The MAK Collection for Occupational Health and Safety

GMS PUBLISSO ZB MED-Publikationsportal Lebenswissenschaften

Di(isononyl)cyclohexan-1,2-dicarboxylat (DINCH) – Bestimmung von DINCH-Metaboliten in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

H. M. Koch[1]
A. Schütze[1]
W. Völkel[2]
M. Wöckner[2]

1 *Autor der Methode, Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr Universität Bochum (IPA), Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum*

2 *Prüfer der Methode, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Pfarrstraße 3, 80538 München*

Korrespondenz an: MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Keywords

Di(isononyl)cyclohexan-1,2-dicarboxylat; DINCH; MINCH; OH-MINCH; cx-MINCH; oxo-MINCH; Weichmacher; Biomonitoring; Urin; LC-MS/MS

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. The method described herein allows for the determination of cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monocarboxyisooctyl ester (cx-MINCH), cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monohydroxyisononyl ester (OH-MINCH), cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monooxoisononyl ester (oxo-MINCH), and cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monoisononyl ester (MINCH) as specific metabolites of diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine. For the determination, urine samples buffered to pH 6.0 are mixed with deuterated internal standards (ISTDs), enzymatically hydrolysed, and then subjected to online preconcentration. By way of automatic column-switching, the analytes are then transferred onto the analytical column in back-flush mode, where they are chromatographically separated and, following negative ionisation, quantified by tandem mass spectrometry. Calibration is carried out using calibration standards prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed.

Citation Note:
Koch HM, Schütze A, Völkel W, Wöckner M. Di(isononyl)-cyclohexan-1,2-dicarboxylat (DINCH) – Bestimmung von DINCH-Metaboliten in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Dez:Doc902. https://doi.org/10.34865/bi16641278doj23_1or

Manuskript abgeschlossen:
11 Apr 2013

Publikationsdatum:
20 Dez 2023

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

1 Kenndaten der Methode

Matrix Urin

Analytisches Messprinzip Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Diisononylcyclohexan-1,2-dicarboxylat (DINCH)	166412-78-8	Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonocarboxyisooctyl-ester (cx-MINCH)	1637562-51-6
		Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonohydroxyisononyl-ester (OH-MINCH)	1637562-52-7
		Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonooxoisononylester (oxo-MINCH)	1588520-62-0
		Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonoisononylester (MINCH)	1889286-78-5

Zuverlässigkeitskriterien

Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonocarboxyisooctylester (cx-MINCH)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 2,76 µg oder 12,7 µg cx-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 6,79 % bzw. 1,95 % u = 16,1 % bzw. 4,61 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 3,07 µg oder 14,0 µg cx-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 9,92 % bzw. 3,67 % u = 23,5 % bzw. 15,8 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer Konzentration von 1,94 µg oder 9,7 µg cx-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	r = 97,9 % bzw. 97,4 %
Nachweisgrenze:	0,025 µg cx-MINCH pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,05 µg cx-MINCH pro Liter Urin	

Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonohydroxyisononylester (OH-MINCH)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 8,29 µg oder 46,0 µg OH-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 7,1 % bzw. 2,67 % u = 16,8 % bzw. 6,31 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 9,49 µg oder 45,6 µg OH-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 6,56 % bzw. 3,63 % u = 15,5 % bzw. 8,58 %

Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer Konzentration von 2,22 µg oder 11,1 µg OH-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	r = 93,3 % bzw. 95 %
Nachweisgrenze:	0,025 µg OH-MINCH pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,05 µg OH-MINCH pro Liter Urin	

Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonooxoisononylester (oxo-MINCH)[a)]

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 1,13 µg oder 12,2 µg oxo-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 1,43 % bzw. 1,84 % u = 3,39 % bzw. 4,36 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 1,02 µg oder 11,6 µg oxo-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 15,0 % bzw. 8,94 % u = 35,5 % bzw. 21,1 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer Konzentration von 1 µg oder 10 µg oxo-MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	r = 91,7 % bzw. 99,7 %
Nachweisgrenze:	0,05 µg oxo-MINCH pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,1 µg oxo-MINCH pro Liter Urin	

[a)] Die Validierungsdaten für die Bestimmung von oxo-MINCH in Urin wurden von den Prüfern der Methode erhoben.

Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremonoisononylester (MINCH)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 1,47 µg oder 6,6 µg MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 10,7 % bzw. 3,51 % u = 25,2 % bzw. 8,30 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 1,49 µg oder 6,52 µg MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	s_w = 15,1 % bzw. 9,22 % u = 35,8 % bzw. 21,8 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer Konzentration von 2,01 µg oder 10,0 µg MINCH pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	r = 95 % bzw. 90,1 %
Nachweisgrenze:	0,05 µg MINCH pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,1 µg MINCH pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu DINCH

Di(isononyl)cyclohexan-1,2-dicarboxylat (Hexamoll® DINCH, im Folgenden als DINCH bezeichnet) ist ein Weichmacher, der als Ersatzstoff für die als reproduktionstoxisch eingestuften langkettigen Phthalate, wie Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und Di(isononyl)phthalat (DINP), entwickelt wurde (Crespo et al. 2007).

DINCH wird durch katalytische Hydrierung des aromatischen Ringsystems von DINP hergestellt, wodurch ein nicht-planarer Cyclohexanrest entsteht. Die Produktion von DINCH erfolgt derzeit allein durch katalytische Hydrierung

von DINP2, das exakt neun Kohlenstoffatome in der Alkylseitenkette enthält. Durch die Hydrierung wird sowohl eine *cis*- als auch eine *trans*-Konfiguration möglich, wobei DINCH zu 90 ± 10 % aus *cis*- und zu 10 ± 10 % aus *trans*-Isomeren besteht (NICNAS 2012).

DINCH wird von BASF SE produziert und ist seit 2002 auf dem Markt. Es ist beispielsweise für die Verwendung in Medizinprodukten, Lebensmittelkontaktmaterialien oder Spielzeug zugelassen (NICNAS 2012). Von der MAK-Kommission (Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft) liegen derzeit keine Begründungen eines MAK- oder BAT-Werts zu DINCH vor. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) legte die tolerierbare tägliche Aufnahme (*Tolerable Daily Intake*, TDI) auf 1 mg/kg Körpergewicht/Tag fest. DINCH kann von Lebensmitteln mit hohem Fettanteil aus dem Verpackungsmaterial herausgelöst und so oral aufgenommen werden (EFSA 2006). Für die Allgemeinbevölkerung ist die Aufnahme über verpackte Lebensmittel der Hauptexpositionsweg (etwa 90 %). Daneben spielt die Aufnahme von belastetem Staub eine Rolle (Giovanoulis et al. 2018). Des Weiteren ist eine intravenöse Aufnahme der Substanz durch Infusionen oder Transfusionen möglich, da DINCH aus Medizinprodukten migrieren kann (Malarvannan et al. 2019). Kinder sind durch in den Mund genommenes Spielzeug oder eine erhöhte Staubaufnahme zusätzlich gegen DINCH exponiert (Weiss et al. 2018).

Nach der Aufnahme wird DINCH rasch metabolisiert. Silva et al. (2012) wiesen insgesamt 15 Metaboliten (ohne Berücksichtigung von Stereoisomeren) im Urin von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nach. Als Hauptmetabolit wurde Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure (CHDA) identifiziert. CHDA ist das Grundgerüst von DINCH, jedoch auch von anderen Substanzen, die ebenfalls als Weichmacher eingesetzt werden (z. B. Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuredi(2-ethylhexyl)-ester). Daher können gemessene CHDA-Gehalte im menschlichen Urin nicht spezifisch auf eine DINCH-Exposition zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu CHDA sind die oxidierten Metaboliten von DINCH spezifisch und somit als Biomarker geeignet. Der Metabolismus besteht im Wesentlichen aus einem ersten Hydrolyseschritt, durch den der Monoester MINCH entsteht. MINCH wird anschließend oxidiert, wodurch OH-MINCH und cx-MINCH gebildet werden. In einem nächsten Schritt erfolgt die Oxidation von OH-MINCH zu oxo-MINCH. Des Weiteren entstehen auch am Ring hydroxylierte Monoester und andere Abbauprodukte, wie carboxylierte Metaboliten mit verkürzten Alkylseitenketten (Schütze et al. 2017). Ein vereinfachtes Metabolismusschema von DINCH ist in Abbildung 1 dargestellt.

In einer Humanstudie wurden nach einmaliger oraler Gabe die Oxidationsprodukte von MINCH als spezifische, über den Urin ausgeschiedene Biomarker identifiziert. Dabei repräsentierte OH-MINCH etwa 10 % der verabreichten Dosis, gefolgt von cx-MINCH und oxo-MINCH (jeweils etwa 2 % der Dosis). MINCH selbst repräsentierte weniger als 1 % der Dosis. Innerhalb von 48 Stunden wurden etwa 40 % der verabreichten Dosis in Form des unspezifischen CHDA und der oxidierten DINCH-Metaboliten über den Urin ausgeschieden. Die sekundär oxidierten Metaboliten wiesen dabei Halbwertszeiten von 10 bis 18 Stunden auf (Koch et al. 2003).

In Bevölkerungsstudien in Deutschland konnten die DINCH-Metaboliten in den Jahren 2009 bis 2017 in immer mehr Proben in immer höheren Konzentrationen nachgewiesen werden (Kasper-Sonnenberg et al. 2019; Schütze et al. 2014). Seit dem Jahr 2013 ließ sich OH-MINCH in allen untersuchten Urinproben in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze quantifizieren. Im Jahr 2017 lagen die Medianwerte für OH-MINCH bei 0,70 µg/l, für oxo-MINCH bei 0,31 µg/l und für cx-MINCH bei 0,21 µg/l.

Die Kommission Human-Biomonitoring (HBM) des Umweltbundesamtes hat im Jahr 2014 HBM-Werte für DINCH abgeleitet. Der HBM-I-Wert (Summe aus OH-MINCH und cx-MINCH) wurde auf 3000 µg/l für Kinder und 4500 µg/l für Erwachsene festgelegt (HBM-Kommission 2014).

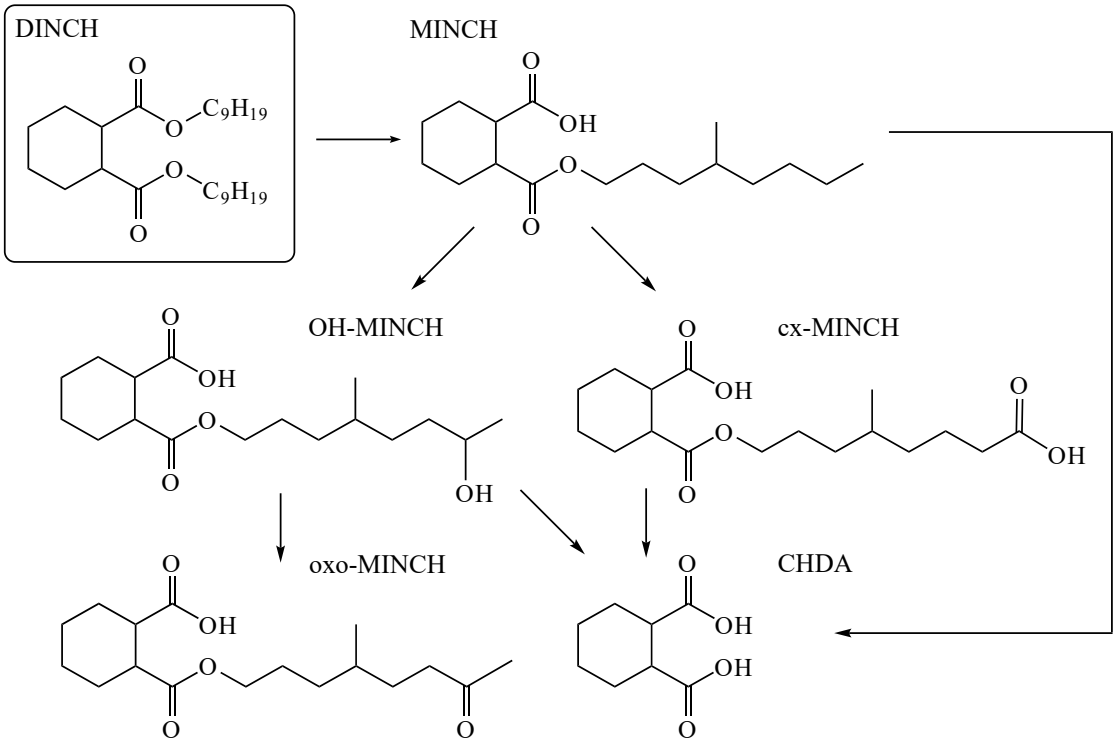


Abb. 1 Vereinfachtes Metabolismusschema von DINCH (nach Koch et al. 2013); die abgebildeten Metaboliten sind lediglich Beispiele möglicher Isomere

3 Grundlage des Verfahrens

Die hier beschriebene Methode erlaubt die Bestimmung von cx-MINCH, OH-MINCH, oxo-MINCH und MINCH als spezifische Metaboliten von DINCH in Urin. Für die Bestimmung werden die auf pH 6,0 gepufferten Urinproben mit deuterierten internen Standards (ISTDs) versetzt und anschließend enzymatisch hydrolysiert. Zur Bestimmung werden die hydrolysierten Proben einer Online-Anreicherung unterzogen. Durch automatische Säulenschaltung werden die Analyten dann im Backflush-Modus auf die analytische Säule überführt, wo sie chromatographisch aufgetrennt und nach negativer Ionisierung mittels Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert werden. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise aufgearbeitet werden wie die zu analysierenden Proben.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- HPLC-Anlage (z. B. Agilent 1200 Serie mit Autosampler G1329A, quaternärer Pumpe G1311A, binärer Pumpe G1312A und Vakuum-Entgaser G1322A bzw. G1379B, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Massenspektrometer (z. B. SCIEX QTRAP® 5500 mit Turbo V™-Ionenquelle, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)

- Anreicherungssäule (z. B. Capcell Pak® C18 MG-II 100 Å, 5 µm, 25 mm × 4 mm, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- Analytische HPLC-Säule (z. B. Atlantis dC18, 100 Å, 3 µm, 150 mm × 2,1 mm, Waters GmbH, Eschborn)
- Zentrifuge (z. B. Megafuge™, Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Wasserbad (z. B. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
- 1,8-ml-Schraubgläschen mit Schraubkappen und PTFE-kaschierten Septen (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- Pasteurpipetten aus Glas (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Verschiedene Bechergläser, Messkolben und Messzylinder (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- pH-Meter mit pH-Elektrode (z. B. CG 842, SCHOTT AG, Mainz)
- Pipetten mit variabel einstellbarem Volumen mit 10-, 100- und 1000-µl-Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 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.

Referenzstandards

- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono(7-carboxy-4-methyl)heptylester (cx-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono(7-hydroxy-4-methyl)octylester (OH-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono(7-oxo-4-methyl)octylester (oxo-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono(4-methyl)octylester (MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

Interne Standards

- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono-D_2-(7-carboxy-4-methyl)heptylester (D_2-cx-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono-D_4-(7-hydroxy-4-methyl)octylester (D_4-OH-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono-D_3-(7-oxo-4-methyl)octylester (D_3-oxo-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Cyclohexan-1,2-dicarbonsäuremono-D_2-(4-methyl)octylester (D_2-MINCH) (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

Sonstige Chemikalien

- Acetonitril LiChrosolv® (z. B. Nr. 100030, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ammoniumacetat EMSURE® ACS (z. B. Nr. 101116, Merck KGaA, Darmstadt)

- Essigsäure (Eisessig) 100 % (z. B. Nr. 100063, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol SupraSolv® (z. B. Nr. 106011, Merck KGaA, Darmstadt)
- *β*-Glucuronidase aus *E. coli* K12 in 50 % Glycerol, 80 U/ml (z. B. Nr. 03708446103, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim)
- Hochreines Wasser (entsprechend ASTM Typ 1)

4.3 Lösungen

- Ammoniumacetatpuffer (1 mol/l, pH 6,0)
  Genau 19,27 g Ammoniumacetat werden in ein Becherglas eingewogen und in etwa 230 ml hochreinem Wasser gelöst. Mittels pH-Meter erfolgt im Anschluss die Einstellung auf pH 6,0 mit Eisessig. Die Lösung wird in einen 250-ml-Messkolben überführt und der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Der Puffer kann im Kühlschrank bei 4 °C acht Wochen gelagert werden.
- Eluent A
  In einem Messzylinder wird 1 l hochreines Wasser mit 500 µl Eisessig versetzt. Vor der Verwendung wird die Lösung gut durchmischt.
- Eluent B
  In einem Messzylinder wird 1 l Acetonitril mit 500 µl Eisessig versetzt. Vor der Verwendung wird die Lösung gut durchmischt.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

- ISTD-Stammlösungen (1000 mg/l)
  Je etwa 10 mg D_2-cx-MINCH, D_4-OH-MINCH, D_3-oxo-MINCH und D_2-MINCH werden in 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Anschließend werden die Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösungen (2 mg/l)
  Je 200 µl der ISTD-Stammlösungen werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die ISTD-Stammlösungen können in Gläschen mit Schraubverschluss und PTFE-kaschiertem Septum bei –20 °C mindestens ein Jahr gelagert werden. Die Dotierlösungen werden ebenfalls bei –20 °C gelagert.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg/l)
  Es werden jeweils etwa 10 mg cx-MINCH, OH-MINCH, oxo-MINCH und MINCH in 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Anschließend werden die Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Dotierlösung I (500 µg/l)
  5 µl der Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung II (10 µg/l)
  200 µl der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Stammlösungen der Analyten können in Gläschen mit Schraubverschluss und PTFE-kaschiertem Septum aliquotiert und bei –20 °C mindestens ein Jahr gelagert werden. Die Dotierlösungen werden ebenfalls bei –20 °C gelagert.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen gemäß dem in Tabelle 1 angegebenen Pipettierschema mit hochreinem Wasser verdünnt. Die Kalibrierstandards werden dann zu je 300 µl in 1,8-ml-Probengläschen mit Schraubverschluss und PTFE-kaschiertem Septum aliquotiert und bei –20 °C eingefroren. Unter diesen Lagerungsbedingungen sind die Standards ohne Analytverluste ein Jahr stabil. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Proben wie unter Abschnitt 5 angegeben.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von DINCH-Metaboliten in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [ml]	Dotierlösung II [ml]	Hochreines Wasser [ml]	Analytkonzentration [µg/l]
1	-	0,2	ad 20	0,1
2	-	0,4		0,2
3	-	1,0		0,5
4	-	4,0		2
5	0,2	-		5
6	0,8	-		20
7	1,6	-		40
8	2,4	-		60

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in 250-ml-Urinbechern gesammelt und bis zur Aufarbeitung bei –20 °C eingefroren. Der so gelagerte Urin ist ohne Analytverluste mindestens ein Jahr haltbar.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinprobe wird bei Raumtemperatur über Nacht aufgetaut. Nachdem die Urinprobe Raumtemperatur erreicht hat, wird sie gut durchmischt. Anschließend werden 300 µl der Urinprobe in ein 1,8-ml-Probengläschen mit Schraubverschluss und PTFE-kaschiertem Septum pipettiert und mit 100 µl Ammoniumacetatpuffer (1 mol/l, pH 6,0) versetzt. Es werden 10 µl ISTD-Dotierlösung und 6 µl β-Glucuronidase, die zuvor 1 : 1 mit dem Ammoniumacetatpuffer verdünnt wurde, hinzugegeben. Die Probe wird gut durchmischt und dann bei 37 °C im Wasserbad zwei Stunden hydrolysiert. Im Anschluss daran wird die Probe wieder gut durchmischt. Die Probe wird mit 10 µl Essigsäure versetzt und dann mindestens drei Stunden eingefroren, wieder aufgetaut und zehn Minuten bei 1900 × g zentrifugiert. Der Überstand wird zur Analyse mittels LC-MS/MS eingesetzt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

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

6.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Anreicherungssäule:	Material:	Octadecylsilan-Phase
	Länge:	25 mm
	Innendurchmesser:	4 mm
	Säulenfüllung:	Capcell Pak® C18 MG-II 100 Å, 5 µm
Trennsäule:	Material:	Octadecylsilan-Phase
	Länge:	150 mm
	Innendurchmesser:	2,1 mm
	Säulenfüllung:	Atlantis dC18, 100 Å, 3 µm
Trennprinzip:	*Reversed Phase*	
Temperatur:	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	25 µl	
Eluent:	A: Wasser + 0,05 % Essigsäure B: Acetonitril + 0,05 % Essigsäure	
Gradient:	siehe Tabelle 2 und 3	
Flussraten:	siehe Tabelle 2 und 3	
Ventilschaltung:	siehe Tabelle 4	

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

Tab. 2 Gradientenprogramm der Beladungspumpe zur Online-Anreicherung der Analyten

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	1000	100	0
7,1	1000	100	0
7,2	100	5	95
18,9	100	5	95
19,0	1000	5	95
29,0	1000	5	95
29,1	100	100	0
32,0	100	100	0
32,1	1000	100	0
35,9	1000	100	0

Tab. 3 Gradientenprogramm der analytischen Pumpe zur chromatographischen Trennung der Analyten

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	200	80	20
7,0	200	80	20
8,5	200	50	50
12,5	250	45	55
16,0	250	5	95
19,0	250	5	95

Tab. 3 *(Fortsetzung)*

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
30,0	250	5	95
31,0	200	80	20
35,9	200	80	20

Tab. 4 Schaltprogramm des Sechswegeventils

Zeit [min]	Ventilstellung
0,0	A
7,0	B
19,0	A
21,0	B
21,2	A
21,4	B
21,6	A
24,2	B
24,5	A

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung: Negative Elektrosprayionisierung (ESI–)

Ionenspray-Spannung: –4500 V

Nebuliser-Gas: Stickstoff, 50 psi

Turbo-Heater-Gas: Stickstoff, 50 psi, 450 °C

Curtain-Gas: Stickstoff, 35 psi

Q1 Resolution: unit

Q3 Resolution: low

Settling Time: 0,005 s

MR Pause: 0,005 s

Kollisionsgas: Stickstoff; low instrument units

Scan Time: 1 s

Parameterspezifische Einstellungen: siehe Tabelle 5

Die Quantifizierung der Analyten erfolgt über den Hauptzerfall (Quantifier), während die qualitative Absicherung der Ergebnisse über den zweiten Massenübergang erfolgt (Qualifier).

Tab. 5 Parameterspezifische Einstellungen und Retentionszeiten für die Bestimmung der DINCH-Metaboliten

Substanz	Retentionszeit [min]	Ausgangs-Ion [*m/z*]	Produkt-Ion [*m/z*]	Kollisionsenergie [V]
cx-MINCH	16,9	327	173[a)]	–24
			153[b)]	–30
D_2-cx-MINCH	16,9	329	175[a)]	–24
			135[b)]	–32
OH-MINCH	17,4	313	153[a)]	–24
			109[b)]	–40
D_4-OH-MINCH	17,4	317	153[a)]	–22
			109[b)]	–40
oxo-MINCH	17,8	311	153[a)]	–24
			109[b)]	–40
D_3-oxo-MINCH	17,8	314	153[a)]	–24
			109[b)]	–38
MINCH	21,0	297	153[a)]	–22
			109[b)]	–40
D_2-MINCH	21,0	299	153[a)]	–20
			109[b)]	–34

[a)] Quantifier
[b)] Qualifier

Sämtliche Parameter müssen vom Anwender nach üblicher Adjustierung des MS/MS-Systems individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

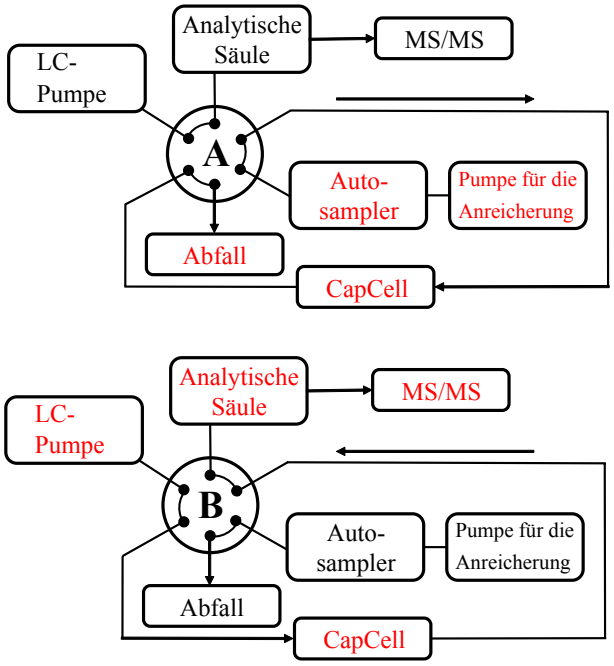
7 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 5.2 aufgearbeiteten Urinproben wird ein Aliquot von 25 µl der Probenlösung mittels Autosampler in das LC-MS/MS-System injiziert.

In Ventilstellung A werden die Analyten mit Hilfe der quaternären Pumpe bei einer Flussrate von 1 ml/min auf der Capcell Pak®-Säule angereichert. Nach Anreicherung der Analyten und Abtrennung von Matrixbestandteilen werden die Analyten in Ventilstellung B in umgekehrter Flussrichtung auf die analytische Säule transferiert (siehe Abbildung 2). Nach Online-Anreicherung, chromatographischer Trennung und Bestimmung mittels MS/MS werden die Analyten anhand ihrer Retentionszeiten sowie der charakteristischen Ionenübergänge identifiziert (siehe Tabelle 5). Mit jeder Analysenserie werden hochreines Wasser als Reagenzienleerwert sowie zwei Qualitätskontrollproben aufgearbeitet und analysiert.

Die in Tabelle 5 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender der Methode muss sich selbst von der Trennleistung der verwendeten analytischen Säule und von dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten überzeugen.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer nativen Urinprobe. Aufgrund der großen Anzahl möglicher Isomere unterscheidet sich die Peakform der Analyten deutlich von der der entsprechenden ISTDs.



Ventilposition A: Extraktion und Anreicherung der Analyten auf der polaren CapCell-Phase

Ventilposition B: Elution der Zielanalyten von der polaren CapCell-Phase; Trennung auf der analytischen Säule; MS/MS-Detektion

Abb. 2 Skizze zum Aufbau des LC-MS/MS-Systems und Illustration der Schaltoptionen A und B des Sechswegeventils

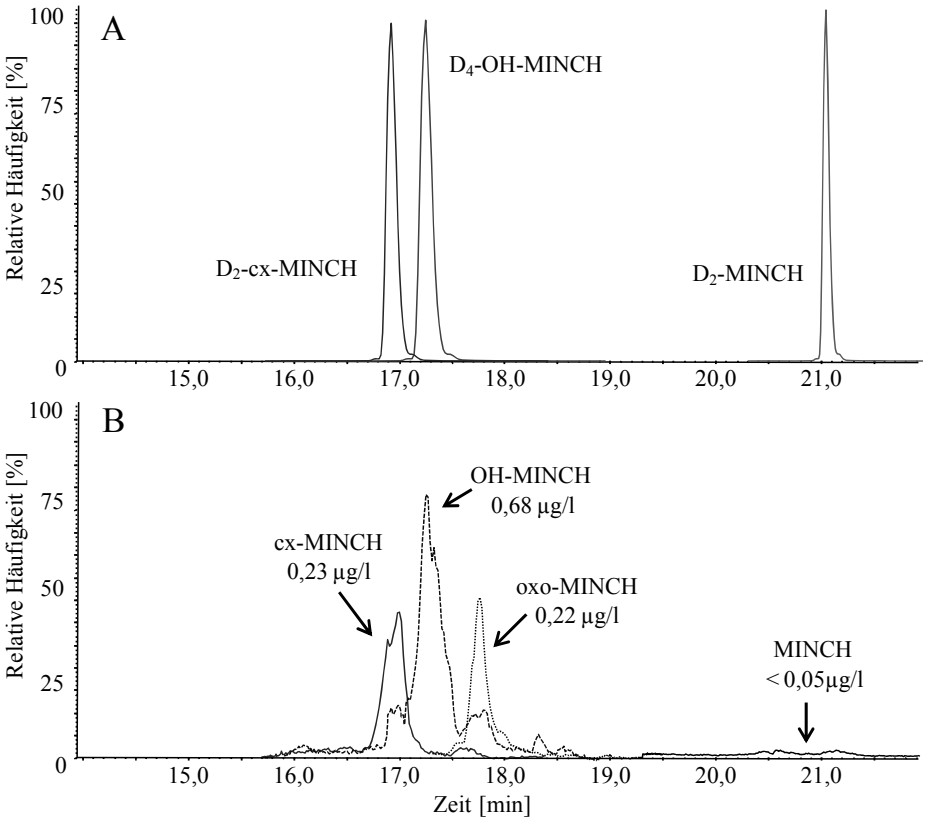


Abb. 3 Chromatogramme einer nativen Urinprobe mit Analytkonzentrationen von 0,23 µg cx-MINCH/l, 0,68 µg OH-MINCH/l, 0,22 µg oxo-MINCH/l und < 0,05 µg MINCH/l

8 Kalibrierung

Die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierstandards werden analog zu den Proben aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5) und mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Abschnitt 6 und 7). Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des dazugehörigen ISTDs gegen die dotierten Konzentrationen aufgetragen werden. Die Kalibriergeraden sind linear in einem Bereich von 0,1 µg/l bis 80 µg/l. In Abbildung 4 sind beispielhafte Kalibriergeraden für cx-MINCH, OH-MINCH, oxo-MINCH sowie MINCH abgebildet.

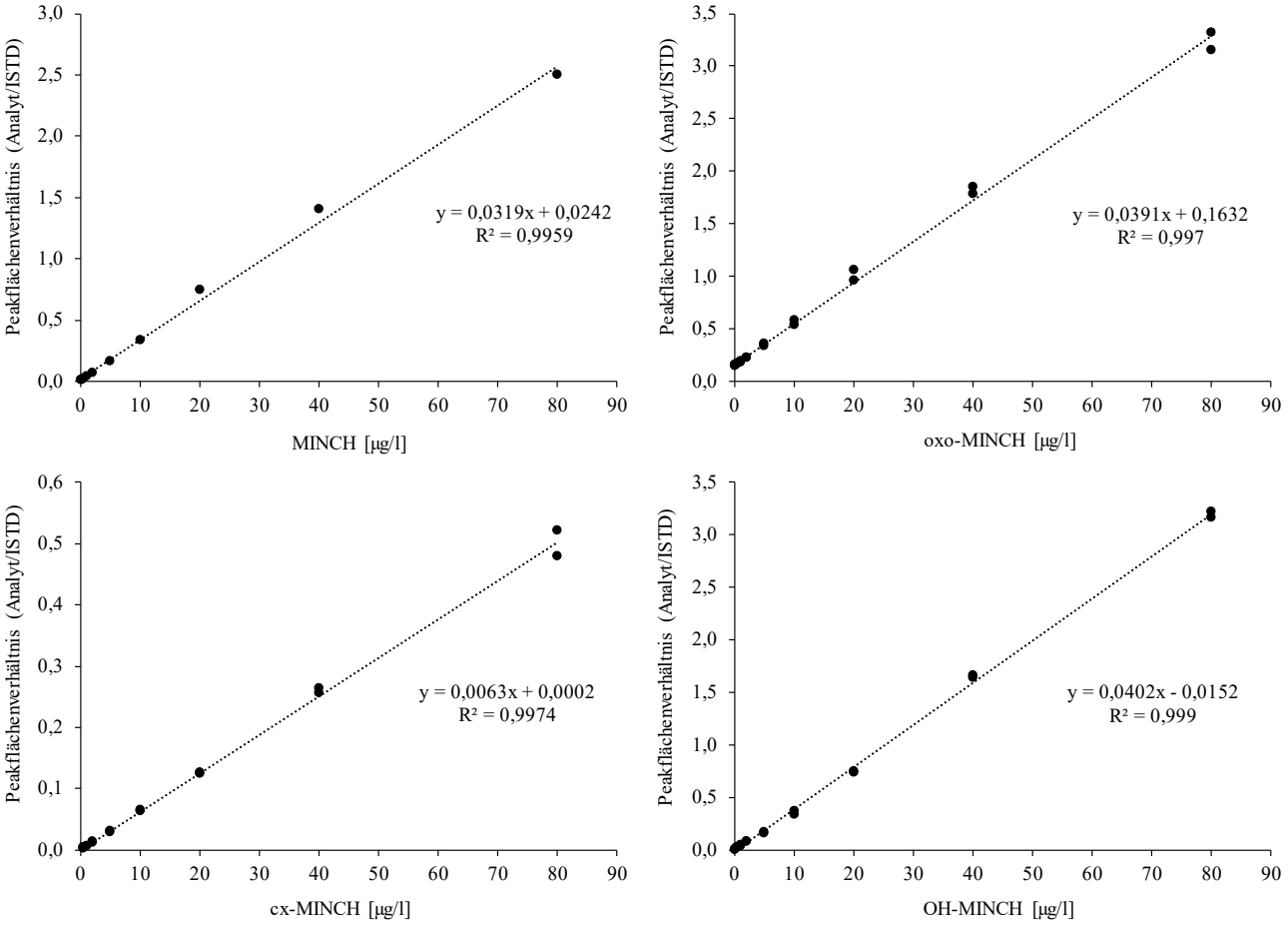


Abb. 4 Beispielhafte Kalibriergeraden für die Bestimmung von cx-MINCH, OH-MINCH, oxo-MINCH sowie MINCH

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Der Analytgehalt einer Probe wird bestimmt, indem der Quotient aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten und der Peakfläche des dazugehörigen ISTDs gebildet und in die nach Abschnitt 8 erstellte Kalibrierfunktion eingesetzt wird. Man erhält die Analytkonzentration in µg/l. Eventuell auftretende Reagenzienleerwerte müssen durch Subtraktion berücksichtigt werden.

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 werden mit jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit niedrigen (Q_{low}) und hohen (Q_{high}) Analytkonzentrationen untersucht, die bekannte Konzentrationen der Analyten enthalten. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss dieses durch Dotierung von Poolurin selber hergestellt werden. Die dotierte Konzentration sollte dabei im zu erwartenden Konzentrationsbereich liegen. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Für die Analyten cx-MINCH, OH-MINCH und MINCH wurde die Präzision in der Serie anhand des Qualitätskontrollmaterials Q_{low} und Q_{high} (siehe Abschnitt 10) ermittelt. Dazu wurde das Q_{low}- und Q_{high}-Material je achtfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Für oxo-MINCH wurde die Präzision in der Serie anhand einer mit 1,13 µg/l bzw. 12,2 µg/l dotierten Urinprobe ermittelt, die achtfach parallel aufgearbeitet und analysiert wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

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

Analyt	Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MINCH	2,76	6,79	16,1
	12,7	1,95	4,61
OH-MINCH	8,29	7,1	16,8
	46,0	2,67	6,31
oxo-MINCH[a)]	1,13	1,43	3,39
	12,2	1,84	4,36
MINCH	1,47	10,7	25,2
	6,6	3,51	8,30

[a)] Diese Daten wurden von den Prüfern der Methode erhoben (siehe Abschnitt 12).

Präzision von Tag zu Tag

Für die Analyten cx-MINCH, OH-MINCH und MINCH erfolgte die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag durch Aufarbeitung und Analyse der Q_{low}- und Q_{high}-Proben an acht unterschiedlichen Tagen. Für oxo-MINCH wurde die Präzision von Tag zu Tag anhand einer mit 1,02 µg/l bzw. 11,6 µg/l dotierten Urinprobe ermittelt, die an acht aufeinanderfolgenden Arbeitstagen aufgearbeitet und analysiert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der DINCH-Metaboliten in Urin (n = 8)

Analyt	Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MINCH	3,07	9,92	23,5
	14,0	3,67	15,8
OH-MINCH	9,49	6,56	15,5
	45,6	3,63	8,58
oxo-MINCH[a)]	1,02	15,0	35,5
	11,6	8,94	21,1
MINCH	1,49	15,1	35,8
	6,52	9,22	21,8

[a)] Diese Daten wurden von den Prüfern der Methode erhoben (siehe Abschnitt 12).

11.2 Richtigkeit

Für die Analyten cx-MINCH, OH-MINCH und MINCH wurden die Richtigkeit der Methode und der Einfluss möglicher Matrixeffekte anhand von acht Individualurinen mit Kreatiningehalten im Bereich von 0,5 bis 2,5 g/l geprüft. Für oxo-MINCH wurden acht Individualurine mit Kreatiningehalten zwischen 0,49 und 2,37 g/l verwendet. Die Urine wurden mit den Analyten in zwei Konzentrationen dotiert. Es wurden jeweils die undotierten sowie die dotierten Urinproben aufgearbeitet und analysiert. Die Berechnung der relativen Wiederfindung erfolgte anhand der ermittelten Gehalte in den dotierten Urinen unter Abzug eventueller Hintergrundgehalte der Analyten. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

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

Analyt	Hintergrundgehalt [µg/l]	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
cx-MINCH	< BG–2,37	1,94	97,9	87,6–108
		9,7	97,4	89,0–106
OH-MINCH	< BG–3,11	2,22	93,3	83,8–100
		11,1	95	87,6–98,9
oxo-MINCH[a)]	–	1,00	91,7	78,0–99,4
		10,0	99,7	93,9–105
MINCH	< BG–0,08	2,01	95	91,2–99,2
		10,0	90,1	84,5–97

BG: Bestimmungsgrenze
[a)] Diese Daten wurden von den Prüfern der Methode erhoben (siehe Abschnitt 12).

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für die Analyten cx-MINCH, OH-MINCH und MINCH erfolgte die Bestimmung der Nachweisgrenzen über das dreifache Signal/Rausch-Verhältnis. Die Bestimmungsgrenzen wurden entsprechend aus dem sechsfachen Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von oxo-MINCH wurde über das fünfzehnfache bzw. dreißigfache Signal/Rausch-Verhältnis errechnet.

Die für die Bestimmung von cx-MINCH, OH-MINCH, oxo-MINCH und MINCH berechneten Werte sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung der DINCH-Metaboliten in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
cx-MINCH	0,025	0,05
OH-MINCH	0,025	0,05
oxo-MINCH[a)]	0,05	0,1
MINCH	0,05	0,1

[a)] Diese Daten wurden von den Prüfern der Methode erhoben (siehe Abschnitt 12).

11.4 Störeinflüsse

Das als Weichmacher eingesetzte DINCH kann durch den Monoester MINCH kontaminiert sein. Daher sollten, auch wenn es sich bei DINCH bislang noch nicht um eine ubiquitär verbreitete Umweltchemikalie handelt, Laborgeräte und alle verwendeten Materialen auf MINCH-Leerwerte untersucht werden. Hingegen ist die Quantifizierung der Sekundärmetaboliten cx-MINCH, OH-MINCH und oxo-MINCH nicht kontaminationsgefährdet.

Die für die Online-Anreicherung verwendete Capcell Pak®-Phase erweist sich trotz der direkten Urinaufgabe als äußerst robust. Um die Lebensdauer der analytischen Säule zu verlängern, kann eine Vorsäule verwendet werden. Zudem empfiehlt es sich, einen 5-µm-Partikelfilter zwischen Autosampler und Sechs-Wege-Ventil zu setzen. Sollte es zu einem Druckanstieg im System kommen, kann diesem durch eine Verlängerung der Waschzeit nach der Probenaufgabe mit einer maximalen Flussrate von 1,5 ml/min entgegengewirkt werden.

12 Diskussion der Methode

Das dargestellte Biomonitoring-Verfahren wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes zwischen dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) und dem Verband der chemischen Industrie (VCI) zur Förderung des Human-Biomonitoring entwickelt und erlaubt die selektive und sensitive Bestimmung von umwelt- und arbeitsbedingten DINCH-Belastungen. Die hier dargestellte Methode ist aufgrund einfacher Probenaufarbeitung und kurzer Analysendauer schnell durchführbar. Die Validierungsdaten zeigen eine gute Reproduzierbarkeit und Richtigkeit sowie eine große Empfindlichkeit der Methode, die unter anderem auch aus der Verwendung strukturidentischer isotopenmarkierter ISTDs resultiert.

Da die DINCH-Metaboliten im Urin der Allgemeinbevölkerung nur in geringen Konzentrationen zu finden sind, sollten sich die untersten Konzentrationen der Kalibrierstandards zunächst an der gerätespezifischen Bestimmungsgrenze orientieren. Die im Rahmen der Methodenentwicklung und Methodenprüfung ermittelten Bestimmungsgrenzen von 0,05 µg/l (cx-MINCH und OH-MINCH) und 0,1 µg/l (oxo-MINCH und MINCH) reichen aus, um auch die Hintergrundgehalte im Urin der Allgemeinbevölkerung zu quantifizieren. Der Median der gemessenen Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung liegt im Bereich von 0,2–0,3 µg/l. Höhere Konzentrationen zum Beispiel durch berufliche Exposition konnten bis jetzt nur grob abgeschätzt werden. Daher empfiehlt es sich, den Kalibrierbereich zwischen 0,1 µg/l und 60 µg/l festzulegen.

Zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung lagen für oxo-MINCH weder Referenzmaterial noch ein deuterierter ISTD vor. Die Bestimmung von oxo-MINCH erfolgte aus diesem Grund semi-quantitativ, indem die Peakflächen von oxo-MINCH auf die von D_4-OH-MINCH bezogen wurden. Die so erhaltenen Quotienten wurden in die Kalibrierfunktion von OH-MINCH eingesetzt, um die jeweilige Konzentration von oxo-MINCH zu berechnen. Die Prüfer der Methode ließen oxo-MINCH und D_3-oxo-MINCH synthetisieren und haben die Methode auch für diesen Parameter umfassend validiert. Die von den Prüfern für oxo-MINCH erhobenen Validierungsdaten wurden in das Manuskript aufgenommen.

Weitere Metaboliten können grundsätzlich in die Methode eingebunden werden. Beispielsweise ist Hexyl-cx-MINCH neben den hier analysierten Metaboliten ein weiterer Hauptmetabolit. Ringhydroxylierte MINCH-Metaboliten sowie

weitere Carboxymetaboliten mit verkürzter Alkylseitenkette spielen dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Der unspezifische Hauptmetabolit CHDA kann separat mittels Standardaddition bestimmt werden. Dazu werden die Proben jeweils ohne Zugabe von CHDA, nach Zugabe von 10 µg CHDA pro Liter und nach Zugabe von 50 µg CHDA pro Liter analysiert. Dabei ist darauf zu achten, dass alle Proben dasselbe Volumen sowie eine nahezu identische Ionenkonzentration aufweisen.

Zum Ansetzen der Eluenten kann anstelle der Essigsäure auch Ameisensäure verwendet werden.

Verwendete Messgeräte HPLC-Anlage (Agilent 1200 Serie) bestehend aus Autosampler G1329A, quaternärer Pumpe G1311A, binärer Pumpe G1312A und Vakuum-Entgaser G1322A bzw. G1379B (Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn); Massenspektrometer SCIEX QTRAP® 5500 mit Turbo V™-Ionenquelle (AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) 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. Band 2: Analysen in biologischem Material. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019

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

Crespo JE, Balart R, Sanchez L, López J (2007) Substitution of di(2-ethylhexyl) phthalate by di(isononyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate as a plasticizer for industrial vinyl plastisol formulations. J Appl Polym Sci 104(2): 1215–1220. https://doi.org/10.1002/app.25760

EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. EFSA J 4(10): 395–401. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.395

Giovanoulis G, Bui T, Xu F, Papadopoulou E, Padilla-Sanchez JA, Covaci A, Haug LS, Cousins AP, Magnér J, Cousins IT, de Wit CA (2018) Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. Environ Int 112: 115–126. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.016

HBM-Kommission (Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamts) (2014) Stoffmonographie für 1,2-Cyclohexandicarbonsäure-di-isononylester (Hexamoll® DINCH®) – HBM-Werte für die Summe der Metabolite Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure-mono-hydroxyisononylester (OH-MINCH) und Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure-mono-carboxy-isooctylester (cx-MINCH) im Urin von Erwachsenen und Kindern. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 57(12): 1451–1461. https://doi.org/10.1007/s00103-014-2069-2

Kasper-Sonnenberg M, Koch HM, Apel P, Rüther M, Pälmke C, Brüning T, Kolossa-Gehring M (2019) Time trend of exposure to the phthalate plasticizer substitute DINCH in Germany from 1999 to 2017: biomonitoring data in young adults from the Environmental Specimen Bank (ESB). Int J Hyg Environ Health 222(8): 1084–1092. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.07.011

Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J (2003) On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 784(1): 169–182. https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00785-7

Koch HM, Schütze A, Pälmke C, Angerer J, Brüning T (2013) Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH®) in humans after single oral doses. Arch Toxicol 87: 799–806. https://doi.org/10.1007/s00204-012-0990-4

Malarvannan G, Onghena M, Verstraete S, van Puffelen E, Jacobs A, Vanhorebeek I, Verbruggen SCAT, Joosten KFM, Van den Berghe G, Jorens PG, Covaci A (2019) Phthalate and alternative plasticizers in indwelling medical devices in pediatric intensive care units. J Hazard Mater 363: 64–72. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.087

NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme) (2012) 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester ('Hexamoll DINCH'). EX/170 (STD/1259). Sydney: NICNAS. https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/EX170%20Public%20Report%20PDF.pdf, abgerufen am 07 Dez 2020

Schütze A, Kolossa-Gehring M, Apel P, Brüning T, Koch HM (2014) Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24-h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. Int J Hyg Environ Health 217(2–3): 421–426. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.08.004

Schütze A, Otter R, Modick H, Langsch A, Brüning T, Koch HM (2017) Additional oxidized and alkyl chain breakdown metabolites of the plasticizer DINCH in urine after oral dosage to human volunteers. Arch Toxicol 91: 179–188. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1688-9

Silva MJ, Furr J, Preau JL Jr, Samandar E, Gray LE, Calafat AM (2012) Identification of potential biomarkers of exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), an alternative to phthalate plasticizers. J Expo Sci Environ Epidemiol 22(2): 204–211. https://doi.org/10.1038/jes.2011.43

Weiss JM, Gustafsson Å, Gerde P, Bergman Å, Lindh CH, Krais AM (2018) Daily intake of phthalates, MEHP, and DINCH by ingestion and inhalation. Chemosphere 208: 40–49. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.094