

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Formamid, Dimethylformamid – Bestimmung von Formamid in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Biomonitoring-Methode

G. Scherer¹, G. Gilch¹, B. Aust², M. Blaszkewicz², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, ABF Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Goethestraße 20, 80336 München

² Methodenprüfung, Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund

³ 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, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

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

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

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

Keywords: Formamid; Dimethylformamid; Biomonitoring; Urin; GC-MS

Citation Note: Scherer G, Gilch G, Aust B, Blaszkewicz M, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Formamid, Dimethylformamid – Bestimmung von Formamid in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2018 Jan;3(1):418-433]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2025. https://doi.org/10.34865/bi7512d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 12 Dez 2025

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi7512d0022>

Manuskript abgeschlossen: 12 Nov 2009

Erstveröffentlichung (Online): 24 Jan 2018

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Formamide, dimethylformamide – Determination of formamide in urine using gas chromatography mass spectrometry

[Formamid, Dimethylformamid – Bestimmung von Formamid in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie]

Biomonitoring Methods in German language

G. Scherer¹, G. Gilch¹, B. Aust², M. Blaszkewicz², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi7512d0022

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 verified the presented biomonitoring method. The method described herein allows the determination of formamide in urine by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Due to its sensitivity, this method is suitable for the detection of occupational and environmental exposure to formamide. For the analytical determination 1 mL of urine is lyophilized after being spiked with ¹³C,¹⁵N-formamide as the internal standard. The lyophilisate is extracted with 200 µL methanol. After centrifugation, 1 µL of the extract is injected into a GC-MS system. The method was extensively validated and the reliability data were confirmed by an independent laboratory, which has established and cross-checked the whole procedure.

Keywords

Formamid; Dimethylformamid; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; Gaschromatographie; Massenspektrometrie; GC-MS

Author Information

¹ Entwickler der Methode, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Goethestraße 20, 80336 München

² Prüfer der Methode, Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund

³ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

⁴ 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

⁵ 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)

Formamid, Dimethylformamid – Bestimmung von Formamid in Urin mittels Gaschromato- graphie-Massenspektrometrie

Matrix:	Urin
Arbeitsstoff:	Formamid
Analyt. Messprinzip:	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Abgeschlossen im:	Oktober 2009

Mit dieser Methode erfassbare Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
Formamid	75-12-7	Formamid	75-12-7
Dimethylformamid	68-12-2	Formamid	75-12-7

Zusammenfassung

Die vorliegende Methode erlaubt die Bestimmung von unmetabolisiert ausgeschiedenem Formamid in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Da das Verfahren eine hohe Sensitivität aufweist, ist es für die Erfassung der Formamidexposition im arbeitsbedingten und umweltbedingten Belastungsbereich geeignet.

Für die analytische Bestimmung wird 1 mL Urin eingesetzt, der nach Zugabe des internen Standards ^{13}C , ^{15}N -Formamid lyophilisiert wird. Das Lyophilisat wird mit 200 μL Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation wird 1 μL des Extrakts in ein GC-MS-System injiziert.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Formamid

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,6 \%$ bzw. $3,4 \%$
	Streubereich	$u = 12,8 \%$ bzw. $9,4 \%$
	bei einer gemessenen Konzentration von $3,8 \text{ mg}$ bzw. $16,9 \text{ mg}$ Formamid pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich	$s_w = 8,0 \%$ bzw. $2,5 \%$ $u = 20,5 \%$ bzw. $6,4 \%$
	bei einer gemessenen Konzentration von $3,8 \text{ mg}$ bzw. $17,3 \text{ mg}$ Formamid pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 103 \%$ bzw. $97,5 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von 4 mg bzw. 16 mg Formamid pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Bestimmungsgrenze:	$0,5 \text{ mg}$ Formamid pro Liter Urin	

Allgemeine Informationen zu Formamid

Formamid (Summenformel: CH_3NO , Molekulargewicht: $45,04 \text{ g/mol}$) ist eine farblose, leicht nach Ammoniak riechende Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 210°C und einem Dampfdruck von $0,06 \text{ mm Hg}$ bei 25°C [Römpf 2017].

Formamid wird in Europa im Umfang von $10\,000\text{--}50\,000 \text{ t}$ pro Jahr hergestellt. Formamid wird als industrielles Lösungsmittel bei organischen Synthesereaktionen sowie als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Farbstoffen und Pigmenten verwendet. Darüber hinaus dient Formamid als Weichmacher für Papier und Gummi und als ein Syntheseausgangsstoff. Es dient weiterhin der Produktion von Pharmazeutika, von synthetischem Leder sowie von Druckerfarbe [ECHA 2011]. Die Kommission hat Formamid überprüft und die toxikologische Datenlage und Bewertung in einer Dokumentation zusammengefasst. Ein MAK-Wert konnte aufgrund unzureichender Datenlage nicht aufgestellt werden [Greim 2001]. Wegen der Gefahr einer Fruchtschädigung bei dermaletem Kontakt wurde Formamid mit „H“ markiert [DFG 2017]. Details zur Bewertung des Formamids können der toxikologisch-arbeitsmedizinischen Begründung der Kommission entnommen werden [Greim 2001].

Zu Resorption, Metabolismus und Ausscheidung beim Menschen liegen keine Informationen vor [Fail et al. 1998; NTP 1992a, 1992b]. Anhand von Tierversuchen kann am Arbeitsplatz mit einer inhalativen sowie dermalen Aufnahme des Formamids gerechnet werden.

Nach oraler Gabe von $2\text{--}4 \text{ g}$ Formamid an Kaninchen wurden ca. 39% unverändert in Urin gefunden [Snyder 1990], was darauf hindeutet, dass Formamid in Urin einen geeigneten Expositionsmarker darstellt. Untersuchungen zu Formamid in Urin als Biomarker einer beruflichen Formamidexposition sind bislang nicht publiziert. Lareo und Perbellini [1995a] berichten, dass Formamid auch als Metabolit des *N,N*-Dimethylformamids (DMF) gebildet wird und mit steigender DMF-Exposition in Urin zunimmt.

Tierversuche zeigen, dass Formamid zu Haut- und Augenreizungen führt, Erfahrungen beim Menschen liegen allerdings nicht vor. Eine Beurteilung der systemischen Effekte und auch der Reizwirkung auf Atemwege und Auge beim Menschen ist nicht möglich [Greim 2001].

In anderen Ländern wurden Grenzwerte für Formamid am Arbeitsplatz festgelegt, so gilt für die USA, für Australien und für Belgien ein Grenzwert von 10 ppm ($= 15 \text{ mg/m}^3$) [ACGIH 2017; NIOSH 2016] und für Dänemark, Finnland, die Niederlande sowie die Schweiz ein Grenzwert von 20 ppm ($= 30 \text{ mg/m}^3$). In Deutschland

wird in der „Technischen Anleitung zur Reinhaltung der Luft“ (*TA Luft*) ein Grenzwert von 20 mg/m³ angegeben [TA Luft 2002].

Unter Verwendung der vorliegenden Methode wurde in einem Kollektiv von 47 unbelasteten Personen eine durchschnittliche Formamidkonzentration von 2,4 mg pro Liter Urin (Bereich: 0,76–5,8 mg/L) bestimmt. Für die im Kollektiv vorhandenen 21 Raucher wurde eine mittlere Formamidkonzentration von 1,9 mg/L (Bereich: 0,76–4,6 mg/L) gemessen. Für die 26 Nichtraucher lag die Konzentration bei 2,9 mg/L (Bereich: 0,94–5,8 mg/L). Ein Einfluss des Rauchens wurde somit nicht festgestellt. Von anderen Autoren wurden zum Teil noch höhere Ausscheidungen von Formamid in Urin beruflich nicht belasteter Personen beschrieben [Lareo et al. 1995b], die allerdings sehr wahrscheinlich auf Artefaktbildung zurückgehen (siehe Abschnitt 10).

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	422
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	422
2.1	Geräte und Materialien	422
2.2	Chemikalien	422
2.3	Lösungen	423
2.4	Interner Standard	423
2.5	Kalibrierstandards	423
3	Probenahme und Probenaufbereitung	424
3.1	Probenahme	424
3.2	Probenaufbereitung	424
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	425
4.1	Gaschromatographie	425
4.2	Massenspektrometrie	425
5	Analytische Bestimmung	425
6	Kalibrierung	426
7	Berechnung der Analysenergebnisse	426
8	Standardisierung und Qualitätssicherung	427
9	Beurteilung des Verfahrens	427
9.1	Präzision	427
9.2	Richtigkeit	428
9.3	Bestimmungsgrenze	429
9.4	Störeinflüsse	429
10	Diskussion der Methode	429
11	Literatur	430
12	Anhang	432

1 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode erlaubt die Bestimmung von unmetabolisiert ausgeschiedenem Formamid in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Da das Verfahren eine hohe Sensitivität aufweist, ist es für die Erfassung der Formamidexposition im arbeitsbedingten und umweltbedingten Belastungsbereich geeignet.

Für die analytische Bestimmung wird 1 mL Urin eingesetzt, der nach Zugabe des internen Standards ^{13}C , ^{15}N -Formamid lyophilisiert wird. Das Lyophilisat wird mit 200 μL Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation wird 1 μL des Extrakts in ein GC-MS-System injiziert.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte und Materialien

- Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer und Kaltaufgabesystem (z. B. Gaschromatograph GC 6890 N (Agilent, Waldbronn) mit MS 5975 (Agilent, Waldbronn) und Kaltaufgabesystem KAS 4 (Gerstel, Mülheim)
- Gaschromatographische Säule: Länge: 30 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 1 μm (z. B. ZB-WAX; Phenomenex, Aschaffenburg)
- Vakuumzentrifuge (z. B. RC 1022; Thermo Electron, Dreieich)
- Kühlzentrifuge (z. B. EBA 12 R; Hettich, Tuttlingen)
- Vortex-Schüttler (z. B. Heidolph, Schwabach)
- Mikroliterpipetten, variabel zwischen 1–10 μL , zwischen 10–100 μL sowie zwischen 100–1000 μL mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf, Hamburg)
- 0,65-mL-PP-Tubes (z. B. Sorenson, VWR, Darmstadt)
- 1,5-mL-Safe-Lock-Tubes (z. B. Eppendorf, Hamburg)
- Microvials für Autosampler (z. B. Ziemer, Langerwehe)
- Becher zum Sammeln der Urinproben (z. B. Sarstedt, Nümbrecht)
- 10-mL-Messkolben (z. B. Brand)

2.2 Chemikalien

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

- Formamid, $\geq 99,5\%$ (z. B. Fluka, Nr. 93572)
- ^{13}C , ^{15}N -Formamid (z. B. Chemotrade, Nr. SS00061)
- Wasser für die Analyse EMSURE[®] (z. B. Merck, Nr. 1.16754)
- Methanol für die HPLC Promochem[®] (z. B. LGC, Nr. SO-3041)
- Humanurin mit niedrigem Formamidgehalt

2.3 Lösungen

Stammlösung

- Formamid-Stammlösung (1 g/L):
8,85 µL Formamid werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Arbeitslösungen

- Formamid-Arbeitslösung I (100 mg/L):
1 mL der Formamid-Stammlösung wird in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Formamid-Arbeitslösung II (10 mg/L):
1 mL der Formamid-Arbeitslösung I wird in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die Stammlösung sollte im Kühlschrank bei 2–8 °C gelagert werden und ist so gelagert etwa acht Wochen haltbar. Die Arbeitslösungen werden frisch angesetzt.

2.4 Interner Standard

- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Formamid-Stammlösung (1 g/L):
8,85 µL $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Formamid werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Formamid-Arbeitslösung (10 mg/L):
100 µL der $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Formamid-Stammlösung in einen 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die Stammlösung des internen Standards sollte im Kühlschrank bei 2–8 °C gelagert werden und ist so gelagert etwa acht Wochen haltbar. Die Arbeitslösung wird frisch angesetzt.

2.5 Kalibrierstandards

Für die Kalibrierung wird ein Humanurin mit möglichst niedrigem Gehalt an Formamid ausgewählt, der anschließend mit steigenden Formamidmengen dotiert wird. Die Kalibrierung umfasst einen Konzentrationsbereich von 0,5–64 mg/L Urin und wird nach dem in Tabelle 1 gegebenen Dotierschema angesetzt. Als Leerwert wird der verwendete Poolurin mitgeführt.

Die Kalibrierstandards werden wie Realproben aufgearbeitet (Abschnitt 3.2) und vermessen (Abschnitt 5).

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards in Urin.

Kalibrier- standard	Volumen Urin [μL]	Volumen Formamid- Arbeitslösung II [μL]	Volumen Formamid- Arbeitslösung I [μL]	Volumen Formamid- Stammlösung [μL]	Formamid- Konzentration [mg/L]
0	200	–	–	–	0
1	200	10			0,5
2	200	20			1
3	200		4		2
4	200		8		4
5	200		16		8
6	200			3,2	16
7	200			6,4	32
8	200			12,8	64

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Urinproben werden in verschließbaren Urinbechern gesammelt. Die gesammelten Urinproben sollten kühl gelagert oder für eine spätere Analyse bei -25°C eingefroren werden. Allerdings ist der Analyt auch bei kurzzeitiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur stabil.

Der Entwickler der Methode hat die Kurzzeitstabilität des Analyten in Matrix mit einer hochdotierten Urinprobe geprüft, die 24 h bei Raumtemperatur stand. Es konnte keine Abnahme der Formamid-Konzentration in diesem Zeitraum beobachtet werden.

3.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben gegebenenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. 1 mL Urin wird in Safe-Lock-Tubes pipettiert und 10 min bei $15.000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. In 0,65-mL-PP-Tubes werden 20 μL der $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Formamid-Arbeitslösung als interner Standard vorgelegt und anschließend 200 μL der zentrifugierten Urinprobe zugegeben. Nach kurzem Vortexen wird die Probe bei -25°C eingefroren (ca. 1 h). Die gefrorene Probe wird in der Vakuum-zentrifuge bei einem Druck < 1 mbar zur Trockene eingengt. Dieser Schritt dauert 2–3 Stunden, abhängig von der Güte des Vakuums und der Anzahl der zu lyophilisierenden Proben. Das Lyophilisat wird mit 200 μL Methanol versetzt und am Vortex-Mischer resuspendiert. Anschließend wird die Probe bei $10.000 \times g$ für 10 min

bei Raumtemperatur zentrifugiert und vom klaren Überstand ein Aliquot in ein GC-Vial mit Microinsert überführt.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

4.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	ZB-WAX
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	1 µm oder äquivalent
Temperaturen:	Säule:	40 °C für 2 min halten, dann 5 °C/min bis 180 °C
	Injektor, Kaltaufgabe:	Ausgangstemperatur 120 °C für 6 s, dann Anstieg 5 °C/s auf 180 °C, halten für 1,5 min, dann mit 5 °C/s zurück auf 120 °C, 28 min halten
Trärgas:	Transferline:	190 °C
	Helium 5.0	
	Fluss:	1,2 mL/min
Injektions- volumen:	1 µL; split: 50:1	

4.2 Massenspektrometrie

Die Detektion erfolgt im Selected-Ion-Monitoring-Modus mit Elektronenstoß-Ionisation.

Ionisationsart:	Elektronenstoß-Ionisation (<i>EI</i>)
Ionisationsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	150 °C
Dwell time:	50 ms
Solvent delay:	6 min
Detektionsmodus:	Selected-Ion-Monitoring (<i>SIM</i>)

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 3.2 aufgearbeiteten Urinproben werden die GC-Vials in das Messgerät gestellt und je 1 µL Probe mit einem split-Verhältnis von 1:50 in das GC-MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten

erfolgt anhand der Retentionszeit und anhand charakteristischer Ionenspuren. Die für die angegebenen GC-Bedingungen (siehe Abschnitt 4) resultierenden Retentionszeiten sowie die charakteristischen Ionenspuren der Analyten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2 Retentionszeiten des Analyten und des dazugehörenden internen Standards sowie zur Auswertung herangezogene Ionenspuren.

Analyt	Ionen (m/z)	Retentionszeit (min)
	Quantifier	
Formamid	45,04	29,12
¹³ C, ¹⁵ N-Formamid	47,03	29,13

In Abbildung 1 im Anhang ist das Chromatogramm eines Humanurins mit einem Formamidgehalt von 3,63 mg/L dargestellt.

6 Kalibrierung

Die in Urin angesetzten Kalibrierstandards werden analog zu den Urinproben entsprechend Abschnitt 3.2 aufgearbeitet und mit GC-MS (vergl. Abschnitt 4 und 5) analysiert. Für den Analyten wird eine Kalibriergerade erstellt, indem das Verhältnis der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die dotierte Analytkonzentration aufgetragen wird. Dabei wird der Eigengehalt des für die Herstellung der Kalibrierstandards verwendeten Humanurins berücksichtigt. Abbildung 2 im Anhang zeigt exemplarisch eine Kalibriergerade für Formamid in Urin.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Nachdem der Hintergrundgehalt des für die Kalibrierung verwendeten Humanurins zu der dotierten Konzentration addiert wurde, wird der Kalibrierpunkt dieser errechneten Konzentration auf die Abszisse des Graphen aufgetragen. Die jeweilige Ordinate stellt das Flächenverhältnis aus Analyten und internem Standard dar (Area Ratio). Unter Verwendung von linearer Regression mit 1/x-Wichtung wird von der ChemStation-Software die Kalibrierfunktion errechnet und samt Bestimmtheitsmaß ausgegeben. Anhand der Kalibriergeraden (Abbildung 2), die annähernd durch den Koordinatenursprung verläuft, werden die vermessenen Proben bewertet. Die Resultate in mg/L können direkt von der Auswertung mittels ChemStation-Software übernommen werden. Zu beachten ist lediglich, dass bei dotierten Proben der Eigengehalt vom Resultat abzuziehen ist, um das Ergebnis der Dotierung zu erhalten.

8 Standardisierung und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieses Bandes verfahren [Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2008]. Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie Qualitätskontrollen mit untersucht, die eine bekannte und konstante Analytkonzentration aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Für die Herstellung von QC-Material wird Urin gesunder Personen mit möglichst niedrigem Gehalt an Formamid ausgewählt und mit einer definierten Menge Formamid dotiert. Der Urin kann auch von mehreren Personen gesammelt und gemischt werden (Poolurin). Für die laufende Qualitätskontrolle wird der dotierte Urin in Aliquote aufgeteilt und eingefroren. Das so hergestellte QC-Material ist bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens ein Jahr haltbar.

Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorserie (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [Bader et al. 2010].

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 bewiesen.

9.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurden Urinproben mit dem Analyten im unteren Kalibrierbereich sowie im oberen Kalibrierbereich dotiert und je fünffach vermessen. Daraus ergaben sich die in Tabelle 3 dokumentierten Präzisionsdaten in Serie.

Tab. 3 Präzision in Serie für die Bestimmung von Formamid in Urin ($n = 5$).

Gemessene Konzentration [mg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
3,8	4,6	12,8
16,9	3,4	9,4

Zur Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden die gleichen Proben an sechs verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung analysiert und ergaben die in Tabelle 4 dokumentierten Präzisionsdaten von Tag zu Tag.

Tab. 4 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Formamid in Urin (n = 6).

Gemessene Konzentration [mg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
3,8	8,0	20,5
17,3	2,5	6,4

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde Urin mit Formamid in einer Konzentration von 4 mg/L bzw. 16 mg/L dotiert und analysiert. Bei fünffacher Bestimmung dieser Proben ergaben sich die in Tabelle 5 dokumentierten Werte für die Richtigkeit.

Tab. 5 Richtigkeit bei der Bestimmung von Formamid in Urin (n = 5).

Dotierte Konzentration [mg/L]	Richtigkeit [%]	Relative Standardabweichung [%]
4	103	5,2
16	97,5	3,7

Zur Bestimmung der absoluten Wiederfindung wurde Humanurin im niedrigen (4 mg/L) sowie im hohen (16 mg/L) Konzentrationsbereich dotiert und je sechsfach, wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben, aufgearbeitet.

Der gleiche Urin wurde sechsmal ohne Formamid-Zusatz nach Vorschrift aufgearbeitet und erst nach methanolischer Rekonstitution des Lyophilisats mit dem Aliquot eines methanolischen Formamid-Standards entsprechend den Dotierungen 4 mg/L (n = 3) bzw. 16 mg/L (n = 6) versetzt. Die so ermittelten Peakflächenverhältnisse aus Analyt und internem Standard dienten als 100 %-Referenzwert. Durch Vergleich der jeweiligen Peakflächenverhältnisse aus Analyt und internem Standard ergaben sich folgende absolute Wiederfindungsraten (Tabelle 6):

Tab. 6 Absolute Wiederfindung für die Bestimmung von Formamid in Urin (n = 3 bzw. 6).

Dotierte Konzentration	4 mg/L	16 mg/L
Analyt/IS-Verhältnis bei Dotierung vor der Aufarbeitung, Mittelwert n = 6	4,16	13,94
Analyt/IS-Verhältnis bei Dotierung nach der Aufarbeitung, Mittelwert n = 3, Referenzwert	4,23	13,17
Wiederfindung	98,2 %	106 %

9.3 Bestimmungsgrenze

Bei Erstellung der Kalibrierung konnte die unterste Dotierung von 0,5 mg/L noch klar von dem Eigengehalt des für die Kalibrierung verwendeten Urins (1,29 mg/L) unterschieden werden, wobei die Abweichung vom Sollwert < 20 % betrug. Unter den 47 bislang mit dieser Methode untersuchten Urinproben wurde als niedrigste Formamidkonzentration 0,76 mg/L gefunden.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich für die Bestimmung von Formamid in Urin eine Bestimmungsgrenze von 0,5 mg/L.

9.4 Störeinflüsse

Bei der Bestimmung von Formamid in Urin mittels GC-MS kann es bei Direktinjektion des Urins zu Formamidbildung im Injektor kommen, die eine korrekte Bestimmung des Formamidgehaltes in der Probe nicht zulässt.

In der vorliegenden GC-MS-Methode wurde zur Vermeidung einer artifiziellen Formamidbildung ein möglichst salz- und proteinfreier Urinextrakt, der lyophilisiert und anschließend mit Methanol extrahiert wurde, injiziert. Zudem wurde mit Kaltaufgabesystem im Temperaturbereich von 120–180 °C gearbeitet.

Aus den EI-Spektren ist ersichtlich, dass das $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Formamid (Molekülion $m/z = 47$) zu einem geringen Anteil (ca. 15 %) auf $m/z = 45$ fragmentiert. Aus diesem Grund wurde der interne Standard in einer Konzentration von 1 mg/L Urin zu den Proben dotiert, damit das Fragment $m/z = 45$ die Quantifizierung des Analyten nicht stört. Alternativ könnte die Verwendung des d_3 -Formamids (Molekülion $m/z = 48$) als interner Standard in Erwägung gezogen werden.

Da Spuren von Wasser einen deutlichen Verlust an Nachweisempfindlichkeit bewirken, ist die vollständige Entfernung des Wassers aus der Urinprobe der entscheidende Schritt bei der Probenaufarbeitung. Dabei hängt die Dauer der Lyophilisierung außer von den technischen Gegebenheiten auch vom Gehalt an nichtflüchtigen Anteilen in Urin ab. So benötigt hoch konzentrierter Urin längere Lyophilisierungszeiten als gering konzentrierter Urin.

Die Einstellung der Injektorbedingungen zur Vermeidung von Artefaktbildung [Hill 2002] wurde mit synthetischem Urin, dem Ammoniumformiat zugesetzt war, eingehend untersucht. Es zeigte sich, dass Artefaktbildung weitestgehend vermieden werden kann, wenn die Probe nicht bei 180 °C, sondern bei 120 °C mit anschließendem Anstieg auf 180 °C, injiziert wird. Unter diesen Bedingungen wurde bei einer Konzentration von 1 g Ammoniumformiat/L synthetischem Urin eine Artefaktbildung in der Größenordnung von 1 mg/L festgestellt. Noch geringere Starttemperaturen verursachen schlechtere Ausbeuten.

10 Diskussion der Methode

Die vorliegende Methode erlaubt eine schnelle, sensitive, präzise und vor allem artefaktarme Quantifizierung von Formamid in Humanurin. Die Empfindlichkeit der

Methode erlaubt die Bestimmung von Formamid nicht nur im arbeitsmedizinischen, sondern auch im umweltmedizinischen Bereich.

Die Methodenkenndaten können als gut bezeichnet werden und wurden durch den Prüfer der Methode bestätigt.

Eine weitgehende Befreiung des GC-Injektionsextraktes von methanol-unlöslichen Urinbestandteilen ist nicht nur zur Schonung von Gerät und Säule, sondern vor allem wegen der Vermeidung einer möglichen artifiziellen Formamidbildung im Injektor, ein wesentlicher Bestandteil der Methode. Die Befunde von Lareo et al. [Lareo et al. 1995b] sprechen deutlich für die Möglichkeit einer Artefaktbildung bei Injektion von unaufgearbeiteten Urinproben. Diese Autoren fanden zum einen relativ hohe Formamidkonzentrationen bei beruflich nicht belasteten Personen (Mittel: 8,6 mg/L), zum anderen verdreifachte sich der von ihnen gemessene Formamidgehalt bei Erhöhung der Injektortemperatur von 200 auf 250 °C.

Hingegen wurde unter Verwendung der vorliegenden Methode in einem Kollektiv von 47 unbelasteten Personen eine durchschnittliche Formamidkonzentration von 2,4 mg pro Liter Urin (Bereich: 0,76–5,8 mg/L) bestimmt. Für die im Kollektiv vorhandenen 21 Raucher wurde eine mittlere Formamidkonzentration von 1,9 mg/L (Bereich: 0,76–4,6 mg/L) gemessen. Für die 26 Nichtraucher lag die Konzentration bei 2,9 mg/L (Bereich: 0,94–5,8 mg/L). Ein Einfluss des Rauchens wurde somit nicht festgestellt. Unsere Untersuchungen zeigen weiter, dass bei Anwendung der beiden in dieser Methode angewendeten Maßnahmen zur Artefaktverhinderung (Methanolextraktion des Lyophilisats und eine Injektortemperatur von anfänglich 120 °C) mit einer artifiziellen Formamidbildung deutlich unter 1 mg/L zu rechnen ist.

Da mit der vorliegenden Methode Hintergrundgehalte der beruflich nicht gegenüber Formamid exponierten Allgemeinbevölkerung bestimmt werden können, ist die Methode auch geeignet den Formamidgehalt in Urin beruflich belasteter Arbeiter zu quantifizieren.

11 Literatur

- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (2017) formamide. In: Documentation of TLVs and BEIs, ACGIH, Cincinnati, OH, USA
- 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 (2008) Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärztebl 105: A341–355
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2017) List of MAK and BAT Values 2017, Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area, Report 53, Wiley-VCH, Weinheim <https://doi.org/10.1002/9783527812110>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2011) Information on registered substances. Dataset on formamide (CAS Number 75-12-7), joint submission/individual submission,

- <https://echa.europa.eu/de/information-on-chemicals/registered-substances/-/disreg/substance/100.000.766> (aufgerufen am 11.10.2017)
- Fail PA, George JD, Grizzle TB, Heindel JJ (1998) Formamide and dimethylformamide: reproductive assessment by continuous breeding in mice. *Reprod Toxicol* 12: 317–332
- Greim H (Hrsg) (2001) Formamid, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 32. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://doi.org/10.1002/3527600418.mb7512d0032>
- Hill A, Orgel LE (2002) Synthesis of adenine from HCN tetramer and ammonium formate. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 32: 99–102
- Lareo AC, Perbellini L (1995a) Biological monitoring of workers exposed to N-N-dimethylformamide. II. Dimethylformamide and its metabolites in urine of exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 67: 47–52
- Lareo AC, Perico A, Bavazzano P, Soave C, Perbellini L (1995b) Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide. I. Methods of analysis. *Int Arch Occup Environ Health* 67: 41–46
- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) (2016) Registry of toxic effects of chemical substances (RTECS), NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards: Formamide. NIOSH, Cincinnati, OH, USA.
<https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0295.html>
(aufgerufen am 11.10.2017)
- NTP (National Toxicology Program) (1992a) Final report on the reproductive toxicity of formamide (FORM) in CD-1 Swiss mice. Research Triangle Inst, Research Triangle Park, NC 27709, PB93–109213, NTIS, Springfield, VA, USA
<https://ntrl.ntis.gov/NTRL/>
(aufgerufen am 11.10.2017)
- NTP (National Toxicology Program) (1992b) Final report on the reproductive toxicity of formamide (FORM) in CD-1 Swiss mice. Research Triangle Inst, Research Triangle Park, NC 27709, PB93–109221, NTIS, Springfield, VA, USA
<https://ntrl.ntis.gov/NTRL/>
(aufgerufen am 11.10.2017)
- Römpp (2017) Thieme Römpp Online. Lexikon. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Snyder R (1990) Ethel Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents. Volume II: Nitrogen and Phosphorous Solvents. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- TA Luft (2002) Gemeinsames Ministerialblatt (2002), Heft 25–29, S. 511–605; Carl Heymanns Verlag KG, Köln
- Entwickler der Methode: G. Scherer, G. Gilch
Prüfer der Methode: B. Aust, M. Blaszkewicz
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

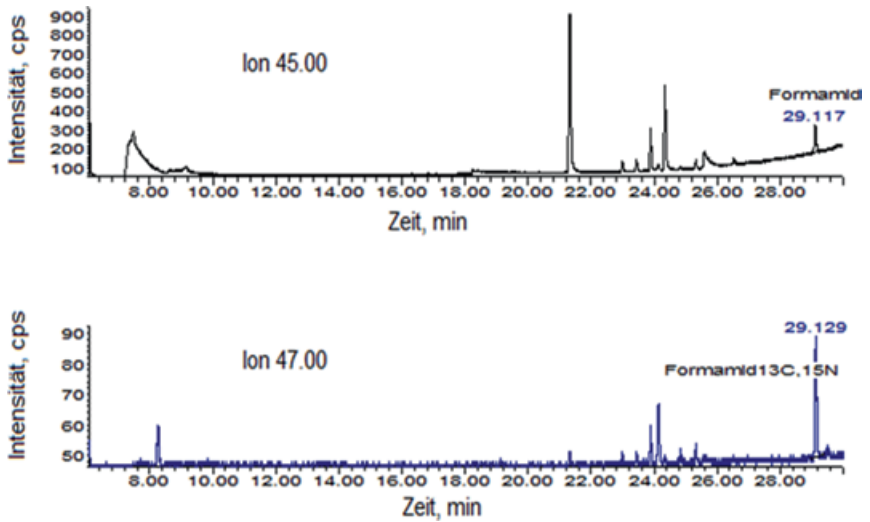


Abb. 1 Chromatogramm eines Humanurins nach Lyophilisierung und Extraktion mit Methanol bei einer Formamidkonzentration von 3,63 mg/L (oben: Massenspur des Formamids; unten: Massenspur des $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Formamid).

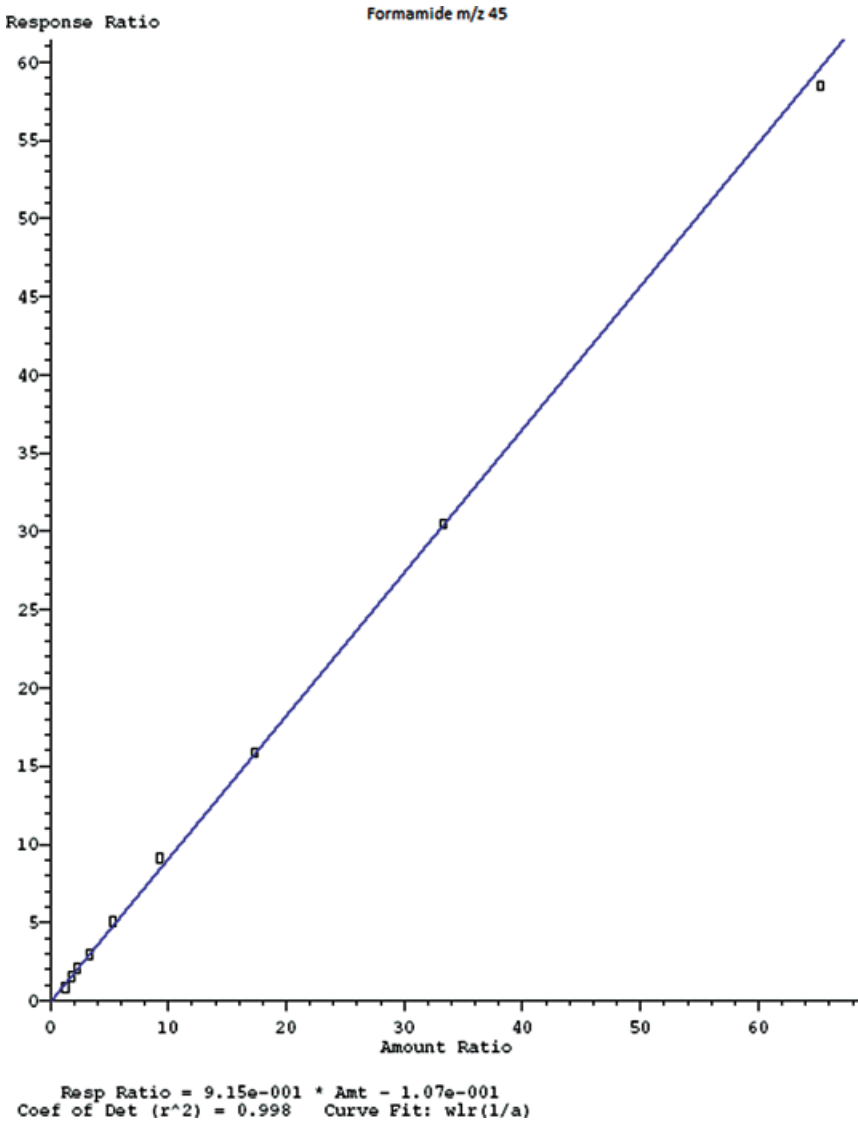


Abb. 2 Kalibrierung für Formamid in Urin (Bereich 0,5–64 mg/L) mit Bezug auf den internen Standard $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Formamid. Der Eigengehalt des dotierten Humanurins beträgt 1,29 mg/L. Die Kalibrierpunkte sind Mittelungen einer Doppelbestimmung.