

Butylhydroxytoluol (BHT) – Bestimmung von 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure) in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Butylhydroxytoluol, BHT, 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-kresol, 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol, Urin, BHT-Säure, 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure, Biomonitoring, LC-MS/MS

W. Gries¹
K. Küpper¹
C. Schmidtkunz¹
G. Leng¹
G. Scherer²

D. Krnac²
T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

- ¹ *Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-SER-GS-BLM, Institut für Biomonitoring, 51368 Leverkusen, Deutschland*
- ² *Prüfer der Methode, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Goethestraße 20, 80336 München, Deutschland*
- ³ *Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland*
- 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, Deutschland*
- ⁵ *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Deutschland*

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

Citation Note:

Gries W, Küpper K, Schmidtkunz C, Leng G, Scherer G, Krnac D, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Butylhydroxytoluol (BHT) – Bestimmung von 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure) in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2020 Mai;5(1):Doc021. DOI: [10.34865/bi12837d5_1](https://doi.org/10.34865/bi12837d5_1)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area verified the presented biomonitoring method.

The method described hereinafter permits the selective determination of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT acid) as a metabolite of butylated hydroxytoluene (BHT) in urine. After adding a ¹³C₆-ring labelled internal standard (ISTD), the samples are enzymatically hydrolysed to release the free BHT acid from glucuronidated compounds. Using two-dimensional liquid chromatography the samples are concentrated and separated from matrix components and analysed using tandem mass spectrometry. Calibration is done using calibration standards prepared in water and processed in the same way as the samples to be analysed.

Manuskript abgeschlossen:
24 Nov 2016

Publikationsdatum:
11 Mai 2020

License: This article is distributed under the terms of the Creative Commons 4.0 International License. See license information at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1 Kenndaten der Methode

Matrix Urin

Analytisches Messprinzip LC-MS/MS

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Butylhydroxytoluol (BHT)	128-37-0	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure)	1421-49-4

Zuverlässigkeitskriterien

3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,0 \%, 5,1 \%, 4,5 \%$ bzw. 6,0 %
	Streubereich	$u = 8,9 \%, 11,4 \%, 10,0 \%$ bzw. 13,5 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 µg, 1,0 µg, 10,0 µg bzw. 100 µg BHT-Säure pro Liter Wasser und n = 10 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,7 \%, 8,1 \%, 11,0 \%$ bzw. 10,0 %
	Streubereich	$u = 21,8 \%, 18,2 \%, 24,8 \%$ bzw. 22,5 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 µg, 1,0 µg, 10,0 µg bzw. 100 µg BHT-Säure pro Liter Wasser und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 101 \%, 103 \%, 101 \%$ bzw. 102 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 µg, 1,0 µg, 10,0 µg bzw. 100 µg BHT-Säure pro Liter Wasser und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,06 µg BHT-Säure pro Liter Wasser	
Bestimmungsgrenze:	0,2 µg BHT-Säure pro Liter Wasser	

2 Allgemeine Informationen zu BHT

Butylhydroxytoluol (BHT) (2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-kresol, 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol) wurde nach seiner Patentierung im Jahre 1947 zunächst als Stabilisierungsmittel in der Erdöl- und Klebstoffindustrie eingesetzt. Aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften wurde der Anwendungsbereich bereits in den 1950er Jahren auf die Stabilisierung von Lebensmitteln und Kosmetika ausgeweitet (Witschi et al. 1989). Heute ist es eines der am häufigsten eingesetzten synthetischen Antioxidantien überhaupt (Nieva-Echevarria et al. 2015), wobei die antioxidativen Eigenschaften auf die sterisch gehinderte Phenolgruppe zurückzuführen sind, die als Radikalfänger wirkt.

Dementsprechend breit ist das Anwendungsspektrum im Lebensmittelbereich, wo die Substanz u. a. Backmischungen, Nüssen, Instantsuppen, Kaugummis, Fetten und Ölen als Antioxidans (E 321) zugesetzt wird. In der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 (EU 2008) sind die maximal zulässigen Gehalte dieses Zusatzstoffes in verschiedenen Lebensmitteln festgelegt. Weitere Anwendungsgebiete sind der Zusatz zu Pharmazeutika (Salben, Gelatine kapseln), Kosmetika (Duschgel, Seifen), Kunststoffen und Gummiprodukten sowie Farben und Lacken.

Die industrielle Herstellung erfolgt durch Umsetzung von *p*-Kresol mit 2-Methylpropen unter Einsatz von Schwefelsäure als Katalysator. Im Jahr 2000 lag das weltweite Produktionsvolumen bei ca. 62 000 t/a (OECD 2002).

BHT ist ein weißer Feststoff, der aus farblosen Kristallen besteht und einen leicht phenolartigen Geruch besitzt. Es hat einen Schmelzpunkt von 70 °C und ist in Wasser nahezu unlöslich (0,76 mg/l). BHT wird unter verschiedenen Handelsnamen vermarktet u. a. Vulkanox-BHT, Ionol, Paranox 441, Impruvol oder Antioxidant 4K.

Am Arbeitsplatz wird BHT hauptsächlich inhalativ aufgenommen, eine dermale Aufnahme ist aber ebenso möglich, wobei nach dermalen Applikation nur 4 % der applizierten Menge die Haut penetrieren und die systemische Bioverfügbarkeit somit gering ist (Henschler 1986).

Es sind mehrere Stoffwechselwege und zahlreiche Metaboliten des BHT bekannt. Aus Metabolismusstudien an Ratten, Mäusen und Kaninchen ist bekannt, dass chemische Umwandlungen im Metabolismus am Ring, an der Methylgruppe sowie an den *tert*-Butylgruppen stattfinden können. Dabei führt der Hauptabbauweg beim Nager und beim Menschen durch stufenweise Oxidation der 4-Methylgruppe über den BHT-Alkohol und den BHT-Aldehyd zur BHT-Säure (siehe Abbildung 1) (Henschler 1986; Nieva-Echevarria et al. 2015). Aus den wenigen verfügbaren Daten zum Metabolismus des BHT beim Menschen ist bekannt, dass im Urin bis zu 5 % der aufgenommenen BHT-Dosis als BHT-Säure ausgeschieden werden, wobei diese überwiegend als Glucuronid gebunden vorliegt (Daniel et al. 1968; Verhagen et al. 1989; Wiebe et al. 1978).

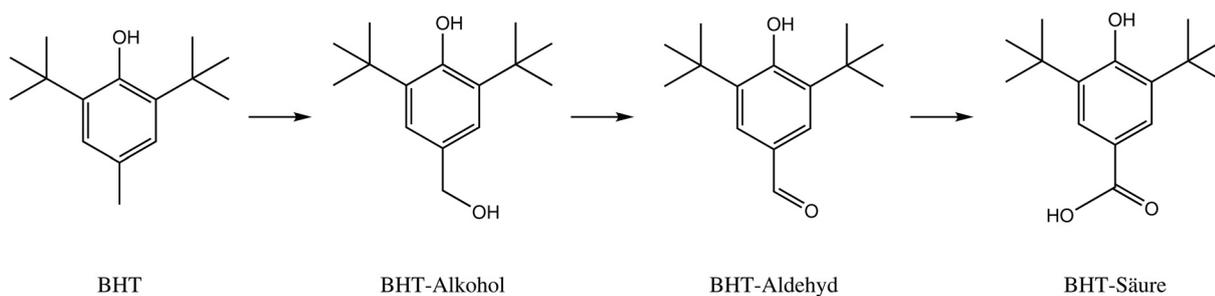


Abb. 1 Hauptabbauweg des BHT zur BHT-Säure (Henschler 1986)

Die Elimination erfolgt zweiphasig und in der α -Phase rasch und vorwiegend über den Urin. Die β -Phase der Elimination kann, bedingt durch einen extensiven enterohepatischen Kreislauf der Metaboliten oder deren Speicherung im Fettgewebe, eine Halbwertszeit von ca. 10 Tagen haben. Beim Menschen erfolgt die Ausscheidung von BHT und seinen Metaboliten primär über den Urin, während bei der Ratte auch eine Ausscheidung über die Faeces stattfindet (Greim 2004; Lanigan und Yamarik 2002).

BHT wurde von der Kommission in Kategorie 4 der krebserzeugenden Arbeitsstoffe eingestuft. Der MAK-Wert wurde auf 10 mg BHT/m³ E festgesetzt (DFG 2019; Hartwig 2012). Da die Resorption durch die Haut nicht wesentlich zur inneren Belastung beiträgt, wurde BHT nicht mit „H“ markiert. Eine „Sh“ oder „Sa“-Markierung wurde nicht vergeben. Von der EFSA wurde ein ADI-Wert (*Acceptable Daily Intake*) von 0,25 mg/kg Körpergewicht pro Tag abgeleitet (EFSA 2012). Beurteilungswerte im biologischen Material liegen nicht vor. Weitere Details zur toxikologischen Bewertung des BHT können den entsprechenden Dokumentationen der Kommission entnommen werden (Greim 2004; Hartwig 2012; Henschler 1986).

Aufgrund der weitverbreiteten Verwendung des BHT in vielen Lebensbereichen ist eine potentielle Belastung der Allgemeinbevölkerung anzunehmen. Aus mehreren Studien liegen Daten zur Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung vor, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Die in Tabelle 1 für Deutschland dargestellten Daten geben einen Überblick über die als Hintergrundbelastung der deutschen Bevölkerung zu erwartenden Gehalte.

Tab. 1 Daten zur Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung mit BHT unter Angabe der BHT-Säure-Ausscheidung im Urin

Land	Probenanzahl (> BG)	BHT-Säure [$\mu\text{g/l}$]		Literatur
		Mittelwert (Median)	Bereich	
Japan	24 (91,7 %)	5,49 (3,86)	< BG–24,4	
Indien	36 (94,3 %)	5,15 (2,24)	< BG–24,0	
China	53 (80,4 %)	0,56 (0,26)	< BG–4,98	Wang und Kannan 2019
Saudi-Arabien	9 (100 %)	1,46 (0,44)	0,11–5,63	
USA	23 (95,7 %)	7,44 (1,78)	< BG–46,0	
Deutschland	40 (82,5 %)	1,28 (0,83)	< BG–7,55	Leng und Gries 2017
Deutschland	10 (100 %)	8,66 (3,75)	0,7–35,4	erhobene Daten aus Methodenprüfung
Deutschland	329 (98 %)	1,70 (1,06)	< BG–18,1	Schmidtkunz et al. 2020
Deutschland	22 (91 %)	n. a. (0,91)	< BG–12,7	Göen et al. 2006

BG: Bestimmungsgrenze; n. a.: nicht angegeben

3 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode dient der selektiven Erfassung von 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure) als Metabolit des Butylhydroxytoluols (BHT) im Urin. Nach Zugabe eines $^{13}\text{C}_6$ -ringmarkierten internen Standards (ISTD) werden die Proben enzymatisch hydrolysiert, um die glucuronidisch gebundenen BHT-Säure-Anteile freizusetzen. Mittels zweidimensionaler LC-Kopplung werden die Analysenproben nach online-Aufreinigung und Anreicherung flüssigchromatographisch von Begleitkomponenten getrennt und mittels nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Wasser angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-MS/MS-System: Waters Acquity UPLC mit 2D-LC-Option gekoppelt mit Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn)
- LC-Säule: Zorbax RRHD Eclipse Plus C8 1,8 μm , 2,1 mm \times 100 mm (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Nr. 959758-906)
- Anreicherungssäule: XBridge BEH C8 Direct Connect HP 10 μm , 2,1 mm \times 30 mm (Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186005233)
- Trap-Säule, z. B. Oasis HLB Direct Connect HP 20 μm , 2,1 mm \times 30 mm (Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186005231)
- Laborschüttler (z. B. IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Wärmeschrank (z. B. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Verschiedene Messkolben und Bechergläser (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)

- Mikroliterpipetten, variabel einstellbar zwischen 10 µl und 100 µl sowie zwischen 100 µl und 1000 µl (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipette (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 2 ml-Gläschen und Bördelkappen (z. B. Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186000327C)
- pH-Meter (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- pH-Universalpapier, pH 0–11 (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbergrecht)

4.2 Chemikalien

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

- Acetonitril, LC-MS grade (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 1.00029)
- Hochreines Wasser, CHROMASOLV™ (z. B. Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Nr. 39253)
- β -Glucuronidase (z. B. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Nr. 03707598001)
- Eisessig, Suprapur® (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 1.00066)
- Ameisensäure (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 533002)
- Ammoniumacetat (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 73594)
- 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure (BHT-Säure), 98 % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 143472)
- 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoesäure-¹³C₆ (ringmarkiert) (¹³C₆-BHT-Säure), 97 % (Auftragssynthese, Institut für Dünnschichttechnologie und Mikrosensorik e. V., Teltow)

4.3 Lösungen

- Ammoniumacetat-Puffer (1 mol/l)
Genau 38,5 g Ammoniumacetat werden in ein 400 ml-Becherglas eingewogen und in ca. 250 ml hochreinem Wasser gelöst. Nach erfolgter pH-Einstellung mit Eisessig auf pH 6,5 (pH-Meter) wird die Lösung quantitativ in einen 500 ml-Messkolben überführt und mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Mobile Phase für die UPLC (Mobile Phase A)
1 ml Ameisensäure wird in einen 1000 ml-Kolben pipettiert. Der Kolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und die mobile Phase gut durchmischt.
- Mobile Phase für die UPLC (Mobile Phase B)
1 ml Ameisensäure wird in einen 1000 ml-Kolben pipettiert. Der Kolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und die mobile Phase gut durchmischt.

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

4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung I (1000 mg/l)
10 mg der $^{13}\text{C}_6$ -BHT-Säure werden in einen 10 ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Stammlösung II (10 mg/l)
100 µl der ISTD-Stammlösung I werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l)
1 ml der ISTD-Stammlösung II werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die ISTD-Lösungen sind bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C mindestens drei Monate haltbar.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg BHT-Säure werden in einen 10 ml-Messkolben eingewogen und in Acetonitril gelöst. Der Kolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (10 mg/l)
100 µl der Stammlösung werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung II (1 mg/l)
1 ml der Dotierlösung I wird in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung III (100 µg/l)
100 µl der Dotierlösung I werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung IV (10 µg/l)
100 µl der Dotierlösung II werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung V (1 µg/l)
1 ml der Dotierlösung IV werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die Stamm- und Dotierlösungen können bei 4 °C für mindestens drei Monate ohne Analytverluste gelagert werden. Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 0,01 µg/l bis 200 µg/l werden in hochreinem Wasser nach dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema angesetzt. Als Leerwert wird hochreines Wasser mitgeführt.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards zur Bestimmung von BHT-Säure in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen der Dotierlösung [μ l]	Volumen Wasser [μ l]	Konz. Kalibrierstandard [μ g/l]
1	–	–	500	0
2	V	5	495	0,01
3	V	10	490	0,02
4	V	25	475	0,05
5	IV	5	495	0,1
6	IV	10	490	0,2
7	IV	25	475	0,5
8	III	5	495	1,0
9	III	10	490	2,0
10	III	25	475	5,0
11	II	5	495	10,0
12	II	10	490	20,0
13	II	25	475	50,0
14	I	5	495	100
15	I	10	490	200

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in geeigneten Urinsammelgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

5.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Es werden 0,5 ml der Urinprobe in ein 2 ml-Rollrandgläschen überführt und 5 μ l der ISTD-Dotierlösung zugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml des Ammoniumacetatpuffers. Die Probe wird auf einem Schüttler gut durchmischt. Zur Hydrolyse wird die Probe mit 5 μ l der β -Glucuronidase versetzt, gut durchmischt und das verschlossene Probengefäß für drei Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wird diese direkt zur Analyse in das UPLC-MS/MS-System injiziert.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem UPLC-System mit zwei Gradientenpumpen gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer.

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC)

Analytische Säule:	Zorbax RRHD Eclipse Plus C8 1,8 µm, 2,1 mm × 100 mm
Anreicherungssäule:	XBridge BEH C8 Direct Connect HP 10 µm, 2,1 mm × 30 mm
Mobile Phase:	Mobile Phase A: hochreines Wasser mit 0,1 % Ameisensäure Mobile Phase B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	25 µl
Schaltprogramm:	0–0,5 min: Ventil 1 – Position 1; Ventil 2 – Position 1 0,5–3,5 min: Ventil 1 – Position 2; Ventil 2 – Position 1 3,5–10 min: Ventil 1 – Position 1; Ventil 2 – Position 1 (vgl. Abbildung 2 im Anhang)
Gradientenprogramm:	siehe Tabellen 3 und 4

Tab. 3 Programm der Gradientenpumpe 1

Zeit [min]	Mobile Phase A [Vol.-%]	Mobile Phase B [Vol.-%]	Flussrate [ml/min]
0,0	90	10	0,8
1,0	90	10	0,8
1,5	0	100	0,8
3,0	0	100	0,8
3,5	90	10	0,8
10	90	10	0,8

Tab. 4 Programm der Gradientenpumpe 2

Zeit [min]	Mobile Phase A [Vol.-%]	Mobile Phase B [Vol.-%]	Flussrate [ml/min]
0,0	90	10	0,3
1,0	90	10	0,3
7,0	5	95	0,3
9,0	5	95	0,3
9,5	90	10	0,3
10,0	90	10	0,3

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsart:	positive Elektrospray-Ionisation (ESI+)
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	400 °C
Cone-Gasfluss:	150 l/h
Desolvationsgasfluss:	700 l/h
Kollisionsgasfluss:	0,15 ml/h
Zerstäuber-Gasfluss:	6,0 bar
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 5

Tab. 5 Parameterspezifische Einstellungen für den Analyten und den internen Standard

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenspur [m/z]		Cone-Spannung [V]	Kollisionsenergie [V]
		Precursor-Ion	Tochter-Ion		
BHT-Säure	6,11	251,3	195,1	33,0	20,0
			139,0 ^{a)}	33,0	20,0
			57,1 ^{a)}	33,0	16,0
¹³ C ₆ -BHT-Säure	6,11	257,3	201,1 ^{a)}	47,0	22,0
			145,0 ^{a)}	47,0	20,0
			57,1	47,0	16,0

^{a)} Qualifier

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

7 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 5 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 25 µl in das UPLC-MS/MS-Gerät injiziert. Die injizierte Probe wird auf der Vorsäule angereichert und gereinigt. Durch Rückspülung (*back flush*) der Probe wird der Analyt von der Vorsäule auf die Trennsäule aufgebracht. Danach erfolgt die eigentliche analytische Trennung. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und der spezifischen Ionenspuren. Die Retentionszeiten des Analyten und des internen Standards sowie die registrierten Ionenspuren sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Qualifier-Übergänge dienen lediglich der Absicherung der Identität des Analyten. Je nach Matrixinterferenzen kann es bei einzelnen Proben sinnvoll sein, über einen der Qualifier zu quantifizieren statt über den eigentlichen Quantifier. In diesen Fällen muss die Kalibrierkurve entsprechend erstellt werden.

Die in Tabelle 5 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten UPLC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten des Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 3 und 4 (im Anhang) sind beispielhaft Chromatogramme einer nativen Urinprobe sowie einer dotierten Wasserprobe (Kalibrierstandard) gezeigt.

8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 5.2) und mittels LC-MS/MS (vgl. Abschnitt 6) analysiert. Die Erstellung der Kalibrierkurven erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des $^{13}\text{C}_6$ -markierten internen Standards gegen die dotierte Konzentration der jeweiligen Kalibrierstandards. Im Messbereich von der Nachweisgrenze bis 200 $\mu\text{g/l}$ ergibt sich eine quadratische Kalibrierfunktion. Bei jeder Analysenserie werden drei Reagenzienleerwerte (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) und drei Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 10) mitgeführt.

In Abbildung 5 (im Anhang) ist beispielhaft eine in Wasser angesetzte Kalibrierkurve des Analyten dargestellt. Die Kalibrierung erfolgt wegen der ubiquitären Hintergrundbelastung mit BHT-Säure in Wasser statt in Urin.

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die ermittelten Peakflächen der BHT-Säure werden durch die jeweilige Peakfläche des $^{13}\text{C}_6$ -markierten internen Standards dividiert. Durch Einsetzen der erhaltenen Quotienten in die entsprechende Kalibrierfunktion (vgl. Abschnitt 8) wird die Analytkonzentration in $\mu\text{g/l}$ berechnet. Eventuelle Reagenzienleerwerte werden durch Subtraktion berücksichtigt. Die Berechnung der Analytkonzentration erfolgte mit der Gerätesoftware MassLynx 4.1 von Waters.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014). Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit untersucht, die bekannte Konzentrationen des Analyten aufweisen. Da kein käuflich zu erwerbendes Qualitätskontrollmaterial zur Verfügung steht, muss dieses selbst hergestellt werden. Dazu wird hochreines Wasser mit Dotierlösungen des Analyten versetzt, sodass die Konzentrationen der Kontrollmaterialien im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegen (z. B. 1 $\mu\text{g/l}$, 10 $\mu\text{g/l}$ und 100 $\mu\text{g/l}$). Die Dotierlösungen werden hierfür unabhängig von jenen, die für die Kalibrierung genutzt werden, hergestellt (separate Einwaage). Aliquote dieser Proben werden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an 10 Tagen je eine Analyse der Kontrollmaterialien) ermittelt (Bader et al. 2010).

Gleichzeitig werden in jeder Analysenserie mindestens drei Reagenzienleerwerte analysiert, damit eventuelle Störungen aus den Chemikalien erkannt werden können (vgl. Abschnitt 11.5).

11 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.

11.1 Präzision

Die Bestimmung der Präzision in der Serie erfolgte sowohl in Wasser als auch in Urin. Hierfür wurde zunächst hochreines Wasser mit BHT-Säure in Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/l}$, 1,0 $\mu\text{g/l}$, 10 $\mu\text{g/l}$ und 100 $\mu\text{g/l}$ dotiert und zehnfach analysiert. Zusätzlich wurde ein Poolurin mit BHT-Säure in Konzentrationen von 1,0 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/l}$ dotiert und zehnfach analysiert. Die dotierten Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet (Abschnitt 5.2) und analysiert (Abschnitt 6). Darüber hinaus wurde eine undotierte native Urinprobe neunfach aufgearbeitet und analysiert.

Die hieraus ermittelten Präzisionen in der Serie sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung von BHT-Säure (n = 9 bzw. n = 10)

Matrix	Dotierte Konzentration	Standardabweichung (rel.)	Streubereich
	[µg/l]	s_w [%]	u [%]
Wasser	0,1	4,0	8,9
	1,0	5,1	11,4
	10,0	4,5	10,0
	100	6,0	13,5
Poolurin	1,0	11,4	25,8
	10,0	11,0	24,9
undotierte Urinprobe	– ^{a)}	6,6	15,2

^{a)} gemessene mittlere native Konzentration: 26,8 µg/l

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ebenfalls Wasser dotiert und über einen Zeitraum von 2,5 Tagen zehnfach analysiert. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von BHT-Säure (n = 10)

Matrix	Dotierte Konzentration	Standardabweichung (rel.)	Streubereich
	[µg/l]	s_w [%]	u [%]
Wasser	0,1	9,7	21,8
	1,0	8,1	18,2
	10,0	11,0	24,8
	100	10,0	22,5

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde aus den Daten zur Bestimmung der Präzision in Serie und der Präzision von Tag zu Tag ermittelt. Zusätzlich wurden zehn Individualurine mit je 1,0 und 10 µg/l BHT-Säure dotiert, um den Einfluss unterschiedlicher Urinmatrices zu ermitteln. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in den Tabellen 8 und 9 aufgeführt.

Tab. 8 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von BHT-Säure, ermittelt aus den Daten zur Präzision in der Serie (n = 10) bzw. aus der Analyse dotierter Individualurinproben (n = 10)

Matrix	Dotierte Konzentration	Wiederfindung (rel.)	Bereich
	[µg/l]	r [%]	[%]
Wasser	0,1	101	95–108
	1,0	103	95–109
	10,0	101	93–105
	100	102	93–109
Poolurin	1,0	95	80–111
	10,0	87	73–99
Individualurinproben	1,0	97	78–119
	10,0	95	85–105

Tab. 9 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von BHT-Säure, ermittelt aus den Daten zur Präzision von Tag zu Tag (n = 10)

Matrix	Dotierte Konzentration	Wiederfindung (rel.)	Bereich
	[µg/l]	r [%]	[%]
Wasser	0,1	97	85–115
	1,0	101	88–112
	10,0	96	82–117
	100	98	88–113

11.3 Hydrolyse

Um die Notwendigkeit der Hydrolyse zu beurteilen, wurden 17 native Urinproben von Personen, die an ihrem Arbeitsplatz mit BHT in Berührung kommen konnten, mit und ohne Hydrolyse aufgearbeitet und analysiert. So wurde der Gehalt der freien BHT-Säure (ohne Hydrolyse) sowie der gesamten BHT-Säure (freie plus konjugierte BHT-Säure, mit Hydrolyse) bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10 Bestimmung von BHT-Säure in Urin mit bzw. ohne enzymatischer Hydrolyse (n = 17)

Hydrolyse	BHT-Säure [µg/l]		> BG [%]
	Median (Mittelwert)	Bereich	
ohne Hydrolyse	0,52 (2,07)	< 0,2–12,1	82,4
enzymatische Hydrolyse (β -Glucuronidase)	4,11 (8,44)	0,9–32,5	100

Um die enzymatische Hydrolyse mit der sauren Hydrolyse zu vergleichen, wurden Urinproben von 22 Personen, die im Rahmen ihrer Tätigkeit Umgang mit BHT hatten, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tab. 11 Bestimmung von BHT-Säure in Urin unter Verwendung der enzymatischen bzw. sauren Hydrolyse (n = 22)

Hydrolyse	BHT-Säure [µg/l]		> BG [%]
	Median (Mittelwert)	Bereich	
enzymatische Hydrolyse (β -Glucuronidase)	4,55 (6,47)	0,7–26,6	100
saure Hydrolyse (Salzsäure)	3,84 (6,05)	0,5–26,7	100

Weiterhin wurden fünf der höher belasteten Proben aus diesem Kollektiv ausgewählt und nach Hydrolyse mit Säure und mit zwei verschiedenen Enzymen (Glucuronidase bzw. Glucuronidase/Arylsulfatase) miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tab. 12 Bestimmung von BHT-Säure in Urin unter Verwendung zweier verschiedener Enzyme bzw. der sauren Hydrolyse (n = 5)

Hydrolyse	BHT-Säure [$\mu\text{g/l}$]				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
enzymatische Hydrolyse (β -Glucuronidase/Arylsulfatase <i>H. pomatia</i>)	26,6	n. a.	10,5	24,3	11,4
enzymatische Hydrolyse (β -Glucuronidase <i>E. coli</i>)	24,4	5,03	10,7	20,3	13,1
saure Hydrolyse (Salzsäure)	19,6	4,48	9,06	26,7	14,4

n. a.: nicht auswertbar (aufgrund von Matrixinterferenzen beim internen Standard)

Um die Reproduzierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse zu ermitteln, wurde eine native Urinprobe zehnfach aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Daten aus neun Messungen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tab. 13 Reproduzierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse bei der Bestimmung von BHT-Säure in Urin (n = 9)

Hydrolyse	Mittelwert [$\mu\text{g/l}$]	Bereich [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]
enzymatische Hydrolyse (β -Glucuronidase)	26,8	23,9–29,6	6,6

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden in Anlehnung an das DIN-Verfahren 32645 (DIN 2008) unter Verwendung der untersten sechs Punkte einer in Wasser angesetzten Kalibrierkurve bestimmt. Die aus der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenze ($\text{NWG} = 4 \times s_{x0}$) ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14 Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung der BHT-Säure

Analyt	Matrix	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/l}$]
BHT-Säure	Wasser	0,06	0,2

11.5 Störeinflüsse

Ziel der Methodenentwicklung war es, eine Nachweisgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$ zu erreichen. Dies erwies sich als sehr ambitioniert, da die BHT-Säure in allen eingesetzten Urinen mit einem deutlichen Hintergrundgehalt zu detektieren war. Aufgrund dieser Hintergrundbelastung war eine Kalibrierung in Urin nicht praktikabel. Daher wurden die Kalibrierstandards in Wasser angesetzt, wodurch das Problem der Hintergrundbelastung gelöst wurde. Trotz der Kalibrierung in Wasser wurde immer noch ein konstanter Leerwert von ca. $0,3 \mu\text{g/l}$ detektiert. Das verwendete Ammoniumacetat, das trotz der Spezifikation „p. a.“ Spuren von BHT-Säure enthielt, wurde als Hauptquelle für diesen Leerwert identifiziert. Durch Verwendung von hochreinem Ammoniumacetat für die Massenspektrometrie konnte der Leerwert auf ca. $0,12 \mu\text{g/l}$ reduziert werden. Auch das zunächst verwendete deionisierte Wasser (Milli-Q-Wasser) wurde als mögliche Quelle für BHT-Säure ins Auge gefasst, da ein mikrobakterieller Abbau von BHT aus dem Filtermaterial nicht ausgeschlossen werden konnte. Dieses Wasser wurde daher durch spezielles, hochreines LC-MS-Wasser ersetzt und zugleich wurde für jede LC-Pumpe eine Trap-Säule vor die Trennsäule geschaltet. Durch diese Maßnahmen konnte der Leerwert auf ca. $0,05 \mu\text{g/l}$ gesenkt werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Notwendigkeit einer Hydrolyse zur Freisetzung der BHT-Säure bestätigt (vgl. Abschnitt 11.3). Im Anschluss wurden verschiedene Möglichkeiten der Hydrolyse getestet. Es stellte sich heraus, dass es sowohl bei Anwendung von Glucuronidase als auch von Glucuronidase/Arylsulfatase, im Vergleich zur sauren Hydrolyse, keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung der BHT-Säure gab. Allerdings waren in dotierten Urinproben nach saurer Hydrolyse immer wieder Ausreißer (vermutlich durch Quenching) zu beobachten und nach enzymatischer Hydrolyse mit Glucuronidase/Arylsulfatase eine erhöhte Hintergrundbelastung mit BHT-Säure, die mit Glucuronidase allein nicht zu beobachten war. Daher wurde für die Hydrolyse eine enzymatische Hydrolyse mit Glucuronidase ausgewählt. Damit konnte der leerwertbedingte Hintergrund weiter auf ca. 0,02 µg/l abgesenkt werden, so dass die Summe aller beschriebenen Maßnahmen eine Nachweisgrenze von 0,06 µg/l und eine Bestimmungsgrenze von 0,2 µg/l ermöglichte.

12 Diskussion der Methode

Die vorliegende Analysemethode ermöglicht die selektive und sensitive Bestimmung von BHT-Säure in Urin, wobei die schnelle und robuste Analytik Screening-Untersuchungen einer großen Anzahl an Proben erlaubt.

Durch Anwendung der LC-MS/MS-Technik mit Säulenschaltung wird die gesamte Analytik und Probenvorbereitung (Hydrolyse, Aufreinigung und Quantifizierung) unter Verwendung nur eines Probengefäßes durchgeführt, wodurch aufarbeitungsbedingte Verluste minimiert werden. Die Anreicherung des Analyten und die Aufreinigung der hydrolysierten Proben erfolgt auf einer Waters XBridge C8-Säule, die analytische Trennung auf der nachgeschalteten Zorbax RRHD Eclipse Plus C8-Säule.

Im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen sauren Hydrolyse führt die hier verwendete enzymatische Hydrolyse zu wesentlich untergrundärmeren Chromatogrammen. Dass die enzymatische Hydrolyse als Ersatz für die saure Hydrolyse eingesetzt werden kann, konnte durch die vergleichende Analytik von 22 Urinproben potentiell exponierter Personen eindeutig bestätigt werden.

Der Einsatz des strukturidentischen ¹³C₆-markierten internen Standards ermöglicht eine weitestgehende Kompensation aller analytischen Schwankungen, was durch die guten Präzisionsdaten bestätigt wird.

Im Rahmen der Prüfung der Methode erfolgte die Kalibrierung mittels linearer Regression, wobei die Kalibriergerade durch den Nullpunkt gelegt wurden. Der Arbeitsbereich reichte dabei ebenfalls bis 200 µg/l und es wurden vergleichbare Validierungsdaten erreicht.

Verwendete Messgeräte Waters Acquity UPLC gekoppelt mit Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn).

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2, Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bireliabd0019](https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärztebl 111: A1583–A1618
- Daniel JW, Gage JC, Jones DI (1968) The metabolism of 3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxytoluene in the rat and in man. Biochem J 106: 783–790. DOI: [10.1042/bj1060783](https://doi.org/10.1042/bj1060783)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2019) MAK- und BAT-Werte-Liste 2019, Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 55. Wiley-VCH, Weinheim. DOI: [10.1002/9783527826155](https://doi.org/10.1002/9783527826155)
- DIN (Deutsches Institut für Normung) (Hrsg) (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth, Berlin. DOI: [10.31030/1465413](https://doi.org/10.31030/1465413)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA J 10: 2588. DOI: [10.2903/j.efsa.2012.2588](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2588)

- EU (Europäische Union) (2008) Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe. OJ L 354: 16–33. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj>, abgerufen am 03 Apr 2020
- Göen T, Dewes P, Kraus T (2006) Biomonitoring von BHT-Expositionen durch die Bestimmung von 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzoesäure (DBHBA) im Urin. Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin e.V. Gentner, Stuttgart: 423–425
- Greim H (Hrsg) (2004) Butylhydroxytoluol (BHT). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 39. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb12837d0039](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12837d0039)
- Hartwig A (Hrsg) (2012) Butylhydroxytoluol (BHT). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 52. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb12837d0052](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12837d0052)
- Henschler D (Hrsg) (1986) Butylhydroxytoluol (BHT). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 11. Lieferung. VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb12837d0011](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12837d0011)
- Lanigan RS, Yamarik TA (2002) Final report on the safety assessment of BHT. *Int J Toxicol* 21 Suppl 2: 19–94. DOI: [10.1080/10915810290096513](https://doi.org/10.1080/10915810290096513)
- Leng G, Gries W (2017) New specific and sensitive biomonitoring methods for chemicals of emerging health relevance. *Int J Hyg Environ Health* 220: 113–122. DOI: [10.1016/j.ijheh.2016.09.014](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.014)
- Nieva-Echevarria B, Manzano MJ, Goicoechea E, Guillen MD (2015) 2,6-Di-tert-butyl-hydroxytoluene and its metabolites in foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 14: 67–80. DOI: [10.1111/1541-4337.12121](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12121)
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2002) 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT). SIDS Initial Assessment Report for SIAM 14. OECD, Paris. <https://hvpchemicals.oecd.org/ui/handler.axd?id=6d30349e-ef9f-496c-a2af-6d497d4f1cca>, abgerufen am 02. Jul 2019
- Schmidtkunz C, Küpper K, Weber T, Leng G, Kolossa-Gehring M (2020) A biomonitoring study assessing the exposure of young German adults to butylated hydroxytoluene (BHT). *Int J Hyg Environ Health*, in Vorbereitung
- Verhagen H, Beckers HHG, Comuth PAWV, Maas LM, ten Hoor F, Henderson PT, Kleinjans JCS (1989) Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. *Food Chem Toxicol* 27: 765–772. DOI: [10.1016/0278-6915\(89\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(89)90105-1)
- Wang W, Kannan K (2019) Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environ Int* 128: 24–29. DOI: [10.1016/j.envint.2019.04.028](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.028)
- Wiebe LI, Mercer JR, Ryan AJ (1978) Urinary metabolites of 3,5-di-(1-¹³C)methyl-1-methylethyl)-4-hydroxytoluene (BHT-¹³C) in man. *Drug Metab Dispos* 6: 296–302. <http://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/6/3/296.full.pdf>, abgerufen am 03 Apr 2020
- Witschi H, Malkinson AM, Thompson JA (1989) Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). *Pharmacol Ther* 42: 89–113. DOI: [10.1016/0163-7258\(89\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90023-5)

Anhang

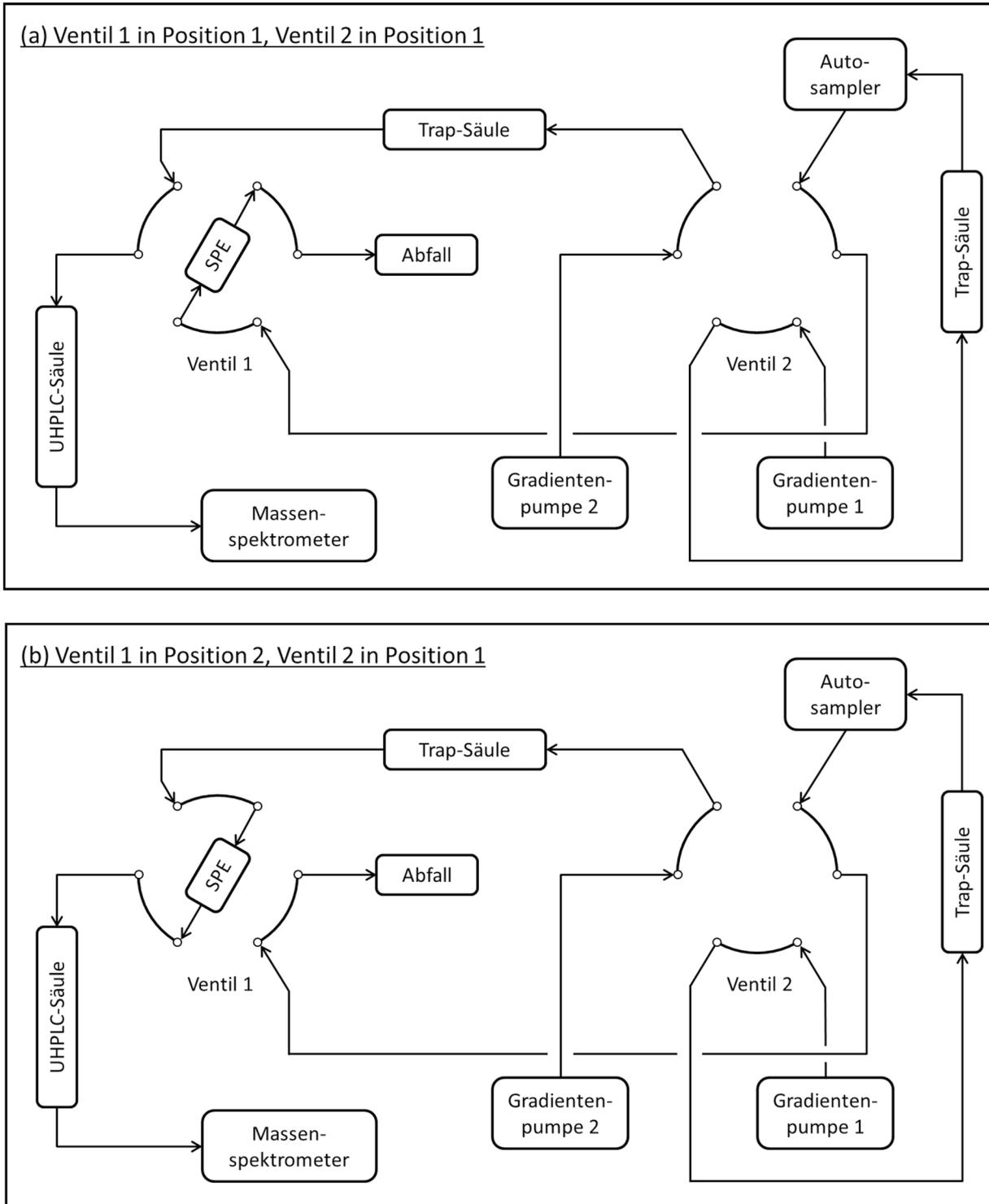


Abb. 2 Schematische Darstellung der Säulenschaltung

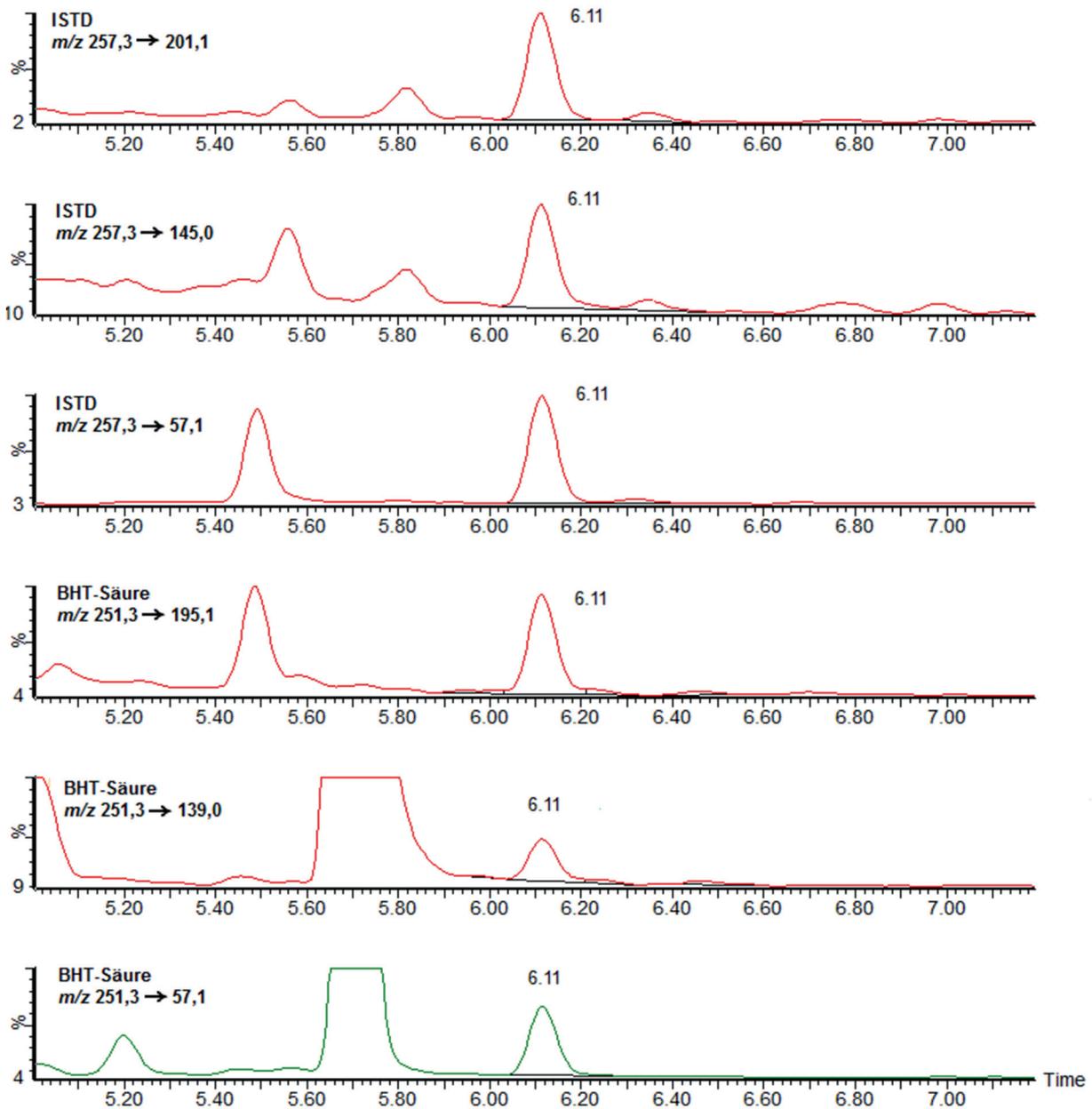


Abb. 3 Chromatogramm einer nativen Urinprobe mit einem ermittelten Gehalt an BHT-Säure von etwa 10 $\mu\text{g/l}$

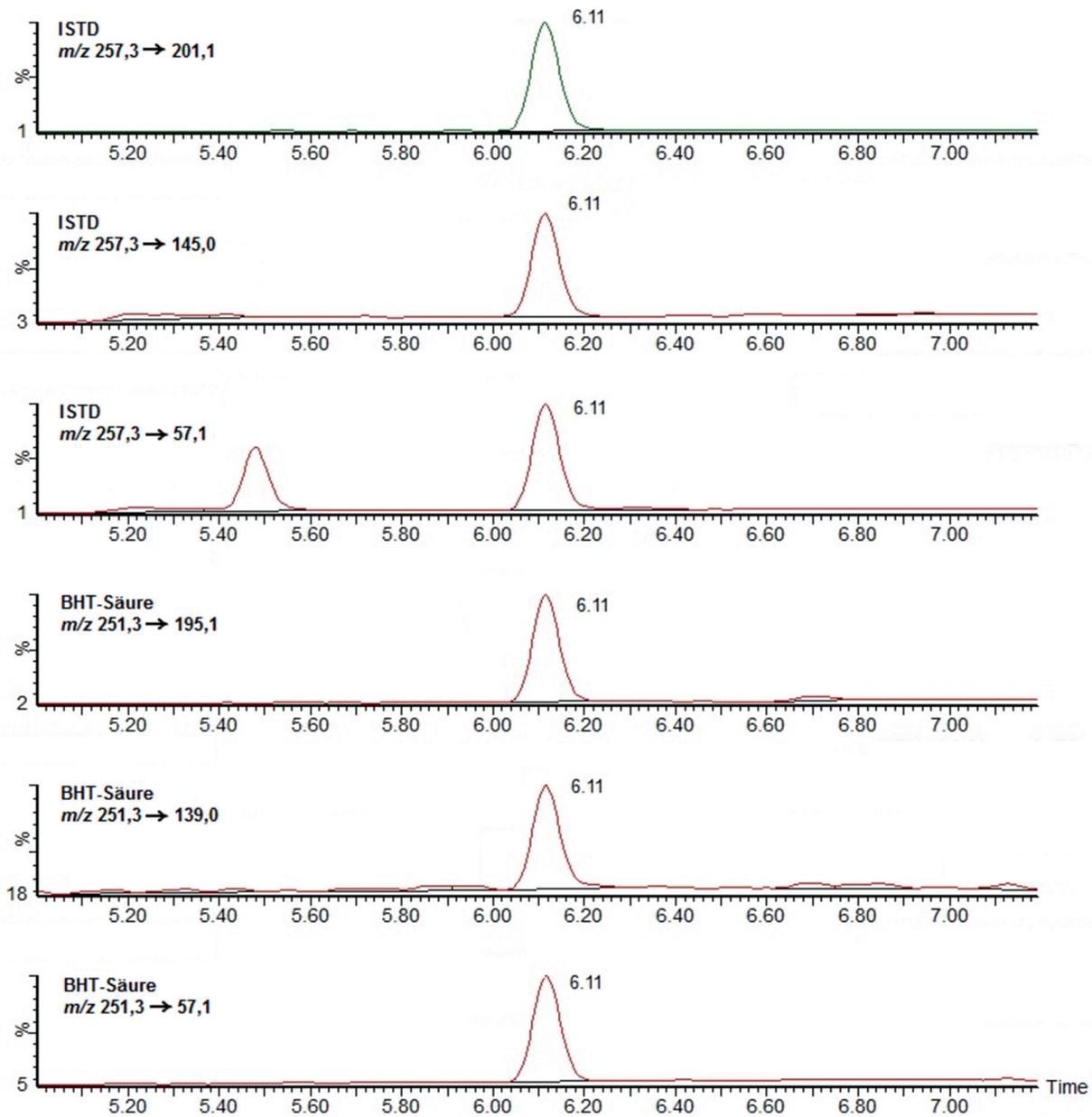


Abb. 4 Chromatogramm eines Kalibrierstandards in Wasser mit einem dotierten Gehalt an BHT-Säure von 10 µg/l

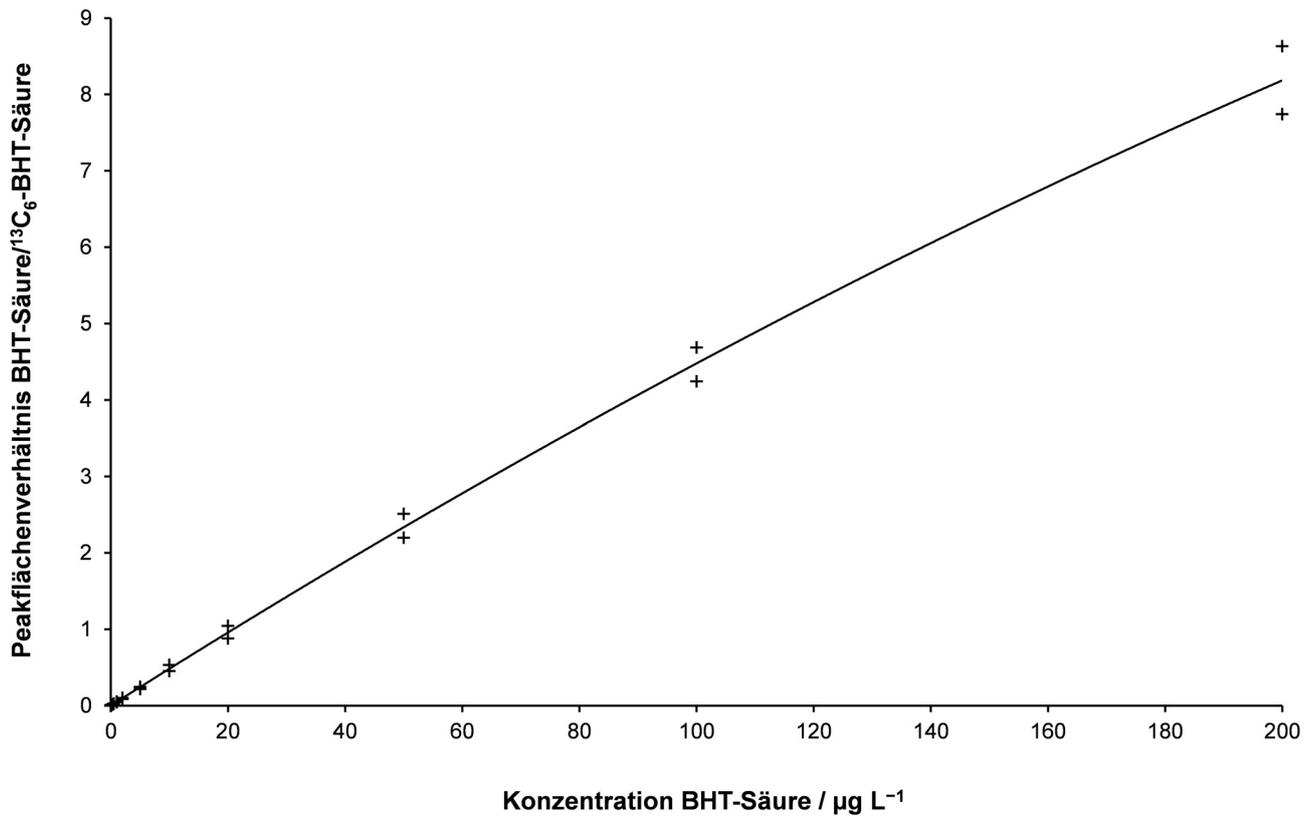


Abb. 5 Kalibrierkurve von BHT-Säure in Wasser