

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Tabakspezifische Nitrosamine – Bestimmung von N-Nitrosoanabasin, N-Nitrosoanatabin, N-Nitrosornikotin und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

G. Scherer¹, G. Gilch¹, D. Köhler¹, W. Völkel², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

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

² Methodenprüfung, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL Bayern), Pfarrstraße 3, 80538 München

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: tabakspezifische Nitrosamine; N-Nitrosoanabasin; N-Nitrosoanatabin; N-Nitrosornikotin; 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; Biomonitoring; Urin; LC-MS/MS; HPLC-MS/MS

Citation Note: Scherer G, Gilch G, Köhler D, Völkel W, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Tabakspezifische Nitrosamine – Bestimmung von N-Nitrosoanabasin, N-Nitrosoanatabin, N-Nitrosornikotin und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2019 Oct;4(4):2442-2468]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2025. https://doi.org/10.34865/bi3762020d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 30 Apr 2025

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi3762020d0022>

Manuskript abgeschlossen: 08 Mai 2014

Erstveröffentlichung (Online): 13 Nov 2019

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



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

Tobacco-specific nitrosamines – Determination of *N*-nitrosoanabasine, *N*-nitrosoanatabine, *N*-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in urine by LC-MS/MS

[Tabakspezifische Nitrosamine – Bestimmung von *N*-Nitrosoanabasin, *N*-Nitrosoanatabin, *N*-Nitrosonornikotin und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in Urin mittels LC-MS/MS]

Biomonitoring methods in German language

G. Scherer¹, G. Gilch¹, D. Köhler¹, W. Völkel², T. Göen^{3,*}, A. Hartwig^{4,*}, MAK Commission^{5,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi3762020d0022

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.

This analytical method permits the determination of tobacco-specific nitrosamines (TSNA) in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The parameters in question are *N*-nitrosoanabasine (NAB), *N*-nitrosoanatabine (NAT), *N*-nitrosonornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). NNAL is a metabolite of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Due to its sensitivity, this method is suitable for the detection of the aforementioned analytes in the urine of smokers. NNAL can also be quantified in the urine of passive smokers.

The analytes NAB, NAT, NNN and NNAL are present in urine in both free and glucuronidated forms. For the determination of the total TSNA level in urine, the glucuronides are cleaved by enzymatic hydrolysis and then the analytes are isolated and concentrated using solid phase extraction (SPE). Two sorbent materials are used for sample preparation via SPE, first a material based on molecularly imprinted polymers and then a mixed-mode cation exchange polymer. Analysis is performed by LC-MS/MS. Deuterated internal standards are used for calibration. Calibration standards are prepared in pooled urine obtained from non-smokers and are processed in the same way as the samples to be analysed.

Keywords

tabakspezifische Nitrosamine; TSNA; *N*-Nitrosoanabasin; NAB; *N*-Nitrosoanatabin; NAT; *N*-Nitrosonornikotin; NNN; 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; NNAL; 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; NNK; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie; LC-MS/MS

Author Information

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

² Prüfer der Methode, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL Bayern), Pfarrstraße 3, 80538 München

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), 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)

Tabakspezifische Nitrosamine – Bestimmung von *N*-Nitrosoanabasin, *N*-Nitrosoanatabin, *N*-Nitrosornikotin und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyri- dyl)-1-butanol in Urin mittels LC-MS/MS

| | |
|-----------------------------|--|
| Matrix: | Urin |
| Gefahrstoffe: | Tabakspezifische Nitrosamine |
| Analyt. Messprinzip: | Hochleistungsflüssigchromatographie mit tandemmassenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS) |
| Abgeschlossen im: | Mai 2014 |

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

| Gefahrstoff | CAS | Parameter | CAS |
|---|------------|--|------------|
| <i>N</i> -Nitrosoanabasin (NAB) | 37620-20-5 | <i>N</i> -Nitrosoanabasin (NAB) | 37620-20-5 |
| <i>N</i> -Nitrosoanatabin (NAT) | 71267-22-6 | <i>N</i> -Nitrosoanatabin (NAT) | 71267-22-6 |
| <i>N</i> -Nitrosornikotin (NNN) | 16543-55-8 | <i>N</i> -Nitrosornikotin (NNN) | 16543-55-8 |
| 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNK) | 64091-91-4 | 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) | 76014-81-8 |

Zusammenfassung

Die vorliegende Methode erlaubt die flüssigchromatographisch-tandemmassenspektrometrische (LC-MS/MS) Bestimmung tabakspezifischer Nitrosamine (TSNA) im Urin. Hierbei handelt es sich um *N*-Nitrosoanabasin (NAB), *N*-Nitrosoanatabin (NAT), *N*-Nitrosornikotin (NNN) sowie 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), wobei NNAL ein Metabolit des 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanons (NNK) ist. Das Verfahren eignet sich aufgrund seiner Empfindlichkeit zur Erfassung der genannten Analyten bei Rauchern. NNAL lässt sich auch im Urin von Passivrauchern quantifizieren.

Die Analyten NAB, NAT, NNN und NNAL liegen im Urin sowohl frei als auch in Form von Glucuroniden vor. Für eine Bestimmung des Gesamtgehaltes werden die Glucuronide durch enzymatische Hydrolyse gespalten und die Analyten anschlie-

2444 Biomonitoring Methods

ßend mittels Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) abgetrennt und konzentriert. Für die Aufreinigung mittels SPE werden zwei Sorbentien verwendet, zunächst ein auf *Molecularly Imprinted Polymers* basierendes Material und anschließend ein *Mixed-Mode*-Kationentauscher-Polymer. Die Bestimmung erfolgt dann mittels LC-MS/MS. Als interne Standards werden strukturidentische deuterierte Verbindungen verwendet. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin von Nichtrauchern angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

N-Nitrosoanabasin (NAB)

| | | |
|---------------------------|--|------------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 11,7 \%$, 1,1 % bzw. 1,1 % |
| | Streubereich | $u = 32,5 \%$, 3,1 % bzw. 3,1 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 8,9 ng, 123 ng bzw. 192 ng NAB pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 3,8 \%$, 6,5 % bzw. 3,5 % |
| | Streubereich | $u = 9,8 \%$, 16,7 % bzw. 9,0 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 8,9 ng, 123 ng bzw. 192 ng NAB pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 88 \%$, 91 % bzw. 97 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 11 ng, 100 ng bzw. 180 ng NAB pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | 1,1 ng NAB pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 5,0 ng NAB pro Liter Urin | |

N-Nitrosoanatabin (NAT)

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------------|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 13,2 \%$, 1,4 % bzw. 2,2 % |
| | Streubereich | $u = 36,6 \%$, 3,9 % bzw. 6,1 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 4,3 ng, 442 ng bzw. 1423 ng NAT pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen | |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) | $s_w = 8,8 \%$, 6,7 % bzw. 2,5 % |
| | Streubereich | $u = 22,6 \%$, 17,2 % bzw. 6,4 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 4,3 ng, 442 ng bzw. 1423 ng NAT pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen | |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) | $r = 104 \%$, 94 % bzw. 102 % |
| | bei einer dotierten Konzentration von 4,9 ng, 750 ng bzw. 1350 ng NAT pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen | |
| Nachweisgrenze: | 0,7 ng NAT pro Liter Urin | |
| Bestimmungsgrenze: | 2,0 ng NAT pro Liter Urin | |

N-Nitrosonornikotin (NNN)

| | |
|---------------------------|---|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) $s_w = 4,4 \%$, $1,9 \%$ bzw. $3,1 \%$ Streubereich $u = 12,2 \%$, $5,3 \%$ bzw. $8,6 \%$ bei einer dotierten Konzentration von $4,3 \text{ ng}$, 90 ng bzw. $225 \text{ ng NNN pro Liter Urin}$ und $n = 5$ Bestimmungen |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) $s_w = 11,4 \%$, $7,1 \%$ bzw. $5,1 \%$ Streubereich $u = 29,3 \%$, $18,3 \%$ bzw. $13,1 \%$ bei einer dotierten Konzentration von $4,3 \text{ ng}$, 90 ng bzw. $225 \text{ ng NNN pro Liter Urin}$ und $n = 6$ Bestimmungen |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) $r = 91 \%$, 91% bzw. 90% bei einer dotierten Konzentration von $4,1 \text{ ng}$, 100 ng bzw. $180 \text{ ng NNN pro Liter Urin}$ und $n = 5$ Bestimmungen |
| Nachweisgrenze: | $0,8 \text{ ng NNN pro Liter Urin}$ |
| Bestimmungsgrenze: | $2,0 \text{ ng NNN pro Liter Urin}$ |

4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)

| | |
|---------------------------|--|
| Präzision in der Serie: | Standardabweichung (rel.) $s_w = 8,3 \%$, $11,9 \%$ bzw. $6,0 \%$ Streubereich $u = 23,0 \%$, $33,0 \%$ bzw. $16,7 \%$ bei einer dotierten Konzentration von $7,8 \text{ ng}$, 591 ng bzw. $1252 \text{ ng NNAL pro Liter Urin}$ und $n = 5$ Bestimmungen |
| Präzision von Tag zu Tag: | Standardabweichung (rel.) $s_w = 3,9 \%$, $11,5 \%$ bzw. $9,9 \%$ Streubereich $u = 10,0 \%$, $29,6 \%$ bzw. $25,5 \%$ bei einer dotierten Konzentration von $7,8 \text{ ng}$, 591 ng bzw. $1252 \text{ ng NNAL pro Liter Urin}$ und $n = 6$ Bestimmungen |
| Richtigkeit: | Wiederfindungsrate (rel.) $r = 111 \%$, 100% bzw. 110% bei einer dotierten Konzentration von $8,5 \text{ ng}$, 750 ng bzw. $1350 \text{ ng NNAL pro Liter Urin}$ und $n = 5$ Bestimmungen |
| Nachweisgrenze: | $2,0 \text{ ng NNAL pro Liter Urin}$ |
| Bestimmungsgrenze: | $5,0 \text{ ng NNAL pro Liter Urin}$ |

Allgemeine Informationen zu tabakspezifischen Nitrosaminen (TSNA)

Zu den TSNA gehören NAB, NAT, NNN und NNK. Sie werden fast ausschließlich aus den Tabakalkaloiden während der Trocknungsphase der Tabakblätter gebildet [Hecht et al. 1981]. Im Hauptstromrauch von Zigaretten, den der Raucher inhaliert, kommen pro Zigarette typischerweise Konzentrationen von 25 ng NAB , 230 ng NAT , 200 ng NNN und 150 ng NNK vor [IARC 2004]. In Räumen, in denen geraucht wurde, wurden NNN- und NNK-Konzentrationen von $4\text{--}20$ bzw. $0,8\text{--}1,5 \text{ ng/m}^3$ gemessen [Tricker et al. 2009]. NNN und NNK wurden von der IARC (International Agency for Research on Cancer) als Kanzerogene der Gruppe 1 („krebserzeugend beim Menschen“) eingestuft. Hingegen wurden NAB und NAT von der IARC in Gruppe 3 („nicht einstuftbar hinsichtlich der krebserzeugenden Wirkung beim Menschen“) eingestuft [IARC 2004]. Im Tierexperiment wirkt NNN als Ösophaguskanzerogen, während NNK als Lungen- und Pankreaskanzerogen wirkt [Hecht und Hoffmann 1989].

2446 Biomonitoring Methods

Der Metabolismus von NAB, NNN und NNK ist gut, der von NAT weniger gut untersucht [Hecht 1998]. Hauptmetabolit von NNK ist NNAL, das seinerseits ebenfalls ein Kanzerogen ist. NNAL kann *O*- oder *N*-glucuronidiert werden. Im Urin wird NNAL in freier und konjugierter Form (Verhältnis ca. 1 : 1) ausgeschieden. Etwa 20–30 % der resorbierten NNK-Dosis werden als NNAL mit dem Urin ausgeschieden [Hecht et al. 1993; Meger et al. 1999]. Auch NAB, NAT und NNN werden in freier Form und als Glucuronid ausgeschieden [Stepanov und Hecht 2005]. Von der resorbierten NNN-Dosis wird mit ca. 1 % nur ein relativ geringer Anteil über den Urin ausgeschieden [Urban et al. 2009]. Seit Mitte der 1990er Jahre ist NNAL im Urin (meist gemessen als Gesamt-NNAL, freies und konjugiertes NNAL) ein etablierter Biomarker für Raucher, Benutzer von rauchfreiem Tabak sowie Passivraucher [Hecht 2002]. Die simultane Quantifizierung von NAB, NAT, NNN und NNAL (siehe Abbildung 1) als Biomarker für die Exposition gegenüber TSNA ist noch relativ neu [Kavvadias et al. 2009 a, 2009 b; Stepanov und Hecht 2005].

Das Verfahren ist zur Bestimmung von NAB, NAT, NNN und NNAL im Humanurin geeignet. In Tabelle 1 sind die in einer Probandenstudie im Urin von Rauchern ($n = 83$) und Nichtrauchern ($n = 25$) ermittelten mittleren Konzentrationen zusammengefasst [Kavvadias et al. 2009 a]. Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit Literaturdaten überein [Stepanov und Hecht 2005]. Die aufgeführten Biomarker dienen in erster Linie zur Erfassung der Exposition von Tabakbenutzern mit der Stoffklasse der TSNA. NNAL ist zusätzlich auch zur Quantifizierung der Belastung von Passivrauchern mit NNK geeignet.

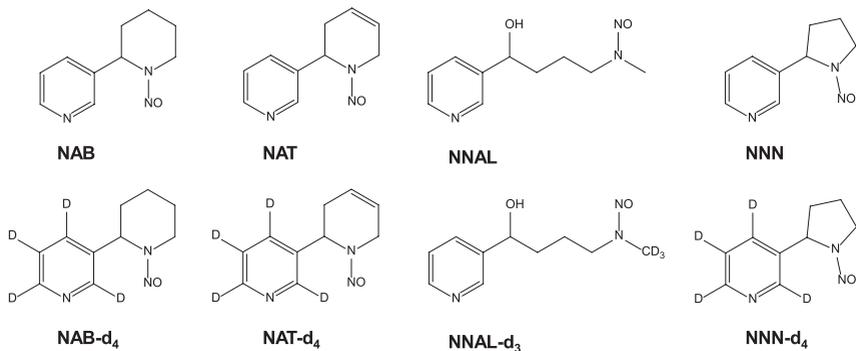


Abb. 1 Chemische Strukturen der Analyten NAB, NAT, NNN und NNAL sowie der verwendeten internen Standards.

Tab. 1 Im Urin von Rauchern und Nichtrauchern ermittelte Gehalte von NAB, NAT, NNN und NNAL (nach Kavvadias et al. 2009 a).

| | NAB | NAT | NNN | NNAL |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | Median (Bereich) [ng/L] | | | |
| Nichtraucher (n = 25) | 0,72 (< NWG–1,46) | 0,03 (< NWG–0,21) | 0,32 (< NWG–1,28) | 9,9 (< NWG–39,0) |
| Raucher (n = 83) | 47,2 (5,6–295) | 210 (20,2–1234) | 30,9 (0,60–1331) | 126 (17,6–781) |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|--|------|
| 1 | Grundlage des Verfahrens | 2448 |
| 2 | Geräte, Chemikalien und Lösungen | 2448 |
| 2.1 | Geräte | 2448 |
| 2.2 | Chemikalien | 2449 |
| 2.3 | Lösungen | 2450 |
| 2.4 | Interne Standards (ISTD) | 2451 |
| 2.5 | Vergleichsstandards | 2452 |
| 3 | Probenahme und Probenaufbereitung | 2453 |
| 3.1 | Probenahme | 2453 |
| 3.2 | Probenaufbereitung | 2453 |
| 4 | Instrumentelle Arbeitsbedingungen | 2454 |
| 4.1 | Hochleistungsflüssigchromatographie | 2454 |
| 4.2 | Tandem-Massenspektrometrie | 2455 |
| 5 | Analytische Bestimmung | 2455 |
| 6 | Kalibrierung | 2456 |
| 7 | Berechnung der Analyseergebnisse | 2457 |
| 8 | Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung | 2457 |
| 9 | Beurteilung des Verfahrens | 2457 |
| 9.1 | Präzision | 2457 |
| 9.2 | Richtigkeit | 2459 |
| 9.3 | Absolute Wiederfindung | 2459 |
| 9.4 | Matrixeffekte | 2460 |
| 9.5 | Nachweis- und Bestimmungsgrenzen | 2460 |
| 9.6 | Stabilität | 2461 |
| 9.7 | Störeinflüsse | 2462 |
| 10 | Diskussion der Methode | 2462 |
| 11 | Literatur | 2463 |
| 12 | Anhang | 2465 |

1 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode erlaubt die flüssigchromatographisch-tandem-massenspektrometrische (LC-MS/MS) Bestimmung tabakspezifischer Nitrosamine (TSNA) im Urin. Hierbei handelt es sich um *N*-Nitrosoanabasin (NAB), *N*-Nitrosoanatabin (NAT), *N*-Nitrosonornikotin (NNN) sowie 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), wobei NNAL ein Metabolit des 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanons (NNK) ist. Das Verfahren eignet sich aufgrund seiner Empfindlichkeit zur Erfassung der genannten Analyten bei Rauchern. NNAL lässt sich auch im Urin von Passivrauchern quantifizieren.

Die Analyten NAB, NAT, NNN und NNAL liegen im Urin sowohl frei als auch in Form von Glucuroniden vor. Für eine Bestimmung des Gesamtgehaltes werden die Glucuronide durch enzymatische Hydrolyse gespalten und die Analyten anschließend mittels Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) abgetrennt und konzentriert. Für die Aufreinigung mittels SPE werden zwei Sorbentien verwendet, zunächst ein auf *Molecularly Imprinted Polymers*-basierendes Material und anschließend ein *Mixed-Mode*-Kationentauscher-Polymer. Die Bestimmung erfolgt dann mittels LC-MS/MS. Als interne Standards werden strukturidentische deuterierte Verbindungen verwendet. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin von Nichtrauchern 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 binärer Hochdruckpumpe, Säulenofen mit Schaltventil und Entgasungseinrichtung (z. B. HP 1100 von Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) sowie einem thermostatisierbaren Autosampler (z. B. HTC PAL von Axel Semrau GmbH & Co. KG, Sprockhövel) und einem Tandem-Massenspektrometer (z. B. API 4000 von AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt)
- LC-Säule: Luna 3 μm , C18(2) 100 \AA , 250 \times 3 mm mit entsprechender Vorsäule C18, 4 \times 3 mm und Vorsäulenhalter (z. B. Phenomenex LTD, Aschaffenburg, Nr. 00G-4251-Y0)
- Laborschüttler (z. B. IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Wärmeschrank mit Schüttelapparatur (z. B. MMM Medcenter GmbH, Planegg)
- Vortex-Mischer (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- pH-Meter (z. B. Schott AG, Mainz)
- Zentrifuge (z. B. Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Pasteurpipetten aus Glas (z. B. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim)
- Verschiedene Pipetten und Multipipetten mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)

- Verschiedene Messkolben, Bechergläser und Messzylinder (z. B. Schott AG, Mainz)
- Schraubflaschen aus Glas (z. B. Schott AG, Mainz)
- 4 mL-Probengläschen aus Braunglas mit Schraubkappen (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 14 mL-Schraubgläser mit Kunststoffkappen (z. B. Schuett Biotec GmbH, Göttingen) und Septen (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Braune Autosampler-Vials (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- SPE-Kartuschen SupelMIP®, 50 mg, 10 mL (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Supelco™ Analytical, Nr. 53221-U)
- SPE-Kartuschen Oasis® MCX, 60 mg, 3 mL (z. B. Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186000254)
- Festphasenextraktionsstation (z. B. Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen)
- Vakuumzentrifuge Jouan (z. B. Thermo Electron Corp., Waltham, USA)
- UV-Lampe (z. B. Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

2.2 Chemikalien

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

- *N*-Nitrosoanabasin (NAB) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. N524250)
- *N*-Nitrosoanabasin- d_4 (NAB- d_4) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. N524252)
- *N*-Nitrosoanatabin (NAT) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. N524750)
- *N*-Nitrosoanatabin- d_4 (NAT- d_4) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. N524752)
- *N*-Nitrosoornikotin (NNN) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. N535000)
- *N*-Nitrosoornikotin- d_4 (NNN- d_4), Lösung in Acetonitril 1,0 mg/mL (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. KIT0730)
- 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. M325740)
- 4-(Methyl- d_3 -nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL- d_3) (z. B. Toronto Research Chemicals Inc, Kanada, Nr. M325742)
- Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 34668)
- Ammoniumhydroxid-Lösung, 25 % in Wasser (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 09857)
- Dichlormethan, picograde (z. B. LGC Standards GmbH, Wesel, Nr. SO-1185-B025)
- Dinatriumhydrogenphosphat, $\geq 99,5$ % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 71636)
- β -Glucuronidase, Typ IX-A aus *E. coli* (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. G7396)

2450 Biomonitoring Methods

- *n*-Heptan, 99 % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 650536)
- *n*-Hexan, picograde (z. B. LGC Standards GmbH, Wesel, Nr. SO-1244-B010)
- Kaliumdihydrogenphosphat (z. B. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Nr. 1.04873)
- Methanol, picograde (z. B. LGC Standards GmbH, Wesel, Nr. SO-1263-B025)
- Salzsäure, ≥ 37 % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 30721)
- Toluol, $\geq 99,9$ % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 650579)
- Hochreines Wasser (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. 39253)
- Hochreines Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt, Nr. PRLS89781.320)

2.3 Lösungen

- Hochreines Wasser, UV-bestrahlt
Vor der Verwendung wird das hochreine Wasser mit UV-Licht bei 254 nm für mindestens 12 h bestrahlt. Für alle weiteren Arbeitsschritte wird nur dieses UV-bestrahlte Wasser eingesetzt.
- Hochreines Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat, UV-bestrahlt
Vor der Verwendung wird das hochreine Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat mit UV-Licht bei 254 nm für mindestens 12 h bestrahlt. Für alle weiteren Arbeitsschritte wird nur dieses UV-bestrahlte Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat eingesetzt.
- Ammoniumacetatlösung, 10 mM
200 mL hochreines Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat werden in einer 500 mL-Schraubflasche mit 60 mL hochreinem Wasser versetzt. Die Lösung wird gründlich gemischt.
- Dichlormethan-Toluol-Gemisch, 1 : 1 (v/v)
500 mL Dichlormethan werden in einer 1000 mL-Schraubflasche vorgelegt und mit 500 mL Toluol versetzt. Die Lösung wird gründlich gemischt.
- Phosphatpuffer, pH 7,2
Lösung A: Genau 90,73 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in einen 1000 mL-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Kolben wird anschließend mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
Lösung B: Genau 94,64 g Dinatriumhydrogenphosphat werden in einen 1000 mL-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Kolben wird anschließend mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
Zur Herstellung des Phosphatpuffers wird 1 L der Lösung B in einem 2 L-Becherglas unter Rühren so lange mit Lösung A versetzt, bis sich ein pH-Wert von 7,2 einstellt (Verhältnis B : A ca. 4 : 1, v/v). Der pH-Wert wird mit einem pH-Meter kontrolliert.
- Enzymsuspension (β -Glucuronidase), 250 U/ μ L
Die gesamte Menge der β -Glucuronidase (440,7 mg Feststoff, ca. 50 % Protein, 3660000 U/g Protein) wird im Originalgebinde des Herstellers in 3224 μ L des Phosphatpuffers suspendiert.

- Salzsäurelösung, 0,1 M
In einem 1000 mL-Messkolben werden etwa 700 mL hochreines Wasser vorgelegt und 8 mL der konzentrierten Salzsäure zugegeben. Der Kolben wird mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Methanol in Dichlormethan, 10 % (v/v)
In einem 1000 mL-Messkolben werden etwa 700 mL Dichlormethan vorgelegt und 100 mL Methanol zugegeben. Der Kolben wird anschließend mit Dichlormethan aufgefüllt.
- Methanolische Ammoniumhydroxidlösung
In einem 1000 mL-Messkolben werden etwa 700 mL Methanol vorgelegt und 100 mL der 25%igen Ammoniumhydroxidlösung zugegeben. Der Kolben wird anschließend mit Methanol aufgefüllt.

Die wässrigen Lösungen sowie die methanolische Ammoniumhydroxidlösung sind bei Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C mindestens drei Monate haltbar. Alle anderen Lösungsmittelgemische sind bei Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C mindestens zwölf Monate haltbar. Die Enzymsuspension ist bei Lagerung bei -20 °C mindestens zwei Monate haltbar.

2.4 Interne Standards (ISTD)

- ISTD-Stammlösung I (1000 mg/L)
Je 10 mg der Standardsubstanzen NAB-d₄, NAT-d₄ und NNAL-d₃ werden in je einen 10 mL-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Messkolben werden mit Methanol aufgefüllt.
- ISTD-Stammlösung II (100 mg/L)
Je 1 mL der ISTD-Stammlösungen I von NAB-d₄, NAT-d₄ und NNAL-d₃ sowie 1 mL der käuflich erworbenen NNN-d₄-Stammlösung werden in je einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden mit Methanol aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung I
Je 0,1 mL der ISTD-Stammlösungen II von NAB-d₄, NNAL-d₃ und NNN-d₄ sowie 1 mL der ISTD-Stammlösung II von NAT-d₄ werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Methanol aufgefüllt (Konzentration je 1 mg/L an NAB-d₄, NNAL-d₃ und NNN-d₄ sowie 10 mg/L an NAT-d₄).
- ISTD-Dotierlösung II
0,5 mL der ISTD-Dotierlösung I werden in einen 20 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt (Konzentration je 25 µg/L an NAB-d₄, NNN-d₄ und NNAL-d₃ sowie 250 µg/L an NAT-d₄).

Die Stamm- und Dotierlösungen der internen Standards sind bei Lagerung bei -20 °C mindestens zwei Jahre haltbar.

2.5 Vergleichsstandards

- Stammlösung I (2000 mg/L)
Je 20 mg der Standardsubstanzen NAB, NAT, NNN und NNAL werden in je einen 10 mL-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Messkolben werden mit Methanol aufgefüllt.
- Stammlösung II (100 mg/L)
Je 0,5 mL der Stammlösungen I von NAB, NAT, NNN und NNAL werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung I (10 mg/L)
1 mL der Stammlösung II wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung II (100 µg/L)
0,1 mL der Dotierlösung I wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung III (10 µg/L)
1 mL der Dotierlösung II wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung IV (0,2 µg/L)
0,2 mL der Dotierlösung III wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt.

Die Stammlösungen sind bei Lagerung bei -20°C mindestens zwölf Monate haltbar. Die Dotierlösungen sind bei Lagerung bei -20°C mindestens drei Monate haltbar.

Die Vergleichsstandards werden in Poolurin von Nichtrauchern angesetzt. Zur Herstellung werden 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 Vergleichsstandards in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 1500 ng/L Urin nach dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird der verwendete Poolurin mitgeführt.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Vergleichsstandards für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin.

| Vergleichsstandard | Verwendete Dotierlösung | Volumen der Dotierlösung | Volumen Poolurin | Konzentration der Analyten |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | | [μL] | [μL] | [ng/L] |
| Leerwert | – | – | 6000 | – |
| 1 | IV | 60 | 5940 | 2 |
| 2 | IV | 150 | 5850 | 5 |
| 3 | IV | 300 | 5700 | 10 |
| 4 | III | 15 | 5985 | 25 |
| 5 | III | 30 | 5970 | 50 |
| 6 | III | 60 | 5940 | 100 |
| 7 | III | 180 | 5820 | 300 |
| 8 | II | 45 | 5955 | 750 |
| 9 | II | 90 | 5910 | 1500 |

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Die Urinproben werden in geeigneten Urinsammelgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufgetaut und gut durchmischt. Es werden jeweils 6 mL der Urinproben in 14 mL-Schraubgläschen überführt und mit 2 mL Phosphatpuffer (pH 7,2), 20 μL der ISTD-Dotierlösung II sowie 40 μL der Enzymsuspension versetzt. Die Proben werden mittels Vortex-Mischer gut durchmischt und lichtgeschützt in einem Wärmeschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht (ca. 16 h) geschüttelt (ca. 100 Umdrehungen/min). Im Anschluss werden die Proben für 20 min bei $3300 \times g$ zentrifugiert.

Für die erste Festphasenextraktion werden die SupelMIP-SPE-Kartuschen eingesetzt und diese zunächst mit je 10 mL Methanol in Dichlormethan (10 %, v/v) gewaschen. Dafür wird das Lösungsmittel mit einer Flussrate von etwa 0,5 mL/min auf die Kartuschen gegeben und diese dann trockengesaugt (20–30 min bei 500–600 mbar). Danach werden die SPE-Säulen nacheinander mit je 1 mL Methanol und 1 mL hochreinem Wasser konditioniert. Das Kartuschenmaterial darf dabei nicht trocken laufen. Anschließend wird der Überstand der hydrolysierten Urinproben mit Pasteurpipetten auf die Kartuschen gegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit der Probe sollte 0,5 mL/min nicht überschreiten. Diese Flussrate sollte auch bei allen

2454 Biomonitoring Methods

weiteren Waschschrritten eingehalten werden. Ein Anlegen und Anpassen von Vakuum kann nötig sein, wenn die Probe nur sehr langsam durchläuft. Nach dem Aufgeben der Probe wird die Kartusche mit 3 mL der 10 mM Ammoniumacetatlösung gewaschen und unter Vakuum getrocknet (20–30 min bei 500–600 mbar). Danach wird zunächst mit 2 mL *n*-Heptan und dann mit 1 mL *n*-Hexan gewaschen und die Kartusche erneut unter Vakuum (20–30 min bei 500–600 mbar) getrocknet. Die Elution der Analyten erfolgt dann mit 3 mL des Dichlormethan-Toluol-Gemisches und einer Elutionsgeschwindigkeit von max. 0,2 mL/min in 4 mL-Schraubgläschen aus braunem Glas. Das Eluat wird mittels Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und dann in 1 mL des Phosphatpuffers (pH 7,2) aufgenommen.

Im Anschluss erfolgt die zweite Festphasenextraktion über MCX-Kartuschen. Diese werden zunächst nacheinander mit je 2 mL Methanol, 1 mL der Methanol-Ammoniumhydroxid-Lösung und 2 mL hochreinem Wasser konditioniert. Danach werden die im Phosphatpuffer aufgenommenen Probenextrakte vollständig auf die Kartuschen gegeben und diese nacheinander mit 2 mL hochreinem Wasser, 2 mL der 0,1 M Salzsäurelösung und 2 mL Methanol gewaschen. Bei allen Konditionierungs- und Waschschrritten ist eine Flussrate von bis zu 5 mL/min akzeptabel. Bei der Probenaufgabe und Elution sollte jedoch eine Flussrate von 1,0 mL/min nicht überschritten werden. Die Elution der Analyten erfolgt mit 2 mL der Methanol-Ammoniumhydroxid-Lösung in 4 mL-Schraubgläschen aus braunem Glas. Die Eluate werden in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und dann in je 100 µL Methanol aufgenommen, in braune Autosampler-Vials überführt und 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

| | |
|-------------------------|---|
| Analytische Säule: | Luna 3 µm, C18(2) 100 Å, 250 × 3 mm |
| Mobile Phase: | Mobile Phase A: Wasser mit 0,1 % Ammoniumacetat Mobile Phase B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure |
| Flussrate: | 0,45 mL/min |
| Säulentemperatur: | 50 °C, isotherm |
| Injektionsvolumen: | 5 µL |
| Autosampler-Temperatur: | 10 °C |
| Gradientenprogramm: | siehe Tabelle 3 |

Tab. 3 Gradientenprogramm zur Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin.

| Zeit | Mobile Phase A | Mobile Phase B | Flussrate |
|-------|----------------|----------------|-----------|
| [min] | [%] | [%] | [mL/min] |
| 0 | 90 | 10 | 0,45 |
| 1,0 | 90 | 10 | 0,45 |
| 5,0 | 40 | 60 | 0,45 |
| 6,0 | 30 | 70 | 0,45 |
| 10,0 | 30 | 70 | 0,45 |
| 11,0 | 90 | 10 | 0,45 |
| 17,0 | 90 | 10 | 0,45 |

4.2 Tandem-Massenspektrometrie

| | |
|---|---|
| Ionisationsmodus: | positive Elektrospray-Ionisation (ESI+) |
| Quellentemperatur: | 650 °C |
| Detektionsmodus: | MRM (Multi Reaction Monitoring) |
| Curtain Gas: | 25 psi |
| Nebulizer Gas: | 45 psi |
| Heater Gas: | 45 psi |
| Eingangspotential: | 10 V |
| Ion spray voltage: | 1500 V |
| Parameterspezifische MRM-Einstellungen: | siehe Tabelle 4 |

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.

5 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 3 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 5 µL in das LC-MS/MS-Gerät injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und der spezifischen Massenübergänge. Die Retentionszeiten der Analyten und internen Standards sowie die registrierten Ionenübergänge sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Für die Analyten NAT und NNAL wird zudem zur Absicherung der Peakidentität das Verhältnis von Quantifier zu Qualifier berechnet. Dabei wird eine Abweichung von ± 35 % vom Referenzwert akzeptiert. Als Referenzwert dient das mittlere Quantifier/Qualifier-Verhältnis der Kalibrierlösungen im betreffenden Konzentrationsbereich. Die Qualifiersignale von NAB und NNN werden erst ab 100 ng/L routinemäßig ausgewertet, da sie in dem üblichen niedrigen Konzentrationsbereich

2456 Biomonitoring Methods

Tab. 4 Parameterspezifische MRM-Einstellungen für NAB, NAT, NNAL und NNN und die dazugehörigen internen Standards (DP: Declustering potential, CE: Collision energy, CXP: Collision exit potential).

| Analyt | Retentionszeit [min] | Q1 [m/z] | Q3 [m/z] | Messzeit [ms] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|---------------------|-------------------------|-------------|--------------------|------------------|-----------|-----------|------------|
| NAB | 9,30 | 192,0 | 162,0 ^a | 100 | 51 | 17 | 28 |
| | | | 105,9 | 25 | 51 | 47 | 18 |
| NAB-d ₄ | 9,28 | 196,0 | 166,0 ^a | 100 | 46 | 19 | 10 |
| NAT | 9,15 | 189,9 | 160,0 ^a | 100 | 41 | 15 | 28 |
| | | | 79,0 | 25 | 41 | 39 | 14 |
| NAT-d ₄ | 9,13 | 194,0 | 164,0 ^a | 100 | 41 | 15 | 10 |
| NNAL | 7,92 | 210,0 | 180,0 ^a | 50 | 56 | 17 | 16 |
| | | | 93,0 | 50 | 56 | 27 | 16 |
| NNAL-d ₃ | 7,92 | 213,0 | 183,0 ^a | 50 | 46 | 17 | 16 |
| NNN | 8,50 | 178,0 | 148,0 ^a | 100 | 46 | 17 | 8 |
| | | | 120,0 | 25 | 46 | 27 | 20 |
| NNN-d ₄ | 8,48 | 182,0 | 152,0 ^a | 100 | 41 | 15 | 12 |

^a Quantifier

unterschiedlich stark durch Matrixkomponenten gestört werden. Bei jeder Analysenserie werden ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) und mindestens zwei Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 8) mitgeführt.

Die in Tabelle 4 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 2 bis 5 (im Anhang) sind beispielhaft Chromatogramme eines aufgearbeiteten Raucherurins dargestellt.

6 Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden die unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Vergleichsstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vergleiche Abschnitt 3) und mittels LC-MS/MS (vergleiche Abschnitt 4) analysiert. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche der Analyten und der jeweiligen isoto-penmarkierten internen Standards gegen die Konzentration der Vergleichsstandards. Eventuelle Leerwerte im undotierten Poolurin werden durch Subtraktion berücksichtigt und die Kalibriergerade durch den Nullpunkt gelegt. Die Kalibriergeraden sind unter den beschriebenen Analysebedingungen im Konzentrationsbereich von 2 bis 1500 ng/L linear. In den Abbildungen 6 bis 9 (im Anhang) sind beispielhaft die Kalibriergeraden der Analyten dargestellt.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

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 ng/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 [Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014]. Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mitgeführt, die bekannte Konzentrationen der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu wird Poolurin von Nichtrauchern eingesetzt, der mit den Standardlösungen der Analyten versetzt wird, so dass die Analytkonzentrationen in den Kontrollmaterialien im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegen. 6 mL-Aliquote dieser Proben werden bei -20 °C gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse der Kontrollmaterialien) 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 bestätigt.

9.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde Poolurin von Nichtrauchern eingesetzt, der mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten versetzt wurde. Diese Proben wurden fünffach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden dieselben dotierten Poolurinproben eingesetzt und an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

2458 Biomonitoring Methods

Tab. 5 Präzision in der Serie für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin (n = 5).

| Analyt | Dotierte Konzentration | Standardabweichung | Streubereich μ |
|--------|------------------------|---------------------|--------------------|
| | [ng/L] | (rel.) s_w [%] | [%] |
| NAB | 8,9 | 11,7 | 32,5 |
| | 123 | 1,1 | 3,1 |
| | 192 | 1,1 | 3,1 |
| NAT | 4,3 | 13,2 | 36,6 |
| | 442 | 1,4 | 3,9 |
| | 1423 | 2,2 | 6,1 |
| NNAL | 7,8 | 8,3 | 23,0 |
| | 591 | 11,9 | 33,0 |
| | 1252 | 6,0 | 16,7 |
| NNN | 4,3 | 4,4 | 12,2 |
| | 90,0 | 1,9 | 5,3 |
| | 225 | 3,1 | 8,6 |

Tab. 6 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin (n = 6).

| Analyt | Dotierte Konzentration | Standardabweichung | Streubereich μ |
|--------|------------------------|---------------------|--------------------|
| | [ng/L] | (rel.) s_w [%] | [%] |
| NAB | 8,9 | 3,8 | 9,8 |
| | 123 | 6,5 | 16,7 |
| | 192 | 3,5 | 9,0 |
| NAT | 4,3 | 8,8 | 22,6 |
| | 442 | 6,7 | 17,2 |
| | 1423 | 2,5 | 6,4 |
| NNAL | 7,8 | 3,9 | 10,0 |
| | 591 | 11,5 | 29,6 |
| | 1252 | 9,9 | 25,5 |
| NNN | 4,3 | 11,4 | 29,3 |
| | 90,0 | 7,1 | 18,3 |
| | 225 | 5,1 | 13,1 |

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurden Nichtraucherpoolurinproben herangezogen, die mit je drei unterschiedlichen Konzentrationen der Standardsubstanzen dotiert wurden. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin (n = 5).

| Analyt | Dotierte Konzentration | Mittlere relative Wiederfindung <i>r</i> | Bereich |
|--------|------------------------|--|-----------|
| | [ng/L] | [%] | [%] |
| NAB | 11,0 | 88,2 | 85,5–89,1 |
| | 100 | 90,8 | 86,4–93,9 |
| | 180 | 97,2 | 93,8–102 |
| NAT | 4,9 | 104 | 89,8–116 |
| | 750 | 93,5 | 80,1–98,4 |
| | 1350 | 102 | 99,0–105 |
| NNAL | 8,5 | 111 | 97,6–122 |
| | 750 | 100 | 97,2–106 |
| | 1350 | 110 | 97,6–121 |
| NNN | 4,1 | 91,1 | 85,4–95,1 |
| | 100 | 90,8 | 86,5–95,9 |
| | 180 | 90,3 | 86,6–97,0 |

9.3 Absolute Wiederfindung

Zur Bestimmung der absoluten Wiederfindung wurde Nichtraucherpoolurin in drei unterschiedlichen Konzentrationen mit den Analyten dotiert und mit einer Referenzprobe verglichen. Als Referenzprobe diente die gleiche Urinmatrix. Die Dotierung der Referenzprobe mit den Analyten erfolgte aber erst nach der Aufarbeitung, kurz vor Injektion der Probe in das LC-MS/MS-Gerät. Die so erhaltenen absoluten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

2460 Biomonitoring Methods

Tab. 8 Absolute Wiederfindung für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin (n = 6).

| Analyt | Dotierte Konzentration | Mittlere absolute Wiederfindung <i>r</i> | Bereich |
|--------|------------------------|--|-----------|
| | [ng/L] | [%] | [%] |
| NAB | 11,0 | 42,0 | 40,9–42,6 |
| | 100 | 61,6 | 58,5–63,6 |
| | 180 | 76,3 | 73,2–79,3 |
| NAT | 4,9 | 46,3 | 41,1–53,3 |
| | 750 | 60,4 | 51,3–63,0 |
| | 1350 | 77,4 | 75,5–80,1 |
| NNAL | 8,5 | 39,1 | 35,0–43,9 |
| | 750 | 32,1 | 30,9–33,7 |
| | 1350 | 45,5 | 40,7–50,5 |
| NNN | 4,1 | 37,9 | 35,4–39,4 |
| | 100 | 40,2 | 38,4–41,8 |
| | 180 | 56,8 | 54,3–60,8 |

9.4 Matrixeffekte

Die bei der LC-MS/MS-Messung auftretenden Matrixeffekte wurden unter Verwendung von drei Individualurinen untersucht. Die Urinproben wurden ohne Dotierung aufgearbeitet und erst vor der eigentlichen LC-MS/MS-Analytik mit den internen Standards und den Analyten in einer niedrigen sowie einer hohen Konzentration dotiert. Die Berechnung der Matrixeffekte erfolgte durch Vergleich der Peakflächen mit den Signalen in reinem Lösungsmittel. Die so erhaltenen Matrixeffekte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

9.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte durch die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses in unterschiedlichen Urinproben. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wurden drei verschiedene analytfreie Matrixproben im unteren Konzentrationsbereich dotiert und das Signal-Rausch-Verhältnis berechnet. Die Nachweisgrenze wurde bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei festgelegt. Die Festlegung der Bestimmungsgrenze erfolgte durch Bestimmung der Präzision und Richtigkeit in sechs verschiedenen Urinproben, die mit Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich in der Nähe der vermuteten Bestimmungsgrenze dotiert wurden. Als Kriterien galten eine zu erreichende Präzision von max. 20 % und eine Richtigkeit von 80–120 %. Die so ermittelten Werte für die Analyten in Urin können Tabelle 10 entnommen werden.

Tab. 9 Matrixeffekte für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin (n = 3).

| Analyt | Dotierte Konzentration | Mittlerer Matrixeffekt | Bereich |
|---------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| | [ng/L] | [%] | [%] |
| NAB | 5,0 | 78,6 | 70,4–82,8 |
| | 80,0 | 78,8 | 73,0–83,5 |
| NAB-d ₄ | 83,0 | 73,5 | 61,4–80,3 |
| NAT | 52,0 | 89,8 | 81,7–94,3 |
| | 600 | 95,4 | 91,6–101 |
| NAT-d ₄ | 833 | 86,4 | 79,9–93,2 |
| NNAL | 5,0 | 75,9 | 69,3–80,3 |
| | 600 | 72,2 | 65,6–75,7 |
| NNAL-d ₃ | 83,0 | 70,1 | 61,6–75,3 |
| NNN | 2,0 | 67,1 | 52,4–75,5 |
| | 80,0 | 66,3 | 55,7–77,7 |
| NNN-d ₄ | 83,0 | 63,4 | 47,9–77,0 |

Tab. 10 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von NAB, NAT, NNAL und NNN in Urin.

| Analyt | Nachweisgrenze | Bestimmungsgrenze |
|--------|----------------|-------------------|
| | [ng/L] | [ng/L] |
| NAB | 1,1 | 5,0 |
| NAT | 0,7 | 2,0 |
| NNAL | 2,0 | 5,0 |
| NNN | 0,8 | 2,0 |

9.6 Stabilität

Alle Stabilitätsuntersuchungen wurden mit Urinproben durchgeführt, die mit den Analyten in einer niedrigen und einer hohen Konzentration frisch dotiert wurden. Die Stabilität der Analyten in der Matrix wurde durch Lagerung der Proben für 24 h bei Raumtemperatur (Kurzzeitstabilität) und für einen längeren Zeitraum (8,5 Monate) bei -20 °C (Langzeitstabilität) sowie nach drei Gefrier-Tau-Zyklen (Frier-Tau-Stabilität) untersucht. Weiterhin wurde die Stabilität von aufgearbeiteten Proben unter Autosampler-Bedingungen (10 °C) für sechs Tage überprüft. Die untersuchten Analyten NAB, NAT, NNAL und NNN zeigten eine ausreichende Stabilität unter

2462 Biomonitoring Methods

allen getesteten Bedingungen. Eine Ausnahme bildet NNAL, das in den Versuchen zur Langzeitstabilität nach 8,5 Monaten bereits einen deutlichen Konzentrationsanstieg zeigte. Die Langzeitstabilität ist für NNAL daher nur für ca. sechs Monate sicher gegeben.

9.7 Störeinflüsse

Verschleppungseffekte im chromatographischen System, wie das Injektions-*Carry-over*, wurden durch mehrfache Injektion von hoch und niedrig konzentrierten Extrakten untersucht. Eine niedrig konzentrierte Matrixprobe wurde dreimal, jeweils nach fünf Injektionen einer hochkonzentrierten Probe, analysiert. Es wurden keine Interferenzsignale mit der Retentionszeit der Analyten oder der internen Standards beobachtet.

Eine mögliche artifizielle Bildung der Analyten NAB, NAT und NNN während der Probenaufarbeitung wurde durch Analyse einer mit den Vorläufern dotierten Matrixprobe untersucht. Ein Nichtraucherurin wurde mit 215 ng/mL Anabasin, 217 ng/mL Anatabin und 253 ng/mL Nornikotin dotiert und in einer Doppelbestimmung dem Aufarbeitungsprozess der Methode unterworfen. Es wurde keine artifizielle Bildung von NAB, NAT und NNN beobachtet. In Vorversuchen mit dem gleichen Nichtraucherurin, der nach der Dotierung mit den oben genannten Vorläufersubstanzen einer abgewandelten Aufarbeitung (Umkehrung der Festphasenextraktionsschritte: zunächst MCX-SPE, dann MIP-SPE) unterworfen wurde, konnte dagegen eine artifizielle Bildung von NAT und NNN festgestellt werden.

Bei sehr konzentrierten Urinproben wurden chromatographische Interferenzen zwischen den Analyten und der Matrix beobachtet. Dadurch kann insbesondere bei Proben mit niedrigen Analytkonzentrationen die Quantifizierung erheblich beeinträchtigt sein. In einigen bislang gemessenen Urinproben wurde eine fast vollständige Unterdrückung der Analyten- und der ISTD-Signale festgestellt. Bei ausreichendem Analytgehalt konnten die Analyten auch in diesen Proben quantifiziert werden. Dafür wurde die Aufarbeitung mit deutlich geringerer Urinmenge (1 mL) durchgeführt. In seltenen Fällen (< 1 % der Proben) wurden in Raucherurinen stark erhöhte NNN-Konzentrationen gemessen (> 100 ng/L). Es ist davon auszugehen, dass in diesen Proben eine artifizielle NNN-Bildung aus den Vorläufern Nornikotin und Nitrit/Nitrat während der Probenlagerung stattgefunden hat. Diese Artefaktbildung kann durch Zusatz einer starken Base (z. B. Natriumhydroxid) oder von Ammoniumsulfamat zum gesammelten Urin unterbunden werden [Shah und Karnes 2010].

10 Diskussion der Methode

Das vorliegende Verfahren ist die erste Multimethode zur Bestimmung tabakspezifischer Nitrosamine (TSNA) im Humanurin. Es eignet sich zur Erfassung der TSNA-Exposition bei Rauchern und Benutzern von anderen Tabakprodukten. Die Anwendung auf die TSNA-Belastung von Passivrauch-exponierten Nichtrauchern ist gegenwärtig auf den Analyten NNAL beschränkt. Prinzipiell kann die Erfassung

einer TSNA-Belastung durch Passivrauchen aber auch auf die Bestimmung von NAB, NAT und NNN im Urin ausgeweitet werden, da diese Biomarker auch bei einem Teil der Nichtraucher mit der vorliegenden Methode messbar waren (vgl. Tabelle 1, Kavvadias et al. 2009 a). Hierzu fehlen allerdings noch weitere systematische Untersuchungen.

Anders als bei NNAL, liegen für die Urinausscheidung von NAB, NAT und NNN beim Menschen kaum Daten vor. Neben Untersuchungen mit der hier beschriebenen Methode [Kavvadias et al. 2009 a, b; Urban et al. 2009], liegen noch Ergebnisse der Arbeitsgruppe Hecht aus den USA vor [Stepanov et al. 2009 a, b; Stepanov und Hecht 2005]. Tendenziell werden von dieser Arbeitsgruppe für Zigarettenraucher höhere NNAL- und NNN- sowie geringere NAB- und NAT-Konzentrationen als in den oben genannten Studien berichtet. Die Ursache für diese Unterschiede ist bislang unklar. In einer weiteren Studie aus den USA [Sarkar et al. 2010] wurden für Zigarettenraucher NNN-Ausscheidungen gefunden, die gut mit den Befunden unter Verwendung der hier beschriebenen Methode übereinstimmen.

Verwendete Messgeräte: LC-MS/MS-System bestehend aus Agilent HPLC-System HP 1100 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) mit den Modulen G1312 A (Binäre Hochdruckpumpe), G1316 A (Säulenofen mit Schaltventil), G1379 A (Entgasereinheit) und dem thermostatisierbaren Autosampler HTC PAL (Axel Semrau GmbH & Co. KG, Sprockhövel) gekoppelt mit einem API 4000 Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt).

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: A 1583–1618
- Hecht SS, Chen CHB, Young R, Hoffmann D (1981) Mass spectra of tobacco alkaloid-derived nitrosamines, their metabolites, and related compounds. Beiträge zur Tabakforschung International 11: 57–66
- Hecht SS, Trushin N, Reid-Quinn CA, Burak ES, Jones AB, Southers JL, Gombar CT, Carmella SG, Anderson LM, Rice JM (1993) Metabolism of the tobacco specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. Carcinogenesis 14: 229–236
- Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. Chem Res Toxicol 11: 559–603
- Hecht SS und Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. Cancer Surveys 8: 273–294
- Hecht SS (2002) Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. Carcinogenesis 23: 907–922

2464 Biomonitoring Methods

- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 83: 1–1438
- Kavvadias D, Scherer G, Cheung F, Errington G, Shepperd J, McEwan M (2009 a) Determination of tobacco-specific *N*-nitrosamines in urine of smokers and nonsmokers. *Biomarkers* 14: 547–553
- Kavvadias D, Scherer G, Urban M, Cheung F, Errington G, Shepperd J, McEwan M (2009 b) Simultaneous determination of four tobacco-specific *N*-nitrosamines (TSNA) in human urine. *J Chromatogr B* 877: 1185–1192
- Meger M, Richter E, Zwickenpflug W, Oehlmann C, Hargaden MB, A-Rahim YI, Vesell ES (1999) Metabolism and disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in Rhesus monkeys. *Drug Metab Dispos* 27: 471–478
- Sarkar M, Liu J, Koval T, Wang J, Feng S, Serafin R, Jin Y, Xie Y, Newland K, Roethig HJ (2010) Evaluation of biomarkers of exposure in adult cigarette smokers using Marlboro Snus. *Nicotine Tob Res* 12: 105–116
- Shah KA und Karnes HT (2010) A review of the analysis of tobacco-specific nitrosamines in biological matrices. *Crit Rev Toxicol* 40: 305–327
- Stepanov I und Hecht SS (2005) Tobacco-specific nitrosamines and their pyridine-*N*-glucuronides in the urine of smokers and smokeless tobacco users. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 885–891
- Stepanov I, Carmella SG, Han S, Pinto A, Strasser AA, Lerman C, Hecht SS (2009 a) Evidence for endogenous formation of *N'*-nitrosonornicotine in some long-term nicotine patch users. *Nicotine Tob Res* 11: 99–105
- Stepanov I, Carmella SG, Briggs A, Hertsgaard L, Lindgren B, Hatsukami D, Hecht SS (2009 b) Presence of the Carcinogen *N'*-Nitrosonornicotine in the Urine of Some Users of Oral Nicotine Replacement Therapy Products. *Cancer Res* 69: 8236–8240
- Tricker AR, Schorp MK, Urban HJ, Leyden D, Hagedorn HW, Engl J, Urban M, Riedel K, Gilch G, Janket D, Scherer G (2009) Comparison of Environmental Tobacco Smoke (ETS) Concentrations Generated by an Electrically Heated Cigarette Smoking System and a Conventional Cigarette. *Inhal Toxicol* 21: 62–77
- Urban M, Scherer G, Kavvadias D, Hagedorn HW, Feng S, Serafin R, Kapur S, Muhammad R, Jin Y, Mendes P, Roethig H (2009) Quantitation of *N'*-Nitrosonornicotine (NNN) in Smokers' Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 33: 260–265

Entwickler der Methode: G. Scherer, G. Gilch, D. Köhler

Prüfer der Methode: W. Völkel

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

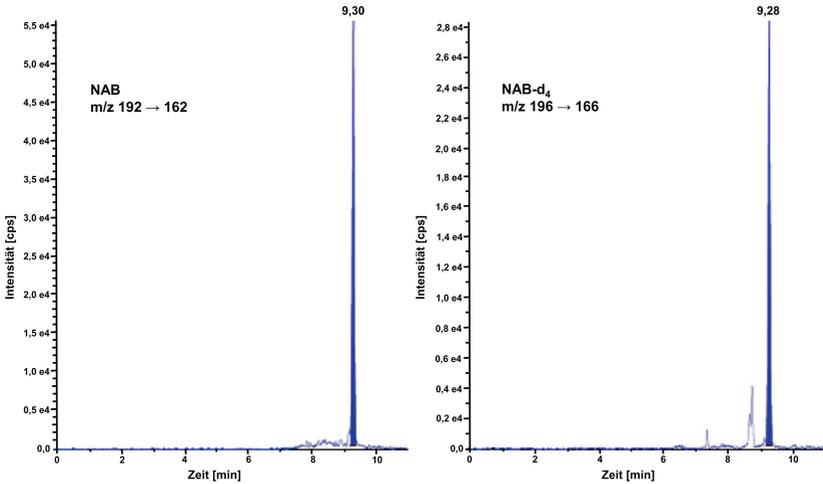


Abb. 2 LC-MS/MS-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Raucherurins für den Analyten NAB und den internen Standard NAB-d₄ (ermittelter NAB-Gehalt: 70 ng/L).

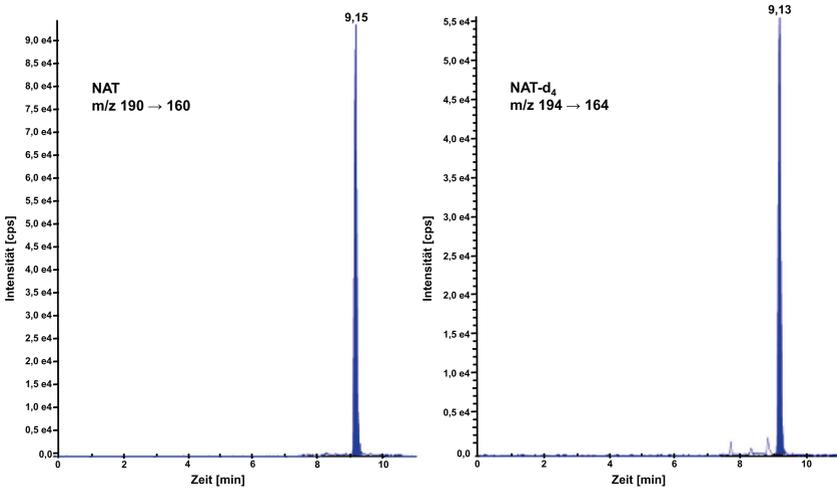


Abb. 3 LC-MS/MS-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Raucherurins für den Analyten NAT und den internen Standard NAT-d₄ (ermittelter NAT-Gehalt: 327 ng/L).

2466 Biomonitoring Methods

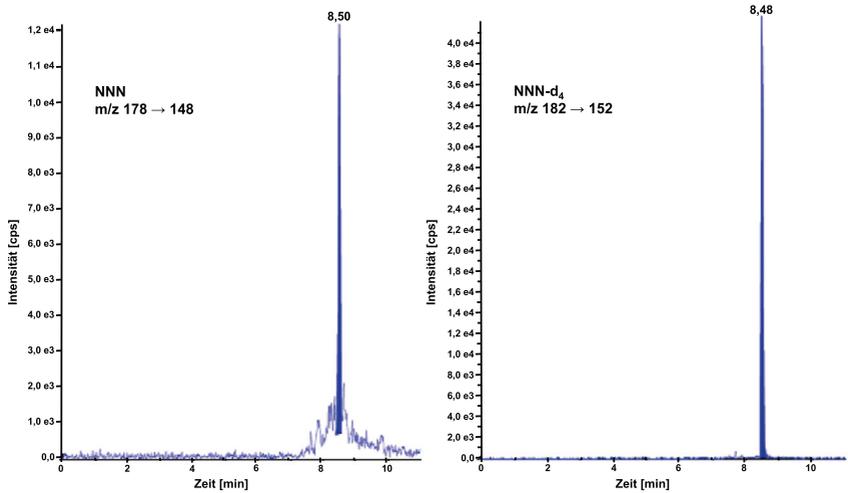


Abb. 4 LC-MS/MS-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Raucherurins für den Analyten NNN und den internen Standard NNN-d₄ (ermittelter NNN-Gehalt: 17 ng/L).

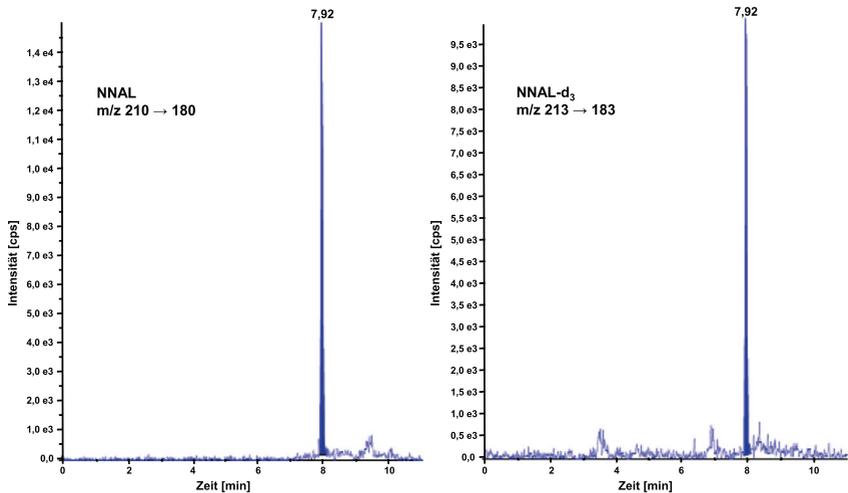


Abb. 5 LC-MS/MS-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Raucherurins für den Analyten NNAL und den internen Standard NNAL-d₃ (ermittelter NNAL-Gehalt: 119 ng/L).

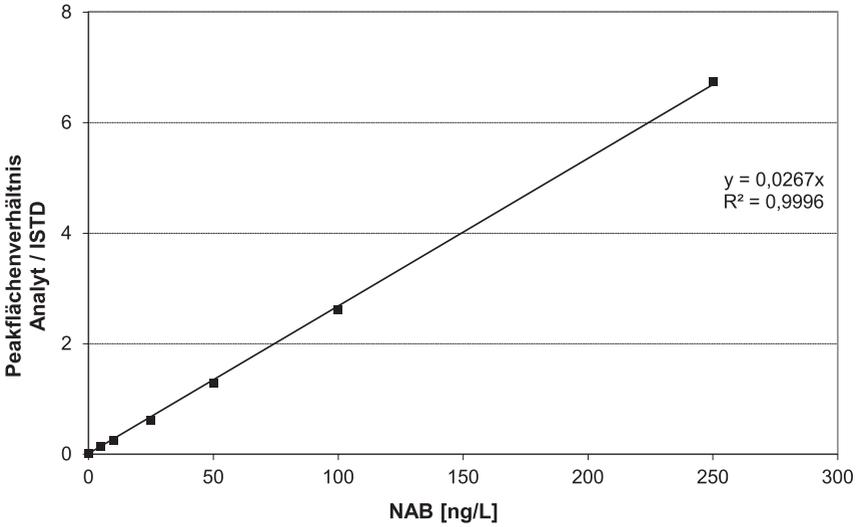


Abb. 6 Kalibriergerade für die Bestimmung von NAB in Urin (Messbereich 0–250 ng/L).

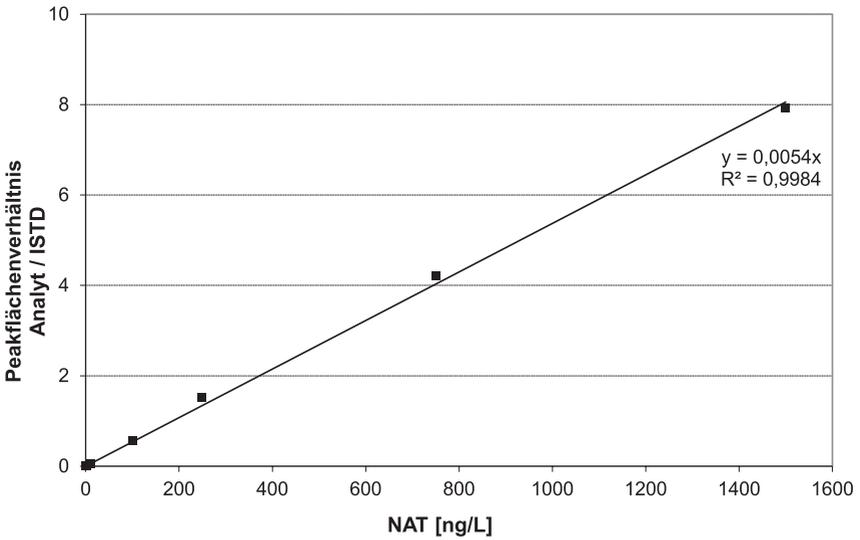


Abb. 7 Kalibriergerade für die Bestimmung von NAT in Urin (Messbereich 0–1500 ng/L).

2468 Biomonitoring Methods

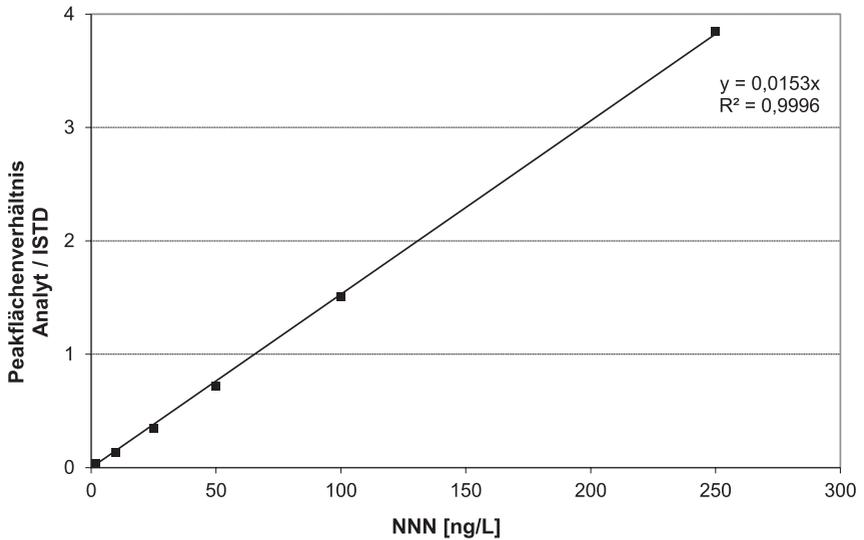


Abb. 8 Kalibriergerade für die Bestimmung von NNN in Urin (Messbereich 0–250 ng/L).

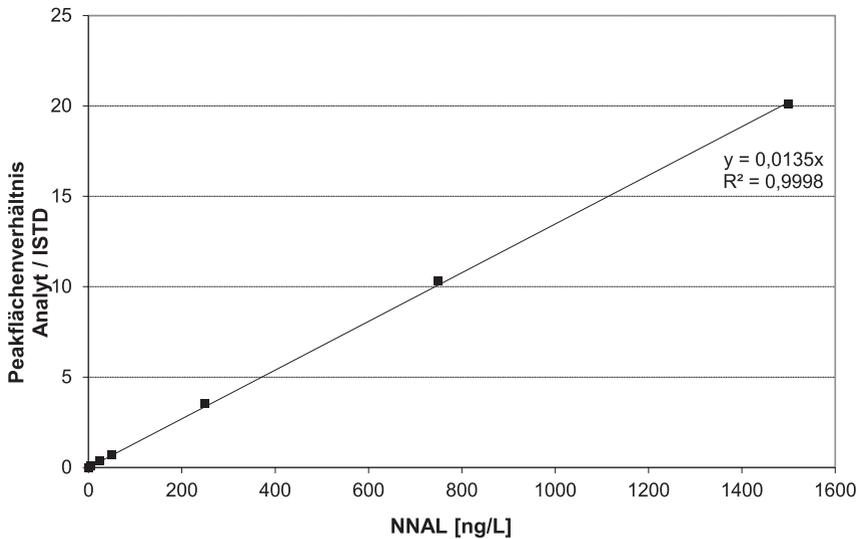


Abb. 9 Kalibriergerade für die Bestimmung von NNAL in Urin (Messbereich 0–1500 ng/L).