

3-(4'-Methylbenzyliden)campher (4-MBC) – Bestimmung von 3-(4'-Carboxybenzyliden)- campher und 3-(4'-Carboxybenzyliden)- hydroxycampher in Urin mittels UPLC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

3-(4'-Methylbenzyliden)campher;
3-(4'-Carboxybenzyliden)-
campher; 3-(4'-Carboxy-
benzyliden)hydroxycampher;
Biomonitoring; Urin;
UPLC-MS/MS

W. Gries¹
K. Küpper¹
G. Leng¹
T. Hauke²
G. Gilch²

G. Scherer²
T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SIT-SER-GS-BLM Institut für Biomonitoring, Chempark, Geb. Q18, 51368 Leverkusen

² Methodenprüfung, ABF – Analytisch-Biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg

³ Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

⁴ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁵ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

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

Citation Note:

Gries W, Küpper K, Leng G,
Hauke T, Gilch G, Scherer G,
Göen T, Hartwig A,
MAK Commission.
3-(4'-Methylbenzyliden)campher
(4-MBC) – Bestimmung von
3-(4'-Carboxybenzyliden)-
campher und
3-(4'-Carboxybenzyliden)-
hydroxycampher in Urin
mittels UPLC-MS/MS.
Biomonitoring-Methode. MAK
Collect Occup Health Saf. 2024
Sep;9(3):Doc078. [https://doi.
org/10.34865/bi3686147d9_3or](https://doi.org/10.34865/bi3686147d9_3or)

Manuskript abgeschlossen:
22 Jun 2021

Publikationsdatum:
30 Sep 2024

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



Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the German Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area (MAK Commission) developed and verified the presented biomonitoring method. The aim of this method is the selective and sensitive quantitation of the two main metabolites of the UVB filter 3-(4'-methylbenzylidene)camphor (4-MBC), 3-(4'-carboxybenzylidene)camphor (cx-MBC) and 3-(4'-carboxybenzylidene)hydroxycamphor (cx-MBC-OH), in urine. After adding deuterated internal standards (cx-MBC-d₄ and cx-MBC-OH-d₄), the samples are enzymatically hydrolysed. After extraction and enrichment by online SPE, the analytes are separated by liquid chromatography and analysed by tandem mass spectrometry. Good precision data with standard deviations below 5.5% for cx-MBC and below 6.5% for cx-MBC-OH, as well as good accuracy data with mean relative recoveries in the range of 90–110% for cx-MBC and 89–106% for cx-MBC-OH, show that the method provides reliable and accurate analytical results. The method is both selective and sensitive, and the limits of quantitation of 0.15 µg/l (cx-MBC) and 0.3 µg/l (cx-MBC-OH) are sufficient to determine background exposure in the general population.

1 Kenndaten der Methode

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

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
3-(4'-Methylbenzyliden)campher (4-MBC)	36861-47-9	3-(4'-Carboxybenzyliden)-campher (cx-MBC)	68801-01-4
		3-(4'-Carboxybenzyliden)-hydroxycampher (cx-MBC-OH)	915796-58-6

Zuverlässigkeitskriterien

3-(4'-Carboxybenzyliden)campher (cx-MBC)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC pro Liter Urin und n = 6 oder 10 Bestimmungen	$s_w = 4,1\%, 3,3\%, 2,8\%$ bzw. $2,2\%$ $u = 10,6\%, 7,3\%, 6,3\%$ bzw. $4,8\%$
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC pro Liter Urin und n = 6 oder 10 Bestimmungen	$r = 99\%, 90\%, 98\%$ bzw. 110%
Nachweisgrenze:	0,05 µg cx-MBC pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,15 µg cx-MBC pro Liter Urin	

3-(4'-Carboxybenzyliden)hydroxycampher (cx-MBC-OH)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC-OH pro Liter Urin und n = 6 oder 10 Bestimmungen	$s_w = 6,2\%, 6,1\%, 4,0\%$ bzw. $1,4\%$ $u = 15,9\%, 13,7\%, 8,9\%$ bzw. $3,2\%$
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC-OH pro Liter Urin und n = 6 oder 10 Bestimmungen	$r = 89\%, 89\%, 92\%$ bzw. 106%
Nachweisgrenze:	0,1 µg cx-MBC-OH pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,3 µg cx-MBC-OH pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu 3-(4'-Methylbenzyliden)campher

3-(4'-Methylbenzyliden)campher (4-MBC, 3-(4'-Methylbenzyliden)bornan-2-on, Enzacamen, (\pm)-1,7,7-Trimethyl-3-[(4-methylphenyl)methylen]bicyclo[2.2.1]heptan-2-on) ist ein weißes kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 66–69 °C, das einen schwachen kampferartigen Geruch aufweist. Er ist praktisch unlöslich in Wasser und nur

geringfügig löslich in Ethanol oder Isopropanol (SCCS 2022). 4-MBC wird in Mengen von 10 bis 1000 Tonnen pro Jahr in der EU hergestellt oder in diese importiert und gilt damit als „Low Production Volume Chemical“ (HBM-Kommission 2016). Die Struktur des 4-MBC ist in [Abbildung 1](#) dargestellt.

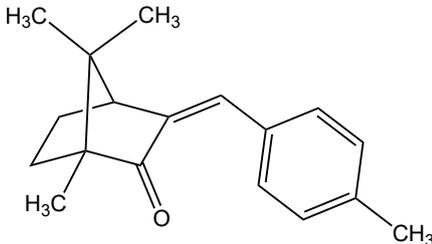


Abb. 1 Struktur von 4-MBC

4-MBC ist ein UVB-Filter in kosmetischen Produkten, vor allem in Sonnenschutzcremes. In diesen darf es mit einem maximalen Anteil von 4 % enthalten sein (Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2009). Kosmetikprodukte, die den Stoff enthalten, dürfen ab Mai 2026 in der EU nicht mehr angeboten werden (Europäische Kommission 2024).

Eine Exposition gegen 4-MBC ist vor allem durch die Verwendung von Kosmetikprodukten gegeben, wobei der Marktanteil 4-MBC-haltiger Produkte rückläufig ist (Hauri et al. 2003; Kerr 2011; Manová et al. 2013; Poiger et al. 2004). Eine Exposition der Allgemeinbevölkerung kann auch durch den Verzehr 4-MBC-belasteter Fische (Balmer et al. 2005; Cunha et al. 2018) oder über belasteten Staub (Ao et al. 2018; Negreira et al. 2009) erfolgen.

Informationen zur Aufnahme und zum Metabolismus des 4-MBC liegen sowohl aus Tierversuchen als auch aus Studien am Menschen vor. Bei Ratten wurden nach oraler Applikation 3-(4'-Carboxybenzyliden)campher (cx-MBC) und 3-(4'-Carboxybenzyliden)hydroxycampher (cx-MBC-OH) als Hauptmetaboliten im Urin identifiziert (Völkel et al. 2006). Die gleichen Hauptmetaboliten wurden bei Mensch und Ratte auch nach dermalen 4-MBC-Applikation nachgewiesen (Schauer et al. 2006). Im Rattenurin liegen beide Metaboliten glucuronidisch gebunden vor, wobei der glucuronidierte Anteil von cx-MBC höher ist als der von cx-MBC-OH (Völkel et al. 2006). Das Verhältnis cx-MBC : cx-MBC-OH liegt im Humanurin bei etwa 1 : 4 (Schauer et al. 2006). Die in verschiedenen Studien nach dermalen Applikation von 4-MBC ermittelte systemische Verfügbarkeit wird mit 0,29–0,74 % (Schauer et al. 2006) sowie 1,9 % (SCCNFP 2004; SCCP 2006) angegeben.

Das aufgenommene 4-MBC wird in einem ersten Schritt, unter Bildung des intermediären Benzylalkohols 3-(4'-Hydroxymethylbenzyliden)campher, durch Cytochrom P450 (CYP450) hydroxyliert. Dieser Metabolit wird durch Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase zu cx-MBC weiteroxidiert und kann anschließend durch CYP450 zu cx-MBC-OH hydroxyliert werden (siehe [Abbildung 2](#)).

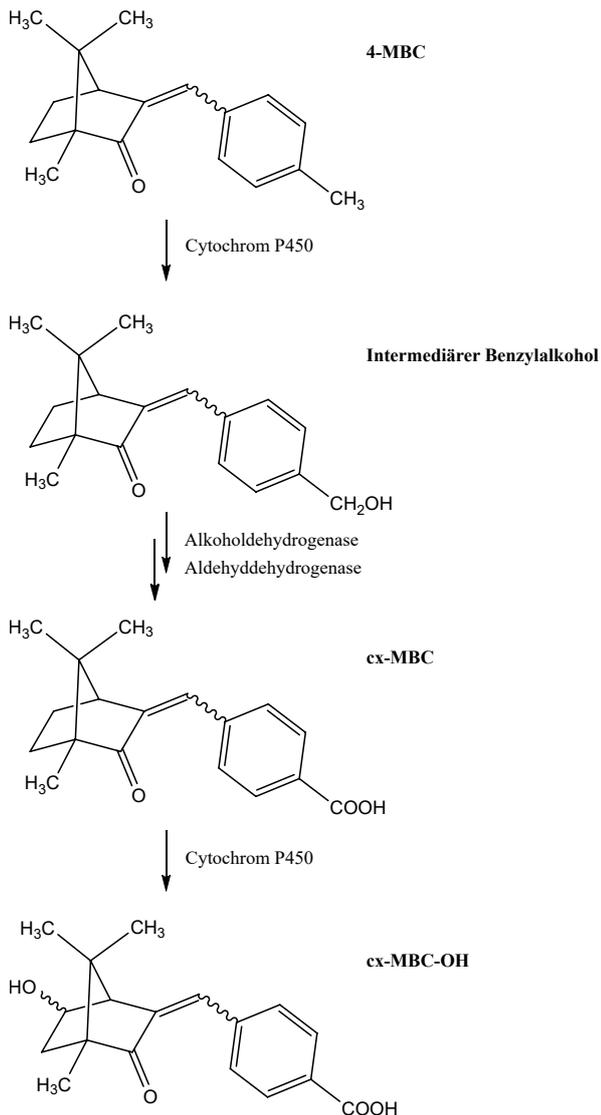


Abb. 2 Metabolismus von 4-MBC nach Schauer et al. (2006)

Die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) sieht ausreichende Beweise dafür, dass 4-MBC ein endokriner Disruptor ist und sowohl das Schilddrüsen- als auch das Östrogensystem beeinflusst. Die Substanz wurde auf EU-Ebene als besonders besorgniserregender Stoff (SVHC; *substance of very high concern*) klassifiziert (ECHA 2021; SCCS 2022). Vom Umweltbundesamt wurde für die Summe von cx-MBC und cx-MBC-OH ein HBM-I-Wert von 470 µg/l Urin für Erwachsene und von 310 µg/l Urin für Kinder abgeleitet (HBM-Kommission 2016).

Um eine mögliche Exposition der Allgemeinbevölkerung gegen 4-MBC zu untersuchen, wurden verschiedene Studien durchgeführt. In [Tabelle 1](#) sind beispielhafte Konzentrationen von cx-MBC und cx-MBC-OH im Urin der Allgemeinbevölkerung in Deutschland angegeben; diese lagen weitestgehend unter der jeweiligen Bestimmungsgrenze der Methode. Lediglich bei Schmidt-kunz et al. (2023) ließen sich in den Proben junger Erwachsener aus den Jahren 1995, 2005 und 2010 leicht erhöhte cx-MBC- sowie cx-MBC-OH-Konzentrationen nachweisen. Der untersuchte Zeittrend der Belastung über die Jahre 1995, 2005, 2010, 2015 und 2019 zeigte aber eine deutliche Abnahme der maximalen cx-MBC- und cx-MBC-OH-Konzentrationen im Urin, was vermutlich auf eine Substitution des UVB-Filters 4-MBC in Kosmetikprodukten zurückzuführen ist. Die höchste Konzentration wurde in einer Probe aus dem Jahr 2005 gemessen und betrug 16,2 µg cx-MBC/l (Schmidt-kunz et al. 2023).

Tab. 1 cx-MBC und cx-MBC-OH-Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung in Deutschland

Studienkollektiv (Anzahl der Personen)	cx-MBC [$\mu\text{g/l}$]		cx-MBC-OH [$\mu\text{g/l}$]		Literatur
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich	
Kinder und Jugendliche (447)	< BG (0,15)	< BG–12,7	< BG (0,30)	alle < BG (0,30)	Murawski et al. 2021
Erwachsene (40)	< BG (0,15)	alle < BG (0,15)	< BG (0,3)	alle < BG (0,3)	Leng und Gries 2017
Junge Erwachsene (250)	0,155 ^{a)}	< BG (0,15)–16,2	< BG (0,30)	< BG (0,30)–2,96	Schmidtkunz et al. 2023

BG: Bestimmungsgrenze

^{a)} Geometrischer Mittelwert

3 Grundlage des Verfahrens

Das Ziel der vorliegenden Methode ist die selektive und sensitive Erfassung der beiden Hauptmetaboliten cx-MBC und cx-MBC-OH des UVB-Filters 4-MBC im Urin. Nach Zugabe der deuterierten internen Standards (cx-MBC-d₄ und cx-MBC-OH-d₄) werden die Proben einer enzymatischen Hydrolyse mit β -Glucuronidase unterworfen, um mögliche Konjugate zu spalten. Nach Aufreinigung und Anreicherung der Proben mittels online-SPE werden die Analyten flüssigchromatographisch von Begleitkomponenten getrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert. Es werden Bestimmungsgrenzen von 0,15 $\mu\text{g/l}$ (cx-MBC) und 0,3 $\mu\text{g/l}$ (cx-MBC-OH) erreicht.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-MS/MS-System (z. B. Waters Acquity gekoppelt mit Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn)
- Anreicherungssäule (z. B. X Bridge C8 Direct Connect HP, 10 μm , 2,1 \times 30 mm, Nr. 186005233, Waters GmbH, Eschborn)
- Analytische Säule (z. B. Acquity UPLC HSS C18, 1,8 μm , 2,1 \times 150 mm, Nr. 186003534, Waters GmbH, Eschborn)
- Inkubator (z. B. MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg)
- Laborzentrifuge (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Schüttler (z. B. Vibrax VXR, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- pH-Meter (z. B. SevenEasyTM, Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- pH-Papier Universal 0–11 (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- 250-ml- und 400-ml-Bechergläser (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 10-ml-, 100-ml- und 500-ml-Messkolben (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Multipette[®] mit passenden Combitips[®] (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Einkanalpipetten mit einstellbarem Volumen von 1–10 μl und 10–100 μl mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf Research[®], Eppendorf AG, Hamburg)
- 3,5-ml-Transferpipetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 96-Well-Platten mit quadratischen 2-ml-Vertiefungen (z. B. Nr. 186002482, Waters GmbH, Eschborn)
- Silikondichtungsmatten für 96-Well-Platten (z. B. Nr. 60180-M123, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- 1,5-ml-Gewindfläschchen mit Schraubverschluss (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)

- 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, SupraSolv® (z. B. Nr. 100017, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ameisensäure (z. B. Nr. 56302, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze)
- Ammoniumacetat (z. B. Nr. 101116, Merck KGaA, Darmstadt)
- Eisessig, SupraPur® (z. B. Nr. 100066, Merck KGaA, Darmstadt)
- β -Glucuronidase aus *E. coli* K12, ≥ 140 U/mg Protein (z. B. Nr. 03708446103, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim)
- Tetrahydrofuran, LiChrosolv® (z. B. Nr. 108101, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q® IQ 7000 Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Stickstoff 5.0 (Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf)
- Argon 5.0 (Linde GmbH, Pullach)

4.3 Standards

- 3-(4-Carboxybenzyliden)campher, > 95 % (Auftragssynthese, Institut für Dünnschichttechnologie und Mikrosensorik e.V., Teltow)
- 3-(4-Carboxybenzyliden)campher-Ring-d₄, > 95 % (Auftragssynthese, Institut für Dünnschichttechnologie und Mikrosensorik e.V., Teltow)
- 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-hydroxycampher, > 95 % (Auftragssynthese, Institut für Dünnschichttechnologie und Mikrosensorik e.V., Teltow)
- 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-hydroxycampher-Ring-d₄, > 95 % (Auftragssynthese, Institut für Dünnschichttechnologie und Mikrosensorik e.V., Teltow)

4.4 Lösungen

- Ammoniumacetatpuffer (1 mol/l; pH 6,4)
38,5 g Ammoniumacetat werden in ein 400-ml-Becherglas eingewogen und in ca. 250 ml hochreinem Wasser angelöst. Nach erfolgter pH-Wert-Einstellung mit Eisessig auf pH 6,4 (pH-Meter) wird die Lösung quantitativ in einen 500-ml-Messkolben überführt und dieser mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Der Ammoniumacetatpuffer wird bei Raumtemperatur gelagert und ist mindestens sieben Tage stabil.

- Laufmittel A (0,1% Ameisensäure in Wasser)
In einem 1000-ml-Messkolben wird 1 ml Ameisensäure vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Laufmittel B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril)
In einem 1000-ml-Messkolben wird 1 ml Ameisensäure vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- β -Glucuronidase (1 : 1-Verdünnung (V/V))
Zu einem Teil β -Glucuronidase aus *E. coli* K12 wird ein Teil hochreines Wasser gegeben.

4.5 Interne Standards (ISTDs)

- cx-MBC-d₄-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg cx-MBC-d₄ werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Tetrahydrofuran gelöst. Der Messkolben wird mit Tetrahydrofuran bis zur Markierung aufgefüllt.
- cx-MBC-OH-d₄-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg cx-MBC-OH-d₄ werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Tetrahydrofuran gelöst. Der Messkolben wird mit Tetrahydrofuran bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Arbeitslösung (10 mg/l)
Je 100 µl der ISTD-Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (0,25 mg/l)
25 µl der ISTD-Arbeitslösung werden in einem 1,5 ml-Gewindefläschchen mit Schraubverschluss zu 975 µl Acetonitril pipettiert.

Die Stammlösungen der ISTDs werden bei –20 °C gelagert und sind mindestens sechs Monate stabil. Die Dotierlösung und die Arbeitslösung können bei 4 °C für sechs Monate gelagert werden.

4.6 Kalibrierstandards

- cx-MBC-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg cx-MBC werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Tetrahydrofuran gelöst. Der Messkolben wird mit Tetrahydrofuran bis zur Markierung aufgefüllt.
- cx-MBC-OH-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg cx-MBC-OH werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Tetrahydrofuran gelöst. Der Messkolben wird mit Tetrahydrofuran bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (10 mg/l)
Je 100 µl der Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung II (1 mg/l)
1 ml der Dotierlösung I wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung III (0,1 mg/l)
100 µl der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung IV (0,01 mg/l)
100 µl der Dotierlösung II werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung V (0,001 mg/l)
100 µl der Dotierlösung III werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stammlösungen werden bei –20 °C gelagert und sind mindestens sechs Monate stabil. Die Dotierlösungen können bei 4 °C für sechs Monate gelagert werden.

Die Kalibrierstandards werden in 1,5-ml-Gewindefläschchen mit Schraubverschluss gemäß dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema unter Verwendung von Poolurin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins werden Urine von

nicht gegen 4-MBC exponierten Personen gesammelt und gemischt. Der Kalibrierbereich muss gegebenenfalls an die erwarteten Konzentrationen in den Realproben angepasst werden.

Die Kalibrierstandards werden analog zu den zu messenden Proben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)).

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Dotierlösung [µl]	Poolurin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
00 ^{a)}	–	–		0
0	–	–		0
1	V	25		0,05
2	IV	5		0,1
3	IV	10		0,2
4	IV	25		0,5
5	III	5	ad 500	1
6	III	10		2
7	III	25		5
8	II	5		10
9	II	10		20
10	II	25		50
11	I	5		100
12	I	10		200

^{a)} Der Kalibrierstandard 00 wird ohne ISTD aufgearbeitet.

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Urinproben werden in Urinbechern mit Schraubverschluss gesammelt und bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Sofern eine Probenaufbereitung nicht innerhalb von drei Tagen möglich ist, sollten die Urinproben bei –20 °C gelagert werden.

5.2 Probenaufbereitung

Die Proben werden auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. 0,5 ml der jeweiligen Urinprobe werden in eine Vertiefung der 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend werden 20 µl der ISTD-Dotierlösung (Konzentration in der Probe 10 µg/l) und 1 ml des Ammoniumacetatpuffers hinzupipettiert. Nach Zugabe von 10 µl der 1 : 1-verdünnten β-Glucuronidase werden die Proben für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach werden den Proben jeweils 50 µl konzentrierte Ameisensäure zugesetzt. Von den so aufgearbeiteten Proben werden 50 µl in das Messsystem injiziert.

Die Prüfer der Methode, die die Probenaufbereitung in 1,5-ml-Gewindefläschchen mit Schraubverschluss durchführten, beobachteten, dass nach Zugabe der Ameisensäure in einigen Proben eine Trübung auftrat. Diese Proben wurden bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände für die Analyse verwendet.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die Messungen erfolgten an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer UPLC-Anlage gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (UPLC-MS/MS).

6.1 Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie

Anreicherungssäule:	X Bridge C8 Direct Connect HP, 10 µm, 2,1 × 30 mm
Analytische Säule:	Acquity UPLC HSS C18, 1,8 µm, 2,1 × 150 mm
Laufmittel:	A: hochreines Wasser + 0,1 % Ameisensäure B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure
Stoppzeit:	10 min
Temperatur Säulenofen:	40 °C
Injektionsvolumen:	50 µl
Gradientenprogramm:	siehe Tabellen 3 und 4
Säulenschaltung:	siehe Tabelle 5

Tab. 3 Gradientenprogramm der Anreicherungssäule für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	75	25	1,0
1,0	75	25	1,0
1,5	0	100	1,0
5,0	0	100	1,0
5,5	75	25	1,0
10,0	75	25	1,0

Tab. 4 Gradientenprogramm der analytischen Säule für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	50	50	0,35
1,0	50	50	0,35
5,0	5	95	0,35
7,0	5	95	0,35
7,5	50	50	0,35
10,0	50	50	0,35

Tab. 5 Ventilschaltzeiten für die online-SPE-UPLC-MS/MS

Zeit [min]	Ventilposition	Beschreibung
0,0–0,5	1	Beladen der SPE-Säule, Äquilibration der UPLC-Säule
0,5–5,5	2	Elution der Analyten von der SPE-Säule im Rückspülmodus (<i>backflush mode</i>), Trennung der Analyten auf der UPLC-Säule
5,5–10,0	1	Äquilibration der SPE-Säule, Äquilibration der UPLC-Säule im Anschluss an die Trennung

Bei dem im Prüflabor verwendeten System wurde zur Beladung und zum Spülen der Anreicherungssäule eine isokratische Pumpe (Shimadzu LC-20AD) eingesetzt. Um dennoch zwischen zwei mobilen Phasen wechseln zu können, wurde ein vorgeschaltetes Solenoid-Ventil verwendet. Damit konnte allerdings keine entsprechende Mischung der mobilen Phasen A und B ermöglicht werden, so dass eine mobile Phase A1 entsprechend vorgemischt wurde (25% Acetonitril in Wasser mit 0,1% Ameisensäure). [Tabelle 6](#) liefert einen entsprechenden Überblick über die im Prüflabor für die Anreicherungssäule eingesetzten Bedingungen.

Tab. 6 Bedingungen der Anreicherungssäule für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin (Methodenprüfung)

Zeit [min]	Laufmittel A1 [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	100	0	1,0
1,25	0	100	1,0
5,25	100	0	1,0

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Elektrospray negativ (ESI-)
Capillary Voltage:	1,3 kV
Source Offset:	10 V
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	550 °C
Cone-Gasfluss:	150 l/h
Desolvationsgasfluss:	800 l/h
Kollisionsgasfluss:	0,15 ml/h
Zerstäuber-Gasfluss:	6,0 bar
Desolvations-, Cone- und Zerstäubergas:	Stickstoff
Kollisionsgas:	Argon
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabellen 7 und 8

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 (Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn) bestimmt und optimiert worden.

Für cx-MBC wurden zwei, für cx-MBC-OH drei Massenübergänge ausgewählt. Von diesen diente jeweils ein Übergang der Quantifizierung (Quantifier) und der andere bzw. die anderen der Bestätigung (Qualifier). Für die ISTDs wurden die entsprechenden Massenübergänge verwendet. Die ausgewählten Übergänge sind zusammen mit den Retentionszeiten und weiteren MRM-Parametern in [Tabelle 7](#) zusammengefasst.

Dabei können die angegebenen Retentionszeiten nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender der Methode muss sich von der Trennleistung der von ihm verwendeten LC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen überzeugen.

Tab. 7 Retentionszeiten, MRM-Übergänge und MS/MS-Parameter

Substanz	Retentionszeit [min]	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	Dwelltime [s]	Cone-Spannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Delay [s]
cx-MBC-OH	2,98	299,10	240,10	0,030	61,0	22,0	Auto
		299,10	255,05 ^{a)}	0,030	61,0	18,0	Auto
		299,10	199,15 ^{a)}	0,030	61,0	20,0	Auto
cx-MBC-OH-d ₄	2,97	303,15	244,10	0,030	51,0	22,0	Auto
		303,15	259,10 ^{a)}	0,030	51,0	18,0	Auto
		303,15	203,15 ^{a)}	0,030	51,0	22,0	Auto
cx-MBC	4,17	283,15	239,05	0,055	63,0	18,0	Auto
		283,15	130,15 ^{a)}	0,055	63,0	20,0	Auto
cx-MBC-d ₄	4,15	287,15	243,10	0,055	63,0	18,0	Auto
		287,15	134,20 ^{a)}	0,055	63,0	18,0	Auto

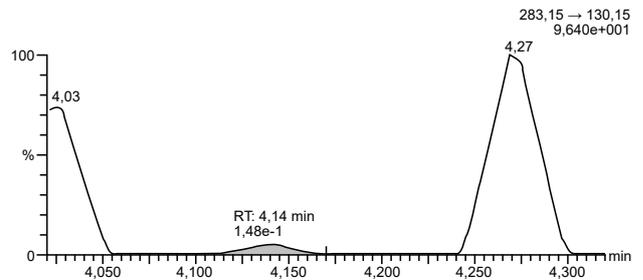
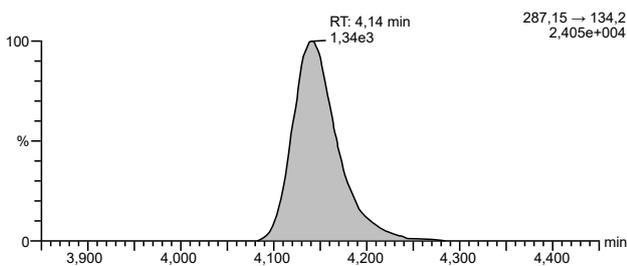
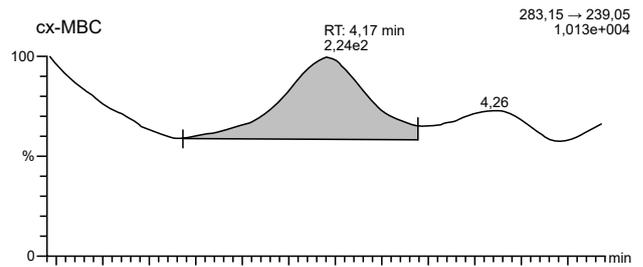
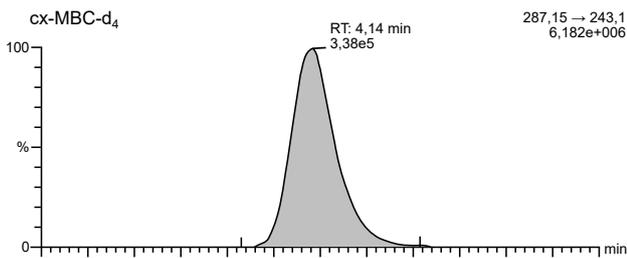
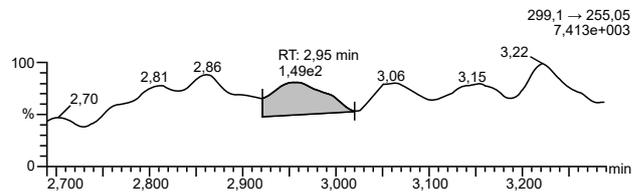
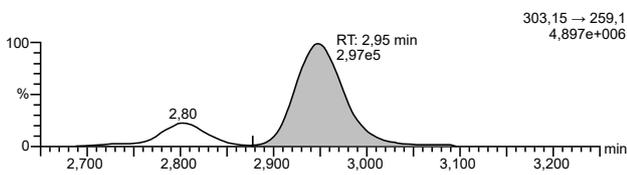
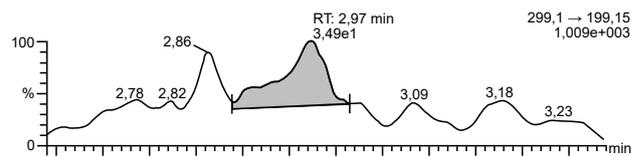
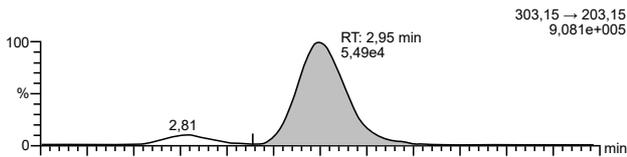
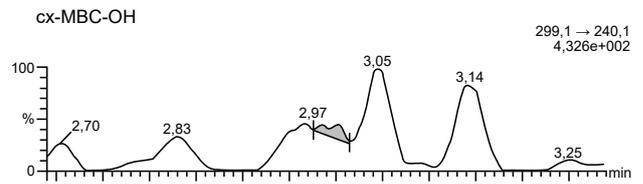
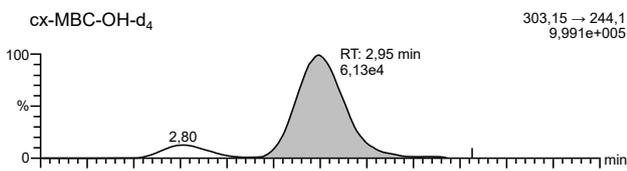
^{a)} Qualifier

Im Prüflabor konnten, unter Verwendung eines SCIEX QTRAP 6500+ MS/MS-Systems, die Qualifier-Übergänge für cx-MBC und dessen ISTD, cx-MBC-d₄, nicht bestätigt werden, da die von den Entwicklern der Methode genannten Massenübergänge (m/z 283 → 130 und m/z 287 → 134) nicht detektiert werden konnten.

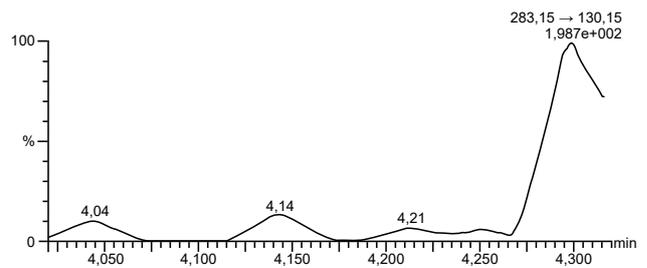
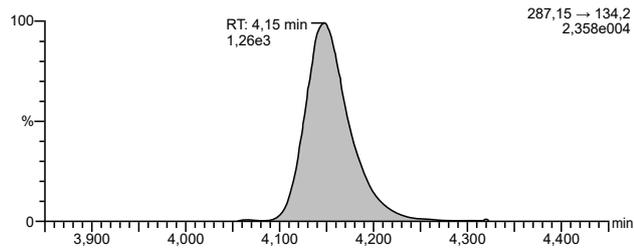
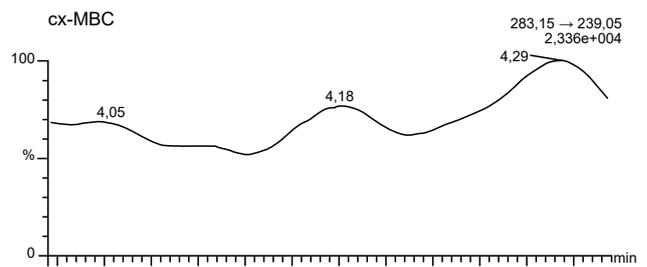
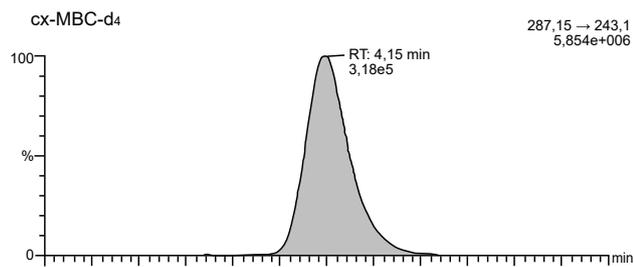
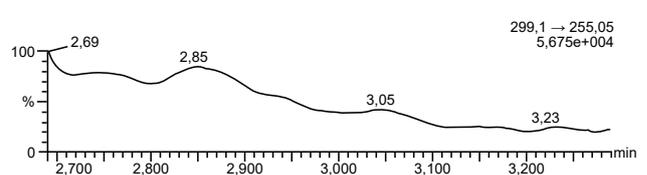
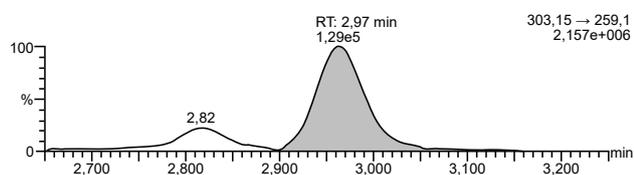
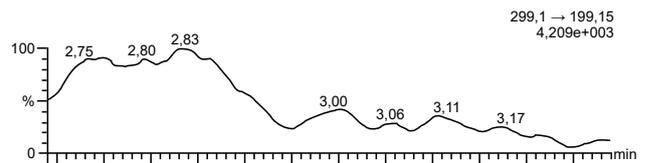
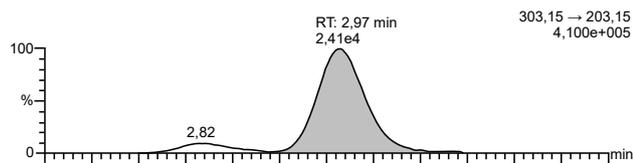
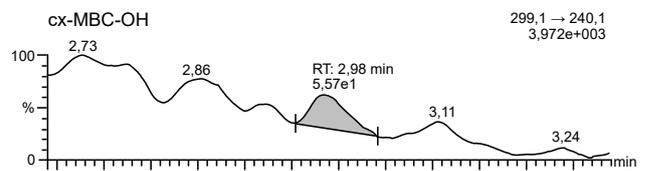
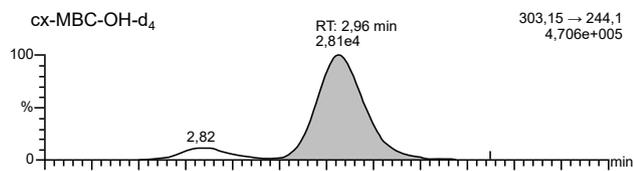
7 Analytische Bestimmung

Die unter [Abschnitt 6](#) angegebenen Geräteparameter werden eingestellt und 50 µl der nach [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeiteten Analysenprobe in das LC-MS/MS-System injiziert. Dabei wird die injizierte Probe auf der Vorsäule (X Bridge C8 Direct Connect HP; Anreicherungsäule) angereichert und gereinigt. Nach 0,5 Minuten erfolgt die Elution durch Rückspülung auf die analytische Säule. Danach erfolgt die eigentliche analytische Trennung auf der Acquity UPLC-HSS C18. Zur Identifizierung der Analyten werden die Retentionszeiten und die Übergänge der jeweiligen Substanzen verwendet und die Qualifier-Massenübergänge als optionaler Identifikationsparameter eingesetzt. [Abbildung 3](#) zeigt beispielhaft Chromatogramme a) eines Reagenzienleerwerts, b) einer nativen Urinprobe und c) einer mit 1,0 µg cx-MBC bzw. cx-MBC-OH/l dotierten Urinprobe.

a)



b)



c)

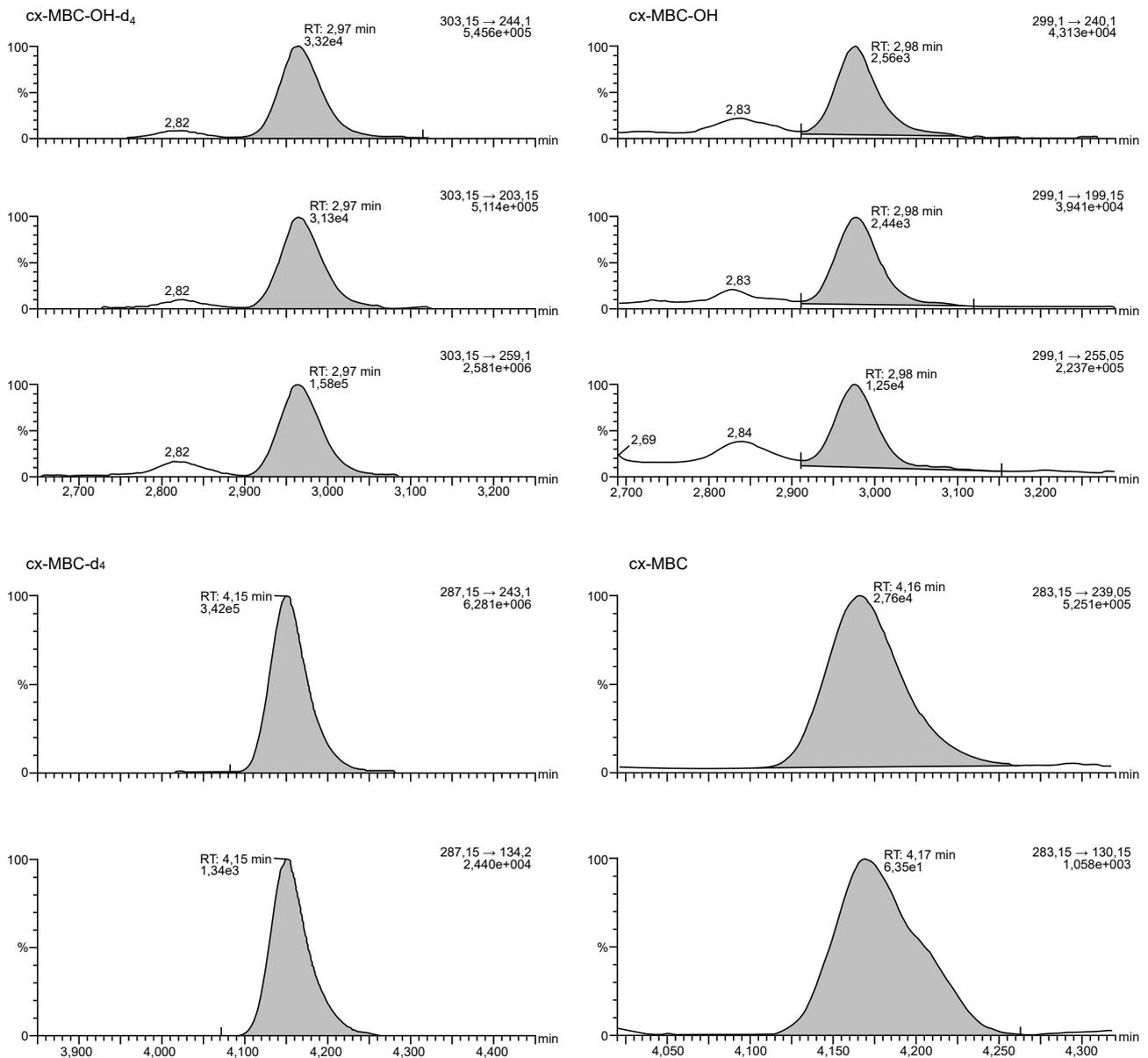


Abb. 3 Chromatogramme a) eines Reagenzienleerwerts, b) einer nativen Urinprobe und c) einer mit 1,0 µg cx-MBC bzw. cx-MBC-OH/I dotierten Urinprobe

8 Kalibrierung

Die Kalibrierlösungen werden wie in [Abschnitt 4.6](#) beschrieben hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Quotienten aus den Peakflächen der Analyten und der zugehörigen ISTDs gegen die jeweils dotierten Analytkonzentrationen aufgetragen werden. Beim Auftreten von Leerwerten müssen diese durch Subtraktion von allen Messpunkten berücksichtigt werden.

Am eingesetzten Analysengerät wurde für beide Analyten ein linearer Messbereich von der Nachweisgrenze bis 200 µg/l ermittelt. **Abbildung 4** zeigt exemplarische Kalibriergeraden für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin in einem Konzentrationsbereich bis 20 µg/l.

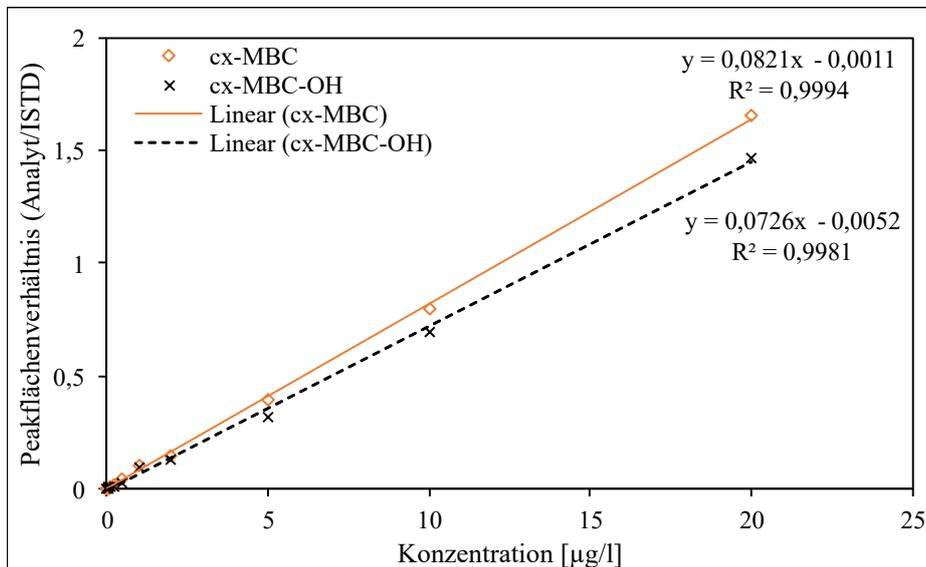


Abb. 4 Kalibriergeraden für die Bestimmung von cx-MBC bzw. cx-MBC-OH in Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die ermittelten Peakflächen der 4-MBC-Metaboliten werden durch die Peakflächen des zugehörigen deuterierten ISTD dividiert. Mit den so erhaltenen Quotienten berechnet man die Analytkonzentration in µg/l unter Anwendung der ermittelten Kalibrierfunktion. Eventuelle Reagenzienleerwerte müssen durch Subtraktion berücksichtigt werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung erfolgte die Berechnung der Analytkonzentrationen mit der Gerätesoftware MassLynx 4.1 von Waters GmbH, Eschborn.

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 der einzelnen Analysenserien werden mindestens drei Urine mit bekannten Analytkonzentrationen parallel zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Da für die 4-MBC-Metaboliten keine käuflichen Kontrollmaterialien zur Verfügung stehen, müssen diese selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolurin von nicht beruflich gegen 4-MBC exponierten Personen eingesetzt und beispielsweise mit 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC und cx-MBC-OH pro Liter dotiert.

Gleichzeitig werden mit jeder Analysenserie mindestens drei Leerwerte analysiert, um eventuell vorliegende Störungen aus den Reagenzien, der Matrix oder den ISTDs zu erkennen.

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 in der Serie

Die Bestimmung der Präzision in der Serie erfolgte in Poolurin. Jeweils zehn Proben zu je 0,5 ml Urin wurden dabei mit 0,5 µg, 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC und cx-MBC-OH pro Liter Urin dotiert. Diese Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet ([Abschnitt 5.2](#)) und analysiert ([Abschnitt 7](#)). Die ermittelten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 8](#) aufgeführt.

Tab. 8 Präzision in der Serie für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin (n = 6 oder 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl der Wiederholungsmessungen n	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
cx-MBC	0,5 ^{a)}	6	4,1	10,6
	1,0	10	3,3	7,3
	10	10	2,8	6,3
	100	10	2,2	4,8
cx-MBC-OH	0,5 ^{a)}	6	6,2	15,9
	1,0	10	6,1	13,7
	10	10	4,0	8,9
	100	10	1,4	3,2

^{a)} Diese Daten stammen von den Prüfern der Methode.

11.2 Richtigkeit

Relative Wiederfindung

Die mittlere relative Wiederfindung wurde aus den Daten der Präzision in der Serie berechnet. Die so ermittelten Wiederfindungen sind in [Tabelle 9](#) zusammengefasst.

Tab. 9 Relative Wiederfindungen für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin (n = 6 oder 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl der Wiederholungsmessungen n	Wiederfindung (rel.) r [%]	Bereich [%]
cx-MBC	0,5 ^{a)}	6	99	–
	1,0	10	90	85–93
	10	10	98	95–105
	100	10	110	105–113
cx-MBC-OH	0,5 ^{a)}	6	89	–
	1,0	10	89	84–100
	10	10	92	87–99
	100	10	106	104–108

^{a)} Diese Daten stammen von den Prüfern der Methode.

11.3 Matrixeffekte

Vergleich der absoluten Peakflächen

Von den Prüfern der Methode wurde der Einfluss der Urinmatrix auf die Signalintensitäten abgeschätzt. Dazu wurden sowohl Urin als auch hochreines Wasser mit den beiden Analyten in zwei Konzentrationen (0,5 µg/l und 100 µg/l) dotiert. Diese Proben wurden sechsfach (Urin) oder dreifach (Wasser) aufgearbeitet und gemessen und die Peakflächen der Analyten und der dazugehörigen ISTDs verglichen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in [Tabelle 10](#) dargestellt.

Tab. 10 Einfluss der Urinmatrix auf die Peakflächen der Analyten und ISTD (n = 6); die Peakflächen der in hochreinem Wasser angesetzten Proben (n = 3) wurden auf 100 % gesetzt

Substanz	Dotierte Konzentration [µg/l]	Verhältnis Peakfläche in Urin/Peakfläche in Wasser [%]
cx-MBC	0,5	77,4
	100	79,5
cx-MBC-d ₄	0,5	89,4
	100	84,6
cx-MBC-OH	0,5	59,0
	100	41,0
cx-MBC-OH-d ₄	0,5	58,5
	100	48,9

Einfluss verschiedener Urinmatrices

Von den Entwicklern der Methode wurde der Einfluss verschiedener Urinmatrices auf Präzision und Wiederfindung untersucht. Dazu wurden zehn native Urinproben (Kreatiningehalte von 0,40–3,17 g/l) jeweils mit 1,0 µg, 10 µg oder 100 µg cx-MBC und cx-MBC-OH pro Liter Urin dotiert. Anschließend wurden die Urinproben aufgearbeitet und analysiert.

Die gemessenen Konzentrationen sind unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung in [Tabelle 11](#) zusammengefasst. Aus [Tabelle 11](#) ist ersichtlich, dass die individuelle Urinmatrix keinen Einfluss auf die Präzision und die Richtigkeit der Messergebnisse hat.

Tab. 11 Einfluss verschiedener Urinmatrices auf die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s _w [%]	Wiederfindung r (Bereich) [%]
cx-MBC	1,0	0,91	5,3	91 (84,7–99,8)
	10	9,61	4,0	96,1 (90,3–105)
	100	108	3,6	108 (99,5–112)
cx-MBC-OH	1,0	0,97	10,6	97 (84,5–109)
	10	9,11	7,8	91,1 (82,8–105)
	100	105	4,8	105 (98,7–117)

11.4 Absolute Wiederfindung

Da bei der hier beschriebenen Methode die Probenanreicherung und -aufreinigung im Wesentlichen mittels online-SPE automatisiert stattfand, erschien die Bestimmung der absoluten Wiederfindung durch Probendotierung vor und nach der Probenvorbereitung nicht sinnvoll.

11.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Bei einer Analytkonzentration von 0,1 µg pro Liter Urin liegt das Signal/Rausch-Verhältnis bei 1 : 25 für cx-MBC und bei 1 : 10 für cx-MBC-OH. Die Ermittlung von robusten, routinetauglichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte unter Verwendung der sechs untersten Kalibriermesspunkte der Kalibriergeraden in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 (DIN 2008). Die aus der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} (Nachweisgrenze = $4 \times s_{x0}$) berechneten Werte sind in [Tabelle 12](#) aufgeführt und repräsentieren die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Routineanalytik.

Tab. 12 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH in Urin

Analyt	aus Verfahrensstandardabweichung s_{x0}	
	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
cx-MBC	0,05	0,15
cx-MBC-OH	0,1	0,3

11.6 Störeinflüsse

Die Prüfer der Methode haben zunächst zwei im Prüflabor zur Verfügung stehende Säulen getestet. Als Anreicherungs säule wurde eine Strata C8 On-Line Extraction Column (2,1 × 20 mm, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg) und als Trennsäule eine Acquity UPLC HSS C18 (1,8 µm, 2,1 × 100 mm, Waters GmbH, Eschborn) verwendet. Beide Säulen entsprachen in ihren Spezifikationen im Wesentlichen den in der Originalvorschrift verwendeten Säulen, waren allerdings kürzer (20 mm statt 30 mm bei der Anreicherungs säule und 100 mm statt 150 mm bei der Trennsäule). Die mit dieser Säulenkombination erhaltenen Retentionszeiten waren für beide Metaboliten um etwa 0,5 min kürzer als die mit den Originalsäulen erhaltenen Retentionszeiten. Weiterhin konnten störende Einflüsse aus der Matrix nicht ausreichend abgetrennt werden, so dass auf den MRM-Spuren beider Metaboliten aus dem Urin stammende Interferenzen auftraten, welche sich negativ auf die Leistungsfähigkeit der Methode auswirkten. So lagen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen etwa um Faktor 4 höher als später mit den Originalsäulen ermittelt.

Bei der Verwendung unterschiedlicher Tandem-Massenspektrometer können die Massenübergänge unterschiedlich stark ausgeprägt sein, was eine Anpassung der Methode erforderlich machen kann. Bei der Methodenprüfung konnten die Qualifier-Übergänge für cx-MBC und dessen internen Standard, cx-MBC-d₄, beim Einsatz eines anderen Massenspektrometers nicht bestätigt werden, wobei diese Qualifierübergänge bereits bei der Entwicklung der Methode relativ geringe Intensitäten aufwiesen.

Für beide Analyten wurden im Reagenzienleerwert keine relevanten Störungen identifiziert. Die Prüfer der Methode beobachteten allerdings in den Urinleerwerten (Kalibrierstandard 00 (ohne Analyt- und ISTD-Zusatz) und Kalibrierstandard 0 (ohne Analyt-, aber mit ISTD-Zusatz)) matrixbedingte Interferenzen. So fanden sich in gepooltem Urin in unmittelbarer Nähe zu den Retentionszeiten der eigentlichen Analytpeaks sowohl auf der MRM-Spur von cx-MBC als auch auf der von cx-MBC-OH aus dem Urin stammende Störpeaks, die chromatographisch nur teilweise abgetrennt werden konnten. Werden diese Störsignale nicht zuverlässig chromatographisch abgetrennt, können daraus deutlich höhere Bestimmungsgrenzen resultieren.

Durch einen Vergleich dotierter Urine mit dotiertem hochreinem Wasser wurde vor allem für den Metaboliten cx-MBC-OH ein Matrixeffekt festgestellt, der zu einer verminderten Signalintensität führte. Da dieser Matrixeffekt aber in allen Einzelurinen beständig auftrat und sowohl das Signal des Analyten als auch des zugehörigen deuterierten ISTD betraf, beeinflusst der Effekt nicht die Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse.

Es sei noch angemerkt, dass die Effizienz der enzymatischen Spaltung nicht geprüft werden konnte, da keine konjugierten Referenzsubstanzen verfügbar waren.

12 Diskussion der Methode

Die vorliegende Analysenmethode wurde entwickelt, um die beiden Hauptmetaboliten von 4-MBC, cx-MBC und cx-MBC-OH, im Urin zu quantifizieren und somit die Exposition der Allgemeinbevölkerung gegen 4-MBC, einen UVB-Filter in Sonnencremes und weiteren kosmetischen Produkten, abschätzen zu können. Die Methode erlaubt eine schnelle, selektive und sensitive Bestimmung von cx-MBC und cx-MBC-OH im Urin. Unter Berücksichtigung neuester Geräteentwicklungen wurde eine robuste UPLC-MS/MS-Methode unter Anwendungen der Säulenschalttechnik, die die Aufreinigung und chromatographische Trennung der Analyten in einem Messzyklus ermöglicht, entwickelt.

Tests unter Verwendung einer HPLC-MS/MS-Anlage waren aufgrund der ungenügenden Trennleistung der zur Verfügung stehenden Chromatographie-Säulen nicht erfolgreich. Die Verwendung eines UPLC-Gerätes ermöglichte durch den hohen Druck und die neuen kompakteren Trennmaterialien eine wesentlich bessere chromatographische Auflösung.

Der Einsatz strukturidentischer, deuterierter interner Standards in Kombination mit der geschilderten hohen chromatographischen Auflösung ermöglichte die Kompensation der bis dahin immer wieder beobachteten analytischen Schwankungen, was durch die sehr guten Präzisionsdaten bestätigt wird. Bei Analytkonzentrationen von 0,5 µg/l, 1,0 µg/l, 10 µg/l und 100 µg/l wurden relative Standardabweichungen von 2,2–4,1% für cx-MBC und 1,4–6,2% für cx-MBC-OH als Präzision in der Serie ermittelt. Auf die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde zugunsten von Aufstockversuchen verzichtet. Die Ergebnisse nach Dotierung von zehn individuellen Urinen verdeutlichen die Robustheit der Analysenmethode, da auch bei der Dotierung von 0,5 µg/l die ermittelten relativen Standardabweichungen deutlich unter 20% liegen. Insofern bestätigen die Aufstockversuche auch die kalkulierten Bestimmungsgrenzen von 0,15 µg/l für cx-MBC und 0,3 µg/l für cx-MBC-OH.

Bei der Anwendung der Methode auf Urinproben aus der Umweltprobenbank konnte der Parameter cx-MBC in 30% der Proben und der Parameter cx-MBC-OH in 6,4% der Proben quantifiziert werden (Schmidtkunz et al. 2023), so dass die Methode geeignet zu sein scheint, entsprechend exponierte Personen der Allgemeinbevölkerung zu identifizieren und deren Exposition mit 4-MBC zu quantifizieren.

Der für die Summe beider Metaboliten im Urin vorgeschlagene HBM-I-Wert von 470 µg/l für Erwachsene und 310 µg/l für Kinder verdeutlicht, dass die Nachweisempfindlichkeit der vorliegenden Analysenmethode sehr gut geeignet ist, um bedenklich hohe Belastungen zuverlässig erfassen zu können.

Verwendete Messgeräte: UPLC-MS/MS-System (Waters Acquity gekoppelt mit Waters Xevo-TQS Tandem-Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn) (Methodenentwickler); Shimadzu LC-System gekoppelt an ein SCIEX QTRAP 6500+ MS/MS (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt) (Methodenprüfer)

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

- Ao J, Yuan T, Gu J, Ma Y, Shen Z, Tian Y, Shi R, Zhou W, Zhang J (2018) Organic UV filters in indoor dust and human urine: a study of characteristics, sources, associations and human exposure. *Sci Total Environ* 640–641: 1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.367>
- Bader M, Barr D, Gönen 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>

- Balmer ME, Buser H-R, Müller MD, Poiger T (2005) Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environ Sci Technol* 39(4): 953–962. <https://doi.org/10.1021/es040055r>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Ärztebl* 111(38): A1583–A1618
- Cunha SC, Trabalón L, Jacobs S, Castro M, Fernandez-Tejedor M, Granby K, Verbeke W, Kwadijk C, Ferrari F, Robbens J, Sioen I, Pocurull E, Marques A, Fernandes JO, Domingo JL (2018) UV-filters and musk fragrances in seafood commercialized in Europe Union: occurrence, risk and exposure assessment. *Environ Res* 161: 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.015>
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021) Member State Committee support document for identification of (±)-1,7,7-trimethyl-3-[(4-methylphenyl)methylene]bicyclo[2.2.1]heptan-2-one covering any of the individual isomers and/or combinations thereof (4-MBC) as a substance of very high concern because of its endocrine disrupting properties (article 57(f) – human health). Adopted on 29 November 2021. Helsinki: ECHA. <https://echa.europa.eu/documents/10162/6a6d37ea-30ea-5cc5-74f7-6c1f6e678fc0>, abgerufen am 01 Jul 2024
- Europäische Kommission (2024) Verordnung (EU) 2024/996 der Kommission vom 3. April 2024 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Verwendung von Vitamin A, Alpha-Arbutin und Arbutin sowie bestimmter Stoffe mit potenziell endokrinschädigenden Eigenschaften in kosmetischen Mitteln. *ABl L* (996): 1–8
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat (2009) Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel (Neufassung). *ABl L* (342): 59–209
- Hauri U, Lütolf B, Hohl C (2003) Determination of organic sunscreen filters in cosmetics with HPLC/DAD. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 94(1): 80–92
- HBM-Kommission (Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamts) (2016) Stoffmonographie für 3-(4-Methylbenzyliden)-kämpfer (4-MBC) – HBM-Werte für die Summe der Metaboliten 3-(4-Carboxybenzyliden)-kämpfer (3-4CBC) und 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-Hydroxykämpfer (3-4CBHC) im Urin von Erwachsenen und Kindern. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamts. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 59(1): 132–150. <https://doi.org/10.1007/s00103-015-2272-9>
- Kerr AC (2011) A survey of the availability of sunscreen filters in the UK. *Clin Exp Dermatol* 36(5): 541–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2010.04007.x>
- Leng G, Gries W (2017) New specific and sensitive biomonitoring methods for chemicals of emerging health relevance. *Int J Hyg Environ Health* 220(2 Pt A): 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.014>
- Manová E, von Goetz N, Hauri U, Bogdal C, Hungerbühler K (2013) Organic UV filters in personal care products in Switzerland: a survey of occurrence and concentrations. *Int J Hyg Environ Health* 216(4): 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.08.003>
- Murawski A, Schmied-Tobies MIH, Rucic E, Schmidtkunz C, Küpper K, Leng G, Eckert E, Kuhlmann L, Göen T, Daniels A, Schwedler G, Kolossa-Gehring M (2021) Metabolites of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), butylated hydroxytoluene (BHT), and tris(2-ethylhexyl) trimellitate (TOTM) in urine of children and adolescents in Germany – human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V (2014–2017). *Environ Res* 192: 110345. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110345>
- Negreira N, Rodríguez I, Rubi E, Cela R (2009) Determination of selected UV filters in indoor dust by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(31): 5895–5902. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.020>
- Poiger T, Buser H-R, Balmer ME, Bergqvist P-A, Müller MD (2004) Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55(7): 951–963. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.012>
- SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers) (2004) Opinion concerning 4-methylbenzylidene camphor COLIPA n° S60. SCCNFP/0779/04. Brussels: European Commission. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out282_en.pdf, abgerufen am 27 Jun 2024
- SCCP (Scientific Committee on Consumer Products) (2006) Opinion on 4-methylbenzylidene camphor COLIPA N° S60. SCCP/1042/06. Brussels: European Commission. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_075.pdf, abgerufen am 10 Jul 2023
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2022) Scientific opinion on 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), preliminary version of 22 December 2021, final version of 29 April 2022. SCCS/1640/21. Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2875/915957>
- Schauer UMD, Völkel W, Heusener A, Colnot T, Broschard TH, von Landenberg F, Dekant W (2006) Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(2): 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.05.011>
- Schmidtkunz C, Küpper K, Weber T, Leng G, Kolossa-Gehring M (2023) A time trend of urinary 4-methylbenzylidene camphor metabolites in young adults from Germany. *Environ Res* 228: 115833. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115833>
- Völkel W, Colnot T, Schauer UMD, Broschard TH, Dekant W (2006) Toxicokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(2): 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.05.012>