

**BESTIMMUNG TOXISCHER SUBSTANZEN
UND IHRER METABOLITEN IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN
MITTELS GASCHROMATOGRAPHIE VI.*****BENZOESÄURE IM URIN**

J. FLEK und V. ŠEDIVEC

Institut für Arbeitshygiene und Berufskrankheiten, Prag 10

Eingegangen am 22. Oktober 1970

Es wurde ein einfaches Verfahren zur Bestimmung von Benzoesäure im Urin ausgearbeitet. Benzoesäure wird aus den Bindungen durch Erhitzen eines Natriumhydroxid mit einer Konzentration von 25 Gew. %/Vol. enthaltenden Reaktionsgemisches im siedenden Wasserbad während 20 Minuten in Freiheit gesetzt. Nach dem Erkalten, Ansäuern mit Schwefelsäure und Sättigen mit Ammoniumsulfat wird das Reaktionsgemisch einstufig mit Acetophenon als Innenstandard enthaltendem Äthylacetat extrahiert. Die in den Extrakt übergegangene Benzoesäure wird mit Diazomethan esterifiziert und der entstandene Methylester wird mit 10%igem Polyäthylenglykol 1500 unter Verwendung eines Ionisations-Flammendetektors bei 130°C chromatographiert. Die Eichkurve weist im Gesamtbereich von 0–5 mg Benzoesäure/ml Urin einen linearen Verlauf auf. Die Methode ermöglicht nicht nur neben normalen Komponenten des Urins, sondern auch neben Methylbenzo- und Hydroxybenzoesäuren eine schnelle und spezifische Benzoesäurebestimmung.

Die Benzoesäure, der Hauptmetabolit des Toluols, scheidet sich mit dem Urin als Hippursäure oder als Benzoylglucuronsäure^{1–6}. Im Urin der Pflanzenfresser findet sich nur Hippursäure, einige fleischfressenden Lebewesen können fast die gleiche Menge beider genannten Stoffe ausscheiden¹. Bei Menschen wird die Art der Benzoesäurebindung gewöhnlich vom Grad der Belastung des Organismus beeinflusst. Bei geringfügiger Belastung scheidet sich ausschließlich Hippursäure aus, bei hoher Belastung kann sich im Urin auch Benzoylglucuronsäure vorfinden^{1,2}. Als Expositionstest für Toluol dient entweder die Hippursäurebestimmung oder die Summenbestimmung der Benzoesäure im Urin. Die Benzoesäure wird aus der Bindung durch alkalische^{7,8} oder saure⁹ Hydrolyse in Freiheit gesetzt, durch Extraktion isoliert und volumetrisch^{7,9} oder gravimetrisch⁸ bestimmt. Bei einer anderen Methode wird sie durch Einwirkung von Oxydationsmitteln in Salicylsäure, die photometrisch bestimmt wird¹⁰, überführt. Man bedient sich auch der Überführung in das Mononitroderivat, das photometrisch bestimmt wird¹¹, fallweise weiterer Methoden¹². Wiewohl sich diese Methoden in der klinischen Praxis voll bewähren, kann man sie trotzdem nicht als vollkommen spezifisch bezeichnen. Es muß stets die Möglichkeit in Betracht

* V. Mitteilung: diese Zeitschrift 35, 3265 (1970).

gezogen werden, daß zahlreiche aromatische Säuren die normale oder gelegentlich auftretende Komponenten des Urins bilden, gleichzeitig mit Benzoesäure bestimmt werden; in der Mehrzahl der Fälle ist jedoch der Fehler mit Rücksicht auf die relativ kleinen Mengen vernachlässigbar.

In der Mitteilung¹³ wurde von uns die spezifische Hippursäurebestimmung im Urin mittels der Gaschromatographie beschrieben. Eines ähnlichen Verfahrens bedienen wir uns nun auch für die Summenbestimmung der Benzoesäure, nachdem sie vorher aus der konjugierten Form mittels alkalischer Hydrolyse in Freiheit gesetzt worden war.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien und Apparate

Die wäßrige Hippursäurestammlösung (0,7336 g Hippursäure und 0,5 ml 50 Gew. %/Vol. Natriumhydroxid wurden mit redestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt) enthielt in 1 ml 7,336 mg Hippursäure (entspricht 5,0 mg Benzoesäure). Die Hippursäurestandardlösungen wurden durch entsprechende Verdünnung so hergestellt, daß sie in 1 ml Hippursäure äquivalente a) 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg, b) 1, 2, 3, 4 und 5 mg Benzoesäure enthielten. Die Acetophenonstammlösung (Innenstandard) in Äthylacetat wurde durch Einwägen von 1 ml frischdestilliertem Acetophenon und Auffüllen mit Äthylacetat auf 100 ml hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen mit Äthylacetat Lösungen bereitet, die in 1 ml a) 250 µg, b) 1250 µg Acetophenon enthielten. Desweiteren gelangten zur Anwendung: verdünnte Schwefelsäure (40 ml 96,0%ige Schwefelsäure wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt), eine wäßrige Natrium- und Kaliumhydroxidlösung (50 g Substanz wurden nach dem Lösen mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt), Essigsäure, Diäthyläther, Äthylacetat, Ammoniumsulfat *p.a.* und N-Nitrosomethylharnstoff¹⁴.

Der Esterifizierungsapparat wurde in der Mitteilung¹³ beschrieben. Desweiteren wurden der mit einem Ionisations-Flammendektor versehene Chromatograph, Modell GD, der Firma Carlo Erba, eine aus nichtrostendem Stahl hergestellte, 2 m lange Kolonne mit einem Innendurchmesser von 2 mm, die mit 10% Polyäthylen-Glykol 1500 an Chromosorb W mit einer Körnung von 60–80 Siebmaschen gefüllt war, herangezogen. Die Arbeitstemperatur betrug 130°C, die Temperatur des Einspritzraums 180°C. Als Trägergas diente Stickstoff (25 ml/min), die Hilfs-gas, Wasserstoff (20 ml/min) und Luft (300 ml/min), wurden vor dem Eintritt in den Apparat durch Führen über die Säule eines Molekularsiebs gereinigt. Das Einspritzen der Probe mit einem Volumen von 5 µl wurde mit Hilfe der Hamiltonschen Mikroinjektionsspritze durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mittels Honeywell-Schreibers mit einem Meßbereich von 2,5 mV beim Eintrittswiderstand von 10¹⁰ Ohm und bei 1/8 bis 1/32 Vollempfindlichkeit durchgeführt. Die Papierverschiebung betrug 12,7 mm/min.

Arbeitsgang

In einem 25 ml-Schliffkolben werden 2 ml des zu prüfenden Urins und 2 ml Natriumhydroxid eingemessen, worauf der Inhalt gemischt wird. Der Kolben wird 20 Minuten in ein siedendes Wasserbad getaucht und nach dem Herausnehmen gekühlt, worauf unter dauerndem Durchschütteln und Kühlen 2 ml verdünnte Schwefelsäure zugegeben werden. Das gekühlte Reaktionsgemisch wird mit 2 g Ammoniumsulfat versetzt und nach gründlichem Durchmischen werden 5 ml Acetophenonlösung in Äthylacetat zugegeben, wobei bei niedrigeren Benzoesäurekonzentrationen

trationen eine Lösung mit dem Gehalt von 250 μg Acetophenon/ml, bei höheren Konzentrationen 1 250 μg Acetophenon/ml zugesetzt werden. Der Kolbeninhalt wird 1 Minute durchgeschüttelt und nach Trennen der Schichten wird ein Teil des Äthylacetatextraktes in ein Esterifizierungs-Reagenzglas übertragen. Die Esterifizierung wird mit Rücksicht auf die hohe Toxizität des Diazomethans im Digestorium durchgeführt. Der Esterifizierungsapparat wird aus drei mit Seitenrohr versehenen Reagenzgläsern in der Weise zusammengestellt, daß sich das Reagenzglas mit dem aus dem Urin gewonnenen Extrakt in der Mitte befindet; in das erste Entwicklungsprüfglas wägt man ungefähr 0,1 g N-Nitrosomethylharnstoff ein, worauf 2 ml Diäthyläther zugegeben werden. In das dritte Indikationsreagenzglas werden auch ungefähr 2 ml Diäthyläther eingemessen. Nach Zusammenstellen des Apparats wird in das Entwicklungsprüfglas 1 ml Kaliumhydroxid-Lösung eingebracht und das Reagenzglas wird sofort unter Zuhilfenahme eines mit einem Glasröhrchen versehenen Gummistopfens verschlossen, worauf der Stickstoffstrom mit einer Geschwindigkeit von ungefähr einem Bläschen in der Sekunde eingeführt wird. Die Esterifizierung der im Extrakt befindlichen Säuren ist beendet, sowie der Diäthyläther im dritten Reagenzglas eine Gelbfärbung annimmt. Das nichtverbrauchte Diazomethan aus dem ersten und dritten Reagenzglas wird mit Hilfe von Essigsäure unschädlich gemacht. Aus dem mittleren Reagenzglas beseitigen wir das nichtverbrauchte Diazomethan mittels Aeration von Stickstoff, es werden 5 μl in die Mikroinjektionsspritze gefüllt und nach dem Einspritzen wird das Chromatogramm verzeichnet. Es werden die Höhen (Flächen) der Wellen des Benzoessäuremethylesters und des Acetophenons gemessen, es wird ihr gegenseitiges Verhältnis (Innenstandard = 1) berechnet und aus der auf gleiche Weise konstruierten Eichkurve wird die Benzoessäurekonzentration im zu analysierenden Urin gemessen.

Eichkurve

Die Eichkurve wird in zwei Bereichen zusammengestellt, u.zw. für die Bestimmung des normalen Benzoessäure-niveaus im Urin im Bereich von 0–1 mg/ml und für die Harnanalyse mit höherem Benzoessäuregehalt im Bereich von 0–5 mg/ml.

In einem Satz von 25 ml-Schliffmaßkolben werden 2 ml Natriumhydroxidlösung und 2 ml Hippursäurestandardlösungen pipettiert, worauf weiter nach dem „Arbeitsgang“ vorgegangen wird. Bei der Extraktion werden für den Bereich der Eichkurve von 0–1 mg Benzoessäure/ml, Äthylacetat mit einem Gehalt von 250 μg Acetophenon/ml, für den Bereich von 0–5 mg/ml mit einem Gehalt von 1 250 μg /ml herangezogen. Das Verhältnis der Höhen (Flächen) der chromatographischen Wellen (Innenstandard = 1) wird in das Diagramm gegen die Benzoessäurekonzentration eingetragen (Abb. 1). Der Blindversuch wird auf gleiche Weise durchgeführt, anstatt 2 ml Standardlösung werden 2 ml destilliertes Wasser verwendet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hydrolyse der gebundenen Benzoessäure

Bei unseren Versuchen wurden vorerst die Bedingungen für die quantitative Hydrolyse der Hippursäure bei verschiedener Alkalität des Reaktionsgemisches (10, 15, 20 und 25 Gew. %/Vol. der Natriumhydroxidkonzentration) und bei abgestufter Erhitzungsdauer untersucht. Die Gemische wurden am siedenden Wasserbad während einer genau gemessenen Zeit erhitzt, dann abgekühlt und unter dauerndem Schütteln und Kühlen mit 2 ml verdünnter Schwefelsäure versetzt, wobei die Schwefelsäure-

konzentration so gewählt wurde, daß das resultierende Gemisch sauer reagierte. Die nichthydrolysierte Hippursäure wurde dann mittels des in der Mitteilung^{1,3} beschriebenen Verfahrens bestimmt. Wie aus dem Kurvenverlauf in Abb. 2 hervorgeht, ist die Geschwindigkeit der Hippursäurehydrolyse von der Alkalität des Reaktionsgemisches sehr abhängig. Bei niedriger Alkalität verläuft die Reaktion nur sehr langsam, bei höherer Alkalität erhöht sich die Geschwindigkeit und die Reaktionsdauer verkürzt sich.

Für den Standardarbeitsgang wurde von uns das Reaktionsgemisch mit einer Natriumhydroxidkonzentration von 25 Gew. %/Vol. und eine Erhitzungsdauer von 20 Minuten gewählt. Die Korrektheit der Bestimmung der Hydrolysenbedingungen wurde durch Versuche mit verschiedenen konzentrierten Hippursäurelösungen überprüft. Die Hippursäurehydrolyse verlief unter den angeführten Bedingungen quantitativ, in allen Fällen wurde die stöchiometrische Benzoesäuremenge bestimmt.

Die Benzoylglucuronsäure wird leichter als die Hippursäure hydrolysiert; ihre Destruktion erfolgt bei wesentlich mäßigeren Bedingungen^{8,9,15}. Durch die Wahl der bei der Hippursäurehydrolyse herrschenden Bedingungen wird daher auch das quantitative Freiwerden der Benzoesäure aus der Bindung zu Glucuronsäure voll gewährleistet.

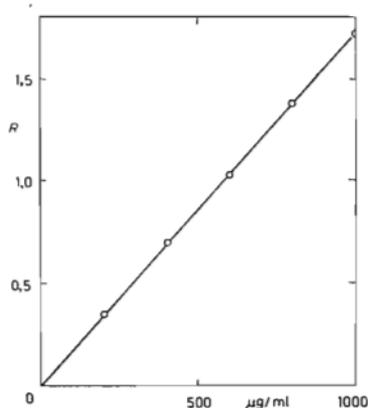


ABB. 1

Eichkurve für die Benzoesäurebestimmung

R ist das Verhältnis der Höhen der chromatographischen Wellen des Benzoesäuremethylesters und des Innenstandards. Die Benzoesäurekonzentration ist in $\mu\text{g/ml}$ der untersuchten Proben angegeben.

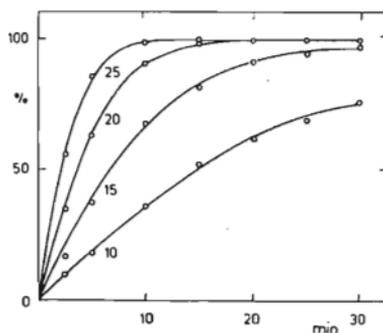


ABB. 2

Verlauf der Hippursäurehydrolyse bei verschiedener Alkalität des Reaktionsgemisches

Hippursäurehydrolyse, ausgedrückt in %, Reaktionsdauer in Minuten. Die einzelnen Kurven entsprechen der Natriumhydroxidkonzentration von 10, 15, 20 und 25 Gew. % / Vol.

Extraktion der Benzoesäure und ihre Überführung in Methylester

Wie von uns nachgewiesen wurde, kann die Benzoesäure aus der mit Ammoniumsulfat gesättigten, wäßrigen Phase mit Hilfe von Äthylacetat quantitativ extrahiert werden. Die Ausbeuten der einstufigen Extraktion sind nicht nur hoch (99,7%), sondern auch vollkommen reproduzierbar. Die Überführung der Benzoesäure in Methylester verläuft, ähnlich wie bei der Hippursäure¹³, bereits nach kurzer Zeit quantitativ.

Wahl des Innenstandards und der Bedingungen der chromatographischen Bestimmung

Als Innenstandard wurde Acetophenon gewählt, das in unmittelbarer Nähe der Welle des Benzoesäuremethylesters eluiert wird. Es ist in Wasser unlöslich und in hoher Reinheit erhältlich. Als geeigneteste stationäre Phase erwies sich Polyäthylenglykol 1500, bei dessen Verwendung vollkommen symmetrische Wellen des Methylesters und Innenstandards gewonnen werden. Die Auswertung des Chromatogramms auf Grund der Höhe der chromatographischen Wellen war nicht nur bequemer, sondern auch exakter als die Auswertung auf Grund der Flächen¹⁶.

Selektivität der Methode und Störeinflüsse

Bei unseren Versuchen richteten wir unsere Aufmerksamkeit vor allem auf einige Homologe und Derivate der Benzoesäure, die entweder als normale Komponenten des Urins oder dann auftreten können, wenn Personen bestimmte Medikamente einnahmen oder den Dämpfen gewisser aromatischer Kohlenwasserstoffe ausgesetzt waren; ggf. können sie auch durch Hydrolyse einiger im Urin befindlichen Säuren entstehen. Mittels des Standardarbeitsganges wurden die *o*-, *m*- und *p*-Methylbenzoesäure und die *o*-, *m*- und *p*-Hydroxybenzoesäure bestimmt. Wie von uns nachgewiesen wurde, benötigen die Methylester der angeführten Säuren eine längere Elutionsdauer als der Benzoesäuremethylester und Acetophenon (Innenstandard), so daß durch sie die Benzoesäurebestimmung nicht gestört wird. Die Tatsache, daß durch die Methylbenzoesäuren die Benzoesäurebestimmung nicht gestört wird, ist besonders wichtig, da die genannten Säuren durch Hydrolyse der Methylhippursäuren, der Metaboliten der Xylole, entstehen.

Unsere Aufmerksamkeit richteten wir auch auf die Gegenwart von Phenol und *p*-Kresol, die normale Komponenten des Urins bilden. Die Hydroxylgruppe des Phenols und *p*-Kresols geht durch Einwirkung von Diazomethan in die Methoxygruppe über und die entstehenden Methyläther weisen kürzere Elutionszeiten als der Benzoesäureester auf. Aus diesem Grund wird die Benzoesäurebestimmung durch die Gegenwart von Phenol und *p*-Kresol nicht gestört.

Bereich der Methode und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Der Bereich der Methode wurde einerseits für den Benzoessäuregehalt im Urin von nichtexponierten Personen (bis 1 mg Benzoessäure/ml Urin) andererseits von Toluoldämpfen ausgesetzten Personen (bis 5 mg Benzoessäure/ml Urin) gewählt. Im Gesamtbereich hat die Eichkurve linearen Verlauf. Bei merklich hohen Benzoessäurekonzentrationen im Urin, wo das Verhältnis der Höhen der chromatographischen Wellen des Benzoessäuremethylesters und des Acetophenons zu groß wäre, kann der zu untersuchende Urin mit Wasser verdünnt werden.

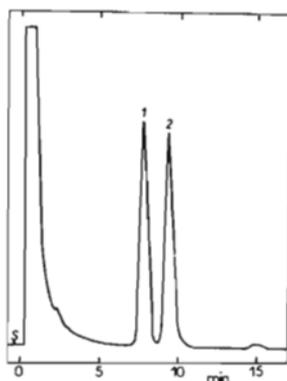


Abb. 3

Chromatogramm des Urins der exponierten Person

S Startpunkt der Analyse von 1 Benzoessäuremethylester, 2 Innenstandard (Acetophenon), Zeit in Minuten.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch zwanzigmal wiederholte Analyse ein und derselben Urinprobe der exponierten Person überprüft. Durch statistische Verarbeitung der Ergebnisse wurde der Variationskoeffizient $V = 0,42\%$ (bei Auswertung auf Grund der Höhen) oder $V = 2,39\%$ (bei Auswertung auf Grund der Flächen) bestimmt. Die Gesamtdauer einer Analyse beträgt ungefähr 40 Minuten. Das bei der Harnanalyse einer exponierten Person gewonnene Chromatogramm ist in Abb. 3 angeführt.

LITERATUR

1. Williams R. T.: *Detoxication Mechanismus*. Chapman & Hall, London 1959.
2. Pagnotto L. D., Lieberman L. M.: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 28, 129 (1967).
3. Bray H. G., Neale F. C., Thorpe W. V.: *Biochem. J.* 40, 134 (1964).
4. Baldwin B. C., Robinson D., Williams R. T.: *Biochem. J.* 71, 638 (1959).
5. Bridges J. W., French M. R., Smith R. L., Williams R. T.: *Biochem. J.* 118, 47 (1970).
6. Hartman F.: *Z. Klin. Med.* 147, 551 (1951).
7. Kingsbury F. B., Swanson W. W.: *J. Biol. Chem.* 48, 13 (1921).
8. Baldwin B. C., Robinson D., Williams R. T.: *Biochem. J.* 76, 595 (1960).
9. Quick A. J.: *J. Biol. Chem.* 69, 549 (1926).
10. Nicholls J. R.: *Analyst* 53, 19 (1928).
11. Dickens F., Pearson J.: *Biochem. J.* 48, 216 (1951).
12. Rieder H. P.: *Clin. Chim. Acta* 2, 497 (1957).
13. Šedivec V., Flek J.: *diese Zeitschrift* 35, 3265 (1970).
14. Arndt F., Noller C. R., Liebermann S.: *Organic Syntheses*, Coll. Vol. II, S. 461, Wiley, New York 1946.
15. Borgström B.: *Acta Physiol. Scand.* 15, 338 (1948).
16. Janák J.: *J. Chromatog.* 3, 308 (1960).

Übersetzt von F. Grundfestová.