

4-*tert*-Octylphenol and *p*-nonylphenol – Determination of 4-*tert*-octylphenol and *p*-nonylphenol in urine by LC-MS/MS

[4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol – Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol in Urin mittels LC-MS/MS]

Biomonitoring Methods in German language

W. Gries¹, G. Leng², K. Küpper², K. Blümlein³, S. Gerling³, T. Göen^{4,*}, A. Hartwig^{5,*}, MAK Commission^{6,*}
DOI: 10.1002/3527600418.bi14066d0022

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 validated the presented biomonitoring method. The analytical method described hereinafter permits the selective detection of 4-*tert*-octylphenol as well as the sum of various branched *p*-nonylphenol isomers in urine. After adding the labelled internal standards (¹³C₆-4-*tert*-octylphenol and ¹³C₆-*p*-nonylphenol), the samples are enzymatically hydrolysed to release the analytes from the conjugated alkylphenols. After online SPE, the analytes are separated by liquid chromatography and analysed using tandem mass spectrometry. A quantitation limit of 2 µg/L each is obtained for the analytes. Calibration standards are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed.

Keywords

Alkylphenole; 4-*tert*-Octylphenol; *p*-Nonylphenol; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; LC-MS/MS; Tandemmassenspektrometrie; online-SPE

Author Information

- ¹ Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-ANT-UWA, R800, 12, 47829 Uerdingen
- ² Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-SER-GS-BLM-Institut für Biomonitoring, Gebäude L9, 51368 Leverkusen
- ³ Prüfer der Methode, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Nikolai-Fuchs-Str. 1, 30625 Hannover
- ⁴ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestr. 9–11, 91054 Erlangen
- ⁵ Vorsitzende 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
- ⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* Email: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol – Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol in Urin mittels LC-MS/MS

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	4- <i>tert</i> -Octylphenol und <i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt, technisch)
Analyt. Messprinzip:	Hochleistungsflüssigchromatographie mit tandemmassenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS)
Abgeschlossen im:	Oktober 2015

Übersicht über die mit dieser Methode erfassbaren Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
4- <i>tert</i> -Octylphenol (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol)	140-66-9	4- <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9
<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt, technisch)	84852-15-3 25154-52-3	<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt)	84852-15-3 25154-52-3

Zusammenfassung

Das hier beschriebene Analyseverfahren ermöglicht die selektive Erfassung des 4-*tert*-Octylphenols sowie der Summe verschiedener *p*-Nonylphenolisomere (verzweigt) im Urin. Nach Zugabe der markierten internen Standards ($^{13}\text{C}_6$ -4-*tert*-Octylphenol und $^{13}\text{C}_6$ -*p*-Nonylphenol) werden die Proben enzymatisch hydrolysiert, um die Analyten aus den konjugierten Alkylphenolen freizusetzen. Nach Aufreinigung durch online-SPE werden die Analyten flüssigchromatographisch aufgetrennt und mittels nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Für beide Parameter wird eine Bestimmungsgrenze von je 2 µg/L erreicht. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

1768 Biomonitoring Methods

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

4-*tert*-Octylphenol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,0 \%$, 4,4 % bzw. 2,5 %
	Streubereich	$u = 15,8 \%$, 10,0 % bzw. 5,6 %
bei einer dotierten Konzentration von 2 µg, 10 µg bzw. 50 µg 4- <i>tert</i> -Octylphenol pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,5 \%$, 5,5 % bzw. 3,2 %
	Streubereich	$u = 22,5 \%$, 11,8 % bzw. 6,9 %
bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 5 µg bzw. 25 µg 4- <i>tert</i> -Octylphenol pro Liter Urin und n = 15 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 104 \%$, 98 % bzw. 98 %
bei einer dotierten Konzentration von 2 µg, 10 µg bzw. 50 µg 4- <i>tert</i> -Octylphenol pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,6 µg 4- <i>tert</i> -Octylphenol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	2,0 µg 4- <i>tert</i> -Octylphenol pro Liter Urin	

p-Nonylphenol (verzweigt)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,4 \%$, 3,2 % bzw. 4,1 %
	Streubereich	$u = 10,0 \%$, 7,2 % bzw. 9,3 %
bei einer dotierten Konzentration von 2 µg, 10 µg bzw. 50 µg <i>p</i> -Nonylphenol pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,8 \%$, 5,2 % bzw. 3,8 %
	Streubereich	$u = 10,3 \%$, 11,2 % bzw. 8,2 %
bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 5 µg bzw. 25 µg <i>p</i> -Nonylphenol pro Liter Urin und n = 15 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 106 \%$, 101 % bzw. 99 %
bei einer dotierten Konzentration von 2 µg, 10 µg bzw. 50 µg <i>p</i> -Nonylphenol pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	1,0 µg <i>p</i> -Nonylphenol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	2,0 µg <i>p</i> -Nonylphenol pro Liter Urin	

Allgemeine Informationen zu den Arbeitsstoffen

Die mit dieser Analysenmethode erfassbaren Verbindungen 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol (verzweigt) gehören zur Gruppe der langkettigen Alkylphenole.

Technisches 4-*tert*-Octylphenol ist ein C8-Alkylphenol, das zu über 95 % aus 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol besteht (siehe Abbildung 1) und hauptsächlich zur Herstellung von Polymeren (Octylphenolformaldehydharzen) eingesetzt wird. Die Octylphenolformaldehydharze werden wiederum für das Gummimaterial in der Reifenherstellung verwendet. Daneben wird 4-*tert*-Octylphenol aber auch zur Herstellung einer Gruppe von Tensiden, den Octylphenoethoxylaten eingesetzt. Die aus 4-*tert*-Octylphenol hergestellten Harze und Ethoxylate werden dann z. B. in Farben, Klebstoffen und Reifen verwendet [OECD 1994; UBA 2018 b].

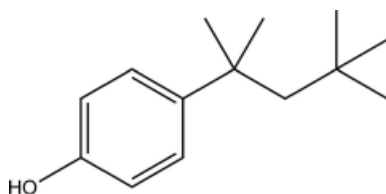


Abb. 1 Struktur des 4-*tert*-Octylphenols (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol).

Das C9-Alkylphenol *p*-Nonylphenol (verzweigt) liegt produktionsbedingt als komplexes Isomerengemisch vor. Abbildung 2 zeigt ein typisches GC-HRMS-Chromatogramm des in dieser Analysenmethode beschriebenen *p*-Nonylphenolstandards, das während der Methodenentwicklung generiert wurde.

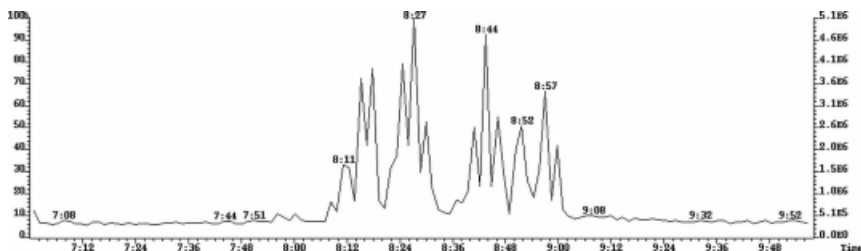
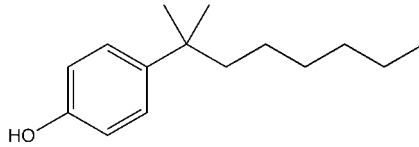


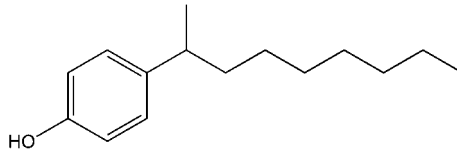
Abb. 2 GC-HRMS-Chromatogramm einer *p*-Nonylphenolstandardlösung.

Wheeler et al. [1997] konnten insgesamt 22 Isomere des *p*-Nonylphenols mittels hochauflösender GC-MS identifizieren. Demnach besteht das technische Gemisch aus zehn Isomeren des Typs α -Dimethyl (48,6 %), vier Isomeren des Typs α -Methyl, α -Ethyl (24,7 %), drei Isomeren des Typs α -Methyl, β -Methyl (8,9 %), zwei Isomeren des Typs α -Methyl (6,6 %) und drei Isomeren des Typs α -Methyl, α -Propyl (11,2 %). Einige isomere Strukturen sind beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt.

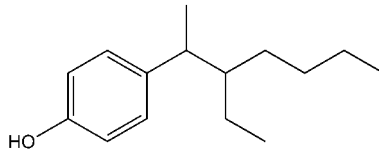
1770 Biomonitoring Methods



4-(1,1-Dimethylheptyl)phenol



4-(1-Methyloctyl)phenol



4-(1-Methyl-2-ethylhexyl)phenol

Abb. 3 Strukturbeispiele von *p*-Nonylphenolisomeren im technischen Standard.

p-Nonylphenol wird hauptsächlich als Ausgangsprodukt zur Herstellung von Nonylphenoethoxylaten eingesetzt und als Monomer für die Phenolharzherstellung [ECHA 2018 a; UBA 2018 a].

4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol zählen zu den endokrinen Disruptoren und stören nachweislich das Hormonsystem in Fischen. Der Einsatz von *p*-Nonylphenol in Anwendungen mit direktem Eintrag in die Umwelt ist daher seit 2003 in der europäischen Union stark eingeschränkt [Gabriel et al. 2008; UBA 2018 a]. 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol sind unter REACH aufgrund der beobachteten endokrinen Wirkung in Fischen in die Kandidatenliste der besonders besorgniserregenden Stoffe (SVHC, Substances of Very High Concern) aufgenommen worden [ECHA 2018 b; UBA 2018 a, b]. Details zur toxikologischen Bewertung von 4-*tert*-Octylphenol können den entsprechenden MAK-Dokumentationen der Kommission entnommen werden [Hartwig 2016; Hartwig 2017]. *p*-Nonylphenol wurde bislang nicht von der Kommission bewertet.

Die Alkylphenoethoxylate und ihre Abbauprodukte werden nach wie vor sowohl in der Umwelt in Gewässersedimenten [UBA 2018 a] als auch im Trinkwasser nachgewiesen [Wang und Schnute 2010]. Ein fortdauernder Eintrag dieser Substanzen in die Umwelt durch das Waschen importierter Textilien und indirekt über weitere Anwendungen wird angenommen [OECD 1994; UBA 2018 a].

In der Umwelt können beim Abbau der Octyl- und Nonylphenoethoxylate, insbesondere unter anaeroben Bedingungen, freie Alkylphenole intermediär entstehen. Beide Alkylphenole sind jedoch inhärent bioabbaubar [OECD 1994]. Zur oralen Bioverfügbarkeit des Octyl- bzw. Nonylphenols im Tierversuch finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben, die von 2–40 % reichen. Im Tierversuch liegt die Eliminations-Halbwertszeit im Blut im Bereich weniger Stunden [Hartwig 2016]. Beim Menschen können 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol im Urin der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen werden [Calafat et al. 2005, 2008; Inoue et al. 2003; Jing et al. 2011], was auf ein ubiquitäres Vorkommen beider Verbindungen in der Umwelt schließen lässt.

In-vitro-Studien und Tierversuche lassen darauf schließen, dass die Alkylphenole im Körper glucuronidiert und anschließend über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden [Nomura et al. 2008; Ye et al. 2007; Zalko et al. 2003]. Im Tierversuch an Ratten konnte gezeigt werden, dass nach oraler Gabe von Nonylphenol 20–50 % der Dosis innerhalb von sieben Tagen unverändert oder als Glucuronid über den Urin ausgeschieden wird [Müller und Certa 2013].

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	1772
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	1772
2.1	Geräte	1772
2.2	Chemikalien	1772
2.3	Lösungen	1773
2.4	Interner Standard (ISTD)	1773
2.5	Vergleichsstandards	1773
3	Probenahme und Probenaufbereitung	1775
3.1	Probenahme	1775
3.2	Probenaufbereitung	1775
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	1775
4.1	Hochleistungsflüssigchromatographie	1775
4.2	Tandem-Massenspektrometrie	1776
5	Analytische Bestimmung	1777
6	Kalibrierung	1777
7	Berechnung der Analyseergebnisse	1778
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung	1778
9	Beurteilung des Verfahrens	1778
9.1	Präzision	1778
9.2	Richtigkeit	1779
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	1780
9.4	Störeinflüsse	1781
10	Diskussion der Methode	1782
11	Literatur	1784
12.1	Alternative Analysenmethode	1786
12.2	Abbildungen	1787

1 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene Analyseverfahren ermöglicht die selektive Erfassung des 4-*tert*-Octylphenols sowie der Summe verschiedener *p*-Nonylphenolisomere (verzweigt) im Urin. Nach Zugabe der markierten internen Standards ($^{13}\text{C}_6$ -4-*tert*-Octylphenol und $^{13}\text{C}_6$ -*p*-Nonylphenol) werden die Proben enzymatisch hydrolysiert, um die Analyten aus den konjugierten Alkylphenolen freizusetzen. Nach Aufreinigung durch online-SPE werden die Analyten flüssigchromatographisch aufgetrennt und mittels nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Für beide Parameter wird eine Bestimmungsgrenze von je 2 µg/L erreicht. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden, wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- LC-MS/MS-System bestehend aus einem HPLC-System mit Gradientenpumpe, einer Vorrichtung zum Entgasen der Eluenten, einem Säulentermostat und einem automatischen Probengeber (z. B. Waters Alliance LC) sowie einem tandem-massenspektrometrischen Detektor (z. B. Waters Quattro Ultima Tandem MS)
- LC-Säule und Trap-Säule: Zorbax Eclipse XDB-C8 5 µm, 4,6 × 50 mm (z. B. Agilent, Nr. 946975-906)
- Anreicherungssäule: Oasis HLB 25 µm, 2,1 × 20 mm (z. B. Waters, Nr. 186002036)
- Laborschüttler (z. B. IKA Vibrax VXR)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius)
- Wärmeschrank (z. B. Binder)
- verschiedene Messkolben und Bechergläser (z. B. Schott)
- 12 mL-Schraubgläser mit teflonkaschierten Schraubverschlüssen (z. B. Schütt)
- verschiedene Pipetten und Multipetten® (z. B. Eppendorf)
- 2 mL-Rollrandgläschen mit Bördekkappen (z. B. Waters)
- pH-Meter (z. B. Mettler Toledo)
- Urinsammelgefäße aus Glas (z. B. Duran)

2.2 Chemikalien

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

- Acetonitril (z. B. Merck, Nr. 1.00017)
- hochreines Wasser (z. B. Milli-Q-Wasser)
- β-Glucuronidase (z. B. Roche, Nr. 03707598001)
- Essigsäure (Eisessig), 100 % (z. B. Merck, Nr. 1.00066)
- Natriumacetat, wasserfrei (z. B. Merck, Nr. 1.062464)

- 4-*tert*-Octylphenol technical grade, 98,06 % (z. B. SI-Group)
- $^{13}\text{C}_6$ -4-*tert*-Octylphenol (Ring- $^{13}\text{C}_6$), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Aceton, (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 33565)
- *p*-Nonylphenol technical grade, 90,10 % (z. B. SI-Group)
- $^{13}\text{C}_6$ -*p*-Nonylphenol (3,6,3-Nonylphenol Ring- $^{13}\text{C}_6$), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Aceton, (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 33574)

2.3 Lösungen

- 0,1 M Natriumacetatpuffer
Genau 4,1 g Natriumacetat werden in ein 400 mL-Becherglas eingewogen und in etwa 250 mL hochreinem Wasser gelöst. Nach erfolgter pH-Einstellung mit Eisessig auf pH 5 (pH-Meter) wird die Lösung quantitativ in einen 500 mL-Messkolben überführt und mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C mindestens einen Monat haltbar.

2.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Dotierlösung (1 mg/L)
Je 1 mL der Standardlösungen von $^{13}\text{C}_6$ -4-*tert*-Octylphenol und $^{13}\text{C}_6$ -*p*-Nonylphenol werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die ISTD-Dotierlösung ist bei Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

2.5 Vergleichsstandards

- Stammlösung I (1000 mg/L)
10 mg 4-*tert*-Octylphenol und 10 mg *p*-Nonylphenol (verzweigt) werden in je einen 10 mL-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die beiden Messkolben werden mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Stammlösung II (10 mg/L)
Je 100 μL der Stammlösungen I werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung I (1 mg/L)
1 mL der Stammlösung II wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und dieser mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

1774 Biomonitoring Methods

- Dotierlösung II (0,1 mg/L)
100 µL der Stammlösung II werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung III (0,01 mg/L)
100 µL der Dotierlösung I werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die Stamm- und Dotierlösungen sind bei Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

Die Vergleichsstandards werden in Poolurin von beruflich nicht mit Alkylphenolen belasteten Personen angesetzt. Zur Herstellung werden die Spontanurinproben in einem geeigneten Gefäß gesammelt, gut durchmischt und bis zur Herstellung der Standards und des Kontrollmaterials bei –20 °C gelagert.

Aus den Dotierlösungen werden durch Verdünnen mit Poolurin Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 100 µg 4-*tert*-Octylphenol bzw. *p*-Nonylphenol je Liter Urin nach dem in Tabelle 1 angegebenen Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird der verwendete Poolurin mitgeführt.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Vergleichsstandards für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenolen (verzweigt) in Urin.

Vergleichs- standard	Dotierlösung	Volumen der Dotierlösung	Volumen Pool- urin	Konzentration der Analyten
		[µL]	[µL]	[µg/L]
Leerwert	–	–	500	–
1	III	25	475	0,5
2	II	5	495	1,0
3	II	10	490	2,0
4	II	25	475	5,0
5	I	5	495	10
6	I	10	490	20
7	I	25	475	50
8	I	50	450	100

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Die Urinproben werden in einem geeigneten Urinsammelgefäß aus Glas gesammelt (siehe auch Abschnitt 9.4), aliquotiert und bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Es werden 0,5 mL der Urinprobe in ein 2 mL-Rollrandgläschen überführt und 10 μL der ISTD-Dotierlösung zugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 mL des Natriumacetatpuffers. Die Probe wird auf einem Schüttler gut durchmischt. Zur Hydrolyse wird die Probe mit 10 μL der β -Glucuronidase versetzt, gut durchmischt und das verschlossene Probengefäß über Nacht (16 h) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wird diese direkt zur Analyse in das LC-MS/MS-System injiziert.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem HPLC-System gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer.

4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Das für diese Methode eingesetzte HPLC-System besteht aus nur einer HPLC-Pumpe. Die online-Säulenschaltung wurde durch Kombination von zwei Sechs-Gänge-Ventilen und zwei T-Verbindungen realisiert (siehe Flusschema in den Abbildungen 4a und 4b). Es ist natürlich genauso möglich die online-SPE durch andere HPLC-Konfigurationen nachzustellen, z. B. durch die Verwendung von zwei HPLC-Pumpen. Die entsprechenden Parameter, wie Gradientensystem und Schaltzeiten müssen dann je nach dem verwendeten online-SPE-System angepasst und optimiert werden.

Trap-Säule:	Zorbax Eclipse XDB-C8 5 μm , 4,6 \times 50 mm (vor dem Injektionssystem installiert)
Anreicherungssäule:	Oasis HLB 25 μm , 2,1 \times 20 mm
Analytische Säule:	Zorbax Eclipse XDB-C8 5 μm , 4,6 \times 50 mm
Mobile Phase:	Mobile Phase A: hochreines Wasser Mobile Phase B: Acetonitril
Flussrate:	0,3 mL/min
Säulentemperatur:	30 $^{\circ}\text{C}$

1776 Biomonitoring Methods

Injektionsvolumen:	100 µL
Schaltprogramm:	0–3,5 min: Fluss über Anreicherungssäule 3,5–18 min: Fluss über Anreicherungssäule und analytische Säule 18–20 min: Fluss über Anreicherungssäule
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 2

Tab. 2 Gradientenprogramm zur Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenolen (verzweigt) in Urin.

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Flussrate [mL/min]
0	80	20	0,3
4,0	80	20	0,3
5,0	5	95	0,3
10,0	5	95	0,3
10,5	80	20	0,3
20,0	80	20	0,3

4.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsmodus:	negative Elektrospray-Ionisation (ESI ⁻)
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	500 °C
Detektionsmodus:	Multi Reaction Monitoring (MRM)
Cone Gasfluss:	100 L/h
Desolvation Gasfluss:	650 L/h
Eingangspotential:	-2 V
Kollisionsenergie:	22 V
Ausgangspotential:	2 V
Multiplier:	650 V

Sämtliche Einstellungen der Ionenquelle sowie die MRM-Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden. Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 3 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 100 μL in das LC-MS/MS-Gerät injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und der spezifischen Ionenspuren. Die Retentionszeiten der Analyten und internen Standards sowie die registrierten Ionenspuren sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Bei jeder Analysenserie werden mehrere Reagenzienleerwerte (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) und mindestens zwei Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 8) mitgeführt.

Die in Tabelle 3 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen und können sich je nach verwendetem online-SPE-System unterscheiden. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 5 und 6 (im Anhang) sind beispielhaft Chromatogramme von zwei mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen dotierten Poolurinproben gezeigt.

Tab. 3 Retentionszeiten und detektierte Ionenspuren zur Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenolen (verzweigt) in Urin.

Analyt	Retentionszeit	Ionenspur [<i>m/z</i>]	
	[min]	Q1	Q3
4- <i>tert</i> -Octylphenol	11,66	205,22	133,04
¹³ C ₆ -4- <i>tert</i> -Octylphenol	11,66	211,14	138,89
<i>p</i> -Nonylphenol	12,12	219,22	133,10
¹³ C ₆ - <i>p</i> -Nonylphenol	12,12	225,08	138,95

6 Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden die unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Vergleichsstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 3) und mittels LC-MS/MS (vgl. Abschnitt 4) analysiert. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche der Analyten und des jeweiligen internen Standards gegen die Konzentration der Kalibrierstandards. Die Kalibriergeraden sind unter den beschriebenen Analysebedingungen im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 1000 $\mu\text{g/L}$ linear. Als üblicher Arbeitsbereich hat sich sowohl für 4-*tert*-Octylphenol als auch für *p*-Nonylphenol eine Kalibrierung bis 50 $\mu\text{g/L}$ als ausreichend erwiesen. Grund dafür ist, dass höhere Werte in den untersuchten Urinproben nicht zu erwarten sind und eine Quantifizierung im Bereich der Bestimmungsgrenze nur durch exakte Kalibrierkurvenführung im unteren Bereich möglich ist. In den Abbildungen 7 und 8 (im Anhang) sind beispielhaft die Kalibriergeraden der Analyten dargestellt.

7 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung der Analytgehalte in den Urinproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktionen (Abschnitt 6). Zur Bestimmung der Analytgehalte einer Urinprobe werden die Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten und des dazugehörigen ISTD bestimmt und in die nach Abschnitt 6 berechneten Kalibrierfunktionen eingesetzt. Man erhält den jeweiligen Analytgehalt in $\mu\text{g/L}$. Eventuelle Reagenzienleerwerte werden durch Subtraktion berücksichtigt.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieser Publikationsreihe verfahren [Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014]. Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit untersucht, die bekannte Konzentrationen der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu wird Poolurin von beruflich nicht mit Alkylphenolen belasteten Personen verwendet, der mit den Standardlösungen der Analyten versetzt wird, so dass die Konzentration des Kontrollmaterials im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegt (z. B. $10 \mu\text{g/L}$ und $50 \mu\text{g/L}$). Aliquote dieser Proben werden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 10 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [Bader et al. 2010].

Gleichzeitig werden in jeder Analysenserie mindestens drei Reagenzienleerwerte analysiert, damit eventuelle Störungen aus den Chemikalien erkannt werden können (vgl. Abschnitt 9.4). Statt Urin wird hier hochreines Wasser eingesetzt.

9 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Validierung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

9.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde Poolurin von beruflich nicht mit Alkylphenolen belasteten Personen eingesetzt. Der Poolurin wurde mit je $2 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ oder $50 \mu\text{g}$ *4-tert-Octylphenol* und *p-Nonylphenol* pro Liter dotiert. Diese Proben wurden zehnfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die hieraus ermittelten relativen Präzisionsdaten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden Poolurinproben mit dotierten Analytkonzentrationen von je 1 µg, 5 µg und 25 µg/L an 15 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 4 Präzision in der Serie für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Urin (n = 10).

Analyt	Dotierte Konzentration	Standardabweichung (rel.) s_w	Streubereich u
	[µg/L]	[%]	[%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	2	7,0	15,8
	10	4,4	10,0
	50	2,5	5,6
<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt)	2	4,4	10,0
	10	3,2	7,2
	50	4,1	9,3

Tab. 5 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Urin (n = 15).

Analyt	Mittlere Konzentration	Standardabweichung (rel.) s_w	Streubereich u
	[µg/L]	[%]	[%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	1,2	10,5	22,5
	5,0	5,5	11,8
	24,7	3,2	6,9
<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt)	1,1	4,8	10,3
	4,6	5,2	11,2
	24,2	3,8	8,2

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurde die Wiederfindung ausgehend von den Versuchen zur Bestimmung der Präzision in Serie ermittelt. Die erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Um den Einfluss unterschiedlicher Urinmatrizes zu ermitteln, wurden zehn Individualurine mit je 10 µg/L bzw. 100 µg/L der beiden Alkylphenole dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 7 dargestellt.

1780 Biomonitoring Methods

Tab. 6 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Urin, ermittelt aus den Daten zur Präzision in Serie (n = 10).

Analyt	Dotierte	Mittlere rel.	Bereich
	Konzentration	Wiederfindung <i>r</i>	
	[µg/L]	[%]	[%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	2	104	94–116
	10	98	92–106
	50	98	94–102
<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt)	2	106	97–113
	10	101	96–107
	50	99	92–104

Tab. 7 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Individualurinen (n = 10).

Analyt	Dotierte	Standard-	Streu-	Mittlere	Bereich
	Konzentration	abweichung	bereich μ	rel. Wieder-	
	[µg/L]	(rel.) s_w	[%]	findung <i>r</i>	[%]
4- <i>tert</i> -Oc- tylphenol	10	5,3	11,8	103	92–111
	100	9,4	21,0	97	83–108
<i>p</i> -Nonyl- phenol (verzweigt)	10	2,7	6,1	102	96–106
	100	2,9	6,7	102	98–102

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode auf Grundlage der sechs untersten Kalibriermesspunkte. Die ermittelten Werte für beide Analyten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8 Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Urin.

Analyt	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
	[µg/L]	[µg/L]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0,6	2,0*
<i>p</i> -Nonylphenol (verzweigt)	1,0	2,0*

* in Abhängigkeit vom Reagenzienleerwert (vgl. Abschnitte 9.4 und 10)

9.4 Störeinflüsse

In der Anfangsphase der Methodenentwicklung wurde versucht, beide Alkylphenole mithilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus der Urinprobe zu isolieren. Wegen den dabei erzielten niedrigen Wiederfindungsraten von nur ca. 20 % für 4-*tert*-Octylphenol und 35 % für *p*-Nonylphenol und einem hohen Reagenzienleerwert um 10 µg/L wurde diese Aufarbeitungsvariante nicht weiterverfolgt. Auch der Einsatz der offline-Festphasenextraktion wurde geprüft, führte aber wegen des nicht signifikant zu reduzierenden Reagenzienleerwertes ebenfalls nicht zum Erfolg.

Dies führte zur Etablierung der Säulenschalttechnik mit online-Anreicherung und Probenaufreinigung auf einer Anreicherungssäule. Nachdem die Analyten im Gegenstrom auf die Trennsäule eluiert wurden, erfolgt nach chromatographischer Trennung die massenspektrometrische Detektion im MRM-Modus. Diese Technik ermöglicht eine signifikante Reduktion der Reagenzienleerwerte auf bis zu 2 µg/L für 4-*tert*-Octylphenol und 3 µg/L für *p*-Nonylphenol. Ziel der Analysemethode war jedoch das Erreichen einer Bestimmungsgrenze von etwa 1 µg/L. In zahlreichen Versuchen wurden daher verschiedene Leerwertquellen identifiziert und entsprechende Maßnahmen zur Reduktion erarbeitet.

Als eine mögliche Leerwertquelle wurde das LC-Kapillarsystem des Analysengerätes lokalisiert. Da die Analyten aufgrund ihrer lipophilen und aciden Struktur leicht adsorbiert werden, besteht die Gefahr einer Anreicherung in den Kapillaren und Schaltventilen, insbesondere nach der Injektion größerer Analytmengen (z. B. nach Injektion der hohen Kalibrierstandards). Das Problem konnte durch anschließende Injektion einer oder mehrerer wässriger Proben zur Spülung des Systems eliminiert werden. Da ein gerätetechnischer Zusammenhang hierbei nicht auszuschließen ist, muss dieses Problem nicht zwingend auf andere Gerätetypen übertragbar sein.

Eine weitere Kontaminationsquelle stellten die eingesetzten Autosampler-Rollrandgläschen und Verschlusskappen dar. Durch vergleichende Untersuchungen wurden die in Abschnitt 2.1 beschriebenen Gefäße und Kappen als optimal für die Analytik der hier untersuchten Alkylphenole ermittelt, da sie die geringsten Reagenzienleerwerte aufwiesen. Alternativ besteht auch die Möglichkeit die eingesetzten Gefäße vor der Verwendung mit Methanol zu spülen und Verschlusskappen mit Teflonsepten zu verwenden. Diese Maßnahme hilft auch bei möglichen chargenbedingten Verunreinigungen und wurde für spätere Versuche konsequent angewendet.

Alternde Vor- oder Trennsäulen wurden ebenfalls als mögliche Kontaminationsquellen identifiziert. Auch hier können adsorbierende Stellen zu einer allmählichen Anreicherung der Analyten führen, die dann durch das Fließmittel gelöst und nachfolgend als „hot spots“ detektiert werden. Weiterhin wurden auch in verschiedenen Acetonitrilchargen Spuren an *p*-Nonylphenol gefunden. Auch diese *p*-Nonylphenol-Spuren reichten sich im nachgeschalteten System an und wurden sporadisch freigesetzt, was zu falsch positiven Werten führte. Erst durch intensive Blindwertstudien konnte dieses Problem erkannt werden. Um zeitintensive Chargentests zu umgehen, wurde eine Trap-Säule vor das Injektionssystem geschaltet, wodurch mögliche Spuren von *p*-Nonylphenol aus den Laufmitteln abgetrennt werden konnten. Die Summe aller geschilderten Maßnahmen führte zu einer reproduzierbaren Reduktion der Blindwerte auf etwa 0,3 µg/L für 4-*tert*-Octylphenol und 0,5 µg/L für *p*-Nonylphenol.

1782 Biomonitoring Methods

Es wurden zwei verschiedene LC-Methoden getestet. Eine Methode (im Hauptteil beschrieben) dient dem hohen Probendurchsatz und ist für die Routine gut geeignet. Die zweite LC-Variante führt zu einer besseren Matrixabtrennung, jedoch eluieren die Substanzen im Vergleich zur ersten Variante erst nach der doppelten Retentionszeit. Beide LC-Varianten zeigten vergleichbare Präzisionsdaten und können standardmäßig angewendet werden. Für das alternative Verfahren wurde eine andere, längere Analysensäule eingesetzt und ein abgewandeltes Gradientenprogramm verwendet. Details zur alternativen Methode können im Anhang (Abschnitt 12.1) eingesehen werden.

Mögliche Kontaminationspfade sind auch bei der Probenahme zu berücksichtigen. Da die beiden Analyten auch aus Verpackungsmaterial diffundieren können, ist bei den Gefäßen für die Urinsammlung auf Art und Herkunft der Gefäße zu achten. Es wurde der Einsatz von Glasgefäßen mit teflonkaschierten Deckeln oder Glasstopfen sowie von Polypropylengefäßen erfolgreich getestet, wenn diese vor Einsatz mit Methanol gespült wurden. Ein Spülschritt mit Methanol für alle eingesetzten Glasgeräte, hierzu zählen auch die für die Lagerung und Aufarbeitung verwendeten Schraubgläser, ist vor Beginn der Analytik sehr zu empfehlen. Das gilt auch für frisch in einer Laborspülmaschine gereinigte Gefäße sowie für gereinigte und danach gelagerte Gefäße.

Bei der Methodenprüfung, die mit einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem HPLC-System Agilent 1100 und einem Tandem-Massenspektrometer AB Sciex QTrap 5500 ausgeführt wurde, konnte die Blindwertproblematik bestätigt werden. Hier wurden als weitere Kontaminationsquellen auch der verwendete Puffer und die eingesetzte β -Glucuronidase identifiziert, die die Quantifizierung im Bereich der Bestimmungsgrenze erschwerten. Auch hier wurde der carry over-Effekt nach Injektion hoher Analytkonzentrationen beobachtet, der erst durch nachfolgende Injektion mehrerer Leerproben beseitigt werden konnte.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene interne Standardsubstanzen getestet. Dabei erwiesen sich 4-*n*-Nonylphenol- d_4 oder auch 4-*n*-Nonylphenol- $^{13}C_6$ als interner Standard für *p*-Nonylphenol (verzweigt) als ungeeignet, da diese aufgrund der abweichenden physikalischen Eigenschaften (Retentionszeit, Fragmentierung) die analytischen Schwankungen (Matrix und Quenching) nicht vollständig kompensieren konnten. Auch der für 4-*tert*-Octylphenol eingesetzte interne Standard 4-*tert*-Octylphenol- $^{13}C_6$ erwies sich als ISTD für *p*-Nonylphenol als nicht optimal. Erst durch den Einsatz von *p*-Nonylphenol- $^{13}C_6$ als ISTD war eine reproduzierbare Analytik auch für das verzweigte *p*-Nonylphenol möglich.

10 Diskussion der Methode

Ziel der Methodenentwicklung war eine schnelle, selektive, sensitive und robuste Analysemethode, die die Bestimmung beider Alkylphenole in einem Analysengang erlaubt. Durch Einsatz der LC-MS/MS-Technik war es möglich, die Trennleistung soweit zu reduzieren, dass das komplexe *p*-Nonylphenol-Isomerenmisch in einem Peak eluiert. Der dabei zur Analyse verwendete Massenübergang von m/z 219 nach m/z 133 ermöglicht die Erfassung von ca. 75 % aller *p*-Nonylphenol-Isomere. In Vor-

versuchen konnte gezeigt werden, dass das oft in der Literatur beschriebene 4-*n*-Nonylphenol (unverzweigt) in dem vorliegenden technischen *p*-Nonylphenolstandard (verzweigt) nicht vorkommt. Somit kann eine Analytik auf diese Substanz als Marker für eine allgemeine Nonylphenolexposition nicht als zielführend angesehen werden.

Bedingt durch die ubiquitäre Verbreitung und die physikalisch-chemischen Eigenschaften von 4-*tert*-Octylphenol und *p*-Nonylphenol ist die Analytik in allen Phasen von einer signifikanten Blindwertproblematik begleitet. Dies gilt insbesondere für *p*-Nonylphenol. Dementsprechend sollte die Analyseverfahren möglichst wenige Analyseschritte beinhalten, da jeder zusätzliche Analyseschritt auch eine zusätzliche potentielle Kontaminationsquelle bedeutet. Nur durch die Anwendung der LC-MS/MS-Kopplung sowie durch die Probenaufarbeitung in nur einem Analysegefäß pro Probe, war eine Reduzierung der Blindwerte unter 1 µg/L möglich.

Wegen der Leerwertproblematik ist es notwendig, die Eignung der Chemikalien und des Messsystems vor Beginn der Alkylphenolanalytik mithilfe von Blindwerttests zu prüfen und bei jeder Analysenserie mindestens drei Reagenzienleerwerte parallel zu den Analyseproben und den Qualitätskontrollproben zu analysieren und zu dokumentieren. Nur wenn die bestimmten Leerwerte gleichmäßig sind und unterhalb von 1 µg/L liegen, kann eine Analysenserie für die Bestimmung der Hintergrundbelastung im Urin der Allgemeinbevölkerung als valide gewertet werden, natürlich auch unter Einhaltung der Qualitätsvorgaben mittels der Qualitätskontrollproben.

Der Einsatz der ¹³C₆-markierten internen Standards, mit zu den Analyten analoger Fragmentierung, ermöglicht die Kompensation aller analytischen Schwankungen, was durch die sehr guten Präzisionsdaten bestätigt wird. Lediglich bei der niedrigsten dotierten Konzentration treten etwas höhere Streubreiten auf, was sicherlich auf die bereits diskutierte Leerwertproblematik im unteren Konzentrationsbereich zurückzuführen ist. Versuche mit aufgestockten Individualurinen zeigen zudem die Robustheit der Analysenmethode auch bei Verwendung unterschiedlicher Urinmatrizes.

Um eine Übersicht über mögliche Hintergrundbelastungen zu erhalten, wurden Urinproben von 40 beruflich nicht gegenüber Alkylphenolen exponierten Personen analysiert. In zwei Proben wurde dabei *p*-Nonylphenol in einer Konzentration von 1,6 und 1,8 µg/L detektiert, während 4-*tert*-Octylphenol in keiner Probe gefunden werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Belastung der Bevölkerung überwiegend im Bereich der Bestimmungsgrenze zu erwarten ist.

Die in Abschnitt 9.4 beschriebenen Hinweise zeigen die erhöhten Anforderungen auf, die an eine valide Methodenanwendung für die Bestimmung der Alkylphenole gestellt werden. Diese Problematik wurde auch von den Prüfern der Methode bestätigt und ist damit als essentielle Herausforderung für Messungen im Bereich der Hintergrundbelastung zu sehen. Bei konsequenter Beachtung der in Abschnitt 9.4 beschriebenen Maßnahmen zur Reduzierung der Blindwerte kann die Empfindlichkeit der Methode noch gesteigert werden (Bestimmungsgrenze von etwa 1 µg/L).

Verwendete Messgeräte: LC-MS/MS-System bestehend aus Waters Alliance HPLC-System gekoppelt mit Tandemmassenspektrometer Waters Quattro Ultima MS.

11 Literatur

- Bader M, Barr D, Göen Th, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J und Hartwig A (Hrsg.): Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim. <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärztebl 111: A1583–1618
- Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391–395
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL (2008) Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 116: 39–44
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018a) Stoffinformation: Phenol, 4-nonyl-, branched. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.076.631> (abgerufen am 12.12.2018)
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018b) Candidate list of Substances of very high concern for Authorisation. <https://www.echa.europa.eu/candidate-list-table> (abgerufen am 12.12.2018)
- Gabriel FLP, Routledge EJ, Heidelberger A, Rentsch D, Guenther K, Giger W, Sumpter JP, Kohler HPE (2008) Isomer-specific degradation and endocrine disrupting activity of nonylphenols. *Environ Sci Technol* 42: 6399–6408
- Hartwig A, MAK Commission (2016) 4-tert-Octylphenol. The MAK Collection for Occupational Health and Safety 1: 1907–1954. <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb14066d0061>
- Hartwig A, MAK Commission (2017) 4-tert-Octylphenol. The MAK Collection for Occupational Health and Safety 2: 822–835. <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb14066kskd0063>
- Inoue K, Kawaguchi M, Okada F, Takai N, Yoshimura Y, Horie M, Izumi S, Makino T, Nakazawa H (2003) Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 486: 41–50
- Jing X, Bing S, XiaoYan WU, XiaoJie S, YongNing WU (2011) A study on Bisphenol A, Nonylphenol and Octylphenol in human urine samples detected by SPE-UPLC-MS. *Biomed Environ Sci* 24: 4–46
- Müller S and Certa H (2013) persönliche Mitteilung an die Autoren. Hans Certa, Sasol Germany GmbH, Marl; Severin Müller, SI Group Switzerland GmbH, Pratteln, Schweiz
- Nomura S, Daidoji T, Inuoe H, Yokota H (2008) Differential metabolism of 4-n and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci* 83: 223–228
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1994) Phenol, 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-, CAS Nr. 140-66-9, OECD SIDS Initial Assessment Report, UNEP (United Nations Environment Programme), Genf, Schweiz. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/140669.pdf>
- UBA (Umweltbundesamt) (2018a) Informationsportal REACH: Nonylphenol und seine Ethoxylate. <https://www.reach-info.de/nonylphenol.htm> (abgerufen am 12.12.2018)
- UBA (Umweltbundesamt) (2018b) Informationsportal REACH: Octylphenol und seine Ethoxylate. <https://www.reach-info.de/octylphenol.htm> (abgerufen am 11.12.2018)

- Wang J und Schnute WC (2010) Direct analysis of trace level bisphenol A, octylphenols and nonylphenols in bottled water and leached from bottles by ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 2605–2610
- Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Blair Janes A (1997) Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high resolution mass capillary GC-MS. *J Chrom Sci* 35: 19–30
- Ye X, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM (2007) Identification of metabolites of 4-nonylphenol isomer 4-(3,6'-dimethyl-3'-heptyl)phenol by rat and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 35: 1269–1274
- Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi JP (2003) In vivo metabolic fate of the xenoestrogen 4-n-nonylphenol in wistar rats. *Drug Metab Dispos* 31: 168–178

Entwickler der Methode: W. Gries, G. Leng, K. Küpper

Prüfer der Methode: K. Blümlein, S. Gerling

Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: Th. Göen

Vorsitzende der „Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: A. Hartwig

Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft: MAK Commission

12 Anhang

12.1 Alternative Analysenmethode

Trap-Säule:	Zorbax Eclipse XDB-C8 5 µm, 4,6 × 50 mm
Anreicherungssäule:	Oasis HLB 25 µm, 2,1 × 20 mm
Analytische Säule:	Symmetry C8 3,5 µm, 2,1 × 150 mm
Mobile Phase:	Mobile Phase A: hochreines Wasser Mobile Phase B: 1 mM Ammoniumacetat Mobile Phase C: Acetonitril
Flussrate:	0,3 mL/min
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	100 µL
Schaltprogramm:	0–5 min: Fluss über Anreicherungssäule 5–35 min: Fluss über Anreicherungssäule und analytische Säule 35–40 min: Fluss über Anreicherungssäule
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 9

Tab. 9 Alternatives Gradientenprogramm für die Bestimmung von 4-*tert*-Octylphenol und verzweigtem *p*-Nonylphenol in Urin.

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Mobile Phase C [%]	Flussrate [mL/min]
0	60	5	35	0,3
10,0	60	5	35	0,3
20,0	15	5	80	0,3
30,0	15	5	80	0,3
31,0	60	5	35	0,3
40,0	60	5	35	0,3

Bedingt durch die längere Analysensäule eluieren die Analyten deutlich später, was gleichzeitig zu einer besseren Matrixabtrennung führt (Retentionszeiten 4-*tert*-Octylphenol und ISTD: $t_R = 26,3$ min; *p*-Nonylphenol und ISTD: $t_R = 25,0$ min). Alle anderen Angaben entsprechen der im Hauptteil beschriebenen Analysenmethode.

12.2 Abbildungen

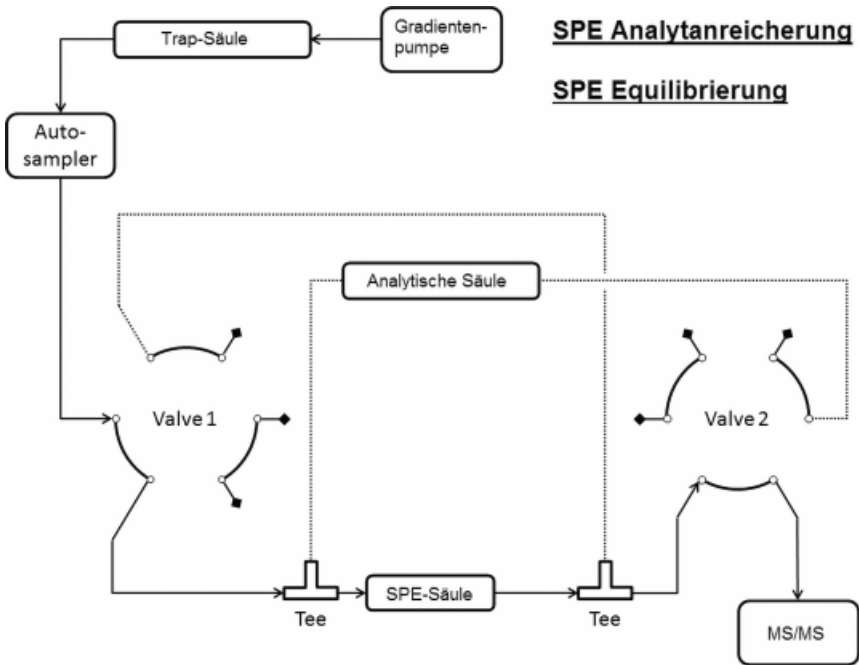


Abb. 4a Flussdiagramm des online-SPE-HPLC-Systems: SPE-Analytanreicherung und Equilibrierung des Systems.

1788 Biomonitoring Methods

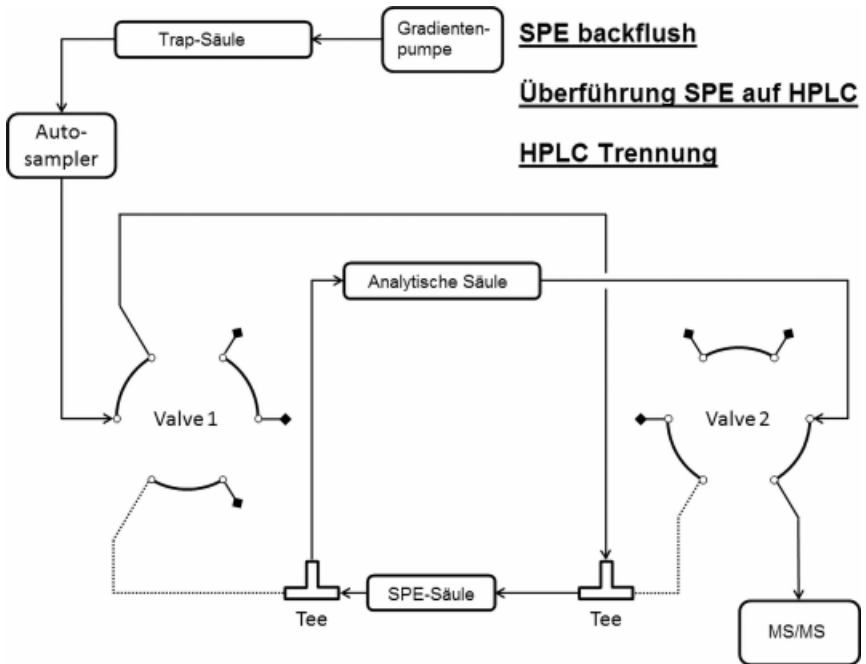


Abb. 4b Flussdiagramm des online-SPE-HPLC-Systems: SPE-Backflush, Analyttransfer und -trennung auf der analytischen Säule.

Octyl- und Nonylphenol in Urin 1789

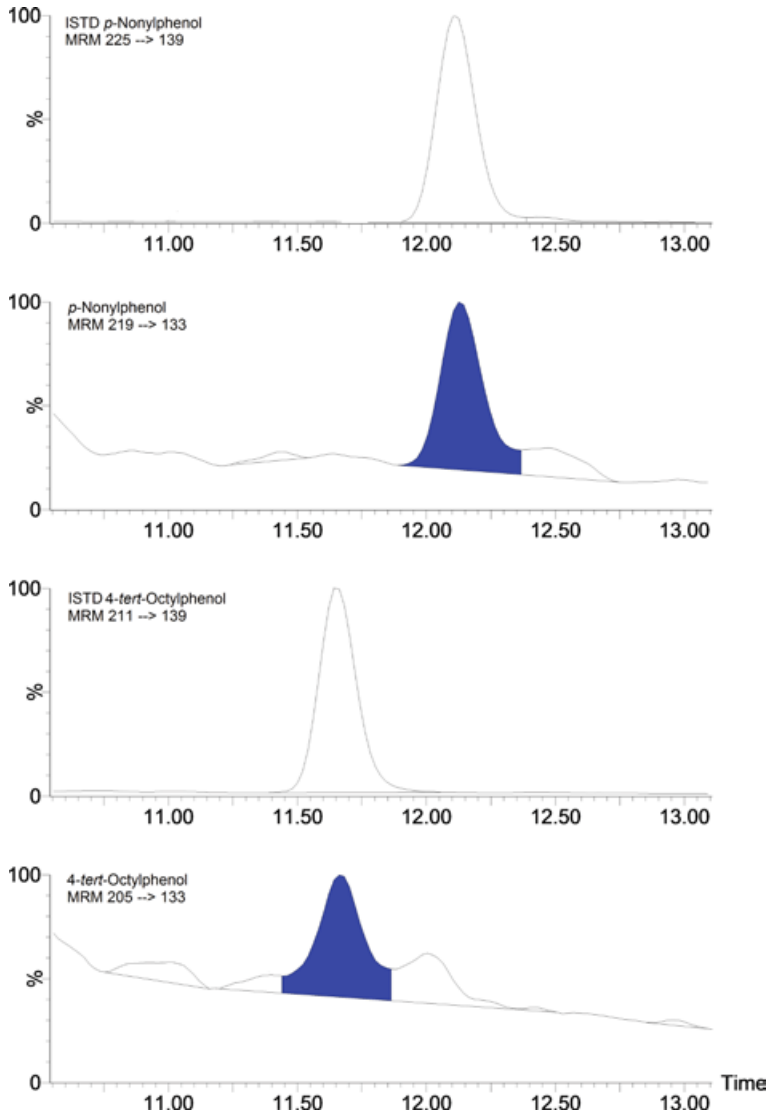


Abb. 5 LC-MS/MS-Chromatogramm einer mit je 1 µg/L der Analyten gespickten Urinprobe.

1790 Biomonitoring Methods

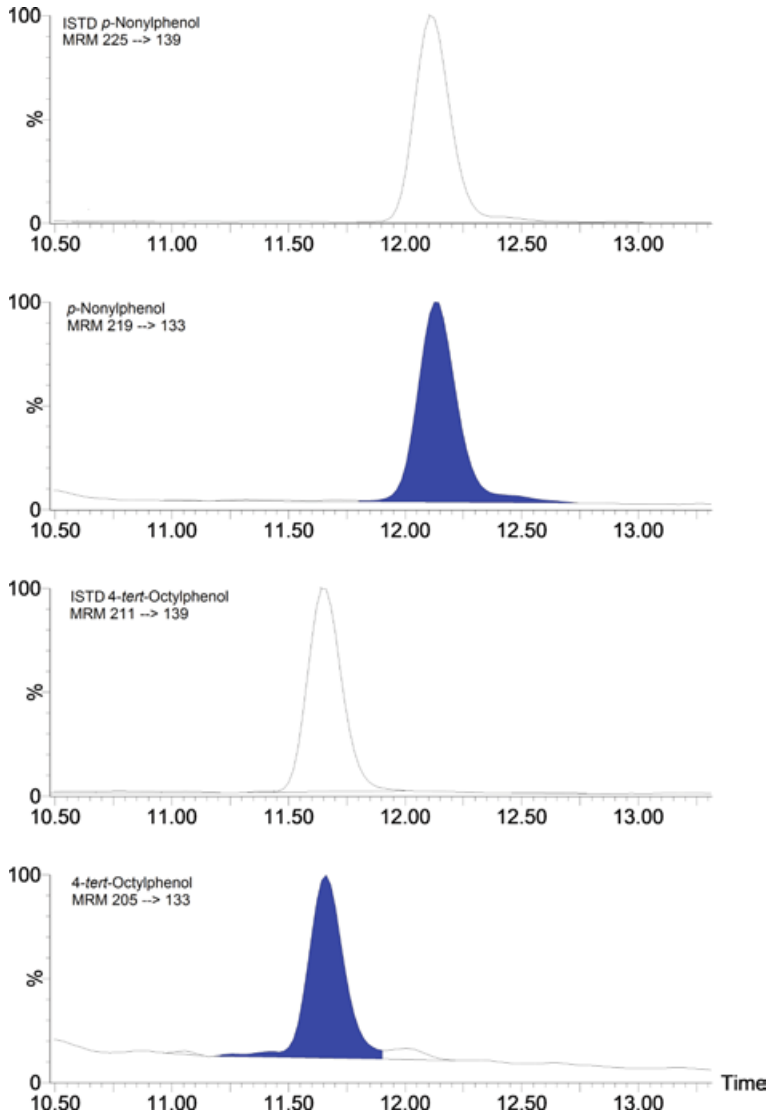


Abb. 6 LC-MS/MS Chromatogramm einer mit je 10 µg/L der Analyten gespickten Urinprobe.

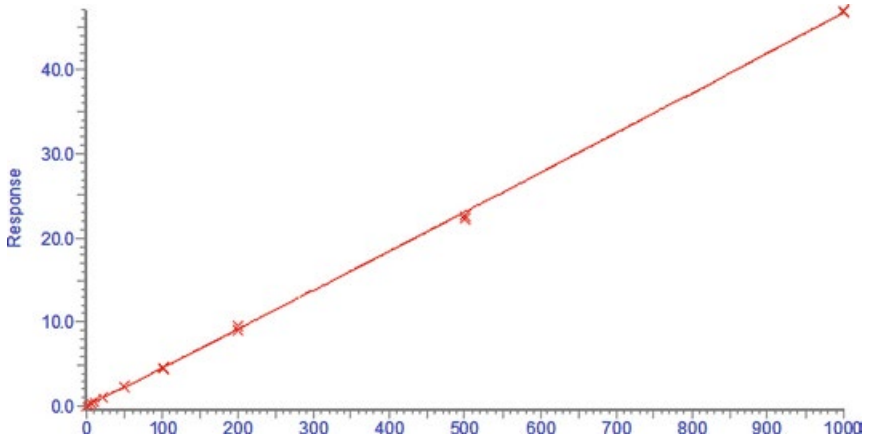


Abb. 7 Kalibriergerade von 4-*tert*-Octylphenol in Urin (Messbereich 0–1000 µg/L).

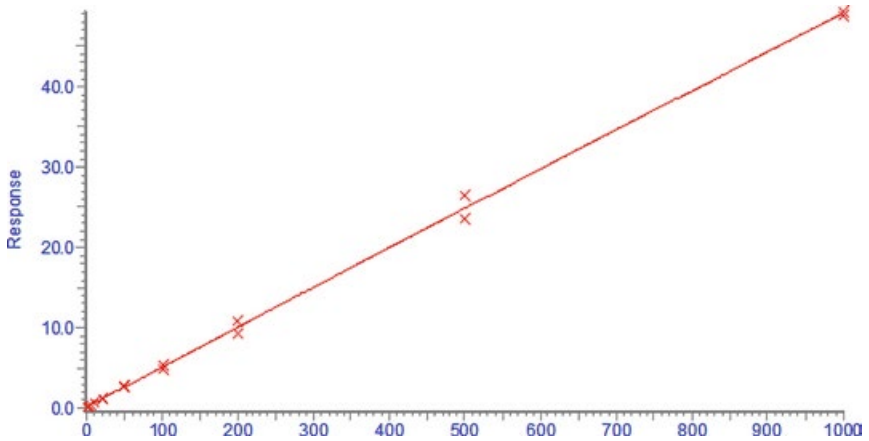


Abb. 8 Kalibriergerade von *p*-Nonylphenol (verzweigt) in Urin (Messbereich 0–1000 µg/L).