

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

5-Fluoruracil – Bestimmung von α -Fluor- β -alanin in Urin mittels GC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

R. Schierl¹, E. Fischer¹, G. Scherer², H.W. Hagedorn², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

¹ *Methodenentwicklung, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Klinikum der Universität München, Ziemssenstraße 1, 80336 München*

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)

Keywords: 5-Fluoruracil; α -Fluor- β -alanin; Biomonitoring; Urin; GC-MS/MS

Citation Note: Schierl R, Fischer E, Scherer G, Hagedorn HW, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. 5-Fluoruracil – Bestimmung von α -Fluor- β -alanin in Urin mittels GC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2019 Jan;4(1):337–352]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2025. https://doi.org/10.34865/bi5121d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 30 Apr 2025

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi5121d0022>

Manuskript abgeschlossen: 21 Mai 2015

Erstveröffentlichung (Online): 30 Jan 2019

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



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

5-Fluorouracil – Determination of α -fluoro- β -alanine in urine by - GC-MS/MS

[5-Fluoruracil – Bestimmung von α -Fluor- β -alanin in Urin mittels GC-MS/MS]

Biomonitoring Methods in German language

R. Schierl¹, E. Fischer¹, G. Scherer², H.-W. Hagedorn², Th. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi5121d0022

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area verified the presented biomonitoring method. The method described hereinafter permits the determination of α -fluoro- β -alanine (FBAL), the main metabolite of 5-fluorouracil, at low concentration levels and can be used for the biomonitoring of exposed individuals (manufacture, pharmacy, medicine).

To this end, urine samples are spiked with ¹³C-FBAL as internal standard (IS) and acidified with 0.1 M hydrochloric acid. The samples are then extracted and purified using a strong cation exchanger. After resuspension and derivatisation, FBAL is analysed using GC-MS/MS in the MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode and quantified with reference to the internal standard. Calibration standards are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed.

Keywords

5-Fluoruracil; α -Fluor- β -alanin; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; Gaschromatographie-Massenspektrometrie; GC-MS/MS

Author Information

¹ Entwickler der Methode: Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Klinikum der Universität München, Ziemssenstr. 1, 80336 München

² Prüfer der Methode: ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstr. 5, 82152 Planegg

³ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

⁴ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁵ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* Email: Th. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

5-Fluoruracil – Bestimmung von α -Fluor- β -alanin in Urin mittels GC-MS/MS

Matrix:	Urin
Arbeitsstoff:	5-Fluoruracil
Analytisches Messprinzip:	Kapillargaschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS)
Abgeschlossen im:	Mai 2015

Übersicht über den mit dieser Methode erfassbaren Parameter und den entsprechenden Arbeitsstoff:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
5-Fluoruracil	51-21-8	α -Fluor- β -alanin (FBAL)	3821-81-6

Zusammenfassung

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die Bestimmung von α -Fluor- β -alanin (FBAL), dem Hauptmetaboliten von 5-Fluoruracil, im niedrigen Konzentrationsbereich und kann zum Biomonitoring exponierter Personen (Produktionsmitarbeiter, Apotheken- und Krankenhauspersonal) eingesetzt werden.

Hierfür werden Urinproben mit ^{13}C -FBAL als internem Standard (IS) versetzt und mit 0,1 M Salzsäure angesäuert. Anschließend erfolgt die Aufkonzentrierung und Reinigung der Proben über einen starken Kationenaustauscher. Nach Resuspendierung und Derivatisierung wird FBAL mittels GC-MS/MS im MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Modus analysiert und unter Bezug auf den internen Standard quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in gleicher Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens

α -Fluor- β -alanin (FBAL)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,7\%$ bzw. $0,9\%$
	Streubereich	$u = 3,8\%$ bzw. $1,9\%$
bei einer dotierten Konzentration von 5 bzw. 40 μg FBAL pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,6\%$
	Streubereich	$u = 10,3\%$
bei einer dotierten Konzentration von 40 μg FBAL pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 97,9\%$ bzw. 101%
	bei einer dotierten Konzentration von 5 bzw. 40 μg FBAL pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,2 μg FBAL pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	1,0 μg FBAL pro Liter Urin	

Allgemeine Informationen zu 5-Fluoruracil

5-Fluoruracil ist das seit vielen Jahren am meisten verwendete Zytostatikum in der Krebstherapie. Eine Exposition kann daher in vielen Bereichen – von der Produktion über die Zubereitung bis hin zur Verabreichung am Patienten – stattfinden. Es gehört zu der Gruppe der Pyrimidinanaloga und wird überwiegend zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms und von Brustkrebs eingesetzt. Die Gabe erfolgt meist intravenös, es kann aber auch als Prodrug (Capecitabin[®]) oral verabreicht werden, um anschließend nach Metabolisierung als aktive Form die zellteilungshemmende Wirkung zu entfalten. Auch eine dermale Anwendung ist möglich (Efudix[®]). Über 80 % des verabreichten 5-Fluoruracils werden in der Leber über mehrere Zwischenschritte zu FBAL metabolisiert und anschließend mit dem Urin ausgeschieden (siehe Abbildung 1). Das Schlüsselenzym scheint dabei die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase zu sein [Diasio und Harris 1989]. Durch die Bestimmung des Hauptmetaboliten FBAL ist eine spezifische Bestimmung der inneren Belastung mit diesem Stoff möglich. Eine Hintergrundbelastung ist normalerweise nicht vorhanden.

Etwa 15 % des zirkulierenden Zytostatikums wird im Glomerulum frei filtriert und über den Urin ausgeschieden, davon ca. 90 % in der ersten Stunde. Lediglich 1–3 % des ursprünglich zirkulierenden Zytostatikums werden in die aktiven Metaboliten 5-Fluor-Desoxyuridin-Monophosphat (FdUMP), 5-Fluoruraciltriphosphat (FUTP) und 5-Fluor-Desoxyuridin-Triphosphat (FdUTP) umgewandelt, die für die zytostatische Wirkung verantwortlich sind [Saif et al. 2009].

Da die Ausscheidungskinetik von Patient zu Patient sehr variiert, kann man durch Bestimmung von FBAL im Urin die Wirkkonzentration im Verlauf der Chemotherapie kontrollieren.

Da 5-Fluoruracil in großem Umfang verabreicht wird, hat sich ein Umgebungsmonitoring auf diese Substanz bewährt, um Kontaminationen in Apotheken, Statio-

340 Analysen in biologischem Material

nen und Tageskliniken zu erfassen [Böhlandt und Schierl 2016]. Wenn hingegen beim Personal (Apotheke, Krankenhaus) eine unbeabsichtigte Inkorporation von 5-Fluoruracil nachgewiesen werden soll, ist eine sensitive analytische Bestimmung von FBAL im Urin nötig. Sessink et al. [1994] haben bereits 1994 eine GC-MS-Methode publiziert und mit dieser FBAL im Urin eines Mitarbeiters der Arzneimittelherstellung nachgewiesen (NWG 60 µg/L). In einer Studie aus Frankreich [Ndaw et al. 2010] wurden mittels LC-MS/MS (NWG 1 µg/L) Urinproben von sechs Apothekenmitarbeitern und dreizehn Onkologeschwestern untersucht. Von 121 Urinproben lagen 15–37 % über der Nachweisgrenze, wobei der Maximalwert 22,7 µg/L betrug. Rubino et al. [2006] publizierten 2006 eine GC-MS Methode (NWG 20 µg/L), mit der 64 Urinproben von Krankenhausmitarbeitern untersucht wurden. Insgesamt lagen nur drei Proben oberhalb der Nachweisgrenze, zwei enthielten etwa 30 µg FBAL/L, eine sogar 1150 µg FBAL/L.

Das hier vorgestellte, neue GC-MS/MS-Verfahren mit einer Nachweisgrenze von 0,2 µg/L wurde kürzlich erfolgreich in einer Studie eingesetzt, in der Urinproben des Pflegepersonals einer onkologischen Station auf FBAL untersucht wurden [Koller et al. 2018].

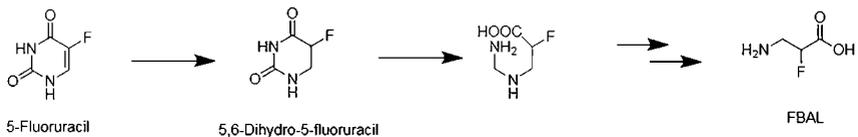


Abb. 1: Postulierter Metabolisierungsweg von 5-Fluoruracil zu FBAL nach Bernadou et al. [1985].

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	341
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	342
2.1	Geräte	342
2.2	Chemikalien	342
2.3	Lösungen	343
2.4	Interner Standard (IS)	343
2.5	Vergleichsstandards	343
3	Probenahme und Probenaufbereitung	344
3.1	Probenahme	344
3.2	Probenaufbereitung	345
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	345
4.1	Gaschromatographie	345
4.2	Massenspektrometrie	346
5	Analytische Bestimmung	346
6	Kalibrierung	346
7	Berechnung der Analysenergebnisse	347
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung	347
9	Beurteilung des Verfahrens	347
9.1	Präzision	348
9.2	Richtigkeit	348
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	349
9.4	Störeinflüsse	349
10	Diskussion des Verfahrens	350
11	Literatur	350
12	Anhang	351

1 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die Bestimmung von α -Fluor- β -alanin (FBAL), dem Hauptmetaboliten von 5-Fluoruracil, im niedrigen Konzentrationsbereich und kann zum Biomonitoring exponierter Personen (Produktionsmitarbeiter, Apotheken- und Krankenhauspersonal) eingesetzt werden.

Hierfür werden Urinproben mit ^{13}C -FBAL als internem Standard (IS) versetzt und mit 0,1 M Salzsäure angesäuert. Anschließend erfolgt die Aufkonzentrierung und Reinigung der Proben über einen starken Kationenaustauscher. Nach Resuspendierung und Derivatisierung wird FBAL mittels GC-MS/MS im MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Modus analysiert und unter Bezug auf den internen Standard quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in gleicher Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- Gaschromatograph mit Split/Splitless-Injektor, massenselektivem Detektor, Backflush-System, Datenverarbeitungssystem und automatischem Probengeber
- Kapillargaschromatographische Trennsäule: stationäre Phase: 5 %-Phenylmethylpolysiloxan; Länge: 15 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm (z. B. VF-5 ms, Agilent, Nr. CP8939)
- Kartuschen zur Festphasenextraktion: Chromabond® HR-XC 500 mg, 3 mL (z. B. Macherey-Nagel, Nr. 730955)
- Verschießbare Gefäße zum Sammeln von Urin
- Heizblock (z. B. Techne, Nr. DB-3A)
- Vortex-Mischer
- Analysenwaage (z. B. Sartorius)
- Verschiedene Messkolben und Messzylinder (z. B. Schott)
- 10 mL-Gewindgläschen mit Kunststoffkappen (z. B. Schuett)
- Vorrichtung zum Eindampfen im Stickstoffstrom (z. B. Barkey)
- Variabel einstellbare Mikroliterpipetten (z. B. Eppendorf)
- Vials mit Inserts für die Gaschromatographie (z. B. VWR)
- Urin-Monovetten (z. B. Sarstedt)
- SPE-Vakuumstation (z. B. Macherey-Nagel)
- Zentrifuge (z. B. Hettich)

2.2 Chemikalien

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

- Acetonitril (z. B. Merck Nr. 1.14291)
- Ammoniaklösung, 25 %, reinst (z. B. Roth Nr. 5460)
- *N-tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA, z. B. Aldrich Nr. 394882)
- α-Fluor-β-alanin (z. B. Campro Nr. CS11-20093213)
- α-Fluor-β-alanin-¹³C (z. B. Campro Nr. CS05-583_142)
- Methanol (z. B. Merck Nr. 1.06007)
- Salzsäure 30 % (z. B. Merck Nr. 1.00318)
- Helium 5.0 (z. B. Linde)
- Hochreines Wasser

2.3 Lösungen

- 0,1 M Salzsäure

In einem 100 mL-Messkolben werden etwa 80 mL hochreines Wasser vorgelegt und 1 mL der 30%igen Salzsäure zugegeben. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

- 15%ige Salzsäure

In einem 100 mL-Messkolben werden genau 50 mL hochreines Wasser vorgelegt und der Kolben wird mit 30%iger Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt.

- 5%ige Ammoniaklösung in Methanol

In einem 100 mL-Messkolben werden etwa 50 mL Methanol vorgelegt und 20 mL 25%ige Ammoniaklösung zugegeben. Anschließend wird der Kolben bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt.

Die verdünnten Salzsäurelösungen sind bei Lagerung im Abzug bei Raumtemperatur mindestens 6 Monate haltbar. Die Ammoniaklösung ist bei Lagerung im Abzug bei Raumtemperatur mindestens zwei Wochen haltbar.

2.4 Interner Standard (IS)

- IS-Stammlösung (400 mg/L)

Etwa 2 mg α -Fluor- β -alanin- ^{13}C werden in einen 5 mL-Messkolben genau eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Stammlösung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gut verschlossen gelagert und ist unter diesen Bedingungen für mindestens 24 Monate ohne nennenswerte Verluste haltbar.

- IS-Dotierlösung (2 mg/L)

50 μL der IS-Stammlösung werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Dotierlösung wird im Kühlschrank bei $+4\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens vier Wochen haltbar.

2.5 Vergleichsstandards

- Stammlösung (400 mg/L)

Etwa 10 mg FBAL werden in einen 25 mL-Messkolben genau eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Im Anschluss wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Stammlösung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gut verschlossen gelagert und ist unter diesen Bedingungen für mindestens 24 Monate ohne nennenswerte Verluste haltbar.

344 Analysen in biologischem Material

- Dotierlösung I (4 mg/L)

In einem 10 mL-Messkolben werden etwa 5 mL hochreines Wasser vorgelegt und 100 µL der Stammlösung hinzupipettiert. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

- Dotierlösung II (0,2 mg/L)

In einem 10 mL-Messkolben werden etwa 5 mL hochreines Wasser vorgelegt und 500 µL der Dotierlösung I hinzu pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Dotierlösungen werden bei +4–6 °C im Kühlschrank gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens vier Wochen haltbar.

Die Vergleichsstandards werden in Poolurin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins werden Urinproben von nicht gegenüber 5-Fluoruracil belasteten Personen gesammelt und gut durchmischt. Der Poolurin wird bei –20 °C gelagert und vor der Verwendung 5 min bei 1370 × g zentrifugiert. Die Vergleichsstandards werden gemäß dem in Tabelle 1 aufgeführten Pipettierschema in 10 mL-Urinmonovetten angesetzt.

Die Vergleichsstandards werden arbeitstäglich frisch angesetzt.

Tab. 1: Pipettierschema zur Herstellung der Vergleichsstandards in Poolurin.

Vergleichs- standard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung	Volumen Poolurin	FBAL- Konzentration
		[µL]	[µL]	[µg/L]
1	–	0	1000	0
2	II	10	990	2
3	II	25	975	5
4	II	50	950	10
5	II	100	900	20
6	I	25	975	100
7	I	50	950	200

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Gefäßen (z. B. Polypropylen) gesammelt. Von den gut durchmischten Urinproben werden 1 mL-Aliquote abgenommen und bei –20 °C gelagert. So gelagert sind die Proben mindestens sechs Monate stabil.

3.2 Probenaufbereitung

Nach Durchmischen der aufgetauten 1 mL-Urinaliquote werden diese mit je 10 μL 15%iger Salzsäure angesäuert. Nach Zugabe von je 20 μL der IS-Dotierlösung werden die Proben über starke Kationenaustauscher-Kartuschen (SPE) gereinigt.

Dazu werden die SPE-Kartuschen zweimal mit je 2 mL Methanol und anschließend zweimal mit je 2 mL hochreinem Wasser konditioniert. Es ist darauf zu achten, dass die Kartuschen nicht trocken laufen. Danach erfolgt die Aufgabe der Urinproben, die langsam unter Anlegen von Vakuum durch die Säulen gezogen werden. Anschließend werden die Kartuschen mit je 2 mL 0,1 M Salzsäure, gefolgt von je 2 mL Methanol, gewaschen und unter Anlegen von Vakuum gut getrocknet. Die Elution des Analyten erfolgt durch zweimalige Aufgabe von je 1 mL 5%iger Ammoniaklösung in Methanol in 10 mL-Schraubröhrchen. Die Eluate werden unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt und die Rückstände mit je 100 μL Acetonitril resuspendiert. Die Proben werden gut durchmischt und je 50 μL MTBSTFA zur Derivatisierung zugegeben. Die Probengläser werden verschlossen, für 20 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die gut durchmischten Proben werden dann für 5 min bei 1370 $\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird in GC-Vials mit Mikroinserts überführt und zur Analyse mittels GC-MS/MS verwendet.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

4.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	5 %-Phenylmethylpolysiloxan (z. B. VF-5 ms)
	Länge:	15 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
Temperaturen:	Filmstärke:	0,25 μm
	Säule:	Ausgangstemperatur 70 °C, 1 min isotherm; Anstieg um 25 °C/min auf 150 °C, dann Anstieg um 8 °C/min auf 190 °C, dann Backflush
	Injektor:	250 °C
	Transfer line:	280 °C
Backflush:	Backflush für 1,1 min mit -11,5 mL/min	
Trägergas:	Helium 5.0	
Flussrate:	1,5 mL/min, konstant	
Injektionsvolumen:	1 μL , pulsed splitless	

346 Analysen in biologischem Material

4.2 Massenspektrometrie

Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)
Ionisationsenergie:	70 eV
Detektionsmodus:	MRM
Kollisionsenergie IS (Qual/Quant)	15 V/10 V
Kollisionsenergie FBAL (Qual/Quant)	15 V/5 V

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung von FBAL in den nach Abschnitt 3 aufgearbeiteten Urinproben wird jeweils 1 µL in das GC-MS/MS-System injiziert und unter den angegebenen Bedingungen analysiert. Bei jeder Analysenserie wird zusätzlich mindestens eine Qualitätskontrollprobe mitgeführt. Die Retentionszeiten des Analyten und des internen Standards sowie die dazugehörigen Massenspuren sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Retentionszeiten und detektierte Massen.

Analyt	Retentionszeit	Vorläufer-Ion	Produkt-Ion
	[min]	[m/z]	[m/z]
FBAL	8,367	278,1	100
			116
			144 (Quantifier)
IS	8,363	281,1	102
			118
			147 (Quantifier)

Die in Tabelle 2 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Analysensäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen zu überzeugen. In Abbildung 2 (im Anhang) ist beispielhaft das Chromatogramm einer mit Standardlösungen dotierten Urinprobe dargestellt.

Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereichs (> 200 µg/L), so wird die Urinprobe mit unbelastetem Poolurin verdünnt, aufgearbeitet und neu vermessen.

6 Kalibrierung

Die nach Abschnitt 2.5 hergestellten Vergleichsstandards werden wie die Urinproben gemäß Abschnitt 3 aufgearbeitet und unter den in den Abschnitten 4 und 5 be-

schriebenen Arbeitsbedingungen analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die Konzentration des jeweiligen Vergleichsstandards aufgetragen wird. Die Steigung der Kalibriergeraden wird mittels linearer Regression berechnet. Die Kalibrierung verläuft bis zu einem Konzentrationsbereich von mindestens 200 µg/L linear (Abbildung 3 im Anhang). Bei fortlaufenden Analysenserien ist es in der Regel ausreichend je einen undotierten Poolurin und einen Vergleichsstandard aufzuarbeiten.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Bestimmung des Analytgehaltes einer Probe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards berechnet und in die nach Abschnitt 6 erstellte Kalibrierfunktion eingesetzt. Hierzu wird der Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion von dem ermittelten Quotienten der Peakflächen abgezogen und der erhaltene Wert anschließend durch die Steigung der Kalibriergerade geteilt. Man erhält die Analytkonzentration in µg/L.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

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

Dazu wird Poolurin mit einer definierten Menge an FBAL dotiert, aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [Bader et al. 2010]. Die Messwerte der mit jeder Analysenserie untersuchten Kontrollprobe sollten jeweils innerhalb der ermittelten Toleranzbereiche liegen.

9 Beurteilung des Verfahrens

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

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurden Poolurinproben von nicht gegenüber FBAL belasteten Personen mit einer FBAL-Standardlösung dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die dotierten FBAL-Konzentrationen betragen 5,05 µg/L sowie 40,4 µg/L. Bei zehnfacher Bestimmung dieser Urinproben ergaben sich die in Tabelle 3 dokumentierten Präzisionen in Serie.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde anhand eines mit 40,4 µg FBAL pro Liter Urin dotierten Poolurins bestimmt. Hierfür wurden Aliquote der dotierten Urinprobe bei -20 °C gelagert und an zehn verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelte Präzision von Tag zu Tag ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 3: Präzision in Serie für die Bestimmung von FBAL in Urin (n = 10).

Analyt	Dotierte Konzentration	Mittelwert der gemessenen Konzentration	Standardabweichung (rel.) s_w	Streubereich u
	[µg/L]	[µg/L]	[%]	[%]
FBAL	5,05	5,00	1,66	3,76
	40,4	39,3	0,85	1,92

Tab. 4: Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von FBAL in Urin (n = 10).

Analyt	Dotierte Konzentration	Mittelwert der gemessenen Konzentration	Standardabweichung (rel.) s_w	Streubereich u
	[µg/L]	[µg/L]	[%]	[%]
FBAL	40,4	40,3	4,55	10,3

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit des Verfahrens wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde Poolurin von mit FBAL unbelasteten Personen in einer Konzentration von 5,05 µg/L sowie 40,4 µg/L dotiert, in Aliquote geteilt und analysiert. Die ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Zusätzlich wurde ein Methodenvergleich mit einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von FBAL in Urin durchgeführt, die von einer anderen Arbeitsgruppe entwickelt und publiziert wurde [Ndaw et al. 2010]. Von dieser Arbeitsgruppe wurden dem Autor der Methode vier native Urinproben zu Vergleichszwecken zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse (Tabelle 6) belegen die Vergleichbarkeit beider Methoden.

Tab. 5: Relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von FBAL in Urin (n = 5).

Analyt	Dotierte Konzentration	Mittlere rel. Wiederfindung <i>r</i>	Bereich
	[µg/L]	[%]	[%]
FBAL	5,05	97,9	88,3–104
	40,4	101	96,5–105

Tab. 6: Vergleich der Analyseergebnisse bei Bestimmung von FBAL im Urin mittels LC-MS/MS und GC-MS/MS.

Probe	LC-MS/MS	GC-MS/MS
	[µg/L]	[µg/L]
1	7,8	5,5
2	28,1	28,3
3	59,8	40,8
4	131	178

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze wurde aus dem dreifachen Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt und die Bestimmungsgrenze analog aus dem zehnfachen Signal-Rausch-Verhältnis. Unter den angegebenen Bedingungen der Probenaufbereitung und analytischen Bestimmung ergab sich für die Bestimmung von FBAL in Urin eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/L und eine Bestimmungsgrenze von 1,0 µg/L.

9.4 Störeinflüsse

Da der verwendete interne Standard nur einen Isotopen-Reinheitsgrad von 98 % aufweist, führt die Zugabe des IS immer auch zu einem geringen Hintergrundsignal an FBAL in den untersuchten Proben. Aus diesem Grund ist die Aufarbeitung eines Reagenzienleerwertes bei jeder Analysenserie zwingend erforderlich, um den Hintergrundgehalt im Urin entsprechend berücksichtigen zu können. Bei Urinproben mit erhöhten Kreatininwerten kam es vereinzelt zu Störsignalen im Chromatogramm, die sich jedoch stets problemlos vom Analytpeak abtrennen ließen. Prinzipiell ist die Methode auch ohne Backflush-System einsetzbar. Durch die höhere Matrixbelastung kann die Nachweisgrenze dann aber etwas höher liegen.

10 Diskussion des Verfahrens

Das hier vorgestellte analytische Verfahren erlaubt eine präzise und nachweisstarke Bestimmung von FBAL in Urin mittels GC-MS/MS und eignet sich vor allem zur Bestimmung der inneren Belastung nach akzidentieller Exposition gegenüber 5-Fluoruracil.

Der Prüfer hat das Verfahren mit kleinen Modifikationen erfolgreich nachgestellt und konnte die Validierungsdaten im Wesentlichen bestätigen. So fand die Prüfung der Methode ohne Backflush-System statt. Durch die stärkere Matrixbelastung des GC-MS/MS-Systems führte dies im Vergleich zu einer etwas höheren Bestimmungsgrenze von 2 µg/L. Zusätzlich wurden die Urinproben bei der Prüfung der Methode vor der Festphasenextraktion mit 1 mL Wasser verdünnt, wodurch der Probenfluss durch die SPE-Kartuschen verbessert wurde. Abweichend kann die Einengung der Proben nach der Festphasenextraktion auch mittels einer Vakuumzentrifuge erfolgen.

Verwendete Messgeräte Agilent GC-MS/MS-System mit Split/Splitless-Injektor, massenselektivem Detektor, Backflush, Datenverarbeitungssystem und automatischem Probengeber.

11 Literatur

- Bader M, Barr D, Göen Th, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J und Hartwig A (Hrsg.): Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bernadou J, Armand JP, Lopez A, Malet-Martino MC, Martino R (1985) Complete Urinary Excretion Profile of 5-Fluorouracil during a Six-Day Chemotherapeutic Schedule, as Resolved by ¹⁹F Nuclear Magnetic Resonance. *Clin Chem* 31: 846–848
- Böhlandt A und Schierl R (2016) Benefits of Wipe Sampling: Evaluation of Long-Term 5-Fluorouracil and Platinum Monitoring Data. *Pharm Technol Hosp Pharm* 1: 139–150
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dt Ärztebl* 111: A1583–1618
- Diasio RB und Harris BE (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16: 215–237
- Koller M, Böhlandt A, Haberl C, Nowak D, Schierl R (2018) Environmental and biological monitoring on an oncology ward during a complete working week. *Toxicol Lett* 298: 158–163
- Ndaw S, Denis F, Marsan P, D'Almeida A, Robert A (2010) Biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil: Urinary alpha-fluoro-betaalanine assay by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in health care personnel. *J Chromatogr B* 878: 2630–2634
- Rubino FM, Verduci C, Buratti M, Fustinoni S, Campo L, Omodeo-Salè E, Giglio M, Iavicoli S, Brambilla G, Colombi A (2006) Assay of urinary alpha-fluoro-beta-alanine by gas chromatography-mass spectrometry for the biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil in oncology nurses and pharmacy technicians. *Biomed Chromatogr* 20: 257–266

Saif MW, Syrigos KN, Katirtzoglou NA (2009) S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative. *Expert Opin Investig Drugs* 18: 335–348

Sessink PJ, Timmermanns JL, Anzion RB, Bos RP (1994) Assessment of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to 5-fluorouracil. Determination of alpha-fluoro-beta-alanine in urine. *J Occup Med* 36: 79–83

Entwickler der Methode: R. Schierl, E. Fischer

Prüfer der Methode: G. Scherer, H.-W. Hagedorn

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

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

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

12 Anhang

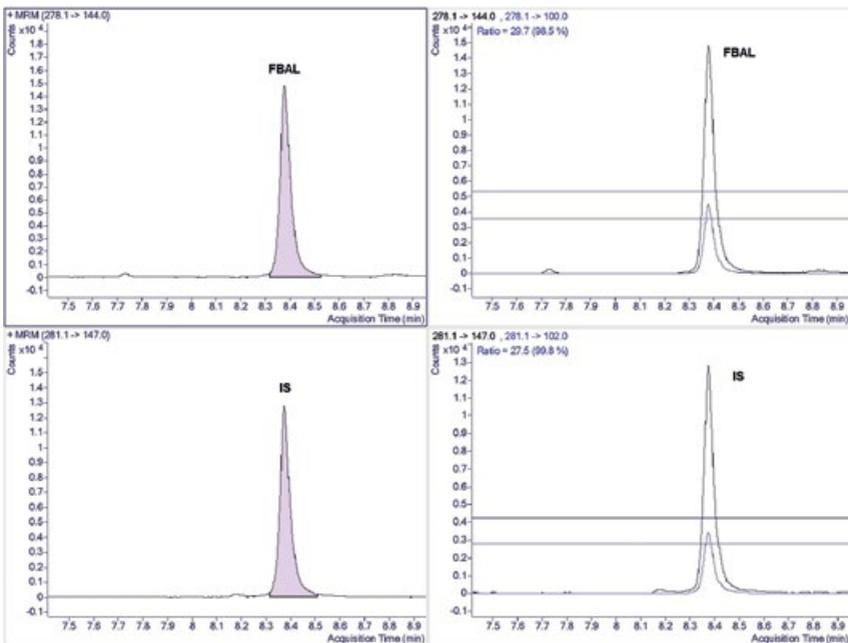


Abb. 2: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe mit einem dotierten FBAL-Gehalt von 40,4 µg/L.

352 Analysen in biologischem Material

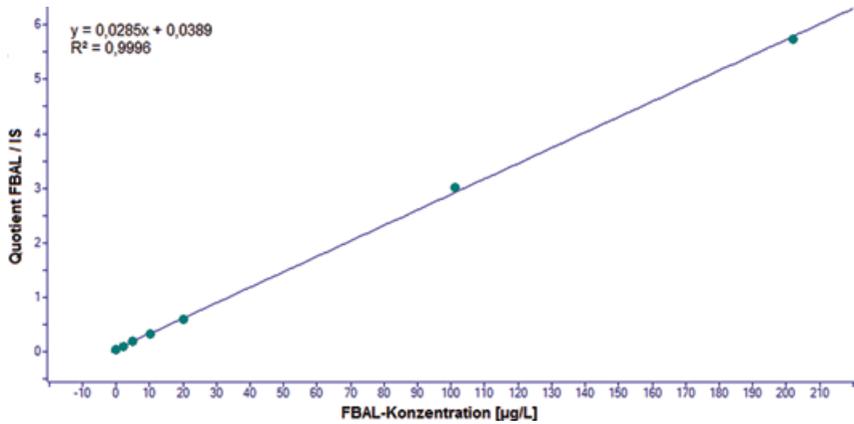


Abb. 3: Beispiel einer Kalibriergerade für FBAL in Urin.