

# Naphthalin – Bestimmung von 1,2-Dihydroxynaphthalin, 1-Naphthol und 2-Naphthol in Urin mittels GC-MS/MS

## Biomonitoring-Methode

### Keywords:

Naphthalin, Naphthole, PAK,  
Polyzyklische aromatische  
Kohlenwasserstoffe,  
Biomonitoring, Urin, GC-MS/MS

K. Klotz<sup>1</sup>  
M. Zobel<sup>1</sup>  
T. Göen<sup>1,3,\*</sup>  
B. Roßbach<sup>2</sup>

E. Rißler<sup>2</sup>  
A. Hartwig<sup>4,\*</sup>  
MAK Commission<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup> Entwickler der Methode, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland

<sup>2</sup> Prüfer der Methode, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Obere Zahlbacher Straße 67, 55131 Mainz, Deutschland

<sup>3</sup> Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland

<sup>4</sup> 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

<sup>5</sup> Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Deutschland

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

## 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 verified the presented biomonitoring method.

This method allows the simultaneous determination of the naphthalene metabolites 1,2-dihydroxynaphthalene (1,2-DHN), 1-naphthol and 2-naphthol in urine in the presence of the antioxidant ascorbic acid. After adding isotope-labelled internal standards, the buffered urine samples are enzymatically hydrolysed to release the analytes from their conjugates. Subsequently, the analytes are purified and enriched using external solid-phase extraction. Following silylation, the analytes are separated by gas chromatography and then analysed by tandem mass spectrometry. Calibration standards are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed. For 1,2-DHN, a glucuronide conjugate of 1,2-DHN is used for calibration.

### Citation Note:

Klotz K, Zobel M, Göen T,  
Roßbach B, Rißler E,  
Hartwig A, MAK Commission.  
Naphthalin – Bestimmung  
von 1,2-Dihydroxynaphthalin,  
1-Naphthol und 2-Naphthol  
in Urin mittels GC-MS/MS.  
Biomonitoring-Methode.  
MAK Collect Occup Health  
Saf. 2020 Dez;5(4):Doc092.  
DOI: [10.34865/bi9120d5\\_4or](https://doi.org/10.34865/bi9120d5_4or)

Manuskript abgeschlossen:  
07 Nov 2019

Publikationsdatum:  
21 Dez 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

<b>Matrix</b>	Urin
<b>Analytisches Messprinzip</b>	GC-MS/MS
<b>Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe</b>	

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Naphthalin	91-20-3	1,2-Dihydroxynaphthalin (1,2-DHN)	574-00-5
		1-Naphthol	90-15-3
		2-Naphthol	135-19-3
1-Naphthylmethylcarbammat (Carbaryl)	63-25-2	1-Naphthol	90-15-3

### Zuverlässigkeitskriterien

#### 1,2-Dihydroxynaphthalin (1,2-DHN)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,5\%$ bzw. $4,2\%$
	Streubereich	$u = 11,6\%$ bzw. $10,8\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $99\ \mu\text{g}$ bzw. $495\ \mu\text{g}$ 1,2-DHN pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,1\%$ bzw. $2,1\%$
	Streubereich	$u = 10,5\%$ bzw. $5,4\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $99\ \mu\text{g}$ bzw. $495\ \mu\text{g}$ 1,2-DHN pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 100\%$ , $89\%$ bzw. $100\%$
	bei einer Soll-Konzentration von $6\ \mu\text{g}$ , $120\ \mu\text{g}$ bzw. $500\ \mu\text{g}$ 1,2-DHN pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,2\ \mu\text{g}$ 1,2-DHN pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,5\ \mu\text{g}$ 1,2-DHN pro Liter Urin	

## 1-Naphthol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,6\%$ bzw. $3,5\%$
	Streubereich	$u = 17,0\%$ bzw. $9,0\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $97\ \mu\text{g}$ bzw. $484\ \mu\text{g}$ 1-Naphthol pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$ bzw. $3,9\%$
	Streubereich	$u = 12,6\%$ bzw. $10,0\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $97\ \mu\text{g}$ bzw. $484\ \mu\text{g}$ 1-Naphthol pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 101\%$ , $90\%$ bzw. $103\%$
	bei einer Soll-Konzentration von $6\ \mu\text{g}$ , $120\ \mu\text{g}$ bzw. $500\ \mu\text{g}$ 1-Naphthol pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,1 $\mu\text{g}$ 1-Naphthol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,2 $\mu\text{g}$ 1-Naphthol pro Liter Urin	

## 2-Naphthol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$ bzw. $1,4\%$
	Streubereich	$u = 12,6\%$ bzw. $3,6\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $103\ \mu\text{g}$ bzw. $515\ \mu\text{g}$ 2-Naphthol pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,6\%$ bzw. $2,7\%$
	Streubereich	$u = 11,8\%$ bzw. $6,9\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $103\ \mu\text{g}$ bzw. $515\ \mu\text{g}$ 2-Naphthol pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 96\%$ , $92\%$ bzw. $107\%$
	bei einer Soll-Konzentration von $6\ \mu\text{g}$ , $120\ \mu\text{g}$ bzw. $500\ \mu\text{g}$ 2-Naphthol pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,1 $\mu\text{g}$ 2-Naphthol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,2 $\mu\text{g}$ 2-Naphthol pro Liter Urin	

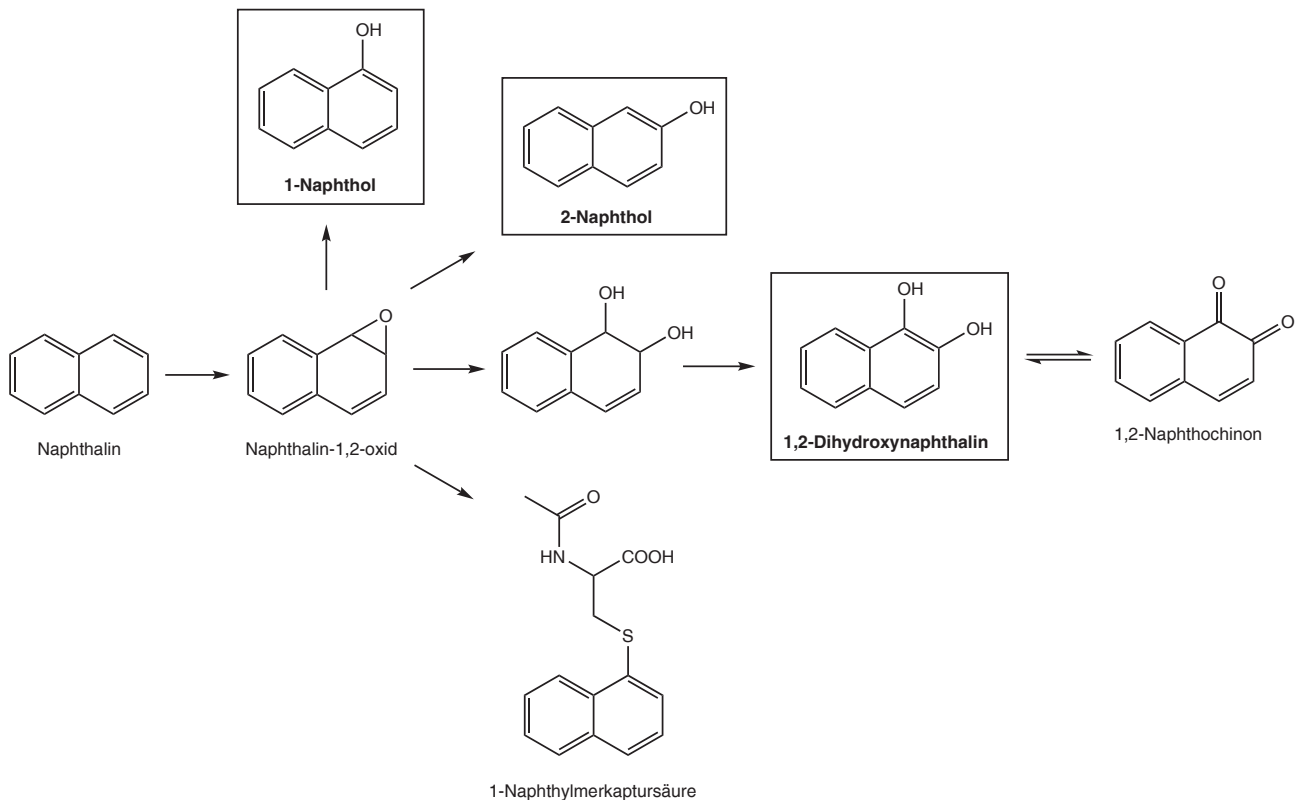
## 2 Allgemeine Informationen zu Naphthalin

Naphthalin gehört zur Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) und ist ein natürlicher Bestandteil von Steinkohlenteer und Erdöl. Nach Aufreinigung wird Naphthalin u. a. als Rohstoff für chemische Synthesen, für die Herstellung von Farbstoffen, Pyrotechnik und Mottenkugeln sowie als Porenbildner bei der Produktion poröser Schleifkörper verwendet (EU 2003).

Weiterhin entsteht Naphthalin bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material, so dass Naphthalin ubiquitär in der Umwelt vorkommt. Eine Exposition der Allgemeinbevölkerung kann durch Zigarettenrauch, den Verzehr von gegrillten oder geräucherten Lebensmitteln oder durch Verbrennungsabgase erfolgen. An bestimmten Arbeitsplätzen wie beispielsweise in der chemischen Industrie, bei der Schleifkörperherstellung oder an Arbeitsplätzen, bei denen ein Umgang mit Teer, Kreosot oder Bitumen erfolgt, wurden deutlich erhöhte Belastungen der Beschäftigten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung beobachtet (Preuss et al. 2005; Sucker et al. 2017; Ziener 2012).

Naphthalin ist von der Kommission als Kanzerogen der Kategorie 2 eingestuft und mit einer H-Markierung versehen (Gefahr durch Hautresorption). Weiterhin erfolgte eine Einstufung in Kategorie 3 B der Keimzellmutagene (DFG 2020). Für das Biomonitoring wurde ein biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert (BAR) von 35 µg/l Urin für die Summe aus 1-Naphthol und 2-Naphthol (nach Hydrolyse) für Nichtraucher abgeleitet. Eine Zusammenfassung der toxikologischen Eigenschaften von Naphthalin kann den entsprechenden Begründungen der Kommission entnommen werden (Greim 2001; Klotz et al. 2016).

Beim Menschen wird Naphthalin zu zwei instabilen, hochreaktiven Epoxiden metabolisiert, die in weiteren Reaktionsschritten in die 1-Naphthylmerkaptursäure sowie verschiedene mono- und dihydroxylierte Verbindungen bzw. die entsprechenden Glucuronid- bzw. Sulfatkonjugate überführt und über den Urin ausgeschieden werden (Preuss et al. 2003; Zobel et al. 2017, 2018) (siehe Abbildung 1). Eine Folgereaktion der hydroxylierten Metabolite kann zur Bildung hochreaktiver Naphthochinone führen, die als das toxische Agens diskutiert werden (Bolton et al. 2000). Eine direkte Bestimmung der Naphthochinone in Urin gestaltet sich aufgrund ihrer hohen Reaktivität schwierig. Reaktionsprodukte dieser Verbindungen mit Glutathion und Proteinen konnten aber bereits nachgewiesen werden (Ayala et al. 2015; Cho et al. 1994; Lin et al. 2014; Murty und Penning 1992; Tsuruda et al. 1995; Waidyanatha et al. 2002). 1,2-Dihydroxynaphthalin (1,2-DHN), als direkter Vorläufer des 1,2-Naphthochinons, erwies sich neueren Studien zufolge als ein Hauptmetabolit im humanen Naphthalinmetabolismus und stellt einen sensitiven und spezifischen Expositionsmarker dar (Klotz et al. 2011, 2018; Wu et al. 2005). Zusätzlich konnte für 1,2-DHN eine höhere diagnostische Spezifität im Vergleich zu den häufig verwendeten Naphthalin-Biomarkern 1-Naphthol und 2-Naphthol gezeigt werden (Klotz et al. 2011, 2018). Für die Bestimmung von 1- und 2-Naphthol im Urin liegen bereits von der Kommission geprüfte Analyseverfahren vor (Hardt et al. 2010; Preuss et al. 2010).



**Abb. 1** Schematische Übersicht zum Naphthalinmetabolismus beim Menschen (nach Zobel et al. 2017)

Zur Naphtholausscheidung im Urin beruflich nicht gegen Naphthalin exponierter Nichtraucher und Raucher wurde eine Vielzahl von Studien publiziert (zusammengefasst bei Klotz et al. 2016). Für Nichtraucher wurden überwiegend Konzentrationen von  $< 30 \mu\text{g/l}$  für 1-Naphthol bzw.  $< 20 \mu\text{g/l}$  für 2-Naphthol angegeben, für Raucher Konzentrationen von  $< 45 \mu\text{g/l}$  für 1-Naphthol bzw.  $< 55 \mu\text{g/l}$  für 2-Naphthol. Für 1,2-DHN liegen nur wenige Daten zur Hintergrundbelastung vor. Wu et al. (2005) gaben für ein Kollektiv von 21 chinesischen Büro- und Krankenhausangestellten (18 Nichtraucher, drei Raucher) einen geometrischen Mittelwert von  $38,8 \pm 2,3 \mu\text{g/l}$  Urin an. Ein Kontrollkollektiv von 29 Personen in Deutschland wies deutlich niedrigere Gehalte auf. Im Median (Bereich) wurden für 20 Nichtraucher Gehalte von  $4,6 \mu\text{g/l}$  ( $< 1,0 - 19,3 \mu\text{g/l}$ ) bzw. für neun Raucher von  $17,1 \mu\text{g/l}$  ( $1,9 - 62,0 \mu\text{g/l}$ ) im Urin bestimmt (Klotz et al. 2011). An Industriearbeitsplätzen liegen deutlich höhere Belastungen der Beschäftigten vor. In einem Kollektiv von neun Beschäftigten der Holzimprägnierung wurden 1,2-DHN-Gehalte von bis zu  $1500 \mu\text{g/l}$  Urin gefunden, die Gehalte von 1- und 2-Naphthol lagen im Bereich von jeweils bis zu  $150 \mu\text{g/l}$  (Klotz et al. 2018). In einer weiteren Studie wurden bei 32 Beschäftigten der Schleifkörperproduktion 1,2-DHN-Gehalte von bis zu  $50\,000 \mu\text{g/l}$  Urin gefunden, mit Mediangehalten zwischen 600 und  $11\,000 \mu\text{g}$  1,2-DHN/l je nach Probenahmezeitpunkt. Die Mediangehalte von 1- und 2-Naphthol lagen in dieser Studie bei 20 und  $400 \mu\text{g/l}$  Urin mit Spitzenwerten von bis zu  $2700 \mu\text{g}$  1-Naphthol bzw.  $1100 \mu\text{g}$  2-Naphthol je Liter Urin (Klotz et al. 2019).

Bei der Beurteilung von Expositionen aufgrund der 1-Naphthol-Ausscheidung im Urin ist zu beachten, dass 1-Naphthol auch einen Metaboliten des Insektizids Carbaryl darstellt (Henschler 1973).

### 3 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode dient der simultanen Erfassung der Naphthalinmetabolite 1,2-DHN, 1-Naphthol und 2-Naphthol in Urin in Anwesenheit von Ascorbinsäure als Antioxidans. Nach Zugabe von isotopenmarkierten inter-

nen Standards werden die gepufferten Urinproben enzymatisch hydrolysiert, um die Analyten aus den Konjugaten freizusetzen. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung und Anreicherung der Analyten mittels externer Festphasenextraktion. Nach Silylierung werden die Analyten gaschromatographisch getrennt und anschließend mittels Tandemmassenspektrometrie analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Für 1,2-DHN wird als Referenzsubstanz glucuronidiertes 1,2-DHN eingesetzt.

## 4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 4.1 Geräte

- Gaschromatograph mit tandemmassenspektrometrischem Detektor (z. B. Agilent 7000 A, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- Kapillargaschromatographische Säule: stationäre Phase: 5 %-Phenyl-Arylen-95 %-Dimethylpolysiloxan, Länge: 30 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25  $\mu\text{m}$  (z. B. Zebron<sup>®</sup> ZB 5 ms, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, Nr. 7HG-G010-11)
- Vorrichtung für die Festphasenextraktion (z. B. VacElut, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- Säulen für die Festphasenextraktion, stationäre Phase: Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer (z. B. Isolute<sup>®</sup> 101, 100 mg, 3 ml, Partikelgröße 65  $\mu\text{m}$ , Porendurchmesser 100  $\text{Å}$ , Biotage AB, Uppsala, Schweden, Nr. 101-0010-B)
- Zentrifuge (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Präzisionswaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Vortex-Schüttler (z. B. Scientific Industries, Inc., New York, USA)
- Wärmeschrank (z. B. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Wasserbad (z. B. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
- 8-ml-Braunglasröhrchen mit Deckel (z. B. LC Laborcenter GmbH & Co., Nürnberg)
- 13-ml-Kunststoffröhrchen mit Deckel (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Verschiedene Pipetten und Multipetten<sup>®</sup> (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Verschiedene Bechergläser und Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- pH-Meter mit pH-Elektrode (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Ultraschallbad (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vorrichtung zum Eindampfen im Stickstoffstrom (z. B. Biotage AB, Uppsala, Schweden)
- 1,8-ml-Braunglasvials und Bördelkappen (z. B. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- 200- $\mu\text{l}$ -Mikroeingsätze für die Vials (z. B. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- Urinsammelbehälter aus Polyethylen (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)

## 4.2 Chemikalien

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

### Referenzstandards

- 1-Naphthol, 99 % (z. B. Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Nr. N1000)
- 2-Naphthol, 98 % (z. B. Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Nr. 130109)
- 1,2-Dihydroxynaphthalin-Glucuronid × 1,5 Triethylamin, 97 % (Auftragssynthese, siehe Zobel et al. 2017)

### Interne Standards

- D<sub>8</sub>-1-Naphthol (1-OD-2,3,4,5,6,7,8-D<sub>7</sub>-Naphthalin), 98 % (z. B. C/D/N Isotopes Inc., Quebec, Kanada, Nr. D-2391)
- D<sub>7</sub>-2-Naphthol (2-OH-1,3,4,5,6,7,8-D<sub>7</sub>-Naphthalin), 98 % (z. B. C/D/N Isotopes Inc., Quebec, Kanada, Nr. D-5051)
- D<sub>6</sub>-1,2-Dihydroxynaphthalin-Glucuronid × 1,5 Triethylamin, 95 % (Auftragssynthese, siehe Zobel et al. 2017)

### Sonstige Chemikalien

- Bis(trimethylsilyl)acetamid mit 3–5 % Trimethylchlorsilan (BSA+TMCS) (z. B. Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Nr. 15256)
- Methanol, für die Gaschromatographie (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100837)
- Toluol, für die Gaschromatographie (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100849)
- Acetonitril, trocken, 99,8 % (z. B. Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Nr. 271004)
- Essigsäure, 100 % (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100063)
- Natriumhydroxid, Plätzchen (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106469)
- Ascorbinsäure, ≥ 99 % (z. B. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nr. 3525.3)
- β-Glucuronidase (5,5 U/ml)/Arylsulfatase (2,6 U/ml), isoliert aus *Helix pomatia* (z. B. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nr. BGALA-RO)
- Hochreines Wasser (z. B. über MilliPore®-Technik)
- Helium 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)

## 4.3 Lösungen

- Natriumhydroxidlösung (1 mol/l)

In einem 1000-ml-Messkolben werden genau 40,0 g Natriumhydroxid-Plätzchen eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

- Natriumacetat-Puffer (0,1 mol/l, pH 5)

In einem Becherglas werden etwa 800 ml hochreines Wasser vorgelegt und 11,5 ml Essigsäure hinzupipettiert. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 5 erfolgt unter Rühren mit Natriumhydroxidlösung (1 mol/l) am pH-Meter. Nach Überführen der Lösung in einen 2-l-Messkolben wird dieser mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

- Wässrige Methanollösung (8 % Methanol, v/v)

In einem 100-ml-Messkolben werden etwa 50 ml hochreines Wasser vorgelegt und 8 ml Methanol zugegeben. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur in Glasgefäßen gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

- Ascorbinsäurelösung (250 g/l)

Genau 2,50 g Ascorbinsäure werden in einem 10-ml-Messkolben eingewogen und mit etwa 7 ml hochreinem Wasser versetzt. Unter Erwärmen und Verwendung eines Ultraschallbades wird die Ascorbinsäure gelöst und anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung muss arbeitstäglich frisch hergestellt werden.

#### 4.4 Interne Standards (ISTD)

- ISTD-Stammlösungen (ca. 100 mg/l)

Je etwa 0,5 mg der isotopenmarkierten Standardsubstanzen D<sub>8</sub>-1-Naphthol, D<sub>7</sub>-2-Naphthol sowie 1,5 mg des Triethylaminsalzes vom D<sub>6</sub>-1,2-Dihydroxynaphthalin-Glucuronid werden in je einem 5-ml-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Kolben werden im Anschluss mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

- ISTD-Dotierlösung

Je 350 µl der ISTD-Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit hochreinem Wasser aufgefüllt. Die Dotierlösung enthält eine Analytkonzentration der ISTD von je ca. 3,5 mg/l.

Die ISTD-Lösungen werden bei –20 °C in braunen Schraubglasvials mit Teflondichtung dunkel gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

#### 4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (400 mg/l)

Je 4 mg der Standardsubstanzen von 1- und 2-Naphthol sowie, unter Berücksichtigung des Massenverhältnisses zum Glucuronid und zum Triethylamin, 12,5 mg 1,2-DHN werden in je einem 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Methanol gelöst. Die Kolben werden im Anschluss mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

- Zwischenverdünnung (100 mg/l)

Je 2,5 ml der Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

- Dotierlösung 1 (DL 1, 10 mg/l)

1 ml der Zwischenverdünnung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

- Dotierlösung 2 (DL 2, 1 mg/l)

0,1 ml der Zwischenverdünnung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.



Die Standardlösungen werden bei  $-20\text{ °C}$  in braunen Schraubglasvials mit Teflondichtung dunkel gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

Die Kalibrierung wird in Poolurin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins wird eine Mischung verschiedener Urine von Nichtrauchern verwendet, bei denen keine berufliche Exposition gegen Naphthalin oder andere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe vorlag. Dieser Poolurin wird bei  $-20\text{ °C}$  gelagert und vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die wässrigen Dotierlösungen gemäß dem in Tabelle 1 angegebenen Pipettierschema mit Poolurin zu einem Endvolumen von 2 ml gemischt. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Proben wie unter Abschnitt 5 angegeben. Die Kalibrierlösungen können auch in einem größeren Ansatz hergestellt und zu je 2 ml aliquotiert werden. Die Kalibrierlösungen werden bei  $-20\text{ °C}$  in Schraubglasvials mit Teflondichtung gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

**Tab. 1** Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Naphthalinmetaboliten in Urin

Kalibrierstandard	Volumen Dotierlösung [ $\mu\text{l}$ ]		Poolurin [ $\mu\text{l}$ ]	Dotierung je Analyt [ $\mu\text{g/l}$ ]
	DL 1	DL 2		
0	–	–	2000	0
1	–	10	1990	5
2	–	20	1980	10
3	20	–	1980	100
4	50	–	1950	250
5	100	–	1900	500
6	150	–	1850	750
7	200	–	1800	1000

## 5 Probenahme und Probenaufbereitung

### 5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Polyethylenbehältern gesammelt und bis zur Probenaufbereitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 5.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse wird der Urin aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. In ein 8-ml-Braunglas-Schraubgläschen werden zu einem Aliquot von 2 ml Urinprobe 150  $\mu\text{l}$  frisch hergestellte Ascorbinsäurelösung und 50  $\mu\text{l}$  der ISTD-Dotierlösung gegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml des Natriumacetatpuffers. Die Probe wird auf einem Vortex-Schüttler gut durchmischt. Zur Hydrolyse erfolgt im Anschluss die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  des Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase. Die Probe wird erneut gut durchmischt (zehn Sekunden Vortex-Schüttler) und dann bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad für 16 Stunden hydrolysiert. Im Anschluss daran wird die Probe gut durchmischt (zehn Sekunden Vortex-Schüttler) und für zehn Minuten bei  $1600 \times g$  zentrifugiert.

Die Anreicherung der Analyten erfolgt mittels Festphasenextraktion an Isololute<sup>®</sup> 101-Kartuschen. Zur Konditionierung wird die Kartusche auf einer Vorrichtung für die Festphasenextraktion platziert, zweimal mit je 1,5 ml Methanol gewaschen und anschließend zweimal mit je 1,5 ml hochreinem Wasser sowie zweimal mit je 2 ml Natriumacetatpuffer equilibriert. Im Anschluss erfolgt die Aufgabe von 3 ml des Überstandes der hydrolysierten und zen-

trifugierten Probelösung. Die Probenaufgabe sollte dabei ohne Anlegen eines Vakuums erfolgen. Anschließend wird die Kartusche nacheinander mit 3 ml Natriumacetatpuffer, zweimal je 1,5 ml hochreinem Wasser und 2 ml der wässrigen Methanollösung gewaschen. Durch Anlegen eines Vakuums wird die Kartusche für etwa fünf Minuten trocken-gesaugt. Zum Entfernen von Flüssigkeitsresten wird die Kartusche dann in ein 13-ml-Kunststoffröhrchen gestellt und für zehn Minuten bei  $1600 \times g$  zentrifugiert. Nach erneutem Trockensaugen der Kartusche für zehn Minuten auf der Vorrichtung für die Festphasenextraktion erfolgt die Elution der Analyten in ein 1,8-ml-Braunglasvial durch Aufgabe von dreimal je 0,5 ml Acetonitril auf die Kartusche. Das Eluat wird anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Zum vollständigen Entfernen von Wasserresten wird der Rückstand nochmals in 200  $\mu$ l Acetonitril aufgenommen und im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt.

Zur Derivatisierung wird der Rückstand mit 10  $\mu$ l des Derivatisierungsreagenz BSA+TMCS sowie 200  $\mu$ l Toluol versetzt. Das Vial wird verschlossen, gut durchmischt (zehn Sekunden Vortex-Schüttler) und dann für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgt die Inkubation der Probe für eine Stunde bei 70 °C im Trockenschrank. Die Probenlösung wird dann in einen 200- $\mu$ l-Mikroinsert überführt und zur Analyse mittels GC-MS/MS eingesetzt.

## 6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (GC-MS/MS-System).

### 6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Zebron <sup>®</sup> ZB 5 ms
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 $\mu$ m
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 100 °C, 1 min isotherm, dann Anstieg mit 10 °C/min auf 120 °C, dann Anstieg mit 5 °C/min auf 195 °C, dann Anstieg mit 30 °C/min auf 300 °C, 15 min bei Endtemperatur
	Injektor:	280 °C
	Transfer Line:	300 °C
Trägergas:	Helium 5.0	
Fluss:	1,8 ml/min, konstant	
Injektorliner:	Glaswolle, deaktiviert	
Injektion:	1 $\mu$ l, splitless	

## 6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)
Ionisationsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	230 °C
Solvent delay:	10 min
Detektionsmodus:	MRM
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 2

Sämtliche Einstellungen der Ionenquelle sowie die MRM-Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell angepasst werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

## 7 Analytische Bestimmung

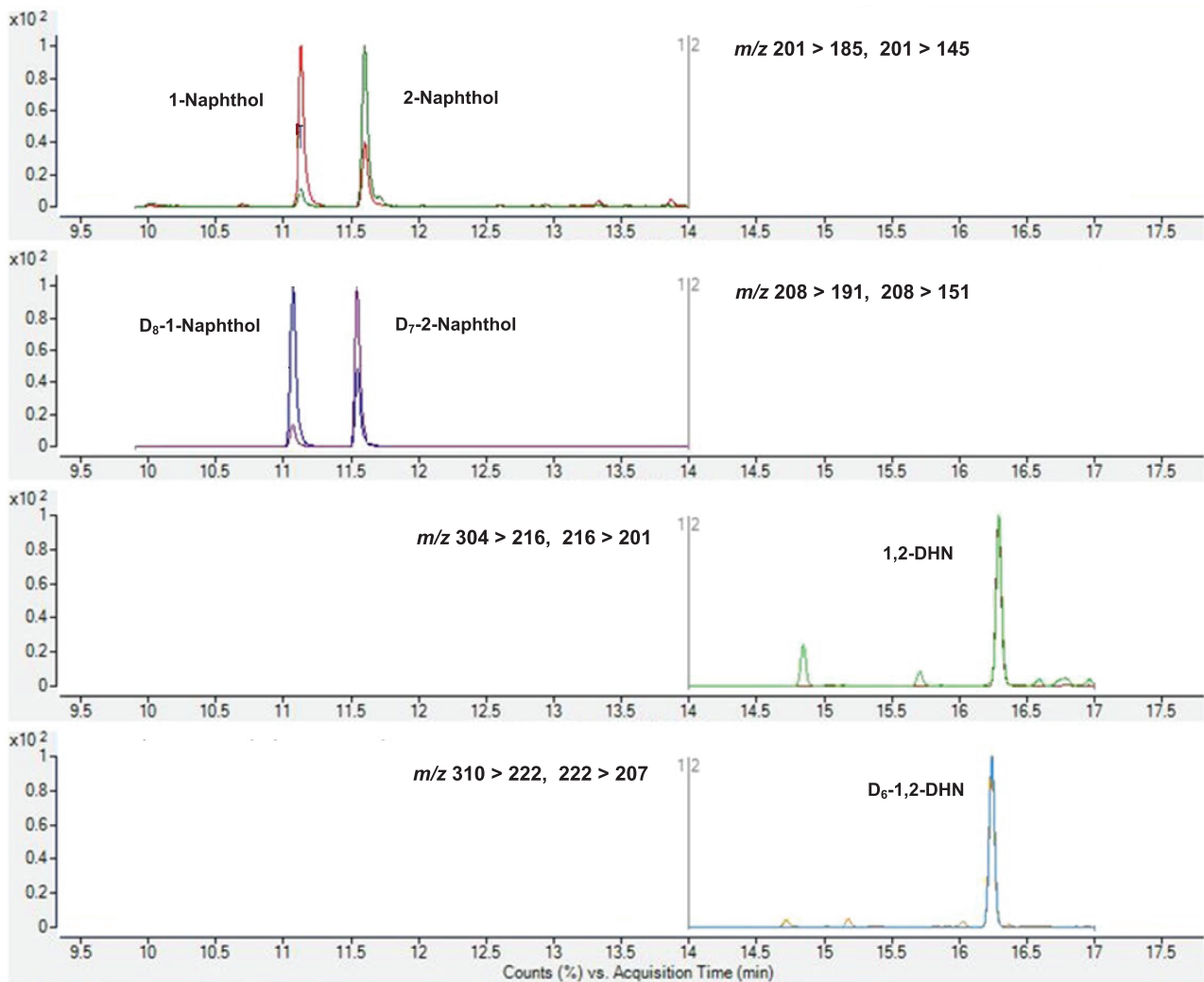
Von den nach Abschnitt 5 aufgearbeiteten Proben wird jeweils 1 µl in das GC-MS/MS-Gerät injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenübergänge und der Retentionszeit (siehe Tabelle 2). Die in Tabelle 2 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. Bei jeder Analysenserie wird ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) mitgeführt. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Chromatogramme einer aufgearbeiteten Urinprobe eines beruflich gegen Naphthalin exponierten Beschäftigten.

**Tab. 2** Parameterspezifische Einstellungen und Retentionszeiten der Analyten

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenübergänge [ <i>m/z</i> ]		Kollisionsenergie [V]
		Ausgangs-Ion (Q1)	Produkt-Ion (Q3)	
1-Naphthol	11,1	201	185	10
		201	145 <sup>a)</sup>	12
		216	201 <sup>b)</sup>	7
D <sub>8</sub> -1-Naphthol	11,0	208	191	14
		208	151 <sup>a)</sup>	14
		223	208 <sup>b)</sup>	7
2-Naphthol	11,6	201	145	12
		201	185 <sup>a)</sup>	10
		216	201 <sup>b)</sup>	7
D <sub>7</sub> -2-Naphthol	11,5	208	151	14
		208	191 <sup>a)</sup>	14
		223	208 <sup>b)</sup>	7
1,2-DHN	16,3	304	216	16
		216	201 <sup>a)</sup>	10
D <sub>6</sub> -1,2-DHN	16,2	310	222	16
		222	207 <sup>a)</sup>	12

<sup>a)</sup> Qualifier

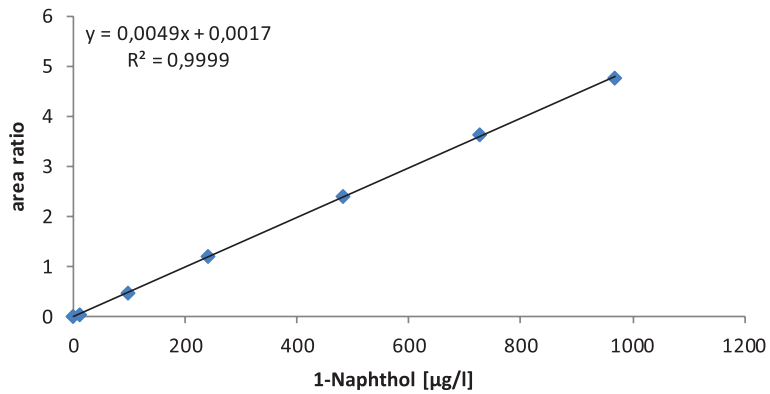
<sup>b)</sup> alternativer Ionenübergang, im Rahmen der Methodenprüfung als Quantifier genutzt



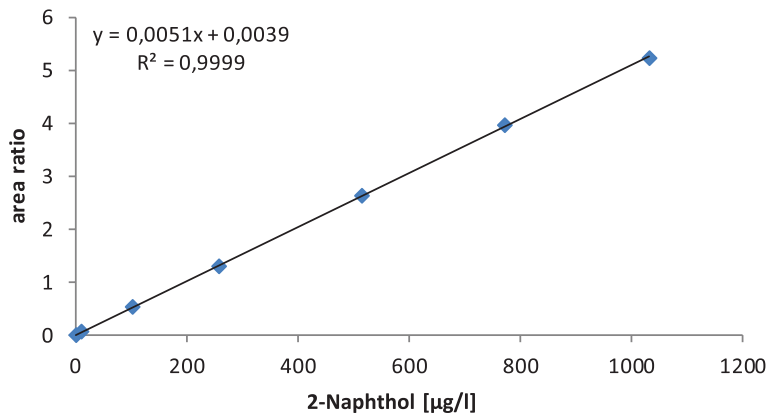
**Abb. 2** GC-MS/MS-Chromatogramme einer aufgearbeiteten Urinprobe eines beruflich gegen Naphthalin exponierten Beschäftigten (ermittelte Konzentrationen: 1-Naphthol: 30,2 µg/l, 2-Naphthol: 22,5 µg/l und 1,2-DHN: 260 µg/l)

## 8 Kalibrierung

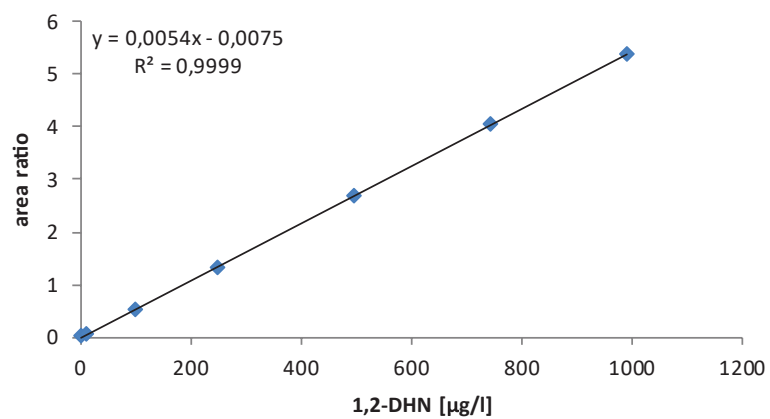
Zur Kalibrierung der Methode werden die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierlösungen analog zu den Proben aufgearbeitet (vergleiche Abschnitt 5) und mittels GC-MS/MS (vergleiche Abschnitt 6 und 7) analysiert. Die Erstellung der Kalibrierfunktion erfolgt durch Auftragung des Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des dazugehörigen isotopenmarkierten internen Standards gegen die dotierte Konzentration der Kalibrierlösung. Die Kalibrierfunktion ist unter den beschriebenen Analysenbedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 µg/l linear mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r \geq 0,995$  für alle Analyten. Abbildungen 3 bis 5 zeigen beispielhaft die Kalibriergeraden der Analyten in Poolurin.



**Abb. 3** Kalibriergerade von 1-Naphthol in Poolurin im Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 µg/l



**Abb. 4** Kalibriergerade von 2-Naphthol in Poolurin im Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 µg/l



**Abb. 5** Kalibriergerade von 1,2-DHN in Poolurin im Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 µg/l

## 9 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehaltes in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des dazugehörigen ISTD gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion des jeweiligen Analyten (vgl. Abschnitt 8) kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in  $\mu\text{g/l}$  Urin berechnet werden. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, so wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt und erneut aufgearbeitet und analysiert.

## 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 bei jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit niedriger ( $Q_{\text{low}}$ ) und hoher ( $Q_{\text{high}}$ ) Analytkonzentration mit untersucht, die eine bekannte Konzentration der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden, indem Nichtraucher-Poolurin mit Standardlösungen der Analyten dotiert wird. Die Analytkonzentration im Qualitätskontrollmaterial sollte dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (z. B.  $100 \mu\text{g/l}$  und  $500 \mu\text{g/l}$ ). Aliquote dieser Proben werden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt (Bader et al. 2010).

## 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 Präzision in Serie wurde anhand des Qualitätskontrollmaterials  $Q_{\text{low}}$  und  $Q_{\text{high}}$  (vergleiche Abschnitt 10) ermittelt. Dazu wurde das  $Q_{\text{low}}$ - und  $Q_{\text{high}}$ -Material je sechsfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

**Tab. 3** Präzisionen in der Serie für die Bestimmung der Naphthalinmetabolite in Urin ( $n = 6$ )

Analyt	Ermittelter Gehalt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
1,2-DHN	102	4,5	11,6
	507	4,2	10,8
1-Naphthol	94,6	6,6	17,0
	457	3,5	9,0
2-Naphthol	100	4,9	12,6
	495	1,4	3,6

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte durch Aufarbeitung und Analyse der  $Q_{\text{low}}$ - und  $Q_{\text{high}}$ -Proben an sechs unterschiedlichen Tagen. Im Rahmen der Prüfung der Methode erfolgte zusätzlich noch eine Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag bei einer niedrigeren Konzentrationsstufe. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tab. 4** Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung der Naphthalinmetabolite in Urin (n = 6)

Analyt	Ermittelter Gehalt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
1,2-DHN	7,0	9,4	24,2
	100	4,1	10,5
	490	2,1	5,4
1-Naphthol	4,9	9,9	25,4
	96,4	4,9	12,6
	457	3,9	10,0
2-Naphthol	6,6	11,1	28,6
	103	4,6	11,8
	504	2,7	6,9

## 11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode und der Einfluss möglicher Matrixeffekte wurden an fünf Individualurinen mit Kreatiningehalten im Bereich von 0,3 bis 2,6 g/l geprüft, die mit jeweils etwa 6, 120 und 500  $\mu\text{g}$  1,2-DHN, 1-Naphthol bzw. 2-Naphthol pro Liter Urin dotiert wurden. Aufarbeitung und Analyse erfolgten jeweils für die undotierten sowie die dotierten Urinproben. Die Berechnung der relativen Wiederfindung erfolgte anhand der ermittelten Gehalte in den dotierten Urinen unter Abzug eventueller Hintergrundgehalte der Analyten. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tab. 5** Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von Naphthalinmetaboliten in Individualurinen (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ]	Mittlere relative Wiederfindung [%]	Bereich [%]
1,2-DHN	6	100	95–105
	120	89	87–96
	500	100	98–103
1-Naphthol	6	101	95–111
	120	90	86–97
	500	103	100–106
2-Naphthol	6	96	93–100
	120	92	88–97
	500	107	99–112

## 11.3 Absolute Wiederfindung

Zur Bestimmung der aufarbeitungsbedingten Verluste der Methode wurde Poolurin mit einer Konzentration von etwa 100  $\mu\text{g/l}$  für jeden Analyten dotiert, aufgearbeitet und analysiert (n = 4). Zusätzlich wurden undotierte Poolurinproben aufgearbeitet und erst nach enzymatischer Hydrolyse, Festphasenextraktion und Einengen im Stickstoffstrom mit den Analyten dotiert, anschließend derivatisiert und analysiert. Aus dem Vergleich der absoluten Peakflächen ohne Berücksichtigung der internen Standards wurden die aufarbeitungsbedingten Verluste für jeden Analyten bestimmt. Mit absoluten Wiederfindungsraten von 93 bis 97 % für alle Analyten zeigte sich eine hohe Effizienz der Festphasenextraktion mit nur geringen aufarbeitungsbedingten Verlusten.

## 11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des beschriebenen Analysenverfahrens wurden mit der Leerwertmethode nach dem DIN-Verfahren 32645 ermittelt (DIN 2008), indem die statistische Streuung der Dreifachbestimmungen von zehn unbelasteten Urinproben berechnet wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tab. 6** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [ $\mu\text{g/l}$ ]	Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{g/l}$ ]
1,2-DHN	0,2	0,5
1-Naphthol	0,1	0,2
2-Naphthol	0,1	0,2

## 11.5 Störeinflüsse

Bei stark matrixbelasteten Urinproben kann ein Quenching-Effekt auftreten, der die Ionisierung der Analyten supprimiert und so in manchen Fällen zu höheren Nachweisgrenzen führt als angegeben. Durch den Einsatz der isotoopenmarkierten internen Standards können die auftretenden Matrixeffekte effizient kompensiert werden.

Grundsätzlich ist bei der Analyse von hydroxylierten PAK – und hier insbesondere bei vicinalen Dihydroxy-PAK – die Gefahr eines oxidativen Abbaus der Analyten zu beachten. Durch die Zugabe von Antioxidationsmitteln wie Ascorbinsäure kann dieser Abbau allerdings deutlich reduziert werden.

## 12 Diskussion der Methode

Das vorgestellte analytische Verfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der Naphthalinmetabolite 1,2-DHN, 1- und 2-Naphthol in humanen Urinproben.

Die Validierungsdaten zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Empfindlichkeit der Methode, die aus dem Einsatz der entsprechenden isotoopenmarkierten internen Standardsubstanzen sowie einer effizienten Probenaufbereitung und Derivatisierung resultieren. Durch den Einsatz von glucuronidiertem 1,2-DHN als stabiler Referenzsubstanz konnten die Schwierigkeiten vermieden werden, die in einem früheren Verfahren bei Verwendung von freiem 1,2-DHN als Referenzsubstanz aufgrund dessen oxidativer Instabilität beschrieben wurden (Klotz et al. 2011). Das 1,2-DHN-Glucuronid ist nicht nur in Lösungen stabiler, sondern ist im Vergleich zum freien 1,2-DHN auch deutlich weniger empfindlich für einen Abbau während der Lagerung als Feststoff. Die Verwendung von 1,2-DHN-Glucuronid als Referenzsubstanz vereinfacht die praktische Durchführung wesentlich und trägt damit entscheidend zum Erhalt zuverlässiger Ergebnisse bei.

Bei Aufarbeitung nach dem beschriebenen Verfahren erfolgt eine Hydrolyse des 1,2-DHN-Glucuronids, so dass mit der Methode die Konzentration von 1,2-DHN als Summe aus freiem und konjugiertem 1,2-DHN bestimmt wird.

Im Rahmen der Methodenprüfung wurden für die Festphasenextraktion Parallelexperimente mit dem Alternativmaterial Bond Elut PPL (Säulendimension 100 mg/3 ml von Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) durchgeführt. Hierbei wurden gut vergleichbare Ergebnisse erzielt. Es zeigte sich zudem, dass bei längeren Probenserien nach der Erstellung einer vollständigen Kalibrierkurve eine Rekalibrierung des Verfahrens sehr gut auch mittels Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt werden kann.

Insgesamt weist die Methode eine hohe Sensitivität auf und ist in einem weiten Bereich (bis 1000  $\mu\text{g/l}$ ) linear, so dass sie sowohl für die Anwendung im umwelt- als auch im arbeitsmedizinischen Bereich geeignet ist.



**Verwendete Messgeräte** GC-MS/MS Agilent 7000A Series Triple Quadrupole System, 7890A Gaschromatograph mit AS7693 Autosampler, Split/splitless-Injektor und massenselektivem Detektor 7000A Triple Quadrupole (jeweils Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn).

## Literatur

- Ayala DC, Morin D, Buckpitt AR (2015) Simultaneous quantification of multiple urinary naphthalene metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *PloS One* 10: e0121937. DOI: [10.1371/journal.pone.0121937](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121937)
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. Allgemeine Vorbemerkungen. 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)
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13: 135–160. DOI: [10.1021/tx9902082](https://doi.org/10.1021/tx9902082)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111: A1583–A1618. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=161921>, abgerufen am 08 Mai 2020
- Cho M, Jedrychowski R, Hammock B, Buckpitt A (1994) Reactive naphthalene metabolite binding to hemoglobin and albumin. *Fundam Appl Toxicol* 22: 26–33. DOI: [10.1006/faat.1994.1004](https://doi.org/10.1006/faat.1994.1004)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (Hrsg) (2020) MAK- und BAT-Werte-Liste 2020. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 56. German Medical Science, Düsseldorf. DOI: [10.34865/mbwl\\_2020\\_deu](https://doi.org/10.34865/mbwl_2020_deu)
- 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)
- EU (European Union) (2003) European Union Risk Assessment Report. Naphthalene. CAS No: 91-20-3, EINECS No: 202-049-5. EU, Luxembourg. <https://echa.europa.eu/documents/10162/4c955673-9744-4d1c-a812-2bf97863906a>, abgerufen am 05 Mai 2020
- Greim H (Hrsg) (2001) Naphthalin. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 33. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb9120d0033](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb9120d0033)
- Hardt J, Barr D, Roßbach B (2010) Naphthalin-Metabolite 1-Naphthol und 2-Naphthol. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material*, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bi9015d0019j](https://doi.org/10.1002/3527600418.bi9015d0019j)
- Henschler D (Hrsg) (1973) Carbaryl. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 2. Lieferung, VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb6325d0002](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb6325d0002)
- Klotz K, Schindler BK, Angerer J (2011) 1,2-Dihydroxynaphthalene as biomarker for a naphthalene exposure in humans. *Int J Hyg Environ Health* 214: 110–114. DOI: [10.1016/j.ijheh.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.11.003)
- Klotz K, Drexler H, Hartwig A, MAK Commission (2016) Naphthalin. BAT Value Documentation in German Language. *MAK Collect Occup Health Saf* 1: 2698–2714. DOI: [10.1002/3527600418.bb9120d0022](https://doi.org/10.1002/3527600418.bb9120d0022)
- Klotz K, Zobel M, Schäferhenrich A, Hebisch R, Drexler H, Göen T (2018) Suitability of several naphthalene metabolites for their application in biomonitoring studies. *Toxicol Lett* 298: 91–98. DOI: [10.1016/j.toxlet.2018.07.008](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.07.008)
- Klotz K, Weiß T, Zobel M, Bury D, Breuer D, Werner S, Sucker K, Zschiesche W, Göen T, Brüning T, Drexler H (2019) Validity of different biomonitoring parameters in human urine for the assessment of occupational exposure to naphthalene. *Arch Toxicol* 93: 2185–2195. DOI: [10.1007/s00204-019-02468-9](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02468-9)
- Lin C, Chen D-R, Wang S-L, Hsieh W-C, Yu W-F, Wang T-W, Tsai C-H, Wei H-H, Tsuang B-J, Lin P-H (2014) Cumulative body burdens of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with estrogen bioactivation in pregnant women: protein adducts as biomarkers of exposure. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 49: 634–640. DOI: [10.1080/10934529.2014.865416](https://doi.org/10.1080/10934529.2014.865416)
- Murty VS, Penning TM (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ortho-quinone conjugate chemistry: kinetics of thiol addition to PAH ortho-quinones and structures of thioether adducts of naphthalene-1,2-dione. *Chem Biol Interact* 84: 169–188. DOI: [10.1016/0009-2797\(92\)90077-x](https://doi.org/10.1016/0009-2797(92)90077-x)

- Preuss R, Angerer J, Drexler H (2003) Naphthalene – an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health* 76: 556–576. DOI: [10.1007/s00420-003-0458-1](https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458-1)
- Preuss R, Drexler H, Böttcher M, Wilhelm M, Brüning T, Angerer J (2005) Current external and internal exposure to naphthalene of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Int Arch Occup Environ Health* 78: 355–362. DOI: [10.1007/s00420-004-0593-3](https://doi.org/10.1007/s00420-004-0593-3)
- Preuss R, Angerer J, Simon P (2010) Naphthalin-Metabolite 1-Naphthol und 2-Naphthol. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material*, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bi9015d0019k](https://doi.org/10.1002/3527600418.bi9015d0019k)
- Sucker K, Zschiesche W, Hummel T, Breuer D, Werner S, Friedrich C, Weiß T, Raulf M, Pallapies D, Bünger J, Brüning T (2017) Naphthalin: Chronische Exposition am Arbeitsplatz – Relevanz für die Grenzwertableitung. Ergebnisse der Querschnittstudie zur Naphthalinexposition in der Schleifmittelindustrie. *Gefahrst Reinhalt Luft* 77: 439–442. [https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2017\\_129.pdf](https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2017_129.pdf), abgerufen am 06 Mai 2020
- Tsuruda LS, Lamé MW, Jones AD (1995) Formation of epoxide and quinone protein adducts in B6C3F1 mice treated with naphthalene, sulfate conjugate of 1,4-dihydroxynaphthalene and 1,4-naphthoquinone. *Arch Toxicol* 69: 362–367. DOI: [10.1007/s002040050185](https://doi.org/10.1007/s002040050185)
- Waidyanatha S, Troester MA, Lindstrom AB, Rappaport SM (2002) Measurement of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone after administration of naphthalene to F344 rats. *Chem Biol Interact* 141: 189–210. DOI: [10.1016/S0009-2797\(02\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00048-0)
- Wu R, Waidyanatha S, Henderson AP, Serdar B, Zheng Y, Rappaport SM (2005) Determination of dihydroxynaphthalenes in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826: 206–213. DOI: [10.1016/j.jchromb.2005.08.022](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.08.022)
- Ziener C-E (2012) Biomonitoring bei Naphthalinexponierten – ein Anwendungsbeispiel. *Zbl Arbeitsmed* 62: 159–161. DOI: [10.1007/BF03345055](https://doi.org/10.1007/BF03345055)
- Zobel M, Göen T, Belov V, Klotz K (2017) Reliable quantification of 1,2-dihydroxynaphthalene in urine using a conjugated reference compound for calibration. *Anal Bioanal Chem* 409: 6861–6872. DOI: [10.1007/s00216-017-0651-9](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0651-9)
- Zobel M, Klotz K, Göen T (2018) LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of N-acetyl-S-(1-naphthyl)cysteine and N-acetyl-S-(2-naphthyl)cysteine in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1074–1075: 139–145. DOI: [10.1016/j.jchromb.2017.12.023](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.023)