

Bisphenol A, Bisphenol F und Bisphenol S – Bestimmung von Bisphenol A, Bisphenol F und Bisphenol S in Urin mittels UPLC-ESI-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Bisphenol A; Bisphenol F;
Bisphenol S; Biomonitoring; Urin;
UPLC-ESI-MS/MS

T. Jäger¹

M. Bader¹

K. Sander²

K. Blümlein²

T. Göen^{3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, BASF SE, Corporate Health Management, ESG/CB – H306, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen

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

³ Methodenentwicklung, Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

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

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

* E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Citation Note:

Jäger T, Bader M, Sander K, Blümlein K, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Bisphenol A, Bisphenol F und Bisphenol S – Bestimmung von Bisphenol A, Bisphenol F und Bisphenol S in Urin mittels UPLC-ESI-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Jun;8(2):Doc050. https://doi.org/10.34865/bi80057d8_2or

Manuskript abgeschlossen:
29 Okt 2020

Publikationsdatum:
30 Jun 2023

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. Bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF), and bisphenol S (BPS) are co-monomers for producing engineering plastics used in the automotive, food, and household sectors and are also used in paper chemicals and leather-tanning agents. Due to the wide range of applications, exposure to these bisphenols can occur both at the workplace and via the environment. The aim of this work was to develop a selective method for the determination of BPA, BPF, and BPS in human urine. This method has been comprehensively verified, and the reliability data have been confirmed by replication and validation of the procedure in a second, independent laboratory. The internal standards are added to the buffered urine samples, which are then subjected to enzymatic hydrolysis and processed via dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). The analytes are separated from matrix components by liquid chromatography and detected by tandem mass spectrometry using electrospray ionisation. Quantitative evaluation is carried out via external calibration in water. The good precision and accuracy data show that the method provides reliable and accurate measurement values. The method is selective and sensitive, and the quantitation limits of 0.25 µg/l, 0.10 µg/l, and 0.05 µg/l urine for BPA, BPF, and BPS, respectively, are sufficient to determine occupational as well as background exposure.

1 Kenndaten der Methode

Matrix Urin

Analytisches Messprinzip Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektrospray-Ionisation und Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-ESI-MS/MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Bisphenol A	80-05-7	Bisphenol A	80-05-7
Bisphenol F	620-92-8	Bisphenol F	620-92-8
Bisphenol S	80-09-1	Bisphenol S	80-09-1

Zuverlässigkeitskriterien

Bisphenol A (BPA)

Präzision in der Serie: Standardabweichung (rel.) $s_w = 9,8\%, 4,5\%, 10,8\%$ bzw. $7,9\%$
 Streubereich $u = 22,2\%, 10,2\%, 24,4\%$ bzw. $17,9\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $0,4\ \mu\text{g}$, $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPA pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag: Standardabweichung (rel.) $s_w = 15,5\%, 8,4\%, 9,2\%$ bzw. $12,5\%$
 Streubereich $u = 39,9\%, 21,6\%, 23,7\%$ bzw. $32,1\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $0,4\ \mu\text{g}$, $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPA pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen

Richtigkeit: Wiederfindungsrate (rel.) $r = 85,2\%, 88,2\%$ bzw. $94,1\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPA pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen

Nachweisgrenze: $0,08\ \mu\text{g}$ BPA pro Liter Urin

Bestimmungsgrenze: $0,25\ \mu\text{g}$ BPA pro Liter Urin

Bisphenol F (BPF)

Präzision in der Serie: Standardabweichung (rel.) $s_w = 13,4\%, 7,7\%, 5,5\%$ bzw. $4,8\%$
 Streubereich $u = 30,3\%, 17,4\%, 12,4\%$ bzw. $10,9\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $0,4\ \mu\text{g}$, $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPF pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag: Standardabweichung (rel.) $s_w = 12,9\%, 7,3\%, 6,8\%$ bzw. $10,7\%$
 Streubereich $u = 33,2\%, 18,8\%, 17,5\%$ bzw. $27,5\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $0,4\ \mu\text{g}$, $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPF pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen

Richtigkeit: Wiederfindungsrate (rel.) $r = 101\%, 95,9\%$ bzw. $97,1\%$
 bei einer dotierten Konzentration von $2,0\ \mu\text{g}$, $10,0\ \mu\text{g}$ bzw. $40,0\ \mu\text{g}$ BPF pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen

Nachweisgrenze: $0,03\ \mu\text{g}$ BPF pro Liter Urin

Bestimmungsgrenze: $0,10\ \mu\text{g}$ BPF pro Liter Urin

Bisphenol S (BPS)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,9\%, 3,3\%, 3,2\%$ bzw. 6,2 %
	Streubereich	$u = 6,6\%, 7,5\%, 7,2\%$ bzw. 14,0 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,4 µg, 2,0 µg, 10,0 µg bzw. 40,0 µg BPS pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,4\%, 2,8\%, 4,9\%$ bzw. 8,2 %
	Streubereich	$u = 19,0\%, 7,2\%, 12,6\%$ bzw. 21,1 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,4 µg, 2,0 µg, 10,0 µg bzw. 40,0 µg BPS pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 91,7\%, 92,7\%$ bzw. 97,2 %
bei einer dotierten Konzentration von 2,0 µg, 10,0 µg bzw. 40,0 µg BPS pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,02 µg BPS pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,05 µg BPS pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu Bisphenol A, Bisphenol F und Bisphenol S

Bisphenole sind eine Gruppe von chemischen Substanzen, die sich aus einer Grundstruktur von zwei über einen Kohlenstoff, Schwefel oder Benzolring verbundenen *p*-Hydroxyphenylgruppen ableiten. Die in der hier beschriebenen Analysenmethode enthaltenen Bisphenole – BPA (4-[2-(4-Hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol), BPF (4-[(4-Hydroxyphenyl)methyl]phenol) und BPS (4-(4-Hydroxyphenyl)sulfonylphenol) – werden als Co-Monomere für die Herstellung von technischen Kunststoffen (z. B. von Polycarbonaten, Polyethern, Polysulfonen, Polyethersulfonen und Epoxidharzen) verwendet (Bousoumah et al. 2021). Technische Kunststoffe sind hochtemperaturbeständig und haben ein breites Anwendungsspektrum in der Automobilindustrie, im Lebensmittel- und im Haushaltsbereich. Weiterhin werden BPA und BPS in Papierchemikalien, beispielsweise als Farbentwickler in Thermopapieren, verwendet (Björnsdotter et al. 2017). BPS wird zudem in Ledergerbmitteln eingesetzt (Ho et al. 2017). Eine Exposition gegen Bisphenole kann aufgrund der vielfältigen Anwendungsgebiete sowohl am Arbeitsplatz bei der Herstellung und der Verarbeitung als auch umweltbedingt durch Kontakt mit Kunststoffprodukten bzw. Thermopapier stattfinden. Die Strukturformeln von BPA, BPF und BPS sind in [Abbildung 1](#) dargestellt.

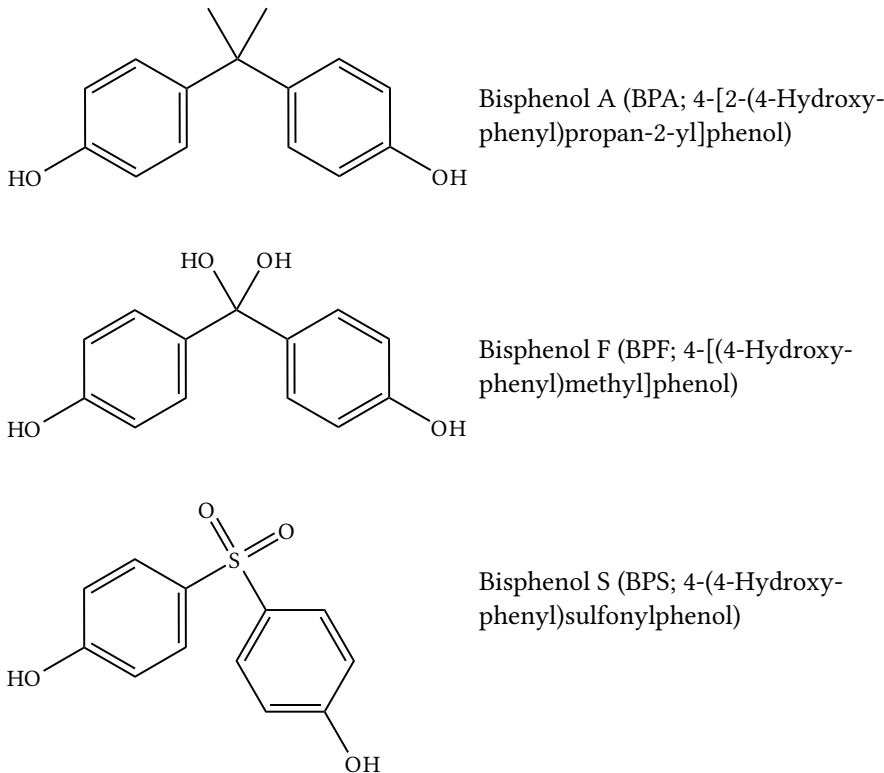


Abb. 1 Strukturformeln von BPA, BPF und BPS

BPA Zu BPA ist eine Vielzahl von Übersichtsarbeiten verfügbar (EFSA 2007; Hartwig 2011). Nach oraler Aufnahme unterliegt BPA beim Menschen dem First-Pass-Metabolismus unter Bildung von Glucuronidkonjugaten, die schnell mit dem Urin ausgeschieden werden. Bei oraler Gabe von 5 mg (ca. 0,07 mg/kg Körpergewicht) betrug die Eliminationshalbwertszeit weniger als sechs Stunden (Völkel et al. 2002). Nur zu einem geringen Anteil wird BPA sulfatiert oder nach Hydroxylierung am Phenylring ausgeschieden (Völkel et al. 2002). Ein vereinfachtes Metabolismusschema der Bisphenole ist in [Abbildung 2](#) dargestellt.

Für BPA hat die Kommission einen Biologischen Leitwert (BLW) von 80 mg/l Urin (nach Hydrolyse) und eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) von 5 mg/m³ E (einatembare Fraktion) abgeleitet (Spitzenbegrenzungskategorie I mit Überschreitungsfaktor 1). Dabei war für die Festsetzung des MAK-Wertes die lokale Wirkung auf den Respirationstrakt relevant. Wegen der (photo)kontaktsensibilisierenden Wirkung beim Menschen wurde der Stoff zudem mit SP markiert. Eine fruchtschädigende Wirkung ist bei Einhaltung des MAK-Wertes nicht anzunehmen (Schwangerschaftsgruppe C). Details zur toxikologischen Bewertung können den entsprechenden Dokumentationen der Kommission entnommen werden (DFG 2022; Greim 1996, 2000; Hartwig 2011; Nasterlack und Csanády 2007). Aufgrund der schwachen östrogenen Wirkung von Bisphenol A ist dessen reproduktionstoxische Wirkung in Diskussion.

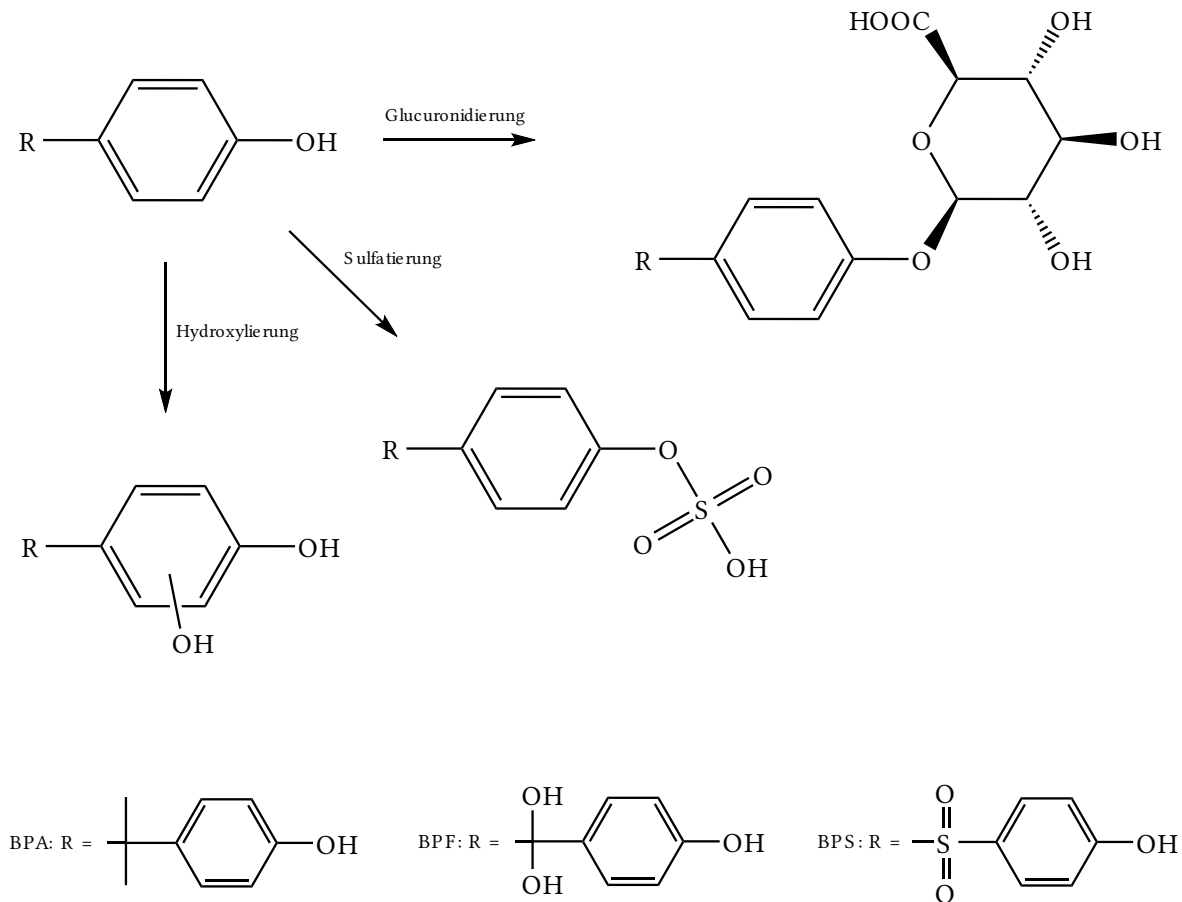


Abb. 2 Vereinfachtes Metabolismusschema der Bisphenole

BPF Tierexperimentelle Untersuchungen an der Ratte haben gezeigt, dass 43–54 % einer oral verabreichten BPF-Dosis (7 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht) über den Urin und 15–20 % mit den Faeces ausgeschieden werden. Der Hauptmetabolit ist das Sulfatkonjugat (Cabaton et al. 2006). Weiterhin wurden das Glucuronid sowie hydroxylierte Verbindungen wie *meta*- und *ortho*-Dihydroxy-BPF nachgewiesen (Cabaton et al. 2008). Von der Kommission liegen keine Dokumentationen zu BPF vor. Die Tatsache, dass BPF in (überwiegend süßem und mittelscharfem) Senf aus Sinalbin gebildet werden kann (Reger et al. 2017; Zoller et al. 2016), muss bei der Beurteilung von BPF-Gehalten in biologischem Material berücksichtigt werden.

BPS Zu BPS liegen mehrere In-vitro-Studien (Gramec Skledar et al. 2015; Gramec Skledar und Peterlin Mašič 2016; Grignard et al. 2012; Le Fol et al. 2015) sowie eine humane Metabolismusstudie nach oraler Gabe (Oh et al. 2018) vor. In Analogie zum strukturverwandten BPA wird BPS rasch und nahezu vollständig an den Hydroxylgruppen glucuronidiert bzw. sulfatiert (Gramec Skledar und Peterlin Mašič 2016). Weiterhin wurde in einer auf einem Mikrosomenassay basierenden Arbeit eine 1,2-Diolverbindung beschrieben (Gramec Skledar et al. 2016). In der Humanstudie von Oh et al. (2018) wurden die Serumkonzentrationen und die Exkretion von glucuronidiertem/sulfatiertem sowie unverändertem d_4 -Bisphenol S im Urin nach oraler Gabe an vier Männer und drei Frauen über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Die Halbwertszeiten für das glucuronidierte/sulfatierte bzw. unveränderte d_4 -BPS im Urin lagen bei 6,81 Stunden bzw. 4,06 Stunden. Insgesamt wurden 82 % (Bereich: 59–104 %) der verabreichten Dosis innerhalb von 48 Stunden wieder ausgeschieden, davon entfielen 2,5 % (Bereich: 0,9–4,1 %) auf die unveränderte Verbindung.

Von der Kommission wurde ein Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert (BAR) von 1 µg BPS (nach Hydrolyse)/l Urin abgeleitet (Bader et al. 2020).

Die hier vorliegende Methode bestimmt die Konzentrationen von BPA, BPF und BPS in Urin zur Bewertung der Belastung nach beruflicher und/oder umweltbedingter Exposition.

Tabelle 1 zeigt exemplarisch Gehalte an BPA, BPF und BPS im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung. In Tabelle 2 sind Daten zur renalen Bisphenolausscheidung nach beruflicher Exposition zusammengefasst.

Tab. 1 BPA-, BPF- und BPS-Hintergrundbelastung im Urin der Allgemeinbevölkerung

Kollektiv (Personenanzahl); Land; Studie	Analyt	BG [µg/l]	Konzentration [µg/l] ([µg/g Kreatinin])		Literatur
			Geometrischer Mittelwert	Bereich	
Erwachsene (116); China	BPA	0,1	1,1 (1,03)	<BG-29,4 (<BG-58,1)	Zhang et al. 2011
Erwachsene (21); Indien	BPA	0,1	1,59 (2,51)	0,25–5,60 (0,31–39,2)	
Erwachsene (36); Japan	BPA	0,1	0,84 (0,67)	0,10–23,2 (0,05–16,0)	
Erwachsene (89); China	BPS	0,02	0,226 (0,223)	<BG-3,16 (<BG-6,64)	Liao et al. 2012
Erwachsene (38); Indien	BPS	0,02	0,072 (0,098)	<BG-0,088 (<BG-4,72)	
Erwachsene (36); Japan	BPS	0,02	1,18 (0,933)	0,147–0,57 (0,148–14,0)	
Erwachsene (31); USA	BPS	0,02	0,299 (0,304)	<BG-21,0 (<BG-7,57)	
Kinder und Jugendliche, 3–17 a (515); Deutschland; GerES V	BPA	0,5	1,905 (1,669)	–	Tschersich et al. 2021
Erwachsene, weiblich (889); Italien	BPA	0,523	5,79 (5,36)	3,30–10,1 (3,14–9,73) ^{a)}	Carli et al. 2022
Kinder, 6 a (488); Korea	BPA	0,212 ^{b)}	1,629	0,150–153	Lee et al. 2022
Kinder, 6 a (115); Korea	BPF	0,074 ^{b)}	0,157	<NG-2,31	
Kinder, 6 a (205); Korea	BPS	0,020 ^{b)}	0,075	<NG-21,5	
Kinder und Jugendliche, 6–17 a (745); USA; NHANES 2013–2014	BPA	0,2 ^{b)}	1,23 ^{c)}	0,63–2,36 ^{a)}	Liu et al. 2019
	BPF	0,2 ^{b)}	0,30 ^{c)}	0,14–0,93 ^{a)}	
	BPS	0,1 ^{b)}	0,28 ^{c)}	0,12–0,66 ^{a)}	
Erwachsene (130); Saudi-Arabien	BPA	–	4,92 ^{c)}	–	Asimakopoulos et al. 2016
	BPF	–	0,19 ^{c)}	–	
	BPS	–	13,3 ^{c)}	–	
Erwachsene (1690); USA; NHANES 2015–2016	BPA	0,2 ^{b)}	1,08	–	CDC 2022 a
Erwachsene (1812); USA; NHANES 2013–2014	BPF	0,2 ^{b)}	0,541	–	CDC 2022 b
Erwachsene (1690); USA; NHANES 2015–2016	BPS	0,1 ^{b)}	0,496	–	CDC 2022 c

BG: Bestimmungsgrenze; NG: Nachweisgrenze

^{a)} 25.–75. Perzentil

^{b)} NG

^{c)} Median

Tab. 2 BPA- und BPS-Konzentrationen in Urin nach beruflicher Belastung

Kollektiv (Personenanzahl); Probenahmezeitpunkt; Land	Analyt	NG [µg/l]	Geometrischer Mittelwert (Bereich) [µg/g Kreatinin]	Literatur
Kassierer/innen (33); nach Schichtende; USA	BPA	0,07–0,25	2,76 (0,44–187,96)	Thayer et al. 2016
	BPS	0,01–0,02	1,35 (0,29–20,38)	
Beschäftigte einer Farbenfabrik (9); nach Schichtende; Finnland	BPA	0,1 ^{a)}	9,2 (0,9–187)	Heinäälä et al. 2017
Beschäftigte einer Thermopapierfabrik (21); nach Schichtende; Finnland	BPA	0,1 ^{a)}	35,5 (1,3–1001)	

Tab. 2 (Fortsetzung)

Kollektiv (Personenanzahl); Probenahmezeitpunkt; Land	Analyt	NG [µg/l]	Geometrischer Mittelwert (Bereich) [µg/g Kreatinin]	Literatur
Kassierer/innen (90); Frankreich	BPA	–	7,10 (0,68–704)	Ndaw et al. 2016
Kassiererinnen (17); USA	BPA	0,4	2,8	Braun et al. 2011
Beschäftigte in der Epoxidharzherstellung (28); China	BPA	–	31,96 (4,61–1253,69)	Wang et al. 2012
Feuerwehrleute (101); USA	BPA	–	1,40 (bis zu 21,1)	Waldman et al. 2016

NG: Nachweisgrenze

a) Bestimmungsgrenze

3 Grundlage des Verfahrens

Nach Zugabe der internen Standards (d_8 -BPA, d_{10} -BPF und d_8 -BPS) zu den Urinproben werden die Proben einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Die Analyten werden anschließend mittels dispersiver Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion (DLLME) angereichert und gleichzeitig von Matrixkomponenten abgetrennt. Die Analyten werden flüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels externer Kalibrierung in wässrigem Medium.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (z. B. Waters UPLC I-Class bestehend aus einem binären Solvent Manager, einem Sample Manager und einem Säulenofen, Waters GmbH, Eschborn)
- Massenspektrometrischer Detektor (z. B. Waters Xevo-TQS, Waters GmbH, Eschborn) mit MassLynx™ Massenspektrometrie-Software
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Laborschüttler (z. B. Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Vakuumkonzentrator mit Kühlfalle (z. B. Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz)
- Zentrifuge (z. B. ROTINA 380R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Heizblock (z. B. Barkey GmbH & Co. KG, Leopoldshöhe)
- 1000-ml-Glasflaschen mit Dispenser (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 100-ml-Kunststoffflasche (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 100-ml-Braunglasflaschen (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Verschiedene Messkolben (z. B. witeg Labortechnik GmbH, Wertheim)
- Glaszentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss (z. B. DURAN Group GmbH, Mainz)
- Verschiedene Pipetten mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Transferpipetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 1,8-ml-Probengläschen mit Schraubverschluss (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Mikroeingänge für Probengläschen (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Wasseraufbereitungsanlage (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- 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.

- Aceton für HPLC (z. B. Nr. 10417440, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Dichlormethan für die Flüssigkeitschromatographie, LiChrosolv® (z. B. Supelco®, Nr. 1.06044, Merck KGaA, Darmstadt)
- Essigsäure, puriss. (z. B. Nr. 33209-M, Merck KGaA, Darmstadt)
- β -Glucuronidase/Arylsulfatase, 4,5 U/ml (z. B. SKU 10127698001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Methanol für die Flüssigkeitschromatographie, LiChrosolv® (z. B. Supelco®, Nr. 1.06007, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxid, Plättchen, EMSURE® (z. B. Supelco®, Nr. 1.06469, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- BPA, $\geq 99\%$ (z. B. Supelco®, Nr. 239658, Merck KGaA, Darmstadt)
- d_8 -BPA (Ring- d_8), 98% (z. B. Nr. D75807, Medical Isotopes, Inc., Pelham NH, USA)
- BPF, $\geq 98,0\%$ (z. B. Supelco®, Nr. 51453, Merck KGaA, Darmstadt)
- d_{10} -BPF, 98,0% (z. B. Nr. B519557, Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- BPS, $\geq 98,0\%$ (z. B. Supelco®, Nr. 43034, Merck KGaA, Darmstadt)
- d_8 -BPS, 98,0% (z. B. Nr. B447392, Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)

4.3 Lösungen

- Natronlauge (etwa 5 mol/l)
In einem Becherglas werden 100 ml hochreines Wasser vorgelegt und unter Eiskühlung 20 g Natriumhydroxid darin gelöst. Die Natronlauge wird in eine 100-ml-Braunglasflasche überführt.
- Natriumacetat-Puffer (60 mmol/l, pH-Wert = 5,0)
In ein 1000-ml-Becherglas werden ca. 800 ml hochreines Wasser vorgelegt und 3,42 ml Eisessig zupipettiert. Die Lösung wird anschließend durch Zusatz von Natronlauge auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt, in einen 1000-ml-Messkolben überführt und auf einen Liter aufgefüllt.
- 15% Methanol (V:V)
In einen 10-ml-Messkolben werden 1,5 ml Methanol pipettiert. Der Messkolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

- d_8 -BPA-Stammlösung (1000 mg/l)
In einen 10-ml-Messkolben werden 10 mg d_8 -BPA eingewogen und in Methanol gelöst. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.
- d_{10} -BPF-Stammlösung (100 mg/l)
Für die d_{10} -BPF-Stammlösung wird 1 mg des Standards in Methanol gelöst und in einen 10-ml-Messkolben überführt. Anschließend wird der Messkolben mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- d_8 -BPS-Stammlösung (100 mg/l)
Für die d_8 -BPS-Stammlösung wird 1 mg des Standards in Methanol gelöst und in einen 10-ml-Messkolben überführt. Anschließend wird der Messkolben mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

- ISTD-Arbeitslösung (d_8 -BPA: 5 mg/l, d_{10} -BPF: 5 mg/l, d_8 -BPS: 1 mg/l)
In einen 10-ml-Messkolben werden 50 μ l der d_8 -BPA-Stammlösung, 500 μ l der d_{10} -BPF-Stammlösung und 100 μ l der d_8 -BPS-Stammlösung pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (d_8 -BPA: 0,5 mg/l, d_{10} -BPF: 0,5 mg/l, d_8 -BPS: 0,1 mg/l)
1000 μ l der ISTD-Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die ISTD-Stammlösungen können bei -18°C für ein Jahr gelagert werden. Die ISTD-Arbeitslösung kann bei 4°C für drei Monate gelagert werden. Die ISTD-Dotierlösung sollte frisch hergestellt werden.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (BPA-, BPF- und BPS-Einzelsubstanzstandards; 1000 mg/l)
Die Stammlösungen für BPA, BPF sowie BPS werden als Einzelsubstanzstandards angesetzt. Dazu werden jeweils 10 mg BPA, BPF und BPS in separate 10-ml-Messkolben eingewogen und in 5 ml Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Arbeitslösung (BPA-, BPF- und BPS-Multianalytstandard; 10 mg/l)
Von jeder Stammlösung werden 100 μ l in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (1,0 mg/l)
1 ml der Arbeitslösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung II (0,1 mg/l)
100 μ l der Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung III (0,01 mg/l)
10 μ l der Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stammlösungen können bei -18°C für ein Jahr gelagert werden. Die Arbeitslösung kann bei 4°C für drei Monate gelagert werden. Die Dotierlösungen sollten frisch hergestellt werden.

Da sich die Steigungen der Kalibriergeraden in Urin nicht von denen in Wasser unterscheiden (siehe [Abschnitt 8](#)), werden die Kalibrierstandards in hochreinem Wasser angesetzt. Die Kalibrierstandards werden durch Dotieren von Wasser mit den Dotierlösungen gemäß dem in [Tabelle 3](#) angegebenen Pipettierschema hergestellt. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards erfolgt analog zu den Urinproben gemäß [Abschnitt 5.2](#). Der Konzentrationsbereich der Kalibrierstandards kann bei Bedarf für BPA und BPF bis 100 $\mu\text{g/l}$ sowie für BPS bis 50 $\mu\text{g/l}$ erweitert werden.

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [μ l]	Dotierlösung II [μ l]	Dotierlösung III [μ l]	Wasser [μ l]	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]
0	–	–	–	500	0,0
1	–	–	5	495	0,1
2	–	–	10	490	0,2
3	–	–	25	475	0,5
4	–	–	50	450	1,0
5	–	10	–	490	2,0

Tab. 3 (Fortsetzung)

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Dotierlösung III [µl]	Wasser [µl]	Konzentration [µg/l]
6	–	25	–	475	5,0
7	–	50	–	450	10,0
8	10	–	–	490	20,0

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in Urinbechern gesammelt und anschließend bis zur Probenaufbereitung bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung (> 3 Tage) sollten die Urinproben bei –18 °C eingefroren werden.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend gut gemischt. 500 µl der Probe werden in ein Glaszentrifugenröhrchen pipettiert und mit 100 µl ISTD-Dotierlösung sowie 1 ml Natriumacetatpuffer versetzt. Nach Zugabe von 10 µl Glucuronidase/Arylsulfatase wird der Ansatz bei 37 °C für drei Stunden im Heizblock inkubiert. Im Anschluss daran werden die Proben mit 2,5 ml hochreinem Wasser verdünnt. Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion werden 750 µl Aceton und 750 µl Dichlormethan mit einer Spritze, oder alternativ mit einer Pipette, zugegeben. Anschließend wird für 10 Sekunden kräftig geschüttelt (Emulsionsbildung). Nach 10 Minuten wird der Ansatz für 20 Minuten bei 4000 rpm (2600 × g) zentrifugiert. 500 µl der organischen Phase werden in ein 1,8-ml-Probengläschen überführt und im Vakuumkonzentrator (1000 rpm, 40 °C, 20 min) zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 100 µl 15%igem Methanol aufgenommen und in ein 1,8-ml-Probengläschen mit Mikroeingang überführt, das anschließend verschlossen wird.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer UPLC-Anlage mit Tandem-Massenspektrometer (UPLC-MS/MS).

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Agilent Zorbax SB-C8 RRHD (1,8 µm; 2,1 × 150 mm)
Trennprinzip:	Reversed Phase
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	40 °C
Flussrate:	0,2 ml/min
Laufmittel:	A: Wasser B: Methanol
Laufzeit:	20 min
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 4

Tab. 4 Gradientenprogramm für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0,0	85	15
15,0	10	90
18,0	10	90
18,1	85	15
20,0	85	15

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Elektrospray, negativ (ESI-)
Detektionsmodus:	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Capillary:	2,90 kV
Cone:	-76 V
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	500 °C
Cone-Gasfluss:	150 l/h
Desolvations-Gasfluss:	1000 l/h
Kollisionsgas:	Argon
Kollisionsgasfluss:	0,15 ml/h
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 5

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte UPLC-MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter sind für das hier verwendete System (Waters Acquity UPLC, Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer, jeweils von Waters GmbH, Eschborn) bestimmt und optimiert worden.

Für die Analyten wurden jeweils zwei Fragment-Ionen-Übergänge ausgewählt, wobei ein Übergang zur Quantifizierung (Quantifier) und der andere zur Bestätigung (Qualifier) herangezogen wurde. Für die ISTDs wurde jeweils nur ein Massenübergang verwendet. Die ausgewählten Fragment-Ionen-Übergänge sind mit den Retentionszeiten in [Tabelle 5](#) dargestellt.

Tab. 5 Retentionszeiten, Massenübergänge und MRM-Parameter für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [m/z]	Status	Cone [V]	Kollisionsenergie [V]	Dwell time [s]
BPA	12,25	226,92 → 133,03	Quantifier	2	26	0,025
	12,25	226,92 → 211,99	Qualifier	2	18	0,025
BPA-d ₈	12,19	234,99 → 220,05	ISTD	50	22	0,025
BPF	10,73	198,89 → 104,97	Quantifier	62	22	0,025
	10,73	198,89 → 76,95	Qualifier	62	20	0,025
BPF-d ₁₀	10,62	208,83 → 110,03	ISTD	28	20	0,025

Tab. 5 (Fortsetzung)

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [m/z]	Status	Cone [V]	Kollisionsenergie [V]	Dwell time [s]
BPS	8,67	248,92 → 91,96	Quantifier	50	34	0,025
	8,67	248,92 → 107,95	Qualifier	50	26	0,025
BPS-d ₈	8,61	256,86 → 111,98	ISTD	2	28	0,025

7 Analytische Bestimmung

Es werden 10 µl der aufgearbeiteten Urinprobe (siehe [Abschnitt 5.2](#)) in das UPLC-MS/MS-System injiziert. Die analytische Trennung erfolgt mittels Reversed-Phase-Chromatographie. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der Retentionszeiten und der spezifischen Massenübergänge. Die in [Tabelle 5](#) für die Analyten und ISTDs angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der von ihm verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen.

Exemplarische Chromatogramme für die einzelnen Analyten sind in [Abbildung 3](#) dargestellt.

8 Kalibrierung

Die Kalibrierlösungen werden wie in [Abschnitt 4.5](#) beschrieben hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet und analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem die Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des entsprechenden ISTD gegen die jeweils dotierten Analytkonzentrationen aufgetragen werden. Am verwendeten Analysengerät wurde ein linearer Messbereich von der Bestimmungsgrenze bis 50 µg/l (BPS) bzw. 100 µg/l (BPA und BPF) erreicht.

Im Rahmen der Methodenentwicklung hat sich gezeigt, dass sich die Steigungen der Kalibriergeraden in Urin nicht von denen in Wasser unterscheiden ([Abbildung 4](#)). Daher können die Kalibrierstandards in Wasser angesetzt werden, was auch den Vorteil hat, dass die in Urin vorliegenden Hintergrundgehalte nicht berücksichtigt werden müssen. Sollten Reagenzienleerwerte auftreten, so müssen diese durch Subtraktion berücksichtigt werden.

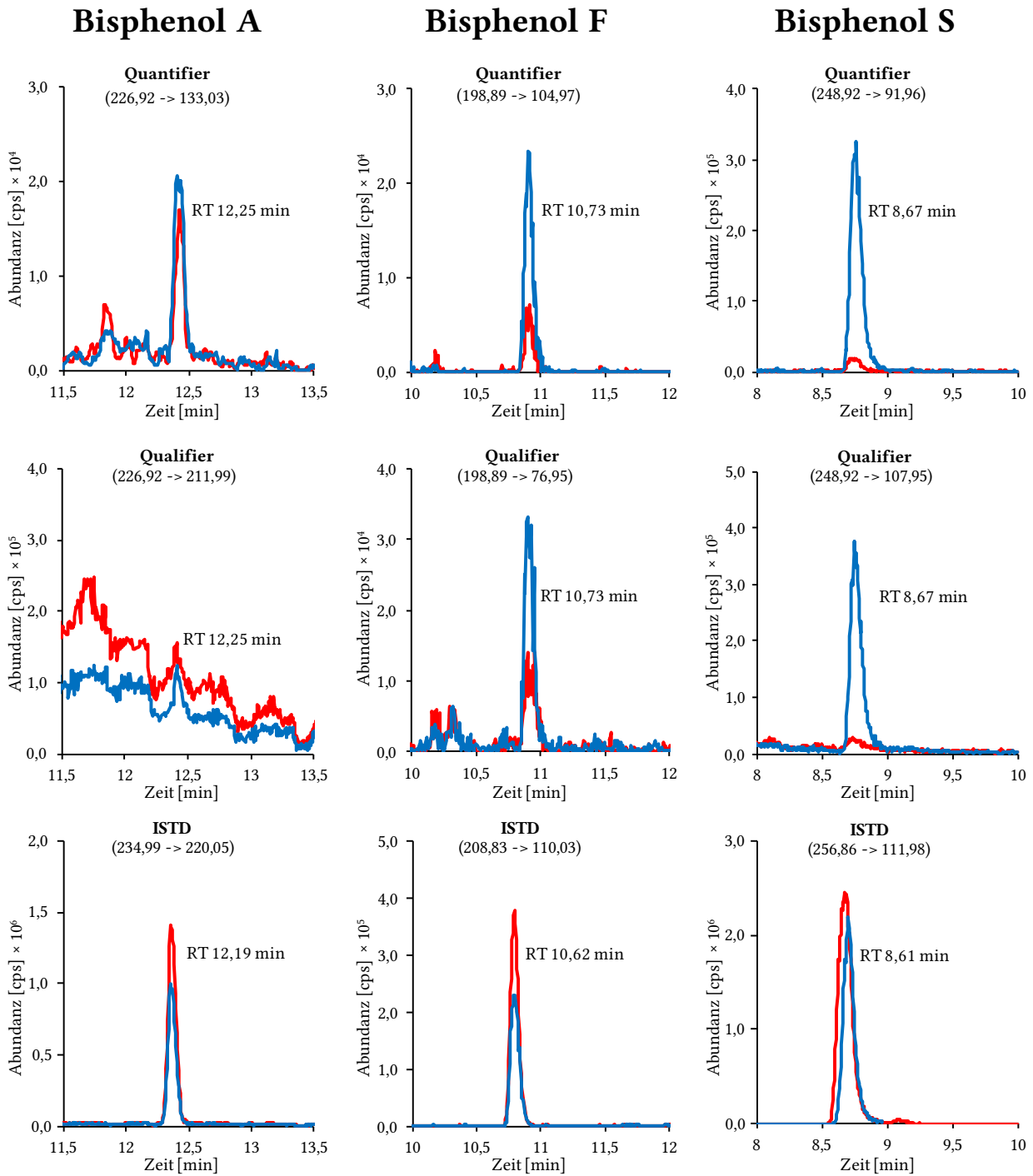


Abb. 3 Chromatogramme einer undotierten humanen Urinprobe (rote Linie; BPA: 0,87 µg/l, BPF: 0,31 µg/l, BPS: 0,07 µg/l) sowie einer dotierten humanen Urinprobe (blaue Linie; BPA: 2 µg/l, BPF: 2 µg/l, BPS: 2 µg/l)

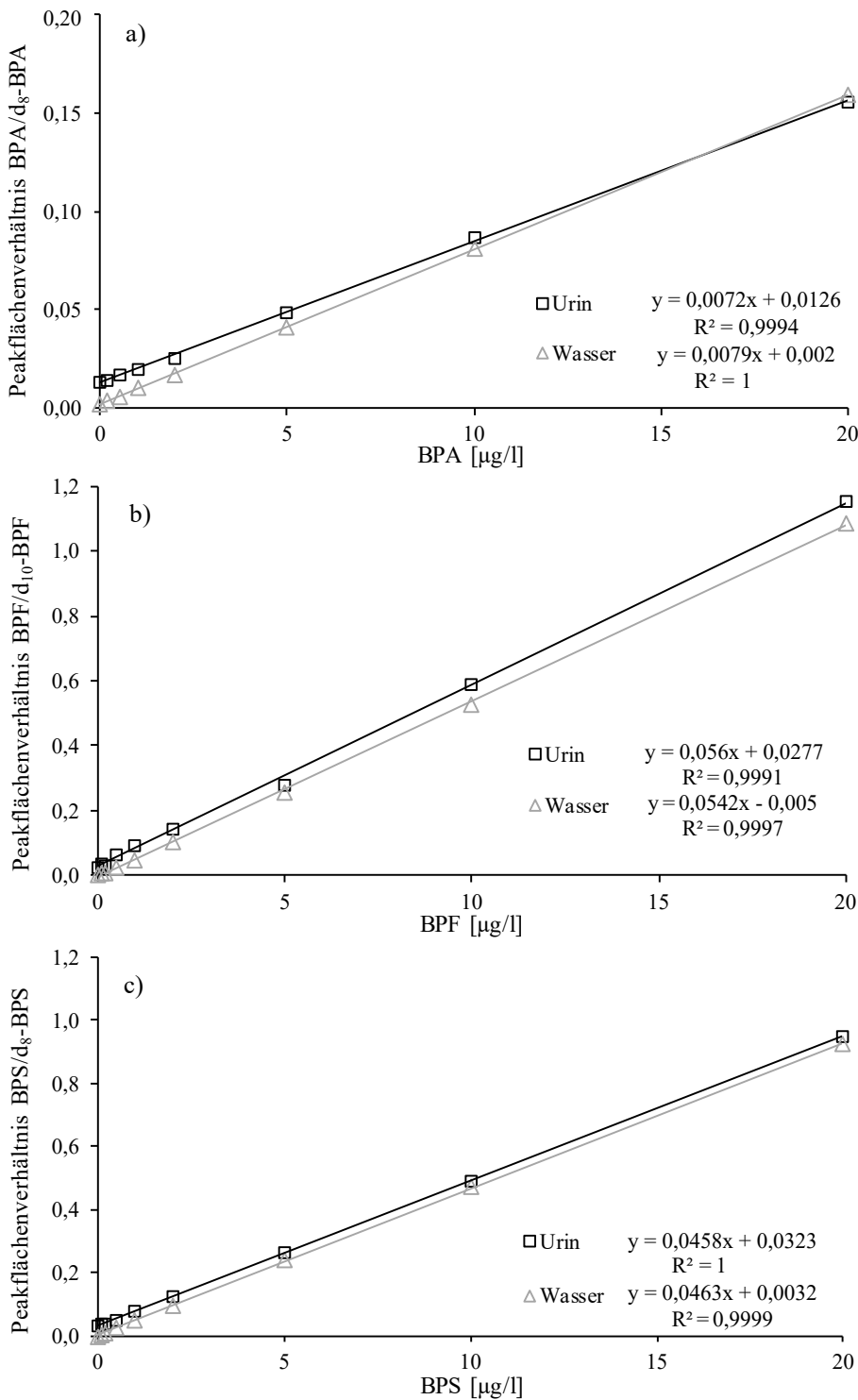


Abb. 4 Kalibriergeraden in Wasser und in Urin für die Bestimmung von a) BPA, b) BPF und c) BPS

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Der Analytgehalt einer Probe in $\mu\text{g/l}$ wird durch Einsetzen des Peakflächenverhältnisses des Analyten und seines jeweiligen ISTDs in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion berechnet. 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 Qualitätssicherung der Analysenergebnisse werden pro Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen aufgearbeitet und analysiert.

Für BPF und BPS stehen derzeit keine käuflichen Referenzmaterialien zur Verfügung, daher muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Hierzu werden Poolurinproben mit drei unterschiedlichen Analytkonzentrationen dotiert und das dotierte Material anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -18 °C tiefgefroren. Gleichzeitig wird mit jeder Analysenserie mindestens ein Reagenzienleerwert analysiert (Aufarbeitung von hochreinem Wasser anstelle von Urin), damit eventuelle Störungen aus den Reagenzien erkannt werden können.

Zur externen Qualitätssicherung besteht die Möglichkeit, am Ringversuchsprogramm für arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologische Analysen G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme, <https://app.g-equas.de/web/>) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM) teilzunehmen (siehe Abschnitt 11.2).

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.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden Kontrollurine herangezogen, die mit den Analyten in vier unterschiedlichen Konzentrationen dotiert waren. Jeweils zehn Aliquote dieser Urine wurden an einem Tag parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse zur Präzision in der Serie sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Gemessene Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
BPA	0,4	0,78	9,8	22,2
	2,0	2,22	4,5	10,2
	10,0	9,34	10,8	24,4
	40,0	38,2	7,9	17,9

Tab. 6 (Fortsetzung)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
BPF	0,4	0,29	13,4	30,3
	2,0	2,01	7,7	17,4
	10,0	9,59	5,5	12,4
	40,0	38,8	4,8	10,9
BPS	0,4	0,40	2,9	6,6
	2,0	1,90	3,3	7,5
	10,0	9,35	3,2	7,2
	40,0	39,0	6,2	14,0

Präzision von Tag zu Tag

Für die Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden dieselben Kontrollurine wie für die Bestimmung der Präzision in der Serie verwendet. Aliquote dieser Urine wurden an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die bestimmten Präzisionsdaten finden sich in [Tabelle 7](#).

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
BPA	0,4	0,70	15,5	39,9
	2,0	2,04	8,4	21,6
	10,0	8,29	9,2	23,7
	40,0	36,8	12,5	32,1
BPF	0,4	0,31	12,9	33,2
	2,0	1,97	7,3	18,8
	10,0	9,15	6,8	17,5
	40,0	40,4	10,7	27,5
BPS	0,4	0,40	7,4	19,0
	2,0	1,93	2,8	7,2
	10,0	8,74	4,9	12,6
	40,0	36,8	8,2	21,1

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Messverfahrens wurde durch Analyse von dotiertem Poolurin (2,0 µg/l, 10,0 µg/l und 40,0 µg/l) unter Berücksichtigung der Hintergrundgehalte ermittelt. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungen sind in [Tabelle 8](#) aufgeführt.

Tab. 8 Richtigkeit für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Rel. Wiederfindung r [%]
BPA	2,0	85,2
	10,0	88,2
	40,0	94,1
BPF	2,0	101
	10,0	95,9
	40,0	97,1
BPS	2,0	91,7
	10,0	92,7
	40,0	97,2

Die Richtigkeit der Methode konnte vom Entwickler der Methode zusätzlich durch die erfolgreiche Teilnahme an externen Qualitätssicherungsprogrammen (Ringversuche im Rahmen des europäischen Humanbiomonitoring-Projektes „HBM4EU“ und des German External Quality Assessment Scheme der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (G-EQUAS)) belegt werden (Jäger 2020). In [Tabelle 9](#) sind beispielhaft die Ringversuchsergebnisse aus dem Jahr 2019 aufgeführt, die mit dem hier dargestellten Verfahren erzielt wurden.

Tab. 9 Ringversuchsergebnisse für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin

Ringversuch	Parameter	Ergebnis [µg/l]	Sollwert [µg/l]	Abweichung vom Sollwert [%]
HBM4EU – Runde 2	BPA	1,93	1,89	2
		6,85	7,0	-2
	BPF	0,46	0,38	21
		3,66	3,40	8
	BPS	1,13	0,95	12
		6,07	5,47	11
HBM4EU – Runde 3	BPA	0,94	1,10	-15
		6,98	8,40	-17
	BPF	0,18	0,23	-22
		3,76	3,35	12
	BPS	3,12	3,56	-13
		8,51	9,00	-5
63. G-EQUAS	BPA	2,79	3,44	-19
		12,9	14,1	-8
64. G-EQUAS	BPA	1,18	0,89	32
		22,2	22,3	-1

Zur Überprüfung der Richtigkeit in Individualurinen wurden Urinproben von zehn Personen (Kreatiningehalte im Bereich von 0,4–2,1 g/l) jeweils in einer Konzentration von 2,0 µg/l bzw. 20 µg/l mit BPA, BPF und BPS dotiert und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die berechnete mittlere relative Wiederfindung für die Analyten ist in [Tabelle 10](#) dargestellt.

Tab. 10 Relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Individualurinen (n = 10)

Analyt	Konzentration [µg/l]	Rel. Wiederfindung r [%]	
		MW ± SD	Bereich
BPA	2,0	101 ± 7	87–115
	20,0	98 ± 5	91–104
BPF	2,0	102 ± 15	79–126
	20,0	104 ± 12	82–118
BPS	2,0	98 ± 5	91–110
	20,0	102 ± 5	97–115

11.3 Matrixeffekte

Die bei der Messung auftretenden Matrixeffekte wurden unter Verwendung von sechs Individualurinen untersucht. Die Urinproben wurden aufgearbeitet und erst vor der eigentlichen LC-MS/MS-Analyse mit den ISTDs und mit den Analyten in einer niedrigen sowie einer hohen Konzentration (2 µg/l bzw. 10 µg/l) dotiert. Die Beurteilung der Matrixeffekte erfolgte durch Vergleich der jeweiligen Peakflächen mit den Signalen der gleichen Analytmengen in reinem Lösungsmittel. Aus den Ergebnissen wurde mit Hilfe der [Formeln 1](#) und [2](#) der Matrixfaktor (MF) und der ISTD-korrigierte Matrixfaktor (MF_{korrr.}) berechnet. Der Variationskoeffizient für den ISTD-korrigierten Matrixfaktor liegt für die drei Analyten bei beiden Konzentrationen unterhalb von 15 % (siehe [Tabelle 11](#)).

Formel 1:

$$MF = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Urin}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

Formel 2:

$$MF_{\text{korrr.}} = \frac{MF_{\text{Analyt}}}{MF_{\text{ISTD}}}$$

Tab. 11 ISTD-korrigierte Matrixfaktoren für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	ISTD-korrigierte Matrixfaktoren		
		MW ± SD	Bereich	Variationskoeffizient [%]
BPA	2,0	1,12 ± 0,08	0,99–1,22	6,9
	10,0	0,98 ± 0,05	0,91–1,04	5,2
BPF	2,0	0,92 ± 0,12	0,80–1,10	12,6
	10,0	0,93 ± 0,07	0,80–0,98	7,8
BPS	2,0	1,01 ± 0,09	0,97–1,19	8,5
	10,0	1,05 ± 0,07	0,96–1,18	7,0

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach dem DIN-Verfahren 32645 (DIN 2008). Hierzu wurden jeweils äquidistante 10-Punkt-Kalibrierungen (Konzentrationsbereich von 0,05–0,5 µg/l in wässriger Lösung) erstellt und zusammen mit einem Leerwert aufgearbeitet und analysiert (siehe [Abbildung 5](#)).

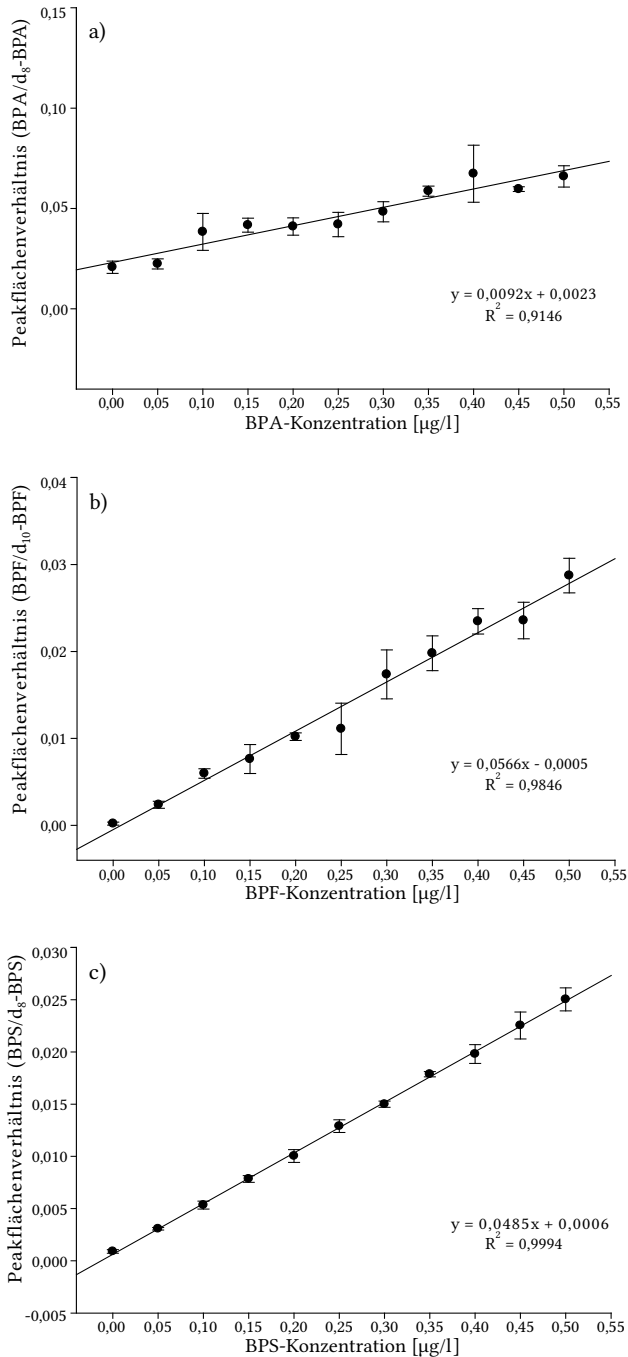


Abb. 5 10-Punkt-Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 0,05 µg/l bis 0,5 µg/l zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von a) BPA, b) BPF und c) BPS

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 aus der Standardabweichung der erhaltenen Kalibrierfunktion am Leerwert errechnet. [Tabelle 12](#) zeigt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin.

Tab. 12 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
BPA	0,08	0,25
BPF	0,03	0,10
BPS	0,02	0,05

11.5 Verschleppungseffekte

Verschleppungseffekte im chromatographischen System wurden durch Mehrfachinjektion hochkonzentrierter Probenextrakte (mit 100 µg Analyt/l dotierte Urinprobe) und anschließende Injektion von Leerwertproben untersucht. Der Reagenzienleerwert wurde, nach jeweils fünf Injektionen der hochkonzentrierten Probe, zweimal eingespritzt und analysiert. Es wurden keine Störpeaks zur Retentionszeit der Analyten und auch keine Analytpeaks bzw. größeren ISTD-Peaks im Chromatogramm des Reagenzienleerwerts beobachtet.

11.6 Störeinflüsse

Die Erfahrungen der Methodenentwickler mit dem hier beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von BPA, BPF und BPS in Urin zeigen bislang kein ausgeprägtes Kontaminationsrisiko. Zwar kann auch in undotierten wässrigen Proben ein Leerwert nachgewiesen werden, die Konzentrationen sind jedoch gering und liegen im Bereich der Nachweisgrenze. Um Kontaminationen durch Verunreinigungen von Chemikalien und Geräten zu erkennen, sollte mit jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert mitgeführt werden.

Generell kommt der Vermeidung bzw. Minimierung von Leerwerten eine große Bedeutung zu. Das zeigt sich daran, dass die Prüfer der Methode die für BPA angegebene Bestimmungsgrenze nicht erreichen konnten. Zudem traten bei den Messreihen zur Erhebung der Präzisionsdaten sporadisch deutlich zu hohe Werte auf, die als Ausreißer gewertet wurden. Diese bei der Methodenprüfung aufgetretenen Probleme machen deutlich, dass vor allem die sensitive und präzise Bestimmung von niedrigen Bisphenolgehalten im Urin, wie sie in der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung vorkommen, analytisch herausfordernd ist.

Im Rahmen der Methodenentwicklung und -validierung sind zum Teil gravierende Matrixeffekte insbesondere für den Parameter BPF beobachtet worden. Dabei handelte es sich sowohl um Ionensuppressionen als auch um Enhancementeffekte. Der Einsatz eines deuterierten internen Standards (d_{10} -BPF) sowie die Optimierung der Elutionsbedingungen (Senkung des Anteils an organischem Lösemittel bei der Injektion sowie Verlängerung der Chromatographielaufzeit) haben zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt. Trotzdem haben sich starke Enhancementeffekte in einzelnen Urinproben gezeigt. Deshalb ist bei unplausibel hohen BPF-Gehalten eine Wiederholung der Analyse zu empfehlen und die Quantifizierung mittels Standardaddition durchzuführen.

12 Diskussion der Methode

Die vorliegende Methode erlaubt die sensitive und spezifische Quantifizierung von BPA, BPF und BPS in humanem Urin. Die Verwendung isotope markierter ISTDs erhöht die Präzision, indem sie aufarbeitungsbedingte Unterschiede zwischen einzelnen Proben kompensiert. Aufgrund der niedrigen Bestimmungsgrenzen von 0,25 µg/l (BPA), 0,10 µg/l (BPF) und 0,05 µg/l (BPS) ist das analytische Verfahren auch geeignet, die Hintergrundbelastung der beruflich nicht exponierten Allgemeinbevölkerung zu erfassen.

Verwendete Messgeräte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (Waters UPLC I-Class, Waters GmbH, Eschborn); Massenspektrometrischer Detektor (Waters Xevo-TQS, Waters GmbH, Eschborn)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Asimakopoulos AG, Xue J, De Carvalho BP, Iyer A, Abualnaja KO, Yaghmoor SS, Kumosani TA, Kannan K (2016) Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ Res* 150: 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.029>
- 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. Band 2: Analysen in biologischem Material*. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bader M, Jäger T, Drexler H, Hartwig A, MAK Commission (2020) Bisphenol S – Ableitung eines BAR. Beurteilungswerte in biologischem Material. *MAK Collect Occup Health Saf* 5(2): Doc036. https://doi.org/10.34865/bb8009d5_2or
- Björnsdotter MK, de Boer J, Ballesteros-Gómez A (2017) Bisphenol A and replacements in thermal paper: a review. *Chemosphere* 182: 691–706. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.070>
- Bousoumah R, Leso V, Iavicoli I, Huuskonen P, Viegas S, Porras SP, Santonen T, Frery N, Robert A, Ndaw S (2021) Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: a systematic review. *Sci Total Environ* 783: 146905. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146905>
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, Barr DB, Sathyanarayana S, Lanphear BP (2011) Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect* 119(1): 131–137. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002366>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Ärztebl* 111(38): A1583–A1618
- Cabaton N, Chagnon M-C, Lhuguenot J-C, Cravedi J-P, Zalko D (2006) Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and non-pregnant rats. *J Agric Food Chem* 54(26): 10307–10314. <https://doi.org/10.1021/jf062250q>
- Cabaton N, Zalko D, Rathahao E, Canlet C, Delous G, Chagnon M-C, Cravedi J-P, Perdu E (2008) Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol In Vitro* 22(7): 1697–1704. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.07.004>
- Carli F, Tait S, Busani L, Ciociaro D, Della Latta V, Pala AP, Deodati A, Raffaelli A, Pratesi F, Conte R, Maranghi F, Tassinari R, Fabbrizi E, Toffol G, Cianfarani S, La Rocca C, Gastaldelli A, LIFE PERSUADED Project Group (2022) Exposure to endocrine disruptors (di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA)) in women from different residing areas in Italy: data from the LIFE PERSUADED Project. *Int J Mol Sci* 23(24): 16012. <https://doi.org/10.3390/ijms232416012>
- CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) (2022 a) Urinary bisphenol A (2011–2016). National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA: CDC. https://www.cdc.gov/exposurereport/report/pdf/cgroup31_URXBPH_2011-p.pdf, abgerufen am 21 Feb 2023
- CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) (2022 b) Urinary bisphenol F (2013–2016). National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA: CDC. https://www.cdc.gov/exposurereport/report/pdf/cgroup31_URXBPF_2011-p.pdf, abgerufen am 21 Feb 2023
- CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) (2022 c) Urinary bisphenol S (2013–2016). National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA: CDC. https://www.cdc.gov/exposurereport/report/pdf/cgroup31_URXBPS_2011-p.pdf, abgerufen am 21 Feb 2023
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Hrsg (2022) MAK- und BAT-Werte-Liste 2022. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 58. Düsseldorf: German Medical Science. https://doi.org/10.34865/mbwl_2022_deu

- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007) Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A). EFSA J 5(1): 428. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.428>
- Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L (2016) Bisphenol A and its analogs: do their metabolites have endocrine activity? Environ Toxicol Pharmacol 47: 182–199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014>
- Gramec Skledar D, Troberg J, Lavdas J, Peterlin Mašič L, Finel M (2015) Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. Xenobiotica 45(6): 511–519. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.999140>
- Gramec Skledar D, Schmidt J, Fic A, Klopčič I, Trontelj J, Dolenc MS, Finel M, Mašič LP (2016) Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. Chemosphere 157: 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.027>
- Greim H, Hrsg (1996) Bisphenol A (4,4'-Isopropylidendiphenol). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 23. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb8005d0023>
- Greim H, Hrsg (2000) Bisphenol A. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 30. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb8005d0030>
- Grignard E, Lapenna S, Bremer S (2012) Weak estrogenic transcriptional activities of bisphenol A and bisphenol S. Toxicol In Vitro 26(5): 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.013>
- Hartwig A, Hrsg (2011) Bisphenol A. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 50. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb8005d0050>
- Heinälä M, Ylinen K, Tuomi T, Santonen T, Porras SP (2017) Assessment of occupational exposure to bisphenol A in five different production companies in Finland. Ann Work Expo Health 61(1): 44–55. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxx006>
- Ho S-M, Rao R, To S, Schoch E, Tarapore P (2017) Bisphenol A and its analogues disrupt centrosome cycle and microtubule dynamics in prostate cancer. Endocr Relat Cancer 24(2): 83–96. <https://doi.org/10.1530/erc-16-0175>
- Jäger T (2020) Ergebnisse für Bisphenole aus externen Qualitätssicherungsprogrammen. E-Mail, 27 Apr 2020
- Le Fol V, Ait-Aïssa S, Cabaton N, Dolo L, Grimaldi M, Balaguer P, Perdu E, Debrauwer L, Brion F, Zalko D (2015) Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. Environ Sci Technol 49(6): 3860–3868. <https://doi.org/10.1021/es505302c>
- Lee YJ, Lim Y-H, Shin CH, Kim B-N, Kim JI, Hong Y-C, Cho YM, Lee YA (2022) Relationship between bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F and serum uric acid concentrations among school-aged children. PLoS One 17(6): e0268503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268503>
- Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon H-B, Nakata H, Kannan K (2012) Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. Environ Sci Technol 46(12): 6860–6866. <https://doi.org/10.1021/es301334j>
- Liu B, Lehmler H-J, Sun Y, Xu G, Sun Q, Snetselaar LG, Wallace RB, Bao W (2019) Association of bisphenol A and its substitutes, bisphenol F and bisphenol S, with obesity in United States children and adolescents. Diabetes Metab J 43(1): 59–75. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0045>
- Nasterlack M, Csanády G (2007) Bisphenol A. In: Drexler H, Greim H, Hrsg. Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und Biologische Leitwerte (BLW). 14. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bb8005d0014>
- Ndaw S, Remy A, Jargot D, Robert A (2016) Occupational exposure of cashiers to bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study. Int Arch Occup Environ Health 89(6): 935–946. <https://doi.org/10.1007/s00420-016-1132-8>
- Oh J, Choi JW, Ahn Y-A, Kim S (2018) Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. Environ Int 112: 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.020>
- Reger D, Pavlovic M, Pietschmann-Keck M, Klinger R (2017) Bisphenol F in Senf: Aktueller Wissensstand und Nachweis mittels LC-MS/MS. J Verbrauch Lebensm 12(2): 131–137. <https://doi.org/10.1007/s00003-017-1091-3>
- Thayer KA, Taylor KW, Garantzios S, Schurman SH, Kissling GE, Hunt D, Herbert B, Church R, Jankowich R, Churchwell MI, Scheri RC, Birnbaum LS, Bucher JR (2016) Bisphenol A, bisphenol S, and 4-hydroxyphenyl 4-isopropoxyphenylsulfone (BPSIP) in urine and blood of cashiers. Environ Health Perspect 124(4): 437–444. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409427>
- Tschersich C, Murawski A, Schwedler G, Rucic E, Moos RK, Kasper-Sonnenberg M, Koch HM, Brüning T, Kolossa-Gehring M (2021) Bisphenol A and six other environmental phenols in urine of children and adolescents in Germany – human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). Sci Total Environ 763: 144615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144615>
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. Chem Res Toxicol 15(10): 1281–1287. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>
- Waldman JM, Gavin Q, Anderson M, Hoover S, Alvaran J, Ip HSS, Fenster L, Wu NT, Krowech G, Plummer L, Israel L, Das R, She J (2016) Exposures to environmental phenols in Southern California firefighters and findings of elevated urinary benzophenone-3 levels. Environ Int 88: 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.11.014>

- Wang F, Hua J, Chen M, Xia Y, Zhang Q, Zhao R, Zhou W, Zhang Z, Wang B (2012) High urinary bisphenol A concentrations in workers and possible laboratory abnormalities. *Occup Environ Med* 69(9): 679–684. <https://doi.org/10.1136/oemed-2011-100529>
- Zhang Z, Alomirah H, Cho H-S, Li Y-F, Liao C, Minh TB, Mohd MA, Nakata H, Ren N, Kannan K (2011) Urinary bisphenol A concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries. *Environ Sci Technol* 45(16): 7044–7050. <https://doi.org/10.1021/es200976k>
- Zoller O, Brüscheiler BJ, Magnin R, Reinhard H, Rhyn P, Rupp H, Zeltner S, Felleisen R (2016) Natural occurrence of bisphenol F in mustard. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33(1): 137–146. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1110623>