

# Benzo[a]pyren – Bestimmung von 3-Hydroxybenzo[a]pyren in Urin mittels LC-MS/MS

## Biomonitoring-Methode

G. Scherer<sup>1</sup>  
H.-W. Hagedorn<sup>1</sup>  
H.-W. Hoppe<sup>2</sup>  
P. Dadanski<sup>2</sup>  
A. Seidel<sup>3</sup>  
T. Göen<sup>4,\*</sup>  
A. Hartwig<sup>5,\*</sup>  
MAK Commission<sup>6,\*</sup>

### Keywords

3-Hydroxybenzo[a]pyren;  
Benzo[a]pyren; Biomonitoring;  
Urin; LC-MS/MS

- <sup>1</sup> *Methodenentwicklung, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg*
- <sup>2</sup> *Methodenprüfung, MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH, Haferwende 12, 28357 Bremen*
- <sup>3</sup> *Methodenprüfung, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene Prof. Dr. Gernot Grimmer Stiftung, Lurup 4, 22927 Großhansdorf*
- <sup>4</sup> *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- <sup>5</sup> *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*
- <sup>6</sup> *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

\* E-Mail: T. Göen ([thomas.goeen@fau.de](mailto:thomas.goeen@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 German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method. Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a polycyclic aromatic hydrocarbon and is classified as carcinogenic to humans by the Commission. B[a]P originates, for example, from coal tar or from the incomplete combustion of organic material. The general population is primarily exposed through cigarette smoke, food, and ambient air. The aim of this work was to develop a selective method for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OH-B[a]P) in urine. The method is characterised by the use of glucuronidated standards, ascorbic acid as an antioxidant, and by the conversion of the analyte into a derivative which allows for sensitive measurement. The procedure has been comprehensively validated, and the reliability data have been confirmed by replication and verification of the procedure in a second, independent laboratory. For the determination of 3-OH-B[a]P, an internal standard is added to the urine samples, which undergo solid-phase extraction prior to analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Quantitative evaluation is carried out via external calibration using pooled urine from persons with no known exposure to B[a]P. The good precision and accuracy data show that the method provides reliable and accurate analytical results. The method is both selective and sensitive, and the limit of detection of 17 pg/l urine is sufficient to determine both occupational exposure and exposure to B[a]P in the general population.

### Citation Note:

Scherer G, Hagedorn H-W, Hoppe H-W, Dadanski P, Seidel A, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Benzo[a]pyren – Bestimmung von 3-Hydroxybenzo[a]pyren in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Dec;8(4):Doc090. [https://doi.org/10.34865/bi13345d8\\_4or](https://doi.org/10.34865/bi13345d8_4or)

Manuskript abgeschlossen:  
27 Apr 2023

Publikationsdatum:  
20 Dez 2023

Lizenz: Dieses Werk ist  
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](#).



## 1 Kenndaten der Methode

<b>Matrix</b>	Urin		
<b>Analytisches Messprinzip</b>	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)		
<b>Parameter und entsprechender Arbeitsstoff</b>			
<b>Arbeitsstoff</b>	<b>CAS-Nr.</b>	<b>Parameter</b>	<b>CAS-Nr.</b>
Benzo[a]pyren	50-32-8	3-Hydroxybenzo[a]pyren	13345-21-6

## Zuverlässigkeitskriterien

### 3-Hydroxybenzo[a]pyren (3-OH-B[a]P)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,4\%$ bzw. $4,3\%$
	Streubereich bei einer Konzentration von 200 pg oder 640 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	$u = 28,9\%$ bzw. $11,9\%$
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,1\%$ bzw. $13,7\%$
	Streubereich bei einer Konzentration von 200 pg oder 640 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$u = 26,0\%$ bzw. $35,2\%$
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer Konzentration von 200 pg oder 640 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	$r = 102\%$ bzw. $92,6\%$
Nachweisgrenze:	16,7 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	50 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin	

## 2 Allgemeine Informationen zu Benzo[a]pyren

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) entstehen bei unvollständiger Verbrennung von organischem Material (IARC 2010, 2012) und kommen ubiquitär in der Umwelt vor. PAHs treten am Arbeitsplatz und in der Umwelt stets als Gemische von bis zu 100 Einzelkomponenten auf. Die relative Verteilung der einzelnen PAHs in den verschiedenen Stoffgemischen variiert in Abhängigkeit von der Expositionsquelle stark (IARC 2010).

Die Kommission stufte 17 PAHs, unter ihnen auch Benzo[a]pyren (B[a]P), in Kanzerogenitäts-Kategorie 2 ein, da diese kanzerogen im Tierversuch und als krebserzeugend für den Menschen anzusehen sind (DFG 2023; Greim 2008). B[a]P wurde zusätzlich in die Kategorie 2 für Keimzellmutagene eingestuft und aufgrund der Gefahr, dass die perkutane B[a]P-Resorption nennenswert zur inneren Belastung beitragen kann, auch mit einer „H“-Markierung versehen (DFG 2023).

Pyrolyseprodukte aus organischem Material, die einen hohen PAH-Anteil aufweisen (wie Braunkohlen- und Steinkohlenteer, Steinkohlenteerpech, Steinkohlenteeröl und Kokereirohgas) wurden von der Kommission als krebserzeugend beim Menschen (Kanzerogenitäts-Kategorie 1) eingestuft (DFG 2023). PAH-haltige Dieselmotor-Emissionen wurden in Kanzerogenitäts-Kategorie 2 eingestuft und auch weitere Pyrolyseprodukte, die einzelne der von der Kommission bewerteten PAHs enthalten, sollten wie Stoffe der Kategorie 2 gehandhabt werden.

B[a]P nimmt unter den arbeitsplatz- und umweltrelevanten PAHs eine Sonderstellung ein (Henschler 1984) und dient nicht nur als Indikator für das Vorliegen krebserzeugender PAHs bei Emissionsmessungen und in Luftproben, sondern wird auch als Marker für die kanzerogene Belastung durch die gesamte PAH-Gruppe angesehen.

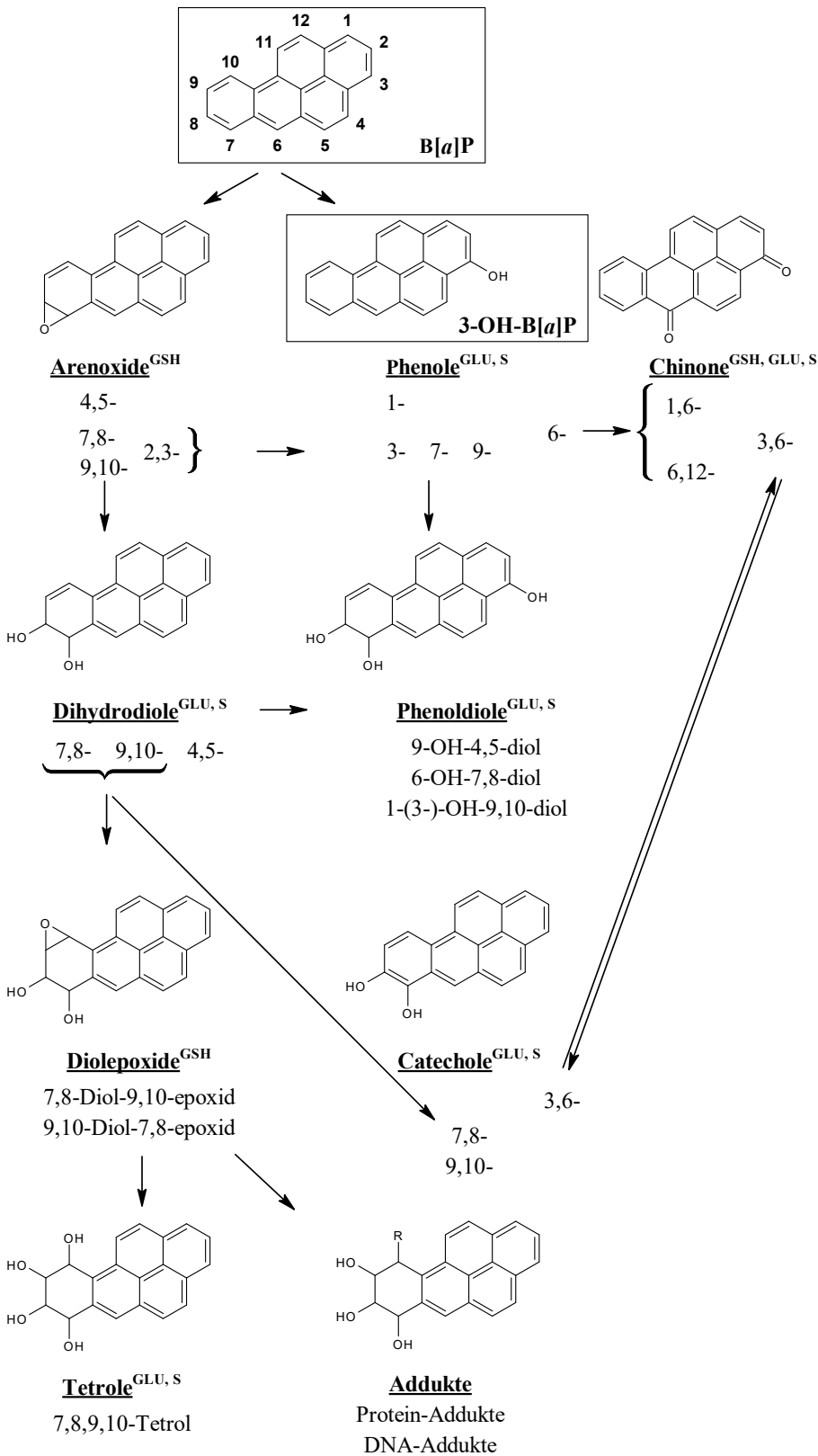
Als Reinsubstanz liegt B[a]P als gelbliche Nadeln und Plättchen vor und wird als solche nur im Labor verwendet. In PAH-Gemischen kommt B[a]P fast ubiquitär vor (IFA 2023). An Arbeitsplätzen ist es nicht nur in den oben genannten Pyrolyseprodukten enthalten (Greim 2001), sondern wird auch in nicht wassermischbaren Kühlschmierstoffen gebildet, wenn deren mineralische Basisöle nicht ausreichend raffiniert oder hydriert sind (DFG 2023, Abschnitt X c).

Außerhalb des Arbeitsplatzes kann die Exposition gegen B[a]P-haltige PAH-Gemische über die Ernährung und das Rauchen sowie über Verkehrsabgase und Luftverschmutzung erfolgen (Klotz 2013).

Am Arbeitsplatz wird B[a]P hauptsächlich an Partikel gebunden über den Atemtrakt aufgenommen. Aufgrund seiner Lipophilie besitzt es aber auch eine gute Hautgängigkeit, sodass die dermale Resorption für beruflich gegen B[a]P exponierte Personen ebenfalls einen wichtigen Aufnahmepfad darstellt (Fustinoni et al. 2010). Nach oraler Aufnahme wird B[a]P zu etwa 10 % über den Gastrointestinaltrakt des Menschen resorbiert (Klotz 2013).

Der lipophile Charakter der PAHs verhindert die direkte Ausscheidung der resorbierten Verbindungen. Die Verstoffwechslung der PAHs trägt dazu bei, dass die lipophilen Verbindungen in wasserlöslichere, besser ausscheidbare Metaboliten umgewandelt werden (ATSDR 1995). [Abbildung 1](#) zeigt ausgewählte Biotransformationswege von B[a]P (ATSDR 1995; Greim 2008; Klotz 2013; Marquardt und Schäfer 2004; Simpson et al. 2000). Pulmonal, transdermal oder gastrointestinal resorbiertes B[a]P wird im Phase-I-Metabolismus durch Cytochrom-P450 (CYP)-abhängige Monooxygenasen in intermediäre Epoxide überführt. Diese Reaktion stellt eine Bioaktivierung dar. Arenoxide können von mikrosomalen Epoxidhydrolasen zum vizinalen Dihydrodiol metabolisiert werden (Klotz 2013). Eine zweite Oxidation des Dihydrodiols durch CYP-Enzyme bewirkt eine Metabolisierung zum besonders reaktiven Dihydrodiolepoxid, das mit körpereigenen Makromolekülen reagieren kann und als ultimales Kanzerogen im B[a]P-Metabolismus angesehen wird (Greim 2008; Marquardt und Schäfer 2004). Darüber hinaus ist die Umwandlung von Arenoxiden in weniger reaktive Dihydrodiole und Phenole sowie die Metabolisierung der Folgeprodukte der Dihydrodiole, der Dihydrodiolepoxide, in Tetrole möglich (Klotz 2013). Schließlich kann auch eine durch CYP1A1 und CYP1B1 katalysierte Hydroxylierung der Position 3 des aromatischen Kohlenwasserstoffgerüsts erfolgen, bei der 3-Hydroxybenzo[a]pyren (3-OH-B[a]P) gebildet wird (Klotz 2013). Die analytische Bestimmung von 3-OH-B[a]P stellt eine Möglichkeit dar, ein B[a]P-bezogenes Biomonitoring durchzuführen.

In der Phase II der Biotransformation werden die gebildeten hydroxylierten Verbindungen durch Sulfotransferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen zu Sulfaten und Glucuroniden konjugiert, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen (Klotz 2013).



**Abb. 1** Vereinfachtes Metabolismusschema von B[a]P in Anlehnung an Klotz (2013) und Simpson (2000), modifiziert. Eine Konjugation kann stattfinden mit GSH (Glutathion), GLU (Glucuronsäure) und S (Sulfat).

Untersuchungen an Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass nur ein Anteil von 0,1–0,35 % einer applizierten B[a]P-Dosis als 3-OH-B[a]P mit dem Urin ausgeschieden wird (Strickland et al. 1996). Es kann davon ausgegangen werden, dass der renal ausgeschiedene 3-OH-B[a]P-Anteil beim Menschen ähnlich gering ist. Analyseverfahren zur Erfassung von hydroxylierten Metaboliten im Urin müssen dementsprechend spezifisch und äußerst sensitiv sein, um die im Urin vorhandenen geringen Mengen mit ausreichender diagnostischer Validität nachweisen zu können (Greim 2008). OH-PAHs liegen in Urinproben der Allgemeinbevölkerung größtenteils konjugiert und zu weniger als 10 % in freier Form vor (Gaudreau et al. 2016). Demzufolge ist anzunehmen, dass auch 3-OH-B[a]P beim Menschen größtenteils als Konjugat mit dem Urin ausgeschieden wird. Der unkonjugierte Anteil ist dabei schwer zu ermitteln, da freies 3-OH-B[a]P deutlich weniger stabil ist, weil es oxidativem Abbau und starken Adsorptionseffekten unterliegt (Nikolaou et al. 1984).

Die Halbwertszeit für die renale Ausscheidung von 3-OH-B[a]P beträgt beim Menschen im Mittel 8,8 Stunden (Bereich: 3,1–16,2 h) (Lafontaine et al. 2004), so dass eine Probenahme vor der nachfolgenden Schicht empfohlen wird (DFG 2023).

Von der Kommission wurden Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) aufgestellt, um bei beruflichem Umgang mit B[a]P die Exposition beurteilen zu können. Den EKA für PAH kann entnommen werden, welche 3-OH-B[a]P-Konzentrationen im Urin bei ausschließlich inhalativer B[a]P-Aufnahme zu erwarten sind (DFG 2023; Klotz 2013). Details zur toxikologischen Bewertung können den entsprechenden Dokumentationen der Kommission entnommen werden (DFG 2023; Greim 2001, 2008; Henschler 1984; Klotz 2013).

Die Historie der Analytik von 3-OH-B[a]P in Humanurin reicht mehrere Jahrzehnte zurück, dabei ergaben sich aufgrund der genannten Schwierigkeiten inkonsistente Ergebnisse. In [Tabelle 1](#) sind zwischen 1994 und 2023 erschienene Publikationen zusammengestellt, in denen Analysemethoden für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin und deren Anwendung bei beruflich exponierten Personen beschrieben wurden. Eine Übersicht über weitere Methoden und Daten zur Hintergrundbelastung beruflich nicht exponierter Personen findet sich in [Tabelle 10](#) am Ende von [Abschnitt 12](#). Sowohl bei den Methoden in [Tabelle 1](#) als auch bei den Methoden in [Tabelle 10](#) erfolgte die Probenaufbereitung – sofern nicht anders angegeben – durch enzymatische Hydrolyse mit Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* und Festphasenextraktion mit C18-Kartuschen. Um einen Vergleich der Studienergebnisse zu ermöglichen, wurden die von den Autoren mit Kreatininbezug angegebenen Werte in beiden Tabellen gemäß Bader et al. (2020) in ng/l Urin umgerechnet. Dabei wurde eine Kreatininkonzentration von 1,4 g/l Urin bei überwiegend männlichen Probanden (Arbeitern) bzw. von 1,2 g/l Urin bei Studienkollektiven mit ausgeglichenem Geschlechterverhältnis angenommen.

**Tab. 1** Publizierte analytische Methoden für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin und deren Anwendung bei beruflich exponierten Personen

Studienkollektiv (n, Raucherstatus)	Methode	NWG	BG	3-OH-B[a]P		Literatur
				Mittelwert±SD	Bereich	
Arbeiter/Kokerei (14, davon 9 R)	Derivatisierung (Methylierung), HPLC-FD (LIF) bzw. laserangeregte Shpol'skii-Spektrometrie (ShS)	8 ng/l (HPLC-FD) bzw. 0,5 ng/l (ShS)	n. a.	4,83 ng/l <sup>(a)</sup> (HPLC-FD); n = 6, davon 5 < NWG, 17,41 ng/l (ShS; n = 8)	< NWG-9 ng/l (HPLC-FD), 1,7-80 ng/l (ShS)	Ariese et al. 1994
Kontrollen/Büro (6, davon 3 R)				8,3 ng/l (ShS)	2,3-19,2 ng/l (ShS)	
Arbeiter/Herstellung Feuerfest-Materialien (19)	Säulenschaltung mit Phthalocyanin-Vorsäule, HPLC-FD	6 ng/l	n. a.	37 ± 56 ng/g Krea <sup>(b)</sup> (51,8 ± 78,4 ng/l)	3-198 ng/g Krea (4,2-277 ng/l)	Gündel et al. 2000; Gündel und Angerer 2000
Arbeiter (3)				5,03 ng/l	1,7-9,5 ng/l	
Kontrollen (3 R)	Automatisierte Säulenschaltung zur Reinigung/Anreicherung, HPLC-FD	0,1 ng/l	0,4 ng/l	0,5 ng/l <sup>(c)</sup>	0,1-0,8 ng/l	Simon et al. 2000
Kontrollen (3 NR, 2 < NWG)				0,1 ng/l <sup>(a)</sup>	< NWG-0,2 ng/l	
Arbeiter in sechs Fabriken bei 45 unterschiedlichen Tätigkeiten (39)	Automatisierte Säulenschaltung zur Reinigung/Anreicherung, HPLC-FD	0,1 ng/l	0,4 ng/l	-	0,14-35 nmol/mol Krea (0,46-116 ng/l)	Lafontaine et al. 2004
Arbeiter/Asphaltierer (75, davon 32 R)	Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Diethylether, HPLC-FD	60 ng/l	n. a.	< NWG	< NWG	Buratti et al. 2007
Arbeiter/Straßenbau (37, davon 25 R)				< NWG	< NWG	
Arbeiter (225, 3 < NWG)				1,74 ng/g Krea (2,44 ng/l)	< NWG-19,53 ng/g Krea (< NWG-27,3 ng/l)	
Arbeiter/Konvertierungsleistung (26)				3,69 ng/g Krea (5,17 ng/l)	0,08-19,53 ng/g Krea (0,12-27,3 ng/l)	
Arbeiter/Herstellung Feuerfestmaterialien (86)	Automatisierte Säulenschaltung zur Reinigung/Anreicherung, HPLC-FD	0,05 ng/l	n. a.	2,00 ng/g Krea (2,80 ng/l)	0,17-17,08 ng/g Krea (0,24-23,9 ng/l)	Förster et al. 2008
Arbeiter/Kokerei (87, 3 < NWG)				0,71 ng/g Krea (0,99 ng/l)	< NWG-8,05 ng/g Krea (< NWG-11,3 ng/l)	
Arbeiter/Herstellung Graphitelektroden (26)				2,43 ng/g Krea (3,40 ng/l)	0,21-14,58 ng/g Krea (0,29-20,4 ng/l)	
Arbeiter/Anodenproduktion (35, davon 3 R)				0,74 nmol/mol Krea <sup>(b)</sup> (2,46 ng/l) <sup>(b)</sup>	0,10-5,05 nmol/mol Krea (0,33-16,7 ng/l)	
Arbeiter/Herstellung Graphitelektroden (50, davon 18 R)	HPLC-FD	n. a.	0,05 ng/l	0,28 nmol/mol Krea <sup>(b)</sup> (0,93 ng/l) <sup>(b)</sup>	0,02-5,27 nmol/mol Krea (0,07-17,5 ng/l)	Barbeau et al. 2014
Arbeiter/Siliciumherstellung (44, davon 22 R)				0,20 nmol/mol Krea <sup>(b)</sup> (0,66 ng/l) <sup>(b)</sup>	0,03-1,14 nmol/mol Krea (0,10-3,79 ng/l)	
Schornsteinfeger (151, davon 53 R, 19 < NWG)	LC-MS/MS	2 ng/l	n. a.	4,75 ng/l <sup>(b)</sup>	< NWG-42,86 ng/l	Alhamedow et al. 2017
Kontrollen (152, davon 29 R, 22 < NWG)				1,38 ng/l <sup>(b)</sup>	< NWG-16,51 ng/l	

BG: Bestimmungsgrenze; HPLC-FD: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion; Krea: Kreatinin; LC-MS/MS: Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie; LIF: Laser-induzierte Fluoreszenz; n. a.: nicht angegeben; NR: Nichtraucher; NWG: Nachweispiegel; R: Raucher; SD: Standardabweichung

<sup>a)</sup> Werte < NWG wurden als NWG/2 in die Berechnung einbezogen.

<sup>b)</sup> Median

<sup>c)</sup> Werte < BG wurden als BG/2 in die Berechnung einbezogen.

### 3 Grundlage des Verfahrens

Zur Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin werden die Proben mit Acetatspuffer gemischt und der pH-Wert der Lösung auf 5,0–5,5 eingestellt. Nach Zugabe des internen Standards (ISTD) 3-OH-B[a]P-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glucuronid sowie Glucuronidase/Arylsulfatase werden die Proben zur Spaltung der Konjugate über Nacht inkubiert (37 °C, 16–18 h). Anschließend werden die Proben zur Aufkonzentrierung des Analyten und Abtrennung von Matrixbestandteilen einer Festphasenextraktion zugeführt. Nach Derivatisierung mit 2-Fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluolsulfonat (FMPT) wird 3-OH-B[a]P mittels LC-MS/MS im MRM-Modus analysiert und quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt mit entsprechend aufgearbeiteten dotierten Poolurinproben.

## 4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 4.1 Geräte

- HPLC-MS/MS-System mit automatischem Probengeber (z. B. Agilent 1200, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) sowie einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (z. B. API 6500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) mit Datenverarbeitungssystem (z. B. Analyst 1.5.2, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)
- HPLC-Trennsäule (z. B. Acquity UPLC BEH C18-Säule, 1,7 µm × 2,1 mm × 50 mm, Nr. 186002350, Waters GmbH, Eschborn)
- Tischzentrifuge (z. B. ROTINA 380R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Vakuumpkonzentrator (z. B. SpeedVac™ SPD120 V, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- Brutschrank (z. B. Incucell 111, MMM Medcenter GmbH, Planegg)
- Reinstwassersystem (z. B. Arium®, Sartorius AG, Göttingen)
- Reagenzglasschüttler (z. B. Standard Multi-Tube Vortexer, VWR International GmbH, Darmstadt)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Vakuumarbeitsstation (z. B. Biotage® VacMaster™, Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden) mit Membranpumpe (z. B. KNF DAC GmbH, Hamburg)
- 20-ml-, 100-ml-, 1000-ml-Messkolben (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 10-ml-Gewindereagenzgläser mit Schraubverschluss (z. B. Nr. 212-7549, VWR International GmbH, Darmstadt)
- 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss (z. B. Nr. 1.300820-01, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- Autosampler-Gläschen (z. B. Nr. 18525267, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 325-µl-Bördelrandfläschchen (z. B. Nr. 1.301038, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- Variabel einstellbare Mikroliterpipetten mit passenden Spitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Pasteurpipetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- SPE (Solid Phase Extraction)-Kartuschen, 200 mg, 3 ml (z. B. Nr. 12105025, Bond Elut-LMS, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Urinbecher mit Schraubverschluss (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, ULC/MS - CC/SFC (z. B. Nr. 012041, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)



- Ameisensäure,  $\geq 99\%$  (z. B. Nr. 069141, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- Ascorbinsäure (z. B. Nr. 33034, Merck KGaA, Darmstadt)
- Dichlormethan, Promochem Picograde® (z. B. Nr. SO-1185-C011, neoLab Migge GmbH, Heidelberg)
- *N,N*-Dimethylethylamin,  $\geq 99\%$  (z. B. Nr. B23992, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Dimethylsulfoxid (DMSO),  $\geq 99,5\%$  (z. B. Nr. D4540, Merck KGaA, Darmstadt)
- Essigsäure, ReagentPlus®,  $\geq 99\%$  (z. B. Nr. A6283, Merck KGaA, Darmstadt)
- 2-Fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluolsulfonat (FMPT),  $\geq 98\%$  (z. B. Nr. F0225, TCI Deutschland GmbH, Eschborn)
- Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (z. B. Nr. 10127698001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Methanol für HPLC, Promochem Optigrade® (z. B. Nr. SO-3041-C012, neoLab Migge GmbH, Heidelberg)
- Natriumhydroxidplättchen,  $\geq 98,0\%$  (z. B. Nr. 71690, Merck KGaA, Darmstadt)
- Salzsäure, rauchend, 37% (z. B. Nr. 100317, Merck KGaA, Darmstadt)
- Reinstwasser (z. B. Arium®, Sartorius AG, Göttingen)

### 4.3 Standards

- 3-OH-Benzo[a]pyren-O- $\beta$ -glucuronid (3-OH-B[a]P-Gluc), Reinheit 98,7% (z. B. Auftragssynthese, Synthèse AptoChem Inc., Montreal, Kanada oder Nr. B-5218, TLC Pharmaceutical Standards Ltd., Ontario, Kanada)
- 3-OH-Benzo[a]pyren-O- $\beta$ -glucuronid- $^{13}\text{C}_6$  (3-OH-B[a]P-Gluc- $^{13}\text{C}_6$ ), Reinheit: 97,9% (z. B. Auftragssynthese, Synthèse AptoChem Inc., Montreal, Kanada)

### 4.4 Lösungen

- Acetatpuffer (1 mol/l, pH 5,1)  
In einem 1000-ml-Messkolben werden 57,0 ml Eisessig vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird durch Zugabe von etwa 30 g Natriumhydroxidplättchen auf pH 5,1 eingestellt.
- Ascorbinsäurelösung (150 g/l)  
In einen 20-ml-Messkolben werden 3 g Ascorbinsäure eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Ameisensäure (1%)  
In einem 100-ml-Messkolben werden 50 ml Methanol mit 49 ml hochreinem Wasser und einem Milliliter Ameisensäure gemischt.
- *N,N*-Dimethylethylamin (0,2%)  
20  $\mu\text{l}$  *N,N*-Dimethylethylamin werden in einem 10-ml-Messkolben vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- FMPT-Stammlösung (2,5 g/l)  
50 mg FMPT werden in einen 20-ml-Messkolben eingewogen und in wenigen Millilitern Acetonitril gelöst. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- FMPT-Arbeitslösung (0,5 g/l)  
4 ml der FMPT-Stammlösung werden in einem 20-ml-Messkolben vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Methanol/Wasser (50 : 50, V/V)  
In einem 1000-ml-Messkolben werden 500 ml Methanol mit 500 ml hochreinem Wasser gemischt.



- Methanol/Acetonitril (50 : 50, V/V)  
In einem 1000-ml-Messkolben werden 500 ml Methanol mit 500 ml Acetonitril gemischt.
- Salzsäure (1 mol/l)  
In einem 100-ml-Messkolben werden 50 ml hochreines Wasser vorgelegt. Vorsichtig werden 8,3 ml der rauchenden Salzsäure dazugegeben. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

#### 4.5 HPLC-Laufmittel

- Laufmittel A (0,5 % Ameisensäure in Wasser)  
In einem 1000-ml-Messkolben werden 5 ml Ameisensäure vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt und das Laufmittel entgast.
- Laufmittel B (0,5 % Ameisensäure in Acetonitril)  
In einem 1000-ml-Messkolben werden 5 ml Ameisensäure vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt und das Laufmittel entgast.

#### 4.6 Interne Standards (ISTDs)

- 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Stammlösung (250 mg/l)  
In einen 20-ml-Messkolben werden 5 mg 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> eingewogen und in ein wenig hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Arbeitslösung 1 (2,5 mg/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3960 µl hochreines Wasser vorgelegt und 40 µl der ISTD-Stammlösung zugegeben.
- 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Arbeitslösung 2 (25 µg/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3960 µl hochreines Wasser vorgelegt und 40 µl der ISTD-Arbeitslösung 1 zugegeben.
- 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Dotierlösung (100 ng/l)  
In einem 20-ml-Messkolben werden ca. 5 ml hochreines Wasser vorgelegt und 80 µl der ISTD-Arbeitslösung 2 zugegeben. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Stammlösung sowie die Arbeitslösungen des ISTDs werden bei –20 °C gelagert und sind mindestens drei Jahre stabil. Die Dotierlösung des ISTD kann bei –20 °C für einen Monat gelagert werden.

#### 4.7 Kalibrierstandards

- Stammlösung (50 mg 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 20-ml-Messkolben werden 1,0 mg 3-OH-B[a]P-Gluc (entsprechend 0,929 mg Reinsubstanz) in ein wenig hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Arbeitslösung 1 (500 µg 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3960 µl hochreines Wasser vorgelegt und 40 µl der 3-OH-B[a]P-Gluc-Stammlösung zugegeben.
- Arbeitslösung 2 (5 µg 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3960 µl hochreines Wasser vorgelegt und 40 µl der 3-OH-B[a]P-Gluc-Arbeitslösung 1 zugegeben.

- Dotierlösung 1 (DL 1) (500 ng 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3600 µl hochreines Wasser vorgelegt und 400 µl der 3-OH-B[a]P-Gluc-Arbeitslösung 2 zugegeben.
- Dotierlösung 2 (DL 2) (50 ng 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3600 µl hochreines Wasser vorgelegt und 400 µl der 3-OH-B[a]P-Gluc-Dotierlösung 1 zugegeben.
- Dotierlösung 3 (DL 3) (5 ng 3-OH-B[a]P-Gluc/l)  
In einem 4-ml-Glasfläschchen mit Schraubverschluss werden 3600 µl hochreines Wasser vorgelegt und 400 µl der 3-OH-B[a]P-Gluc-Dotierlösung 2 zugegeben.

Die Stammlösung sowie die Arbeitslösungen des 3-OH-B[a]P-Glucuronids werden bei  $-20\text{ °C}$  gelagert und sind mindestens drei Jahre stabil. Die Dotierlösungen 1–3 können bei  $-20\text{ °C}$  für einen Monat gelagert werden.

Die Kalibrierstandards werden gemäß dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema in Poolurin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins werden Urine von nicht gegen B[a]P exponierten Personen gesammelt und gemischt. Der Poolurin wird bei  $-20\text{ °C}$  gelagert, vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und 10 min bei  $5000 \times g$  zentrifugiert. Bei der Aufarbeitung wird zu den Kalibrierstandards S0 bis S8 je 50 µl ISTD (3-OH-B[a]P-Gluc- $^{13}\text{C}_6$ ,  $c = 100\text{ ng/l}$  Wasser) zugegeben. Der Standard S00 wird ohne ISTD aufgearbeitet.

**Tab. 2** Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin

Kalibrierstandard	DL 1 [µl]	DL 2 [µl]	DL 3 [µl]	Poolurin [µl]	Konzentration, bezogen auf 3-OH-B[a]P-Gluc [pg/l]	Konzentration, bezogen auf freies 3-OH-B[a]P [pg/l]
S00	–	–	–	6000	0	0
S0	–	–	–	6000	0	0
S1	–	–	100	6000	83,3	50,3
S2	–	20	–	6000	167	101
S3	–	40	–	6000	333	201
S4	–	80	–	6000	667	403
S5	–	128	–	6000	1067	644
S6	–	160	–	6000	1333	805
S7	32	–	–	6000	2667	1611
S8	64	–	–	6000	5333	3221

## 5 Probenahme und Probenaufbereitung

### 5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Urinbechern (z. B. aus Polypropylen) gesammelt. Werden die Proben nicht direkt aufgearbeitet, können sie bei  $-20\text{ °C}$  gelagert werden und sind unter diesen Bedingungen mehrere Monate stabil.

### 5.2 Probenaufbereitung

Tiefgefrorene Urinproben werden langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend gut gemischt. Je 6 ml der Proben werden in 10-ml-Gewindereagenzgläser pipettiert und mit 400 µl Acetatpuffer versetzt. Der pH-Wert der gepufferten Proben wird mit Salzsäure (1 mol/l) auf 5,0–5,5 eingestellt. Nach Zugabe von 50 µl der ISTD-Dotierlösung, 100 µl der Ascorbinsäurelösung sowie 20 µl Glucuronidase/Arylsulfatase werden die Gewindereagenzgläser mit

den Schraubdeckeln verschlossen. Die Ansätze werden unter Vermeidung von Schaumbildung durch vorsichtiges Umschwenken gemischt und über Nacht (16–18 Stunden) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Sollte sich das Sediment während der Inkubation nicht gelöst haben, wird die Probe zentrifugiert (5000 × g, 10 min) und der Überstand in ein neues Schraubglas überführt.

Bei der sich nun anschließenden Festphasenextraktion ist darauf zu achten, dass die Kartuschen zu keinem Zeitpunkt trocken laufen. Für die Festphasenextraktion werden die SPE-Kartuschen zuerst mit 3 ml Dichlormethan, anschließend mit 6 ml Methanol und zuletzt mit 3 ml hochreinem Wasser konditioniert. Die Urinproben werden mit Pasteurpipetten in 2–3 Aliquoten aufgegeben. Es wird zuerst mit 3 ml hochreinem Wasser, dann mit 3 ml Methanol/Wasser (50 : 50, V/V), anschließend mit 1 ml Methanol und zuletzt mit 2 ml Methanol/Acetonitril (50 : 50, V/V) gewaschen. Nach den Waschschrritten werden die Analyten mit zweimal 2 ml Dichlormethan von den SPE-Kartuschen eluiert, wobei die restlichen ca. 300 µl Dichlormethan unter Verwendung passender Spritzenstempel durchgedrückt werden. Die Eluate werden in 4-ml-Gläschen gesammelt, mit 20 µl DMSO versetzt und im SpeedVac-Konzentrator innerhalb von ca. 30 min auf 20 µl (DMSO-Anteil) eingengt. Die Rückstände werden mit 250 µl der FMPT-Arbeitslösung und 50 µl *N,N*-Dimethylethylamin (0,2 % in Acetonitril) gemischt. Diese Lösungen werden für 20 min bei 45 °C inkubiert, anschließend in Microvials überführt und im SpeedVac-Konzentrator innerhalb von ca. 15 min auf 20 µl (DMSO-Anteil) eingengt. Die Rückstände werden in 250 µl der 1%igen Ameisensäure aufgenommen und auf dem Reagenzglasschüttler intensiv gemischt. 15 µl der so aufgearbeiteten Proben werden der LC-MS/MS-Analyse zugeführt.

Die aufgearbeiteten Proben können bei –20 °C gelagert werden und sind unter diesen Bedingungen mindestens 6 Monate stabil.

## 6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer HPLC-Anlage mit Säulenofen und Degasser, gekoppelt mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer und einem automatischem Probengeber.

### 6.1 Flüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 50 mm)
Trennprinzip:	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
Injektionsvolumen:	15 µl
Temperatur Säulenofen:	50 °C
Flussrate:	0,6 ml/min
Laufmittel:	A: 0,5 % Ameisensäure in Wasser B: 0,5 % Ameisensäure in Acetonitril
Laufzeit:	15 min
Gradientenprogramm:	siehe <a href="#">Tabelle 3</a>

**Tab. 3** Gradientenprogramm für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
Initial	80	20
1,0	80	20
7,0	69	31
8,5	69	31
10,0	10	90
13,0	10	90
13,1	80	20
15,0	80	20

## 6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierungsmodus:	Elektrospray-Ionisation, positiv (ESI)
Detektionsmodus:	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM)
Trägergas:	Stickstoff
Ionenspray-Spannung:	5500 V
Quellentemperatur:	550 °C
Eingangsspannung:	10,0 V
Schutzgas:	10,0 Psi (0,69 bar)
Vernebelungsgas:	130 Psi (8,96 bar)
Heizgas:	220 Psi (15,2 bar)
Kollisionsgas:	7,0 Psi (0,48 bar)

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter sind für das für die Methodenentwicklung verwendete System (API 6500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) bestimmt und optimiert worden.

Für 3-OH-B[a]P wurden zwei Massenübergänge ausgewählt. Ein Übergang dient zur Quantifizierung (Quantifier) und der andere zur Bestätigung (Qualifier). Für den ISTD wurde nur ein Massenübergang verwendet. Die ausgewählten Übergänge sind zusammen mit den Retentionszeiten und weiteren MRM-Parametern in [Tabelle 4](#) zusammengefasst. Die angegebenen Retentionszeiten dienen nur als Anhaltspunkt. Der Anwender muss sich von der Trennleistung der von ihm verwendeten LC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der analysierten Substanzen überzeugen.

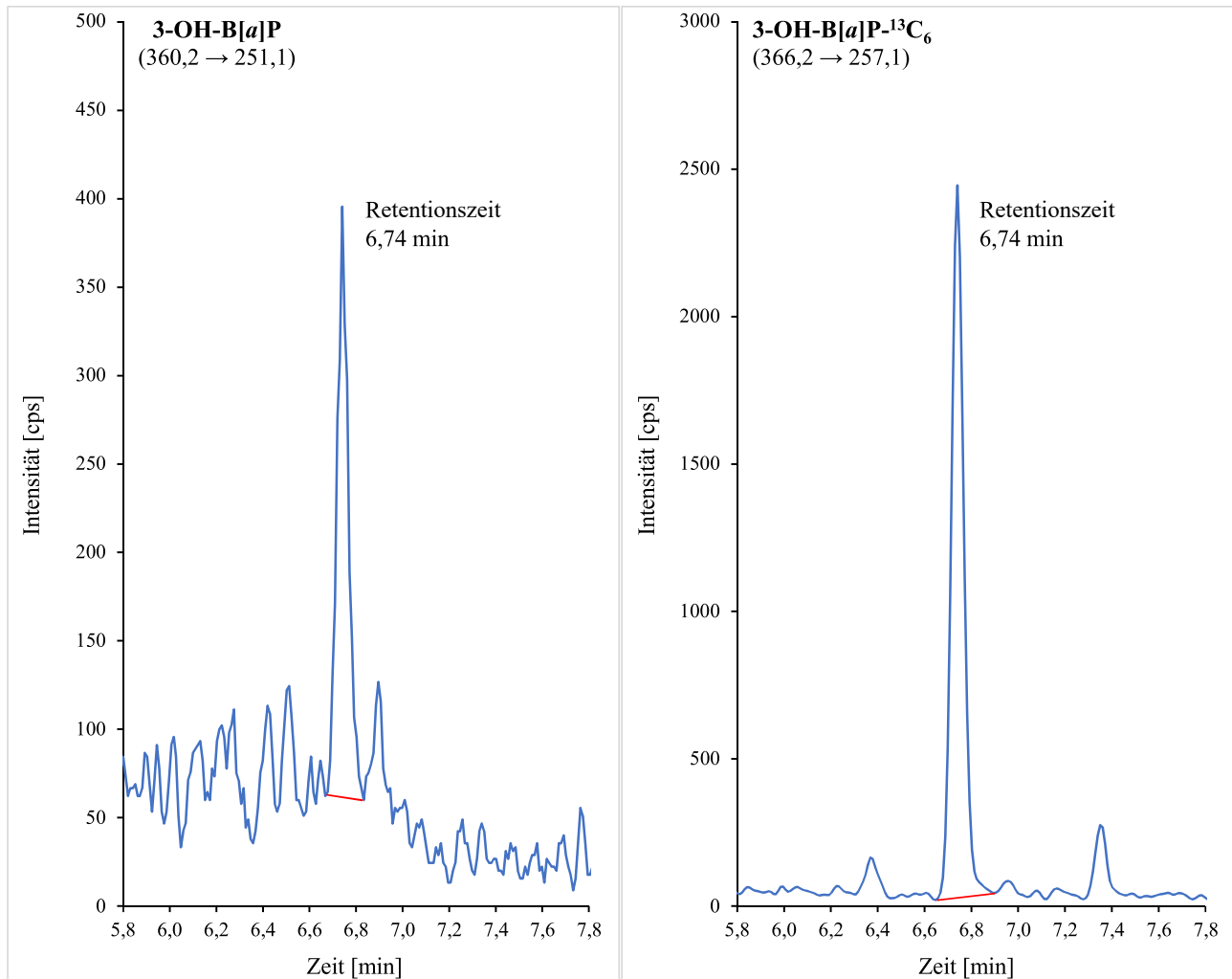
**Tab. 4** Retentionszeiten, Massenübergänge, Dwell time, Declustering-Potential (DP), Kollisionsenergie (CE) und Cell exit-Potential (CXP) für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin

Analyt / ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [m/z]	Status	Dwell time [ms]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
3-OH-B[a]P	6,74	360,2 → 251,1	Quantifier	150	161	45	18
	6,74	360,2 → 267,1	Qualifier	150	161	45	18
3-OH-B[a]P- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> (ISTD)	6,74	366,2 → 257,1	ISTD	150	161	45	18

## 7 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung werden jeweils 15 µl der nach [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeiteten Urinproben in das HPLC-MS/MS-System injiziert und unter den in [Abschnitt 6](#) angegebenen Bedingungen analysiert. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit (RT) und der charakteristischen Ionenübergänge.

[Abbildung 2](#) zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines mit einer Konzentration von 50 pg 3-OH-B[a]P/l dotierten Urins.

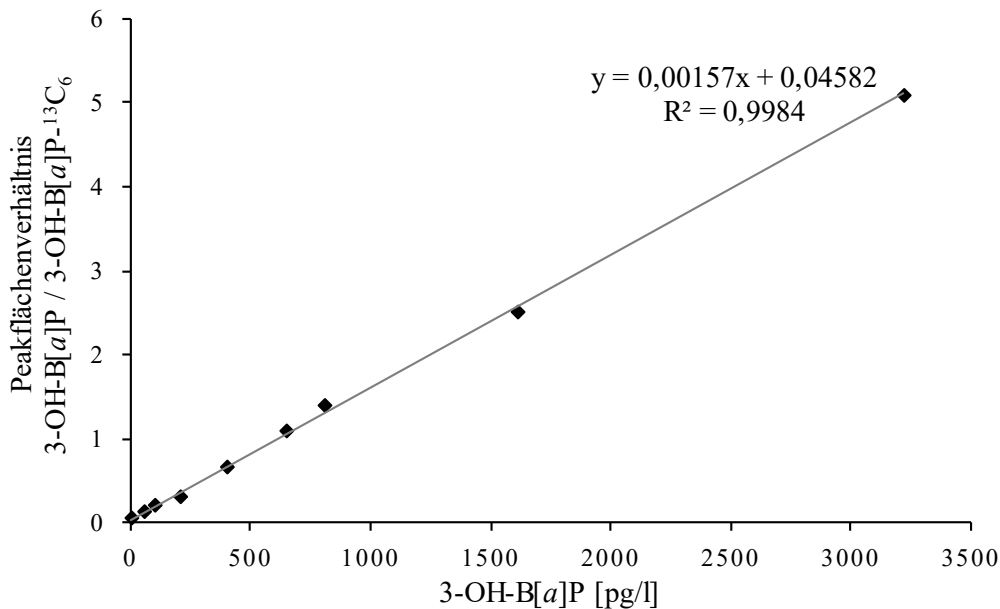


**Abb. 2** Beispielhaftes Chromatogramm eines mit 50 pg 3-OH-B[a]P/l dotierten Urins

## 8 Kalibrierung

Die nach [Abschnitt 4.7](#) hergestellten Kalibrierlösungen werden wie die Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und entsprechend den in [Abschnitt 6](#) beschriebenen Arbeitsbedingungen analysiert. Die Peakfläche des Analyten 3-OH-B[a]P wird auf die Peakfläche des ISTDs 3-OH-B[a]P-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> bezogen. Die so erhaltenen Quotienten werden gegen die dotierten Konzentrationen der dazugehörigen Kalibrierstandards aufgetragen. Die Kalibriergerade für 3-OH-B[a]P

verläuft im Konzentrationsbereich von 50–3221 pg/l linear (siehe [Abbildung 3](#)). Bei der Vermessung von Realproben muss der Kalibrierbereich gegebenenfalls an die erwarteten Konzentrationen angepasst werden.



**Abb. 3** Kalibriergerade für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin unter Verwendung von 3-OH-B[a]P-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> als ISTD

## 9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Steigung der Kalibriergeraden wird mittels linearer Regression berechnet und für die Quantifizierung herangezogen. Der Achsenabschnitt der Kalibriergerade entspricht dabei dem im Poolurin vorliegenden Hintergrund und wird bei der Kalkulation nicht berücksichtigt.

Sollte das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereichs liegen, wird die Urinprobe 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 Qualitätssicherung wurden in jeder Analysenserie Qualitätskontrollproben parallel zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Das Kontrollmaterial wird durch Dotierung von Poolurin mit drei Konzentrationen von 3-OH-B[a]P-Gluc hergestellt, aliquotiert und bei –20 °C gelagert. Die dotierten Konzentrationen sollten dabei im zu erwartenden Konzentrationsbereich liegen. Die Methodenentwickler haben in jeder Analysenserie jeweils zwei Proben der drei Qualitätskontrollmaterialien mitlaufen lassen.

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

## 11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

### 11.1 Präzision

#### Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde Poolurin mit 200 pg oder 640 pg 3-OH-B[a]P/l Urin dotiert, fünf-fach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die aus den Messergebnissen berechneten Präzisionsdaten sind [Tabelle 5](#) zu entnehmen.

**Tab. 5** Präzision in der Serie für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [pg/l]	Gemessene Konzentration [pg/l]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
3-OH-B[a]P	200	203,6	10,4	28,9
	640	592,8	4,3	11,9

#### Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde ebenfalls unter Verwendung der mit 200 pg oder 640 pg 3-OH-B[a]P/l dotierten Poolurinproben bestimmt. Aliquote dieser dotierten Poolurine wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und an sechs Tagen (innerhalb von 11 Tagen) aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Präzisionsdaten sind in [Tabelle 6](#) dargestellt.

**Tab. 6** Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [pg/l]	Gemessene Konzentration [pg/l]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
3-OH-B[a]P	200	202,5	10,1	26,0
	640	530,9	13,7	35,2

### 11.2 Richtigkeit

Die mittlere relative Wiederfindung der Methode wurde aus den Daten der Präzision in der Serie berechnet. Die so ermittelten Wiederfindungen sind in [Tabelle 7](#) zusammengefasst.

**Tab. 7** Relative Wiederfindung für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [pg/l]	Wiederfindung (rel.) $r$ [%]	Streubereich $u$ [%]
3-OH-B[a]P	200	102	94,6–121
	640	92,6	88,0–97,3

### 11.3 Absolute Wiederfindung

Die durch die Aufarbeitung bedingten Analytverluste wurden durch Bestimmung der absoluten Wiederfindung bei zwei Konzentrationen quantifiziert. Dafür wurde zum einen Poolurin mit 200 pg oder 640 pg freiem Analyten (3-OH-B[a]P) pro Liter dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Zum anderen wurde Poolurin nach vollständiger



Aufarbeitung mit 200 pg oder 640 pg freiem Analyten (3-OH-B[a]P) pro Liter dotiert und analysiert. Die absoluten Wiederfindungen wurden durch den Vergleich der jeweiligen Peakflächen berechnet (siehe [Tabelle 8](#)).

**Tab. 8** Absolute Wiederfindung für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [pg/l]	Referenz-peakfläche	Mittlere gemessene Peakfläche	Wiederfindung (abs.) [%]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
3-OH-B[a]P	200	2777	3368	121	11,7	30,1
	640	7487	8152	109	1,6	4,2

## 11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze für 3-OH-B[a]P in Urin ist 50 pg/l bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 12:1. Die Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze wurde unter Verwendung analytfreier Urine von sechs Probanden überprüft. Die Urinproben wurden jeweils mit 100 pg 3-OH-B[a]P-Gluc/l dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die Richtigkeit der Einzelwerte lag zwischen 96,2 % und 116,2 % und der Mittelwert der gefundenen Konzentration (106 pg/l) variierte mit 6,6 %.

Die Nachweisgrenze wurde als 1/3 der Bestimmungsgrenze definiert und lag somit bei 16,7 pg/l Urin. [Tabelle 9](#) zeigt die ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin.

**Tab. 9** Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [pg/l]	Bestimmungsgrenze [pg/l]
3-OH-B[a]P	16,7	50

## 11.5 Störeinflüsse

Störungen können aufgrund der von Probe zu Probe unterschiedlichen Matrix auftreten und vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich die Quantifizierung des 3-OH-B[a]P erschweren. Die korrekte Signalzuordnung ist jedoch durch den 3-OH-B[a]P-Qualifier gewährleistet.

Bei der Methodenprüfung ergaben sich verschiedene Herausforderungen. So fanden sich – bei ansonsten sehr guten Validierungsdaten – aufarbeitungsbedingte Verluste, die zwischen 1 % und 70 % lagen. Da die Prüfer der Methode mit einem nicht-glucuronidierten, deuterierten ISTD gearbeitet und während der Probenaufarbeitung keine Ascorbinsäure zugesetzt haben, dürfte es sich bei den aufarbeitungsbedingten Verlusten sowohl um Verluste durch Oxidation als auch um Verluste an der Festphasensäule gehandelt haben. Zudem waren bei einer der Analysenserien die Signalintensitäten infolge Ionensuppression gering; hier stellte sich eine schlechte Charge Acetonitril als Ursache heraus.

Anwendern der Methode wird daher empfohlen, das 3-OH-B[a]P-Gluc-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> als ISTD zu verwenden, die Anweisungen der Probenaufbereitung genau zu befolgen (Ascorbinsäurezusatz, einzelne Schritte der SPE) und auf die Reinheit der Reagenzien zu achten.

Von den Prüfern der Methode wurde neben der Acquity UPLC C18-Säule (1,7 µm × 2,1 mm × 100 mm mit 0,2 µm Vorfilter, Waters GmbH, Eschborn) eine Kinetex Biphenyl-Säule (2,6 µm Biphenyl 100 Å, 2,1 mm × 100 mm, Nr. 00D-4622-AN, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg) getestet. Mit beiden Trennsäulen waren Analyt und ISTD gut detektierbar und die Kalibriergeraden verliefen linear. Mit der Biphenylphase ergab sich allerdings eine stabilere, weniger verrauschte Basislinie bei gleichzeitig höheren Signalintensitäten.

## 12 Diskussion der Methode

Die hier vorgestellte Methode basiert auf der Analyse des renal ausgeschiedenen und enzymatisch aus seinem Glucuronid freigesetzten 3-OH-B[a]P. Im Anschluss an die Aufreinigung und Anreicherung mittels SPE wird das 3-OH-B[a]P derivatisiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Der Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidans wirkt dem oxidativen Abbau des bei der Konjugatspaltung freigesetzten 3-OH-B[a]P entgegen und verbessert so die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode. Auch der ISTD 3-OH-B[a]P-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> wird als Glucuronid eingesetzt, um eine stabile Kalibrierung zu gewährleisten.

Bislang sind nur wenige analytische Verfahren publiziert, die die notwendige Bestimmungsgrenze für niedrige, umweltrelevante B[a]P-Expositionen erreichen. Die Arbeitsgruppe von Simon et al. (2000) erreichte mittels HPLC-Fluoreszenz-Detektion unter Anwendung einer automatisierten Säulenschaltung eine Bestimmungsgrenze von 100 pg/l (siehe [Tabelle 1](#)), womit eine Differenzierung von Rauchern und Nichtrauchern möglich war. [Tabelle 10](#) zeigt weitere Methoden sowie Daten zur Hintergrundbelastung beruflich nicht exponierter Personen. Barbeau et al. (2011, 2014) publizierten eine ebenfalls sehr aufwändige Analysenmethode unter Kombination chromatographischer Trennverfahren und nachfolgender Fluoreszenzdetektion. Auf diesem Wege konnte eine Bestimmungsgrenze von 50 pg/l Humanurin erreicht werden. Yao et al. (2014) sowie Raponi et al. (2017) arbeiteten mit LC-MS/MS (mit und ohne Derivatisierung des 3-OH-B[a]P) und ermittelten Bestimmungsgrenzen von 250 pg/l bzw. 390 pg/l, die für den arbeitsmedizinischen Bereich ausreichend sind.

Aus den Ergebnissen in [Tabelle 10](#) kann geschlossen werden, dass zur Erfassung einer nicht-beruflichen Belastung mit B[a]P (vor allem durch Rauchen, Nahrung und Umgebungsluft) eine Bestimmungsgrenze von mindestens 0,1 ng 3-OH-B[a]P/l Urin notwendig ist, besser noch von < 0,05 ng/l. Für die Erfassung der beruflichen Belastung ist nach den vorliegenden Kenntnissen eine Bestimmungsgrenze von 0,2–0,5 ng/l ausreichend. Die zum Teil berichteten 3-OH-B[a]P-Konzentrationen von > 1 ng/l Urin bei beruflich nicht-exponierten Personen (Ariese et al. 1994; Fan et al. 2006; Luo et al. 2015; Raponi et al. 2017; Zhang et al. 2015) müssen nach heutigem Kenntnisstand als methodische Artefakte gewertet werden.

Mit einer Bestimmungsgrenze von 50 pg 3-OH-B[a]P pro Liter Urin ist die hier vorgestellte Methode extrem sensitiv, so dass 3-OH-B[a]P in 50–60 % der Urinproben der beruflich nicht-belasteten Allgemeinbevölkerung quantifiziert werden kann. Um diese niedrige Bestimmungsgrenze zu erreichen, muss das verwendete Messgerät in einem sehr guten Zustand sein. So müssen die Ionisierungskammer und die Säule sauber sein, gegebenenfalls muss auch das Q1-System des MS/MS gewartet werden. Methodisch war hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit vor allem die Wahl des richtigen Derivatisierungsreagenzes relevant, da die Derivatisierung allein den Zweck verfolgt, den Response des Detektors und damit die Sensitivität zu erhöhen.

Eine weitere Absenkung der Bestimmungsgrenze auf 5 pg/l Urin wäre notwendig, um auch sehr niedrige Hintergrundgehalte in der Allgemeinbevölkerung zu erfassen. Die Entwickler der Methode haben in diesem Zusammenhang unter anderem die Verwendung größerer Urinvolumina getestet, was sich allerdings als nicht zielführend erwies, da sich gleichzeitig auch der Hintergrund erhöhte.

Die hier dargestellte Methode ermöglicht die sensitive und valide Erfassung von 3-OH-B[a]P-Gehalten in Urin. Bei einer beruflichen Exposition gegen B[a]P ist eine Abschätzung und Bewertung der Exposition, z. B. im Rahmen der arbeitsmedizinischen Vorsorge, unter Zuhilfenahme der von der Kommission aufgestellten EKA (DFG 2023) möglich. Die vorliegende Analysenmethode und die entsprechenden EKA schaffen zusammen die wissenschaftlich basierte Voraussetzung für die Erfassung und Bewertung einer B[a]P-Exposition zum Schutz beruflich gegen kanzerogene PAH-Gemische exponierter Personen.

**Verwendete Messgeräte** HPLC-MS/MS-System mit automatischem Probengeber (Agilent 1200, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) sowie einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (API 6500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) mit Datenverarbeitungssystem (Analyst 1.5.2, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt), HPLC-Trennsäule (Acquity UPLC BEH C18-Säule, 1,7 µm × 2,1 mm × 50 mm, Nr. 186002350, Waters GmbH, Eschborn)

**Tab. 10** Publiizierte analytische Methoden für die Bestimmung von 3-OH-B[a]P in Urin und deren Anwendung bei beruflich nicht-exponierten Personen

Studienkollektiv: Land, Geschlecht (Personenanzahl, Raucherstatus)	Methode	NWG	BG	3-OH-B[a]P		Literatur
				Mittelwert $\pm$ SD	Bereich	
Frankreich, ♂ (27 R, 9 < NWG)	Automatisierte Säulenschaltung zur Reinigung / Anreicherung, HPLC-FD	0,1 ng/l	0,4 ng/l	0,030 nmol/mol Krea <sup>a)</sup> (0,100 ng/l)	< 0,01–0,084 nmol/mol Krea (< 0,033–0,279 ng/l)	Lafontaine et al. 2006
Frankreich, ♂ (27 NR, 22 < NWG)				0,014 nmol/mol Krea <sup>a)</sup> (0,046 ng/l)	< 0,01–0,045 nmol/mol Krea (< 0,033–0,149 ng/l)	
USA, ♂/♀ (30 R, im Untersuchungszeitraum max. 30 Zigaretten/d)				0,155 $\pm$ 0,091 ng/24 h	–	
USA, ♂/♀ (59 R, Zigarettenkonsum im Untersuchungszeitraum halbiert, Snus <i>ad libitum</i> )	Derivatisierung (FMPT), LC-MS/MS	n. a.	0,05 ng/l	0,078 $\pm$ 0,045 ng/24 h	–	Sarkar et al. 2010
USA, ♂/♀ (15 R, im Untersuchungszeitraum Snus <i>ad libitum</i> )				0,079 $\pm$ 0,051 ng/24 h	–	
USA, ♂/♀ (11 R, im Untersuchungszeitraum kein Tabakkonsum)				0,056 $\pm$ 0,022 ng/24 h	–	
Frankreich, ♂/♀ (25 NR, 224 der 284 Messungen < NWG)	HPLC-FD	0,08 ng/l	0,25 ng/l	< NWG <sup>b)</sup>	< NWG–0,095 nmol/mol Krea (< NWG–0,270 ng/l)	Leroy et al. 2010
Frankreich, ♂ (13 R, 1 < NWG)				0,029 $\pm$ 0,024 nmol/mol Krea (0,096 $\pm$ 0,080 ng/l)	< NWG–0,075 nmol/mol Krea (< NWG–0,249 ng/l)	Barbeau et al. 2011
Frankreich, ♂ (23 NR, 18 < NWG)	Säulenschaltung mit „Heart-cut“, HPLC-FD	0,02 ng/l	0,05 ng/l	0,010 $\pm$ 0,005 nmol/mol Krea (0,033 $\pm$ 0,017 ng/l)	< NWG–0,023 nmol/mol Krea (< NWG–0,076 ng/l)	
China, ♂ (4 R)	Derivatisierung (Dansylchlorid), LC-MS/MS	0,1 ng/l	0,25 ng/l	0,45 ng/l	0,32–0,67 ng/l	Yao et al. 2014
China, ♂/♀ (4 NR, 1 < NWG)				0,25 ng/l <sup>b)</sup>	< NWG–0,35 ng/l	
China (7, 2 < NWG)	Derivatisierung (Dansylchlorid), UPLC-MS/MS	0,1 ng/l	0,3 ng/l	1,35 ng/l <sup>b)</sup>	< NWG–2,30 ng/l	Luo et al. 2015
China, ♂ (81 R, 195 der 243 Messungen < NWG)				6 $\pm$ 3 ng/l	–	Zhang et al. 2015
China, ♂ (58 NR, 56 < NWG)	LC-MS/MS	n. a.	2 ng/l	2 $\pm$ 0,2 ng/l	–	
Italien (200)				0,03 $\pm$ 0,05 nmol/l (8,05 $\pm$ 13,4 ng/l)	< BG–0,39 nmol/l (< BG–105 ng/l)	
Italien (39 R)				0,04 $\pm$ 0,07 nmol/l (10,7 $\pm$ 18,8 ng/l)	< BG–0,39 nmol/l (< BG–105 ng/l)	Raponi et al. 2017
Italien (97 NR)	HPLC-MS/MS	0,13 ng/l	0,39 ng/l	0,03 $\pm$ 0,04 nmol/l (8,05 $\pm$ 10,7 ng/l)	< BG–0,296 nmol/l (< BG–79,4 ng/l)	
Italien (64 Ex-R)				0,03 $\pm$ 0,04 nmol/l (8,05 $\pm$ 10,7 ng/l)	< BG–0,19 nmol/l (< BG–51,0 ng/l)	
Italien, ♂/♀ (269 R)				< NWG <sup>b)</sup>	< NWG–24 ng/l <sup>c)</sup>	Tombolini et al. 2018
Italien, ♂/♀ (747 NR)	HPLC-MS/MS	0,07 ng/g Krea (0,2 ng/l)	n. a.	< NWG <sup>b)</sup>	< NWG–32 ng/l <sup>c)</sup>	

Tab. 10 (Fortsetzung)

Studienkollektiv: Land, Geschlecht (Personenanzahl, Raucherstatus)	Methode	NWG	BG	3-OH-B[a]P		Literatur
				Mittelwert ± SD	Bereich	
Deutschland, ♂/♀ (242 R/NR/ex-R, 155 < NWG)	Glucuronide als Standards,			0,081 ng/l	–	
Deutschland, ♂/♀ (45 R, 27 < NWG)	Derivatisierung mit FMPT, HPLC-MS/MS	0,017 ng/l	0,05 ng/l	0,059 ± 0,069 ng/l	–	Rögner et al. 2021
Deutschland, ♂/♀ (42 ex-R, 42 < NWG)				< NWG	–	
Deutschland, ♂/♀ (37 NR, 37 < NWG)				< NWG	–	

BG: Bestimmungsgrenze; Ex-R: Ehemalige Raucher; FMPT: 2-Fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluolsulfonat; HPLC-FD: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion; HPLC-MS/MS: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie; Krea: Kreatinin; LC-MS/MS: Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie; n. a.: nicht angegeben; NR: Nichtraucher; NWG: Nachweispiegel; R: Raucher; SD: Standardabweichung; UPLC-MS/MS: Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie

<sup>a)</sup> Werte < NWG wurden als NWG/2 in die Berechnung einbezogen.

<sup>b)</sup> Median

<sup>c)</sup> 5.-95. Perzentil

## Anmerkungen

### Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten ([www.dfg.de/mak/interessenkonflikte](http://www.dfg.de/mak/interessenkonflikte)) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

## Literatur

- Alhamdow A, Lindh C, Albin M, Gustavsson P, Tinnerberg H, Broberg K (2017) Early markers of cardiovascular disease are associated with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Rep* 7(1): 9426. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09956-x>
- Ariese F, Verkaik M, Hoornweg GP, Van De Nesse RJ, Jukema-Leenstra SR, Hofstraat JW, Gooijer C, Velthorst NH (1994) Trace analysis of 3-hydroxy benzo[a]pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Anal Toxicol* 18(4): 195–204. <https://doi.org/10.1093/jat/18.4.195>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1995) Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta, GA: ATSDR. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>, abgerufen am 10 Okt 2023
- 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. Band 2: Analysen in biologischem Material. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bader M, Jäger T, Drexler H, Hartwig A, MAK Commission (2020) Kreatinin als Bezugsgröße für Stoffkonzentrationen im Urin – Addendum zur Konversion von volumen- bzw. kreatininbezogenen Analyseergebnissen. Beurteilungswerte in biologischem Material. *MAK Collect Occup Health Saf* 5(4): Doc085. [https://doi.org/10.34865/bbgeneralldgt5\\_4ad](https://doi.org/10.34865/bbgeneralldgt5_4ad)
- Barbeau D, Maitre A, Marques M (2011) Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst* 136(6): 1183–1191. <https://doi.org/10.1039/c0an00428f>
- Barbeau D, Persoons R, Marques M, Hervé C, Laffitte-Rigaud G, Maitre A (2014) Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. *Ann Occup Hyg* 58(5): 579–590. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meu004>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111(38): A1583–A1618
- Buratti M, Campo L, Fustinoni S, Cirila PE, Martinotti I, Cavallo D, Foa V (2007) Urinary hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons as biomarkers of exposure in asphalt workers. *Biomarkers* 12(3): 221–239. <https://doi.org/10.1080/13547500601100110>
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Hrsg (2023) MAK- und BAT-Werte-Liste 2023. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 59. Düsseldorf: German Medical Science. [https://doi.org/10.34865/mbwl\\_2023\\_deu](https://doi.org/10.34865/mbwl_2023_deu)
- Fan R, Dong Y, Zhang W, Wang Y, Yu Z, Sheng G, Fu J (2006) Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 836(1–2): 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.044>
- Förster K, Preuss R, Roßbach B, Brüning T, Angerer J, Simon P (2008) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup Environ Med* 65(4): 224–229. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.030809>
- Fustinoni S, Campo L, Cirila PE, Martinotti I, Buratti M, Longhi O, Foà V, Bertazzi P (2010) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt workers. *Occup Environ Med* 67(7): 456–463. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.050344>
- Gaudreau É, Bérubé R, Bienvenu J-F, Fleury N (2016) Stability issues in the determination of 19 urinary (free and conjugated) monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem* 408(15): 4021–4033. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9491-2>
- Greim H, Hrsg (2001) Benzo[a]pyren. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 32. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb5032pyrd0032>
- Greim H, Hrsg (2008) Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. 45. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb0223orgd0045>
- Gündel J, Angerer J (2000) High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenzo[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 738(1): 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00499-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00499-5)

- Gündel J, Schaller KH, Angerer J (2000) Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenzo(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Int Arch Occup Environ Health* 73(4): 270–274. <https://doi.org/10.1007/s004200050427>
- Henschler D, Hrsg (1984) Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, krebserzeugende (PAH). In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten*. 10. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb0pahsd0010>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2010) Benzo[a]pyrene. In: *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Band 92. Lyon: IARC. S. 394–423. [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/2841/a076b09df49aeb8c7922378fe4f372fda3edd13.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/2841/a076b09df49aeb8c7922378fe4f372fda3edd13.pdf), abgerufen am 27 Jun 2023
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2012) Benzo[a]pyrene. In: *A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Band 100F. Lyon: IARC. S. 111–144. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk304416/pdf/bookshelf\\_nbk304416.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk304416/pdf/bookshelf_nbk304416.pdf), abgerufen am 27 Jun 2023
- IFA (Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) (2023) Benzo(a)pyren. GESTIS-Stoffdatenbank. <https://gestis.dguv.de/data?name=022500>, abgerufen am 13 Sep 2023
- Klotz K (2013) Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). In: Drexler H, Hartwig A, Hrsg. *Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), Biologische Leitwerte (BLW) und Biologische Arbeitsstoff-Referenzwerte (BAR)*. 20. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 1–29. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bb5032d0020>
- Lafontaine M, Gendre C, Delsaut P, Simon P (2004) Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. *Polycycl Aromat Compd* 24(4–5): 441–450. <https://doi.org/10.1080/10406630490471447>
- Lafontaine M, Champmartin C, Simon P, Delsaut P, Funck-Brentano C (2006) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicol Lett* 162(2–3): 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.019>
- Leroyer A, Jeandel F, Maitre A, Howsam M, Deplanque D, Mazzuca M, Nisse C (2010) 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *Sci Total Environ* 408(5): 1166–1173. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.073>
- Luo K, Gao Q, Hu J (2015) Derivatization method for sensitive determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene in human urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1379: 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.043>
- Marquardt H, Schäfer S, Hrsg (2004) *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Nikolaou K, Masclet P, Mouvier G (1984) Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere – a critical review. *Sci Total Environ* 32(2): 103–132. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(84\)90125-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(84)90125-6)
- Raponi F, Bauleo L, Ancona C, Forastiere F, Paci E, Pignini D, Tranfo G (2017) Quantification of 1-hydroxypyrene, 1- and 2-hydroxynaphthalene, 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 6-hydroxynitropyrene by HPLC-MS/MS in human urine as exposure biomarkers for environmental and occupational surveys. *Biomarkers* 22(6): 575–583. <https://doi.org/10.1080/1354750x.2016.1252959>
- Rögner N, Hagedorn H-W, Scherer G, Scherer M, Pluym N (2021) A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of 3-hydroxybenzo[a]pyrene in urine-exposure assessment in smokers and users of potentially reduced-risk products. *Separations* 8(10): 171. <https://doi.org/10.3390/separations8100171>
- Sarkar M, Liu J, Koval T, Wang J, Feng S, Serafin R, Jin Y, Xie Y, Newland K, Roethig HJ (2010) Evaluation of biomarkers of exposure in adult cigarette smokers using Marlboro Snus. *Nicotine Tob Res* 12(2): 105–116. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntp183>
- Simon P, Lafontaine M, Delsaut P, Morele Y, Nicot T (2000) Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 748(2): 337–348. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00350-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00350-9)
- Simpson CD, Wu MT, Christiani DC, Santella RM, Carmella SG, Hecht SS (2000) Determination of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 13(4): 271–280. <https://doi.org/10.1021/tx990202c>
- Strickland P, Kang D, Sithisarakul P (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environ Health Perspect* 104(Suppl 5): 927–932. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s5927>
- Tombolini F, Pignini D, Tranfo G, Paci E, Carosi I, Marini F, Bauleo L, Ancona C, Forastiere F (2018) Levels of urinary metabolites of four PAHs and cotinine determined in 1016 volunteers living in Central Italy. *Environ Sci Pollut Res Int* 25(29): 28772–28779. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1650-x>
- Yao L, Yang J, Liu B, Zheng S, Wang W, Zhu X, Qian X (2014) Development of a sensitive method for the quantification of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by solid phase extraction, dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Anal Methods* 6(16): 6488–6493. <https://doi.org/10.1039/c4ay00867g>
- Zhang X, Hou H, Xiong W, Hu Q (2015) Development of a method to detect three monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *J Anal Methods Chem* 2015: 514320. <https://doi.org/10.1155/2015/514320>