

Lysmeral – Bestimmung von Hydroxylysmerylsäure, 4-*tert*-Butylbenzoesäure, *tert*-Butylhippursäure, Lysmerylsäure und Lysmerol im Urin mittels UPLC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Lysmeral; Lysmeral-Metaboliten; Duftstoff; Biomonitoring; Urin; UPLC-MS/MS; ESI-

G. Scherer¹

N. Rögner¹

G. Gilch¹

D. Krnac¹

M. Stöckelhuber¹

N. Pluym¹

M. Scherer¹

S. Gerling²

K. Blümlein²

T. Göen^{3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg

² Methodenprüfung, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Nikolai-Fuchs-Straße 1, 30625 Hannover

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:

Scherer G, Rögner N, Gilch G, Krnac D, Stöckelhuber M, Pluym N, Scherer M, Gerling S, Blümlein K, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Lysmeral – Bestimmung von Hydroxylysmerylsäure, 4-*tert*-Butylbenzoesäure, *tert*-Butylhippursäure, Lysmerylsäure und Lysmerol im Urin mittels UPLC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2021 Dez;6(4):Doc099. DOI: https://doi.org/10.34865/bi8054d6_4or

Manuskript abgeschlossen:
12 Nov 2018

Publikationsdatum:
30 Dez 2021

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



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.

With the procedure described below, the following lysmeral metabolites are determined in urine: hydroxylysmeryllic acid, 4-*tert*-butylbenzoic acid (TBBA), *tert*-butylhippuric acid (TBHA), lysmeryllic acid, and lysmerol. Following the addition of the deuterated internal standards (TBBA- d_{13} , lysmeryllic acid- d_8 , and lysmerol- d_8) to 1 ml of urine, an enzymatic cleavage is carried out using β -glucuronidase. The samples are then subjected to liquid-liquid extraction with dichloromethane. The extracts are evaporated to dryness and derivatised with 3-nitrophthalic anhydride. The analysis is performed by UPLC-MS/MS following negative electrospray ionisation (ESI⁻).

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS)

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Lysmeral	80-54-6	Hydroxylysmerylsäure	1897559-05-5
		4- <i>tert</i> -Butylbenzoesäure (TBBA)	98-73-7
		<i>tert</i> -Butylhippursäure (TBHA)	87015-91-6
		Lysmerylsäure	66735-04-4
		Lysmerol	56107-04-1

Zuverlässigkeitskriterien

Hydroxylysmerylsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,9\%, 4,7\%$ bzw. $4,9\%$
	Streubereich	$u = 19,2\%, 13,1\%$ bzw. $13,6\%$
	bei dotierten Konzentrationen von $0,4\ \mu\text{g}$, $0,8\ \mu\text{g}$ bzw. $4,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 13,7\%, 10,5\%$ bzw. $9,7\%$
	Streubereich	$u = 35,2\%, 27,0\%$ bzw. $24,9\%$
	bei dotierten Konzentrationen von $0,4\ \mu\text{g}$, $0,8\ \mu\text{g}$ bzw. $4,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 88,9\%, 88,4\%$ bzw. $89,9\%$
bei dotierten Konzentrationen von $0,5\ \mu\text{g}$, $1,0\ \mu\text{g}$ bzw. $10,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,15\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,45\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin	

4-*tert*-Butylbenzoesäure (TBBA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,1\%, 1,3\%$ bzw. $0,8\%$
	Streubereich	$u = 11,4\%, 3,61\%$ bzw. $2,22\%$
	bei dotierten Konzentrationen von $0,6\ \mu\text{g}$, $8,0\ \mu\text{g}$ bzw. $85,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 8,1\%, 1,3\%$ bzw. $0,8\%$
	Streubereich	$u = 20,8\%, 3,34\%$ bzw. $2,06\%$
	bei dotierten Konzentrationen von $0,6\ \mu\text{g}$, $8,0\ \mu\text{g}$ bzw. $85,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 92,6\%, 96,8\%$ bzw. $98,1\%$
bei dotierten Konzentrationen von $0,5\ \mu\text{g}$, $1,0\ \mu\text{g}$ bzw. $10,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,14\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin	

Bestimmungsgrenze: 0,42 µg pro Liter Urin

tert-Butylhippursäure (TBHA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,9\%, 8,5\%$ bzw. 6,8 %
	Streubereich	$u = 21,9\%, 23,9\%$ bzw. 18,9 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,8 µg, 1,0 µg bzw. 14,5 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 23,6\%, 48,7\%$ bzw. 17,8 %
	Streubereich	$u = 60,7\%, 125\%$ bzw. 45,8 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,8 µg, 1,0 µg bzw. 14,5 µg pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 107\%, 110\%$ bzw. 110 %
bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,13 µg pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,39 µg pro Liter Urin	

Lysmerylsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,8\%, 2,1\%$ bzw. 3,0 %
	Streubereich	$u = 18,9\%, 5,8\%$ bzw. 8,3 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,8\%, 5,2\%$ bzw. 6,2 %
	Streubereich	$u = 14,9\%, 13,4\%$ bzw. 15,9 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 103\%, 102\%$ bzw. 101 %
bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,12 µg pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,36 µg pro Liter Urin	

Lysmerol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,6\%, 3,9\%$ bzw. 2,0 %
	Streubereich	$u = 12,8\%, 10,8\%$ bzw. 5,5 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 16,5\%, 4,2\%$ bzw. 9,9 %
	Streubereich	$u = 42,4\%, 10,8\%$ bzw. 25,5 %
	bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 92,9\%, 98,7\%$ bzw. 113 %
bei dotierten Konzentrationen von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 10,0 µg pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen		

Nachweisgrenze: 0,035 µg pro Liter Urin

Bestimmungsgrenze: 0,10 µg pro Liter Urin

2 Allgemeine Informationen zu Lysmeral

Lysmeral (Lilial, 2-(4-*tert*-Butylbenzyl)propionaldehyd) ist ein synthetischer Duftstoff, der nach Maiglöckchen riecht und in Kosmetika, Reinigungsmitteln sowie in Hygiene- und Haushaltsprodukten breite Anwendung findet (Pluym et al. 2016). Die chemische Struktur des Lysmerals ist in [Abbildung 1](#) dargestellt. Da Lysmeral beim Menschen hautsensibilisierend wirken kann (Uter et al. 2013), muss das in Kosmetikprodukten enthaltene Lysmeral in Europa als Inhaltsstoff angegeben werden, sofern der Gehalt 0,001% in *Leave-on*-Produkten bzw. 0,01% in *Rinse-off*-Produkten überschreitet (Heisterberg et al. 2011).

Wichtige Metaboliten sowie deren Toxikokinetik und metabolische Konversionsfaktoren wurden im Rahmen des Kooperationsprojektes des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) und des Verbands der chemischen Industrie (VCI) zur Entwicklung eines Biomonitoring-Verfahrens für die Erfassung der Lysmeral-Exposition in der Allgemeinbevölkerung in einer Metabolismusstudie mit fünf Freiwilligen ermittelt (Scherer et al. 2017). Dabei wurden vier Metaboliten von Lysmeral (Hydroxylysmerylsäure, *tert*-Butylbenzoesäure, Lysmerylsäure und Lysmerol) im Urin detektiert, die insgesamt 16,5% der einmalig applizierten Lysmeral-Dosis ausmachten. Nach Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin von 40 Freiwilligen aus der Allgemeinbevölkerung schätzten Scherer et al. (2017) die mittlere aufgenommene Lysmeralmenge auf etwa 140–220 µg pro Tag. Aus diesen Daten sowie aus *In-vitro*-Untersuchungen an diversen Tierspezies kann das in [Abbildung 1](#) gezeigte Metabolismusschema für Lysmeral abgeleitet werden.

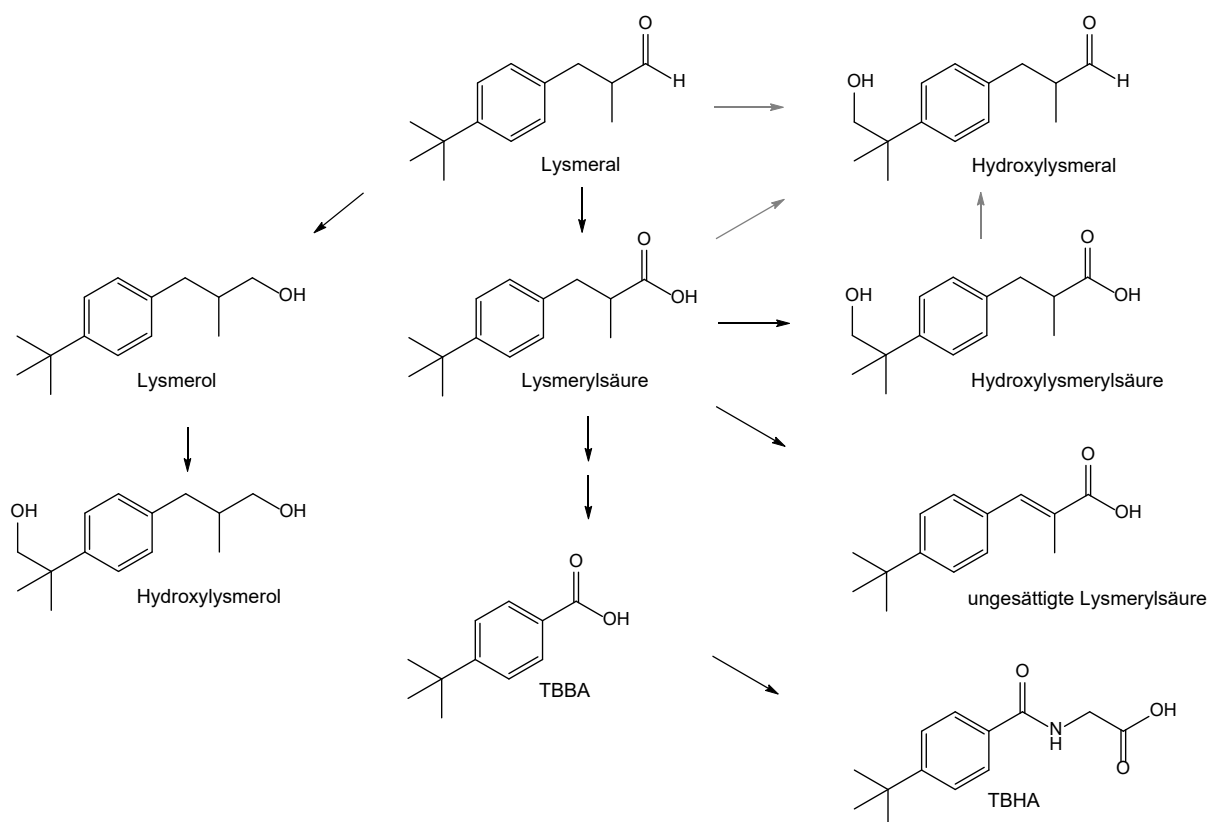


Abb. 1 Postulierter Lysmeral-Metabolismus in Tier und Mensch (gemäß Scherer et al. 2017). Die meisten der Metaboliten wurden aus Tierversuchen (Ratte bzw. Maus) und *In-vitro*-Untersuchungen (Hepatozyten und Mikrosomen von Nagetieren und Menschen) abgeleitet. Die schwarzen Pfeile zeigen einen experimentell nachgewiesenen Stoffwechselweg an, die grauen Pfeile einen möglichen aber nicht wahrscheinlichen Stoffwechselweg

Hydroxylysmerylsäure, Lysmerylsäure und Lysmerol stellen geeignete und spezifische Biomarker für eine Lysmeral-Exposition dar. Hingegen können TBHA und TBBA auch aus anderen verbreitet vorkommenden Vorläufern wie beispielsweise *tert*-Butyltoluol entstehen (Scherer et al. 2017). Da allerdings TBBA häufig detektiert wird und eine gute Korrelation zu den übrigen Lysmeral-Metaboliten vorliegt, kann TBBA ebenfalls als spezifischer Biomarker angesehen werden (Scherer et al. 2021). In Bevölkerungsstudien in Deutschland wurden die Hauptmetaboliten TBBA und Lysmerol in beinahe allen Urinproben nachgewiesen, Hydroxylysmerylsäure und Lysmerylsäure in etwa 30–40 % der Proben. Dabei fand sich TBBA in deutlicher höheren Konzentrationen als die übrigen Metaboliten (Murawski et al. 2020; Scherer et al. 2021).

3 Grundlage des Verfahrens

Mit dem nachfolgend beschriebenen Verfahren werden die Lysmeral-Metaboliten Hydroxylysmerylsäure, *tert*-Butylbenzoesäure (TBBA), *tert*-Butylhippursäure (TBHA), Lysmerylsäure und Lysmerol im Urin bestimmt. Nach Zugabe der deuterierten internen Standards (TBBA- d_{13} , Lysmerylsäure- d_8 und Lysmerol- d_8) zu 1 ml Urin wird zunächst eine enzymatische Spaltung mit β -Glucuronidase und anschließend eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt. Die Extrakte werden zur Trockne eingengt und mit 3-Nitrophthalsäureanhydrid derivatisiert. Die Analyse erfolgt mittels UPLC-MS/MS nach negativer Elektrospray-Ionisierung (ESI⁻).

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-System bestehend aus Sample Manager (SM-FTN), I-Class Binary Solvent Manager, Column Manager und Sample Organiser (z. B. Acquity UPLC I-Class System, Waters GmbH, Eschborn)
- HPLC-Säule: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 mm \times 100 mm (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- Tandem-Massenspektrometer (z. B. Xevo TQ-S Tandem Quadrupol, Waters GmbH, Eschborn)
- Brutschrank mit Schüttler (z. B. Incucell 111 mit Schüttler GFL 3005, MMM Medcenter GmbH, Planegg)
- Stickstoffgenerator (z. B. CMC Instruments, Eschborn)
- Zentrifuge (z. B. Rotixa KS, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- SpeedVac-Konzentrator (z. B. Jouan GmbH, Unterhaching)
- Rollenmischer (z. B. Stuart Equipment, Cole-Parmer, Stone, Vereinigtes Königreich)
- Multi-Tube-Vortexer (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- pH-Meter (z. B. Typ CG 842, Schott AG, Mainz)
- 1-ml-, 2-ml-, 10-ml-, 100-ml- und 1000-ml-Messkolben (z. B. Schott AG, Mainz)
- 100-ml- und 1000-ml-Messzylinder (z. B. Schott AG, Mainz)
- 4-ml-Probengläschen mit Schraubkappen (z. B. BGB Analytik Vertrieb GmbH, Lörrach)
- Probengläschen für den Autosampler (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- Multipette[®] (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Kohlenhubpipetten mit variabler Volumeneinstellung (1–10 μ l, 10–100 μ l bzw. 100–1000 μ l) mit den passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)

- 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.

- Ammoniumacetat (z. B. Nr. 012406, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- Ammoniumhydroxid-Lösung $\geq 25\%$ in Wasser (z. B. Nr. 15650920, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Dichlormethan (z. B. Nr. DRE-C12424500, LGC Standards GmbH, Wesel)
- Dinatriumhydrogenphosphat (z. B. Nr. 106586, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethylacetat (z. B. Nr. 270989, Merck KGaA, Darmstadt)
- β -Glucuronidase, Typ IX-A aus *E. coli*, lyophilisiertes Pulver, 500.000 Units (z. B. Nr. G7396-500KU, Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat (z. B. Nr. 104873, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol (z. B. Nr. 136806, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- 3-Nitrophthalsäureanhydrid (z. B. Nr. 820903, Merck KGaA, Darmstadt)
- *ortho*-Phosphorsäure 85 % (z. B. Nr. 1.00573, Merck KGaA, Darmstadt)
- Wasser (z. B. Nr. REAH2O25AG, LGC Standards GmbH, Wesel)

4.3 Referenzmaterialien

- Hydroxylysmerylsäure (4-(2-Hydroxy-1,1-dimethylethyl)- α -methylbenzolpropansäure) (z. B. Auftragsynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- TBBA (4-*tert*-Butylbenzoessäure) (z. B. Nr. 820238, Merck KGaA, Darmstadt)
- TBBA- d_{13} (z. B. Nr. D-7697, C/D/N Isotopes Inc., Pointe-Claire, Kanada)
- TBHA ([4-(*tert*-Butylbenzoyl)amino]essigsäure) (z. B. Nr. OTV000050, Merck KGaA, Darmstadt)
- Lysmerylsäure (3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methylpropionsäure) (z. B. Nr. JH-7214, Combi-Blocks Inc., San Diego, USA)
- Lysmerylsäure- d_8 (z. B. Auftragsynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Lysmerol (3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methyl-1-propanol) (z. B. Auftragsynthese, Otava Chemicals, Vaughan, Kanada)
- Lysmerol- d_8 (z. B. Auftragsynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

4.4 Lösungen

- *ortho*-Phosphorsäure (20 %)
In einem 100-ml-Messkolben werden etwa 70 ml hochreines Wasser vorgelegt und 23,5 ml *ortho*-Phosphorsäure (85 %) zugegeben. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Methanol:Wasser (1:1, V/V)
In einem 100-ml-Messkolben werden 50 ml Methanol vorgelegt und der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

- Ammoniumacetat-Lösung (5 mmol/l)
Es werden 385,41 mg Ammoniumacetat in einen 1000-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Ammoniumhydroxid-Lösung (0,025 %, V/V)
In einem 100-ml-Messkolben werden etwa 90 ml hochreines Wasser vorgelegt und 25 µl Ammoniumhydroxid-Lösung zugegeben. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Ammoniumacetat-Lösung (5 mmol/l) + Ammoniumhydroxid-Lösung (0,025 %), pH 9,2
Der pH-Wert der Ammoniumacetat-Lösung (5 mmol/l) wird mit der 0,025%igen Ammoniumhydroxid-Lösung auf pH = 9,2 eingestellt.
- Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (0,67 mol/l)
Es werden 90,73 g Kaliumdihydrogenphosphat in einen 1000-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (0,67 mol/l)
Es werden 94,64 g Dinatriumhydrogenphosphat in einen 1000-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Phosphatpuffer (0,67 mol/l, pH 6,4)
Ein Liter der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (0,67 mol/l) wird mit der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (0,67 mol/l) auf pH = 6,4 eingestellt.

Die wässrigen Lösungen werden im Kühlschrank (4–8 °C) gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens drei Monate stabil.

- 3-Nitrophthalsäureanhydrid in Ethylacetat (100 mg/l)
Es werden 25 mg 3-Nitrophthalsäureanhydrid in 250 ml Ethylacetat gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank (4–8 °C) gelagert. Es liegen keine Daten zur Stabilität vor.
- β-Glucuronidase (150 U/µl)
Die gesamte Menge des Enzyms wird in 3324 µl Phosphatpuffer (pH 6,4) gelöst. Die Lösung wird bei –20 °C gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens einen Monat stabil.

4.5 Interne Standards (ISTDs)

- ISTD-Stammlösungen (1 g/l)
10 mg TBBA-d₁₃, Lysmerylsäure-d₈ bzw. Lysmerol-d₈ werden in je einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.
- ISTD-Arbeitslösungen (100 mg/l)
100 µl der jeweiligen ISTD-Stammlösungen werden in je einen 1-ml-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l)
Je 100 µl der ISTD-Arbeitslösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die ISTD-Stamm- und -Arbeitslösungen sowie die ISTD-Dotierlösung werden bei –20 °C gelagert. Es liegen keine Daten zur Stabilität vor.

4.6 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1 g/l)
10 mg Hydroxylysmerylsäure, TBBA, TBHA, Lysmerylsäure bzw. Lysmerol werden in je einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.
- Arbeitslösungen (100 mg/l)
100 µl der jeweiligen Stammlösung werden in je einen 1-ml-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.
- Dotierlösung I (10 mg/l)
Je 100 µl der Arbeitslösungen werden in einen 1-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung II (2 mg/l)
200 µl der Dotierlösung I werden in einen 1-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung III (100 µg/l)
100 µl der Dotierlösung II werden in einen 2-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Stamm-, Arbeits- und Dotierlösungen der Analyten werden bei -20°C gelagert. Es liegen keine Daten zur Stabilität vor.

Die Kalibrierstandards werden durch Dotieren von Poolurin mit den Dotierlösungen I–III gemäß dem in [Tabelle 1](#) angegebenen Pipettierschema hergestellt. Für die Analyten Hydroxylysmerylsäure, TBBA und Lysmerol wird von 0,2 µg/l bis 500 µg/l kalibriert, für TBHA und Lysmerylsäure von 0,2–100 µg/l.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen Poolurin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
00	–	–	1000	0 (ohne ISTD)
0	–	–	1000	0
1	III	2	998	0,2
2	III	5	995	0,5
3	III	10	990	1
4	III	20	980	2
5	III	50	950	5
6	II	5	995	10
7	II	25	975	50
8	II	50	950	100
9	I	50	950	500

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Kunststoffgefäßen gesammelt und bis zur Probenaufbereitung bei -20°C eingefroren.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. Je 1 ml der Proben wird in ein 4-ml-Probengläschen pipettiert und mit 10 μl ISTD-Dotierlösung, 1 ml Phosphatpuffer (pH 6,4) und 10 μl β -Glucuronidase (155 U/ μl) versetzt. Die Proben werden gemischt und in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht geschüttelt (ca. 100 Umdrehungen/min).

Zu den Proben werden 50 μl der 20%igen *ortho*-Phosphorsäure und 1,5 ml Dichlormethan pipettiert. Die Proben werden anschließend für 30 min auf einem Rollenmischer durchmischt und anschließend für 15 min bei $1860 \times g$ zentrifugiert. Die Dichlormethanphase wird in ein neues Probengläschen pipettiert und in der SpeedVac ohne Heizung und ohne Gaseinlass zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 1 ml Derivatisierungslösung (3-Nitrophthalsäureanhydrid in Ethylacetat) aufgenommen und die Probe für 30 min bei 80°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung wiederum zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgt eine Resuspendierung des Rückstandes in 100 μl Methanol/Wasser (1 : 1, V/V).

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 mm \times 100 mm
Säulentemperatur:	30°C
Autosampler:	10°C
Injektionsvolumen:	10 μl
Laufmittel:	A: Methanol B: Ammoniumacetat (0,5 mM) + Ammoniumhydroxid (0,025 %), pH 9,2
Flussrate:	0,35 ml/min
Laufzeit:	13 min

Das Gradientenprogramm ist in [Tabelle 2](#) angegeben. Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

Tab. 2 Gradientenprogramm für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	20	80
4	45	55
10	65	35
11	100	0
13	20	80

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Negative Elektrospray-Ionisierung (ESI ⁻)
Ionenquellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	600 °C
Cone-Gasfluss:	148 l/h
Desolvationsgasfluss:	798 l/h
Kollisionsgasfluss:	8,4 ml/h
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 3

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

Tab. 3 Retentionszeiten und parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin

Analyt bzw. ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [m/z]	Status	Messzeit [ms]	Cone [V]	Kollisionsenergie [V]
Hydroxylsmeralsäure	4,48	235,0 → 205,1	Quantifier	43	2	14
		428,2 → 384,1	Qualifier	43	12	16
TBBA-d ₁₃	5,17	190,2 → 146,2	ISTD	51	48	14
TBBA	5,27	177,0 → 133,0	Quantifier	51	44	14
TBHA	5,49	234,1 → 133,1	Quantifier	43	52	20
		234,1 → 190,1	Qualifier	43	52	14
Lysmeralsäure-d ₈	8,11	227,0 → 227,0 ^{a)}	ISTD	43	60	14
Lysmeralsäure	8,19	219,1 → 219,1 ^{a)}	Quantifier	43	60	14
Lysmerol-d ₈	11,92	406,0 → 239,0	ISTD	80	4	14
Lysmerol	11,92	398,2 → 231,1	Quantifier	80	4	14
		398,2 → 166,0	Qualifier	80	4	14

^{a)} Da für diese Verbindung kein geeigneter Massenübergang gefunden wurde, wurden identische Ionen als Mutter- und Tochterionen gewählt.

7 Analytische Bestimmung

10 µl der aufgearbeiteten Urinprobe (siehe [Abschnitt 5.2](#)) werden in das UPLC-MS/MS-System eingespritzt. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenübergänge und der Retentionszeiten. Die in [Tabelle 3](#) 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. Das Chromatogramm eines mit den einzelnen Analyten dotierten Urins ist exemplarisch in [Abbildung 2](#) dargestellt.

8 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards werden wie unter [Abschnitt 4.5](#) beschrieben hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Die Kalibriergerade wird durch Auftragen des Peakflächenverhältnisses von Analyt zu deuteriertem internen Standard gegen die dotierte Konzentration erstellt. Für die Analyten Hydroxylsmeralsäure, TBBA und TBHA wird TBBA-d₁₃ als interner Standard verwendet. Die Kalibriergeraden sind im Bereich von 0,2–100 µg/l bzw. 0,2–500 µg/l linear. [Abbildung 3](#) zeigt exemplarische Kalibriergeraden der einzelnen Analyten.

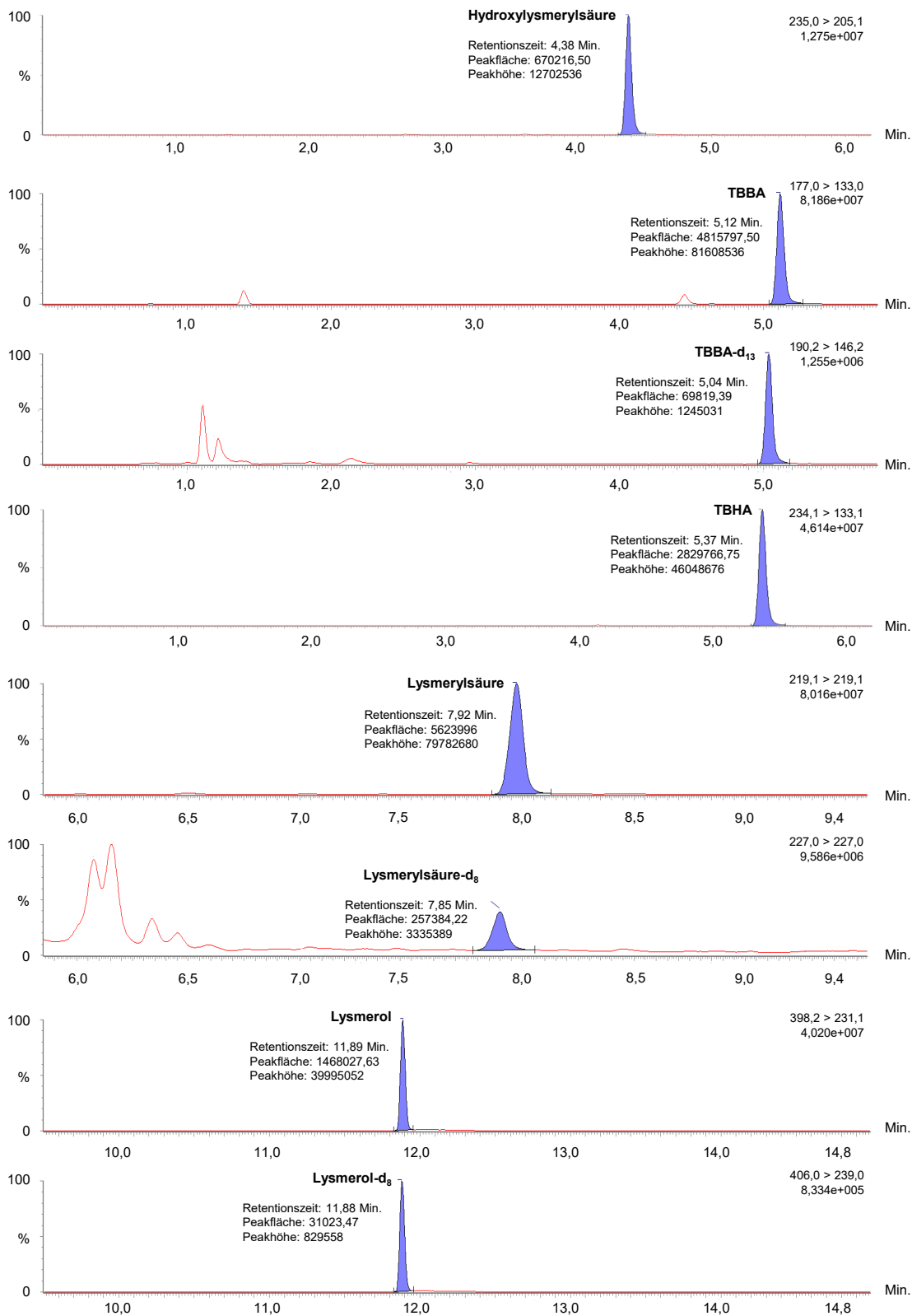


Abb. 2 MRM-Chromatogramm eines mit Hydroxylysmerylsäure (100 µg/l), TBBA (500 µg/l), TBHA (500 µg/l), Lysmerylsäure (100 µg/l) und Lysmerol (100 µg/l) dotierten Urins

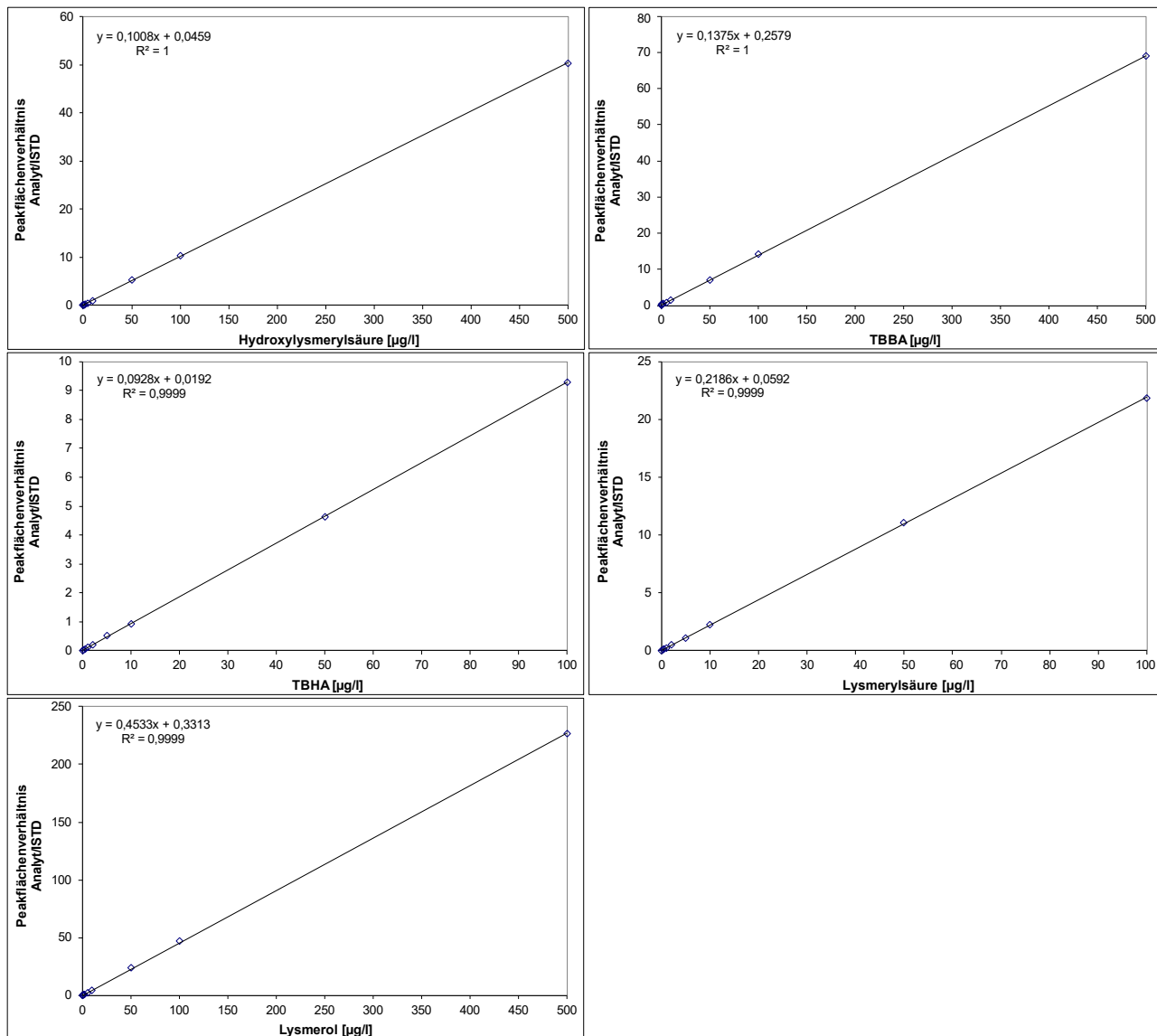


Abb. 3 Kalibriergeraden für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehaltes einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des dazugehörigen ISTDs gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion des jeweiligen Analyten (vgl. Abschnitt 8) kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in µg/l Urin berechnet werden.

Das Flächenverhältnis des undotierten Kalibrierstandards wird von den übrigen Kalibrierstandards abgezogen und die Regressionsgerade durch den Ursprung des Koordinatensystems gezwungen. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

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

Zur Präzisionskontrolle werden mit jeder Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit niedriger, mittlerer und hoher Analytkonzentration untersucht. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden, indem Poolurin mit Standardlösungen der Analyten dotiert wird. Die Analytkonzentration im Qualitätskontrollmaterial sollte dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (z. B. 0,5 µg/l, 1 µg/l und 10 µg/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 der Kontrollmaterialien) ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt. Bei der Methodenentwicklung wurde die Validierung gemäß den Kriterien des von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitels (Bader et al. 2010) sowie der FDA (U.S. Food and Drug Administration; U.S.-Behörde für Lebens- und Arzneimittel) (FDA 2018) Guidelines durchgeführt.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Die Bestimmung der Präzision in der Serie erfolgte bei einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Analytkonzentration. Für die Ermittlung der Präzision in der Serie wurden die Proben jeweils fünfmal an einem Tag aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Präzision in der Serie für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Hydroxylysmerylsäure	0,4	6,9	19,2
	0,8	4,7	13,1
	4,0	4,9	13,6
TBBA	0,6	4,1	11,4
	8,0	1,3	3,6
	85,0	0,8	2,2
TBHA	0,8	7,9	21,9
	1,0	8,5	23,9
	14,5	6,8	18,9
Lysmerylsäure	0,5	6,8	18,9
	1,0	2,1	5,8
	10,0	3,0	8,3
Lysmerol	0,5	4,6	12,8
	1,0	3,9	10,8
	10,0	2,0	5,6

Präzision von Tag zu Tag

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte ebenfalls bei einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Analytkonzentration. Für die Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden die dotierten Urinproben innerhalb von etwa drei Wochen an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die errechneten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 5](#) dargestellt.

Tab. 5 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Hydroxylysmerylsäure	0,4	13,7	35,2
	0,8	10,5	27,0
	4,0	9,7	24,9
TBBA	0,6	8,1	20,8
	8,0	1,3	3,3
	85,0	0,8	2,1
TBHA	0,8	23,6	60,7
	1,0	48,7	125
	14,5	17,8	45,8
Lysmerylsäure	0,5	5,8	14,9
	1,0	5,2	13,4
	10,0	6,2	15,9
Lysmerol	0,5	16,5	42,4
	1,0	4,2	10,8
	10,0	9,9	25,5

11.2 Richtigkeit

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen, wurde analytfreier Poolurin verwendet. Der Urin wurde mit drei verschiedenen Analytkonzentrationen (0,5 µg/l, 1 µg/l bzw. 10 µg/l) dotiert. Pro Konzentrationslevel wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die so erhaltenen mittleren relativen Wiederfindungsraten sind in [Tabelle 6](#) aufgeführt.

Tab. 6 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindungsrate r [%]
Hydroxylysmerylsäure	0,5	88,9
	1,0	88,4
	10,0	89,9
TBBA	0,5	92,6
	1,0	96,8
	10,0	98,1
TBHA	0,5	107
	1,0	110
	10,0	110
Lysmerylsäure	0,5	103
	1,0	102
	10,0	101
Lysmerol	0,5	92,9
	1,0	98,7
	10,0	113

11.3 Absolute Wiederfindung

Die Bestimmung der absoluten Wiederfindung diente der Abschätzung aufarbeitungsbedingter Verluste. Dafür wurde Urin mit den Analyten auf drei verschiedenen Konzentrationsniveaus (0,5 µg/l, 1 µg/l bzw. 10 µg/l) dotiert. Diese Proben wurden sechsmal aufgearbeitet und analysiert. Die Berechnung der absoluten Wiederfindung erfolgte durch Vergleich mit Referenzproben. Als Referenzproben diente dieselbe Urinmatrix, die jedoch erst nach der Aufarbeitung mit den Analyten auf den drei Konzentrationsniveaus dotiert wurde. Die Referenzproben wurden dreimal analysiert. Die so erhaltenen absoluten Wiederfindungsraten sind in [Tabelle 7](#) aufgeführt.

Tab. 7 Absolute Wiederfindungsraten für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Absolute Wiederfindungsrate <i>r</i> [%]
Hydroxylysmerylsäure	0,5	85,5
	1,0	80,1
	10,0	80,4
TBBA	0,5	96,7
	1,0	103
	10,0	99,5
TBHA	0,5	104
	1,0	87,4
	10,0	104
Lysmerylsäure	0,5	86,3
	1,0	86,8
	10,0	80,6
Lysmerol	0,5	74,1
	1,0	72,2
	10,0	72,5

11.4 Matrixeffekte

Die bei der LC-MS/MS-Messung auftretenden Matrixeffekte wurden unter Verwendung von drei Individualurinen untersucht. Die Urinproben wurden ohne Dotierung aufgearbeitet und erst vor der eigentlichen LC-MS/MS-Analyse mit den Analyten in niedriger und hoher Konzentration sowie mit den internen Standards dotiert. Parallel wurde reines Lösungsmittel mit denselben Analytkonzentrationen dotiert und vermessen.

Die Matrixeffekte wurden berechnet, indem die Peakflächen der Analytsignale der Urinproben mit denen der Lösungsmittelproben verglichen wurden ([Tabelle 8](#)).

Tab. 8 Matrixeffekte für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin (n = 3)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Matrixeffekte [%]
Hydroxylysmerylsäure	0,5	75,9
	10,0	72,2
	10,0 (ISTD)	109
TBBA	0,5	111
	10,0	108
	10,0 (ISTD)	105
TBHA	0,5	89,6
	10,0	90,0
	10,0 (ISTD)	105
Lysmerylsäure	0,5	99,9
	10,0	99,7
	10,0 (ISTD)	115

Tab. 8 (Fortsetzung)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Matrixeffekte [%]
Lysmerol	0,5	265
	10,0	504
	10,0 (ISTD)	271

11.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten wurden durch die Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses mit Hilfe der entsprechenden Funktion in der Auswertesoftware MassLynx V4.1 ermittelt. Dazu wurden drei verschiedene analytfreie Urinproben im unteren Konzentrationsbereich dotiert und das Signal/Rausch-Verhältnis berechnet. Die Konzentrationen bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von drei wurden als Nachweisgrenzen festgelegt. Die Bestimmungsgrenzen wurden zunächst bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von neun angenommen und anschließend durch die Ermittlung der Präzision und Richtigkeit in fünf verschiedenen, an der Bestimmungsgrenze dotierten Urinproben verifiziert. Dabei musste eine Präzision von maximal 20 % und eine Richtigkeit von 80–120 % erreicht werden. [Tabelle 9](#) zeigt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für alle Analyten.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten für die Bestimmung der Lysmeral-Metaboliten im Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
Hydroxylysmerylsäure	0,15	0,45
TBBA	0,14	0,42
TBHA	0,13	0,39
Lysmerylsäure	0,12	0,36
Lysmerol	0,035	0,10

11.6 Stabilität

Für die Ermittlung der Stabilität der Analyten wurden drei unterschiedliche Prüfungen durchgeführt: Kurzzeitstabilität, Langzeitstabilität und Frier-/Tau-Stabilität. Für die Ermittlung der oben genannten Parameter wurden zwei mit niedriger bzw. hoher Konzentration dotierte Urinproben verwendet.

Die Kurzzeitstabilität der Analyten wurde bei Raumtemperatur und einer Lagerungsdauer von 24 h ermittelt, was einer maximalen Verweildauer der Probe bei Raumtemperatur (während Probenahme und Aufarbeitung) entspricht. Die ermittelte Richtigkeit für die fünf Lysmeral-Metaboliten lag zwischen 85 % und 115 %.

Die Langzeitstabilität wurde bei einer Lagertemperatur von ≤ -20 °C ermittelt. Von den aliquotierten Proben wurden in regelmäßigen Abständen jeweils drei aufgearbeitet und vermessen. Dabei lag die Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % der jeweiligen Sollwerte. TBBA, Lysmerylsäure und Hydroxylysmerylsäure sind bei -20 °C zehn Monaten stabil.

Die Frier-/Tau-Stabilität wurde mit einem Probenaliquot bestimmt, das dreifach direkt nach Herstellung und nach sechsmaligem Einfrieren/Auftauen aufgearbeitet und vermessen wurde. Die Richtigkeit der Bestimmungen lag innerhalb 85–115 % des jeweiligen Sollwertes. TBBA, Lysmerylsäure, Lysmerol und Hydroxylysmerylsäure waren über sechs Frier-/Tau-Zyklen stabil.

Die Daten zur Stabilität der übrigen Analyten lagen bei Drucklegung der Methode noch nicht vor.

11.7 Verschleppungseffekte

Verschleppungseffekte im chromatographischen System wurden durch mehrfache Injektion hochkonzentrierter Proben und Leerwertproben untersucht. Nach jeweils fünf Injektionen einer hochkonzentrierten Probe wurde eine Leerwerturinprobe zweimal analysiert. Für Lysmerol wurden zur Retentionszeit des Analyten und des internen Standards kleine Interferenzsignale beobachtet. Allerdings lag die dabei verschleppte Analytkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze.

11.8 Störeinflüsse

Während der Methodenentwicklung wurde ein Interferenzpeak zur Retentionszeit der Lysmerylsäure beobachtet. Durch Optimierung des pH-Wertes der Eluenten konnte diese Störung allerdings behoben werden. Bei einem pH-Wert von pH 9,2 wurden robuste Ergebnisse erhalten, so dass eine exakte Einhaltung dieses pH-Wertes bei der Chromatographie unbedingt erforderlich ist.

Bei der Methodenprüfung unter Verwendung einer HPLC (anstelle einer UPLC) ergaben sich zunächst bei allen Analyten Interferenzen sowie zum Teil erhebliche Blindwerte. Ein Wechsel der genutzten Glucuronidase aus *E. coli* zu einer Glucuronidase aus *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich Nr. G7017) konnte als Ursache für diese Störungen ausgeschlossen werden. Bei einer Wiederholung unter Verwendung eines frisch gereinigten HPLC-MS/MS-Geräts sowie von ausschließlich von den Entwicklern der Methode aufgearbeiteten Proben ergaben sich geringere Störeinflüsse und deutlich reduzierte Blindwerte.

12 Diskussion der Methode

Die hier dargestellte UPLC-MS/MS-Methode erlaubt die Bestimmung von fünf Lysmeral-Metaboliten (Hydroxylysmerylsäure, TBBA, TBHA, Lysmerylsäure und Lysmerol). Die Methode ist schnell, selektiv und weist eine ausreichende Richtigkeit und Linearität auf. Die Bestimmungsgrenzen sind ausreichend, um die Konzentrationen der Analyten im Urin der Allgemeinbevölkerung zu quantifizieren. Für Lysmerylsäure und Hydroxylysmerylsäure liegen die Hintergrundgehalte im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung allerdings in ca. 80 % der Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Der Metabolit TBHA wies im Rahmen der Methodenentwicklung hohe Varianzen im unteren Konzentrationsbereich auf. Der Anwender der Methode muss für diesen Analyten die Messgenauigkeit auch im unteren Konzentrationsbereich sicherstellen oder auf TBHA als Biomarker zur Erfassung der Lysmeral-Exposition verzichten.

Die Methodenprüfung erfolgte in einem zweiten, unabhängigen Labor unter Verwendung eines HPLC-MS/MS-Systems. Dabei lagen die Bestimmungsgrenzen für Lysmerylsäure und Hydroxylysmerylsäure aufgrund von Peakverbreiterungen deutlich über denen der Methodenentwickler, zudem wurden für TBBA hohe Hintergrundgehalte bestimmt. Die Validierungsdaten für Lysmerol konnten mit HPLC-MS/MS bestätigt werden.

Aufgrund der im Urin der Allgemeinbevölkerung beobachteten Konzentrationen an Lysmeral-Metaboliten (Pluym et al. 2016; Scherer et al. 2017) sind auch die mit einer HPLC-Trennung erreichbaren Bestimmungsgrenzen für Lysmerol und TBBA ausreichend für ein Biomonitoring.

Verwendete Messgeräte UPLC-System: Acquity UPLC I-Class System bestehend aus Sample Manger (SM-FTN), I-Class Binary Solvent Manager, Column Manager und Sample Organiser sowie einem Xevo TQ-S Tandem Quadrupol Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn)

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>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- FDA (Food and Drug Administration) (2018) Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. FDA, Silver Spring, MD. <https://www.fda.gov/media/70858/download>, abgerufen am 22 Feb 2021
- Heisterberg MV, Menné T, Johansen JD (2011) Contact allergy to the 26 specific fragrance ingredients to be declared on cosmetic products in accordance with the EU cosmetics directive. Contact Dermatitis 65(5): 266–275. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01962.x>
- Murawski A, Fiedler N, Schmied-Tobies MIH, Rucic E, Schwedler G, Stöckelhuber M, Scherer G, Pluym N, Scherer M, Kolossa-Gehring M (2020) Metabolites of the fragrance 2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde (lysmeral) in urine of children and adolescents in Germany – Human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). Int J Hyg Environ Health 229(2020): 113594. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113594>
- Pluym N, Krnac D, Gilch G, Scherer M, Leibold E, Scherer G (2016) A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the human biomonitoring of non-occupational exposure to the fragrance 2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde (lysmeral). Anal Bioanal Chem 408(21): 5873–5882. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9702-x>
- Scherer M, Koch HM, Schütze A, Pluym N, Krnac D, Gilch G, Leibold E, Scherer G (2017) Human metabolism and excretion kinetics of the fragrance lysmeral after a single oral dosage. Int J Hyg Environ Health 220(2): 123–129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.005>
- Scherer M, Petreanu W, Weber T, Scherer G, Pluym N, Kolossa-Gehring M (2021) Human biomonitoring in urine samples from the Environmental Specimen Bank reveals a decreasing trend over time in the exposure to the fragrance chemical lysmeral from 2000 to 2018. Chemosphere 265(2021): 128955. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128955>
- Uter W, Johansen JD, Börje A, Karlberg A-T, Lidén C, Rastogi S, Roberts D, White IR (2013) Categorization of fragrance contact allergens for prioritization of preventive measures: clinical and experimental data and consideration of structure-activity relationships. Contact Dermatitis 69(4): 196–230. DOI: <https://doi.org/10.1111/cod.12117>