

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Benzol, Toluol, *o*-Xylol, *m*-Xylol, *p*-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol) – Bestimmung von Aromaten in Urin mittels dynamischer Headspace-GC-MS

Biomonitoring-Methode

J. Van Pul¹, B. Roßbach², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

¹ Methodentwicklung, BASF Antwerpen NV, Analytical Services - Central Laboratory, Scheldelaan 600, B-2040 Antwerpen, Belgien

² Methodenprüfung, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Obere Zahlbacher Straße 67, 55131 Mainz

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, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

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

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

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

Keywords: Benzol; Toluol; Xylol; Ethylbenzol; Styrol; Isopropylbenzol; Cumol; Biomonitoring; Urin; Headspace-GC-MS

Citation Note: Van Pul J, Roßbach B, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Benzol, Toluol, *o*-Xylol, *m*-Xylol, *p*-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol) – Bestimmung von Aromaten in Urin mittels dynamischer Headspace-GC-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2018 Jul;3(3):1705-1729]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2025. https://doi.org/10.34865/bi7143d0022a_w

Neuveröffentlichung (Online): 12 Dez 2025

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi7143d0022a>

Manuskript abgeschlossen: 10 Okt 2013

Erstveröffentlichung (Online): 26 Jul 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.

Benzene, toluene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, styrene, isopropylbenzene (cumene) – Determination of aromatic compounds in urine by dynamic headspace GC-MS

[Benzol, Toluol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol) – Bestimmung von Aromaten in Urin mittels dynamischer Headspace-GC-MS]

Biomonitoring Methods in German language

J. Van Pul¹, B. Roßbach², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi7143d0022a

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 analytical method described hereinafter permits the simultaneous determination of the following unmetabolised aromatic compounds in urine: benzene, toluene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, styrene and isopropylbenzene (cumene). Prior to the determination of the analytes by GC-MS, the analytes are extracted and enriched using ITEX (In Tube Extraction) or SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction). To this end, the urine samples are incubated at 50 °C, the analytes extracted from the gas phase and then the enriched analytes are transferred to the gas chromatograph and analysed using mass spectrometry. Calibration standards are prepared in water and processed in the same way as the samples to be analysed. Deuterated benzene is used as internal standard.

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

Benzol; Toluol; o-Xylol; m-Xylol; p-Xylol; Ethylbenzol; Styrol; iso-Propylbenzol; Cumol; Aromaten; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; SPDE; ITEX; Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie; HS-GC-MS

Author Information

¹ Entwickler der Methode, BASF Antwerpen NV, Analytical Services – Central Laboratory, Scheldelaan 600, B-2040 Antwerpen

² Prüfer der Methode, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Obere Zahlbacher Straße 67, 55131 Mainz

³ 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

⁴ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauererring 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)

Benzol, Toluol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol) – Bestimmung von Aromaten in Urin mittels dynamischer Headspace-GC-MS

| | |
|-----------------------------|--|
| Matrix: | Urin |
| Arbeitsstoffe: | Benzol, Toluol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Ethylbenzol, Styrol, iso-Propylbenzol (Cumol) |
| Analyt. Messprinzip: | Dynamische Headspace-Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HS-GC-MS) |
| Abgeschlossen im: | Oktober 2013 |

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

| Arbeitsstoff | CAS | Parameter | CAS |
|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| Benzol | 71-43-2 | Benzol | 71-43-2 |
| Toluol | 108-88-3 | Toluol | 108-88-3 |
| o-Xylol | 95-47-6 | o-Xylol | 95-47-6 |
| m-Xylol | 108-38-3 | m-Xylol | 108-38-3 |
| p-Xylol | 106-42-3 | p-Xylol | 106-42-3 |
| Ethylbenzol | 100-41-4 | Ethylbenzol | 100-41-4 |
| Styrol | 100-42-5 | Styrol | 100-42-5 |
| iso-Propylbenzol (Cumol) | 98-82-8 | iso-Propylbenzol (Cumol) | 98-82-8 |

Zusammenfassung

Das beschriebene Analyseverfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der folgenden unmetabolisierten aromatischen Verbindungen in Urin: Benzol, Toluol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol). Vor der Bestimmung der Analyten mittels GC-MS erfolgt eine Extraktion und Anreicherung der Analyten mit ITEX (In Tube Extraction) bzw. SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction). Dazu werden die Urinproben bei 50 °C inkubiert, die Analyten aus der Gasphase extrahiert und die angereicherten Analyten in den Gaschromatographen

überführt und massenspektrometrisch analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Wasser angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Als interner Standard wird deuteriertes Benzol eingesetzt.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Benzol

| | | |
|--|--|-------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 4,0 \%$ bzw. $1,9 \%$ |
| | Streubereich | $u = 9,5 \%$ bzw. $4,5 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Benzol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 12,4 \%$ bzw. $6,1 \%$ |
| | Streubereich | $u = 28,6 \%$ bzw. $14,1 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Benzol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 107 \%$ bzw. 106% |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Benzol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | 0,007 μg Benzol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 0,021 μg Benzol pro Liter Urin | |

Toluol

| | | |
|--|--|-------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,2 \%$ bzw. $1,8 \%$ |
| | Streubereich | $u = 5,2 \%$ bzw. $4,3 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Toluol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 21,8 \%$ bzw. $2,6 \%$ |
| | Streubereich | $u = 50,3 \%$ bzw. $6,0 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Toluol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 110 \%$ bzw. 107% |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Toluol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | 0,029 μg Toluol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 0,087 μg Toluol pro Liter Urin | |

o-Xylol

| | | |
|---|---------------------------|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,3 \%$ bzw. $1,6 \%$ |
| | Streubereich | $u = 5,4 \%$ bzw. $3,8 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ o-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |

1708 Biomonitoring Methods

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------|
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 4,3 \%$ bzw. $4,7 \%$ |
| | Streubereich | $u = 9,9 \%$ bzw. $10,8 \%$ |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ o-Xylol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 117 \%$ bzw. 100% |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ o-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | $0,015 \mu\text{g}$ o-Xylol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | $0,045 \mu\text{g}$ o-Xylol pro Liter Urin | |

m-Xylol

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,6 \%$ bzw. $1,5 \%$ |
| | Streubereich | $u = 6,1 \%$ bzw. $3,6 \%$ |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ m-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 5,0 \%$ bzw. $5,2 \%$ |
| | Streubereich | $u = 11,5 \%$ bzw. $12,0 \%$ |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ m-Xylol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 122 \%$ bzw. 102% |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ m-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | $0,011 \mu\text{g}$ m-Xylol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | $0,033 \mu\text{g}$ m-Xylol pro Liter Urin | |

p-Xylol

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,1 \%$ bzw. $1,4 \%$ |
| | Streubereich | $u = 5,0 \%$ bzw. $3,3 \%$ |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ p-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 4,9 \%$ bzw. $5,8 \%$ |
| | Streubereich | $u = 11,3 \%$ bzw. $13,4 \%$ |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ p-Xylol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 103 \%$ bzw. 99% |
| | bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ p-Xylol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | $0,011 \mu\text{g}$ p-Xylol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | $0,033 \mu\text{g}$ p-Xylol pro Liter Urin | |

Ethylbenzol

| | | |
|---|--|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,2 \%$ bzw. $1,6 \%$ |
| | Streubereich | $u = 5,2 \%$ bzw. $3,8 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Ethylbenzol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 4,5 \%$ bzw. $5,2 \%$ |
| | Streubereich | $u = 10,4 \%$ bzw. $12,0 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Ethylbenzol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 102 \%$ bzw. 101% |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Ethylbenzol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Nachweisgrenze: | 0,010 μg Ethylbenzol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 0,030 μg Ethylbenzol pro Liter Urin | |

Styrol

| | | |
|--|---|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 3,1 \%$ bzw. $1,8 \%$ |
| | Streubereich | $u = 7,3 \%$ bzw. $4,3 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Styrol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 4,1 \%$ bzw. $5,9 \%$ |
| | Streubereich | $u = 9,5 \%$ bzw. $13,6 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Styrol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 117 \%$ bzw. 97% |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Styrol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Nachweisgrenze: | 0,014 μg Styrol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 0,042 μg Styrol pro Liter Urin | |

iso-Propylbenzol (Cumol)

| | | |
|---|---------------------------|------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 2,4 \%$ bzw. $1,9 \%$ |
| | Streubereich | $u = 5,7 \%$ bzw. $4,5 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Cumol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen | | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 5,6 \%$ bzw. $4,7 \%$ |
| | Streubereich | $u = 12,9 \%$ bzw. $10,8 \%$ |
| bei einer dotierten Konzentration von $0,15 \mu\text{g}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Cumol pro Liter Urin und $n = 9$ Bestimmungen | | |

1710 Biomonitoring Methods

| | | |
|--------------------|-------------------------------|--|
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 98 \%$ bzw. 100 % bei einer dotierten Konzentration von 0,15 µg bzw. 1,5 µg Cumol pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen |
| Nachweisgrenze: | 0,012 µg Cumol pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 0,036 µg Cumol pro Liter Urin | |

Allgemeine Informationen zu den Arbeitsstoffen. Am Arbeitsplatz werden aromatische Verbindungen zumeist in Lösungsmittelgemischen eingesetzt, so dass belastete Personen häufig gegenüber mehreren der eingangs genannten Verbindungen exponiert sind. Alle mit der vorliegenden Methode bestimmbar Aromaten wurden durch die Kommission toxikologisch bewertet. Details zur toxikologischen Bewertung können den jeweiligen MAK- und BAT-Begründungen der Einzelstoffe entnommen werden. Eine Zusammenfassung der einzelnen Einstufungen ist in Tabelle 1 dargestellt. Für Benzol und Toluol liegen mittlerweile auch Beurteilungswerte für die unmetabolisierten Verbindungen im Urin vor (siehe Tabelle 1). Abbildung 1 zeigt die Strukturen der mit der vorliegenden Methode bestimmbar Analyten.

Mit der vorliegenden Methode werden die nicht metabolisierten Aromaten im Urin analysiert. Somit eignet sich die Methode vorwiegend für eine akute Exposition, die Stunden bis wenige Tage vor der Probenahme stattgefunden hat.

Benzol kommt in der Natur im Rohöl vor und wird auch bei Vulkanausbrüchen sowie Waldbränden emittiert. Zu einer nicht-beruflichen Exposition kommt es vor allem durch Tabakrauch sowie beim Betanken von Fahrzeugen und durch Autoabgase [Arnold et al. 2013]. 1 000 000 bis 10 000 000 t Benzol werden pro Jahr als Reinsubstanz im Europäischen Wirtschaftsraum produziert bzw. in den Europäischen Wirtschaftsraum importiert.

Tab. 1 Einstufung der aromatischen Verbindungen durch die Kommission [DFG 2017]^a

| Substanz | H-, S-Mark. | Krebs-erzeugend Kategorie | Keimzell-mutagen Kategorie | Beurteilungswert im Urin | Max. Arbeitsplatzkonzentration (MAK) |
|----------------------|-------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Benzol | H | 1 | 3A | BAR: 0,3 µg/L EKA | – |
| Toluol | H | – | – | BAT: 75 µg/L | 50 mL/m ³ |
| Xylol (alle Isomere) | H | – | – | – | 100 mL/m ³ |
| Ethylbenzol | H | 4 | – | – | 20 mL/m ³ |
| Styrol | – | 5 | – | – | 20 mL/m ³ |
| Cumol | H | 3B | – | – | 10 mL/m ³ |

^a BAT: Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert; BAR: Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert; EKA: Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe

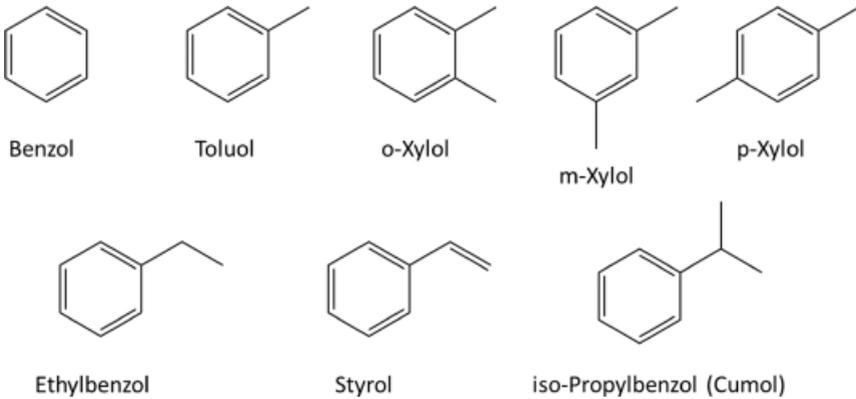


Abb. 1 Strukturformeln der Analyten.

Was die industrielle Verwendung von Benzol anbelangt, so wird es für die Produktion verschiedenster Chemikalien, wie beispielsweise Styrol, Cumol und Cyclohexan verwendet, die wiederum für die Herstellung von Kunststoffen, Harzen, Nylon und anderen Synthesefasern eingesetzt werden. Benzol wird darüber hinaus in der Herstellung von Gummi, Schmierstoffen, Farben, Detergentien, Arzneimitteln und Pestiziden eingesetzt. Aufgrund seiner kanzerogenen Eigenschaften ist Benzol als Lösungsmittel nicht mehr in Verwendung [Römpp 2017] und unterliegt nach der REACH-VO (Anhang XVII) strengen Anwendungsbeschränkungen. Benzol wird nach oraler und inhalativer Exposition gut resorbiert, kumuliert in fetthaltigem Gewebe und ist plazentagängig. Auch eine perkutane Resorption von Benzol ist möglich [Henschler 1988; 1992]. Es ist bekannt, dass rund 50 % des eingeatmeten Benzols resorbiert werden. In Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität werden durchschnittlich 12 % der Gesamtmenge des aufgenommenen Benzols innerhalb weniger Stunden wieder abgeatmet. Rund 33 % der aufgenommenen Benzolmenge werden über den Urin ausgeschieden, davon ungefähr 24 % in Form von konjugierten Phenolen. Benzolmetabolite in Urin werden schon lange als zuverlässige Parameter zur Überwachung einer berufs- und umweltbedingten Exposition gegenüber Benzol genutzt [Carrieri et al. 2010; Ghittori et al. 1995; Pople et al. 2002; Weisel 2010]. Unverändertes Benzol wird lediglich zu einem Anteil von ungefähr 0,2 % über den Urin ausgeschieden. Dennoch eignet sich dieser Parameter gut für ein Biomonitoring von Benzol, vor allem im Niedrigdosisbereich [Campagna et al. 2014; Fustinoni et al. 2005]. Die Ausscheidung von Benzol und seinen Metaboliten mit dem Urin ist innerhalb von 24 bis 48 h nach Expositionsende abgeschlossen.

Toluol ist in Benzin enthalten und gelangt auch durch Autoabgase in die Umwelt. Weiterhin wird es bei Vulkanausbrüchen und Waldbränden freigesetzt. Industriell wird Toluol insbesondere als Lösungsmittel für Farben, Harze, Lacke und Klebstoffe

1712 Biomonitoring Methods

und auch für die Extraktion von Naturstoffen verwendet. Es ist weiterhin ein wichtiger Ausgangsstoff für zahlreiche chemische Synthesen [Henschler 1986; Römpf 2017]. Die Aufnahme von Toluol kann sowohl inhalativ [Henschler 1986], als auch dermal [Greim 1998] erfolgen.

Technisches Xylol besteht aus einer Mischung von o-, m- und p-Xylol, so dass in der Praxis zumeist eine Mischexposition gegenüber allen drei Isomeren vorliegt. Xylole werden sowohl als Lösungsmittel für Öle, Fette, Harze, Lacke und Farben als auch zur Entfettung von Metallen verwendet. o-Xylol und p-Xylol stellen zudem Ausgangssubstanzen für die Herstellung von Phthalsäureanhydrid und Terephthalsäure dar [Arpe 2007; Römpf 2017]. In die Atmosphäre gelangt Xylol vorrangig durch Autoabgase oder andere Verbrennungsprozesse. Xylol wird hauptsächlich inhalativ aufgenommen, darüber hinaus ist auch die dermale Resorption von Bedeutung.

Ethylbenzol wird durch Alkylierung von Benzol mit Ethylen hergestellt und wird sowohl als Lösungs- und Verdünnungsmittel als auch als Ausgangsstoff für die Styrolsynthese verwendet [Arpe 2007; Römpf 2017]. Die Aufnahme erfolgt über die Lunge, in geringerem Umfang auch über die Haut.

Styrol und Cumol werden industriell als Ausgangsmaterialien zur Herstellung verschiedener Produkte verwendet.

Styrol wird insbesondere für die Produktion von Polymeren (Polystyrol) verwendet. Der Hauptaufnahmeweg ist inhalativ, die Aufnahme über die Haut spielt eine untergeordnete Rolle [Henschler 1987].

Cumol wird vorrangig für die Synthese von Aceton, Phenol und α -Methylstyrol eingesetzt. Aus arbeitsmedizinischer Sicht stehen die inhalative und perkutane Resorption im Vordergrund [Lehnert und Greim 2001].

Seit 2016 existiert ein Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert für Benzol in Urin in Höhe von 0,3 $\mu\text{g/L}$ (BAR) sowie eine EKA (Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe)-Korrelation (siehe Tabelle 2). Für unverändertes Toluol in Urin liegt ein Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert (BAT) in Höhe von 75 $\mu\text{g/L}$ vor (vgl. Tabelle 1).

In der wissenschaftlichen Literatur sind einige Studien veröffentlicht, in denen die Gehalte an unmetabolisierten aromatischen Verbindungen in Urin in der Allgemeinbevölkerung oder in beruflich belasteten Kollektiven gemessen wurden (vgl. Tabelle 3). In diesen finden sich vor allem Daten zum unmetabolisierten Benzol in Urin.

Nach Janasik et al. [2008] folgt die Ausscheidung unmetabolisierter aromatischer Verbindungen im Urin einem Zwei-Kompartiment-Modell mit Halbwertszeiten von 0,45 bis 0,88 h in der ersten Phase und von 6,7 bis 19,2 h in der zweiten Phase. In Abhängigkeit von der Expositions-dosis ist die Ausscheidung der unmetabolisierten Verbindungen im Urin sehr gering und liegt für alle untersuchten Aromaten in der Regel unter 0,1 % [Janasik et al. 2008].

Tab. 2 Auszug aus der EKA-Korrelation von Benzol [DFG 2017].

| Luft Benzol [mg/m ³] | Urin Benzol [µg/L] |
|----------------------------------|--------------------|
| 0,1 | 0,5 [*] |
| 0,2 | 0,8 [*] |
| 0,5 | 1,5 |
| 1,0 | 2,75 |
| 2,0 | 5,0 |
| 3,3 | 7,5 |
| 6,5 | 12,5 |

* für Nichtraucher abgeleitet

Tab. 3 Gehalte unmetabolisierter aromatischer Verbindungen in Urin sowohl in der Allgemeinbevölkerung als auch in beruflich belasteten Kollektiven.

| Studie | Kollektiv | Probenanzahl n | Gehalt der aromatischen Verbindung in Urin, Median (95. Perzentil) [µg/L] | | | | |
|------------------------|----------------------------|----------------|---|--------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| | | | Benzol | Toluol | m-/p-Xylol | o-Xylol | Ethylbenzol |
| Basilicata et al. 2005 | Arbeiter ¹ | 11 | 0,21 (>3,0) | | | | |
| Fustinoni et al. 2005 | Arbeiter ² , NR | 46 | 0,34 (2,84) ^a | | | | |
| | Arbeiter ² , R | 32 | 1,17 (5,11) ^a | | | | |
| Manini et al. 2008 | Arbeiter ³ , NR | 80 | 0,16 (0,19) ^b | 0,19 (0,22) ^b | 0,35 (0,44) ^b | | 0,40 (0,47) ^b |
| | Arbeiter ³ , R | 20 | 0,79 (1,92) ^b | 0,27 (0,38) ^b | 0,43 (0,62) ^b | | 0,46 (0,61) ^b |
| Fustinoni et al. 2010 | Allgemeinbev., NR | 65 | 0,09 (0,18) | 0,38 (0,51) | 0,12 (0,17) | 0,04 (0,06) | 0,07 (0,13) |
| | Allgemeinbev., R | 43 | 0,44 (2,70) | 0,44 (0,70) | 0,13 (0,22) | 0,04 (0,08) | 0,07 (0,12) |
| Campagna et al. 2014 | Allgemeinbev., NR | 86 | 0,09 (0,31) | | | | |

NR = Nichtraucher, R = Raucher; ¹ Arbeiter im Benzinlager, ² Tankstellenwärter, ³ Verkehrspolizisten, ^a Max.-Wert, ^b 75. Perzentil

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|--|------|
| 1 | Grundlage des Verfahrens | 1714 |
| 2 | Geräte, Chemikalien und Lösungen | 1715 |
| 2.1 | Geräte | 1715 |
| 2.2 | Chemikalien | 1715 |
| 2.3 | Interner Standard (IS) | 1716 |
| 2.4 | Vergleichsstandards | 1716 |
| 3 | Probenahme und Probenaufbereitung | 1716 |
| 4 | Instrumentelle Arbeitsbedingungen | 1717 |
| 4.1 | Headspace-Autosampler | 1717 |
| 4.2 | Gaschromatographie | 1718 |
| 4.3 | Massenspektrometrie | 1719 |
| 5 | Analytische Bestimmung | 1719 |
| 6 | Kalibrierung | 1720 |
| 7 | Berechnung der Analyseergebnisse | 1720 |
| 8 | Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung | 1720 |
| 9 | Beurteilung des Verfahrens | 1720 |
| 9.1 | Präzision | 1721 |
| 9.2 | Richtigkeit | 1722 |
| 9.3 | Matrixeffekte | 1722 |
| 9.4 | Nachweis- und Bestimmungsgrenzen | 1722 |
| 9.5 | Störeinflüsse | 1723 |
| 10 | Diskussion des Verfahrens | 1724 |
| 11 | Literatur | 1726 |
| 12 | Anhang | 1728 |

1 Grundlage des Verfahrens

Das beschriebene Analyseverfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der folgenden unmetabolisierten aromatischen Verbindungen in Urin: Benzol, Toluol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Ethylbenzol, Styrol und iso-Propylbenzol (Cumol). Vor der Bestimmung der Analyten mittels GC-MS erfolgt eine Extraktion und Anreicherung der Analyten mit ITEX (In Tube Extraction) bzw. SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction). Dazu werden die Urinproben bei 50 °C inkubiert, die Analyten aus der Gasphase extrahiert und die angereicherten Analyten in den Gaschromatographen überführt und massenspektrometrisch analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Wasser angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Als interner Standard wird deuteriertes Benzol eingesetzt.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor (z. B. Agilent 6890 mit Agilent 5975) und Datenverarbeitungssystem (z. B. Agilent Chemstation)
- Kapillargaschromatographische Säule: stationäre Phase: VF-WAXms, Länge: 60 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,5 μm (z. B. VF-WAXms, Agilent, Nr. CP9223)
- Autosampler mit dynamischer Headspace-Option, z. B. In Tube Extraktion (ITEX) oder Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) (z. B. CombiPal von CTC Analytics AG) optional mit Kühlfalle (z. B. JAS)
- Muffelofen
- Analysenwaage (z. B. Sartorius)
- 20 mL-Headspace-Probengläschen mit Schraubverschluss (z. B. Supelco, Nr. SU860097)
- Schraubverschlüsse mit Septum aus weißem Silikon/rotem PTFE (z. B. LaPha Pack, Nr. 18031578)
- Verschiedene Messkolben (z. B. Brand)
- Mikroliterspritzen
- Mikroliterpipetten, variabel zwischen 10 und 100 μL sowie zwischen 100 und 1000 μL mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf Reference 10–100 μL und 100–1000 μL)

2.2 Chemikalien

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

- Benzol (z. B. Merck, Nr. 101783)
- D₆-Benzol (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 522104)
- Ethylbenzol (z. B. Merck, Nr. 801372)
- Kaliumcarbonat (z. B. Merck, Nr. 104924)
- Methanol (z. B. Merck, Nr. 106011)
- iso-Propylbenzol (Cumol) (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 36698)
- Styrol (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 45993)
- Toluol (z. B. Merck, Nr. 100849)
- m-Xylol, 99 % (z. B. Alfa Aesar, Nr. L03788)
- o-Xylol, 99 % (z. B. Alfa Aesar, Nr. A11358)
- p-Xylol, 99 % (z. B. Alfa Aesar, Nr. A10534)
- Hochreines Wasser (z. B. Millipore Milli-Q)
- Helium 5.0 (z. B. Linde)
- Stickstoff 5.0 (z. B. Linde)
- Urin von beruflich nicht gegenüber aromatischen Verbindungen exponierten Nichtrauchern (Poolurin)

1716 Biomonitoring Methods

2.3 Interner Standard (IS)

IS-Ausgangslösung (95 mg/L). In einen 100 mL-Messkolben werden etwa 50 mL Methanol vorgelegt und 10 µL D₆-Benzol zugefügt. Der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

IS-Dotierlösung (9,5 mg/L). In einen 20 mL-Messkolben werden etwa 10 mL Methanol vorgelegt und 2 mL der IS-Ausgangslösung zugefügt. Der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die Lösungen sind im Kühlschrank bei 4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

2.4 Vergleichsstandards

Ausgangslösung. In einen 100 mL-Messkolben werden etwa 50 mL Methanol vorgelegt und mit je 10 µL der Analyten versetzt. Der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt. Die Ausgangslösung enthält folgende Analytkonzentrationen: 91 mg/L Styrol, je 88 mg/L an Benzol und o-Xylol, je 87 mg/L an Toluol, m-Xylol, p-Xylol und Ethylbenzol sowie 86 mg/L Cumol.

Dotierlösung. 20 µL der Ausgangslösung werden in einen 20 mL-Messkolben pipettiert und dieser mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Dotierlösung enthält folgende Analytkonzentrationen: 91 µg/L Styrol, je 88 µg/L an Benzol und o-Xylol, je 87 µg/L an Toluol, m-Xylol, p-Xylol und Ethylbenzol sowie 86 µg/L Cumol.

Die Lösungen sind im Kühlschrank bei 4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen werden 20 mL-Headspacegläschen mit Stickstoff für etwa 30 s ausgespült, anschließend je 5 mL hochreines Wasser vorgelegt und mit 2 µL der Dotierlösung des IS versetzt. Die Gläschen werden verschlossen und mit einer 25 µL-Dosierspritze (Mikroliterspritze) werden die in Tabelle 4 aufgelisteten Volumina Dotierlösung durch das Septum zum Wasser gegeben. Die so präparierten Kalibrierlösungen werden gut durchmischt und können anschließend direkt für die Messung verwendet werden.

3 Probenahme und Probenaufbereitung

Die gewonnenen Urinproben werden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert. Vor der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Zur Analyse werden die Urinproben mit einem Salzüberschuss versetzt. Dazu wird Kaliumcarbonat vor der Verwendung drei Stunden lang bei 350 °C in einem Muffel-

Tab. 4 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards.

| Kalibrierpunkt | Volumen der Dotierlösung [µL] | Analytkonzentration im Kalibrierstandard [µg/L] | | | |
|----------------|-------------------------------|---|---------------------------------|--------|-------|
| | | Benzol, o-Xylol | Toluol, m-/p-Xylol, Ethylbenzol | Styrol | Cumol |
| K0 | – | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K1 | 5 | 0,88 | 0,87 | 0,91 | 0,86 |
| K2 | 10 | 1,8 | 1,7 | 1,8 | 1,7 |
| K3 | 20 | 3,5 | 3,5 | 3,6 | 3,4 |
| K4 | 40 | 7,0 | 7,0 | 7,3 | 6,9 |
| K5 | 60 | 10,6 | 10,4 | 10,9 | 10,3 |

ofen getrocknet. Anschließend wird das Salz im Exsikkator im Stickstoffstrom auf Raumtemperatur abgekühlt (mind. 30 min).

Zur Analyse werden genau 5 g ($\pm 0,1$ g) frisch getrocknetes Kaliumcarbonat in ein 20 mL-Headspacegläschen eingewogen. Das Headspacegläschen mit dem Salz wird gründlich mit Stickstoff gespült, anschließend wird ein 5 mL-Aliquot der Urinprobe zugegeben. Das Probengefäß wird möglichst schnell verschlossen und von Hand gut geschüttelt, wobei Lösungswärme freigesetzt wird. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (ca. 30 min) werden 2 µL der Dotierlösung des IS durch das Septum zugegeben.

Die Prüfung der Methode durch einen unabhängigen Prüfer hat ergeben, dass der Sättigungsschritt mit Kaliumcarbonat ggf. auch entfallen kann (siehe Abschnitt 9.5).

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die Messung erfolgt an einer Gerätekopplung bestehend aus einem Gaschromatographen mit einem Autosampler zur dynamischen Headspace-Extraktion (ITEX bzw. SPDE), einem massenselektiven Detektor (MSD) und einem Datenverarbeitungssystem.

4.1 Headspace-Autosampler

ITEX-Option

| | |
|---------------------|------------------|
| Inkubation: | 15 min bei 50 °C |
| Sorptionsmittel: | Tenax TA |
| Spritzentemperatur: | 110 °C |

1718 Biomonitoring Methods

| | |
|----------------------------------|----------------------|
| Extraktionsvolumen: | 1000 µL |
| Hubzahl: | 20 |
| Extraktionsgeschwindigkeit: | 50 µL/s |
| Desorptionsvolumen: | 750 µL |
| Desorptionstemperatur: | 250 °C (GC-Injektor) |
| Desorptions- geschwindigkeit: | 20 µL/s |
| Spülvorgang: | 10 min bei 250 °C |

SPDE-Option

| | |
|-----------------------------|--|
| Inkubation: | 24 min bei 50 °C |
| Sorptionsmittel: | Polydimethylsiloxan mit 10 % aktiviertem Kohlenstoff |
| Spritzentemperatur: | 60 °C |
| Kanülentemperatur: | -5 °C |
| Extraktionsvolumen: | 1250 µL |
| Hubzahl: | 40 |
| Extraktionsgeschwindigkeit: | 200 µL/s |
| Desorptionsgas: | Stickstoff |
| Desorptionsvolumen: | 250 µL |
| Desorptionstemperatur: | 250 °C (GC-Injektor) |
| Desorptionsgeschwindigkeit: | 50 µL/s |
| Spülvorgang: | 24 min bei 250 °C (Spülen mit Stickstoff) |

4.2 Gaschromatographie

| | | |
|----------------|----------------------|---|
| Kapillarsäule: | Stationäre Phase: | VF-WAXms |
| | Länge: | 60 m |
| | Innerer Durchmesser: | 0,25 mm |
| | Filmdicke: | 0,5 µm |
| Detektor: | MSD | |
| Temperaturen: | Säule: | Ausgangstemperatur 38 °C, 2 min halten, Anstieg mit 5 °C/min auf 130 °C, Anstieg mit 30 °C/min auf 220 °C, 7 min bei Endtemperatur |
| | Injektor: | 250 °C |
| | Transfer line: | 280 °C |
| Trägergas: | Helium 5.0 | |
| | Fluss: | 1,5 mL/min |
| Injektion: | Split 1:10 | |

4.3 Massenspektrometrie

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Ionisationsart: | Elektronenstoßionisation (EI) |
| Ionisationsenergie: | 70 eV |
| Quellentemperatur: | 230 °C |
| Quadrupoltemperatur: | 150 °C |
| Dwell time: | 50 ms |
| Detektionsmodus: | Single Ion Monitoring (SIM) |

Alle Parameter sind Richtwerte und gegebenenfalls nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 3 vorbereiteten Urinproben werden die Proben mittels dynamischer Headspace-Extraktion extrahiert und die Analyten in das GC-MS-System überführt. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der Retentionszeiten und charakteristischer Ionenspuren. Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 5 aufgeführten Ionenspuren im SIM-Modus registriert. Bei jeder Analysenserie werden eine Qualitätskontrollprobe und ein Reagenzienleerwert, bestehend aus hochreinem Wasser, mitanalysiert.

Die angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen zu überzeugen. In Abbildung 2 (im Anhang) ist beispielhaft das GC-MS-Chromatogramm eines Aromatenstandards abgebildet.

Tab. 5 Retentionszeiten und detektierte Ionenspuren der Analyten.

| Analyt | Retentionszeit [min] | Ionenspur [m/z] | |
|------------------------|----------------------|-----------------|-----------|
| | | Quantifier | Qualifier |
| Benzol | 9,55 | 78 | 77 |
| D ₆ -Benzol | 9,55 | 84 | 82 |
| Toluol | 12,40 | 91 | 92, 65 |
| Ethylbenzol | 15,00 | 91 | 106 |
| p-Xylol | 15,25 | 91 | 105, 106 |
| m-Xylol | 15,50 | 91 | 105, 106 |
| Cumol | 16,45 | 105 | 120 |
| o-Xylol | 16,90 | 91 | 105, 106 |
| Styrol | 19,05 | 104 | 78, 103 |

6 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards (siehe Abschnitt 2.4) werden analog zu den Urinproben entsprechend den Abschnitten 4 und 5 analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des IS gegen die jeweils dotierte Konzentration aufgetragen wird. Die Kalibriergeraden verlaufen für alle Analyten zwischen der Nachweisgrenze und dem obersten Kalibrierpunkt linear. Abbildung 3 (im Anhang) zeigt beispielhaft die Kalibriergeraden ausgewählter Analyten.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

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

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieser Publikationsreihe verfahren [Bundesärztekammer 2014; Bader et al. 2010]. Zur Präzisionskontrolle wird bei jeder Serie mindestens eine Qualitätskontrollprobe mit bekannter und konstanter Analytkonzentration mit untersucht. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu werden 5 mL-Aliquote von Poolurin in Headspacegläschen jeweils mit einer Standardlösung aller Analyten versetzt, so dass die Konzentration des Kontrollmaterials im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegt. Nach ausreichender Durchmischung wird das so hergestellte Qualitätskontrollmaterial bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Sollwerte und Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt [Bader et al. 2010]. Die Messwerte der mit jeder Analysenserie untersuchten Kontrollprobe sollten jeweils innerhalb der ermittelten Toleranzbereiche liegen.

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 Ermittlung der Präzision in Serie wurde Poolurin mit den Standardlösungen in zwei verschiedenen Konzentrationen dotiert und je achtfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte, indem mit denselben Konzentrationen dotierte Urinproben an neun aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und analysiert wurden. Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 6 Präzisionen in Serie für die Bestimmung der Aromaten im Urin (n = 8).

| Analyt | Dotierte Konzentration c = 0,15 µg/L | | Dotierte Konzentration c = 1,5 µg/L | |
|-------------|---|-------------------------|--|-------------------------|
| | Standardabweichung (rel.) s_w [%] | Streubereich u [%] | Standardabweichung (rel.) s_w [%] | Streubereich u [%] |
| | Benzol | 4,0 | 9,5 | 1,9 |
| Toluol | 2,2 | 5,2 | 1,8 | 4,3 |
| o-Xylol | 2,3 | 5,4 | 1,6 | 3,8 |
| m-Xylol | 2,6 | 6,1 | 1,5 | 3,6 |
| p-Xylol | 2,1 | 5,0 | 1,4 | 3,3 |
| Ethylbenzol | 2,2 | 5,2 | 1,6 | 3,8 |
| Styrol | 3,1 | 7,3 | 1,8 | 4,3 |
| Cumol | 2,4 | 5,7 | 1,9 | 4,5 |

Tab. 7 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung der Aromaten im Urin (n = 9).

| Analyt | Dotierte Konzentration c = 0,15 µg/L | | Dotierte Konzentration c = 1,5 µg/L | |
|-------------|---|-------------------------|--|-------------------------|
| | Standardabweichung (rel.) s_w [%] | Streubereich u [%] | Standardabweichung (rel.) s_w [%] | Streubereich u [%] |
| | Benzol | 12,4 | 28,6 | 6,1 |
| Toluol | 21,8 | 50,3 | 2,6 | 6,0 |
| o-Xylol | 4,3 | 9,9 | 4,7 | 10,8 |
| m-Xylol | 5,0 | 11,5 | 5,2 | 12,0 |
| p-Xylol | 4,9 | 11,3 | 5,8 | 13,4 |
| Ethylbenzol | 4,5 | 10,4 | 5,2 | 12,0 |
| Styrol | 4,1 | 9,5 | 5,9 | 13,6 |
| Cumol | 5,6 | 12,9 | 4,7 | 10,8 |

1722 Biomonitoring Methods

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde Poolurin mit den Aromaten dotiert und analysiert. Zur Ermittlung der Richtigkeit wurden im Poolurin vorhandene Hintergrundgehalte der Analyten vom Ergebnis abgezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8 Relative Wiederfindung für die Bestimmung der Aromaten in Urin (n = 8).

| Analyt | Dotierte Konzentration c = 0,15 µg/L | | Dotierte Konzentration c = 1,5 µg/L | |
|-------------|---|----------------|--|----------------|
| | mittlere rel. Wiederfindung [%] | Bereich [%] | mittlere rel. Wiederfindung [%] | Bereich [%] |
| Benzol | 107 | 86–118 | 106 | 102–110 |
| Toluol | 110 | 106–117 | 107 | 103–110 |
| o-Xylol | 117 | 113–121 | 100 | 96–102 |
| m-Xylol | 122 | 116–127 | 102 | 98–103 |
| p-Xylol | 103 | 98–107 | 99 | 95–100 |
| Ethylbenzol | 102 | 99–107 | 101 | 97–103 |
| Styrol | 117 | 111–125 | 97 | 93–99 |
| Cumol | 98 | 94–102 | 100 | 96–103 |

9.3 Matrixeffekte

Zusätzlich wurden vom Prüfer der Methode die Präzision und Richtigkeit der Methode in unterschiedlichen Urinproben untersucht. Dazu wurden sechs Individualurine (Kreatiningehalt von 0,28 bis 3,30 g/L) undotiert sowie mit den Analyten dotiert untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Ferner erfolgte vom Prüfer der Methode ein Vergleich der Kalibriergeraden, die in Wasser bzw. in Urin erstellt wurden. Hierfür wurden Kalibrierstandards in Wasser und Poolurin angesetzt (Leerwert, 0,1 bis 5,0 µg/L), analysiert und der Anstieg der ermittelten Kalibriergeraden verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

9.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mit der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 unter Verwendung von Kalibrierstandards in Wasser festgesetzt. Die so ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tab. 9 Präzision und relative Wiederfindung für die Bestimmung der Aromaten in unterschiedlichen Urinproben (n = 6).

| Analyt | Dotierte Konzentration c = 0,15 µg/L | | Dotierte Konzentration c = 1,5 µg/L | |
|-------------|---|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | mittlere rel. Wiederfindung | Standardab- weichung (rel.) | mittlere rel. Wiederfindung | Standardab- weichung (rel.) |
| | [%] | s _w [%] | [%] | s _w [%] |
| Benzol | 103 | 13,4 | 90 | 7,3 |
| Toluol | 110 | 9,9 | 99 | 7,6 |
| o-Xylol | 101 | 3,1 | 94 | 6,8 |
| m-Xylol | 218 | 4,5 | 84 | 7,0 |
| p-Xylol | 99 | 4,8 | 94 | 6,1 |
| Ethylbenzol | 99 | 4,9 | 95 | 5,8 |
| Styrol | 92 | 15,3 | 98 | 7,2 |
| Cumol | 100 | 3,7 | 94 | 6,7 |

Tab. 10 Vergleich der Steigungen der Kalibriergeraden in Wasser und Poolurin.

| Analyt | Anstieg der Kalibriergeraden in Wasser | Anstieg der Kalibriergeraden in Poolurin | Abweichung [%] |
|-------------|--|--|-------------------|
| Benzol | 0,196 | 0,196 | -0,4 |
| Toluol | 0,346 | 0,339 | -2,2 |
| o-Xylol | 0,430 | 0,411 | -4,5 |
| m-Xylol | 0,416 | 0,393 | +5,5 |
| p-Xylol | 0,431 | 0,412 | -4,6 |
| Ethylbenzol | 0,569 | 0,531 | -6,6 |
| Styrol | 0,220 | 0,205 | -7,0 |
| Cumol | 0,765 | 0,773 | -1,1 |

9.5 Störeinflüsse

Bei der Bestimmung unmetabolisierter aromatischer Verbindungen in Urin besteht die Gefahr, dass die Proben über die verwendeten Gerätschaften, durch die Laborluft oder durch Verunreinigungen in den verwendeten Chemikalien kontaminiert werden. Eine Kontamination mit den Analyten kann durch eine systematische Reinigung der verwendeten Gefäße und Laborgeräte im trockenen Stickstoffstrom vermieden bzw. reduziert werden. Zudem sollten nur hochreine Chemikalien eingesetzt wer-

1724 Biomonitoring Methods

Tab. 11 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten nach DIN 32645.

| Analyt | Nachweisgrenze [µg/L] | Bestimmungsgrenze [µg/L] |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| Benzol | 0,007 | 0,021 |
| Toluol | 0,029 | 0,087 |
| o-Xylol | 0,015 | 0,045 |
| m-Xylol | 0,011 | 0,033 |
| p-Xylol | 0,011 | 0,033 |
| Ethylbenzol | 0,010 | 0,030 |
| Styrol | 0,014 | 0,042 |
| Cumol | 0,012 | 0,036 |

den. Grundsätzlich ist das Mitführen von Reagenzienleerwerten zwingend erforderlich, die dann gegebenenfalls durch Korrekturfaktoren berücksichtigt werden müssen. So enthält beispielsweise der IS D₆-Benzol stets einen geringen Anteil an undeutertem Benzol.

Darüber hinaus fiel während der Methodenprüfung eine Kontamination des für den Aussalzschrift verwendeten Kaliumcarbonats mit mehreren der Analyten auf. Deshalb erfolgte die Prüfung der Methode ohne den beschriebenen Aussalzschrift, wobei die Validierung zu ähnlichen und zum Teil sogar besseren Zuverlässigkeitskriterien führte.

Um Störungen durch Hintergrundgehalte im Poolurin zu vermeiden, kann die Kalibrierung der Methode auch in Wasser erfolgen. Ein Vergleich der Kalibriergeraden in Wasser und Poolurin zeigte nur geringfügige Abweichungen (vgl. Abschnitt 9.3). Das zur Qualitätssicherung verwendete Kontrollmaterial sollte allerdings stets in Poolurin angesetzt werden.

10 Diskussion des Verfahrens

Die hier beschriebene Methode eignet sich zur simultanen Quantifizierung von acht unmetabolisierten aromatischen Verbindungen im Urin. Das Verfahren erlaubt eine sensitive Bestimmung der Analyten mit Nachweisgrenzen im Bereich von 0,01 bis 0,03 µg/L. Gleichzeitig ist die Methode für alle Analyten sehr präzise mit relativen Standardabweichungen (Präzision in Serie) unter 5 %. Obwohl nur D₆-Benzol als interner Standard eingesetzt wurde, ergaben sich für die einzelnen Analyten bei einer dotierten Konzentration von 1,5 µg/L, sehr gute relative Wiederfindungsraten zwischen 97 % und 107 %. Auch in Individualurinen konnten sehr gute Präzisionsdaten und Wiederfindungsraten bestimmt werden.

Generell kann die Bestimmung der unmetabolisierten Aromaten in Urin als sehr spezifisch angesehen werden, da physiologische Quellen dieser Aromaten nicht bekannt sind. Durch die sehr niedrigen Nachweisgrenzen ist es darüber hinaus auch

möglich, Hintergrundbelastungen z. B. mit Benzol zu erfassen. Allerdings besteht bei der Quantifizierung der unmetabolisierten Aromaten – anders als bei der Bestimmung der Metabolite – ein gewisses Kontaminationsrisiko (vgl. Abschnitt 9.5), so dass bei der Probenahme und auch bei der Probenaufarbeitung mit großer Sorgfalt vorgegangen werden muss. Darüber hinaus ist eine zielgerichtete Qualitätssicherung besonders wichtig.

Für das Biomonitoring unmetabolisierter aromatischer Verbindungen im Urin wird eine sehr empfindliche und gleichzeitig zuverlässige Analysemethode benötigt, da aufgrund verschiedener Maßnahmen die Gehalte an aromatischen Lösungsmitteln, sowohl am Arbeitsplatz als auch in der Außenluft, kontinuierlich zurückgegangen sind. Auch werden die aromatischen Verbindungen nur zu einem sehr geringen Anteil unmetabolisiert ausgeschieden.

Die hohe Sensitivität der Methode wird u. a. dadurch erreicht, dass die Analyten mittels dynamischer Headspace-Extraktion (ITEX bzw. SPDE) angereichert werden. Bei der sogenannten In-Tube-Extraktion (ITEX) wird zur Anreicherung der Analyten aus dem Urin eine beheizte Headspace-Spritze eingesetzt, die über eine mit Adsorbiermaterial (Tenax TA) gefüllte Mikrotrap zwischen Spritzenadel und Spritzenzylinder verfügt. Ein Teil des Headspacevolumens wird mit der Spritze wiederholt durch die Mikrotrap gezogen. Durch schnelles Erhitzen der Mikrotrap über den Siedepunkt werden die adsorbierten Analyte schließlich desorbiert und in den GC-Injektor eingebracht [Jochmann et al. 2008; Rasanen et al. 2010].

Ein Vorteil des ITEX-Verfahrens im Vergleich zum klassischen SPME-Verfahren besteht darin, dass sich viele Parameter individuell optimieren lassen. So können neben der Art und Menge des zum Aussalzen der Analyten verwendeten Salzes sowie der Inkubationstemperatur und -dauer auch das durch Hubzahl und Hubvolumen bestimmte Extraktionsvolumen sowie die Desorptionsbedingungen, wie Desorptionsvolumen, -temperatur und -rate, optimiert werden.

Alternativ kann die sogenannten SPDE zur Anreicherung der Analyten aus dem Urin genutzt werden. Auch bei diesem Verfahren wird die Gasphase einer Probe in Kontakt mit einem Sorptionsmittel gebracht. In diesem Fall ist das Sorptionsmittel, z. B. Polydimethylsiloxan mit 10 % aktiviertem Kohlenstoff, als Beschichtung auf die Innenwand einer Edelstahlkanüle an einer temperierbaren Spritze angebracht. Die Anreicherung der Analyten erfolgt durch wiederholtes Aufziehen und Reinjizieren von Aliquoten der Gasphase über der Probe mit Hilfe der Spritze. Optional kann die Spritzenadel auch gekühlt werden, um die Anreicherung flüchtiger Substanzen weiter zu erhöhen. Die thermische Desorption der Analyten erfolgt hier nach Einbringen der Spritzenkanüle in den heißen GC-Injektor durch Injektion von Stickstoff als Desorptionsgas.

Beide Anreicherungsverfahren führen zu vergleichbaren Zuverlässigkeitskriterien und zeigen damit die prinzipielle Eignung sowohl des ITEX- als auch des SPDE-Verfahrens an.

Verwendete Messgeräte. Gaschromatograph 6890 A mit Split-/Splitless-Injektor, massenspektrometrischem Detektor MSD 5975 (Agilent, Santa-Clara, USA) und automatischem Probengeber CombiPal mit dynamischer Headspace-Option (In Tube

Extraktion (ITEX) oder Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) (CTC Analytics AG)).

11 Literatur

- Arnold SM, Angerer J, Boogaard PJ, Hughes ME, O'Lone RB, Robison SH, Schnatter AR (2013) The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: Benzene case study. *Crit Rev Toxicol* 43: 119–53
- Arpe H-J (2007) Industrielle Organische Chemie. Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- 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, Hartwig A (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Basilicata P, Miraglia N, Pieri M, Acampora A, Soleo L, Sannolo N (2005) Application of the standard addition approach for the quantification of urinary benzene. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 818: 293–9
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dt Ärztebl* 111: A1583–1618
- Campagna M, Satta G, Campo L, Flore V, Ibba A, Meloni M, Tocco MG, Avataneo G, Flore C, Fustinoni S, Cocco P (2014) Analysis of potential influence factors on background urinary benzene concentration among a non-smoking, non-occupationally exposed general population sample. *Int Arch Occup Environ Health* 87: 793–9
- Carrieri M, Tranfo G, Pignini D, Paci E, Salamon F, Scapellato ML, Fracasso ME, Manno M, Bartolucci GB (2010) Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators. *Toxicol Lett* 192: 17–21
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2017) MAK- und BAT-Werte-Liste 2017, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung Nr. 53, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527812110>
- Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foà V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo DF (2005) Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2237–44
- Fustinoni S, Rossella E, Campo L, Mercadante R, Bertazzi PA (2010) Urinary BTEX, MTBE and naphthalene as biomarkers to gain environmental exposure profiles of the general population. *Sci Total Environ* 408: 2840–9
- Ghittori S, Maestri L, Fiorentino ML, Imbriani M (1995) Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health* 67: 195–200
- Greim H (Hrsg) (1998) Toluol, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 27. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/3527600418.mb10888d0027>

- Henschler D (Hrsg) (1986) Toluol, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 11. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb10888d0011>
- Henschler D (Hrsg) (1987) Styrol, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 13. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/3527600418.mb10042d0013>
- Henschler D (Hrsg) (1988) Benzol, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 14. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/3527600418.mb7143d0014>
- Henschler D (Hrsg) (1992) Benzol, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 18. Lieferung, VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/3527600418.mb7143d0018>
- Janasik B, Jakubowski M, Jałowicki P (2008) Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 81: 443–9
- Jochmann MA, Yuan X, Schilling B, Schmidt TC (2008) In-tube extraction for enrichment of volatile organic hydrocarbons from aqueous samples. *J Chromatogr A* 1179: 96–105
- Lehnert G, Greim H (Hrsg) (2001) iso-Propylbenzol (Cumol). Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), 10. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.bb9882d0010>
- Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, Mutti A, Apostoli P (2008) Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett* 181: 25–30
- Pople JE, Ball RL, Padgett MJ, Aston JP (2002) Construction of a database of benzene biological monitoring. *Toxicol Lett* 134: 301–4
- Rasanen I, Viinamäki J, Vuori E, Ojanperä I (2010) Headspace in-tube extraction gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of hydroxylic methyl-derivatized and volatile organic compounds in blood and urine. *J Anal Toxicol* 34: 113–21
- Römpf (2017) Thieme Römpf Online. Lexikon. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Weisel CP (2010) Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact* 184: 58–66

Entwickler der Methode: J. Van Pul

Prüfer der Methode: B. Roßbach

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

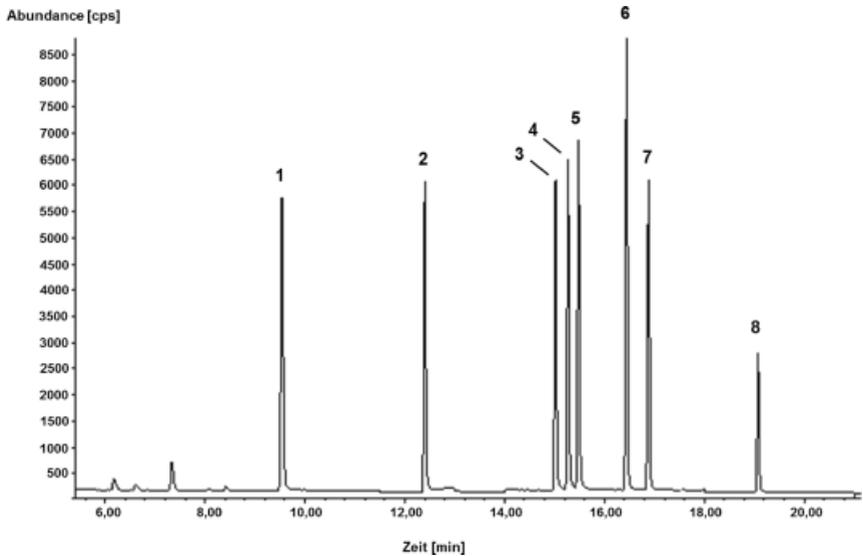


Abb. 2 Chromatogramm eines wässrigen Kalibrierstandards mit einer Analytenkonzentration von je 1 µg/L (1 – Benzol, 2 – Toluol, 3 – Ethylbenzol, 4 – p-Xylol, 5 – m-Xylol, 6 – iso-Propylbenzol, 7 – o-Xylol, 8 – Styrol).

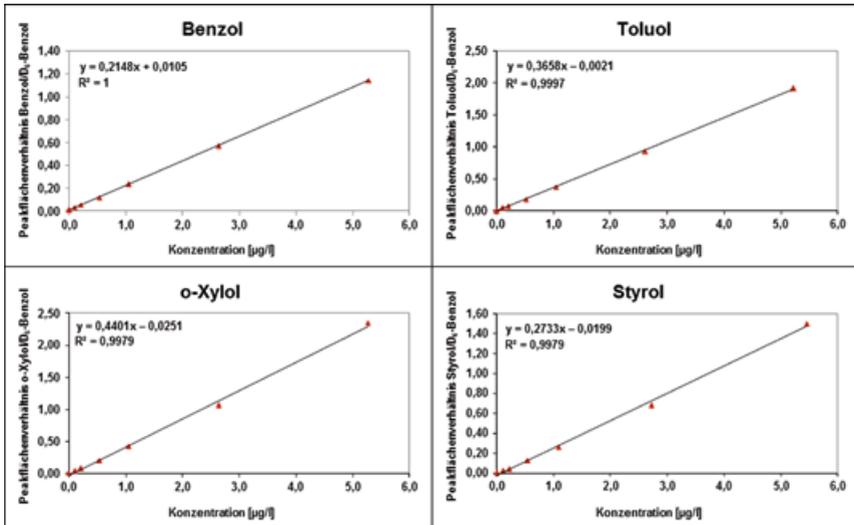


Abb. 3 Exemplarische Darstellung von Kalibriergeraden des Benzols, Toluols, o-Xylols sowie Styrols in Wasser.