The MAK-Collection for Occupational Health and Safety

GMS PUBLISSO ZB MED-Publikationsportal Lebenswissenschaften

Geraniol – Bestimmung von 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure in Urin mittels UPLC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

T. Jäger[1]
S. Bäcker[1]
T. Brodbeck[1]
M. Bader[1]
G. Scherer[2]
M. Stöckelhuber[2]
T. Göen[3,*]
A. Hartwig[4,*]
MAK Commission[5,*]

[1] *Methodenentwicklung, BASF SE, Corporate Health Management, ESG/CB-H306, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen*

[2] *Methodenprüfung, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg*

[3] *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material" der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, 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.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)*

Keywords

Geraniol; Citral; Geraniol-Metaboliten; 8-Carboxygeraniol; Hildebrandtsäure; Geransäure; 3-Hydoxycitronellsäure; Biomonitoring; Urin; UPLC-MS/MS

Citation Note:
Jäger T, Bäcker S, Brodbeck T, Bader M, Scherer G, Stöckelhuber M, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Geraniol – Bestimmung von 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure in Urin mittels UPLC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2021 Sep;6(3):Doc073.
DOI: https://doi.org/10.34865/bi10624d6_3or

Manuskript abgeschlossen:
18 Mai 2017

Publikationsdatum:
30 Sep 2021

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

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.

The method described herein enables the selective and quantitative determination of geraniol metabolites in human urine into the concentration range relevant for environmental exposure. The following four metabolites can be determined using this method: 8-carboxygeraniol, Hildebrandt acid, geranic acid, and 3-hydroxycitronellic acid. Hildebrandt acid, geranic acid, and 3-hydroxycitronellic acid can also arise from the metabolism of citral. The buffered urine samples are enzymatically hydrolysed and, following addition of the internal standards (8-carboxygeraniol-d_5, Hildebrandt acid-d_5, and 2,4,6-octatrienoic acid), processed via liquid-liquid extraction with diethyl ether. The analytes are separated from any matrix components by liquid chromatography, and are then detected via tandem mass spectrometry using electrospray ionisation. The quantitative evaluation is carried out using external calibration in water.

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Geraniol ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-ol)	106-24-1	8-Carboxygeraniol ((2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-diensäure)	26187-80-4
		Hildebrandtsäure ((2*E*,6*E*)-2,6-Dimethylocta-2,6-diendisäure)	123175-88-2
		Geransäure ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-diensäure)	4698-08-2
		3-Hydroxycitronellsäure (3-Hydroxy-3,7-dimethyl-6-octensäure)	87877-75-6
Citral ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienal)	5392-40-5	Hildebrandtsäure ((2*E*,6*E*)-2,6-Dimethylocta-2,6-diendisäure)	123175-88-2
		Geransäure ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-diensäure)	4698-08-2
		3-Hydroxycitronellsäure (3-Hydroxy-3,7-dimethyl-6-octensäure)	87877-75-6

Zuverlässigkeitskriterien

8-Carboxygeraniol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 2,1–11,5 %
	Streubereich	u = 4,8–26,5 %
	bei einer Konzentration von 50 µg oder 500 µg 8-Carboxygeraniol pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 5,5–22,3 %
	Streubereich	u = 13,5–54,7 %
	bei einer Konzentration von 50 µg oder 500 µg 8-Carboxygeraniol pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	r = 97 %
	bei einer Soll-Konzentration von 500 µg 8-Carboxygeraniol pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,41 µg 8-Carboxygeraniol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	1,50 µg 8-Carboxygeraniol pro Liter Urin	

Hildebrandtsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 2,9–5,5 %
	Streubereich	u = 6,7–12,8 %
	bei einer Konzentration von 500 µg oder 1500 µg Hildebrandtsäure pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 6,7–9,8 %
	Streubereich	u = 16,4–24,0 %
	bei einer Konzentration von 500 µg oder 1500 µg Hildebrandtsäure pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	r = 106 %
	bei einer Soll-Konzentration von 500 µg Hildebrandtsäure pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,76 µg Hildebrandtsäure pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	2,65 µg Hildebrandtsäure pro Liter Urin	

Geransäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 3,3–6,2 %
	Streubereich	u = 7,5–14,3 %
	bei einer Konzentration von 500 µg oder 1500 µg Geransäure pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 7,2–15,7 %
	Streubereich	u = 17,8–38,4 %
	bei einer Konzentration von 500 µg oder 1500 µg Geransäure pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	r = 134 %
	bei einer Soll-Konzentration von 500 µg Geransäure pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,53 µg Geransäure pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	1,80 µg Geransäure pro Liter Urin	

3-Hydroxycitronellsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 2,2–5,8 %
	Streubereich	u = 5,2–13,3 %
	bei einer Konzentration von 50 µg oder 500 µg 3-Hydroxycitronellsäure pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 6,1–14,6 %
	Streubereich	u = 14,9–35,7 %
	bei einer Konzentration von 50 µg oder 500 µg 3-Hydroxycitronellsäure pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	r = 117 %
	bei einer Soll-Konzentration von 500 µg 3-Hydroxycitronellsäure pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,78 µg 3-Hydroxycitronellsäure pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	2,66 µg 3-Hydroxycitronellsäure pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu Geraniol

Geraniol ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-ol) ist ein azyklischer Monoterpenallylalkohol (siehe Abbildung 1), der häufig als Duftstoff in Kosmetikprodukten, Parfums, Hygieneartikeln sowie in Haushaltsreinigern eingesetzt wird. Geraniol ist ein natürlicher Bestandteil ätherischer Öle und kann aus diesen durch Destillation gewonnen werden. Großtechnisch lässt sich Geraniol u. a. durch Hydrierung von Citral herstellen (Lapczynski et al. 2008).

Die Toxizität von Geraniol wurde in zahlreichen In-vivo- und In-vitro-Studien untersucht (Lapczynski et al. 2008). Geraniol ist von geringer akuter Toxizität. Nach langfristiger Exposition steht die Reizwirkung auf Haut und Augen im Vordergrund. Die MAK-Kommission hat Geraniol wegen der sensibilisierenden Wirkungen am Menschen mit „Sh“ markiert (Greim 2004).

In einem Tierversuch an männlichen Ratten identifizierten Chadha und Madyastha (1984) nach Gabe von 800 mg Geraniol pro kg Körpergewicht und Tag (per Schlundsonde) folgende Metaboliten im Urin: 8-Hydroxygeraniol, 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure (Abbildung 1). Allerdings eignen sich die Metaboliten Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure nur bedingt zur Erfassung einer Geraniol-Exposition, da diese Metaboliten auch aus anderen Quellen, wie beispielsweise Citral, gebildet werden und somit nicht spezifisch sind (Diliberto et al. 1990) (Abbildung 2).

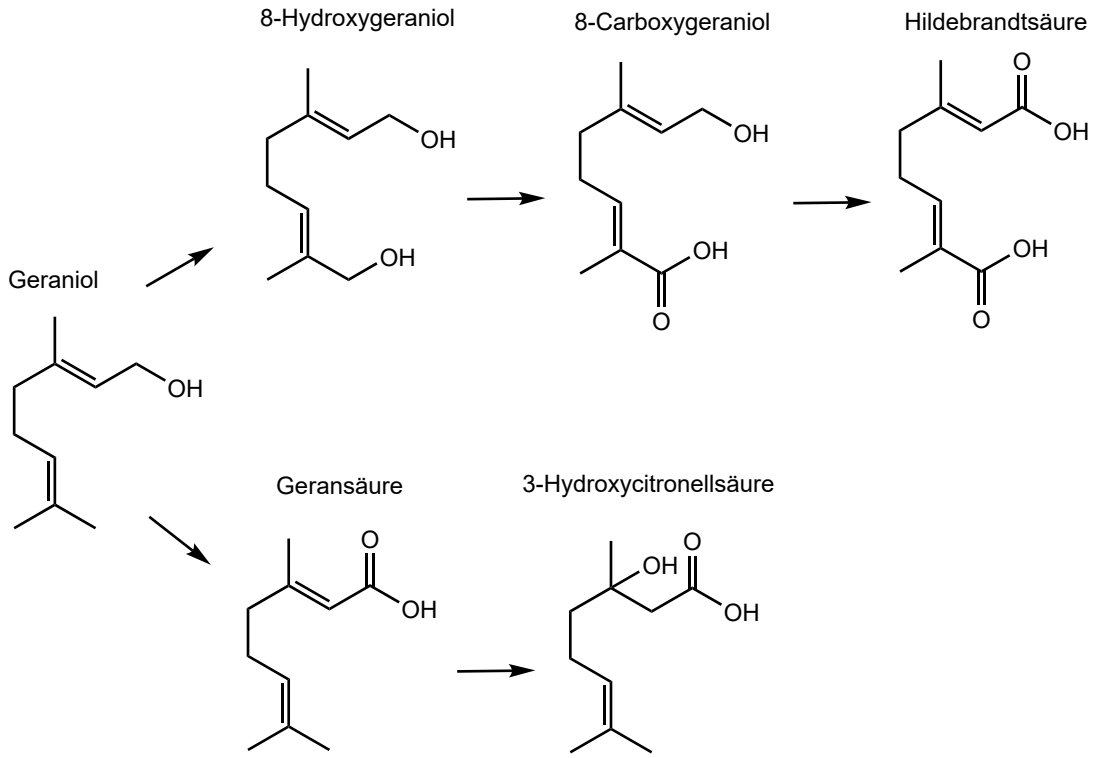


Abb. 1 Metabolismusschema von Geraniol nach Chadha and Madyastha (1984)

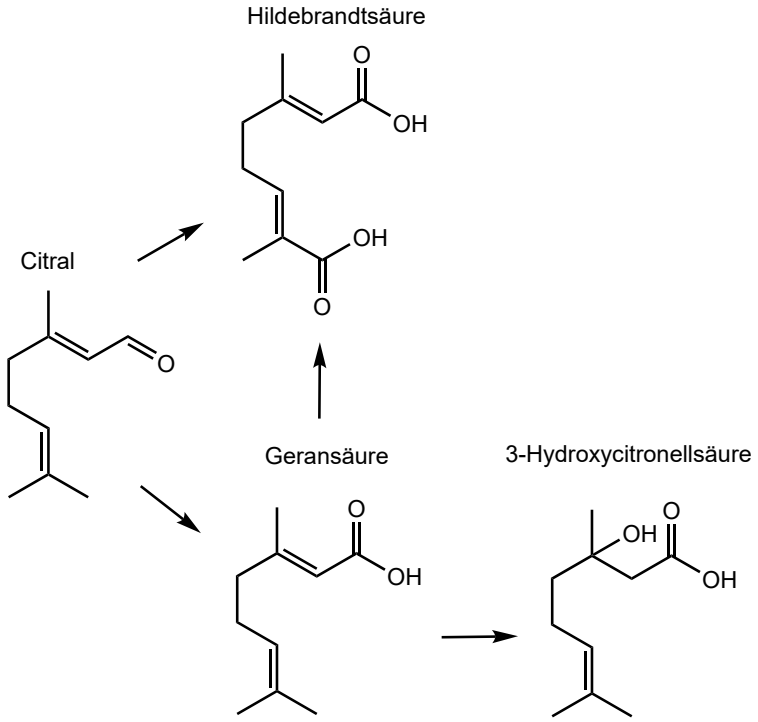


Abb. 2 Vereinfachtes Metabolismusschema von Citral nach Diliberto et al. (1990)

Zur Aufklärung des Geraniol-Metabolismus sowie der Toxikokinetik und metabolischer Konversionsfaktoren beim Menschen wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes zur Förderung des Human-Biomonitorings zwischen dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) und dem Verband der chemischen Industrie (VCI) eine Metabolismusstudie durchgeführt. Hierfür wurde der Urin von drei männlichen Probanden nach einmaliger oraler Verabreichung von 25 mg bzw. 250 mg Geraniol über 72 Stunden kontinuierlich und vollständig gesammelt und anschließend mit der hier beschriebenen Methode analysiert. Anhand der Metabolismusstudie konnte gezeigt werden, dass Geraniol überwiegend in Form der nicht streng stoffspezifischen Metaboliten Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure ausgeschieden wird. Die Konzentrationen dieser Metaboliten erreichten bereits 1,5–4 Stunden nach Exposition das jeweilige Eliminationsmaximum, anschließend wurden die Metaboliten mit Halbwertszeiten von 2–3 Stunden eliminiert. Der in der Ratte beschriebene Metabolit 8-Hydroxygeraniol konnte im Urin der Probanden nach oraler Verabreichung von Geraniol nicht nachgewiesen werden (Jäger et al. 2016).

In Urinproben von 41 Personen ohne bekannte berufliche Geraniol-Exposition wurden die Konzentrationen von 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure bestimmt. Die ermittelten Gehalte sind in Tabelle 1 dargestellt. Obwohl 8-Carboxygeraniol im Vergleich zu den übrigen untersuchten Metaboliten nur einen Anteil von etwa 2 % ausmacht, ist dieser Metabolit am besten als Biomarker einer Geraniol-Exposition geeignet, da er nach aktuellem Kenntnisstand der einzige spezifische Metabolit des Geraniols ist (Jäger et al. 2020).

Tab. 1 Daten zu Geraniol-Metaboliten im Urin beruflich nicht gegen Geraniol exponierter Personen (n = 41) nach Jäger et al. (2020)

Analyt	n > BG	Mittelwert ± SD [µg/l]	Bereich [µg/l]
8-Carboxygeraniol	34 (83 %)	10 ± 9	< BG–46
Hildebrandtsäure	41 (100 %)	431 ± 385	37–1966
Geransäure	41 (100 %)	126 ± 118	9–477
3-Hydroxycitronellsäure	33 (81 %)	21 ± 18	< BG–70

BG: Bestimmungsgrenze

3 Grundlage des Verfahrens

Die beschriebene Methode erlaubt die Erfassung einer Hintergrundbelastung mit Geraniol durch die selektive Bestimmung von vier Geraniol-Metaboliten in Urin. Die folgenden Metaboliten können mit dieser Methode erfasst werden: 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure. Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure werden allerdings auch durch Verstoffwechslung von Citral gebildet. Die gepufferten Urinproben werden enzymatisch hydrolysiert und, nach Zugabe der internen Standards (8-Carboxygeraniol-d_5, Hildebrandtsäure-d_5 und 2,4,6-Octatriensäure), mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether aufgearbeitet. Die Analyten werden flüssigkeitschromatographisch getrennt und anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der Elektrosprayionisierung detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels externer Kalibrierung in Wasser.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-System (z. B. ACQUITY UPLC H-Class System PLUS, Waters GmbH, Eschborn)
- Tandem-Massenspektrometer (z. B. Xevo TQ, Waters GmbH, Eschborn)
- UPLC-Säule: ACQUITY UPLC HSS T3, 1,8 µm, 2,1 mm × 150 mm (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Wasseraufbereitungsanlage (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Rotationsmischer (z. B. Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- 250-ml- und 1000-ml-Bechergläser (z. B. DURAN Group GmbH, Mainz)
- Scheidetrichter (z. B. aus eigener Anfertigung)
- 1000-ml-Laborglasflasche mit Dispenser (z. B. BRAND GmbH + CO KG, Wertheim)
- Glaszentrifugenröhrchen mit Schraubverschlüssen (z. B. DURAN Group GmbH, Mainz)
- 1,8-ml-Probengläschen mit Bördelkappen oder Schraubverschlüssen (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Mikroeinsätze für die Probengläschen (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- 100-ml-Braunglasflasche (z. B. BRAND GmbH + CO KG, Wertheim)
- Kolbenhubpipetten mit variabler Volumeneinstellung (1–10 µl, 10–100 µl und 100–1000 µl) mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)

- Rotationsautomat (z. B. aus eigener Anfertigung)
- Rotationsverdampfer (z. B. BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen)
- Heizblock (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Transferpipetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Verschiedene Messkolben (z. B. witeg Labortechnik GmbH, Wertheim)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

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

- Acetonitril (z. B. Nr. 11317080, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Ameisensäure 98–100 % (z. B. Nr. 05314.2010, Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
- Diethylether (z. B. Nr. 07106.3700, Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
- Essigsäure 100 % (z. B. Nr. 24101.3000, Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
- β-Glucuronidase/Arylsulfatase (z. B. Nr. 10127698001, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol (z. B. Nr. 900688, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (z. B. Nr. S5881, Merck KGaA, Darmstadt)
- Schwefelsäure 96 % (z. B. Nr. 03062.3000, Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Referenzmaterialien

- 8-Carboxygeraniol ((2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-diensäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- 8-Carboxygeraniol-d_5 ((2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-2-methyl-6-trideuteromethyl-5,5-dideuteroocta-2,6-diensäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- Hildebrandtsäure ((2*E*,6*E*)-Dimethylocta-2,6-diendisäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- Hildebrandtsäure-d_5 ((2*E*,6*E*)-6-Trideuteromethyl-2-methylocta-5,5-dideutero-2,6-diendisäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- Geransäure ((2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-diensäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- 3-Hydroxycitronellsäure (3-Hydroxy-3,7-dimethyloct-6-ensäure) (z. B. ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- 2,4,6-Octatriensäure (z. B. Nr. S439819, Merck KGaA, Darmstadt)

4.4 Lösungen

- UPLC-Fließmittel A (Ameisensäure, 0,033 %)

  2 ml konzentrierte Ameisensäure werden mit hochreinem Wasser auf 6 l aufgefüllt (pH = 2,9).

- Schwefelsäure (1 mol/l)

  In einem 1000-ml-Messkolben werden 700 ml hochreines Wasser vorgelegt und 98 g Schwefelsäure dazugegeben. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird in eine 1000-ml-Laborglasflasche mit Dispenser umgefüllt.

- Natronlauge (5 mol/l)

  20 g Natriumhydroxid werden abgewogen und in einem 250-ml-Becherglas unter Eiskühlung in 100 ml hochreinem Wasser gelöst. Die Natronlauge wird in eine 100-ml-Braunglasflasche überführt.

- Natriumacetat-Puffer (pH = 5,0)

  In ein 1000-ml-Becherglas werden etwa 800 ml hochreines Wasser vorgelegt, 1 ml Eisessig wird dazu pipettiert und die Lösung anschließend mit Natronlauge (5 mol/l) auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Die Lösung wird in eine 1000-ml-Laborglasflasche umgefüllt.

Bei Lagerung bei Raumtemperatur sind die Lösungen mindestens zwölf Monate haltbar.

4.5 Interne Standards (ISTDs)

- ISTD-Stammlösungen (1000 mg/l)

  Etwa 10 mg 8-Carboxygeraniol-d_5, Hildebrandtsäure-d_5 bzw. 2,4,6-Octatriensäure werden jeweils in einem 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in 5 ml Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.

- ISTD-Arbeitslösungen (100 mg/l)

  1 ml der jeweiligen ISTD-Stammlösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden anschließend bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.

- ISTD-Dotierlösung (1 bzw. 2 mg/l)

  100 µl der 8-Carboxygeraniol-d_5-Arbeitslösung, 100 µl der Hildebrandtsäure-d_5-Arbeitslösung und 200 µl der 2,4,6-Octatriensäure-Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C sind die Lösungen der internen Standards mindestens zwölf Monate haltbar.

4.6 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg/l)

  Etwa 10 mg 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure bzw. 3-Hydroxycitronellsäure werden jeweils in einem 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in 5 ml Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

- Dotierlösung I (100 mg/l)

  Jeweils 1 ml der Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

- Dotierlösung II (10 mg/l)

  1 ml der Dotierlösung I wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

- Dotierlösung III (1 mg/l)

  1 ml der Dotierlösung II wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

- Dotierlösung IV (0,1 mg/l)

  1 ml der Dotierlösung III wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C sind die Stammlösungen und Dotierlösungen der Analyten mindestens zwölf Monate haltbar.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen I bis IV gemäß dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema mit hochreinem Wasser zu einem Endvolumen von 1 ml gemischt. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards erfolgt analog zur Probenaufbereitung wie unter Abschnitt 5.2 angegeben.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen hochreines Wasser [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
0	–	0	1000	0
1	IV	10	990	1
2	IV	20	980	2
3	IV	50	950	5
4	III	10	990	10
5	III	20	980	20
6	III	50	950	50
7	II	10	990	100
8	II	20	980	200
9	II	50	950	500
10	I	10	990	1000
11	I	20	980	2000

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Polypropylengefäßen gesammelt und bis zur Probenaufbereitung bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung (> drei Tage) sollten die Urinproben bei −20 °C eingefroren werden.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinprobe wird auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. 1 ml der Probe wird in ein Schraubgläschen pipettiert und mit 1 ml Natriumacetatpuffer (pH = 5,0) versetzt. Nach Zugabe von 10 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase wird der Ansatz für drei Stunden bei 40 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wird die Probe mit 100 µl der ISTD-Dotierlösung versetzt und nach Zugabe von 8 ml hochreinem Wasser in einen Scheidetrichter pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Schwefelsäure (1 mol/l) und 25 ml Diethylether wird die Probe für zehn Minuten mit einem Rotationsmischer extrahiert. Die untere wässrige Phase wird abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird in einen 100-ml-Rundkolben überführt und mit 200 µl der 0,033%igen Ameisensäure (Fließmittel A) versetzt. Der Diethylether

wird bei etwa 50 °C am Rotationsverdampfer abrotiert. Die Probe wird anschließend in ein 1,8-ml-Probengläschen mit Mikroeinsatz überführt und das Gläschen verschlossen.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer UPLC-Anlage gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (UPLC-MS/MS).

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	ACQUITY UPLC HSS T3, 1,8 µm, 2,1 × 150 mm
Trennprinzip:	Reversed Phase
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	40 °C
Flussrate:	0,3 ml/min
Fließmittel:	A: 0,033%ige Ameisensäure B: Acetonitril
Laufzeit:	50 min

Das Gradientenprogramm ist in Tabelle 3 angegeben. Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

Tab. 3 Gradientenprogramm für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	85	15
25,0	82	18
38,0	25	75
38,1	10	90
45,0	10	90
45,1	85	15
50,0	85	15

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsmodus:	Positive Elektrospray-Ionisierung (ESI)
Detektionsmodus:	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Capillary:	3,5 kV
Cone:	30 V
Temperatur der Ionenquelle:	150 °C
Desolvationstemperatur:	500 °C
Cone-Gasfluss:	50 l/h
Desolvationsgasfluss:	1000 l/h

Kollisionsgas: Argon

Kollisionsgasfluss: 0,15 ml/h

Parameterspezifische Einstellungen: siehe Tabelle 4

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das von ihm eingesetzte MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten Parameter sind für die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendete Gerätekonfiguration bestimmt und optimiert worden.

Für jeden Analyten wurden zwei Massenübergänge ausgewählt. Ein Übergang dient zur Quantifizierung (Quantifier) und der andere zur Bestätigung (Qualifier). Die ausgewählten Übergänge sind zusammen mit den Retentionszeiten in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Retentionszeiten und parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin

Analyt / ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [*m/z*]	Cone [V]	Collision energy [V]	Dwell time [s]
8-Carboxygeraniol	18,98	167,0 ⟶ 93,0[a)]	16	14	0,028
	18,98	167,0 ⟶ 121,1[b)]	16	12	0,028
8-Carboxygeraniol-d_5	18,59	172,1 ⟶ 97,3[c)]	16	14	0,028
Hildebrandtsäure	17,92	181,1 ⟶ 107,0[a)]	16	14	0,028
	17,92	181,1 ⟶ 163,1[b)]	16	6	0,028
Hildebrandtsäure-d_5	17,22	186,1 ⟶ 167,8[c)]	22	10	0,028
Geransäure	35,71	122,9 ⟶ 66,9[a)]	22	14	0,050
	35,71	122,9 ⟶ 80,9[b)]	22	12	0,050
3-Hydroxycitronellsäure	30,92	169,0 ⟶ 69,0[b)]	20	10	0,050
	30,92	169,0 ⟶ 109,1[a)]	20	10	0,050
2,4,6-Octatriensäure	31,64	139,0 ⟶ 93,0[c)]	12	18	0,050

[a)] Qualifier
[b)] Quantifier
[c)] ISTD

7 Analytische Bestimmung

20 µl der aufgearbeiteten Urinprobe (siehe Abschnitt 5.2) werden in das UPLC-MS/MS-System injiziert. Die analytische Trennung erfolgt mittels Reversed-Phase-Chromatographie. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenübergänge und der Retentionszeiten. Die in Tabelle 4 angegebenen Retentionszeiten können dabei nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen.

Abbildungen 3 und 4 zeigen beispielhaft Chromatogramme eines mit den Geraniol-Metaboliten dotierten Urins. Die dotierte Konzentration des 8-Carboxygeraniol und der 3-Hydroxycitronellsäure beträgt 50 µg/l, die der Hildebrandtsäure und der Geransäure 500 µg/l.

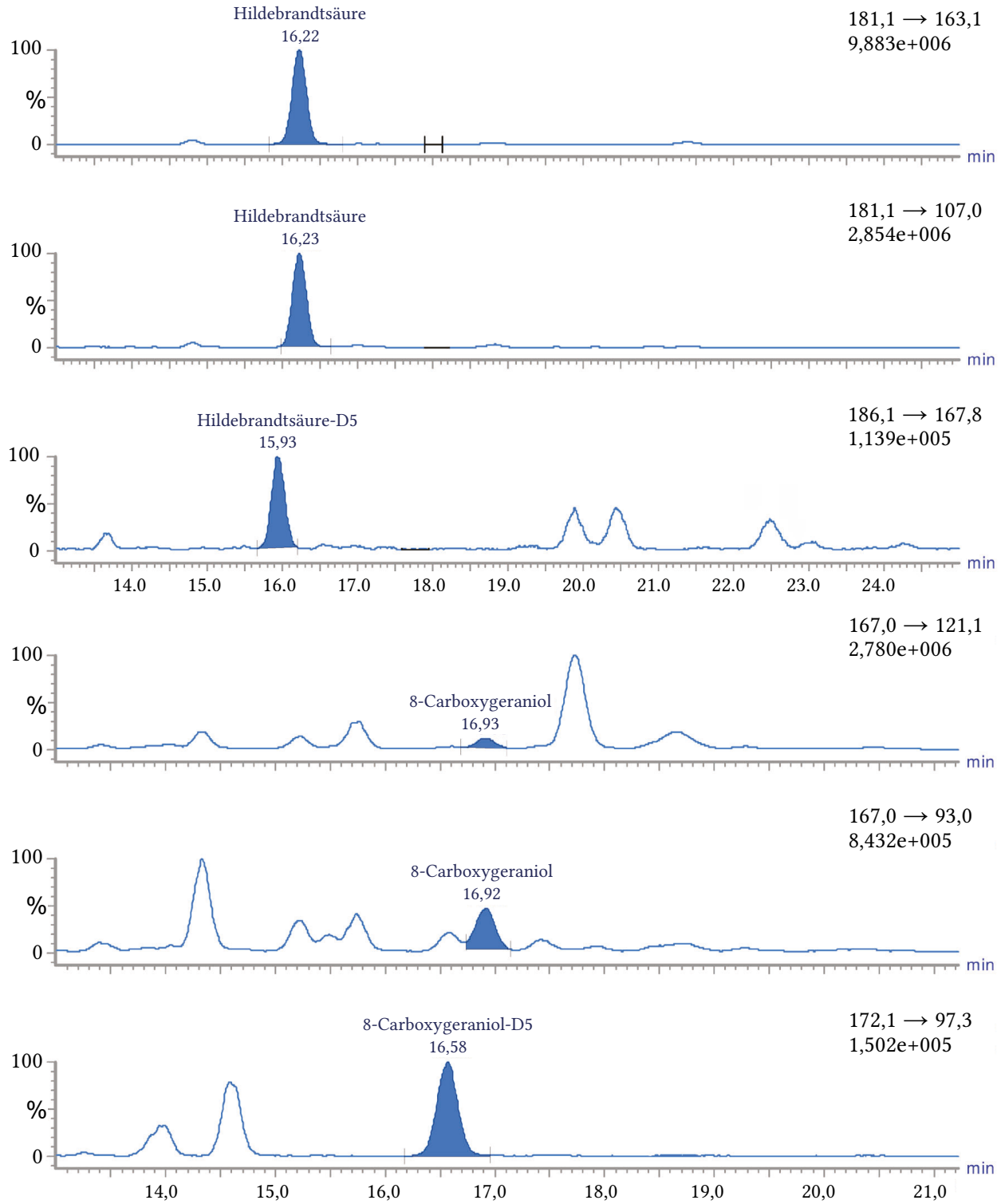


Abb. 3 Chromatogramme eines mit den Geraniol-Metaboliten dotierten Urins, Hildebrandtsäure: 500 µg/l, 8-Carboxygeraniol: 50 µg/l)

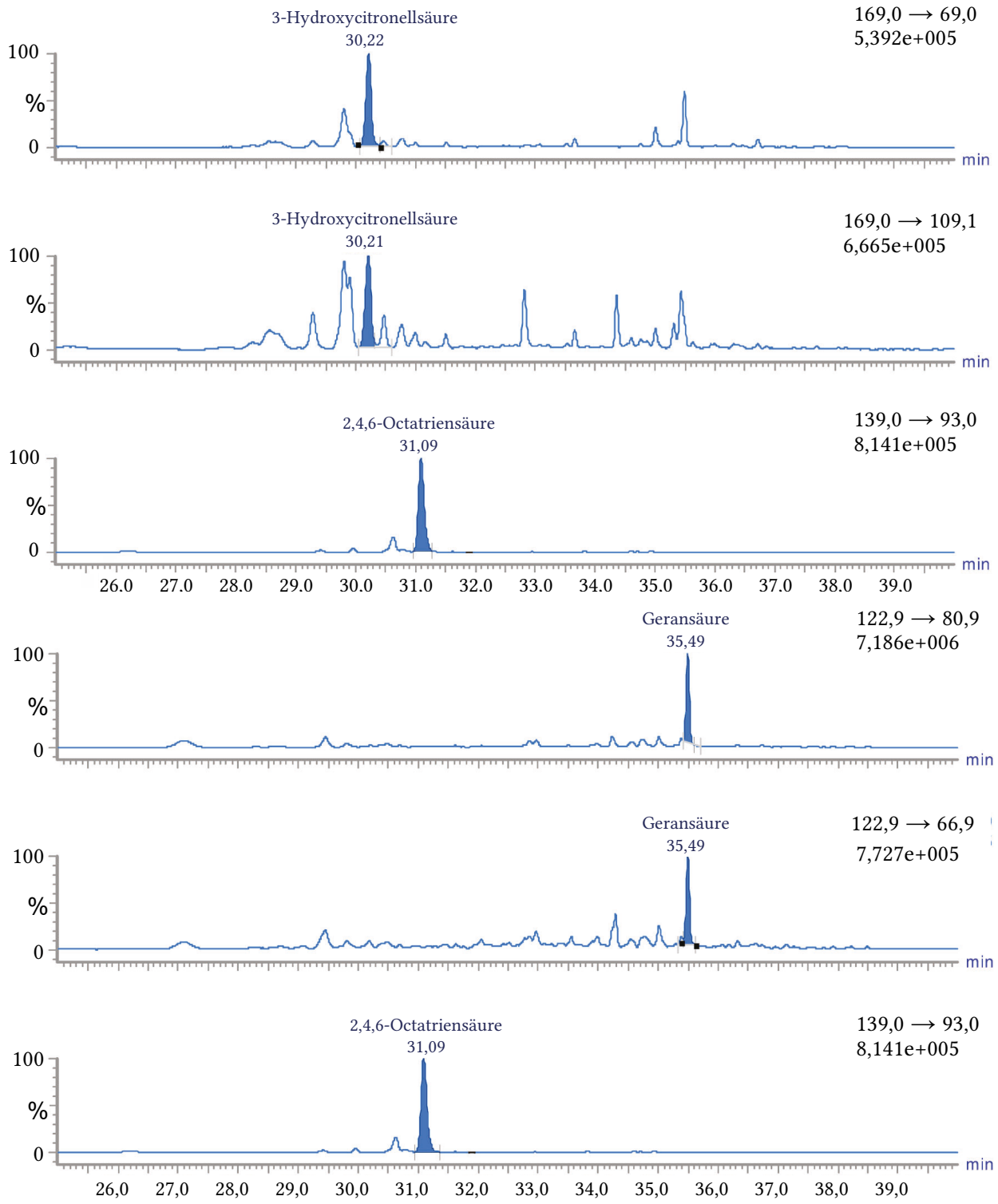


Abb. 4 Chromatogramme eines mit den Geraniol-Metaboliten dotierten Urins (3-Hydroxycitronellsäure: 50 µg/l, Geransäure: 500 µg/l)

8 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards (siehe Abschnitt 4.6) werden analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.2) und analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten und der Peakfläche des entsprechenden ISTD gegen die dotierten Analytkonzentrationen aufgetragen werden. Am eingesetzten Analysengerät ergab sich im Konzentrationsbereich von der Bestimmungsgrenze bis 2000 µg/l ein quadratischer Zusammenhang. Abbildungen 5 und 6 zeigen beispielhaft Kalibriergeraden der einzelnen Analyten.

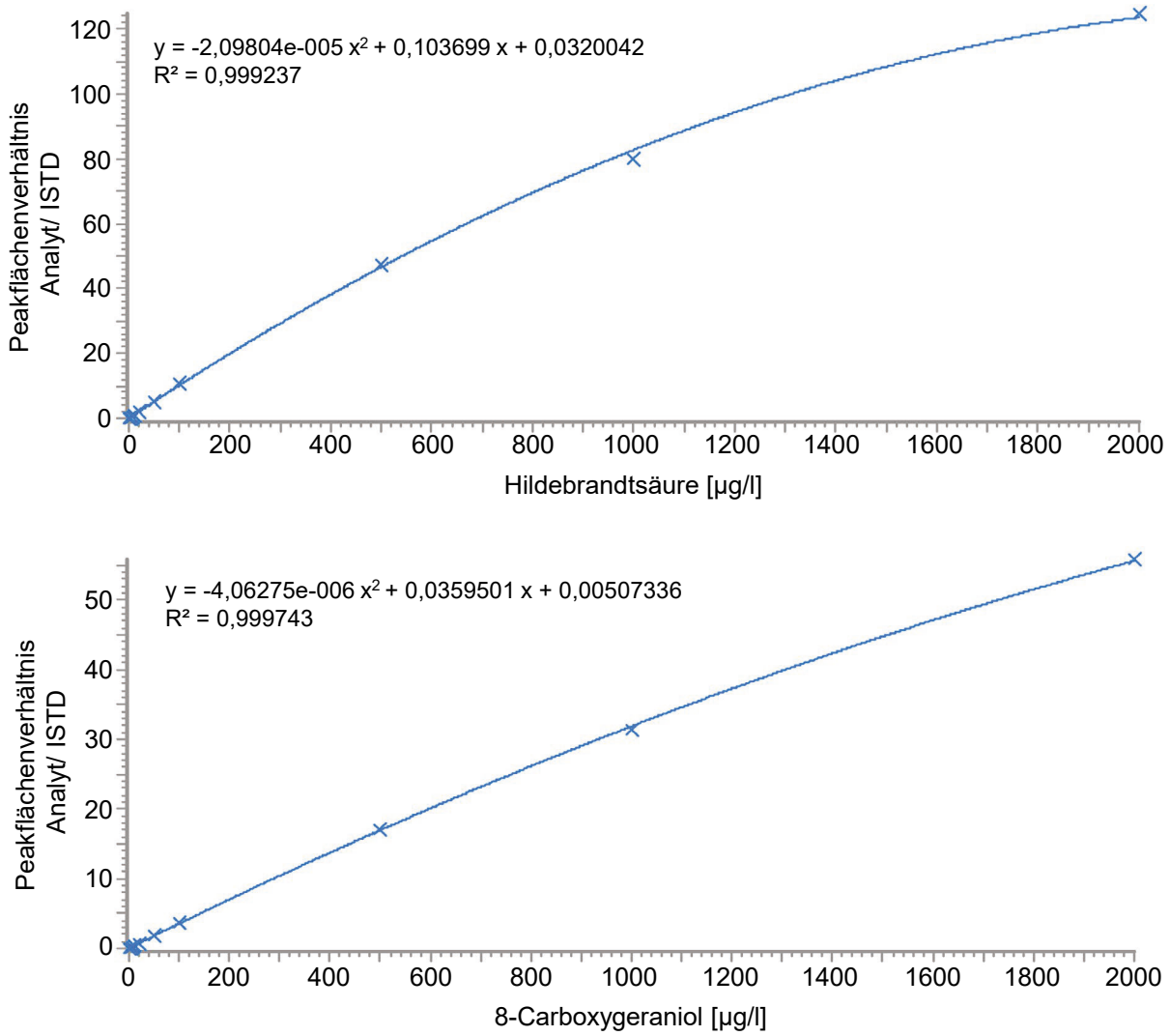
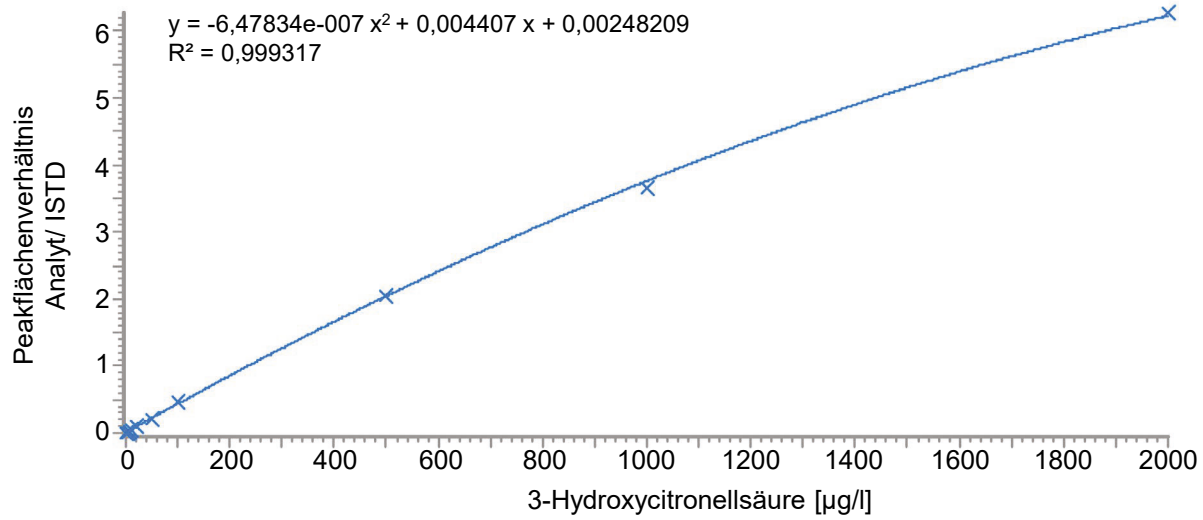


Abb. 5 Kalibriergeraden für die Bestimmung von Hildebrandtsäure und 8-Carboxygeraniol in Urin



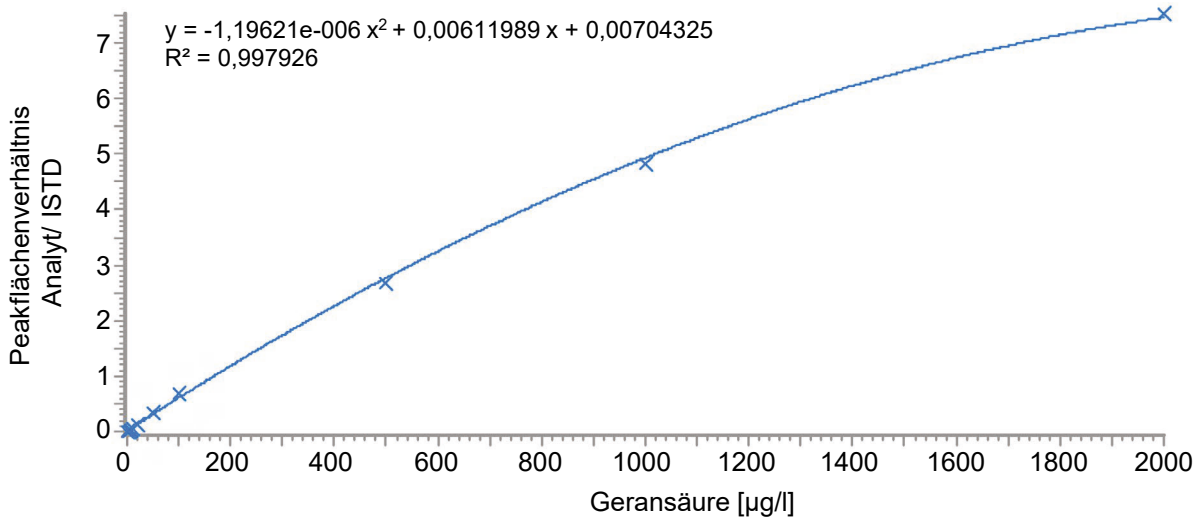


Abb. 6 Kalibriergeraden für die Bestimmung von 3-Hydroxycitronellsäure und Geransäure in Urin

9 Berechnung der Analysenergebnisse

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

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse 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 Qualitätssicherung der Analysenergebnisse werden in jeder Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit unterschiedlicher Analytkonzentration parallel zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Da Kontrollmaterialien derzeit kommerziell nicht erhältlich sind, müssen die Qualitätskontrollproben selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolurin verwendet, der mit Standardlösungen der Analyten dotiert wird. Aufgrund der in den Urinproben der Allgemeinbevölkerung detektierten sehr unterschiedlichen Analytkonzentrationen, sollte der Poolurin nicht bzw. mit mittleren und hohen Analytkonzentrationen dotiert werden (siehe Tabelle 5). Die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien werden aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C tiefgefroren.

Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt (Bader et al. 2010).

Gleichzeitig wird zu jeder Analysenserie hochreines Wasser als Reagenzienleerwert mitgeführt, um eventuelle Störungen aus den Reagenzien zu erkennen. Beim Auftreten von Reagenzienleerwerten müssen diese gegebenenfalls durch Subtraktion berücksichtigt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung sind keine relevanten Reagenzienleerwerte aufgetreten.

Tab. 5 Mögliche Analytkonzentrationen im Qualitätskontrollmaterial für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin

Qualitätskontroll-material	8-Carboxygeraniol [µg/l]	Hildebrandtsäure [µg/l]	Geransäure [µg/l]	3-Hydroxycitronellsäure [µg/l]
Q_{low}	Urinleerwert	Urinleerwert	Urinleerwert	Urinleerwert
Q_{mid}	50	500	500	50
Q_{high}	500	1500	1500	500

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

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden die Qualitätskontrollmaterialien (Q_{low}, Q_{mid}, Q_{high}) an einem Tag achtfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Daten zur Präzision in der Serie sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin (n = 8)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
8-Carboxygeraniol	0 (Urinleerwert)	11,5	26,5
	50	7,8	18,0
	500	2,1	4,8
Hildebrandtsäure	0 (Urinleerwert)	4,9	11,4
	500	2,9	6,7
	1500	5,5	12,8

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
	0 (Urinleerwert)	6,2	14,3
Geransäure	500	4,3	10,0
	1500	3,3	7,5
	0 (Urinleerwert)	5,8	13,3
3-Hydroxycitronellsäure	50	4,7	10,9
	500	2,2	5,2

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde ermittelt, indem das Qualitätskontrollmaterial an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert wurde. Die ermittelten Daten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
	0 (Urinleerwert)	22,3	54,7
8-Carboxygeraniol	50	10,9	26,8
	500	5,5	13,5
	0 (Urinleerwert)	9,4	23,1
Hildebrandtsäure	500	9,8	24,0
	1500	6,7	16,4
	0 (Urinleerwert)	15,7	38,4
Geransäure	500	12,9	31,5
	1500	7,2	17,8
	0 (Urinleerwert)	14,6	35,7
3-Hydroxycitronellsäure	50	9,0	22,1
	500	6,1	14,9

11.2 Richtigkeit

Zur Überprüfung von Matrixeffekten der Methode wurden Urinproben von zehn unterschiedlichen Personen (Kreatiningehalte im Bereich von 0,3–3,1 g/l) jeweils mit 500 µg eines jeden Analyten pro Liter dotiert, aufgearbeitet und vermessen. Zusätzlich wurden die Urine ohne Dotierung aufgearbeitet und analysiert. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
8-Carboxygeraniol	500	97	79–111
Hildebrandtsäure	500	106	77–124
Geransäure	500	134	126–162
3-Hydroxycitronellsäure	500	117	99–137

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach dem DIN-Verfahren 32645 (DIN 2008). Hierzu wurde eine äquidistante 10-Punkt-Kalibrierung (Konzentrationsbereich von 1–10 µg/l in Wasser) erstellt und zusammen mit einem Leerwert aufgearbeitet und analysiert (n = 3). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechneten sich aus der Standardabweichung der erhaltenen Kalibrierfunktionen. Tabelle 9 zeigt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für alle Analyten.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung der Geraniol-Metaboliten in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
8-Carboxygeraniol	0,41	1,50
Hildebrandtsäure	0,76	2,65
Geransäure	0,53	1,80
3-Hydroxycitronellsäure	0,78	2,66

11.4 Störeinflüsse

Bei einigen der als Quantifier und Qualifier genutzten Massenübergänge traten mitunter Störpeaks in den Chromatogrammen auf. Deshalb ist im Rahmen der Methodenetablierung auf eine gute Trennung der Analyten von vorhandenen Matrixpeaks zu achten. Weiterhin fand sich bei der Untersuchung von Matrixeffekten, insbesondere bei der Geransäure und in geringerem Ausmaß bei der 3-Hydroxycitronellsäure, eine erhöhte relative Wiederfindungsrate (> 100 %), die vermutlich auf das Fehlen strukturidentischer deuterierter ISTDs zurückzuführen ist. Der Einsatz von 2,4,6-Octatriensäure als strukturähnlicher ISTD kann die auftretenden Matrixeffekte nur teilweise kompensieren. Kommerziell stehen deuterierte ISTDs für Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure derzeit nicht zur Verfügung.

Die quantitative Bestimmung der Geraniol-Metaboliten ist nicht kontaminationsanfällig. Es ist allerdings sinnvoll, in jeder Analysenserie Reagenzienleerwerte mitzuführen, um eventuell auftretende Kontaminationen erkennen zu können.

Im Rahmen der Methodenprüfung wurde als UPLC-Säule eine C18-Phase mit gleichen Säulendimension verwendet (Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm; 2,1 × 150 mm (Waters GmbH, Eschborn)). Mit der in der Prüfung verwendeten Säule traten bei einigen MRM-Übergängen, insbesondere beim MRM-Übergang der 2,4,6-Octatriensäure, Störpeaks auf. Daher wurde die Konzentration der ISTDs im Vergleich zur Originalmethode verdoppelt, um die ISTD-Peaks sicher und reproduzierbar von Störpeaks abtrennen zu können.

Vor allem bei den beiden später eluierenden Analyten Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure wirkten sich die Störpeaks negativ auf die Methodenperformance aus und erschwerten vor allem bei niedrigeren Konzentrationen eine konsistente Integration der Analytenpeaks. Daher wird empfohlen die Methode ausschließlich mit der in der Originalmethode genannten stationären Phase durchzuführen.

12 Diskussion der Methode

Das dargestellte Biomonitoringverfahren erlaubt die Erfassung einer Geraniol-Exposition beruflich belasteter Personen sowie der Allgemeinbevölkerung. Das Verfahren wurde im Rahmen des BMU/VCI-Kooperationsprojektes entwickelt und ist bereits international publiziert (Jäger et al. 2020).

Die umfassend validierte UPLC-MS/MS Methode erlaubt die sensitive Bestimmung der vier Hauptmetaboliten von Geraniol, 8-Carboxygeraniol, Hildebrandtsäure, Geransäure sowie 3-Hydroxycitronellsäure, in Urin. Hildebrandtsäure, Geransäure und 3-Hydroxycitronellsäure werden allerdings auch durch die Verstoffwechslung von Citral gebildet. Die Methode ist selektiv und weist eine gute Präzision auf. Die im Rahmen der Methodenentwicklung bestimmten

relativen und absoluten Wiederfindungsraten sind sehr gut. Die Bestimmungsgrenzen von 1,50 bis 2,66 µg/l reichen aus, um die Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung zu quantifizieren.

Die vom Prüfer der Methode erhobenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen um Faktor 2–3 über den Werten, die in der Originalmethode beschrieben wurden. Hierfür war vermutlich verantwortlich, dass für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowohl ein anderes Verfahren als auch eine andere Matrix verwendet wurden (Methodenprüfung: Poolurin, Methodenentwicklung: Wasser).

Die Probenaufarbeitung kann auch an kleinere Probenvolumina angepasst werden (*downscaling*). Dazu wird 1 ml Urin in ein 4-ml-Gläschen pipettiert und mit 0,5 ml Natriumacetatpuffer (pH = 5,0) verdünnt. Nach Zugabe von 10 µl *β*-Glucuronidase/Arylsulfatase wird der Ansatz drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Probe wird mit 20 µl ISTD-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 50 µl Phosphorsäure (4 mol/l) wird die Probe mit 2 ml Diethylether versetzt, kurz geschüttelt und für zehn Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Die obere organische Phase wird in ein 4-ml-Gläschen überführt und das Lösungsmittel abgeblasen. Der Rückstand wird in 100 µl 0,033%iger Ameisensäure (Fließmittel A) aufgenommen, in ein Probengläschen mit Mikroeinsatz überführt und das Gläschen verschlossen.

Verwendete Messgeräte ACQUITY UPLC H-Class System PLUS und Tandem-Massenspektrometer Xevo TQ (jeweils von Waters GmbH, Eschborn)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (https://www.dfg.de/dfg_profil/gremien/senat/arbeitsstoffe/interessenkonflikte/index.html) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. 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: https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019

Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Ärztebl 111(38): A1583–A1618

Chadha A, Madyastha KM (1984) Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. Xenobiotica 14(5): 365–374. DOI: https://doi.org/10.3109/00498258409151425

Diliberto JJ, Srinivas P, Overstreet D, Usha G, Burka LT, Birnbaum LS (1990) Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats. Drug Metab Dispos 18(6): 866–875

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: https://doi.org/10.31030/1465413

Greim H (Hrsg) (2004) Geraniol. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 39. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: https://doi.org/10.1002/3527600418.mb10624d0039

Jäger T, Bäcker S, Leibold E, Koch HM, Bader M (2016) Human biomonitoring of the fragrant compound geraniol – the challenge of exposure assessment of natural products and nature-identical chemicals. In: International Society of Exposure Science (Hrsg) Abstract book. Congress of the International Society of Exposure Science (ISES). ISES, Utrecht, 711. https://intlexposurescience.org/wp-content/uploads/2019/02/ISES-2016-abstractbook.pdf, abgerufen am 15 Jul 2021

Jäger T, Bäcker S, Brodbeck T, Leibold E, Bader M (2020) Quantitative determination of urinary metabolites of geraniol by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Anal Methods 12(47): 5718–5728. DOI: https://doi.org/10.1039/D0AY01582B

Lapczynski A, Bhatia SP, Foxenberg RJ, Letizia CS, Api AM (2008) Fragrance material review on geraniol. Food Chem Toxicol 46(Suppl 11): 160–170. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.048