

Di(2-propylheptyl)phthalat – Bestimmung von Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat, Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat und Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat in Urin mittels GC-HR-MS oder GC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Di(2-propylheptyl)phthalat;
DPHP; Urin; GC-HR-MS;
GC-MS/MS

W. Gries¹

C. Schmidtkunz¹

G. Leng¹

M. Müller²

M. Lange²

T. Göen^{3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, Institut für Biomonitoring, 51368 Leverkusen

² Methodenprüfung, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Georg-August-Universität Göttingen, Waldweg 37 B, 37073 Göttingen

³ Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, 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:

Gries W, Schmidtkunz C, Leng G, Müller M, Lange M, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Di(2-propylheptyl)phthalat – Bestimmung von Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat, Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat und Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat in Urin mittels GC-HR-MS oder GC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2021 Sep;6(3):Doc072. DOI: https://doi.org/10.34865/bi53306d6_3or

Manuskript abgeschlossen:
18 Mai 2017

Publikationsdatum:
30 Sep 2021

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.

This method was developed for the selective detection of the main metabolites of di(2-propylheptyl) phthalate (DPHP) in urine. After enzymatic hydrolysis, the metabolites mono(2-propyl-6-carboxyhexyl) phthalate (cx-MPHxP), mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl) phthalate (OH-MPHP), and mono(2-propyl-6-oxoheptyl) phthalate (oxo-MPHP) are extracted from 1 ml of urine with *tert*-butyl methyl ether. The metabolites are then selectively derivatised at the carboxyl group by adding 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) and diisopropylcarbodiimide. The HFIP esters formed are separated using capillary gas chromatography and analysed with subsequent high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry detection. Detection limits ranged from 0.05 to 0.1 µg/l with corresponding quantitation limits between 0.15 and 0.3 µg/l.

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Gaschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie oder Tandem-Massenspektrometrie (GC-HR-MS oder GC-MS/MS)

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Di(2-propylheptyl)phthalat (DPHP)	53306-54-0	Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat (cx-MPHxP)	1412411-10-9
		Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat (OH-MPHP)	1372605-11-2
		Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat (oxo-MPHP)	1373125-92-8

Zuverlässigkeitskriterien

Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat (cx-MPHxP) mittels GC-HR-MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$s_w = 1,0 \%, 0,8 \%$ bzw. 2,5 % $u = 2,3 \%, 1,8 \%$ bzw. 5,5 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$s_w = 2,2 \%, 4,5 \%$ bzw. 5,2 % $u = 4,9 \%, 10,0 \%$ bzw. 11,7 %
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$r = 102 \%, 102 \%$ bzw. 105 %
Nachweisgrenze:	0,05 µg cx-MPHxP pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,15 µg cx-MPHxP pro Liter Urin	

Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat (cx-MPHxP) mittels GC-MS/MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 1,8 \%, 1,7 \%$ bzw. 1,1 % $u = 4,6 \%, 4,4 \%$ bzw. 2,8 %
Präzision von Tag zu Tag: ^{a)}	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	$s_w = 4,4 \%, 4,9 \%$ bzw. 5,6 % $u = 10,4 \%, 11,6 \%$ bzw. 13,2 %
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg cx-MPHxP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$r = 103 \%, 104 \%$ bzw. 106 %
Nachweisgrenze: ^{b)}	0,05 µg cx-MPHxP pro Liter Urin	

Bestimmungsgrenze:^{b)} 0,15 µg cx-MPHxP pro Liter Urin

^{a)} die Daten der Präzision von Tag zu Tag mittels GC-MS/MS wurden von den Prüfern der Methode erhoben

^{b)} siehe Abschnitt 11.4 und Abschnitt 11.5

Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat (OH-MPHP) mittels GC-HR-MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 3,8\%, 2,4\%$ bzw. 2,9%
	Streubereich	$u = 8,5\%, 5,3\%$ bzw. 6,4%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,4\%, 4,8\%$ bzw. 1,8%
	Streubereich	$u = 16,4\%, 10,7\%$ bzw. 4,1%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 88\%, 90\%$ bzw. 108%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,1 µg OH-MPHP pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,3 µg OH-MPHP pro Liter Urin	

Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat (OH-MPHP) mittels GC-MS/MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,6\%, 1,4\%$ bzw. 1,0%
	Streubereich	$u = 17,0\%, 3,6\%$ bzw. 2,6%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag: ^{a)}	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 17,4\%, 16,1\%$ bzw. 10,7%
	Streubereich	$u = 41,2\%, 38,1\%$ bzw. 25,3%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 115\%, 106\%$ bzw. 103%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg OH-MPHP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze: ^{b)}	0,1 µg OH-MPHP pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze: ^{b)}	0,3 µg OH-MPHP pro Liter Urin	

^{a)} die Daten der Präzision von Tag zu Tag mittels GC-MS/MS wurden von den Prüfern der Methode erhoben

^{b)} siehe Abschnitt 11.4 und Abschnitt 11.5

Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat (oxo-MPHP) mittels GC-HR-MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,7\%, 1,2\%$ bzw. 2,0%
	Streubereich	$u = 3,9\%, 2,7\%$ bzw. 4,4%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,6\%, 1,3\%$ bzw. 1,4 %
	Streubereich	$u = 5,7\%, 2,8\%$ bzw. 3,0 %
bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 100\%, 100\%$ bzw. 106 %
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,08 µg oxo-MPHP pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,25 µg oxo-MPHP pro Liter Urin	

Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat (oxo-MPHP) mittels GC-MS/MS

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,7\%, 1,9\%$ bzw. 1,1 %
	Streubereich	$u = 12,1\%, 4,9\%$ bzw. 2,8 %
bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag: ^{a)}	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 11,0\%, 10,1\%$ bzw. 8,3 %
	Streubereich	$u = 26,0\%, 23,9\%$ bzw. 19,6 %
bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 96\%, 105\%$ bzw. 102 %
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg bzw. 100 µg oxo-MPHP pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze: ^{b)}	0,1 µg oxo-MPHP pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze: ^{b)}	0,3 µg oxo-MPHP pro Liter Urin	

^{a)} die Daten der Präzision von Tag zu Tag mittels GC-MS/MS wurden von den Prüfern der Methode erhoben

^{b)} siehe [Abschnitt 11.4](#) und [Abschnitt 11.5](#)

2 Allgemeine Informationen zu Di(2-propylheptyl)phthalat (DPHP)

DPHP hat eine Molmasse von 446,7 g/mol und liegt bei Raumtemperatur als klare, farblose und viskose Flüssigkeit vor. Die Strukturformel von DPHP ist in [Abbildung 1](#) dargestellt. Das unter dem Handelsnamen „Palatinol 10-P“ vermarktete DPHP wird als Weichmacher in PVC und Vinylchloridcopolymeren eingesetzt, wobei der Gehalt in den Produkten 30–60 % beträgt. DPHP wird beispielsweise in Baumaterialien, Dachbelägen, Kabelummantelungen, KFZ-Innenausstattungen, Polyurethan- und Epoxidharzklebstoffen sowie in Farben verwendet. Zwischen 100 000 und 1 000 000 Tonnen DPHP werden jährlich in den Europäischen Wirtschaftsraum eingeführt bzw. in diesem hergestellt (ECHA 2021).

Die Herstellung erfolgt durch die Dimerisierung von *n*-Valeraldehyd mit anschließender Hydrierung. Die entstehenden Alkohole (zu 90 % 2-Propylheptanol und zu 10 % 2-Propyl-4-methylhexanol und 2-Propyl-5-methylhexanol) werden anschließend mit Phthalsäureanhydrid verestert. Das entstehende DPHP hat einen Phthalsäureestergehalt von mindestens 99,5 % mit einer Isomerenverteilung von etwa 81 % DPHP, 18 % 2-Propylheptyl-2-propyl-4/5-methylhexylphthalat und 1 % Bis(2-propyl-4/5-methylhexyl)phthalat (BfR 2011).

Zur kanzerogenen Wirkung von DPHP liegen keine Studien vor. Da der Verdacht auf eine kanzerogene Wirkung bei langfristiger Exposition besteht, wurde DPHP von der MAK-Kommission in die Kanzerogenitäts-Kategorie 3 eingestuft (Hartwig 2015). Darüber hinaus wird DPHP im Rahmen von REACH auf seine mögliche Wirkung als hormonaktive Substanz untersucht (ECHA 2021).

Die Metabolisierung von DPHP geschieht in erster Linie über den Monoester, der durch ω - und ω -1-Oxidation zu den Hydroxy-, Oxo- und Carboxy-Monoestern oxidiert wird. Dementsprechend wurden von freiwilligen Probanden innerhalb von 48 Stunden nach oraler Gabe von DPHP 13,5–17 % der Dosis als oxo-MPHP, 10,7–16 % als OH-MPHP und 0,5–3 % als cx-MPHxP mit dem Urin ausgeschieden (Leng et al. 2014; Wittassek und Angerer 2008). Die Strukturen der DPHP-Metaboliten sind in [Abbildung 1](#) dargestellt.

Die Kommission Human-Biomonitoring (HBM-Kommission) des Umweltbundesamtes hat im Jahr 2015 HBM-Werte für DPHP abgeleitet. Der HBM-I-Wert, also die Konzentration bei dessen Unterschreitung nach dem aktuellen Stand der Bewertung durch die HBM-Kommission nicht mit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung zu rechnen ist, wurde auf 1000 $\mu\text{g/l}$ Morgenurin für Kinder und auf 1500 $\mu\text{g/l}$ Morgenurin für Erwachsene (jeweils die Summe aus oxo-MPHP und OH-MPHP) festgelegt (HBM-Kommission 2015).

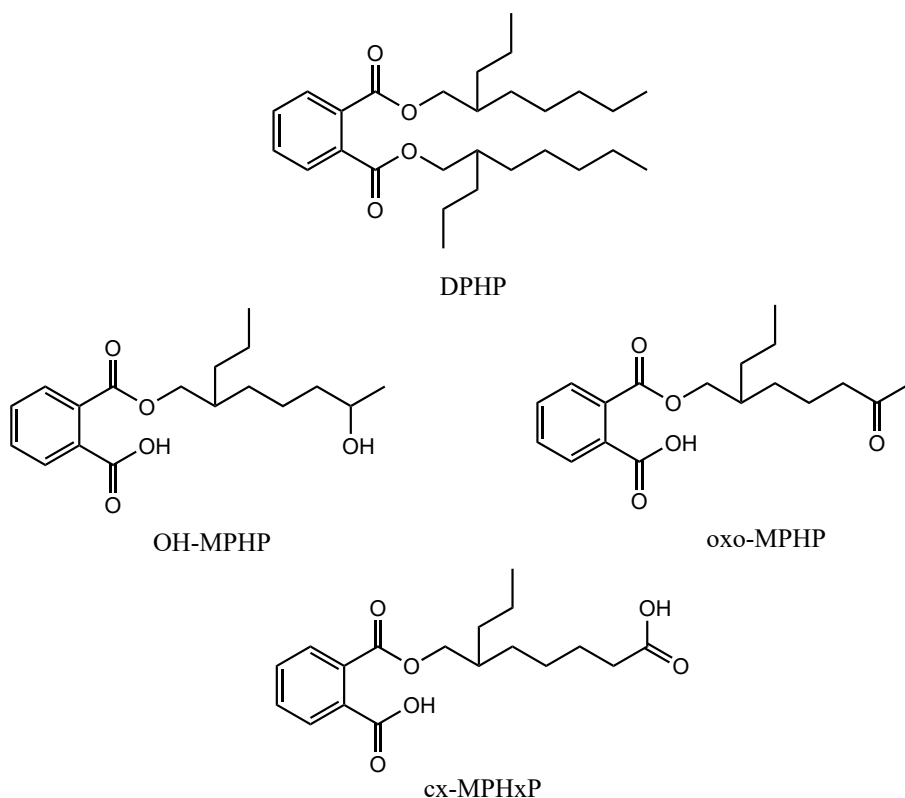


Abb. 1 Strukturformeln von Di(2-propylheptyl)phthalat (DPHP) und dessen Hauptmetaboliten (nach Wittassek und Angerer 2008)

Was die Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung in Deutschland angeht, so können seit 2011 in etwa 15–22 % der Urinproben DPHP-Metaboliten im niedrigen $\mu\text{g/l}$ -Bereich nachgewiesen werden (Schmidtkunz et al. 2019). Die Belastung bei Kindern und Jugendlichen liegt deutlich höher, so wurde oxo-MPHP im Rahmen der Deutschen Umweltstudie zur Gesundheit (2014–2017, GerES V) in 62 % aller Proben detektiert (Schwedler et al. 2020 a). Die OH-MPHP-Konzentration im Urin von Arbeitern nach beruflicher Exposition gegen DPHP wurde in Finnland untersucht (Porras et al. 2020).

Die OH-MPHP-Gehalte, die im Nachschichturin der Beschäftigten bestimmt wurden, sind zusammen mit den o. g. Daten aus den Studien zur Allgemeinbevölkerung in Deutschland in [Tabelle 1](#) dargestellt.

Tab. 1 Konzentrationen von cx-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP im Urin der Allgemeinbevölkerung und nach beruflicher Exposition gegen DPHP

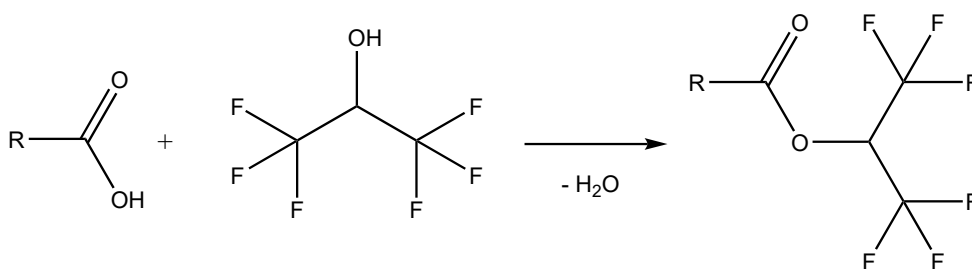
Kollektiv (Probenanzahl n)	cx-MPHxP Median (Bereich) [$\mu\text{g/l}$]	OH-MPHP Median (Bereich) [$\mu\text{g/l}$]	oxo-MPHP Median (Bereich) [$\mu\text{g/l}$]	Literatur
Allgemeinbevölkerung, Deutschland 2011 (40)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,51); 8 % der Proben > BG	< BG (< BG–0,93); 38 % der Proben > BG	Gries et al. 2012
Junge Erwachsene, Deutschland 2009 (60)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,64); 3,3 % der Proben > BG	< BG (< BG–0,96); 3,3 % der Proben > BG	Schütze et al. 2015
Junge Erwachsene, Deutschland 2012 (60)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,36); 3,3 % der Proben > BG	< BG (< BG–0,65); 21,7 % der Proben > BG	
Junge Erwachsene, Deutschland 2011 (60)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,45); 1,7 % der Proben > BG	< BG (< BG–0,69); 18,3 % der Proben > BG	Schmidtkunz et al. 2019
Junge Erwachsene, Deutschland 2014 (60)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,46); 3,3 % der Proben > BG	< BG (< BG–0,81); 15,0 % der Proben > BG	
Junge Erwachsene, Deutschland 2017 (60)	< BG (< BG–< BG)	< BG (< BG–0,32); 1,7 % der Proben > BG	< BG (< BG–1,45); 18,3 % der Proben > BG	
Kinder und Jugendliche, Deutschland 2014–2017 (516)	< BG (< BG–0,83); 0,8 % der Proben > BG	< BG (< BG–17,9); 50 % der Proben > BG	0,31 (< BG–27,6); 62 % der Proben > BG	Schwedler et al. 2020 a
Kabelherstellung (5)	n. a.	3,9 (1,8–7,8) ^{a)}	n. a.	Porras et al. 2020
Plastikproduktion (5)	n. a.	7,1 (< BG–21,0) ^{a)}	n. a.	

BG: Bestimmungsgrenze; n. a.: nicht analysiert

a) aufgrund der Quantifizierung der OH-MPHP-Gehalte mit LC-MS/MS konnte zwischen den Hydroxymetaboliten des DPHP und anderer C10-Phthalate nicht unterschieden werden

3 Grundlage des Verfahrens

Das Ziel der vorliegenden Methode ist die selektive Erfassung der Hauptmetaboliten von DPHP in Urin. Die nach enzymatischer Hydrolyse aus 1 ml Urin freigesetzten Metaboliten cx-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP werden mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Anschließend werden die Metaboliten unter Zugabe von HFIP und Diisopropylcarbodiimid selektiv an der Carboxylgruppe derivatisiert. Die gebildeten HFIP-Ester werden kapillargaschromatographisch getrennt und mittels HR-MS- oder MS/MS-Detektion analysiert. Es werden Nachweisgrenzen von 0,05 bis 0,1 $\mu\text{g/l}$ und Bestimmungsgrenzen von 0,15 bis 0,3 $\mu\text{g/l}$ erreicht. [Abbildung 2](#) zeigt den Reaktionsmechanismus der Veresterung der Carbonsäure mit HFIP.


Abb. 2 Schematische Darstellung der Veresterungsreaktion der Carbonsäure mit HFIP

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Gaschromatograph (z. B. Agilent GC 5890, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) mit Autosampler (z. B. CTC A200S, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) und HR-MS-Detektor (z. B. Waters AutoSpec Ultima Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn)
- Gaschromatograph (z. B. CP-3800, Varian Inc., Palo Alto, USA) mit MS/MS-Detektor (z. B. 300 MS-TQ, Varian Inc., Palo Alto, USA)
- GC-Säule: Rxi[®]-17, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm oder Rtx-65, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (z. B. Restek GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe)
- 200-µl-Vials mit Bördelkappen (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- Analysenwaage (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Inkubator (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- 3,5-ml-Einmalpipetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Kühlzentrifuge (z. B. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- 10-ml- und 500-ml-Messkolben (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 250-ml- und 400-ml-Bechergläser (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Multipette[®] (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Pasteurpipetten aus Polyethylen (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- pH-Meter (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- 12-ml-Probengläser mit Teflon-kaschierten Schraubverschlüssen (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Laborschüttler (z. B. Vibrax VXR, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- Stickstoff-Evaporator (z. B. Zymark, Biotage AB, Uppsala, Schweden)
- 10-µl-, 100-µl- und 1000-µl-Transferpipetten (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

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

- 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) (z. B. Nr. 845157, Merck KGaA, Darmstadt)
- Acetonitril SupraSolv[®] (z. B. Nr. 1.00017, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ammoniumacetat (z. B. Nr. 32301-M, Merck KGaA, Darmstadt)
- β -Glucuronidase *E. coli* K 12, in 50 % Glycidol, ≥ 80 U/mg Protein (z. B. Nr. 3707598001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim)
- Eisessig (z. B. Nr. 1.00063.1011, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q[®] plus VE System (> 18 M Ω), Merck KGaA, Darmstadt)
- Isooctan für die Rückstandsanalyse (z. B. Nr. 650439, Merck KGaA, Darmstadt)

- Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat (cx-MPHxP) > 95 % (z. B. Nr. 2071, IDM, Teltow)
- Mono(2-propyl-6-carboxyhexyl)phthalat, vierfach ringdeutert (cx-MPHxP-d₄) > 95 % (z. B. Nr. 2072, IDM, Teltow)
- Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat (OH-MPHP) > 95 % (z. B. Nr. 2067, IDM, Teltow)
- Mono(2-propyl-6-hydroxyheptyl)phthalat, vierfach ringdeutert (OH-MPHP-d₄) > 95 % (z. B. Nr. 2068, IDM, Teltow)
- Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat (oxo-MPHP) > 90 % (z. B. Nr. 2069, IDM, Teltow)
- Mono(2-propyl-6-oxoheptyl)phthalat, vierfach ringdeutert (oxo-MPHP-d₄) > 90 % (z. B. Nr. 2070, IDM, Teltow)
- Natriumhydrogencarbonat (z. B. Nr. 1.06329, Merck KGaA, Darmstadt)
- *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid > 98 % (z. B. Nr. 38370, Merck KGaA, Darmstadt)
- Salzsäure 37 % (z. B. Nr. 1.00317, Merck KGaA, Darmstadt)
- *tert*-Butylmethylether für die Rückstandsanalyse (z. B. Nr. 1.01849, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Lösungen

- Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 mol/l)
42 g Natriumhydrogencarbonat werden in ein 250-ml-Becherglas eingewogen, in etwa 100 ml hochreinem Wasser angelöst und in einen 500-ml-Messkolben quantitativ überführt. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Ammoniumacetat-Lösung (1 mol/l, pH 6,5)
38,5 g Ammoniumacetat werden in ein 400-ml-Becherglas eingewogen und in etwa 250 ml hochreinem Wasser gelöst. Anschließend erfolgt die pH-Einstellung mit Eisessig auf pH 6,5 unter Verwendung eines pH-Meters. Danach wird die Lösung quantitativ in einen 500-ml-Messkolben überführt, der mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt wird.

Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C sind die Lösungen mindestens drei Monate haltbar.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

- ISTD-Stammlösungen (1000 mg/l)
10 mg cx-MPHxP-d₄, OH-MPHP-d₄ bzw. oxo-MPHP-d₄ werden in je einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- ISTD-Arbeitslösung (10 mg/l)
Je 100 µl der ISTD-Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l)
1 ml der ISTD-Arbeitslösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C sind die Lösungen der internen Standards mindestens zwölf Monate haltbar.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg/l)
10 mg cx-MPHxP, OH-MPHP bzw. oxo-MPHP werden in je einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Anschließend werden die Kolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung I (10 mg/l)
Jeweils 100 µl der Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, der anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt wird.
- Dotierlösung II (1 mg/l)
1 ml der Dotierlösung I wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, der anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt wird.
- Dotierlösung III (0,1 mg/l)
100 µl der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, der anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt wird.
- Dotierlösung IV (0,01 mg/l)
100 µl der Dotierlösung II werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, der anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt wird.
- Dotierlösung V (0,001 mg/l)
1 ml der Dotierlösung IV wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, der anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt wird.

Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C sind die Stamm- und Dotierlösungen der Analyten mindestens zwölf Monate haltbar.

Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,05 µg/l bis 200 µg/l werden in Poolurin von nicht gegenüber DPHP exponierten Personen nach dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird undotierter Poolurin mitgeführt. Für die Anwendung der Methode im umweltmedizinischen Bereich ist in der Regel eine Kalibrierung bis 50 µg/l ausreichend.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen Poolurin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
0	–	0	1000	0
1	V	50	950	0,05
2	IV	10	990	0,1
3	IV	20	980	0,2
4	IV	50	950	0,5
5	III	10	990	1
6	III	20	980	2
7	III	50	950	5
8	II	10	990	10
9	II	20	980	20

Tab. 2 (Fortsetzung)

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen Poolurin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
10	II	50	950	50
11	I	10	990	100
12	I	20	980	200

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Kunststoffgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Vor der Analyse werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt.

5.2 Probenaufbereitung

Jeweils 1 ml der Urinproben werden in 12-ml-Probengläschen pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl der ISTD-Dotierlösung, 2 ml Ammoniumacetat-Lösung und 10 µl β -Glucuronidase werden die Proben im Inkubator über Nacht bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, werden sie durch Zugabe von 200 µl konzentrierter Salzsäure angesäuert ($\text{pH} < 2$). Für die Extraktion werden 4 ml *tert*-Butylmethylether zugegeben und die Proben für 10 min auf dem Schütteltisch geschüttelt. Zur besseren Phasentrennung werden die Proben in einer Kühlzentrifuge (10°C) bei $2200 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Die *tert*-Butylmethylether-Phase wird mit einer Pasteurpipette in ein neues Probengläschen überführt und im Stickstoffstrom bei 35°C zur Trockne abgeblasen.

Der Rückstand wird in 150 µl Acetonitril aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl HFIP und 10 µl Diisopropylcarbodiimid werden die Probengläschen verschlossen und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur derivatisiert. Anschließend werden 1 ml Natriumhydrogencarbonatlösung und 500 µl Isooctan zugegeben und die Proben für 10 min intensiv geschüttelt. Zur besseren Phasentrennung werden die Proben in einer Kühlzentrifuge (10°C) bei $2200 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Die Isooctanphase wird in ein 200-µl-Vial überführt und zur Analyse mittels GC-HR-MS bzw. GC-MS/MS eingesetzt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (GC-HR-MS) bzw. einem Tandem-Massenspektrometer (GC-MS/MS).

6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Rxi [®] -17 (Diphenyl-/dimethylpolysiloxan (50%/50%)) alternativ: Rtx-65 (Diphenyl-/dimethylpolysiloxan (65%/35%))
	Länge:	30 m
	Innendurchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm

Temperatur:	Säule:	Ausgangstemperatur 90 °C, 1 min halten, Anstieg mit 12 °C/min auf 250 °C, dann Anstieg mit 30 °C/min auf 280 °C, 5 min halten
	Injektor:	280 °C
Trägergas:	Helium 5.0	
Druck:	120 kPa	
Injektion:	1 µl splitless, 1 min	
Insert:	Double Gooseneck	4 mm Innendurchmesser

6.2 Massenspektrometrie

Hochauflösende Massenspektrometrie

Ionisationsart:	Negative Chemische Ionisierung (NCI)
NCI-Gas:	Ammoniak
CI-Gasfluss:	2×10^{-5} mbar
Transferline:	250 °C
Ionenquellen-Temperatur:	230 °C
Emission current:	0,5 mA
Resolution:	5000
Multipliiert:	350 V
Electron energy:	100 eV
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 3

Tab. 3 Parameterspezifische Einstellungen und Retentionszeiten der Analyten und internen Standards für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-HR-MS

Analyt / ISTD	Retentionszeit ^{a)} [min]	Massenspur [m/z]
cx-MPHxP	11,51	485,1399
cx-MPHxP-d ₄	11,50	489,1650
OH-MPHP	14,01	321,1762
OH-MPHP-d ₄	14,00	325,1953
oxo-MPHP	14,09	319,1545
oxo-MPHP-d ₄	14,08	323,1797

^{a)} Rtx-65-Trennsäule

In [Abbildung 3](#) sind beispielhaft die HR-Massenspektren der HFIP-Derivate von cx-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP dargestellt. Die zur Quantifizierung verwendeten Ionen sind auf die Abspaltung jeweils einer $\text{CH}(\text{CF}_3)_2$ -Gruppe mit m/z 150,9982 zurückzuführen.

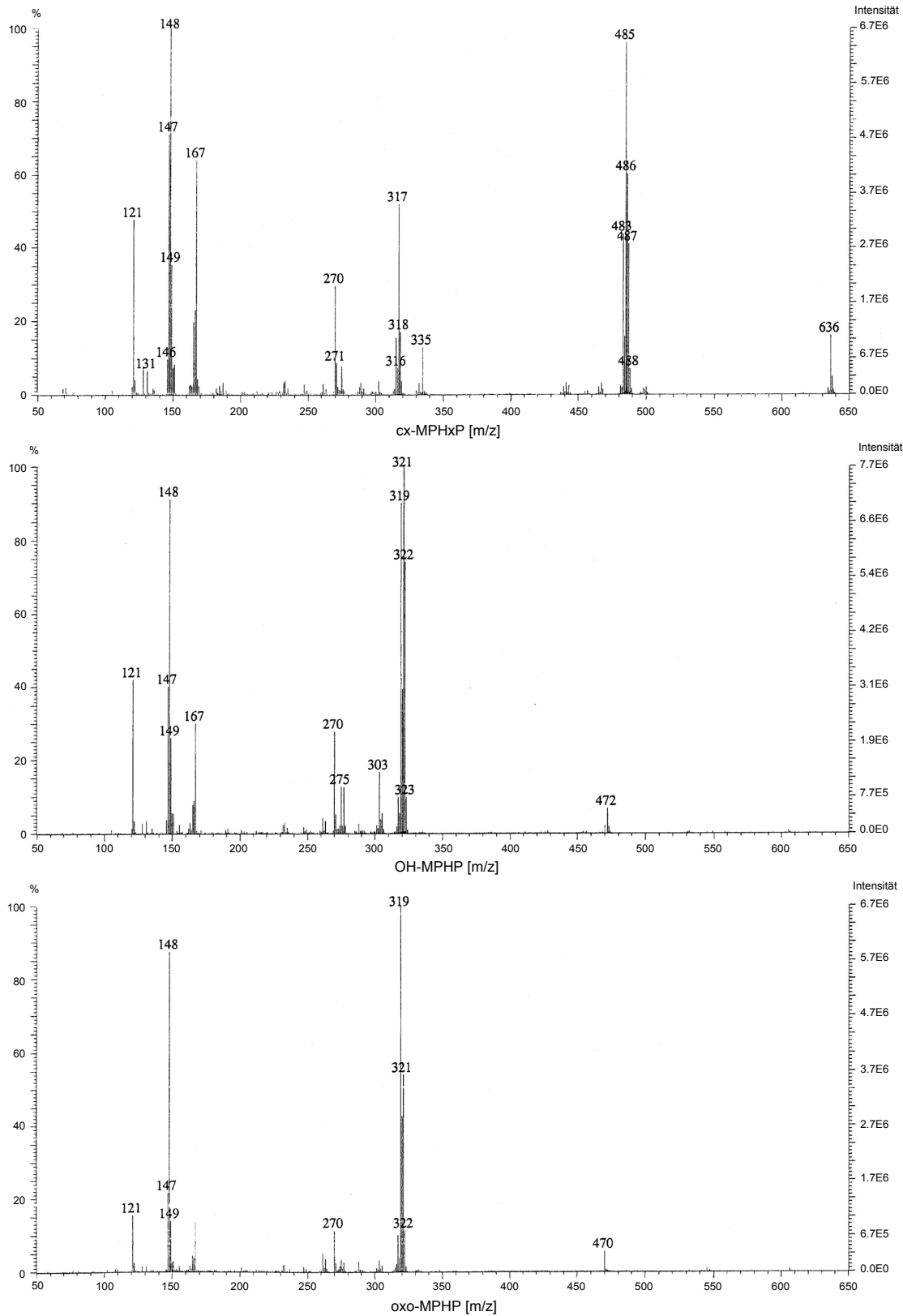


Abb. 3 HR-Massenspektren der HFIP-Derivate von cx-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP

Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie

Ionisationsart:	Negative Chemische Ionisierung (NCI)
NCI-Gas:	Methan
CI-Gasfluss:	4,7 mbar
Transferline:	280 °C
Ionenquellen-Temperatur:	250 °C
CID-Gas:	Argon
CID-Gasfluss:	$2,4 \times 10^{-6}$ bar
Multipliiert:	1200 V
Electron energy:	100 eV
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 4

Tab. 4 Parameterspezifische Einstellungen und Retentionszeiten der Analyten und internen Standards für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS

Analyt / ISTD	Retentionszeit ^{a)} [min]	Ausgangs-Ion Q1 [m/z]	Produkt-Ion Q3 [m/z]	Kollisionsenergie [V]
cx-MPHxP	12,15	485	317	15
cx-MPHxP-d ₄	12,14	489	321	15
OH-MPHP	14,09	321	121	20
OH-MPHP-d ₄	14,07	325	125	20
oxo-MPHP	14,22	319	121	20
oxo-MPHP-d ₄	14,20	323	125	20

^{a)} Rxi[®]-17-Trennsäule

7 Analytische Bestimmung

Von den nach [Abschnitt 5](#) aufgearbeiteten Proben wird jeweils 1 µl in das GC-HR-MS- bzw. GC-MS/MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionen bzw. Ionenübergänge und der Retentionszeiten (siehe [Tabelle 3](#) und [4](#)). Die in [Tabelle 3](#) und [4](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. [Abbildungen 4](#) und [5](#) zeigen beispielhaft die Chromatogramme einer nativen Urinprobe sowie einer mit 1 µg/l der jeweiligen DPHP-Metaboliten dotierten Urinprobe (GC-MS/MS).

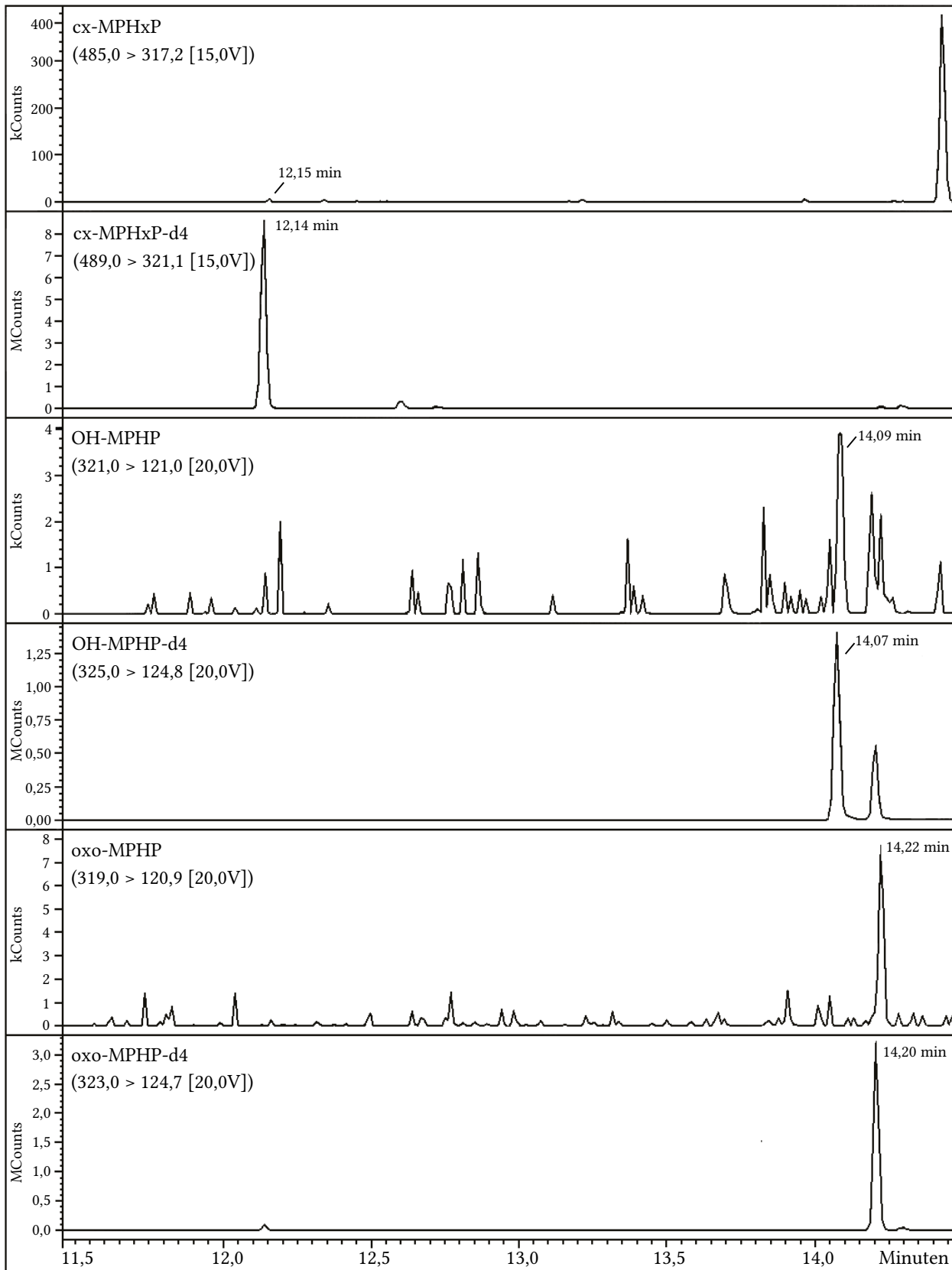


Abb. 4 Chromatogramm einer nativen Urinprobe (GC-MS/MS)

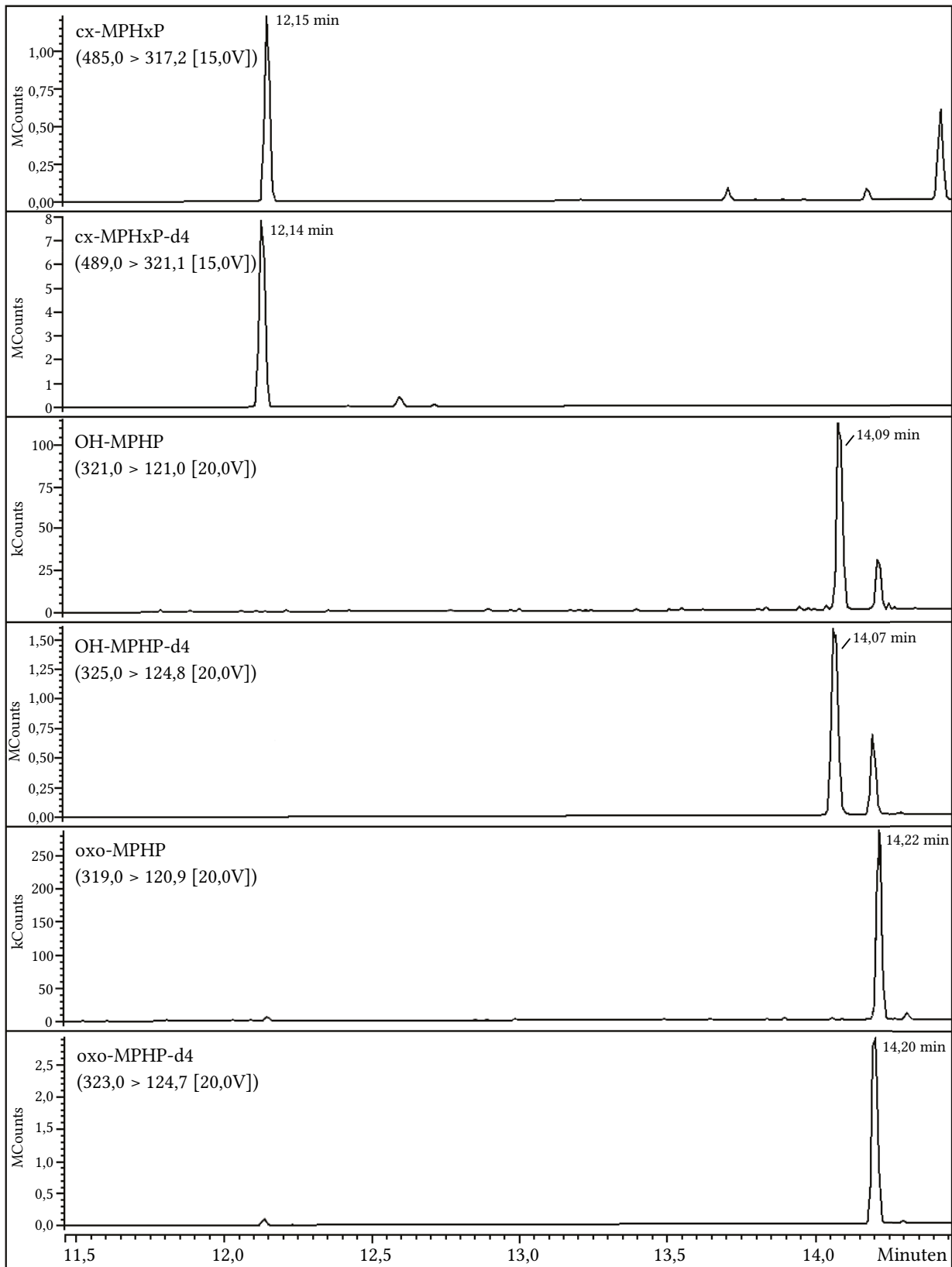


Abb. 5 Chromatogramm einer mit 1 µg/l der jeweiligen DPHP-Metaboliten dotierten Urinprobe (GC-MS/MS)

8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Methode werden die unter [Abschnitt 4.5](#) beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vergleiche [Abschnitt 5](#)) und analysiert (vergleiche [Abschnitt 6](#) und [Abschnitt 7](#)). Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragung des Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen DPHP-Metaboliten und der Peakfläche des zugehörigen ISTD gegen die dotierte Konzentration des jeweiligen Kalibrierstandards. Für die Detektion mittels HR-MS lag der lineare Messbereich zwischen der Nachweisgrenze und 20 µg/l für cx-MPHxP bzw. 50 µg/l für OH-MPHP und oxo-MPHP. Für die Detektion mittels MS/MS wurde ein linearer Messbereich von der Nachweisgrenze bis 200 µg/l für alle DPHP-Metaboliten ermittelt.

Die Berechnung der Kalibrierfunktion erfolgt durch lineare Regression. Leerwerte aus dem eingesetzten Probenmaterial werden von allen Messpunkten subtrahiert. [Abbildung 6](#) zeigt beispielhaft Kalibriergeraden für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin (GC-MS/MS).

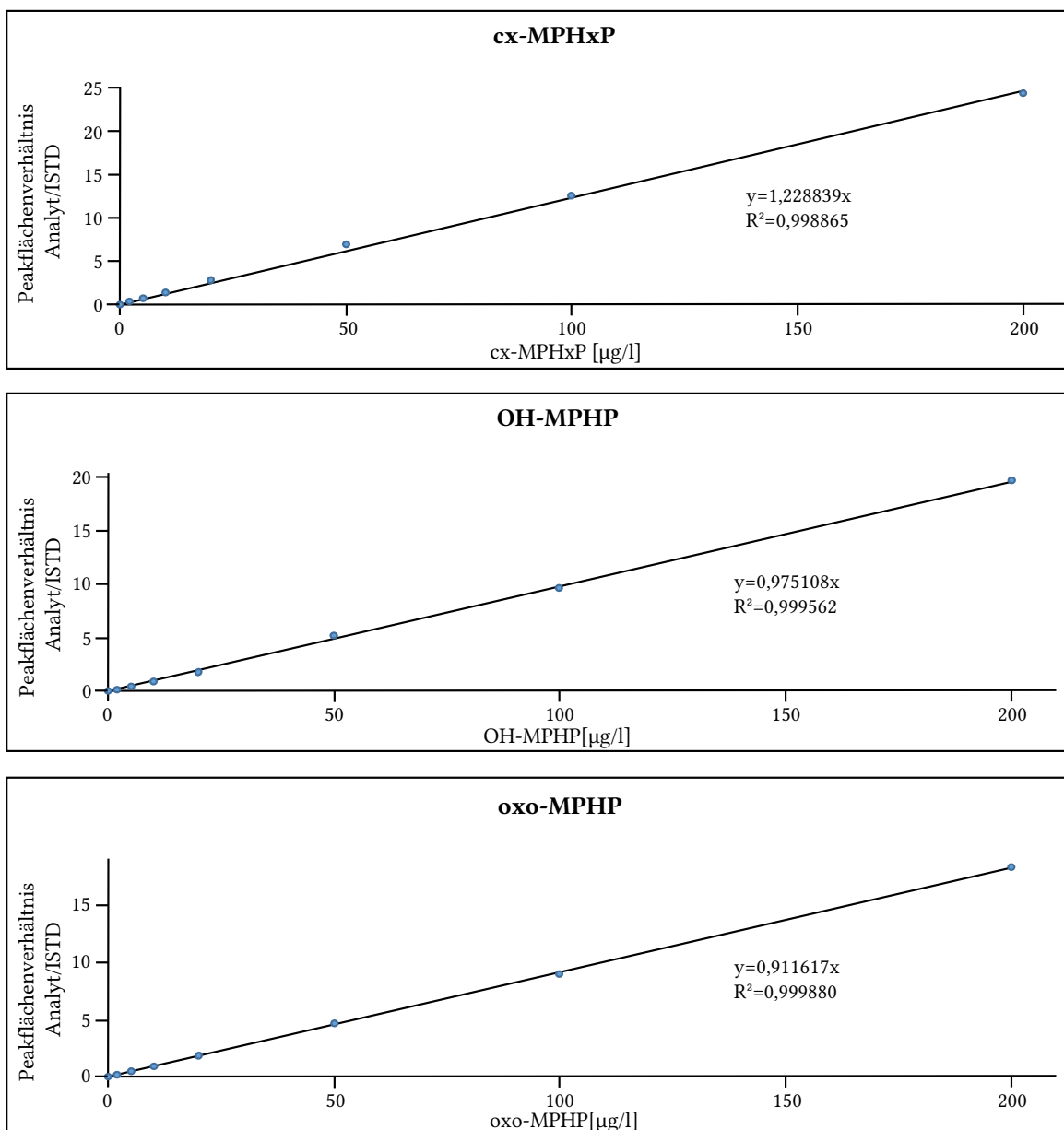


Abb. 6 Kalibriergeraden für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehalts in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des ISTD gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion ([Abschnitt 8](#)) kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in $\mu\text{g/l}$ Urin berechnet werden. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

Bei jeder Analysenserie wird ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser) mitgeführt. Gegebenenfalls vorliegende Leerwerte werden von den Ergebnissen abgezogen.

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 Kapitelverfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Präzisionskontrolle werden mit jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben untersucht, die eine bekannte Konzentration der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden, indem Poolurin von nicht gegen DPHP exponierten Personen mit Standardlösungen der Analyten dotiert wird. Die Analytkonzentrationen in den Qualitätskontrollmaterialien sollten dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (z. B. $1 \mu\text{g/l}$ und $10 \mu\text{g/l}$). Aliquote dieser Proben werden bei -20°C gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt (Bader et al. 2010).

Gleichzeitig wird mit jeder Analysenserie hochreines Wasser als Reagenzienleerwert analysiert, um eventuelle Störungen aus den Reagenzien zu erkennen.

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Methode wurde ursprünglich als GC-HR-MS-Methode entwickelt und die Zuverlässigkeit des Verfahrens durch umfassende Validierung bestätigt. Zusätzlich wurden von den Entwicklern der Methode Validierungsdaten für die MS/MS-Detektion erhoben. Die GC-MS/MS-Methode wurde in einem zweiten, unabhängigen Labor durch Nachstellung und Validierung geprüft.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde Urin einer nicht beruflich gegen DPHP exponierten Person eingesetzt. 1-ml-Urinproben wurden dabei jeweils mit $1 \mu\text{g/l}$, $10 \mu\text{g/l}$ und $100 \mu\text{g/l}$ der Analyten dotiert. Diese Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet ([Abschnitt 5.2](#)) und analysiert ([Abschnitt 6](#) und [Abschnitt 7](#)). Die mit HR-MS- bzw. MS/MS-Detektion ermittelten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 5](#) und [6](#) aufgeführt.

Tab. 5 Präzision in der Serie für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-HR-MS (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MPHxP	1	1,0	2,3
	10	0,8	1,8
	100	2,5	5,5
OH-MPHP	1	3,8	8,5
	10	2,4	5,3
	100	2,9	6,4
oxo-MPHP	1	1,7	3,9
	10	1,2	2,7
	100	2,0	4,4

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MPHxP	1	1,8	4,6
	10	1,7	4,4
	100	1,1	2,8
OH-MPHP	1	6,6	17,0
	10	1,4	3,6
	100	1,0	2,6
oxo-MPHP	1	4,7	12,1
	10	1,9	4,9
	100	1,1	2,8

Präzision von Tag zu Tag

Für die GC-HR-MS-Methode wurde Urin einer beruflich nicht gegen DPHP exponierten Person mit Analytkonzentrationen von 1 µg/l, 10 µg/l sowie 100 µg/l dotiert. An fünf verschiedenen Tagen wurden je zwei Urinproben aufgearbeitet und analysiert. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 7](#) aufgeführt.

Für das GC-MS/MS-Verfahren wurden die Daten zur Präzision von Tag zu Tag von den Prüfern der Methode erhoben. Dazu wurde Urin einer beruflich nicht gegen DPHP exponierten Person mit 1 µg/l, 10 µg/l bzw. 100 µg/l der jeweiligen Analyten dotiert. Diese Urinproben wurden an acht verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 8](#) angegeben.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-HR-MS (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MPHxP	1	2,2	4,9
	10	4,5	10,0
	100	5,2	11,7
OH-MPHP	1	7,4	16,4
	10	4,8	10,7
	100	1,8	4,1
oxo-MPHP	1	2,6	5,7
	10	1,3	2,8
	100	1,4	3,0

Tab. 8 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS (n = 8)^{a)}

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MPHxP	1	4,4	10,4
	10	4,9	11,6
	100	5,6	13,2
OH-MPHP	1	17,4	41,2
	10	16,1	38,1
	100	10,7	25,3
oxo-MPHP	1	11,0	26,0
	10	10,1	23,9
	100	8,3	19,6

^{a)} die Daten der Präzision von Tag zu Tag mittels GC-MS/MS wurden von den Prüfern der Methode erhoben

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methoden wurde aus den Daten zur Präzision in der Serie ermittelt. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind für die HR-MS-Detektion in [Tabelle 9](#) und für die MS/MS-Detektion in [Tabelle 10](#) aufgeführt.

Tab. 9 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-HR-MS (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
cx-MPHxP	1	102	100–104
	10	102	101–103
	100	105	98–107
OH-MPHP	1	88	82–92
	10	90	88–95
	100	108	95–108
oxo-MPHP	1	100	98–104
	10	100	98–102
	100	106	101–109

Tab. 10 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
cx-MPHxP	1	103	101–106
	10	104	101–105
	100	106	105–108
OH-MPHP	1	115	104–123
	10	106	104–108
	100	103	102–105
oxo-MPHP	1	96	89–103
	10	105	101–106
	100	102	100–104

11.3 Matrixeffekt

Zur Bestimmung der Robustheit gegenüber eventuellen Matrixeffekten wurden zehn verschiedene Urinproben von nicht gegen DPHP exponierten Personen verwendet. Die Urinproben wiesen Kreatiningehalte von 0,52 g/l bis 3,74 g/l auf und wurden mit jeweils 10 µg der DPHP-Metaboliten/l dotiert, wie beschrieben aufgearbeitet ([Abschnitt 5.2](#)) und mittels GC-HR-MS analysiert ([Abschnitt 6](#) und [Abschnitt 7](#)). Es wurden relative Standardabweichungen von 3,8 % bis

4,0 % und mittlere relative Wiederfindungen von 100 % bis 103 % ermittelt. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Urine hatte somit keinen relevanten Einfluss auf die Analysenergebnisse.

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für das GC-HR-MS-Verfahren erfolgte in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 (DIN 2008) unter Verwendung der sechs untersten Kalibrierpunkte (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 und 2,0 µg/l, n = 3). Die Daten sind in [Tabelle 11](#) aufgeführt. Bei der MS/MS-Detektion lagen die von den Entwicklern der Methode bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in einem vergleichbaren Bereich ([Tabelle 12](#)). Die in der Praxis realisierbaren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Der Anwender hat sich selbst von der Nachweisstärke des jeweils verwendeten GC-HR-MS- bzw. GC-MS/MS-Gerätes zu überzeugen, falls das Erreichen niedriger Bestimmungsgrenzen für die vorgesehenen Analysen relevant ist. Weitere Informationen hierzu finden sich in [Abschnitt 11.5](#).

Tab. 11 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-HR-MS (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
cx-MPHxP	0,05	0,15
OH-MPHP	0,1	0,3
oxo-MPHP	0,08	0,25

Tab. 12 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung der DPHP-Metaboliten in Urin mittels GC-MS/MS (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
cx-MPHxP	0,05	0,15
OH-MPHP	0,1	0,3
oxo-MPHP	0,1	0,3

11.5 Störeinflüsse

Laut Hersteller liegt der optimale Aktivitätsbereich der verwendeten β -Glucuronidase zwischen pH 6,0 und 6,5 bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C. Unter diesen Bedingungen läuft die Spaltung sehr schnell ab und ist spätestens innerhalb von 90 min abgeschlossen. In der Methode wird die Hydrolyse über Nacht beschrieben, weil dies besser in den Routinebetrieb des Labors integriert werden konnte. Dieser Schritt muss nicht zwingend analog erfolgen.

Die hier beschriebene Analysenmethode beinhaltet einen Derivatisierungsschritt mit HFIP. Die Veresterung, mit Einführung der CH(CF₃)₂-Gruppe, verläuft nur im wasserfreien Medium quantitativ. Daher ist bei der Abnahme der *tert*-Butylmethylether-Phase auf Wasserfreiheit zu achten.

Bei Anwendung unpolarer GC-Säulen, wie beispielsweise einer Rtx-5-Säule, wurde ein Peaktailing beim OH-MPHP beobachtet. OH-MPHP und oxo-MPHP können auf dieser Phase nur angetrennt werden. Bei den gebildeten Massenfragmenten sind somit Überlagerungen möglich, was die selektive Quantifizierung einschränkt. Diese Beobachtung führte zum Einsatz der mittelpolaren Trennphasen des Typs Rxi[®]-17 und Rtx-65, die eine optimale Peakauflösung und Trennung der DPHP-Metaboliten ohne zusätzliche Derivatisierung der OH-Gruppe des OH-MPHP ermöglichen. Die Trennleistung beider Phasen ist ähnlich, jedoch ist der Einsatz der Rxi[®]-17-Phase aufgrund ihrer höheren Temperaturstabilität auf Dauer vorteilhafter.

Es wurden Hintergrundsignale bei den Reagenzienleerwerten beobachtet, die auf die internen Standards zurückzuführen sind. Sie lagen in der Größenordnung von 0,1 µg/l bei cx-MPHxP, 0,5 µg/l bei OH-MPHP und 0,2 µg/l bei

oxo-MPHP. Diese Hintergrundgehalte müssen bei der Erstellung der Kalibriergeraden, aber auch bei der Berechnung der Metabolitenkonzentrationen in den zu analysierenden Proben durch Subtraktion berücksichtigt werden. Bei der Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wirken sich diese Hintergrundsignale nachteilig aus, da sie im unteren Messbereich zu einer Unschärfe der Signalzunahme führen, wodurch das Erreichen niedrigerer Nachweis- und Bestimmungsgrenzen eingeschränkt ist.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden keine signifikanten Störungen aus der Matrix beobachtet, mit Ausnahme von möglichen Störungen durch eine im Harn vorhandene Hintergrundbelastung an Metaboliten von Diisodecylphthalat (DiDP) oder Diisononylphthalat (DiNP). Sowohl technisches DiDP als auch DiNP sind Gemische, welche Substanzen enthalten, die zu DPHP isomer sind (im Falle von DiDP ganz überwiegend). Im Metabolismus dieser Weichmacher können daher auch Isomere der DPHP-Metaboliten *cx*-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP entstehen, welche in der Massenspektrometrie zu isobaren Ionen und somit zu Interferenzen führen. Die Hintergrundbelastung mit DiDP-/DiNP-Metaboliten liegt wesentlich höher als jene für die spezifischen DPHP-Metabolite, so dass der Qualität der chromatographischen Trennung eine zentrale Bedeutung zukommt, wenn eine Exposition gegenüber DPHP selektiv erfasst werden soll (Gries et al. 2012; Koch et al. 2017; Schwedler et al. 2020 b).

Die vorliegende GC-HR-MS- bzw. GC-MS/MS-Methode erlaubt eine sichere Trennung des *cx*-MPHxP und oxo-MPHP von den entsprechenden isomeren Metaboliten des DiDP/DiNP, während für OH-MPHP die Selektivität in Anwesenheit eines hohen DiDP-/DiNP-Hintergrunds unzureichend ist, selbst bei Anwendung der GC-HR-MS mit einer 60-m-Säule (Gries et al. 2012). Sowohl die sehr robuste und selektive Erfassung von oxo-MPHP als auch die Anfälligkeit des Biomarkers OH-MPHP gegenüber einer in einzelnen Urinproben hohen Hintergrundbelastung mit DiDP-/DiNP-Metaboliten wurde durch die Anwendung der Methode in größeren Umweltstudien (z. B. Schmidtkunz et al. 2019) bestätigt. Die Bestimmungsgrenze von 0,3 µg/l für OH-MPHP kann bei hoher DiDP-/DiNP-Metabolitkonzentration nicht gewährleistet werden. Bei *cx*-MPHxP handelt es sich dagegen um einen untergeordneten Metaboliten, der nur in geringer Menge entsteht und daher nur bei hohen Expositionen überhaupt messbar ist. Im umweltmedizinischen Spurenbereich ist deswegen oxo-MPHP der beste Biomarker für eine Exposition gegenüber DPHP. Er vereint eine sehr selektive Detektierbarkeit mit einer niedrigen Bestimmungsgrenze, und zudem ist er mit 13,5 % einer oral aufgenommenen DPHP-Dosis der hauptsächlichste oxidierte Metabolit von DPHP im Urin (Leng et al. 2014).

Im Rahmen der externen Methodenprüfung wurden bei einer dotierten Konzentration von 1 µg/l schlechtere Ergebnisse für die Präzision und Wiederfindung erhalten als von den Entwicklern der Methode angegeben. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 4,4 % und 22,6 % und die relativen Wiederfindungsraten zwischen 157 % und 239 % (n = 8). Die entsprechenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen etwa um den Faktor 10 über den vom Entwicklerlabor ermittelten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der Methodenprüfung ein zusätzlicher Trocknungsschritt des Isooctanextrakts mit 0,2 g Natriumsulfat durchgeführt wurde. Darüber hinaus spielt es möglicherweise eine Rolle, dass anstelle eines „Double-Gooseneck“-Inserts ein „Single-Gooseneck“-Insert verwendet wurde. Deshalb wird zur Verwendung eines „Double-Gooseneck“-Inserts geraten. Des Weiteren kann auf den Trocknungsschritt verzichtet werden, da nach dem Extraktionsschritt auch mit einem Aliquot der Isooctanphase weitergearbeitet werden kann.

Generell muss bei den im Umweltbereich zu erwartenden Analytgehalten (< 1 µg/l, sehr selten bis zu ca. 30 µg/l) ein besonderes Augenmerk auf die Herstellung der Extrakte und gegebenenfalls auf ein Feintuning des jeweiligen Analysengerätes gelegt werden.

12 Diskussion der Methode

Das Analysenverfahren ermöglicht die selektive und sensitive Bestimmung der Hauptmetaboliten des DPHP unter Einsatz der GC-HR-MS- bzw. GC-MS/MS-Technik mit negativer chemischer Ionisation und ist für den Einsatz in der Routine geeignet.

Durch die Extraktion der enzymatisch freigesetzten DPHP-Metaboliten mit *tert*-Butylmethylether und nachgeschalteter Derivatisierung mit HFIP wird eine sehr selektive Erfassung der DPHP-Metaboliten erzielt (zu möglichen Störungen bei OH-MPHP durch isomere Metaboliten von DiDP/DiNP siehe [Abschnitt 11.5](#)). Die weiche Ionisierung im negativen CI-Modus ermöglicht Bestimmungsgrenzen bis in den umweltmedizinisch relevanten Messbereich, so dass eine sichere Erfassung von Expositionen gegen DPHP sowohl im arbeits- als auch im umweltmedizinischen Bereich möglich ist. Die Methode wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes zur Förderung des Human-Biomonitoring zwischen dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) und dem Verband der chemischen Industrie (VCI) entwickelt und ist bereits international publiziert (Gries et al. 2012).

Die Metaboliten der bei der DPHP-Herstellung gebildeten Isomeren 2-Propylheptyl-2-propyl-4-methylhexylphthalat und 2-Propylheptyl-2-propyl-5-methylhexylphthalat werden miterfasst, sofern die oxidierten Metaboliten *cx*-MPHxP, OH-MPHP und oxo-MPHP aus den Isomeren entstehen, also der 2-Propyl-4/5-methylhexyl-Rest bei der Esterspaltung abgespalten wird. Die Metaboliten des bei der DPHP-Herstellung zu 1% entstehenden Bis(2-propyl-4/5-methylhexyl)phthalats werden mit dieser Methode nicht erfasst.

Die Methodenentwickler haben parallel zu den hier beschriebenen gaschromatographischen Methoden eine LC-MS/MS-Analysenmethode als weitere Analysenoption, die eine Quantifizierung der DPHP-Metaboliten ermöglicht, entwickelt (Gries et al. 2012). Die LC-MS/MS-Technik wies einen höheren dynamischen Messbereich auf, jedoch wurden etwas schlechtere Bestimmungsgrenzen (0,3–0,5 µg/l) im Vergleich zur GC-MS/MS (0,1–0,3 µg/l) erzielt. Zudem ist mit der LC-MS/MS-Methode keine Differenzierung zwischen den Metaboliten des DPHP und des DiDP möglich. Da die in den Urinproben vorhanden DiDP-Metaboliten gleichzeitig mit den DPHP-Metaboliten eluieren, kann nur ein Summenparameter bestimmt werden. Mit der GC-HR-MS bzw. der GC-MS/MS-Methode ist hingegen eine selektive Erfassung der DPHP-Metaboliten möglich.

Verwendete Messgeräte Agilent GC 5890-Gaschromatograph (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) mit CTC A200S-Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) und HR-MS-System (Waters Auto-Spec Ultima Massendetektor, Waters GmbH, Eschborn) bzw. GC-MS/MS-System (Methodenentwickler: CP-3800/300 MS-TQ, Varian Inc., Palo Alto, USA; Methodenprüfer: 450 GC/320 MS-TQ, Varian Inc., Palo Alto, USA)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (https://www.dfg.de/dfg_profil/gremien/senat/arbeitsstoffe/interessenkonflikte/index.html) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Bd 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2011) DPHP in Spielzeug nachgewiesen: BfR bewertet Risiko des Weichmachers - Stellungnahme Nr. 004/2012 des BfR vom 28. Juni 2011. BfR, Berlin. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/dphp-in-spielzeug-nachgewiesen-bfr-bewertet-risiko-des-weichmachers.pdf>, abgerufen am 07 Jul 2021
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- DIN (Deutsches Institut für Normung) (Hrsg) (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth, Berlin. DOI: <https://doi.org/10.31030/1465413>

- ECHA (European Chemicals Agency) (2021) Substance infocard – bis(2-propylheptyl) phthalate. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.053.137>, abgerufen am 07 Jul 2021
- Gries W, Ellrich D, Küpper K, Ladermann B, Leng G (2012) Analytical method for the sensitive determination of major di(2-propylheptyl)-phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 908: 128–136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.019>
- Hartwig A (Hrsg) (2015) Di(2-propylheptyl)phthalat. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 58. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb5330654d0058>
- HBM-Kommission (Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamts) (2015) Stoffmonografie für Di-2-propylheptylphthalat (DPHP) – Human-Biomonitoring (HBM)-Werte für die Summe der Metaboliten Oxo-Monopropylheptylphthalat (oxo-MPHP) und Hydroxy-Monopropylheptylphthalat (OH-MPHP) im Urin von Erwachsenen und Kindern. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 58(7): 774–784. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00103-015-2172-z>
- Koch HM, Rütger M, Schütze A, Conrad A, Pälme C, Apel P, Brüning T, Kolossa-Gehring M (2017) Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. *Int J Hyg Environ Health* 220(2 Pt A): 130–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.003>
- Leng G, Koch HM, Gries W, Schütze A, Langsch A, Brüning T, Otter R (2014) Urinary metabolite excretion after oral dosage of bis(2-propylheptyl) phthalate (DPHP) to five male volunteers – characterization of suitable biomarkers for human biomonitoring. *Toxicol Lett* 231(2): 282–288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.035>
- Porras SP, Hartonen M, Koponen J, Ylinen K, Louhelainen K, Tornaues J, Kiviranta H, Santonen T (2020) Occupational exposure of plastics workers to diisononyl phthalate (DiNP) and di(2-propylheptyl) phthalate (DPHP) in Finland. *Int J Environ Res Public Health* 17(6): 2035. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17062035>
- Schmidtkunz C, Gries W, Weber T, Leng G, Kolossa-Gehring M (2019) Internal exposure of young German adults to di(2-propylheptyl) phthalate (DPHP): trends in 24-h urine samples from the German Environmental Specimen Bank 1999–2017. *Int J Hyg Environ Health* 222(3): 419–424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.12.008>
- Schütze A, Gries W, Kolossa-Gehring M, Apel P, Schröter-Kermani C, Fiddicke U, Leng G, Brüning T, Koch HM (2015) Bis(2-propylheptyl)phthalate (DPHP) metabolites emerging in 24h urine samples from the German Environmental Specimen Bank (1999–2012). *Int J Hyg Environ Health* 218(6): 559–563. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.05.007>
- Schwedler G, Conrad A, Rucic E, Koch HM, Leng G, Schulz C, Schmied-Tobies MIH, Kolossa-Gehring M (2020 a) Hexamoll® DINCH and DPHP metabolites in urine of children and adolescents in Germany. Human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V, 2014–2017. *Int J Hyg Environ Health* 229: 113397. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.09.004>
- Schwedler G, Rucic E, Lange R, Conrad A, Koch HM, Pälme C, Brüning T, Schulz C, Schmied-Tobies MIH, Daniels A, Kolossa-Gehring M (2020 b) Phthalate metabolites in urine of children and adolescents in Germany. Human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V, 2014–2017. *Int J Hyg Environ Health* 225: 113444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113444>
- Wittassek M, Angerer J (2008) Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl* 31(2): 131–138. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00837.x>