

Ein Standard-Arbeitsverfahren auf dem Prüfstand

Acrylamid-Freisetzung bei der Herstellung von Polyacrylamid-Gelen



► Dr. Jürgen Fauss, Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker, Geschäftsbereich Prävention Messstelle Gefahrstoffe der BGN



► Dr. Markus Hoffmann, Gefahrstoffbeauftragter, Abteilung Sicherheitswesen, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Messungen bei der Herstellung von Polyacrylamid-Gelen haben ergeben, dass bis zur vollständigen Aushärtung der fertigen Gele monomeres Acrylamid in die Laborluft freigesetzt wird. Um eine Gefährdung der Labormitarbeiter auszuschließen, muss der Umgang mit monomerem Acrylamid – auch in Lösung – stets in einem Abzug durchgeführt werden.

Ausgangssituation:

Polyacrylamidgele werden bei mikrobiologischen Arbeitsverfahren als Standard-Trennmedien zur Analyse von Protein gemischen verwendet. Beim Ausgangsstoff – monomerem Acrylamid – handelt es sich um einen krebserzeugenden und erbgutverändernden Gefahrstoff der Kategorie 2 [1]. Gemäß § 11 der neuen Gefahrstoffverordnung [2] fallen Arbeiten mit krebserzeugenden, erbgutverändernden und fortpflanzungsgefährdenden Stoffen (KMR) [3] in die Schutzstufe 4. Gefordert werden hier die Handhabung in geschlossenen Systemen sowie der messtechnische Nachweis, dass beim Umgang zu keinem Zeitpunkt eine gefährliche Stoffkonzentration in der Raumluft auftritt.

Obwohl die Möglichkeit besteht, Polyacrylamidgele fertig konfektioniert und somit standardisiert zu kaufen, stellen die meisten universitären Forscher ihre Gele lieber selbst her, um spezifischen Erfordernissen Ihrer jeweiligen Trennprobleme besser gerecht werden zu können. Da die Verwendung pulverförmigen Acrylamids in den Laboratorien der Universität Heidelberg bereits vor Jahren eingestellt wurde (aufgrund der Ersatzstoff-Verpflichtung gem. § 9 (1) GefStoffV), werden käufliche wässrige Acrylamid-Lösungen als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen eingesetzt.

Als Chemiker hätte ich auf entsprechende Nachfrage im Brustton der Überzeugung geantwortet, dass in Wasser gelöstes Acrylamid als polares Molekül keine Tendenz zeigen sollte, bei Raumtemperatur in erheblichen Mengen aus Wasser heraus in die Dampfphase überzugehen, und dass daher eine Anreicherung in der Raumluft in Richtung auf eine für Menschen gefährliche Konzentration nicht zu erwarten sein sollte.

Erfordernis der Messung:

An der Universität Heidelberg werden Polyacrylamidgele täglich in zahlreichen biologischen, neurobiologischen und medizinischen Laboratorien hergestellt und verwendet. Die Bandbreite der technischen Rahmenbedingungen reicht dabei vom offenen Umgang in Funktionsräumen



Abb. 1: Giessen eines Polyacrylamid-Gels

mit unspezifischer Lüftung bis zur Handhabung im Abzug in Laboratorien mit 8-fachem technischem Luftwechsel. Um zu überprüfen, unter welchen Bedingungen eine gefahrlose Handhabung des Acrylamids sichergestellt ist, wurde in Kooperation mit der Messstelle Gefahrstoffe der Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel und Gaststätten (BGN) [4] eine Messreihe zusammengestellt, bei der im Zeitraum 8/2005–4/2006 die drei am häufigsten anzutreffenden Arbeitsplatzszenarien im Umgang mit Acrylamid in den Forschungslaboratorien der Universität Heidelberg untersucht wurden:

Herstellung:

H1: In einem Funktionsraum mit ca. 2-fachem Luftwechsel offen auf dem Labortisch

H2: In einem Labor mit 8-fachem Luftwechsel offen auf dem Labortisch

H3: In einem Labor mit 4-fachem Luftwechsel im Abzug

Verwendung: in einem Labor mit 4-fachem Luftwechsel offen auf dem Labortisch

V1 Elektrophorese

V2 Ausstanzen von Gel-Banden auf einem Durchlichttisch



personen-
bezogene
Probenahme

Bei den Herstellungsszenarien (H1 und H2) sowie bei der Verwendung in der Elektrophorese (V1) wurden die Acrylamid-Konzentrationen in der Luft sowohl personen- als auch standortbezogen gemessen. Bei der Gelherstellung im Abzug (H3) wurde nur personenbezogen und beim Ausstanzen der Banden aus dem Gel (V2) nur standortbezogen gemessen.

Der manuelle Prozess während der Gel-Herstellung dauert je nach Größe und Dicke des gewünschten Gels zwischen 5 und 10 Minuten. Hierbei wird zunächst eine wässrige Lösung von monomerem Acrylamid mit TBE-Puffer [5] versetzt. Danach wird ein Gemisch aus TEMED [5] und APS [5] hinzu gegeben und die erhaltene Mischung nach kurzem Schütteln zwischen die beiden Glasplatten der Gelkammer gegossen (Abb. 1) und die Oberfläche des Gels mit einem Alkohol überschichtet.

Die Kammer bleibt bis zur beendeten Polymerisation stehen (1-3 Stunden). Eine Elektrophorese bzw. das Ausstanzen von Banden aus Gelplatten dauert zwischen einer und mehreren Stunden.

Messung auch ohne gültigen Grenzwert?

Angesichts des Umstands, dass mit der Novellierung der GefStoffV alle Technischen Richtkonzentrationen (TRK-Werte [6]) aufgehoben und für die ehemals in der TRGS 900 [7] aufgeführten KMR-Stoffe bis auf 5 Stoffe noch keine neuen Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW [8]) festgelegt wurden, kann man sich schon fragen, was eine Messung eigentlich bringen soll, wenn es keinen Stoffgrenzwert gibt und wie eine gemessene Konzentration zu bewerten ist. Der pragmatische Ansatz hierzu war, den ehemaligen TRK-Wert von Acrylamid ($30 \mu\text{g}/\text{m}^3$) als Anhaltspunkt für eine Gefährdungsabschätzung heranzuziehen und eine deutliche Unterschreitung dieses Werts als akzeptabel anzusehen, während ein Erreichen oder gar Überschreiten des Grenzwerts Anlass für entsprechende Schutzmaßnahmen sein sollte.

Für die Bewertung der Messergebnisse ist die Definition für die Einhaltung von Luftgrenzwerten entscheidend: Ein Luftgrenzwert gilt dann als dauerhaft sicher eingehalten, wenn die gemessenen Schichtmittelwerte höchstens 1/10 des Grenzwerts erreichen. Im Fall von Acrylamid sind dies maximal $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Ergebnis der Messung:

Nur in den Szenarien H3 (monomeres Acrylamid im Abzug), V1 und V2 (Polyacrylamidgele offen im Labor) wurde der ehemalige TRK-Wert sicher eingehalten. Beim Umgang mit monomerem

Acrylamid außerhalb eines Abzugs (H1 und H2) traten selbst bei einem 8-fachen Luftwechsel der Laborluft Belastungen mit Acrylamid auf, die eine dauerhaft sichere Einhaltung des bisherigen Grenzwerts nicht gewährleisten (Tab. 1).

Eine weitere Messung – unabhängig von den Szenarien – wenige Zentimeter über einer offenen Acrylamid-Flasche ergab einen Messwert von $740 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und bestätigte die unerwartete Flüchtigkeit des Monomeren aus der wässrigen Lösung. Die tatsächliche Konzentration lag aufgrund der vermutlichen Überladung des Proben-trägers wahrscheinlich noch deutlich höher.

Fazit:

Aus dem Schutzstufenkonzept [9] der GefStoffV leitet sich unmittelbar die Verpflichtung zur Emissionsminimierung ab. Dies gilt umso mehr, als es sich bei Acrylamid um einen krebserzeugenden und erbgutverändernden Arbeitsstoff handelt, bei dem auch bei eingehaltenem TRK-Wert eine Beeinträchtigung der Gesundheit des Menschen nicht ausgeschlossen werden kann. Unter der Prämisse, dass keine fertigen Gele gekauft, sondern Polyacrylamid-Gele vor Ort frisch hergestellt werden müssen, bleibt keine andere Möglichkeit übrig, als Arbeiten mit monomerem Acrylamid bis zur erfolgten Polymerisation zum fertigen Gel im Abzug durchzuführen.

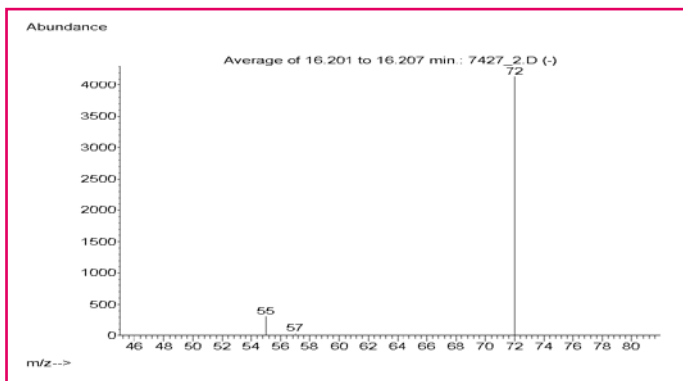
Das Messergebnis sollte darüber hinaus den Anstoß geben, einmal über die bisherige Annahme nachzudenken, dass beim Umgang mit Gefahrstoffen in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur generell keine gefährlichen Konzentrationen in der Raumluft entstehen können. Im Lichte der unerwarteten Ergebnisse bei Acrylamid scheint hier eine Bewertung jedes Einzelfalls künftig durchaus angebracht. –

Experimenteller Teil

Probenahme und -aufarbeitung

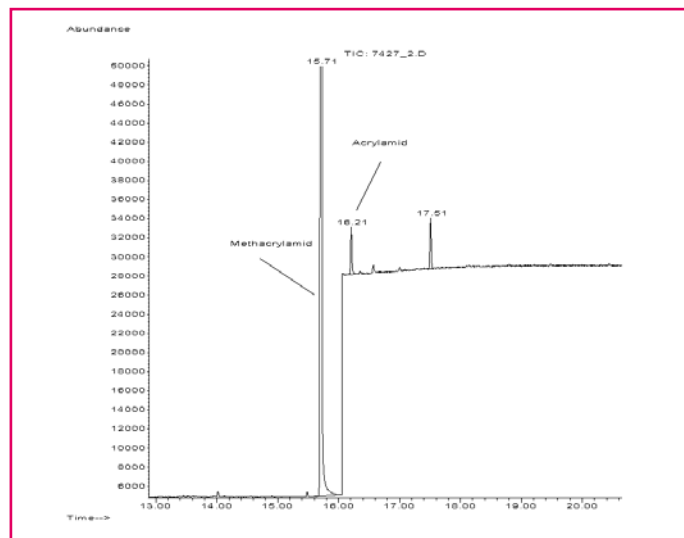
Die Probenahme von Acrylamid in der Luft und die Aufarbeitung der Proben-träger erfolgte mittels eines vom BGIA angewendeten Verfahrens [10], welches im Zentrallabor der BGN modifiziert und validiert wurde [11].

Hierbei wird für die Messung ein kombiniertes Probenahme-System GGP [12] verwendet, das über einen trichterförmigen Erfassungskegel mit einer Ansaugrate von 210 l/h die Einatemgeschwindigkeit von 1,25 m/s simuliert. Eine mit Aktivkohle gefüllte Kartusche adsorbiert das gasförmig vorliegende Acrylamid während auf einem vorgeschalteten Glasfaserfilter eventuell vorhandene Aerosole abgeschieden werden. Das Ansaugen der Probeluft erfolgt mit geeigneten, akkubetriebenen Pumpen (bspw. HFS-513A der Fa. Gilian oder GSA 5002ex), die



▲ Abb. 2: Massenspektrum

▶ Abb. 3: Chromatogramm



vor der Probenahme auf einen Durchfluss von 3,5 l/min. eingestellt werden. Vor und nach der Probenahme wird der eingestellte Volumenstrom mittels eines Massendurchflussmessers als Primärstandard (DryCal Lite, Fa. Bios) überprüft.

Zur Messung wird das kombinierte Proben-träger-System durch einen flexiblen Schlauch mit der Probenahmepumpe verbunden und in Atemhöhe positioniert. Je nach Messstrategie wird es entweder an einer Person befestigt oder ortsfest an einem Stativ aufgestellt (Abb.1).

Die Extraktion der beiden Probenträger erfolgt jeweils mit 3 ml Dichlormethan/Methanol-Gemisch 9:1 mit Methacrylamid bzw. Undecan als internem Standard. Während für die Aktivkohle eine spätere Desorption im analytischen Labor ausreichend ist, muss das Filter direkt nach der Probenahme in das Extraktionsmittel eingetaucht werden. Für die Berechnung des Analyseergebnisses werden die Gehalte beider Extrakte einer Probenahme addiert und mittels des normierten Probenahme-Volumens auf die Konzentrationen in der Luft am Arbeitsplatz umgerechnet.

Chromatographie

Methode 1 (GC/MS, EI-Modus)

Gaschromatograph: HP 6890 mit MSD 5973
Trennsäule CP Sil 8 CB, 50 m x 0,32 mm I.D., 4,7 µm Film, Fa. Varian
PTV-Injektor 35 °C für 0,5 min., mit 300 °C/min. auf 270 °C;

Injektion von 1 µl splitlos für 2 min., 60 kPa Helium im constant pressure-Modus
Ofentemperatur: 35 °C für 5 min., mit 5 °C/min. auf 100 °C, mit 16 °C/min. auf 200 °C, 10 min. halten und mit 16 °C/min. auf 270 °C, 7 min. halten

Quadrupol 200 °C, target ion m/z = 71 (Acrylamid, Undecan)

Methode 2 (GC/MS, CI-Modus)[13]

Gaschromatograph: HP 6890 mit MSD 5973-N

Trennsäule 19091N-136 Innowax, 60 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm Film, Fa. Agilent
PTV-Injektor 35 °C für 0,02 min., mit 500 °C/min. auf 260 °C;

Injektion von 1 µl splitlos für 1,2 min., 180 kPa Helium im constant flow-Modus
Ofentemperatur: 35 °C für 1 min., mit 12 °C/min auf 230 °C, 10 min. halten
Quadrupol 240 °C, target ion m/z = 72 (Acrylamid) bzw. 86 (Methacrylamid)
Reaktandgas: Methan im PCI-Modus mit 1,0 l/min.

Methode 3 (GC/NPD)

Gaschromatograph: HP 5890 mit Stickstoff/Phosphor-selektivem Detektor
Trennsäule ZB Wax 30 m x 0,25 mm I.D., 0,5 µm Film, Fa. Phenomenex
on column-Injektor, Temperatur folgt der Ofentemperatur (oven track on)
Injektion von 1 µl, 30 kPa Helium im constant pressure-Modus
Ofentemperatur: 32 °C für 1 min., mit 20 °C/min. auf 150 °C, mit 10 °C/min. auf 240 °C, 8 min. halten
NPD 260 °C, ca. 3 pA Grundrauschen

Obwohl für die Acrylamid-Analytik alle 3 Methoden zur Anwendung kamen, ist die positive chemische Ionisation mit Methan als Reaktandgas die Methode der Wahl. Im Gegensatz zur vielseitigen, d. h. je nach Massenwahl für viele flüchtigen

tigen organische Verbindungen anwendbaren EI-Methode 1, führt die chemische Ionisation zu einer hohen Selektivität. Anstelle des häufig vorkommenden Ions m/z = 71 wird das intakte, protonierte Molekülion m/z = 72 sehr selektiv und empfindlich detektiert, so dass sich eine Bestimmungsgrenze von 10 µg/l Acrylamid in der Messlösung (entsprechend 80 ng Acrylamid pro m³ Atemluft bei 2 h Sammelzeit) ergibt (Abb.3). Mit Ammoniak als Reaktandgas kann die Empfindlichkeit offenbar nochmals um etwa das Dreifache erhöht werden.

Validierung

Die Wiederholpräzision der einzelnen Analyseverfahren betrug 3–5 %. Die absolute Bestimmungsgrenze für Acrylamid bewegte sich je nach Verfahren in einem Bereich von 130 ng/ml Messlösung (NPD) bis hinab zu 10 ng/ml Messlösung (MSD/PCI).

Die Wiederfindungsraten der Messverfahren einschließlich der maximal 2stündigen Probenahme betragen 90–100 %. Nach den Vorgaben der DIN EN 482 wurden anhand von Parallelansätzen Messunsicherheiten der Gesamtverfahren von unter 20 % ermittelt.

Die beaufschlagte Aktivkohle-Kartusche ist vor der Aufarbeitung bis zu 1 Woche unter Kühlung lagerfähig, während das Filter sofort in die Desorptionslösung eingebracht werden muss.

Die Flüchtigkeit des Acrylamids wird analytisch durch die Tatsache bestätigt, dass sich diese Substanz nach der Probenahme stets zum größten Teil in der dem Filter nachgeschalteten Aktivkohle-Phase befindet.

Danksagung

Wir danken Frau Ana Mateo-Murawski von der Messstelle Gefahrstoffe der BGN für Ihre Unterstützung hinsichtlich der Acrylamid-Analytik und -methodenentwicklung.

Tab. 1: gemessene Acrylamid-Konzentrationen

	personenbezogen	standortbezogen
H1	15 µg/m ³	20 µg/m ³
H2	3 µg/m ³	5 µg/m ³
H3	0,2 µg/m ³	-
V1	0,2 µg/m ³	0,7 µg/m ³
V2	-	< 0,1 µg/m ³

Literatur

- [1] Krebserzeugend und erbgutverändernd Kategorie 2: Stoffe, die als krebserzeugend und erbgutverändernd für den Menschen angesehen werden sollten (RL 67/548/EWG, Anhang VI Pkte. 4.2.1 und 4.2.2)
- [2] Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen – GefStoffV vom 23.12.2004
- [3] KMR: krebserzeugend, mutagen, reproduktionstoxisch
- [4] BGN, Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel und Gaststätten, Geschäftsbereich Prävention, Messstelle Gefahrstoffe; Dynamostr. 7-11, 68165 Mannheim
- [5] TBE-Puffer: Zubereitung aus TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Borsäure und EDTA-Na₂ (Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat); TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; APS: Ammoniumpersulfat
- [6] Technische Richtkonzentration; diejenige Konzentration eines Gefahrstoffs als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft, die als Anhaltspunkt für die zu treffenden Schutzmaßnahmen und die messtechnische Überwachung am Arbeitsplatz heranzuziehen ist.
- [7] Technische Regel gefährliche Stoffe Nr. 900: „Arbeitsplatzgrenzwerte“
- [8] Der Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) ist der Grenzwert für die zeitlich gewichtete durchschnittliche Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz in Bezug auf einen gegebenen Referenzzeitraum. Er gibt an, bei welcher Konzentration eines Stoffes akute oder chronische schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit im Allgemeinen nicht zu erwarten sind.
- [9] Schutzstufenkonzept der GefStoffV: §§ 8–11
- [10] Arbeitsmappe des Berufsgenossenschaftlichen Instituts für Arbeitsschutz (BGI), St. Augustin: Messung von Gefahrstoffen – Acrylamid, 6038 (10/1990)

Weitere Literatur direkt bei den Autoren erhältlich

► **KONTAKT**

Dr. Markus Hoffmann

Ruprecht Karls-Universität Heidelberg
Tel.: 06221/542167
Fax: 06221/542199
markus.hoffmann@uni-hd.de

Dr. Jürgen Fauss

Messstelle Gefahrstoffe der BGN
Mannheim
Tel.: 0621/4456-3627 oder -3683
Fax: 0621/4456-3499
juergen.fauss@bgn.de