

Climbazol – Bestimmung von Dihydroxy-climbazol und Carboxyhydroxyclimbazol in Urin mittels UPLC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Climbazol; Biomonitoring; Urin;
UPLC-MS/MS

K. Küpper¹

C. Schmidtkunz¹

I. Schönraht¹

W. Gries¹

G. Leng¹

G. Scherer²

M. Scherer²

K. Riedel²

T. Göen^{3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

¹ Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SIT-ABG-GS-BLM – Institut für Biomonitoring, Chempark Gebäude 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:

Küpper K, Schmidtkunz C, Schönraht I, Gries W, Leng G, Scherer G, Scherer M, Riedel K, Göen T, Hartwig A, MAK Commission.
Climbazol – Bestimmung von Dihydroxyclimbazol und Carboxyhydroxyclimbazol in Urin mittels UPLC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2026 Sep;11(3):Doc056. https://doi.org/10.34865/bi3808317d11_3or

Manuskript abgeschlossen:
16 Nov 2023

Publikationsdatum:
30 Sep 2026

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 this analytical method for the determination of two important urinary metabolites of climbazole – dihydroxy-climbazole ((OH)₂-climbazole) and carboxyhydroxyclimbazole (cx-OH-climbazole). For the quantitation of the analytes, enzymatic hydrolysis of the urine sample is followed by online SPE-UPLC-MS/MS. The two diastereomers of (OH)₂-climbazole are resolved chromatographically, and thus quantified separately. On the other hand, the diastereomers of cx-OH-climbazole coelute in one single peak. Calibration is performed using calibration standards prepared in pooled urine and processed analogously to the samples to be analysed. (OH)₂-climbazole-D₆ and cx-OH-climbazole-D₆ are applied as internal standards. The method provides reliable and accurate analytical results, as shown by the good precision data with standard deviations no greater than 9.2%. Good accuracy data were obtained with a mean relative recovery in the range of 96.9–102%. The method is both selective and sensitive, and provides a quantitation limit of 0.5 µg/l for (OH)₂-climbazole (per diastereomer) and cx-OH-climbazole (sum of diastereomers), respectively. The method enables the determination of occupational and environmental exposure to climbazole.

1 Kenndaten der Methode

Matrix und analytisches Messprinzip

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

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
1-(4-Chlorphenoxy)-1-(imidazol-1-yl)-3,3-dimethylbutan-2-on (Climbazol)	38083-17-9	4-(4-Chlorphenoxy)-3-hydroxy-4-(1H-imidazol-1-yl)-2,2-dimethylbutansäure (Carboxyhydroxyclimbazol; cx-OH-Climbazol)	3029805-89-5
		4-(4-Chlorphenoxy)-4-(1H-imidazol-1-yl)-2,2-dimethylbutan-1,3-diol (Dihydroxyclimbazol; (OH) ₂ -Climbazol)	3029805-86-2

Zuverlässigkeitskriterien

(OH)₂-Climbazol – Diastereomer 1

Die genaue Konfiguration des Diastereomers 1 ist nicht bekannt, siehe auch [Abschnitt 4.2](#).

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,2\%$, $7,2\%$ bzw. $6,4\%$
	Streubereich	$u = 21,8\%$, $16,9\%$ bzw. $15,1\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{g}$ oder $100\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1) pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,0\%$, $3,6\%$ bzw. $4,2\%$
	Streubereich	$u = 15,5\%$, $9,3\%$ bzw. $10,8\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{g}$ oder $100\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1) pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.)	$r = 101\%$, 102% bzw. $98,2\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{g}$ oder $100\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1) pro Liter Urin und $n = 48$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,2\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1) pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,5\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1) pro Liter Urin	

(OH)₂-Climbazol – Diastereomer 2

Die genaue Konfiguration des Diastereomers 2 ist nicht bekannt, siehe auch [Abschnitt 4.2](#).

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$, $3,6\%$ bzw. $3,5\%$
	Streubereich	$u = 11,6\%$, $8,6\%$ bzw. $8,3\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{g}$ oder $100\ \mu\text{g}$ (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2) pro Liter Urin und $n = 8$ Bestimmungen	

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg oder 100 µg (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2) pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 3,0\%, 2,5\%$ bzw. $2,9\%$ $u = 7,8\%, 6,5\%$ bzw. $7,5\%$
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg oder 100 µg (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2) pro Liter Urin und n = 48 Bestimmungen	$r = 99,0\%, 102\%$ bzw. $96,9\%$
Nachweisgrenze:	0,2 µg (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2) pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,5 µg (OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2) pro Liter Urin	

cx-OH-Climbazol

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg oder 100 µg cx-OH-Climbazol pro Liter Urin und n = 8 Bestimmungen	$s_w = 7,2\%, 7,6\%$ bzw. $2,5\%$ $u = 17,0\%, 18,0\%$ bzw. $5,8\%$
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg oder 100 µg cx-OH-Climbazol pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 3,5\%, 2,5\%$ bzw. $3,5\%$ $u = 9,0\%, 6,5\%$ bzw. $8,9\%$
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 1 µg, 10 µg oder 100 µg cx-OH-Climbazol pro Liter Urin und n = 48 Bestimmungen	$r = 99,3\%, 102\%$ bzw. $99,9\%$
Nachweisgrenze:	0,2 µg cx-OH-Climbazol pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,5 µg cx-OH-Climbazol pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu Climbazol

Climbazol (1-(4-Chlorphenoxy)-1-(imidazol-1-yl)-3,3-dimethylbutan-2-on) ist ein weißer bis hellbrauner kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 96,6 °C. Bei 25 °C beträgt die Wasserlöslichkeit der Substanz 58 mg/l (pH 7,4) und der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient 3,83 (pH 10), wobei beide Werte stark vom pH-Wert abhängen. (ECHA 2024). Aufgrund seiner antimykotischen Wirkung wird Climbazol als Konservierungsmittel in Kosmetika (Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2009), in Veterinärprodukten (Cavana et al. 2015 a, b) und in Fingermalfarben (DIN 2025) eingesetzt. Darüber hinaus wird es als Wirkstoff gegen Schuppen in Haarshampoos verwendet (Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2009) und als Antimykotikum in Humanarzneimitteln und Veterinärprodukten (Cavana et al. 2015 a, b; Difonzo et al. 2017).

Da Climbazol in der Umwelt als endokriner Disruptor wirkt, ist die Verwendung von Climbazol in kosmetischen Produkten in der EU begrenzt (ECHA 2024; SCCP 2009; SCCS 2018). So dürfen Haarwässer, Gesichtsscremes oder Produkte für die Fußpflege bis zu 0,2 % und Shampoos bis zu 0,5 % Climbazol als Konservierungsmittel enthalten, während in Anti-Schuppenshampoos bis zu 2,0 % Climbazol als aktive Substanz zugesetzt werden dürfen (Europäische Kommission 2019; Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2009). Die Climbazolgehalte in den Veterinärprodukten orientieren sich an den vom *Scientific Committee on Consumer Safety* beschlossenen Werten (Cavana et al. 2015 a, b; SCCS 2018). Climbazol wurde von der MAK-Kommission bisher noch nicht bewertet.

Zu Climbazol lagen lange Zeit vor allem Studien aus den 1970er und 1980er Jahren vor (SCCP 2005). In diesen Studien wurden neben der Toxizität auch Verstoffwechselung und Ausscheidung nach dermalen bzw. oraler Exposition gegen

Climbazol untersucht. Die Zuverlässigkeit und Aussagekraft dieser Studien sind allerdings begrenzt, da sie noch vor Einführung der GLP (*Good Laboratory Practice*; Gute Laborpraxis) und mit nicht mehr aktuellen Analysemethoden, wie beispielsweise der Dünnschichtchromatographie-Densitometrie, durchgeführt wurden.

Die orale Verabreichung von Climbazol wurde in vivo an der Maus, an der Ratte, am Hund und am Menschen untersucht (Bayer AG 1976 (Ref. 67), 1977 (Ref. 18), 1979 (Ref. 25), 1980 (Ref. 22) nach SCCP 2005; Schönraht et al. 2024 a, 2025). Bei den Versuchstieren wurden zu mehreren Zeitpunkten nach oraler Gabe Climbazol und der Metabolit Hydroxyclymbazol (1-(4-Chlorphenoxy)-1-(1-imidazolyl)-3,3-dimethyl-2-butanol; OH-Climbazol; siehe Abbildung 1) im Plasma bestimmt (Bayer AG 1976 (Ref. 67), 1977 (Ref. 18), 1980 (Ref. 22) nach SCCP 2005). Die Studien zeigten, dass Climbazol nach oraler Gabe schnell gastrointestinal resorbiert und zu OH-Climbazol metabolisiert wird. Bei der Probandenstudie der Bayer AG (n = 1; 2 mg Climbazol/kg Körpergewicht; Bayer AG 1979 (Ref. 25) nach SCCP 2005) wurden Climbazol und OH-Climbazol über einen Zeitraum von 24 Stunden nach oraler Aufnahme sowohl im Plasma als auch im Urin quantifiziert. Die Menge des innerhalb von 24 h mit dem Urin ausgeschiedenen Climbazols und OH-Climbazols betrug nur einen Bruchteil (0,05 %) der verabreichten Dosis (Bayer AG 1979 (Ref. 25) nach SCCP 2005).

Der Metabolismus des Climbazols nach oraler Aufnahme wurde im Rahmen der BMU-VCI-Initiative erneut untersucht, wobei Dihydroxyclymbazol (4-(4-Chlorphenoxy)-4-(1H-imidazol-1-yl)-2,2-dimethylbutan-1,3-diol; (OH)₂-Climbazol) und Carboxyhydroxyclymbazol (4-(4-Chlorphenoxy)-3-hydroxy-4-(1H-imidazol-1-yl)-2,2-dimethylbutansäure; cx-OH-Climbazol) als Biomarker zum Einsatz kamen. Diese bislang nicht beschriebenen Biomarker wurden in Analogie zum bereits aufgeklärten Metabolismus des strukturverwandten Triadimefon postuliert (Schmidt Kunz et al. 2021). Fünf Probanden nahmen Climbazol als einmalige orale Dosis (49–77 µg Climbazol/kg Körpergewicht), anschließend wurden (OH)₂-Climbazol sowie cx-OH-Climbazol über einen Zeitraum von 48 Stunden nach oraler Aufnahme im Urin quantifiziert. In dieser Untersuchung wurden 23,9 % (18,0–33,4 %) der oralen Climbazoldosis innerhalb von 48 Stunden in Form von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol mit dem Urin ausgeschieden (Schönraht et al. 2024 a, 2025). Das gefundene Metabolitenverhältnis (OH)₂-Climbazol zu cx-OH-Climbazol betrug etwa 2 : 1 und die mittleren Halbwertszeiten der zweiphasigen Elimination betrugen 2,63 h und 10,69 h für (OH)₂-Climbazol sowie 2,57 h und 12,17 h für cx-OH-Climbazol (Schönraht et al. 2024 a).

Hinsichtlich der dermalen Resorption liegen neben In-vivo-Studien aus den 1970er und 1980er Jahren (Bayer AG 1979 (Ref. 21), 1979 (Ref. 23), 1979 (Ref. 68), 1980 (Ref. 20) nach SCCP 2005) auch aktuelle In-vitro- und In-vivo-Studien (Champmartin et al. 2025; Schönraht et al. 2024 a, 2025) vor. Eine vergleichende Zusammenstellung von Ergebnissen aus Diffusionszellenversuchen aus den Jahren 2006 bis 2025 wurde von Champmartin et al. (2025) publiziert. Von den bei Champmartin et al. (2025) aufgeführten Studien wurde auf europäischer Ebene (ECHA 2024; SCCP 2009) die Procter & Gamble-Studie (2006 nach SCCP 2009) herangezogen, um mit der von den Autoren angegebenen mittleren dermalen Resorptionsrate den Abstand zum NOEL bei Anwendung climbazolhaltiger Kosmetika zu berechnen. In dieser Publikation wurde basierend auf In-vitro-Resorptionsuntersuchungen (OECD 2004) errechnet, dass bei Shampooformulierungen mit 2 % Climbazol unter Rinse-off-Bedingungen 0,15 % des Climbazols systemisch verfügbar sind. Hingegen kommen Champmartin et al. (2025) bei ihren Diffusionszellenversuchen unter Verwendung frischer menschlicher Haut zu dem Schluss, dass eine alleinige Quantifizierung des nicht-metabolisierten Climbazols in der Rezeptorlösung der Diffusionszelle zu einer deutlichen Unterschätzung der dermalen Resorption führen kann. Diese Autoren wiesen in der Rezeptorlösung neben Climbazol die zwei Diastereomere des monohydroxylierten Climbazolmetaboliten nach, die 67 % der resorbierten Dosis ausmachten. Insgesamt (Climbazol + Diastereomere des OH-Climbazols) wurden 57 % der auf die Haut aufgetragenen Dosis resorbiert, und weitere 12,5 % lagen innerhalb der Hautproben vor, woraus eine mögliche systemische Verfügbarkeit von rund 70 % einer dermal applizierten Dosis abgeleitet wurde (Champmartin et al. 2025).

In vier In-vivo-Studien der Bayer AG (Bayer AG 1979 (Ref. 21), 1979 (Ref. 23), 1979 (Ref. 68), 1980 (Ref. 20) nach SCCP 2005) wurde die Verwendung climbazolhaltiger Produkte nachgestellt und die dermale Aufnahme erfasst. Dazu wurden die Climbazol- und OH-Climbazolkonzentrationen bis zu 24 Stunden nach Applikation in Plasma (Bayer AG 1980 (Ref. 20) nach SCCP 2005) oder in Plasma und Urin (Bayer AG 1979 (Ref. 21), 1979 (Ref. 23), 1979 (Ref. 68) nach SCCP 2005) quantifiziert. Die genannten In-vivo-Studien zeigen eindeutig, dass Climbazol perkutan resorbiert wird. Nach vierzigmaligem Händewaschen mit einem climbazolhaltigen Shampoo (2 %) wurde eine maximale Analytenkonzentration von 20 µg/l im Plasma und 5 µg/l im Urin erreicht (Bayer AG 1979 (Ref. 21) nach SCCP 2005). Nach der

Haarwäsche mit demselben Shampoo lag die maximale Analytkonzentration im Plasma bei 4 µg Climbazol/l und 5 µg OH-Climbazol/l, während keiner der beiden Analyten im Urin nachgewiesen werden konnte (Bayer AG 1979 (Ref. 23) nach SCCP 2005).

Die dermale Anwendung eines climbazolhaltigen Shampoos sowie einer climbazolhaltigen Haarlotion wurde auch in der Metabolismusstudie von Schönrrath et al. (2024 a, 2025) an drei Probanden untersucht. Dabei wurde die Ausscheidung der Climbazolmetaboliten (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Applikation quantifiziert. Nach Anwendung des Shampoos wurden bis zu 0,4% des applizierten Climbazols dermal resorbiert, nach Anwendung der Haarlotion bis zu 9,3%. Systemische Aufnahme und Exkretion verliefen dabei deutlich langsamer als nach oraler Aufnahme und die Ausscheidung war zum letzten Probenahmezeitpunkt noch nicht abgeschlossen (Schönrrath et al. 2024 a, 2025). Das Verhältnis der Climbazolmetaboliten (OH)₂-Climbazol zu cx-OH-Climbazol in den Urinproben lag bei 4 : 1 (Haarlotion) bzw. 3 : 1 (Haarshampoo) und die Eliminationshalbwertszeiten betrugen bis zu 28,9 h und 33,0 h für (OH)₂-Climbazol bzw. cx-OH-Climbazol (Schönrrath et al. 2024 a).

Was eine mögliche Exposition anbelangt, so können Beschäftigte sowohl bei der Synthese, Aufreinigung und Abfüllung des Climbazols als auch bei der Herstellung climbazolhaltiger Endprodukte gegen die Substanz exponiert sein. Zudem kann von einer Exposition bei der beruflichen Anwendung climbazolhaltiger Produkte ausgegangen werden (Friseure, Veterinäre, Landwirte). Die Allgemeinbevölkerung ist vor allem durch die Verwendung climbazolhaltiger Kosmetikprodukte und die Anwendung climbazolhaltiger Produkte für Haustiere exponiert. Da Climbazol sehr stabil ist und durch die Wasseraufbereitung nicht vollständig entfernt wird, ist auch eine Exposition über das Trinkwasser und Nahrungsmittel denkbar (Creusot et al. 2020; Tröger et al. 2018).

Climbazol kommt in den vermarkteten Produkten typischerweise als 1 : 1-Mischung (Racemat) seiner beiden Enantiomere zum Einsatz (Europäische Kommission 2019). Die Verstoffwechslung zum (OH)₂- bzw. cx-OH-Climbazol führt dann zu Molekülen mit zwei chiralen Zentren, so dass insgesamt vier Stereoisomere vorliegen können.

Abbildung 1 zeigt das postulierte Metabolismusschema von Climbazol mit seinen Urinmetaboliten (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol nach Schmidtkunz et al. (2021) sowie Schönrrath et al. (2024 a). Gut erkennbar ist hier die Einführung des zweiten chiralen Zentrums durch die Reduktion der prochiralen Carbonylgruppe.

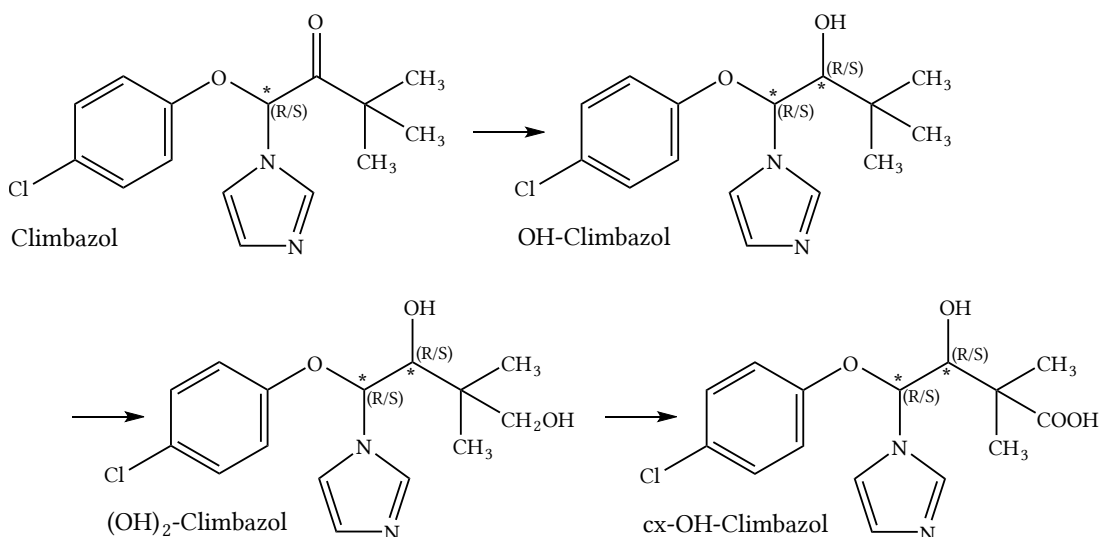


Abb. 1 Metabolismusschema von Climbazol nach Schmidtkunz et al. (2021) und Schönrrath et al. (2024 a)

3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht die selektive Bestimmung der Climbazolmetaboliten (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin. Die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol erfolgt dabei diastereoselektiv, während für cx-OH-Climbazol nur die Summe der Diastereomere analytisch zugänglich ist. Nach Zugabe der deuterierten internen Standards (ISTDs) (OH)₂-Climbazol-D₆ und cx-OH-Climbazol-D₆ erfolgt eine enzymatische Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus *E. coli*. Die Analyten werden mittels Online-SPE aufgereinigt, flüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt mit Standards, die in Poolurin angesetzt und analog zu den zu analysierenden Proben aufgearbeitet werden.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-MS/MS-Anlage mit zwei Gradientenpumpen (z.B. Waters ACQUITY UPLC H-Class mit 2D-LC-Option, gekoppelt mit einem Waters Xevo-TQ-S Tandem-Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn)
- Analytische Säule (z.B. ACQUITY UPLC HSS C18, 1,8 μ m, 2,1 mm $\times$ 150 mm, Nr. 1250977, Waters GmbH, Eschborn)
- Anreicherungssäule (z.B. EC 20/2 Chromabond HR-X, 15 μ m, 2 mm $\times$ 20 mm, Nr. 732 310.20, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- 96-Well-Mikrotiterplatten, 2 ml (z.B. Nr. 186002482, Waters GmbH, Eschborn) mit Verschlussfolie (z.B. Nr. 186002789, Waters GmbH, Eschborn) oder Verschlussmatten (Nr. 60180-M123, Thermo Fisher Scientific™, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Analysenwaage (z.B. Sartorius AG, Göttingen)
- pH-Meter (z.B. SevenCompact S220, Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Wärmeschrank (z.B. MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg)
- 400-ml-Bechergläser (z.B. Schott AG, Mainz)
- 3,5-ml-Einmalpipetten (z.B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Urinsammelbecher (z.B. aus Polypropylen) (z.B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Verschiedene Messkolben (z.B. Schott AG, Mainz)
- Multipette® (z.B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Variabel einstellbare Pipetten (1–10 μ l, 10–100 μ l sowie 100–1000 μ l) mit passenden Pipettenspitzen (z.B. Eppendorf AG, Hamburg)

4.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p.a.-Qualität zu verwenden. Als Referenzsubstanzen wurden sowohl für (OH)₂-Climbazol als auch für cx-OH-Climbazol beide Diastereomere in Auftrags-synthese hergestellt, die jeweils als Enantiomeregemische vorlagen. Eine Bestimmung der Absolutkonfiguration von „Diastereomer 1“ und „Diastereomer 2“ erfolgte nicht. Folgende Kombinationen sind möglich: (3R,4S-(OH)₂-Climbazol + 3S,4R-(OH)₂-Climbazol; 3R,4R-(OH)₂-Climbazol + 3S,4S-(OH)₂-Climbazol; 3R,4S-cx-OH-Climbazol + 3S,4R-cx-OH-Climbazol; 3R,4R-cx-OH-Climbazol + 3S,4S-cx-OH-Climbazol).

- (OH)₂-Climbazol, Diastereomer 1, 97,0 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftrags-synthese, Chiro-Block GmbH, Wolfen)

- (OH)₂-Climbazol, Diastereomer 2, 95,0 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- cx-OH-Climbazol, Diastereomer 1, 97,4 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- cx-OH-Climbazol, Diastereomer 2, 96,7 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- (OH)₂-Climbazol-D₆, Diastereomer 1, 88,9 % (qNMR, Rest: u. a. 7,8 % Tetrahydrofuran) bzw. 95,5 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- (OH)₂-Climbazol-D₆, Diastereomer 2, 91,6 % (qNMR, Rest: u. a. 5,4 % Tetrahydrofuran) bzw. 96,3 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- cx-OH-Climbazol-D₆, Diastereomer 1, 89,4 % (qNMR, Rest: u. a. 7 % Dioxan + 1 % Essigsäure) bzw. 99,4 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- cx-OH-Climbazol-D₆, Diastereomer 2, 80,0 % (qNMR, Rest: u. a. 12 % Dioxan) bzw. 97,8 % (HPLC-Flächenprozent, 210 nm) (z.B. Auftragssynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- Acetonitril, LiChrosolv® (z.B. Nr. 100030, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ameisensäure (z.B. Nr. 56302, FlukaTM, Honeywell Deutschland Holding GmbH, Offenbach)
- Ammoniumacetat für die Massenspektrometrie (z.B. Nr. 73 594, FlukaTM, Honeywell Deutschland Holding GmbH, Offenbach)
- Eisessig, Suprapur® (z.B. Nr. 100066, Merck KGaA, Darmstadt)
- β-Glucuronidase aus *E. coli* K 12 in 50 % Glycerin, ≥ 140 U/μl (z.B. Nr. 03707598001, Roche Life Science Products, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z.B. Milli-Q® IQ 7000 Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Lösungen

- Ammoniumacetatlösung (1 mol/l, pH=6,5)
In einen 500-ml-Messkolben werden 38,5 g Ammoniumacetat eingewogen und in ca. 250 ml hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit Eisessig auf pH=6,5 eingestellt und der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur sechs Monate stabil.

- Eluent A (0,1%ige Ameisensäure in hochreinem Wasser (Wasser : Ameisensäure; 99,9 : 0,1; V/V))
In einen 1000-ml-Messkolben werden etwa 500 ml hochreines Wasser vorgelegt. 1 ml Ameisensäure wird zugegeben und der Messkolben anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens eine Woche stabil.

- Eluent B (0,1%ige Ameisensäure in Acetonitril (Acetonitril : Ameisensäure; 99,9 : 0,1; V/V))
In einen 1000-ml-Messkolben werden etwa 500 ml Acetonitril vorgelegt. 1 ml Ameisensäure wird zugegeben und der Messkolben anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens eine Woche stabil.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

Als ISTDs wurden sowohl für $(\text{OH})_2$ -Climbazol als auch für cx-OH-Climbazol beide Diastereomere in Auftragsynthese hergestellt, die, wie die nicht isotopenmarkierten Referenzsubstanzen, jeweils als Enantiomergemische vorlagen. Es wurden die an den Methylgruppen sechsfach deuterierten Substanzen verwendet.

- ISTD-Stammlösung (1000 mg/l)
In je einen 10-ml-Messkolben werden 10 mg $(\text{OH})_2$ -Climbazol- D_6 (Diastereomer 1), $(\text{OH})_2$ -Climbazol- D_6 (Diastereomer 2), cx-OH-Climbazol- D_6 (Diastereomer 1) bzw. cx-OH-Climbazol- D_6 (Diastereomer 2) eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die Kolben werden anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Arbeitslösung (10 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
Je 50 μl der einzelnen ISTD-Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
1 ml der ISTD-Arbeitslösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die ISTD-Stammlösungen, die ISTD-Arbeitslösung sowie die ISTD-Dotierlösung werden bei 4 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate stabil.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (1000 mg/l)
In je einen 10-ml-Messkolben werden 10 mg $(\text{OH})_2$ -Climbazol (Diastereomer 1), $(\text{OH})_2$ -Climbazol (Diastereomer 2), cx-OH-Climbazol (Diastereomer 1) bzw. cx-OH-Climbazol (Diastereomer 2) eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die Kolben werden anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- Arbeitslösung (10 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
Je 50 μl der einzelnen Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (1 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
1 ml der Arbeitslösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung II (0,1 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
100 μl der Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung III (0,01 mg/l, jeweils als Summe der Diastereomere)
100 μl der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stamm-, Arbeits- und Dotierlösungen werden bei 4 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate stabil.

Für die Kalibrierung wird Poolurin nicht gegen Climbazol exponierter Personen verwendet. Für die Herstellung der Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,1–500 $\mu\text{g/l}$ wird der Urin in Mikrotiterplatten (alternativ: 2-ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen) nach dem in [Tabelle 1](#) dargestellten Pipettierschema mit den Dotierlösungen versetzt. Die Kalibrierstandards enthalten jeweils beide Diastereomere von $(\text{OH})_2$ -Climbazol und cx-OH-Climbazol in einem 1 : 1-Verhältnis. Zur Ermittlung des Leerwerts wird undotierter Poolurin mitgeführt.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Dotierlösung [µl]	Urin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]	ISTD-Dotierlösung [µl]
0	–	–	500	0,00	5
1	III	2,5	500	0,05	5
2	III	5	500	0,1	5
3	III	10	500	0,2	5
4	III	25	500	0,5	5
5	II	5	500	1	5
6	II	10	500	2	5
7	II	25	500	5	5
8	I	5	500	10	5
9	I	10	500	20	5
10	I	25	500	50	5

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinprobe wird in einem Urinsammelbecher (z.B. aus Polypropylen) gesammelt. Falls der Urin nicht sofort aufgearbeitet werden kann, wird ein Aliquot eingefroren und tiefgekühlt (unter –10 °C) bis zur Analyse gelagert.

5.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse wird die Urinprobe bei Raumtemperatur aufgetaut und durch Schütteln homogenisiert. Ein Aliquot von 0,5 ml Urin wird jeweils in die Vertiefung einer 96-Well-Platte (alternativ: 2-ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen) pipettiert. Nach der Zugabe von 5 µl der ISTD-Dotierlösung, 1 ml der Ammoniumacetatlösung und 5 µl der β-Glucuronidaselösung wird die 96-Well-Platte mit einer Verschlussfolie verschlossen. Die Proben werden anschließend homogenisiert und im Wärmeschrank bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. Anschließend werden 50 µl der aufgearbeiteten Proben direkt in das UPLC-MS/MS-System injiziert.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer UPLC-Anlage mit 2D-LC-Option und einem Tandem-Massenspektrometer (Waters Xevo TQ-S).

6.1 Flüssigkeitschromatographie

Anreicherungssäule:	EC 20/2 Chromabond HR-X, 15 µm, 2 mm × 20 mm
Analytische Säule:	ACQUITY UPLC HSS C18, 1,8 µm, 2,1 mm × 150 mm
Mobile Phase:	Eluent A: Wasser : Ameisensäure (99,9 : 0,1; V/V) Eluent B: Acetonitril : Ameisensäure (99,9 : 0,1; V/V)
Laufzeit:	10 min
Säulentemperatur:	50 °C

Proben temperatur:	15 °C
Injektionsvolumen:	50 µl
Gradientenprogramm der Pumpe P1:	siehe Tabelle 2
Gradientenprogramm der Pumpe P2:	siehe Tabelle 3
Ventilschaltzeiten:	siehe Tabelle 4

Der Aufbau der verwendeten 2D-LC-Apparatur sowie eine Illustration der Schaltpositionen des Sechs-Wege-Ventils sind in Schmidtkunz et al. (2021) dargestellt. Die angegebenen Parameter sind zum Teil gerätespezifisch und müssen an die jeweils verwendete LC-Anlage angepasst werden.

Tab. 2 Gradientenprogramm der Pumpe 1 für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	95	5	0,8
1,0	95	5	0,8
1,5	0	100	0,8
3,0	0	100	0,8
3,5	95	5	0,8
10,0	95	5	0,8

Tab. 3 Gradientenprogramm der Pumpe 2 für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	95	5	0,4
1,0	95	5	0,4
5,0	50	50	0,4
5,2	50	50	0,4
5,3	5	95	0,4
7,5	5	95	0,4
8,0	95	5	0,4
10,0	95	5	0,4

Tab. 4 Schaltprogramm des Sechs-Wege-Ventils

Zeit [min]	Ventilposition	Beschreibung
0–0,5	1	Anreicherung der Analyten, Equilibrierung der analytischen Säule
0,5–3,5	2	Überführung der Analyten auf die analytische Säule im Backflush-Modus, chromatographische Trennung der Analyten
3,5–10,0	1	Rekonditionierung der Anreicherungssäule über Pumpe P1, chromatographische Trennung der Analyten über Pumpe P2

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Elektrospray, positiv (ESI+)
Kapillar-Spannung:	2,0 kV
Cone-Spannung:	20 V
Quellen-Offset:	50 V
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvation-Temperatur:	400 °C
Cone-Gasfluss:	150 l/h
Desolvation-Gasfluss:	800 l/h
Kollisionsgasfluss:	0,15 ml/min
Nebulisergasfluss:	5,0 bar
Kollisionsgas:	Argon
Weitere Einstellungen:	siehe Tabelle 5

Tab. 5 Massenspektrometrische Parameter für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Analyt bzw. ISTD	Vorläufer-Ion (<i>m/z</i>)	Produkt-Ion (<i>m/z</i>)	Dwelltime [s]	Cone-Spannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Retentionszeit [min]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	311,4	69,1 ^{a)}	0,017	17,0	8,0	4,50
		111,0	0,017	17,0	58,0	
(OH) ₂ -Climbazol-D ₆ (Diastereomer 1)	317,4	69,1 ^{a)}	0,017	15,0	10,0	4,49
		121,2	0,017	15,0	14,0	
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	311,4	69,1 ^{a)}	0,017	17,0	8,0	4,56
		111,0	0,017	17,0	58,0	
(OH) ₂ -Climbazol-D ₆ (Diastereomer 2)	317,4	69,1 ^{a)}	0,017	15,0	10,0	4,55
		121,2	0,017	15,0	14,0	
cx-OH-Climbazol	325,4	69,1 ^{a)}	0,017	31,0	10,0	4,41
		129,2	0,017	31,0	14,0	
cx-OH-Climbazol-D ₆	331,4	69,1 ^{a)}	0,017	25,0	8,0	4,40
		135,1	0,017	25,0	16,0	

^{a)} Quantifier

Die in [Tabelle 5](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender dieser Methode hat sich selbst von der Trennleistung der von ihm verwendeten analytischen Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen zu überzeugen. In den beispielhaft dargestellten Chromatogrammen sind die Diastereomere von (OH)₂-Climbazol chromatographisch getrennt ([Abbildung 2](#)), die von cx-OH-Climbazol nicht ([Abbildung 3](#)).

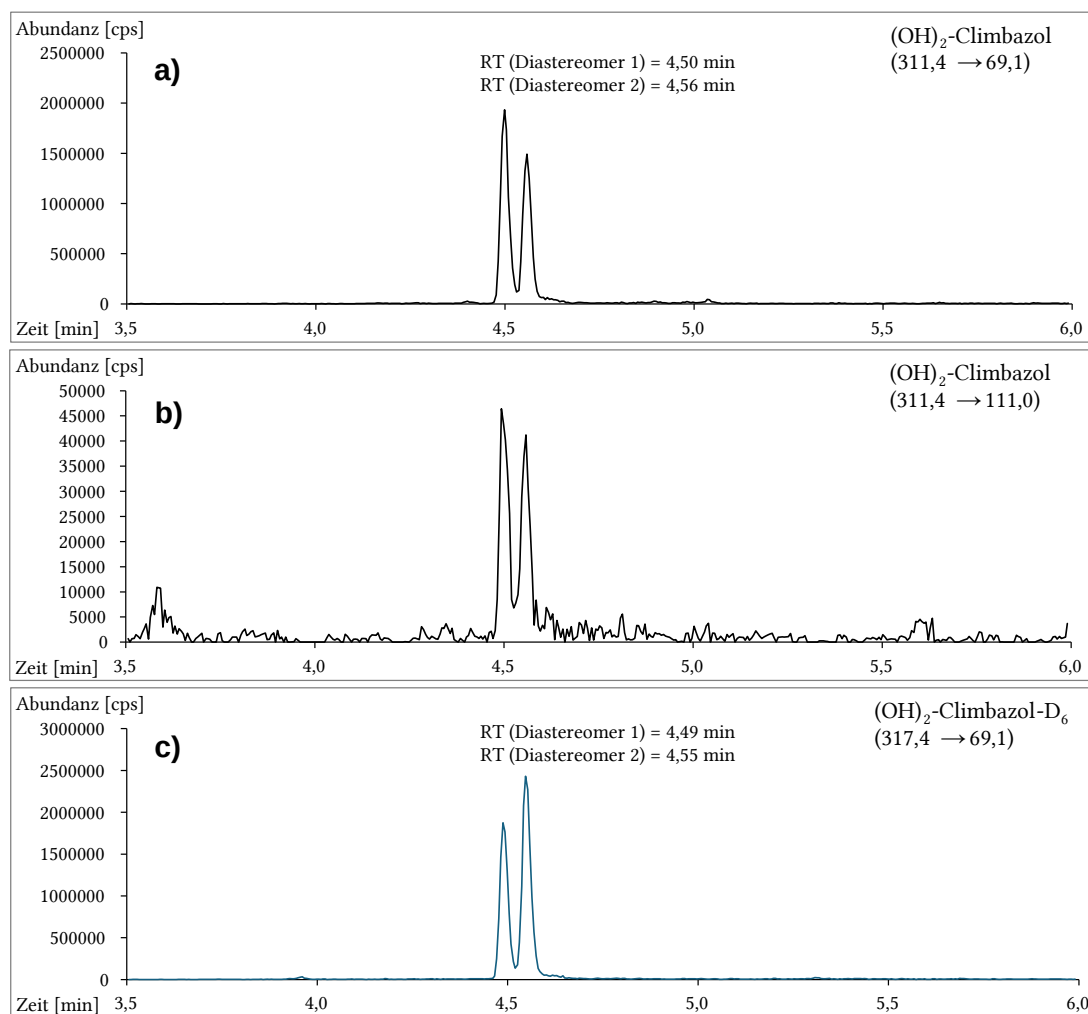


Abb. 2 Chromatogramm eines mit $(OH)_2$ -Climbazol in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ dotierten Poolurins. Unter a) ist der Quantifizierungsübergang des $(OH)_2$ -Climbazols zu sehen, unter b) der Qualifizierungsübergang des $(OH)_2$ -Climbazols und unter c) der Quantifizierungsübergang des ISTD $(OH)_2$ -Climbazol- D_6 .

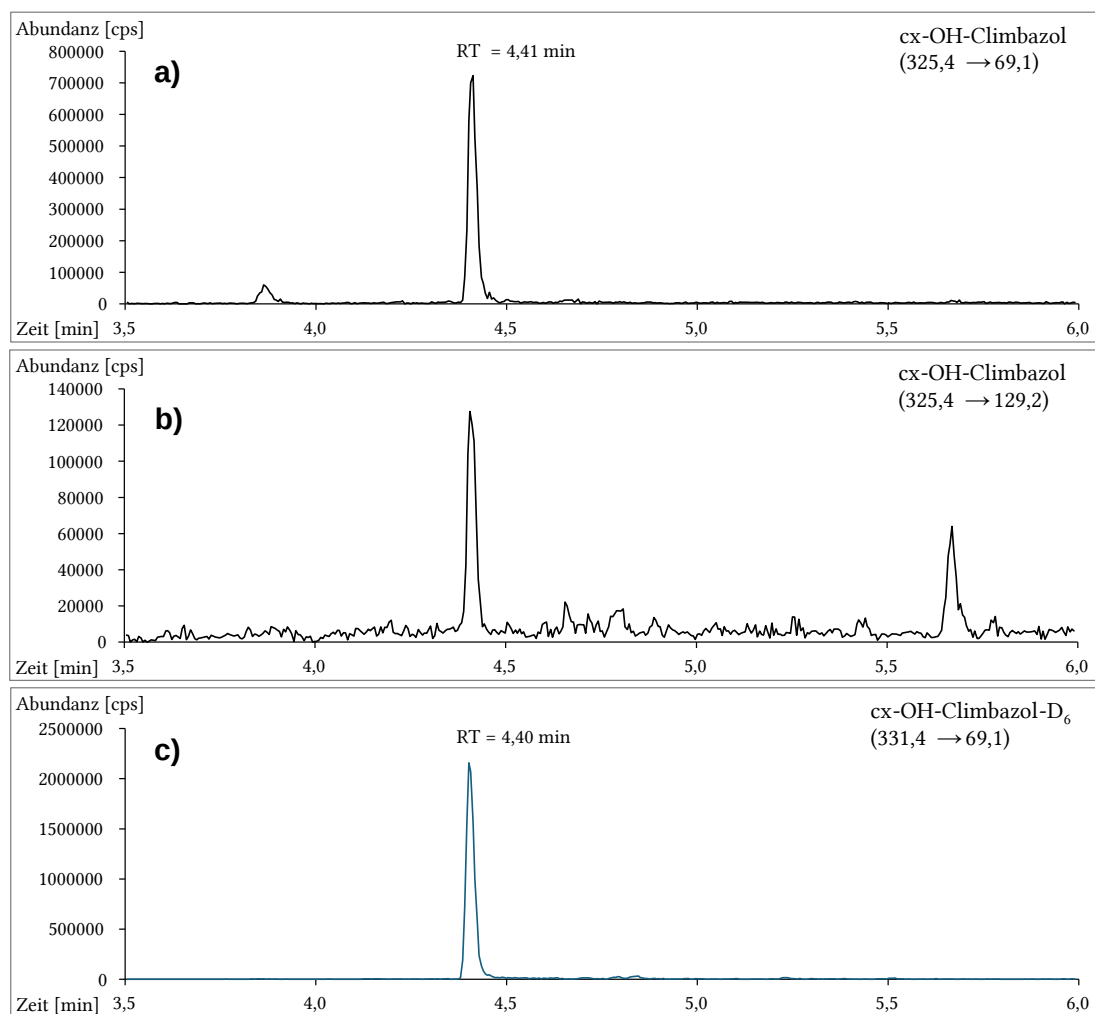


Abb. 3 Chromatogramm eines mit cx-OH-Climbazol in einer Konzentration von 10 µg/l dotierten Poolurins. Unter a) ist der Quantierübergang des cx-OH-Climbazols zu sehen, unter b) der Qualierübergang des cx-OH-Climbazols und unter c) der Quantierübergang des ISTD cx-OH-Climbazol-D₆.

7 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach [Abschnitt 5](#) aufgearbeiteten Urinproben werden 50 µl der aufgearbeiteten Probe in das UPLC-MS/MS-System injiziert. Die aufgegebene Probe wird mittels Online-SPE angereichert und aufgereinigt. Nach Elution im Backflush-Modus erfolgt die chromatographische Trennung. Während die beiden Diastereomere von (OH)₂-Climbazol getrennt werden, koeluierten die Diastereomere des cx-OH-Climbazols. Die Analyten werden anhand ihrer Retentionszeiten sowie der charakteristischen Massenübergänge identifiziert (siehe [Tabelle 5](#)).

8 Kalibrierung

Die nach [Abschnitt 4.5](#) hergestellten Kalibrierstandards werden analog zu den Urinproben – ohne weitere Zugabe von ISTD – aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5](#)) und entsprechend den [Abschnitten 6 und 7](#) analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem das Peakflächenverhältnis des jeweiligen Analyten und des zugehörigen ISTDs gegen die dotierte Analytkonzentration aufgetragen wird. Dabei werden die Diastereomere des (OH)₂-Climbazols einzeln integriert, während

jene des cx-OH-Climbazols nur als Summe integriert werden können (Koelution). Beispielhafte Kalibriergeraden für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin sind in [Abbildung 4](#) dargestellt.

Bei der Methodenentwicklung wurde am Analysengerät ein linearer Messbereich von 0,5–500 µg/l ermittelt. Bei der externen Validierung der Methode wurde nach den höchsten Kalibrierstandards eine Verschleppung der Analyten beobachtet. Sie entsprach einer Analytkonzentration von bis zu 0,7 µg/l. Um diese Verschleppung zu verhindern, empfiehlt es sich – abhängig von den zu messenden Proben – den Kalibrierbereich nach oben beispielsweise auf 20 oder 50 µg/l einzuschränken.

Leerwerte aus dem eingesetzten Probenmaterial müssen durch Subtraktion berücksichtigt werden. Während der Methodenentwicklung wurden jedoch keine Leerwerte in relevanter Höhe beobachtet. Bei längeren Sequenzen hat es sich bewährt, am Anfang und am Ende der Messserie eine Kalibrierreihe aufzunehmen, um die Proben – soweit keine signifikanten Unterschiede der Peakflächenverhältnisse auftreten – mit einer gemittelten Kalibriergerade auszuwerten.

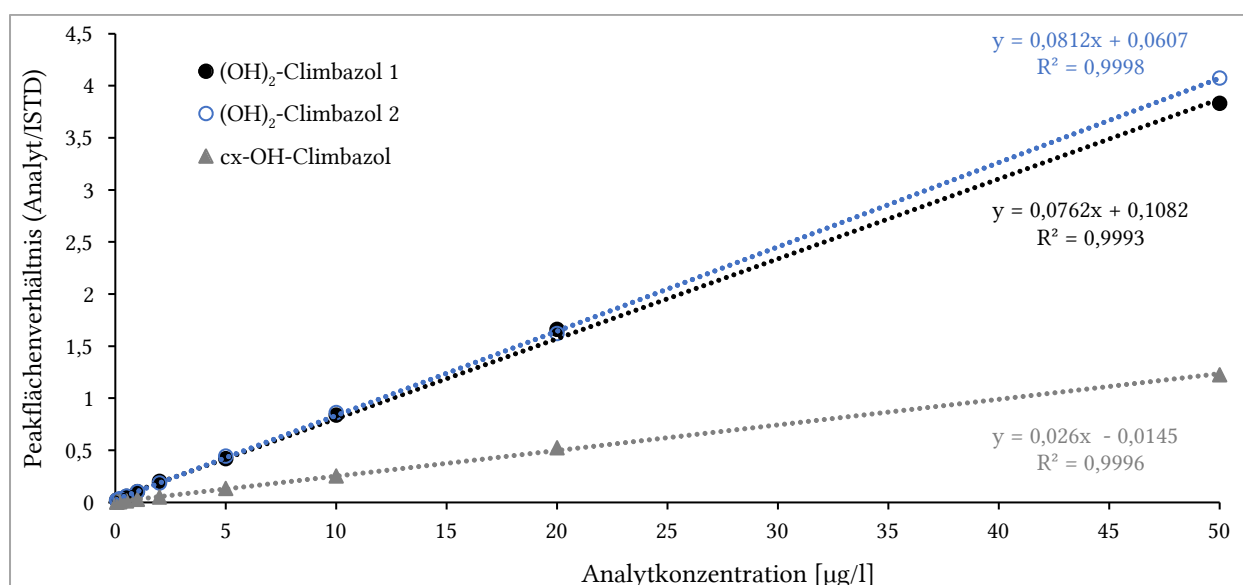


Abb. 4 Kalibriergeraden für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Die Berechnung der Analytkonzentration in den jeweiligen Urinproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktionen (siehe [Abschnitt 8](#)). Die Peakfläche des Analyten wird durch die Peakfläche des zugehörigen ISTDs dividiert. Der so erhaltene Quotient wird in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion eingesetzt und die jeweilige Analytkonzentration in µg/l ermittelt. Während der Methodenentwicklung erfolgte die Berechnung der Analytkonzentrationen mit der Gerätesoftware MassLynx 4.1, Waters GmbH, Eschborn.

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 2023).

Zur Qualitätssicherung der einzelnen Analysenserien werden mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit bekannten Analytkonzentrationen parallel zu den zu analysierenden Proben bestimmt. Da käufliches Material nicht zur Verfügung

steht, muss das Qualitätskontrollmaterial selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen Climbazol eingesetzt und mit Standardlösungen der Analyten dotiert, sodass die Analytgehalte im bewertungsrelevanten Konzentrationsbereich liegen. Außerdem werden in jeder Analysenserie Reagenzienleerwerte mitgeführt, um eventuelle Störungen aus den Reagenzien zu erkennen. Anstelle von Urin wird dabei hochreines Wasser als Matrix eingesetzt.

Von den Entwicklern der Methode wurde für die Qualitätskontrollmaterialien Poolurin mit den Analyten in Höhe von 1,0 µg/l, 10 µg/l bzw. 100 µg/l dotiert. Außerdem wurden während der Methodenentwicklung mindestens drei Reagenzienleerwerte in jeder Analysenserie mitgeführt.

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Die Präzision in der Serie wurde unter Verwendung der Qualitätskontrollmaterialien (siehe [Abschnitt 10](#)) ermittelt, indem diese achtfach parallel aufgearbeitet und analysiert wurden. In [Tabelle 6](#) sind die Daten für die Präzision in der Serie angegeben.

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol (n = 8)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	1,0	9,2	21,8
	10	7,2	16,9
	100	6,4	15,1
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	1,0	4,9	11,6
	10	3,6	8,6
	100	3,5	8,3
cx-OH-Climbazol	1,0	7,2	17,0
	10	7,6	18,0
	100	2,5	5,8

Die Präzision von Tag zu Tag wurde aus den Mittelwerten der achtfachen Messungen an sechs Tagen ermittelt. Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten sind nachfolgend in [Tabelle 7](#) aufgeführt.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	1,0	6,0	15,5
	10	3,6	9,3
	100	4,2	10,8
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	1,0	3,0	7,8
	10	2,5	6,5
	100	2,9	7,5
cx-OH-Climbazol	1,0	3,5	9,0
	10	2,5	6,5
	100	3,5	8,9

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde aus den gesamten Messdaten der Präzisionsbestimmung ermittelt. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungen sind in [Tabelle 8](#) aufgeführt.

Tab. 8 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin (n = 48)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere Wiederfindung (rel.) r [%]	Bereich [%]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	1,0	101	79,0–114
	10	102	87,0–113
	100	98,2	87,5–111
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	1,0	99,0	85,0–114
	10	102	88,9–125
	100	96,9	86,7–106
cx-OH-Climbazol	1,0	99,3	84,0–112
	10	102	88,9–125
	100	99,9	88,6–111

11.3 Selektivität

Um den Einfluss unterschiedlicher Urinmatrices auf die Analysenergebnisse zu ermitteln, wurden neun native Urinproben mit den Analyten in den Konzentrationen 1 µg/l, 10 µg/l und 100 µg/l dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die Kreatiningehalte der Urine wurden photometrisch nach Jaffé-Reaktion (Taussky und Kurzmann 1954) bestimmt und lagen zwischen 0,21 g/l und 1,69 g/l. Die relativen Standardabweichungen und mittleren relativen Wiederfindungen für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in den Individualurinen sind in [Tabelle 9](#) wiedergegeben.

Tab. 9 Selektivität für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Individualurinen (n = 9)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	Standardabweichung (rel.) <i>s_w</i> [%]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	1,0	95,6	12,7
	10	95,3	7,6
	100	93,2	9,2
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	1,0	91,8	18,0
	10	84,4	16,9
	100	93,7	9,9
cx-OH-Climbazol	1,0	103	33,1
	10	106	6,1
	100	108	5,9

Bei einer dotierten Analytkonzentration von 1,0 µg/l war die mittlere relative Wiederfindung korrekt, während sich für die relative Standardabweichung eine gewisse matrixbedingte Unsicherheit der Bestimmung zeigte.

Auch von den Methodenprüfern wurde der Einfluss individueller Urinmatrices auf die Analysenergebnisse untersucht. So wurden während der Methodenprüfung sechs verschiedene, undotierte Urinpools analysiert. Ohne Dotierung mit Analyten sollte das Signal bei Erfüllung der Selektivitätskriterien weniger als 20 % desjenigen bei Dotierung an der Bestimmungsgrenze betragen (Bestimmungsgrenze bei der Methodenprüfung: 0,05 µg/l, siehe [Anhang](#)). Für (OH)₂-Climbazol wurde ein Bereich von 0,0–40,9 % (Mittel: 23,4 %) und für cx-OH-Climbazol ein Bereich von 12,8–26,1 % (Mittel: 20,1 %) gefunden. Ohne ISTD-Dotierung trat bei (OH)₂-Climbazol-D₆ kein Signal auf, bei cx-OH-Climbazol-D₆ ein Signal von 0,03–0,07 % des üblichen ISTD-Signals. Es lässt sich festhalten, dass das Selektivitätskriterium bei der Bestimmung der Analyten nur grenzwertig erfüllt war, wobei offenblieb, ob die Urine tatsächlich analytfrei waren.

11.4 Matrixeffekte

Um mögliche Matrixeffekte zu erfassen, hielten sich die Prüfer der Methode an die Vorgaben der FDA (2018) und der EMA (2022). Im Zuge der externen Methodenprüfung wurde hochreines Wasser und Poolurin mit den Analyten in einer Konzentration von 0,1 µg/l und 400 µg/l dotiert. Auf gleiche Weise wurde mit den ISTDs (Dotierung von hochreinem Wasser und Poolurin mit jeweils 20 µg und 400 µg/l) verfahren. Der Vergleich der absoluten Flächen der Analyten-peaks zeigte einen deutlichen Matrixeffekt im Sinne einer Signalsuppression von im Mittel 20–30 % durch die Urinmatrix. Dieser Matrixeffekt scheint für cx-OH-Climbazol etwas größer als für (OH)₂-Climbazol zu sein ([Tabelle 10](#)). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Kalibrierung in Urinmatrix (anstatt in Wasser) sowie der Verwendung isotoopenmarkierter ISTDs, um eine präzise und richtige Quantifizierung zu erreichen.

Tab. 10 Matrixeffekte bei der Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Poolurinen (n = 3)

Analyt bzw. ISTD	Dotierte Konzentration [µg/l]	Matrixeffekt [%]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1 + 2)	0,1	64–86
	400	79–82
cx-OH-Climbazol	0,1	55–82
	400	66–73
(OH) ₂ -Climbazol-D ₆ (Diastereomer 1 + 2)	20	76–87
	400	74–78
cx-OH-Climbazol-D ₆	20	59–69
	400	63–69

11.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Tabelle 11) wurden mit dem Kalibriergeradenverfahren in Anlehnung an DIN 32 645 ermittelt (DIN 2008). Dazu wurden die untersten Kalibrierpunkte der Kalibriergeraden verwendet.

Tab. 11 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	0,2	0,5
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	0,2	0,5
cx-OH-Climbazol (Diastereomer 1 + 2)	0,2	0,5

11.6 Störeinflüsse

Die hier beschriebene Analyse der Climbazolmetaboliten verläuft grundsätzlich sehr robust. Leerwerte aus Reagenzien oder Hintergrundbelastungen aus nativen Urinproben scheinen keine relevante Rolle zu spielen. Ebenfalls sind Analysensequenzen mit bis zu 100 Injektionen ohne nachweisbaren Qualitätsverlust möglich. Entwickler und Prüfer der Methode fanden jedoch übereinstimmend Matrixinterferenzen in Form von Störpeaks in Urinen mit höheren Kreatiningehalten, die sich vor allem bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen störend auswirkten. Auch war bei Proben mit Analytgehalten in Höhe der Bestimmungsgrenze oftmals kein eindeutiger Peak im Qualifizierungsübergang zu sehen. Auf Basis der Sensitivität der Analysengeräte (z. B. Signal-Rausch-Verhältnis) wäre zwar, je nach Urinmatrix, eine deutlich unter 0,5 µg/l liegende Bestimmungsgrenze denkbar; in Realproben können die beschriebenen Matrixinterferenzen jedoch die zuverlässige Quantifizierung von Analytgehalten unter 0,5 µg/l erschweren. Bei höheren Analytkonzentrationen spielt der Einfluss störender Matrixkomponenten nur noch eine untergeordnete Rolle.

Die Verwendung isotope-markierter ISTDs ist zwingend notwendig, um matrixbedingte Schwankungen bei der Aufarbeitung, der Chromatographie oder der Ionisierung adäquat zu kompensieren.

Um eine mögliche Exposition der Allgemeinbevölkerung gegen Climbazol sensitiv erfassen zu können, sollte der Kalibrierbereich entsprechend angepasst werden. Mit einer weiteren Optimierung der chromatographischen Bedingungen kann die Selektivität der Analytik ggf. erhöht werden, um auch bis in den sub-µg/l-Bereich eine präzise, richtige und gegenüber verschiedenen Urinmatrices robuste Quantifizierung zu ermöglichen. Denkbar sind z. B. Anpassungen der Ventilschaltzeiten oder der Elutionsgradienten, um nicht nur eine gute Anreicherung, sondern auch eine bessere Aufreinigung bei der Online-SPE zu erreichen.

12 Diskussion der Methode

Die Methode erlaubt eine selektive, sensitive und robuste Analyse der Climbazolmetaboliten (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol, wobei für (OH)₂-Climbazol auch eine Trennung der beiden Diastereomere erfolgt. Die Ergebnisse einer Expositionsstudie (Schönrath et al. 2024 a) zeigen, dass die mit der Methode nachweisbaren Analyten geeignete Biomarker sind, um sowohl eine orale als auch eine dermale Climbazolexposition zu erfassen. In Schönrath et al. (2024 a) sind auch die zeit- und ggf. individuenabhängigen Veränderungen des Diastereomerenverhältnisses der beiden (OH)₂-Climbazoldiastereomere nach oraler Verabreichung und dermalen Anwendung beschrieben.

Die Methode erlaubt die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol mit guter Präzision und Richtigkeit, wobei die Selektivität der Bestimmung bei Analytkonzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze durch Matrixkomponenten gestört sein kann (siehe Abschnitt 11.3).

Da für die Methodenentwicklung nur die nicht-glucuronidierten Analyten als Standards synthetisiert wurden, konnte die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse nicht direkt überprüft werden. In Schmidt-kunz et al. (2021) wurden zur

Validierung der enzymatischen Hydrolyse zwei Proben mit relativ hohen Analytkonzentrationen zehnfach parallel enzymatisch hydrolysiert, aufgearbeitet und vermessen. Die Ergebnisse zeigten eine vergleichbar gute Präzision wie die parallel aufgearbeiteten und vermessenen Proben, denen lediglich die freien Analyten zugesetzt waren (Schmidtkunz et al. 2021). Darüber hinaus wurden Aliquote derselben Proben einerseits einer sauren Hydrolyse und andererseits der enzymatischen Hydrolyse unterzogen, wobei sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse ergab (Schmidtkunz et al. 2021). In den von Schmidtkunz et al. (2021) untersuchten Proben einer Kinetikstudie lagen im Mittel 0,9 % des (OH)₂-Climbazols und 55 % des cx-OH-Climbazols unkonjugiert vor.

Bei den mit dieser Methode bestimmbaren Analyten handelt es sich um valide Biomarker, um die innere Belastung nach Exposition gegen Climbazol zu erfassen. Die dargestellte Methode ist ausreichend sensitiv, um die Climbazolaufnahme und -ausscheidung nach einmaliger dermaler Anwendung von Haarpflegeprodukten (Shampoo bzw. Haarlotion; Schönraht et al. 2025) quantitativ zu erfassen. Die Climbazolmetaboliten (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol konnten bis mindestens 48 h nach Shampooanwendung und bis mindestens 72 h nach Haarlotionanwendung quantifiziert werden (Schönraht et al. 2025).

Die Prüfer der Methode verwendeten Geräte anderer Hersteller (LC-20AB; Shimadzu Deutschland GmbH, Neufahrn sowie QTrap 6500+; AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt) und eine andere analytische Säule (Acquity UPLC BEH C8, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm; Waters GmbH, Eschborn). Zudem wurde die β-Glucuronidase eines anderen Anbieters (Megazyme Ltd., Bray, Irland) verwendet und die Proben nach dem Hydrolyseschritt für 10 min bei 37 500 × g zentrifugiert.

Mit diesen geräte- und ausstattungsbedingten Modifikationen (nähere Angaben siehe [Anhang](#)) konnten die Diastereomere von (OH)₂-Climbazol ebenfalls getrennt werden, während dies für cx-OH-Climbazol auch nicht möglich war. Die Kalibrierung erfolgte bei der Prüfung in einem Bereich von 0,05–500 µg/l und es ergaben sich niedrigere Bestimmungsgrenzen von 0,05 µg/l für die Summe der (OH)₂-Climbazol-Diastereomere sowie für die Summe der cx-OH-Climbazol-Diastereomere. In zehn Poolurinproben der Allgemeinbevölkerung waren die Analyten trotz der besseren Bestimmungsgrenzen nicht nachweisbar.

Die Methodenentwickler untersuchten 40 Individualurinproben von beruflich nicht gegen Climbazol exponierten Personen, wobei ebenfalls in keiner der Proben Analytkonzentrationen > 1,5 µg/l gemessen wurden. Die Entwickler untersuchten zu einem späteren Zeitpunkt 300 Urinproben der Allgemeinbevölkerung aus der Deutschen Umweltprobenbank (Probenahme zwischen 2002 und 2022), wobei in 16 Proben der Gehalt mindestens eines Analyten über der Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/l lag und eine maximale Konzentration von 10,23 µg/l (OH)₂-Climbazol sowie 2,53 µg/l cx-OH-Climbazol gemessen wurde. Es zeigte sich tendenziell ein Abfall der Climbazolbelastung über die Zeit (Schönraht et al. 2024 b).

Verwendete Messgeräte UPLC-MS/MS-Anlage (Waters ACQUITY UPLC H-Class mit 2D-LC-Option, gekoppelt mit Waters Xevo-TQ-S Tandem-Massenspektrometer, Waters GmbH, Eschborn); analytische Säule (ACQUITY UPLC HSS C18, 1,8 µm, 2,1 mm × 150 mm, Waters GmbH, Eschborn); Anreicherungssäule (EC 20/2 Chromabond HR-X, 15 µm, 2 mm × 20 mm, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

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

Die Autoren beteiligen sich ad personam in ihrer Eigenschaft als sachkundige Experten und nicht als Vertretung der Institutionen oder Unternehmen, in denen sie tätig sind.

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. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2023) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 120(21–22): 1–37. https://doi.org/10.3238/arztebl.2023.rili_baek_QS_Labor
- Cavana P, Peano A, Petit J-Y, Tizzani P, Perrot S, Bensignor E, Guillot J (2015 a) A pilot study of the efficacy of wipes containing chlorhexidine 0.3%, climbazole 0.5% and Tris-EDTA to reduce *Malassezia pachydermatis* populations on canine skin. Vet Dermatol 26(4): 278–e61. <https://doi.org/10.1111/vde.12220>
- Cavana P, Petit J-Y, Perrot S, Guechi R, Marignac G, Reynaud K, Guillot J (2015 b) Efficacy of a 2% climbazole shampoo for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of naturally infected dogs. J Mycol Med 25(4): 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.10.004>
- Champmartin C, Aubertin M, Seiwert C, Cosnier F (2025) Percutaneous absorption of climbazole: In vitro data from human skin. Regul Toxicol Pharmacol 162: 105895. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105895>
- Creusot N, Casado-Martinez C, Chiaia-Hernandez A, Kiefer K, Ferrari BJD, Fu Q, Munz N, Stamm C, Tlili A, Hollender J (2020) Retrospective screening of high-resolution mass spectrometry archived digital samples can improve environmental risk assessment of emerging contaminants: a case study on antifungal azoles. Environ Int 139: 105708. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105708>
- Difonzo EM, Scarfi F, Galeone M (2017) New formulation for topical treatment of onychomycoses. G Ital Dermatol Venereol 152(5): 432–435. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.17.05456-6>
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32 645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2025) DIN EN 71-7:2025-12. Sicherheit von Spielzeug - Teil 7: Fingermalfarben - Anforderungen und Prüfverfahren, deutsche Fassung. Berlin: DIN Media. <https://doi.org/10.31030/3650669>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2024) Substance evaluation conclusion and evaluation report for Climbazole (EC No 253-775-4, CAS RN 38083-17-9). Reference date 04 Nov 2024. https://chem.echa.europa.eu/api-activity-list/v1/substanceEvaluation/documents?name=4b85a0e5c8f38ada2c58313b7ee91378_SEV-253-775-4-1_Conclusion_public.pdf, abgerufen am 16 Apr 2026
- EMA (European Medicines Agency) (2022) ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, step 5. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam: Committee for Medicinal Products for Human Use. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf, abgerufen am 05 Mai 2026
- Europäische Kommission (2019) Verordnung (EU) 2019/698 der Kommission vom 30. April 2019 zur Änderung der Anhänge III und V der Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über kosmetische Mittel (Text von Bedeutung für den EWR). ABIL (119): 66–69
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat (2009) Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel (Neufassung) (Text von Bedeutung für den EWR). ABI L (342): 59–209
- FDA (U.S. Food and Drug Administration), CDER (Center for Drug Evaluation and Research), CVM (Center for Veterinary Medicine) (2018) Bioanalytical method validation. Guidance for industry. Silver Spring, MD: FDA. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, abgerufen am 05 Mai 2026
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004) OECD Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: in vitro method. Paris: OECD. https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2004/11/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_g1gh4b52/9789264071087-en.pdf, abgerufen am 05 Mai 2026
- SCCP (Scientific Committee on Consumer Products) (2005) Opinion on climbazole. Colipa No P64. SCCP/0918/05. Brussels: European Commission. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_027.pdf, abgerufen am 05 Mai 2026
- SCCP (Scientific Committee on Consumer Products) (2009) Opinion on climbazole. Colipa No P64. SCCP/1204/08. Brussels: European Commission. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_164.pdf, abgerufen am 05 Mai 2026
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2018) Addendum to the scientific opinions on climbazole (P64) ref. SCCS/1506/13 and SCCS/1590/17. SCCS/1600/18. Luxembourg: European Commission. https://health.ec.europa.eu/document/download/1217ac52-7823-40bd-9ac1-be3f8d5b6348_en?filename=sccs_o_220.pdf, abgerufen am 05 Mai 2026
- Schmidtkunz C, Küpper K, Gries W, Leng G (2021) A validated LC-MS/MS method for the quantification of climbazole metabolites in human urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1173: 122677. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122677>
- Schönrath I, Schmidtkunz C, Ebert KE, Küpper K, Brüning T, Koch HM, Leng G (2024 a) Human urinary excretion kinetics of the antimycotic climbazole: biomonitoring of two new metabolites after oral and dermal dosage. Toxicol Lett 399: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.06.011>
- Schönrath I, Schmidtkunz C, Küpper K, Weber T, Leng G, Kolossa-Gehring M (2024 b) Exposure of young German adults to the anti-dandruff agent climbazole from 2002 to 2022: analysis of specific biomarkers in urinary samples. Chemosphere 367: 143611. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143611>

- Schönrrath I, Schmidtkunz C, Ebert KE, Küpper K, Brüning T, Koch HM, Leng G (2025) Metabolismus des Anti-Schuppen-Wirkstoffs Climbazol nach oraler Gabe und dermalen Applikation. *ASU Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 60(1): 46–50. <https://doi.org/10.17147/asu-1-411962>
- Taussky HH, Kurzmann G (1954) A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem* 208(2): 853–861. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65610-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65610-8)
- Tröger R, Klöckner P, Ahrens L, Wiberg K (2018) Micropollutants in drinking water from source to tap - method development and application of a multiresidue screening method. *Sci Total Environ* 627: 1404–1432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.277>

Anhang

Geräte, Chemikalien und Lösungen bei der externen Methodenprüfung

Bei der Methodenprüfung wurden niedrigere Bestimmungsgrenzen von 0,05 µg/l Urin erreicht. Die allgemeine Vorgehensweise entsprach dabei der beschriebenen Methode der Entwickler, so dass an dieser Stelle nur das für die externe Prüfung verwendete UPLC-MS/MS-Anlage und Änderungen bei den Chemikalien und Lösungen ergänzend dargestellt werden.

Geräte

- UPLC-MS/MS-Anlage mit einer Gradientenpumpe LC-20AB (Shimadzu Deutschland GmbH, Neufahrn) gekoppelt mit Qtrap 6500+ Tandem-Massenspektrometer (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt)
- Analytische Säule (z. B. Acquity UPLC BEH C8, 1,7 µm, 2,1 x 150 mm, Nr. 186003377, Waters GmbH, Eschborn)

Chemikalien

- β-Glucuronidase aus *E. coli* in Lösung (Tris-HCl/NaCl/EDTA), ~250 U/µl (z. B. E-BGLAEC Nr. 700004191 Megazyme, Bray, Irland)

Lösungen

- Eluent B (0,1%ige Ameisensäure in Wasser/Acetonitril; Wasser : Acetonitril : Ameisensäure (94,95 : 4,95 : 0,1; V/V/V))
In einen 1000-ml-Messkolben werden etwa 500 ml hochreines Wasser vorgelegt. 49,5 ml Acetonitril und 1 ml Ameisensäure werden zugegeben und der Messkolben anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens drei Monate stabil.

Flüssigkeitschromatographie

Da die Pumpe für die Anreicherungssäule keine Gradientenpumpe war, wurden das Laufmittel und das Programm für die Pumpe modifiziert.

Anreicherungssäule:	EC 20/2 Chromabond HR-X, 15 µm, 2 mm × 20 mm
Analytische Säule:	Acquity UPLC BEH C8, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm
Mobile Phase:	Eluent A: Wasser : Acetonitril : Ameisensäure (94,95 : 4,95 : 0,1; V/V/V) Eluent B: Acetonitril : Ameisensäure (99,9 : 0,1; V/V)

Laufzeit:	10 min
Säulentemperatur:	50 °C
Probentemperatur:	15 °C
Injektionsvolumen:	50 µl
Programm der Pumpe 1:	siehe Tabelle 12
Gradientenprogramm der Pumpe 2:	siehe Tabelle 3
Ventilschaltzeiten:	siehe Tabelle 13

Tab. 12 Programm der Pumpe 1 für die Anreicherungssäule

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0,0	100	0	0,8
1,25	0	100	0,8
3,5	100	0	0,8

Tab. 13 Ventilschaltzeiten

Zeit [min]	Ventilposition	Beschreibung
0–0,5	1	Anreicherung der Analyten, Equilibrierung der analytischen Säule
0,5–3,5	2	Überführung der Analyten auf die analytische Säule im Backflush-Modus, chromatographische Trennung der Analyten
3,5–10,0	1	Rekonditionierung der Anreicherungssäule über Pumpe P1, chromatographische Trennung der Analyten über Pumpe P2

Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Electrospray, positiv (ESI+, unit/unit)
Curtain Gas (CUR):	20
Collision Gas (CAD):	Medium
Ion-Spray Voltage:	4500 V
Temperatur:	400 °C
Ion Source Gas 1 (GS1):	7
Ion Source Gas 2 (GS2):	0
Entrance Potential (EP):	10
Temperatur:	400 °C
Kollisionsgasfluss:	medium
Weitere Einstellungen:	siehe Tabelle 14

Tab. 14 Massenspektrometrische Parameter für die Bestimmung von (OH)₂-Climbazol und cx-OH-Climbazol in Urin

Analyt bzw. ISTD	Vorläufer-Ion (<i>m/z</i>)	Produkt-Ion (<i>m/z</i>)	Dwelltime [s]	Cone-Spannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Retentionszeit [min]
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 1)	311	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,0
		115	0,01	20	21	
		111	0,01	20	46	
(OH) ₂ -Climbazol-D ₆ (Diastereomer 1)	317	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,1
		121	0,01	20	21	
(OH) ₂ -Climbazol (Diastereomer 2)	311	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,2
		111	0,01	20	46	
(OH) ₂ -Climbazol-D ₆ (Diastereomer 2)	317	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,2
		121	0,01	20	21	
cx-OH-Climbazol	325	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,0
		129	0,01	20	21	
cx-OH-Climbazol-D ₆	331	69 ^{a)}	0,01	20	13	6,0
		135	0,01	20	21	

^{a)} Quantifier

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenzen wurden gemäß FDA (2018) bzw. ICH M10-Guideline (EMA 2022) unter Verwendung von drei verschiedenen, analytfreien Urinen ermittelt. Die Urinproben wurden jeweils fünffach an der Bestimmungsgrenze (0,05 µg/l) mit (OH)₂-Climbazol sowie cx-OH-Climbazol dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Als Kriterien dienen die Richtigkeit sowie die Präzision der Bestimmungen. Für die Climbazolmetaboliten lagen die Einzelwerte der Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze zwischen 80 % und 120 %, für die Präzision wurde ein Variationskoeffizient von 20 % nicht überschritten.