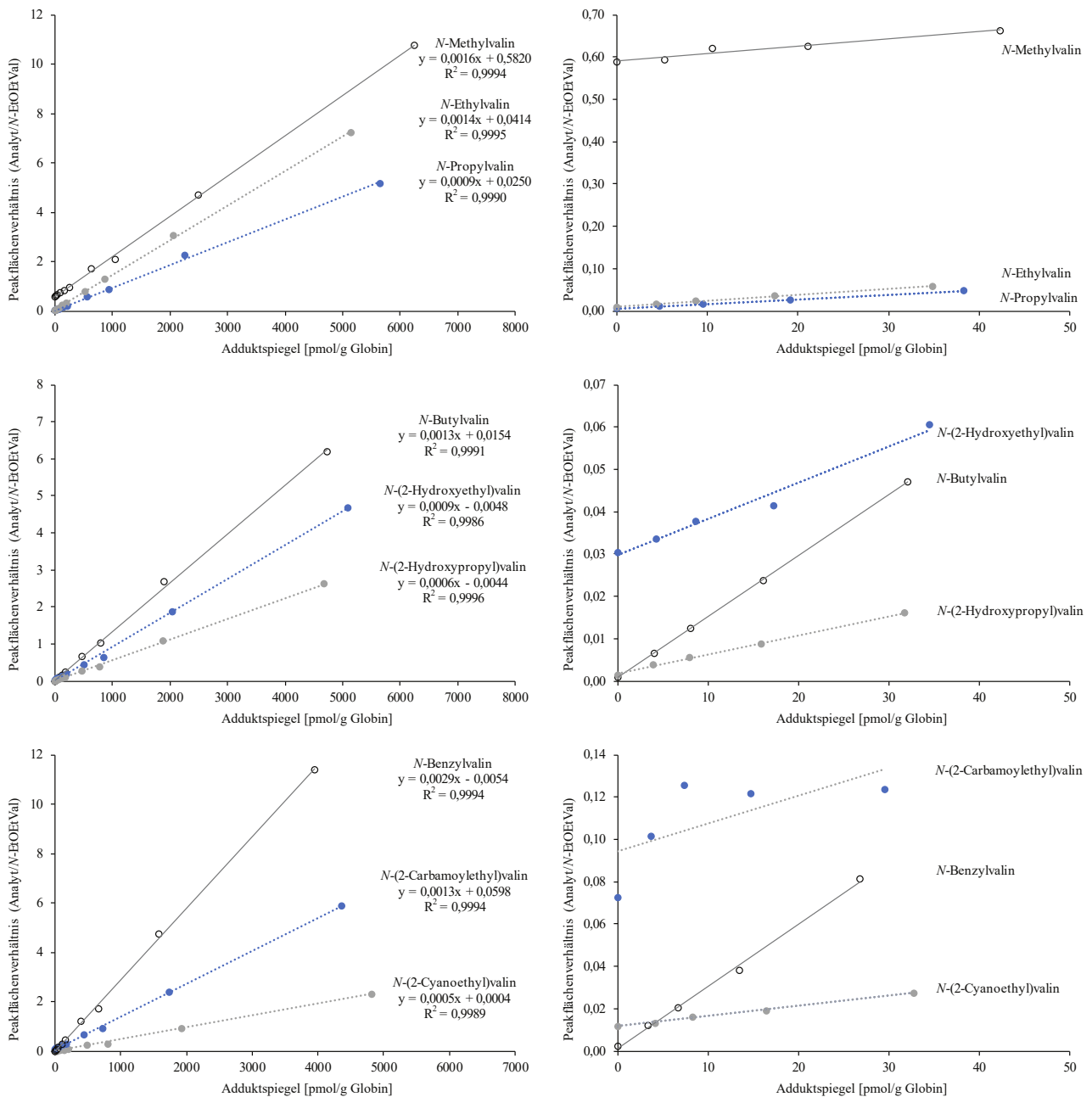


Abb. 5 Exemplarische Kalibriergeraden für die Bestimmung von N-Methylvalin, N-Ethylvalin, N-Propylvalin, N-Butylvalin, N-(2-Hydroxypropyl)valin, N-(2-Hydroxyethyl)valin, N-(2-Cyanoethyl)valin, N-Benzylvalin und N-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung der Analyseergebnisse wird die ermittelte Peakfläche des Analyten durch die Peakfläche des internen Standards dividiert. Der so erhaltene Quotient wird in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion eingesetzt und der Adduktspiegel in pmol/g Globin errechnet. Die Berechnung des Analyseergebnisses erfolgt in der Routine mithilfe der entsprechenden Gerätesoftware.

Das Analysenergebnis kann auch auf das Blutvolumen bezogen werden. Als Näherung kann eine mittlere Globinkonzentration von 144 g/l Blut herangezogen werden (Brunn 1992). Der Faktor 10^{-6} ergibt sich aus der Umrechnung von pmol zu μmol , um am Ende ein Ergebnis in $\mu\text{g/l}$ zu erhalten.

Adduktspiegel [pmol/g Globin] \times mittlere Globinkonzentration [g Globin/l Blut] \times molare Masse [g/mol] $\times 10^{-6}$ =
 Adduktspiegel [pmol/g Globin] \times Umrechnungsfaktor [g Globin $\times \mu\text{g}/(\text{pmol} \times \text{l Blut})$] = Adduktkonzentration [$\mu\text{g/l Blut}$]

Tabelle 6 gibt die molaren Massen der Valinaddukte sowie die resultierenden Umrechnungsfaktoren an. Als Beispiel sei die Umrechnung eines *N*-Methylvalinspiegels von 150 pmol/g Globin angeführt:

150 pmol *N*-Methylvalin/g Globin \times 144 g Globin/l Blut \times 131,18 g/mol $\times 10^{-6}$ =
 150 pmol *N*-Methylvalin/g Globin \times 0,01889 g Globin $\times \mu\text{g}/(\text{pmol} \times \text{l Blut})$ = 2,83 $\mu\text{g N-Methylvalin/l Blut}$.

Tab. 6 Molare Massen der Valinaddukte und Umrechnungsfaktoren für die Umrechnung von [pmol/g Globin] in [$\mu\text{g/l Blut}$]

Addukt	Molare Masse [g/mol]	Umrechnungsfaktor [g Globin $\times \mu\text{g}/(\text{pmol} \times \text{l})$]
<i>N</i> -Methylvalin	131,18	0,01889
<i>N</i> -Ethylvalin	145,20	0,02091
<i>N</i> -Propylvalin	159,23	0,02293
<i>N</i> -Butylvalin	173,26	0,02495
<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin	175,23	0,02523
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin	161,20	0,02321
<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)valin	170,21	0,02451
<i>N</i> -Benzylvalin	207,27	0,02985
<i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin	188,23	0,02711

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010 b; Bundesärztekammer 2014).

Zur Qualitätssicherung wird bei jeder Analysenserie mindestens eine Globinkontrollprobe mitgeführt, die konstante Adduktspiegel (z.B. 1800 pmol/g Globin) aufweist. Diese Probe wird innerhalb einer Messserie am Anfang, in der Mitte und am Ende der Sequenz analysiert. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial durch Dotierung von Poolglobin selbst hergestellt werden. Das isolierte Globin kann bei -20°C mindestens ein Jahr gelagert werden. Der Sollwert und der Toleranzbereich (Mittelwert \pm drei Standardabweichungen) des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt.

Zur externen Qualitätssicherung besteht die Möglichkeit, an Ringversuchsprogrammen teilzunehmen. Das Angebot im G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme, <https://app.g-equas.de/web/>) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin beinhaltet derzeit vier Parameter der Methode (*N*-Methylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin und *N*-(2-Cyanoethyl)valin).

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Die Bestimmung der Präzision in der Serie wurde durchgeführt, indem 100 mg Poolglobin mit den Referenzsubstanzen in zwei Konzentrationen dotiert wurden.

Die Proben wurden jeweils sechsfach aufgearbeitet und analysiert. Für *N*-Propylvalin beträgt die Anzahl der Messwiederholungen zehn, da dieser Analyt nachträglich in die Methode integriert wurde. Aus den Messergebnissen wurden für die einzelnen Analyten Mittelwert, Variationskoeffizient und Streubereich (95 %) ermittelt. Die so erhaltenen Präzisionsdaten sind [Tabelle 7](#) zu entnehmen.

Tab. 7 Präzision in der Serie für die Bestimmung von *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin (n = 10), *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes (n = 6)

Analyt	Dotierte Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Gemessene Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
<i>N</i> -Methylvalin	625	625	5,2	13,4
	2499	2361	4,3	11,1
<i>N</i> -Ethylvalin	564	579	8,1	20,8
	2257	2329	4,6	11,8
<i>N</i> -Propylvalin	515	510	1,8	4,1
	2058	2068	1,2	2,7
<i>N</i> -Butylvalin	473	473	2,4	6,2
	1892	1856	2,8	7,2
<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin	468	452	4,9	12,6
	1871	1732	5,5	14,1
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin	508	508	5,2	13,4
	2034	1922	4,3	11,1
<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)valin	481	494	2,5	6,4
	1926	1983	5,4	13,9
<i>N</i> -Benzylvalin	395	389	2,0	5,1
	1581	1524	1,5	3,9
<i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin	435	435	7,8	20,1
	1741	1723	5,1	13,1

Präzision von Tag zu Tag

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde durchgeführt, indem 100 mg Poolglobin mit den Referenzsubstanzen in zwei Konzentrationen dotiert wurden.

Die Proben wurden an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Für *N*-Propylvalin, das nachträglich in die Methode integriert wurde, wurden Proben an sieben verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Für die einzelnen Analyten wurden aus den Messergebnissen jeweils Mittelwert, Variationskoeffizient und Streubereich (95 %) berechnet. Die errechneten Werte sind in [Tabelle 8](#) dargestellt.

Tab. 8 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin ($n = 7$), *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes ($n = 6$)

Analyt	Dotierte Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Gemessene Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Standardabweichung (rel.) s_w	
			Standardabweichung [%]	Streubereich u [%]
<i>N</i> -Methylvalin	625	508	2,4	6,2
	2499	2642	3,6	9,3
<i>N</i> -Ethylvalin	564	612	10,8	27,8
	2257	2544	6,4	16,5
<i>N</i> -Propylvalin	515	520	3,1	7,6
	2058	2018	2,9	7,1
<i>N</i> -Butylvalin	473	473	0,8	2,1
	1892	1856	3,8	9,8
<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin	468	420	2,4	6,2
	1871	1899	5,7	14,7
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin	508	526	4,9	12,6
	2034	2266	6,0	15,4
<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)valin	481	465	6,9	17,7
	1926	2199	2,7	6,9
<i>N</i> -Benzylvalin	395	312	6,6	17,0
	1581	1581	2,6	6,7
<i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin	435	358	5,8	14,9
	1741	1741	4,6	11,8

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Analysen wurde als mittlere relative Wiederfindung aus den Bestimmungen der Präzision in der Serie und der Präzision von Tag zu Tag ermittelt. Die so erhaltenen Wiederfindungen sind [Tabelle 9](#) zu entnehmen.

Tab. 9 Richtigkeit für die Bestimmung von *N*-Methylvalin, *N*-Ethylvalin, *N*-Propylvalin ($n = 10$ sowie $n = 7$), *N*-Butylvalin, *N*-(2-Hydroxypropyl)valin, *N*-(2-Hydroxyethyl)valin, *N*-(2-Cyanoethyl)valin, *N*-Benzylvalin und *N*-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes ($n = 6$ sowie $n = 6$)

Analyt	Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Wiederfindung (rel.) r [%]	
		Präzision in der Serie	Präzision von Tag zu Tag
<i>N</i> -Methylvalin	625	101	81
	2499	105	106
<i>N</i> -Ethylvalin	564	102	108
	2257	103	113
<i>N</i> -Propylvalin	515	99,1	101
	2058	101	98,0
<i>N</i> -Butylvalin	473	100	93
	1892	98	110
<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin	468	96	90
	1871	92	102

Tab. 9 (Fortsetzung)

Analyt	Adduktspiegel [pmol/g Globin]	Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	
		Präzision in der Serie	Präzision von Tag zu Tag
N-(2-Hydroxyethyl)valin	508	100	103
	2034	95	111
N-(2-Cyanoethyl)valin	481	103	96
	1926	103	114
N-Benzylvalin	395	99	79
	1581	96	100
N-(2-Carbamoylethyl)valin	435	99	82
	1741	99	100

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 (DIN 2008).

Hierzu wurde eine nicht äquidistante 5- oder 6-Punkt-Kalibrierung (Bereich je nach Addukt zwischen 3,35 pmol/g Globin und 5,29 pmol/g Globin (unterster Punkt) sowie 157 pmol/g Globin und 249 pmol/g Globin (oberster Punkt)) erstellt und zusammen mit einem Leerwert aufgearbeitet und analysiert.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze errechnet sich nach DIN 32645 aus der Standardabweichung der erhaltenen Kalibrierfunktion am Leerwert. [Tabelle 10](#) zeigt die so ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Anzumerken ist, dass bei dieser Ermittlung der Bestimmungsgrenzen normale Kalibrierungen aus dem Routinebetrieb herangezogen wurden, anstelle der eigentlich in DIN 32645 geforderten äquidistanten Kalibrierungen. Dies geschah aus Gründen der Effizienz und weil zum Zeitpunkt der externen Methodvalidierung lediglich eine ungefähre Abschätzung der Bestimmungsgrenzen gefragt war, um die Anwendbarkeit der Methode im arbeitsmedizinischen Bereich abzusichern. Im Rahmen der Methodenprüfung konnte das Prüflabor die genannten Bestimmungsgrenzen für alle Analyten außer N-Ethylvalin bestätigen, indem die Kriterien der FDA-Richtlinie für die untere Bestimmungsgrenze (FDA 2018) erfüllt wurden. Außerdem konnten sowohl das entwickelnde als auch das prüfende Labor zeigen, dass aus dem Signal/Rausch-Verhältnis noch erheblich niedrigere Bestimmungsgrenzen resultieren, wengleich dieser Berechnungsweg die tatsächlich erreichte Präzision und Richtigkeit des gesamten Analysenverfahrens außer Acht lässt. Falls besondere Anforderungen an die Belastbarkeit der angegebenen Bestimmungsgrenzen bestehen, sollten Anwender der vorliegenden Analysenmethode die tatsächlichen Bestimmungsgrenzen am jeweils verwendeten Instrument im Rahmen einer Methodenverifizierung ermitteln (für weitere Optimierungen siehe auch [Abschnitt 12](#)).

Die relativ hohe Bestimmungsgrenze des Acrylamidmarkers N-(2-Carbamoylethyl)valin kann durch den Hintergrundgehalt in dem für die Kalibrierung verwendeten Poolglobin verursacht worden sein. Gleiches gilt für den Methylierungsmarker Methylvalin, wobei die relativ hohen Hintergrundwerte wahrscheinlich überwiegend durch endogene Methylierung bedingt sind.

Tab. 10 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von N-Methylvalin, N-Ethylvalin, N-Propylvalin, N-Butylvalin, N-(2-Hydroxypropyl)valin, N-(2-Hydroxyethyl)valin, N-(2-Cyanoethyl)valin, N-Benzylvalin und N-(2-Carbamoylethyl)valin in der Erythrozytenfraktion des Vollblutes (n = 2)

Analyt	Nachweisgrenze [pmol/g Globin]	Bestimmungsgrenze [pmol/g Globin]
N-Methylvalin	50	170
N-Ethylvalin	15	50

Tab. 10 (Fortsetzung)

Analyt	Nachweisgrenze [pmol/g Globin]	Bestimmungsgrenze [pmol/g Globin]
N-Propylvalin	15	50
N-Butylvalin	15	50
N-(2-Hydroxypropyl)valin	10	30
N-(2-Hydroxyethyl)valin	20	70
N-(2-Cyanoethyl)valin	15	60
N-Benzylvalin	10	30
N-(2-Carbamoylethyl)valin	70	200

11.4 Störeinflüsse

Die Qualität des isolierten Globins wirkt sich direkt auf die Zuverlässigkeit der anschließenden Adduktbestimmung aus. Es sollten nur frische, nicht hämolysierte EDTA-Blutproben für die Globinisolierung verwendet werden, da bei der Bestimmung von *N*-Methylvalin aus Globin hämolysierter Proben um bis zu 80 % niedrigere Adduktgehalte im Vergleich zu nicht hämolysierten Proben gemessen wurden (Bader 1996). Insofern ist die Abtrennung intakter Erythrozyten möglichst bald nach Blutentnahme von entscheidender Bedeutung. Die abgetrennten Erythrozyten müssen zudem ausreichend mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden, um Plasmaproteine wie Serumalbumin zu entfernen, da diese zusammen mit dem Globin ausfallen und so die globinbezogenen Adduktspiegel unterschätzt werden.

Weitere Faktoren können sich negativ auf die korrekte Bestimmung der Adduktspiegel auswirken: bei der Probenaufbereitung sollte die Isolierung des Globins ganz bis zum Ende durchgeführt werden (kein Einfrieren von Zwischenstufen), um eine mögliche Bildung von Artefakten zu vermeiden. So konnte Törnqvist (1990) nachweisen, dass der *N*-(2-Hydroxyethyl)valin-Gehalt in tiefgefrorenem Erythrozytenlysat in Einzelfällen innerhalb von sechs Monaten auf bis zu achtfach höhere Werte ansteigt.

Beim Derivatisierungsschritt ist auf die Verwendung von hinreichend weiten Gewindgläschen zu achten, um das Suspensieren und Lösen des Globins in Formamid zu erleichtern. Aufgrund der starken pH-Abhängigkeit der Edman-Zyklisierungsreaktion ist die Einhaltung des optimalen pH-Bereichs von pH 6–7 von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grund können Verunreinigungen des verwendeten Formamids mit flüchtigen Aminen oder Ammoniak die Reaktionsausbeute und somit die Sensitivität der Methode deutlich vermindern. Deshalb ist vorzugsweise bei –20 °C gelagertes, ultrareines Formamid zu verwenden oder Formamid in p.a.-Qualität, das durch Entgasen mit Stickstoff auf einen pH-Wert von ≈ 7 eingestellt wurde. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Anwesenheit anderer freier Amine weiterhin zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann (van Sittert et al. 1996).

Die Prüfer der Methode sprachen die Empfehlung aus, den Rückstand der Ethylacetatextrakte mit einem größeren Toluolvolumen aufzunehmen, um eine einfachere Abtrennung der organischen Phase nach den Waschschrinen zu erreichen. Die Verwendung von mehr als 500 µl Toluol ist allerdings nur zielführend, sofern ein schnell arbeitender Vakuumkonzentrator zur Verfügung steht.

Was die Chromatographie anbelangt, so wird in den Chromatogrammen in Einzelfällen ein Peaksplitting beobachtet, das auf Matrixeffekte, die die Fokussierung bei der Splitlos-Split-Injektion stören, hinweist. In diesen Fällen sollte die Summe beider Peaks ausgewertet werden.

Zudem ist zu beachten, dass die Stammlösung des *N*-((*R,S*)-2-Hydroxypropyl)valin-Leucin-Anilids als Diastereomerenmisch vorliegt. Beide Diastereomere sind im Chromatogramm gut voneinander getrennt und zeigen die gleiche Response. In der hier vorliegenden Methode wurde ausschließlich der erste Peak zur Quantifizierung verwendet; in der von der Kommission publizierten Methode von Schettgen et al. (2016) hingegen beide Peaks. Da die Adduktbildung im menschlichen Organismus nicht diastereoselektiv verläuft, sind beide Vorgehensweisen valide.

Zur Apparatur ist anzumerken, dass nach 150–200 Injektionen das Insert gewechselt werden muss. Als Indikator für den fälligen Insertwechsel kann *N*-Ethylvalin dienen, da dieses an der Insertwandung haftet und aufgrund von Memoryeffekten im Chromatogramm sichtbar wird. Dies ist besonders bei Proben, in denen *N*-Ethylvalin bestimmt werden soll, zu beachten. Vor den entsprechenden Analyseserien sollte immer ein neuer Liner eingesetzt werden.

Ausreißer bei den Qualitätskontrollproben deuten auf eine nachlassende Trennleistung der Säule durch Adsorption hin. Lässt sich durch Kürzen und Ausheizen der Säule, sowie durch Wechsel des Inserts keine Besserung erzielen, muss die Säule erneuert werden.

12 Diskussion der Methode

Die bisher von der Kommission für die Bestimmung von Hb-Addukten publizierten Methoden basieren alle auf den gleichen Grundprinzipien: Isolierung von Erythrozyten aus dem Vollblut, Isolierung von Globin aus den Erythrozyten, Freisetzung der Globin-Addukte durch modifizierten Edman-Abbau und Messung der schlussendlich erhaltenen Analysenlösungen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) (Bader et al. 2010 a; Lewalter et al. 2003; Müller et al. 2012; Schettgen et al. 2016; van Sittert et al. 1996).

Die vorliegende Methode basiert auf dem Verfahren von van Sittert et al. (1996) und unterscheidet sich von diesem in der Probenvorbereitung nur in einigen Details. Hinsichtlich der Messung wurde das Verfahren vom bereits etablierten GC-MS-Prinzip auf ein selektiveres GC-MS/MS-System adaptiert. Außerdem wurde die Methode um mehrere Biomarker erweitert, welche im ursprünglichen Verfahren nicht enthalten waren. Auch wenn für einige dieser Marker von der Kommission bereits Analysemethoden publiziert wurden (Tabelle 11), lassen sich nun mit der hier beschriebenen Methode neun Hb-Addukte alkylierender Substanzen (Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Hydroxypropyl-, Hydroxyethyl-, Cyanoethyl-, Benzyl-, Carbamoylethylvalin) in nur einem chromatographischen Lauf quantifizieren. Erstmals kann die gesamte homologe Reihe der *n*-Alkylvaline von C1 bis C4, als mögliche Langzeitmarker einer Exposition gegen beispielsweise Alkylhalogenide oder Dialkylsulfate, erfasst werden. Somit ergänzt diese Methode auch die von der Kommission veröffentlichte Vorschrift zur Bestimmung der entsprechenden Mercaptursäuren als Kurzzeitmarker im Harn (Eckert et al. 2016).

Tab. 11 Hb-Addukte alkylierender Verbindungen, für die die Kommission bereits Methodenvorschriften publiziert hat

Biomarker in der vorliegenden Methode	Bereits publizierte Methodenvorschriften der Kommission ^{a)}
<i>N</i> -Methylvalin	van Sittert et al. (1996)
<i>N</i> -Ethylvalin	–
<i>N</i> -Propylvalin	–
<i>N</i> -Butylvalin	–
<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)valin	Schettgen et al. (2016)
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin	van Sittert et al. (1996); Schettgen et al. (2016)
<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)valin	van Sittert et al. (1996); Schettgen et al. (2016)
<i>N</i> -Benzylvalin	Lewalter et al. (2003)
<i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)valin	Bader et al. (2010 a); Schettgen et al. (2016)

^{a)} Mit der Methode von Schettgen et al. (2016) lässt sich auch *N*-(2-Hydroxy-2-carbamoylethyl)valin als Addukt des Acrylamidmetaboliten Glycidamid quantifizieren. Zudem erlaubt eine Methode von Müller et al. (2012) die Erfassung des *N*-(2,3-Dihydroxypropyl)valins als Hb-Addukt des Glycidols.

Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode sind für den arbeitsmedizinischen Bereich als sehr gut zu bezeichnen. Durch die Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie wird im Vergleich zur GC-MS-Technik eine deutliche Steigerung der Ergebnissicherheit erreicht, so ist die mit der vorliegenden Methode erzielte Präzision deutlich höher als in der ursprünglichen Methode. Außerdem sind die GC-MS/MS-Chromatogramme wesentlich störungsfreier und dadurch schneller auswertbar.

Die Bestimmungsgrenzen des Verfahrens sind für den arbeits- und zum Teil auch für den umweltmedizinischen Bereich ausreichend. Die von van Sittert et al. (1996) ermittelten Nachweisgrenzen liegen bei 12 pmol/g Globin (*N*-Methylvalin und *N*-(2-Cyanoethyl)valin) bzw. bei 19 pmol/g Globin (*N*-(2-Hydroxyethyl)valin), wurden jedoch anhand des dreifachen Signal/Rausch-Verhältnisses berechnet und nicht in Anlehnung an das DIN-Verfahren 32645 (DIN 2008) bzw. nach den Kriterien der FDA (2018) für Bioanalytik, wie in der hier vorliegenden Methode.

Für den arbeitsmedizinischen Bereich, für den diese Methode entwickelt wurde, stellt die Verwendung des *N*-(2-Ethoxyethyl)valin-Alanin-Anilids als ISTD für alle Analyten eine praktikable und kosteneffiziente Lösung dar. Allerdings kann ein einzelner ISTD nicht alle methodischen Schwankungen kompensieren. Es ist davon auszugehen, dass die Methodenkenndaten durch Verwendung strukturidentischer isopenmarkierter ISTDs für alle Analyten weiter verbessert werden könnten, insbesondere könnten dadurch niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erhalten werden. Dies wäre vor allem für umweltmedizinische Fragestellungen relevant; die Signal/Rausch-Verhältnisse der Chromatogramme sind hierfür hinlänglich gut. So haben die Entwickler der Methode auch die Verwendung eines synthetisierten *N*-*n*-Propyl-¹³C₅, ¹⁵N-Valin-Leucin-Anilids als ISTD für *N*-Propylvalin getestet (beide Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) und konnten dadurch die Bestimmungsgrenze für *N*-Propylvalin um den Faktor 10, auf unter 5 pmol/g Globin absenken.

Generell hätte der Einsatz von isopenmarkierten ISTDs auch den Vorteil, spezifische Matrixeffekte aufgrund unterschiedlicher Globinproben auszugleichen. Die isopenmarkierten ISTDs können, wie bei Schettgen et al. (2016) beschrieben, durch Inkubation von Erythrozytenlysat mit isopenmarkierten reaktiven Substanzen selbst hergestellt werden.

Die hier vorgestellte Methode kann – bei Vorliegen entsprechender Dipeptidstandards – durchaus auch auf Addukte weiterer, das *N*-terminale Valin des Hämoglobins alkylierende, Substanzen erweitert werden. Somit bietet diese Methode auch eine gute Basis für zukünftige Entwicklungen auf dem Gebiet der Hämoglobinadduktanalytik.

Tabelle 12 zeigt die Spiegel von Hb-Addukten, die mit dem vorliegenden Verfahren bei beruflich nicht exponierten Personen gemessen wurden. Adduktspiegel beruflich exponierter Personen sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Daten umfassen mehrere Jahre und eine Vielzahl von Betrieben, Tätigkeiten, Expositionsszenarien und Schutzmaßnahmen. Anders als bei *N*-Methylvalin sind bei den Alkylhomologen *N*-Ethylvalin, *N*-*n*-Propylvalin und *N*-*n*-Butylvalin sehr selten Befunde oberhalb der Bestimmungsgrenze zu verzeichnen. Insbesondere hinsichtlich *N*-Ethylvalin steht dies im Einklang mit den Erkenntnissen von Scherer et al. (2010), die bei Rauchern die Ethylmercaptursäure, den korrespondierenden Biomarker im Urin, analysiert haben. Die ermittelten Konzentrationen lagen etwa fünfzigfach unterhalb derer der Methylmercaptursäure in denselben Proben. Für *N*-*n*-Propylvalin und *N*-*n*-Butylvalin sind keine Vergleichsdaten publiziert.

Tab. 12 Mit dem vorliegenden Verfahren bestimmte Adduktspiegel beruflich nicht exponierter Personen. Zur Mittelwertberechnung wurden Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze als BG/2 ausgewiesen

Addukt	Raucherstatus	Personenanzahl	Adduktspiegel [pmol/g Globin]	
			Mittelwert	Bereich
<i>N</i> -Methylvalin	R	100	450	270–603
	NR		371	185–551
<i>N</i> -Ethylvalin	R/NR	100	< BG	< BG–86
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)valin	R	100	172	< BG–603
	NR		< BG	< BG
<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)valin	R	100	163	< BG–375
	NR		< BG	< BG

Tab. 12 (Fortsetzung)

Addukt	Raucherstatus	Personenanzahl	Adduktspiegel [pmol/g Globin]	
			Mittelwert	Bereich
N-Benzylvalin	R/NR	100	< BG	< BG
N-(2-Carbamoylethyl)valin	R	83	< BG	< BG-346
	NR	64	< BG	< BG

BG: Bestimmungsgrenze; NR: Nichtraucher; R: Raucher

Tab. 13 Mit dem vorliegenden Verfahren bestimmte Adduktspiegel beruflich exponierter Personen. Zur Mittelwertberechnung wurden Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze als BG/2 ausgewiesen

Addukt	Probenanzahl n	Adduktspiegel [pmol/g Globin]			
		Mittelwert	Median	95. Perzentil	Bereich
N-Methylvalin	1906	357	326	571	< BG-1336
N-Ethylvalin	851	< BG	< BG	< BG	< BG-202
N-n-Butylvalin	700	< BG	< BG	< BG	< BG
N-(2-Hydroxypropyl)valin	1643	< BG	< BG	< BG	< BG-82
N-(2-Hydroxyethyl)valin	1388	131	< BG	444	< BG-8309
N-(2-Cyanoethyl)valin	2245	93	< BG	321	< BG-2658
N-Benzylvalin	931	< BG	< BG	< BG	< BG-33
N-(2-Carbamoylethyl)valin	645	< BG	< BG	< BG	< BG-484

BG: Bestimmungsgrenze

Verwendete Messgeräte GC-MS/MS-System (Bruker 456 mit CTC PAL-Autosampler und Bruker EVOQ TQ-MS mit Steuerungs- und Auswertesoftware, Bruker Corporation, Billerica, USA) sowie Kapillartrennsäule (Nr. 13623, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Rxi-5Sil MS, Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, bzw. Nr. 122-5532UI, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, DB-5ms Ultra Inert, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn).

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- AGS (Ausschuss für Gefahrstoffe) (2018) Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS 552). Krebs erzeugende N-Nitrosamine der Kat 1A und 1B. Dortmund: BAuA. https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRGS/pdf/TRGS-552.pdf?__blob=publicationFile&v=1, abgerufen am 25 Jul 2023
- Bader M (1996) Gaschromatographisch/massenspektrometrische Analyse von Proteinaddukten als Beitrag zum biochemischen Effekt-Monitoring kanzerogener Arbeitsstoffe. Dissertation. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Bader M, Wrbitzky R (2006) Follow-up biomonitoring after accidental exposure to acrylonitrile – implications for protein adducts as a dose monitor for short-term exposures. *Toxicol Lett* 162(2–3): 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.034>
- Bader M, Angerer J, Schettgen T, Scherer G (2010 a) N-(2-Carbamoylethyl)valin – Hämoglobin-Addukt von Acrylamid. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi0cbevd0019>

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010 b) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bader M, Will W, Frey G, Nasterlack M (2012) Analysis of protein adducts as biomarkers of short-term exposure to ethylene oxide and results of follow-up biomonitoring. *Arh Hig Rada Toksikol* 63(2): 107–115. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2211>
- Baer H, Bergamo M, Forlin A, Pottenger LH, Lindner J (2012) Propylene oxide. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a22_239.pub3
- Bailey E, Brooks AGF, Dollery CT, Farmer PB, Passingham BJ, Sleightholm MA, Yates DW (1988) Hydroxyethylvaline adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake. *Arch Toxicol* 62(4): 247–253. <https://doi.org/10.1007/bf00332482>
- Ball L, Jones A, Boogaard P, Will W, Aston P (2005) Development of a competitive immunoassay for the determination of N-(2-hydroxypropyl) valine adducts in human haemoglobin and its application in biological monitoring. *Biomarkers* 10(2–3): 127–137. <https://doi.org/10.1080/13547500500158938>
- Barry KH, Koutros S, Lubin JH, Coble JB, Barone-Adesi F, Beane Freeman LE, Sandler DP, Hoppin JA, Ma X, Zheng T, Alavanja MCR (2012) Methyl bromide exposure and cancer risk in the Agricultural Health Study. *Cancer Causes Control* 23(6): 807–818. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-9949-2>
- Boogaard PJ, Rocchi PS, van Sittert NJ (1999) Biomonitoring of exposure to ethylene oxide and propylene oxide by determination of hemoglobin adducts: correlations between airborne exposure and adduct levels. *Int Arch Occup Environ Health* 72(3): 142–150. <https://doi.org/10.1007/s004200050353>
- Brazdil JF (2012) Acrylonitrile. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a01_177.pub3
- Brunn HF (1992) Hemoglobin. In: Haeberli A, Hrsg. Human protein data. Weinheim: Wiley-VCH
- Budnik LT, Klothe S, Velasco-Garrido M, Baur X (2012) Prostate cancer and toxicity from critical use exemptions of methyl bromide: environmental protection helps protect against human health risks. *Environ Health* 11(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-069x-11-5>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111(38): A1583–A1618
- Bundesregierung Deutschland (2010) Verordnung zur Neufassung der Gefahrstoffverordnung und zur Änderung sprengstoffrechtlicher Verordnungen. *BGBl I* (59): 1643–1692
- Carmella SG, Chen M, Villalta PW, Gurney JG, Hatsukami DK, Hecht SS (2002) Ethylation and methylation of hemoglobin in smokers and non-smokers. *Carcinogenesis* 23(11): 1903–1910. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1903>
- Cumming RB, Walton MF (1970) Fate and metabolism of some mutagenic alkylating agents in the mouse. I. Ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate at sublethal dose in hybrid males. *Mutat Res* 10(4): 365–377. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90049-7)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Hrsg (2023) MAK- und BAT-Werte-Liste 2023. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 59. Düsseldorf: German Medical Science. https://doi.org/10.34865/mbwl_2023_deu
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018 a) 1-Bromobutane (CAS Number 109-65-9). Registration dossier. Joint submission, first publication 18 Jan 2013, last modification 20 Nov 2018. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/12474>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018 b) 1-Iodopropane (CAS Number 107-08-4). Registration dossier. Joint submission, first publication 08 Feb 2018, last modification 01 Feb 2018. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/22093>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019) Bromoethane (CAS Number 74-96-4). Registration dossier. Joint submission, first publication 01 May 2013, last modification 17 May 2019. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/11503>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2020 a) Iodoethane (CAS Number 75-03-6). Registration dossier. Joint submission, first publication 04 May 2018, last modification 27 Feb 2020. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/24183>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2020 b) α -Bromotoluene (CAS Number 100-39-0). Registration dossier. Joint submission, first publication 26 Apr 2018, last modification 07 Aug 2020. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/23901>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021 a) Bromomethane (CAS Number 74-83-9). Registration dossier. Joint submission, first publication 14 Jul 2012, last modification 22 Apr 2021. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/5298>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021 b) Dibutyl sulfate (CAS Number 625-22-9). Substance infocard, last modification 21 Dec 2021. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.120.685>, abgerufen am 17 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021 c) Dipropyl sulfate (CAS Number 598-05-0). Substance infocard, last modification 21 Dec 2021. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.157.208>, abgerufen am 17 Jul 2023

- ECHA (European Chemicals Agency) (2021 d) Iodomethane (CAS Number 74-88-4). Registration dossier. Joint submission, first publication 03 Mar 2011, last modification 03 Aug 2021. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/12834>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021 e) α -Iodotoluene (CAS Number 620-05-3). Substance infocard, last modification 21 Dec 2021. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.009.659>, abgerufen am 17 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2022 a) 1-Bromopropane (CAS Number 106-94-5). Registration dossier. Joint submission, first publication 28 Dec 2010, last modification 15 Sep 2022. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15004>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2022 b) Dimethyl sulphate (CAS Number 77-78-1). Registration dossier. Joint submission, first publication 02 Mar 2011, last modification 07 Mar 2022. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14273>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2022 c) α -Chorotoluene (CAS Number 100-44-7). Registration dossier. Joint submission, first publication 18 Apr 2011, last modification 22 Aug 2022. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14202>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 a) Acrylamide (CAS Number 79-06-1). Registration dossier. Joint submission, first publication 17 Feb 2011, last modification 09 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15534>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 b) Acrylonitrile (CAS Number 107-13-1). Registration dossier. Joint submission, first publication 02 Mar 2011, last modification 10 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15561>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 c) Chloromethane; methyl chloride (CAS Number 74-87-3). Registration dossier. Joint submission, first publication 04 Mar 2011, last modification 02 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15768>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 d) Diethyl sulphate (CAS Number 64-67-5). Registration dossier. Joint submission, first publication 03 Mar 2011, last modification 17 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14957>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 e) Ethylene (CAS Number 74-85-1). Registration dossier. Joint submission, first publication 03 Mar 2011, last modification 19 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/16094>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 f) Ethylene oxide (CAS Number 75-21-8). Registration dossier. Joint submission, first publication 24 Mar 2010, last modification 18 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15813>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 g) Methyloxirane (CAS Number 75-56-9). Registration dossier. Joint submission, first publication 02 Mar 2011, last modification 04 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/16091>, abgerufen am 18 Jul 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023 h) Propene (CAS Number 115-07-1). Registration dossier. Joint submission, first publication 17 Feb 2011, last modification 11 May 2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/16184>, abgerufen am 18 Jul 2023
- Eckert E, Göen T, Hoppe HW, Hartwig A, MAK Commission (2016) S-Alkylmerkaptursäuren in Urin (Methylmerkaptursäure, Ethylmerkaptursäure, n-Propylmerkaptursäure und iso-Propylmerkaptursäure). MAK Collect Occup Health Saf 1(3): 2197–2220. <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi10694d0021>
- Esposito F, Squillante J, Nolasco A, Montuori P, Macri PG, Cirillo T (2022) Acrylamide levels in smoke from conventional cigarettes and heated tobacco products and exposure assessment in habitual smokers. Environ Res 208: 112659. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112659>
- EU (European Union) (2004) European Union Risk Assessment Report. Acrylonitrile. CAS No: 107-13-1, EINECS No: 203-466-5. Luxembourg: EU. <https://echa.europa.eu/documents/10162/22bf49d3-e951-44b8-a45a-6973d3dc62f6>, abgerufen am 06 Jul 2023
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2018) Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. Silver Spring, MD: FDA. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, abgerufen am 06 Jul 2023
- Filser JG, Denk B, Törnqvist M, Kessler W, Ehrenberg L (1992) Pharmacokinetics of ethylene in man; body burden with ethylene oxide and hydroxyethylation of hemoglobin due to endogenous and environmental ethylene. Arch Toxicol 66(3): 157–163. <https://doi.org/10.1007/bf01974008>
- Friedman OM, Mahapatra GN, Dash B, Stevenson R (1965) Studies on the action of diazomethane on deoxyribonucleic acid. The action of diazomethane on deoxyribonucleosides. Biochim Biophys Acta 103(2): 286–297. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(65\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90168-1)
- Gauch F, Abraham K, Monien BH (2022) Simultaneous quantification of eight hemoglobin adducts of genotoxic substances by isotope-dilution UHPLC-MS/MS. Anal Bioanal Chem 414(19): 5805–5815. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04143-y>
- Greim H, Hrsg (1997) Diazomethan. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 24. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb33488d0024>
- Hagmar L, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson A-L, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. Scand J Work Environ Health 27(4): 219–226. <https://doi.org/10.5271/sjweh.608>
- Hall BE, James SP (1986) Mercapturic acid formation in the marmoset (*Callithrix jacchus*). Xenobiotica 16(7): 609–614. <https://doi.org/10.3109/00498258609043550>
- Hartwig A, Hrsg (2011) 1-Bromopropan. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 50. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb10694d0050>
- Herth G, Schornick G, Buchholz FL (2015) Polyacrylamides and poly(acrylic acids). In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. S. 1–16. https://doi.org/10.1002/14356007.a21_143.pub2

- Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 14(7): 767–790. <https://doi.org/10.1021/tx000260u>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1977) Methyl iodide. In: Some fumigants, the herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, chlorinated dibenzodioxins and miscellaneous industrial chemicals. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Band 15. Lyon: IARC Press. S. 245–254. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1563/a870aa191a4ce861c017da1342f2c6f3511b35bf.pdf, abgerufen am 10 Jul 2020
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1999) Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Band 71. Lyon: IARC Press. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/2279/d7e4bcce9c42cec078b965c33b0298cf0a3aff3d.pdf, abgerufen am 08 Mai 2020
- IFA (Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) (2023) GESTIS-Stoffdatenbank. <https://gestis.dguv.de/>, abgerufen am 21 Jun 2023
- Kaye CM (1974) The synthesis of mercapturic acids from diethyl sulphate and di-n-propyl sulphate in the rat. *Xenobiotica* 4(6): 329–336. <https://doi.org/10.3109/00498257409052108>
- Kolesnikov VA, Efremov RV, Danov SM, Gryaznova LV (1977) Kinetics of the hydrolysis of dialkylsulfates. *Kinetika i Kataliz* 18(4): 1065–1066
- Kriek E, Emmelot P (1964) Methylation of deoxyribonucleic acid by diazomethane. *Biochim Biophys Acta* 91: 59–66. [https://doi.org/10.1016/0926-6550\(64\)90170-7](https://doi.org/10.1016/0926-6550(64)90170-7)
- Lavé T, Birnböck H, Götschi A, Ramp T, Pähler A (2009) In vivo and in vitro characterization of ethyl methanesulfonate pharmacokinetics in animals and in human. *Toxicol Lett* 190(3): 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.030>
- Leng G, Gries W (2014) Biomonitoring following a chemical incident with acrylonitrile and ethylene in 2008. *Toxicol Lett* 231(3): 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.027>
- Lewalter J, Leng G, Ellrich D, Angerer J (2003) N-Benzylvalin nach Benzylchloridexposition. In: Angerer J, Schaller KH, Greim H, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 15. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi0nbvld0015>
- Lipper K-A, Löser E, Brücher O (2017) Benzyl chloride and other side-chain-chlorinated aromatic hydrocarbons. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.o04_o01.pub2
- Müller M, Göen T, Eckert E, Schettgen T (2012) N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin als Hämoglobinaddukt des Glycidols. In: Göen T, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 20. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi55652d0020>
- Neumann HG, Birner G, Kowallik P, Schütze D, Zwirner-Baier I (1993) Hemoglobin adducts of N-substituted aryl compounds in exposure control and risk assessment. *Environ Health Perspect* 99: 65–69. <https://doi.org/10.1289/ehp.939965>
- NTP (National Toxicology Program) (2003) NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of 1-bromopropane. NIH Publication No. 04-4479. Research Triangle Park, NC: NTP. https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/ntp/ohat/bromopropanes/1-bromopropane/1bp_monograph.pdf
- NTP (National Toxicology Program) (2021) Report on Carcinogens, Fifteenth Edition. Research Triangle Park, NC: NTP. <https://ntp.niehs.nih.gov/go/roc15>
- Ohlischläger A, Menzel K, Ten Kate A, Martinez JR, Frömbgen C, Arts J, McCulloch A, Rossberg M, Lendle W, Pfeleiderer G, Tögel A, Torkelson TR, Beutel KK (2019) Chloromethanes. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a06_233.pub4
- Pattenden G, Hrsg (1991) Carbon-carbon σ -bond formation. *Comprehensive organic synthesis. Selectivity, strategy and efficiency in modern organic chemistry*. Band 3. Oxford: Pergamon Press
- Pauwels W, Veulemans H (1998) Comparison of ethylene, propylene and styrene 7,8-oxide in vitro adduct formation on N-terminal valine in human haemoglobin and on N-7-guanine in human DNA. *Mutat Res* 418(1): 21–33. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(98\)00106-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(98)00106-5)
- Rebsdatt S, Mayer D (2001) Ethylene oxide. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a10_117
- RÖMPP-Redaktion (2023) RÖMPP-Lexikon. https://roempp.thieme.de/covers/alphabetic/content_type=lexicon?context=&contextId=, abgerufen am 21 Jun 2023
- Sabbioni G, Day BW (2022) Quo vadis blood protein adductomics? *Arch Toxicol* 96(1): 79–103. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03165-2>
- Saltzman ES, Nicewonger MR, Montzka SA, Yvon-Lewis SA (2022) A post-phaseout retrospective reassessment of the global methyl bromide budget. *J Geophys Res Atmos* 127(3): e2021JD035567. <https://doi.org/10.1029/2021jd035567>
- Scherer G, Urban M, Hagedorn H-W, Serafin R, Feng S, Kapur S, Muhammad R, Jin Y, Sarkar M, Roethig H-J (2010) Determination of methyl-, 2-hydroxyethyl- and 2-cyanoethylmercapturic acids as biomarkers of exposure to alkylating agents in cigarette smoke. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(27): 2520–2528. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.023>

- Scherer G, Pluym N, Scherer M (2022) Comparison of urinary mercapturic acid excretions in users of various tobacco/nicotine products. *Drug Test Anal*: 1–20. <https://doi.org/10.1002/dta.3372>
- Schettgen T (2006) Biochemisches Effekt-Monitoring in der Umweltmedizin – Hämoglobin-Addukte von Acrylamid, Glycidamid und Acrylnitril im Blut der Allgemeinbevölkerung. Dissertation. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Schettgen T, Broding HC, Angerer J, Drexler H (2004) Dimethyl sulphate; a hidden problem in occupational medicine. *Occup Environ Med* 61(1): 73–75
- Schettgen T, Müller J, Ferstl C, Angerer J, Weiss T, Leng G, Göen T, Hartwig A, MAK Commission (2016) Hämoglobinaddukte von Ethylenoxid (N-(2-Hydroxyethyl)valin), Propylenoxid (N-(2-Hydroxypropyl)valin), Acrylnitril (N-(2-Cyanoethyl)valin), Acrylamid (N-(2-Carbonamidethyl)valin) und Glycidamid (N-(2-Hydroxy-2-carbonamidethyl)valin). *MAK Collect Occup Health Saf* 1(3): 2221–2253. <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi7521d0021>
- van Sittert NJ, Angerer J, Bader M, Blaszkewicz M, Ellrich D, Krämer A, Lewalter J (1996) N-2-Cyanoethyl-Valin, N-2-Hydroxyethyl-Valin, N-Methyl-Valin (zum Nachweis einer Belastung/Beanspruchung durch Acrylnitril, Ethylenoxid sowie methylierende Substanzen). In: Angerer J, Schaller KH, Greim H, Hrsg. *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material*. 12. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi0nmvld0012>
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 50(17): 4998–5006. <https://doi.org/10.1021/jf020302f>
- Tavares R, Borba H, Monteiro M, Proença MJ, Lynce N, Rueff J, Bailey E, Sweetman GMA, Lawrence RM, Farmer PB (1996) Monitoring of exposure to acrylonitrile by determination of N-(2-cyanoethyl)valine at the N-terminal position of haemoglobin. *Carcinogenesis* 17(12): 2655–2660. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.12.2655>
- Törnqvist M (1990) Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during storage of blood samples. *Carcinogenesis* 11(1): 51–54. <https://doi.org/10.1093/carcin/11.1.51>
- Törnqvist M, Landin HH (1995) Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. *J Occup Environ Med* 37(9): 1077–1085. <https://doi.org/10.1097/00043764-199509000-00008>
- Törnqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P (2002) Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778(1–2): 279–308. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00172-1](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00172-1)
- Wallis SAS (1981) Reaction of benzyl chloride with haemoglobin and DNA in various organs of mice. *Toxicol Lett* 9(4): 379–387. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(81\)90014-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(81)90014-x)
- Yoffe D, Frim R, Ukeles SD, Dagani MJ, Barda HJ, Benya TJ, Sanders DC (2013) Bromine compounds. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a04_405.pub2
- Zimmermann H (2013) Propene. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a22_211.pub3
- Zimmermann H, Walzl R (2009) Ethylene. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a10_045.pub3