

1,2,5,6,9,10-Hexabromcyclododecan (HBCDD) – Bestimmung von α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD in Plasma mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

1,2,5,6,9,10-Hexabrom-
cyclododecan, HBCDD,
Flammschutzmittel,
Biomonitoring, Plasma,
LC-MS/MS

W. Gries¹
K. Küpper¹
C. Schmidtkunz¹
G. Leng¹
N. Quinete²

A. Alt²
T. Schettgen²
T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

¹ Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SER-GS-BLM-Institut für Biomonitoring, 51368 Leverkusen, Deutschland

² Prüfer der Methode, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Uniklinik RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen, Deutschland

³ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland

⁴ Vorsitzende 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, Deutschland

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

* 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,
Schmidtkunz C, Leng G,
Quinete N, Alt A, Schettgen T,
Göen T, Hartwig A, MAK
Commission. 1,2,5,6,9,10-
Hexabromcyclododecan
(HBCDD) – Bestimmung
von α -HBCDD, β -HBCDD
und γ -HBCDD in Plasma
mittels LC-MS/MS.
Biomonitoring-Methode.
MAK Collect Occup Health
Saf. 2020 Okt;5(3):Doc066.
DOI: [10.34865/bi319455d5_3or](https://doi.org/10.34865/bi319455d5_3or)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method.

This analytical method allows the selective detection of the flame retardant 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCDD) in plasma, with α -HBCDD, β -HBCDD and γ -HBCDD being the three main stereoisomers of technical HBCDD. The analytes are extracted from plasma after adding the corresponding ¹³C-labelled internal standards. After precipitation of the plasma proteins and solid phase extraction using a Florisil® cartridge, the analytes are separated from accompanying components by liquid chromatography and analysed using tandem mass spectrometry. Calibration standards are prepared in plasma and processed in the same way as the samples to be analysed.

Manuskript abgeschlossen:
19 Nov 2015

Publikationsdatum:
09 Okt 2020

License: This article is distributed
under the terms of the Creative
Commons 4.0 International
License. See license information
at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Plasma
Analytisches Messprinzip	LC-MS/MS
Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe	

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
1,2,5,6,9,10-Hexabromcyclododecan	3194-55-6	1,2,5,6,9,10-Hexabromcyclododecan	3194-55-6
α -HBCDD	134237-50-6	α -HBCDD	134237-50-6
β -HBCDD	134237-51-7	β -HBCDD	134237-51-7
γ -HBCDD	134237-52-8	γ -HBCDD	134237-52-8

Zuverlässigkeitskriterien

α -HBCDD

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 21,3 \%, 13,1 \%$ bzw. $10,5 \%$
	Streubereich	$u = 48,2 \%, 29,6 \%$ bzw. $23,8 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$ bzw. $10,0 \mu\text{g}$ α -HBCDD pro Liter Plasma und $n = 10$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 18,2 \%, 11,7 \%$ bzw. $6,5 \%$
	Streubereich	$u = 41,2 \%, 26,5 \%$ bzw. $14,7 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$ bzw. $10,0 \mu\text{g}$ α -HBCDD pro Liter Plasma und $n = 10$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 95 \%, 103 \%$ bzw. 95%
	bei einer dotierten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$ bzw. $10,0 \mu\text{g}$ α -HBCDD pro Liter Plasma und $n = 10$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,03 \mu\text{g}$ α -HBCDD pro Liter Plasma	
Bestimmungsgrenze:	$0,1 \mu\text{g}$ α -HBCDD pro Liter Plasma	

β -HBCDD

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 16,3\%, 9,1\%$ bzw. 6,5 %
	Streubereich	$u = 37,6\%, 20,6\%$ bzw. 14,7 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg β -HBCDD pro Liter Plasma und n = 9 bzw. 10 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 14,0\%, 10,4\%$ bzw. 10,9 %
	Streubereich	$u = 31,7\%, 23,5\%$ bzw. 24,7 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg β -HBCDD pro Liter Plasma und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 104\%, 98\%$ bzw. 97 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg β -HBCDD pro Liter Plasma und n = 10 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,03 μg β -HBCDD pro Liter Plasma	
Bestimmungsgrenze:	0,1 μg β -HBCDD pro Liter Plasma	

 γ -HBCDD

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 14,0\%, 8,7\%$ bzw. 7,2 %
	Streubereich	$u = 31,7\%, 19,7\%$ bzw. 16,3 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg γ -HBCDD pro Liter Plasma und n = 10 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 17,6\%, 13,5\%$ bzw. 6,9 %
	Streubereich	$u = 39,8\%, 30,5\%$ bzw. 15,6 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg γ -HBCDD pro Liter Plasma und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 95\%, 98\%$ bzw. 108 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,1 μg , 1,0 μg bzw. 10,0 μg γ -HBCDD pro Liter Plasma und n = 10 Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,03 μg γ -HBCDD pro Liter Plasma	
Bestimmungsgrenze:	0,1 μg γ -HBCDD pro Liter Plasma	

2 Allgemeine Informationen zu HBCDD

1,2,5,6,9,10-Hexabromcyclododecan (HBCDD) ist ein weißes geruchloses Pulver mit einer Dichte von 2,24–2,38 g/cm³ und einem Schmelzpunkt von 180–185 °C. Das sich bei Temperaturen oberhalb von 190 °C zersetzende HBCDD besitzt mit einem logK_{OW} von 5,625 stark lipophile Eigenschaften. Dementsprechend gering ist die Wasserlöslichkeit, die für das technische Gemisch zu ca. 66 $\mu\text{g}/\text{l}$ bestimmt wurde (NICNAS 2012). Die industrielle Her-

stellung erfolgt durch Bromierung von 1,5,9-Cyclododecatrien, wobei technisches HBCDD vor allem aus den drei Diastereomeren α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD besteht, die jeweils als Enantiomerenpaare vorliegen. Insgesamt können bis zu 16 stereoisomere Formen abgeleitet werden (Arsenault et al. 2007 a, b). Chargenabhängig besteht das technische HBCDD-Gemisch zu ca. 72–90 % aus γ -HBCDD, zu 9–13 % aus α -HBCDD und zu < 0,5–12 % aus β -HBCDD (EFSA 2011). Die ebenfalls im Produktionsprozess entstehenden Stereoisomere δ -HBCDD und ε -HBCDD werden aufgrund ihres geringen Anteils von durchschnittlich unter 1 % in der Analytik nicht weiter berücksichtigt (Heeb et al. 2005, 2008).

Die Strukturen von α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD sind in Abbildung 1 dargestellt.

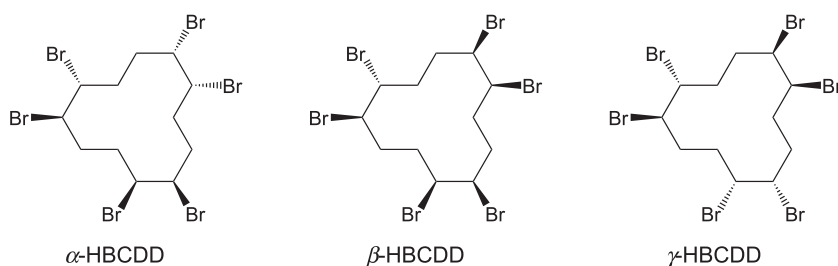


Abb. 1 Strukturen der Stereoisomere α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD

Seit 2016 ist die Herstellung und Verwendung von HBCDD in der EU aufgrund seiner Persistenz verboten. HBCDD wurde unter verschiedenen Handelsnamen vermarktet (u. a. Pyroguard[®], Pyrovatex[®], Saytex[®], Myflam[®], HBCD oder Nicca-Fi-None[®]) und wurde hauptsächlich als Flammschutzmittel in expandiertem oder extrudiertem Polystyrol verwendet. So wurde HBCDD in Styroporplatten zu Dämmzwecken eingesetzt. Darüber hinaus wurde es in Verpackungskunststoffen, in Gehäusekunststoffen von Elektro- und Elektronikgeräten sowie in elektrischen Bauteilen, wie Kabeln, verwendet. Schließlich wurde HBCDD in geringerem Umfang auch zur Beschichtung von Textilien genutzt sowie zur Herstellung von Polstermöbeln, Matratzen oder Autositzen (ECHA 2010 a). Die Verwendung als Flammschutzmittel resultierte aus der Eigenschaft des HBCDD, die Entflammbarkeit zu verringern und die Ausbreitung von Bränden zu verzögern. Dabei liegt HBCDD nicht chemisch an die Kunststoffe gebunden vor, sondern wird als Additiv lediglich physikalisch in diesen verteilt (NICNAS 2012).

Die Europäische Union stuft HBCDD bereits 2008 als besonders besorgniserregenden Stoff (*Substance of Very High Concern*, SVHC) sowie als persistenten, bioakkumulierenden und toxischen Stoff (PBT-Stoff) ein und nahm ihn 2011 in Anhang XIV (Zulassungspflichtige Stoffe) der REACH-Verordnung auf (ECHA 2010 a; EU 2011 a). Im Mai 2013 folgte die Aufnahme in Anhang A durch das Expertengremium der Stockholmer POP (*persistent organic pollutants*)-Konvention, der die UN-Chemikalienkonferenz nachfolgend zugestimmt hat (UN 2017). Seit dem 23. März 2016 ist die Herstellung von HBCDD als Stoff oder Bestandteil einer Zubereitung verboten (EU 2016). In Europa wurden jährlich ungefähr 12 000 Tonnen HBCDD eingesetzt (Stand 2006) (IOM 2008).

Das zugesetzte HBCDD kann aus den Endprodukten während des gesamten Lebenszyklus durch Auslaugen oder Abrieb freigesetzt werden und findet sich in Luft, Wasser oder Staub wieder (Abdallah und Harrad 2009). Dabei spielen nicht nur Produkte aus dem direkten Kontaktumfeld, sondern auch unsachgemäß entsorgte Altprodukte eine zentrale Rolle. Einmal in die Umwelt gelangtes HBCDD wird nur schwer abgebaut und zählt daher zu den persistenten Verbindungen. Die Halbwertszeit im Boden liegt je nach Isomer zwischen 119 und 210 Tagen, wobei α -HBCDD die längste Halbwertszeit von allen HBCDD-Stereoisomeren aufweist. Auch die Elimination von HBCDD aus dem Organismus erfolgt langsam. Die geschätzte Eliminationshalbwertszeit liegt im Bereich von Wochen bis Monaten (ECHA 2010 a). HBCDD wurde sogar bereits bei Luftmessungen in der Arktis nachgewiesen und ist weiterhin weltweit in Boden, Sediment und Wasser zu finden (NICNAS 2012). Bedingt durch die gute Fettlöslichkeit reichert sich HBCDD im Fettgewebe von Organismen an. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei in Fischen

und Eiern gefunden (EFSA 2011; Janák et al. 2005). Somit kann der Mensch HBCDD nach wie vor über verschiedene Expositionswege aufnehmen. HBCDD wurde auch in der Muttermilch nachgewiesen, so dass Säuglinge ebenfalls potentiell exponiert sind (Abdallah und Harrad 2011; Eljarrat et al. 2009; Kakimoto et al. 2008; Weiss et al. 2006). Untersuchungen zum Metabolismus beim Menschen sind nicht verfügbar. Geyer et al. (2004) haben allerdings mit zwei unterschiedlichen Ansätzen eine Halbwertszeit beim Menschen von 64 Tagen errechnet.

Eine toxikologische Beurteilung von HBCDD von Seiten der Kommission ist noch nicht erfolgt. Eine ausführliche Darstellung relevanter toxikologischer Studien findet sich im Risk Assessment Report der EU (2011 b), in den Begründungen der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA 2010 a, b) sowie in einer Bewertung des Australischen National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS 2012). Von der Kommission abgeleitete Beurteilungswerte in biologischem Material liegen nicht vor, allerdings hat die Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes einen HBM I-Wert von 1,6 µg HBCDD pro Liter Plasma festgelegt (UBA 2015).

Mithilfe der vorliegenden Analyseverfahren ist es möglich, HBCDD-Belastungen in humanem Plasma selektiv zu analysieren. Zur Bestimmung eventueller Hintergrundbelastungen wurden mit der hier vorliegenden Methode 48 individuelle Plasmaproben von beruflich nicht gegen HBCDD exponierten Personen analysiert. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1 Hintergrundbelastungen mit α -, β - und γ -HBCDD in Plasma (n = 48)

Analyt	Median [µg/l]	Mittelwert [µg/l]	Anzahl > NWG	Anzahl < BG
α -HBCDD	< 0,1	< 0,1	3 (0,03 µg/l, 0,04 µg/l, 0,08 µg/l)	48
β -HBCDD	< 0,1	< 0,1	0	48
γ -HBCDD	< 0,1	< 0,1	0	48

3 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Analyseverfahren erlaubt die selektive Erfassung des Flammschutzmittels HBCDD im Plasma, wobei mit α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD die drei in technischem HBCDD hauptsächlich vorkommenden Stereoisomere erfasst werden. Die Analyten werden nach Zugabe der entsprechenden ¹³C-markierten internen Standards aus Plasma extrahiert. Nach Fällung der Plasmaproteine und Festphasenaufreinigung über eine Florisil®-Kartusche werden die Analyten flüssigchromatographisch von Begleitkomponenten getrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Plasma angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- LC-MS/MS System: Waters Alliance LC 2695 gekoppelt mit einem Waters Quattro Ultima Tandem Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn)
- LC-Säule: Waters Atlantis T3 3 µm, 3,0 × 50 mm (Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186003721)
- Schüttler (z. B. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- Pasteurpipetten (z. B. Transferpipetten aus Polyethylen, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)

- Blutentnahmebesteck mit EDTA (z. B. EDTA-Vacutainer[®], Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Nr. 367864)
- Verschiedene Messkolben (z. B. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim)
- 12-ml-Schraubgläschen mit Teflon-kaschierten Schraubverschlüssen (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Variabel einstellbare Pipetten (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipette[®] (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Florisil[®]-SPE-Kartuschen 6 ml/1000 mg (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Nr. 730082.250)
- 200- μ l-Autosampler-Microvials mit Bördelkappen (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Nr. 702521/702025)
- Kühlzentrifuge (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)

4.2 Chemikalien

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

- Acetonitril, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100665)
- Hochreines Wasser (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Milli-Q[®]-Wasser)
- Methanol, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106011)
- Ethanol, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 102371)
- Dichlormethan, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106054)
- *n*-Hexan, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 104371)
- *iso*-Octan, SupraSolv[®] (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 115440)
- Ammoniumacetat, Emsure[®] (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 1.01116)
- α -HBCDD, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. ULM-4834-1.2)
- α -HBCDD-¹³C₁₂, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. CLM-7922-0.5)
- β -HBCDD, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. ULM-5835-1.2)
- β -HBCDD-¹³C₁₂, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. CLM-7923-1.2)
- γ -HBCDD, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. ULM-4836-1.2)
- γ -HBCDD-¹³C₁₂, 50 mg/l in Toluol (z. B. Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, USA, Nr. CLM-7924-1.2)

4.3 Lösungen

- Wässrige Ammoniumacetatlösung (5 mmol/l)
Genau 385 mg Ammoniumacetat werden in einen 1000-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens eine Woche haltbar.
- Dichlormethan : *n*-Hexan 2 : 8 (v : v)
In einem 500-ml-Messkolben werden 100 ml Dichlormethan pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit *n*-Hexan bis zur Markierung aufgefüllt.
Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

4.4 Interne Standards (ISTD)

- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l)
Je 200 µl der einzelnen käuflich erworbenen ISTD-Standardlösungen (α -HBCDD-¹³C₁₂, β -HBCDD-¹³C₁₂ und γ -HBCDD-¹³C₁₂) werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
Die ISTD-Dotierlösung wird bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens 12 Monate haltbar.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (1 mg/l)
Je 200 µl der Standardlösungen (α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD) werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung 1 (0,1 mg/l)
1 ml der Stammlösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und dieser mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung 2 (0,01 mg/l)
100 µl der Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung 3 (0,001 mg/l)
100 µl der Dotierlösung 1 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei 4 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens 12 Monate stabil.

Es werden Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,05–5 µg/l nach dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird undotiertes Poolplasma mitgeführt.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrierstandards zur Bestimmung von HBCDD in Plasma

Kalibrierstandard	Volumen Plasma [μl]	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [μl]	Konzentration Kalibrierstandard [$\mu\text{g/l}$]
1	1000	–	–	0
2	950	3	50	0,05
3	990	2	10	0,1
4	980	2	20	0,2
5	950	2	50	0,5
6	990	1	10	1,0
7	980	1	20	2,0
8	950	1	50	5,0

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Nach der Desinfektion der Punktionsstelle werden etwa 5 ml Blut mit einem Einmalentnahmesystem mit Antikoagulantzusatz (z. B. EDTA-Vacutainer®) aus der Armvene der zu untersuchenden Person entnommen. Das Entnahmeröhrchen wird anschließend leicht umgeschwenkt, damit sich das Antikoagulant homogen verteilen kann. Die Blutprobe wird im Anschluss bei $2200 \times g$ für zehn Minuten zentrifugiert. Die obere Plasmaphase wird mit einer Pipette in ein verschließbares Glasröhrchen überführt.

Das Plasma kann im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Woche, im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens ein Jahr gelagert werden.

5.2 Probenaufbereitung

1 ml des Plasmas wird in ein Schraubgläschen pipettiert. $5\ \mu\text{l}$ der ISTD-Dotierlösung und $200\ \mu\text{l}$ Ethanol werden zu der Probe pipettiert und diese kurz geschüttelt. Anschließend werden 5 ml *n*-Hexan zur Probe gegeben, das Gläschen wird verschlossen und für zehn Minuten auf dem Schüttler intensiv gemischt. Dann wird die Probe für zehn Minuten bei $2200 \times g$ und einer Temperatur von $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Die Konditionierung der SPE-Kartusche erfolgt nacheinander mit 3 ml Dichlormethan und 8 ml *n*-Hexan. Auf die so konditionierte Kartusche wird der Überstand der zentrifugierten Probe (Hexanextrakt) mit einer Pipette aufgetragen. Das durchlaufende Hexan wird verworfen. Die Analyten werden anschließend mit 5 ml Dichlormethan : *n*-Hexan 2:8 (v:v) in ein neues Vial eluiert. Das Eluat wird mit Stickstoff (50 kPa bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) bis zur Trockne einengt und der Rückstand in $100\ \mu\text{l}$ Ammoniumacetatlösung aufgenommen. Die Probenlösung wird in ein $200\text{-}\mu\text{l}$ -Microvial überführt, das Vial verschlossen und zur Analyse mittels LC-MS/MS eingesetzt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekopplung bestehend aus einem Waters Alliance HPLC-System und einem Waters Quattro Ultima Tandem-Massenspektrometer.

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Analytische Säule:	Waters Atlantis T3 3 µm, 3,0 × 50 mm
Mobile Phase:	A: Methanol B: Wässrige Ammoniumacetatlösung C: Acetonitril
Stoppzeit:	15 min
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Probentemperatur:	15 °C
Flussrate:	0,3 ml/min
Gradientenpumpe:	Gradientenprogramm siehe Tabelle 3

Tab. 3 Programm der Gradientenpumpe

Zeit [min]	Mobile Phase A [Vol.-%]	Mobile Phase B [Vol.-%]	Mobile Phase C [Vol.-%]
0	20	40	40
1,5	20	20	60
2,5	20	10	70
10	20	10	70
10,05	20	0	80
11	20	0	80
12	20	40	40

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsart:	negative Elektrospray-Ionisation (ESI-)
Quellentemperatur:	120 °C
Desolvations-Temperatur:	300 °C
Cone-Gasfluss:	276 l/h
Desolvations-Gasfluss	499 l/h
Kollisionsenergie:	30 eV
Multipliiert:	650 V
Kollisionszellendruck:	$9,02 \times 10^{-4}$ mbar
Kollisionsgas:	Argon
Dwell time	0,05 s
Delay	0,1 s
Parameterspezifische Einstellungen	siehe Tabelle 4

Tab. 4 Parameterspezifische Einstellungen für die Analyten und die internen Standards

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenspur [m/z]	
		Ausgangs-Ion	Produkt-Ion
α -HBCDD	7,7	641	79
β -HBCDD	7,9	641	79
γ -HBCDD	8,4	641	79
α -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$	7,7	653	79
β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$	7,9	653	79
γ -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$	8,4	653	79

Die LC-MS/MS-Produkt-Ionenspektren von HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$ und HBCDD sind in Abbildung 2 dargestellt und die sich durch das Brom ergebene Isotopenverteilung in Abbildung 3. Die MRM-Übergänge entsprechen der Fragmentierung der $[\text{M-H}]^-$ -Pseudo-Molekülonen zu $^{79}\text{Br}^-$. Die durch die Isotopenverteilung entstehende Masse 81 (entspricht $^{81}\text{Br}^-$) kann zur Absicherung der Ergebnisse eingesetzt werden und erlaubt durch Summenbildung über die Peakflächen $^{79}\text{Br}^-$ und $^{81}\text{Br}^-$ einen empfindlicheren Nachweis der HBCDD-Isomere.

Sämtliche Einstellungen der Ionenquelle sowie die MRM-Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell eingestellt werden. Die angegebenen Zahlenwerte können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

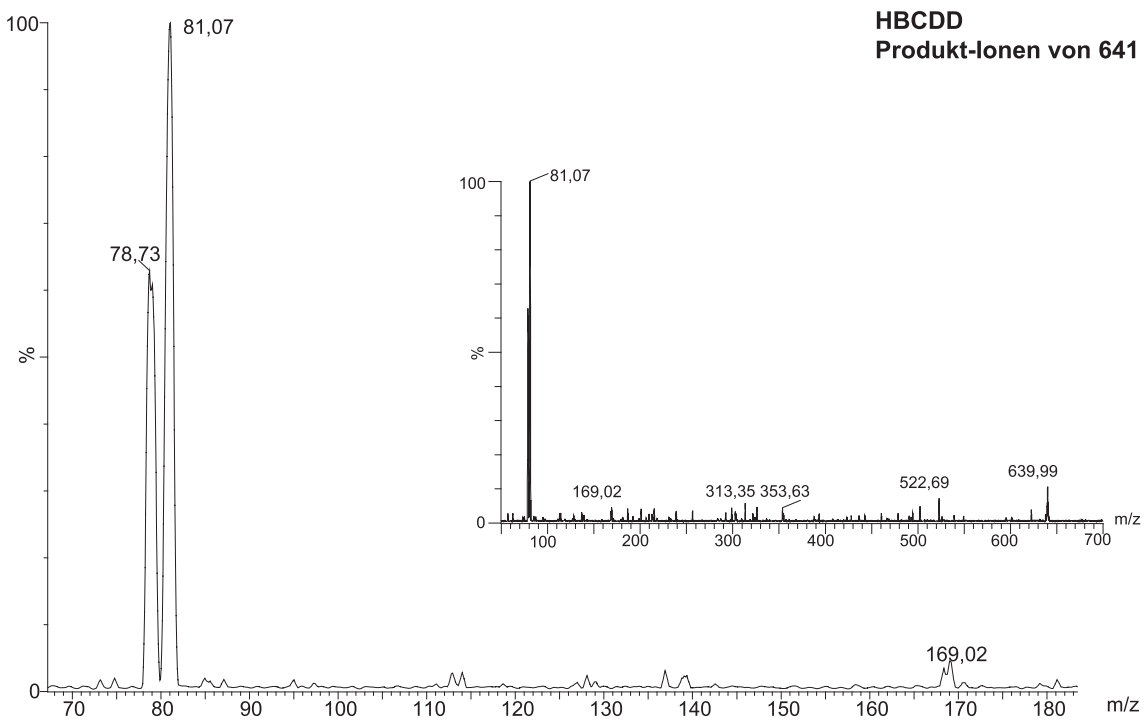
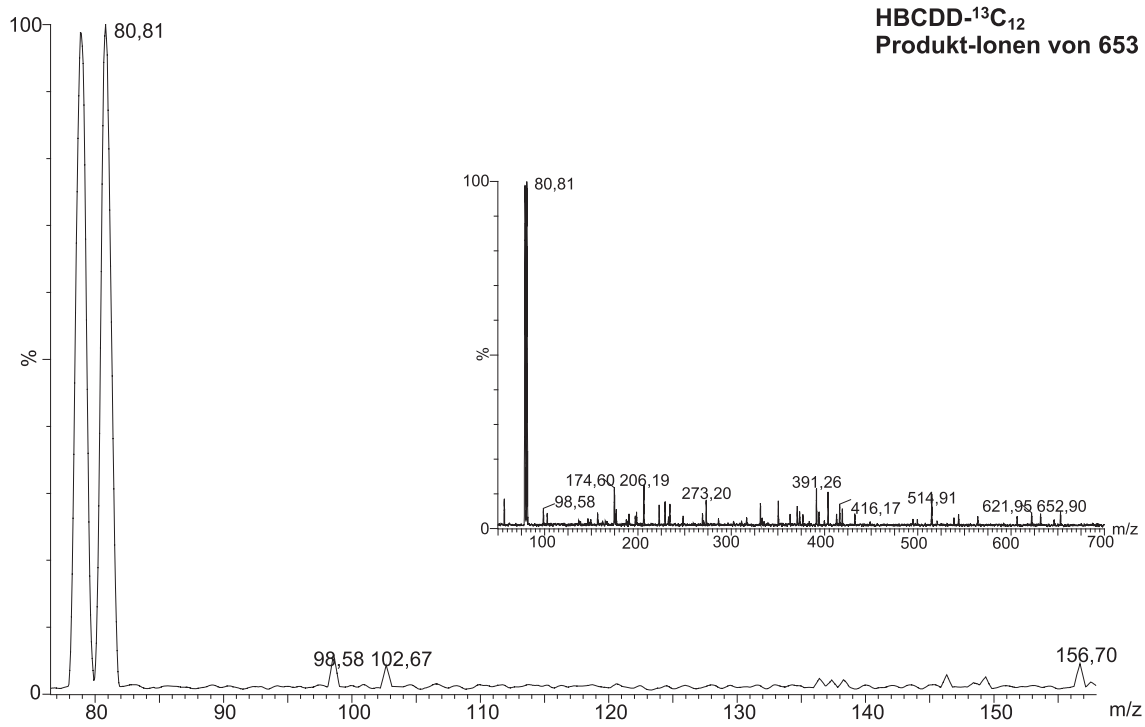


Abb. 2 Produkt-Ionenspektren von HBCDD-¹³C₁₂ und HBCDD

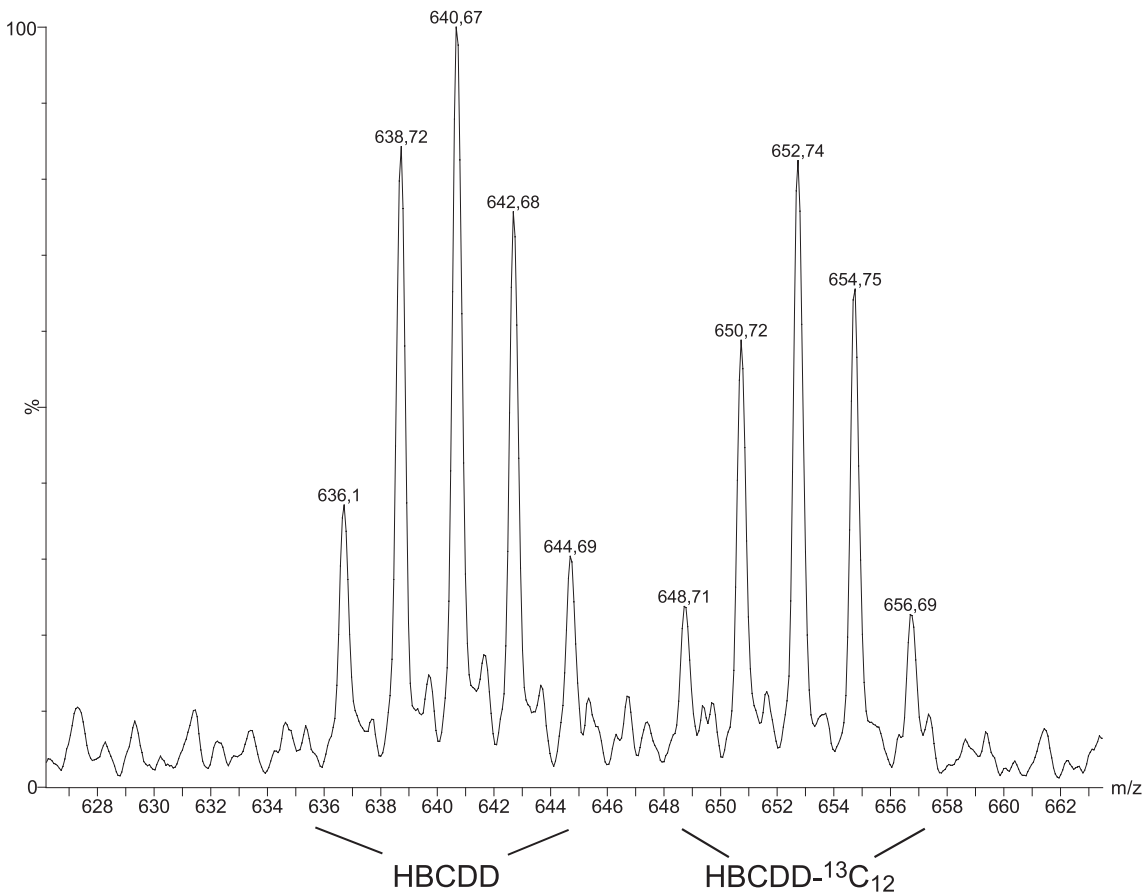


Abb. 3 Isotopenverteilung von HBCDD-¹³C₁₂ und HBCDD

7 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 5 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 20 µl in das LC-MS/MS-Gerät injiziert. Zur Identifizierung der einzelnen Analyten werden die Retentionszeiten und die Ionenspektren des jeweiligen Analyten verwendet (Tabelle 4). Die in Tabelle 4 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 4 und 5 sind beispielhaft Chromatogramme einer nativen Plasmaprobe sowie einer mit je 0,1 µg/l der Analyten dotierten Plasmaprobe abgebildet.

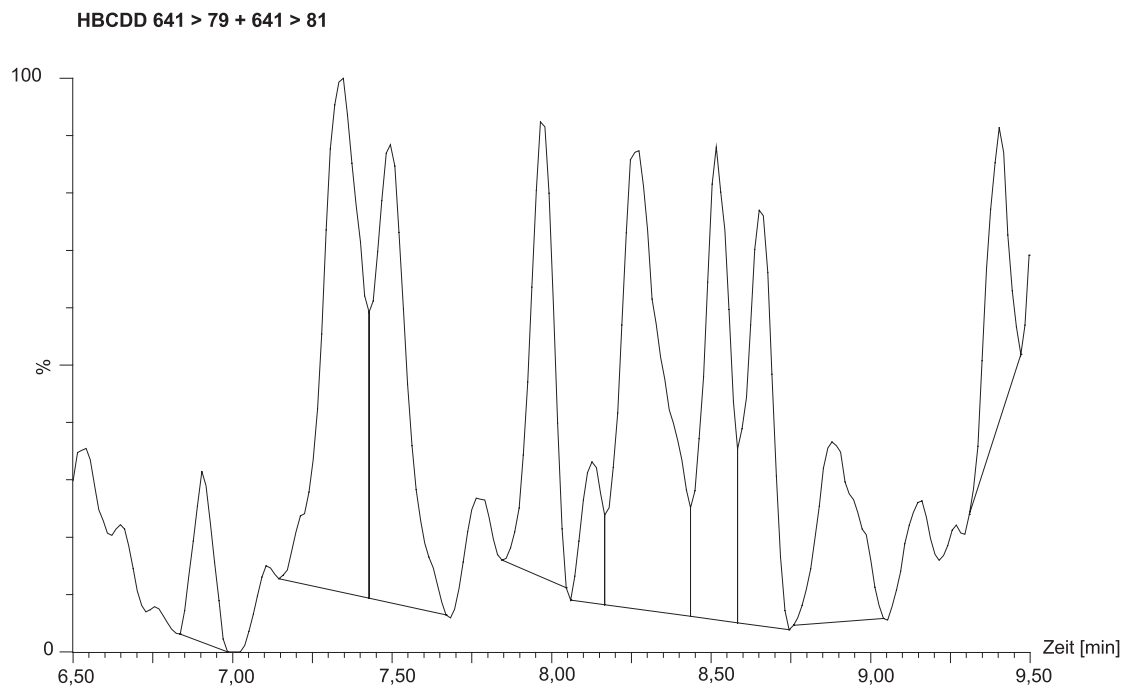
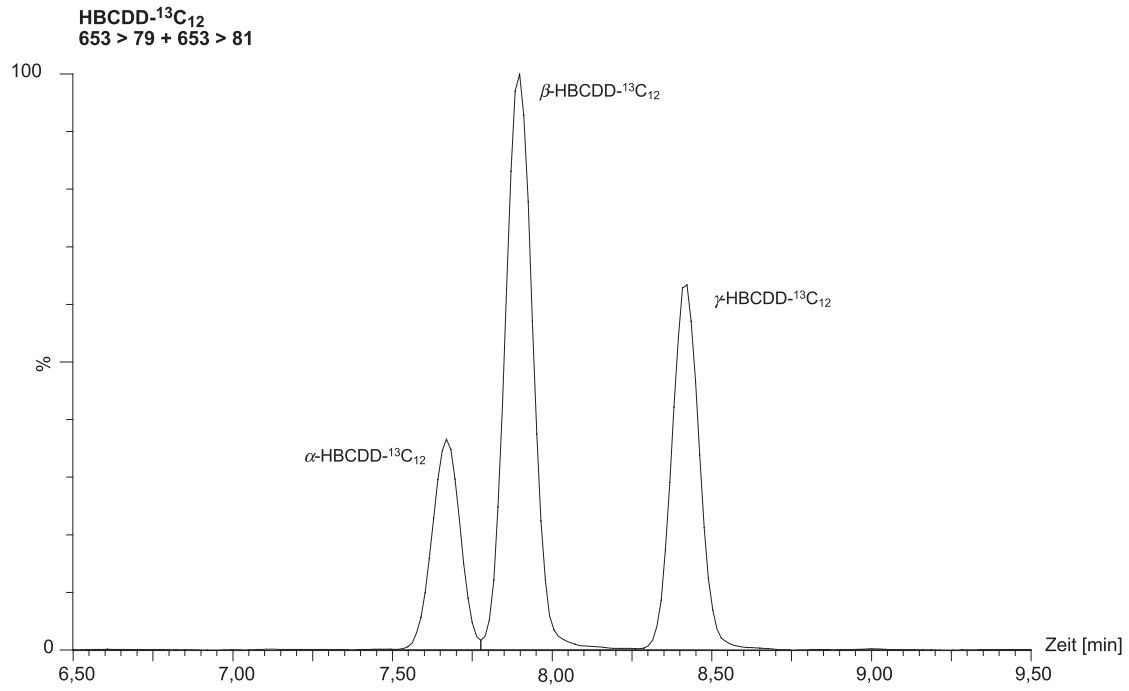


Abb. 4 Chromatogramm einer nativen Plasmaprobe

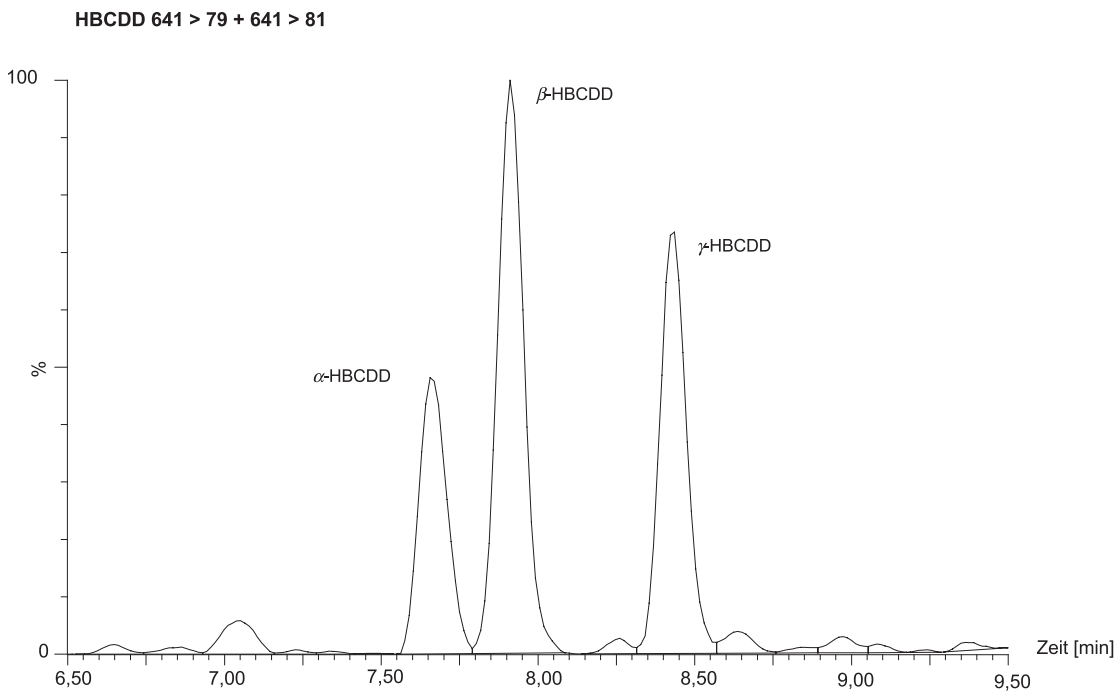
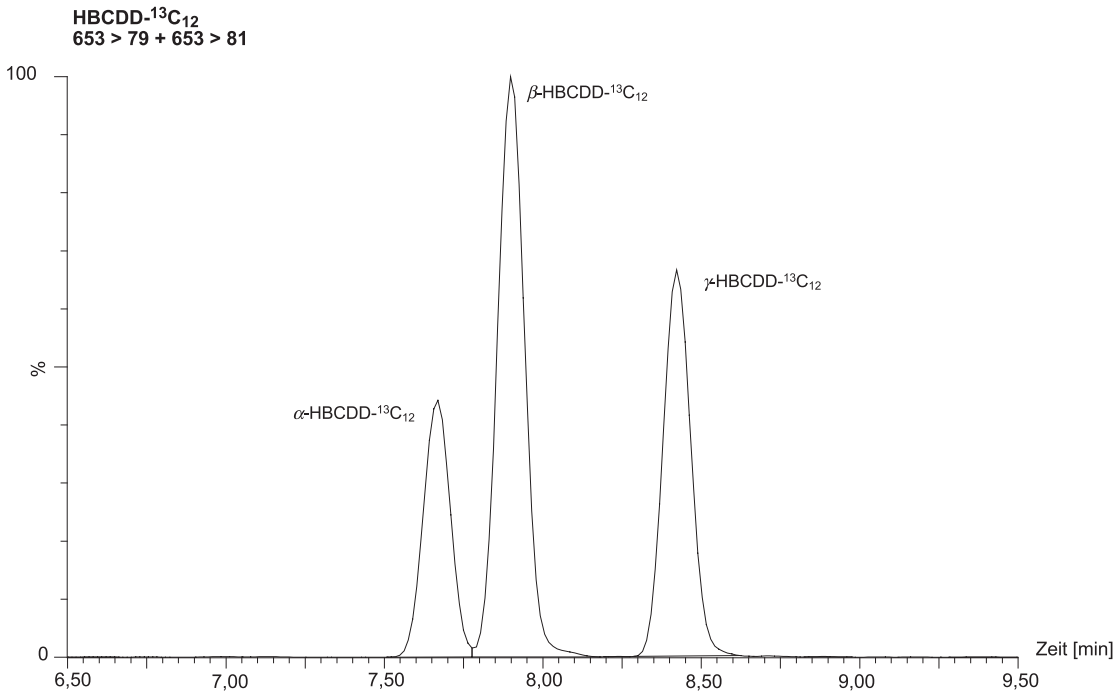


Abb. 5 Chromatogramm einer mit 0,1 µg/l je Analyt dotierten Plasmaprobe

8 Kalibrierung

Die nach Abschnitt 4.5 hergestellten Kalibrierstandards werden nach Abschnitt 5.2 aufgearbeitet und analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem die Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten und des zugehörigen ^{13}C -markierten internen Standards gegen die dotierten Analytkonzentrationen aufgetragen werden. Am eingesetzten Analysegerät wurde dabei ein linearer Messbereich von der Nachweisgrenze bis 100 $\mu\text{g/l}$ ermittelt, wobei sich eine Kalibrierung bis 5 $\mu\text{g/l}$ als ausreichend erwiesen hat. Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Kalibriergeraden für α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD in Plasma.

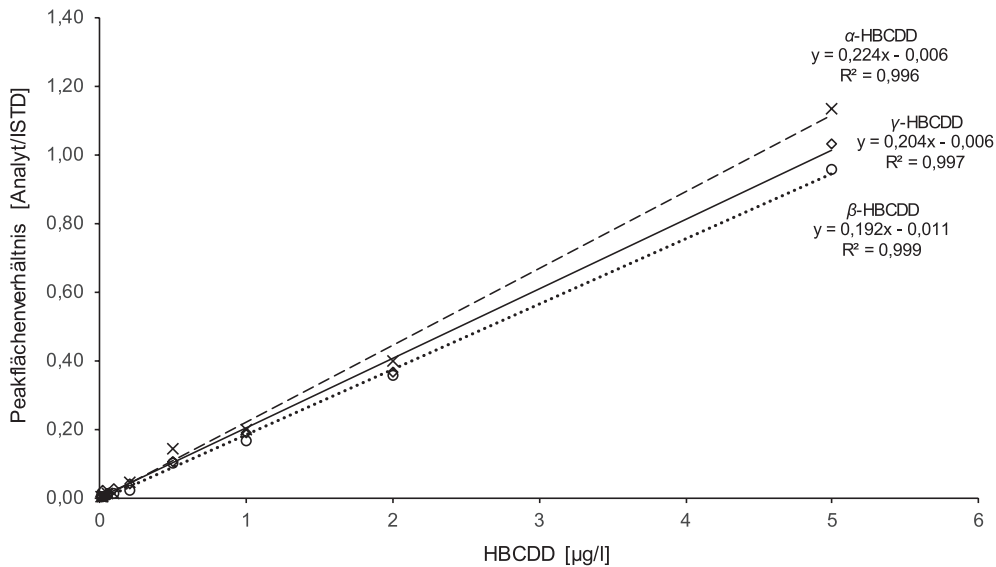


Abb. 6 Kalibriergeraden für die Bestimmung von α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD in Plasma

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung der Analytgehalte in den Plasmaproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktionen (Abschnitt 8). Die ermittelten Peakflächen der einzelnen HBCDD-Isomere werden durch die Peakflächen des zugehörigen internen Standards dividiert. Mit den so erhaltenen Quotienten wird die Analytkonzentration in den Proben unter Anwendung der entsprechenden Kalibrierfunktion ermittelt. Reagenzienleerwerte werden durch Subtraktion berücksichtigt.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in einem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014). Zur Qualitätssicherung werden mindestens drei Plasmaproben mit bekannten Analytkonzentrationen parallel zu den Proben analysiert. Da für diese Analyten keine käuflichen Kontrollmaterialien zur Verfügung stehen, müssen diese selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolplasma von beruflich nicht gegen HBCDD exponierten Personen eingesetzt und jeweils mit 0,1 $\mu\text{g/l}$, 1,0 $\mu\text{g/l}$ oder 5 $\mu\text{g/l}$ α -HBCDD, β -HBCDD und γ -HBCDD dotiert. Aliquote dieser Materialien werden bei -20°C gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse der Kontrollmaterialien) ermittelt (Bader et al. 2010). Gleichzeitig

wird mit jeder Analysenserie mindestens ein Reagenzienleerwert analysiert, damit eventuelle Störungen aus den Reagenzien erkannt werden.

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde Poolplasma von beruflich nicht gegen HBCDD exponierten Personen eingesetzt. Je zehn Plasmaproben wurden dabei jeweils mit Analytkonzentrationen von 0,1 µg/l, 1,0 µg/l und 10,0 µg/l dotiert. Diese Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet (Abschnitt 5.2) und analysiert (Abschnitt 6). Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5 Präzision in der Serie für die Bestimmung von α -, β - und γ -HBCDD in Plasma (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
α -HBCDD	0,1	0,097	21,3	48,2
	1,0	1,03	13,1	29,6
	10,0	10,8	10,5	23,8
β -HBCDD	0,1 ^{a)}	0,099	16,3	37,6
	1,0	1,01	9,1	20,6
	10,0	9,86	6,5	14,7
γ -HBCDD	0,1	0,102	14,0	31,7
	1,0	0,85	8,7	19,7
	10,0	8,96	7,2	16,3

^{a)} Ausreißer eliminiert, n = 9

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ebenfalls mit Poolplasma von beruflich nicht gegen HBCDD exponierten Personen durchgeführt. An fünf verschiedenen Tagen wurden je zwei Plasmaproben mit Analytkonzentrationen von 0,1 µg/l, 1,0 µg/l sowie 10,0 µg/l dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionsdaten sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab. 6 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von α -, β - und γ -HBCDD in Plasma (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Gemessene Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
α -HBCDD	0,1	0,095	18,2	41,2
	1,0	1,03	11,7	26,5
	10,0	9,77	6,5	14,7
β -HBCDD	0,1	0,104	14,0	31,7
	1,0	0,98	10,4	23,5
	10,0	9,65	10,9	24,7
γ -HBCDD	0,1	0,095	17,6	39,8
	1,0	0,98	13,5	30,5
	10,0	10,8	6,9	15,6

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Analysen wurde aus den Daten zur Präzision in der Serie und zur Präzision von Tag zu Tag errechnet. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in den Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

Tab. 7 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung von α -, β - und γ -HBCDD in Plasma errechnet aus den Daten zur Präzision in der Serie (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindung (rel.) r [%]	Bereich [%]
α -HBCDD	0,1	97	68–130
	1,0	103	80–118
	10,0	108	89–120
β -HBCDD	0,1 ^{a)}	99	77–120
	1,0	101	82–113
	10,0	99	87–107
γ -HBCDD	0,1	102	79–125
	1,0	85	76–102
	10,0	90	81–101

^{a)} Ausreißer eliminiert, n = 9

Tab. 8 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung von α -, β - und γ -HBCDD in Plasma errechnet aus den Daten zur Präzision von Tag zu Tag (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindung (rel.) r [%]	Bereich [%]
α -HBCDD	0,1	95	74–120
	1,0	103	84–126
	10,0	95	82–118
β -HBCDD	0,1	104	79–120
	1,0	98	85–118
	10,0	97	82–115
γ -HBCDD	0,1	95	65–115
	1,0	98	81–118
	10,0	108	102–115

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte auf Grundlage des dreifachen Signal/Rausch-Verhältnisses für die Nachweisgrenzen und des neunfachen Signal/Rausch-Verhältnisses für die Bestimmungsgrenzen. Die für die drei Analyten in Plasma berechneten Werte sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Analyse von α -, β - und γ -HBCDD in Plasma (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/l}$]
α -HBCDD	0,03	0,1
β -HBCDD	0,03	0,1
γ -HBCDD	0,03	0,1

11.4 Störeinflüsse

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene LC-Säulen hinsichtlich ihrer Trennleistung getestet, jedoch konnte nur mit der Nucleodur C18 ISIS (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Nr. 760413.20), mit der XSelect HSS C18 (Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186006138) sowie mit der Atlantis T3 (Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186003721) über einen längeren Zeitraum eine stabile Trennung aller drei Isomere erzielt werden. Die Trennung der drei HBCDD-Stereoisomere war jedoch nicht das einzige Auswahlkriterium. Es wurde beobachtet, dass eine Vielzahl der getesteten LC-Säulen rasch in ihrer Trennleistung nachließen und zunehmend weniger inert waren. Dieses Phänomen wurde auch bei Injektion reiner Standardlösungen beobachtet, sodass die eventuelle Begleitmatrix als mögliche Ursache ausscheidet. Die hier beschriebenen Messungen konnten erfolgreich mit zwei Säulen (XSelect und Atlantis T3) durchgeführt werden, die sich neben einer geringen Peakbreite auch durch eine scharfe Abtrennung des α -HBCDD vom β -HBCDD auszeichnen.

Die aus der PCB-Analytik bekannte SPE-Aufreinigungstechnik über Florisil®-Kartuschen erwies sich auch für die HBCDD-Isomere als sehr effektiv, da hierdurch Lipidbestandteile selektiv abgetrennt werden konnten. Durch das Abblasen des Eluats und das Aufnehmen des Rückstands in 100 μl Ammoniumacetatlösung wurde eine Aufkonzentrierung der Analysenprobe um den Faktor 10 erzielt.

Bei der analytischen Bestimmung mittels LC-MS/MS zeigte sich, dass das aus der Isotopenverteilung des Broms resultierende Massenfragment m/z 79 im Vergleich zu m/z 81 eine höhere Intensität aufwies. Die Quantifizierung

über m/z 79 und Absicherung über m/z 81 führte bei Verwendung von 2 ml Plasma zu einer Nachweisgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$. Weitere Optimierungsschritte, wie die Erhöhung des Cone-Gasflusses und die Summenbildung über m/z 79 und m/z 81, führten bei einem verwendeten Plasmavolumen von 1 ml zu einer Absenkung der Nachweisgrenze auf $0,03 \mu\text{g/l}$ und einer Bestimmungsgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$ für jedes der drei Isomere.

Die Ergebnisangabe der vorliegenden Methode erfolgt volumenbezogen ($\mu\text{g/l}$); jedoch ist anzumerken, dass hinsichtlich HBCDD ein internationaler Konsens dahingehend besteht, dass Ergebnisse in aller Regel auf den Lipidgehalt des Blutplasmas bezogen werden sollten (ng/g Lipid). Basis hierfür ist das Phänomen, dass sich stark lipophile Xenobiotika im Körperfett verteilen und somit der Gehalt der Xenobiotika im Blutplasma (oder Blutserum) direkt durch den Lipidgehalt in dieser Matrix beeinflusst wird (Phillips et al. 1989). Der Lipidgehalt wiederum hängt von verschiedensten Faktoren ab, u. a. auch von der Nahrungsaufnahme in den Stunden vor der Gewinnung der Blutproben. Er kann in einem relativ weiten Bereich schwanken von $4,5\text{--}12,6 \text{ g Lipid je Liter Blutplasma}$ bei Erwachsenen (ICRP 1975).

Im Rahmen der Methodenprüfung wurde nach Einspritzung hochdotierter Proben ein Verschleppungseffekt festgestellt. Es empfiehlt sich daher, nach solchen Proben eine Wasserprobe zu injizieren.

12 Diskussion der Methode

Die analytische Erfassung von HBCDD in biologischem Material ist eine Herausforderung. Optimierte Geräteparameter und eine effektive Probenaufreinigung sind daher Voraussetzung für eine analytische Bestimmung der HBCDD-Stereoisomere im angegebenen Nachweisbereich (Covaci et al. 2007; Dodder et al. 2006; Marvin et al. 2007; Thomsen et al. 2008).

Die vorliegende Analyseverfahren ermöglicht die selektive und robuste Quantifizierung von α -, β - und γ -HBCDD im Plasma. Die Verwendung von nur einem Milliliter Plasma und die Bestimmungsgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$ erlauben neben der Erfassung beruflicher Expositionen (Thomsen et al. 2007) gegebenenfalls auch die Erfassung einer umweltbedingten Exposition, sofern die untersuchten Probanden spezifischen Quellen für eine erhöhte umweltbedingte Belastung ausgesetzt sind (Li et al. 2014; Thomsen et al. 2008). Die Erfassung der Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung ist mit der vorliegenden Methode dagegen nicht ohne weiteres möglich (siehe Tabelle 1). Für solche Fragestellungen sollte auf alternative, deutlich nachweisstärkere Verfahren zurückgegriffen werden, wobei teilweise jedoch nur die Summe von HBCDD-Isomeren erfasst wird (Bjermo et al. 2017; Kalantzi et al. 2011; Li et al. 2014; Rawn et al. 2014; Roosens et al. 2009; Tang 2010; Thomsen et al. 2007, 2008; Weiss et al. 2004, 2006).

Durch den Einsatz der ^{13}C -markierten internen Standards mit gleichartiger Fragmentierung wird eine gute Kompensation der analytischen Schwankungen erreicht. Dies wurde durch die insgesamt zufriedenstellenden Präzisionsdaten bestätigt, da die im Bereich von $14,0\text{--}21,3 \%$ liegenden höheren relativen Standardabweichungen ausschließlich auf die an der Bestimmungsgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$ durchgeführten Wiederfindungsversuche zurückzuführen sind.

Um eine Übersicht über mögliche Hintergrundbelastungen zu erhalten, wurde Plasma von 48 beruflich nicht gegen HBCDD exponierten Personen analysiert. In keiner der Proben konnten Analytgehalte oberhalb der ermittelten Bestimmungsgrenze von $0,1 \mu\text{g/l}$ quantifiziert werden. In drei Proben wurde α -HBCDD oberhalb der NWG, mit Werten von $0,03 \mu\text{g/l}$, $0,04 \mu\text{g/l}$ und $0,08 \mu\text{g/l}$, detektiert (vgl. Tabelle 1).

Im Rahmen der Prüfung der Methode wurden unter Verwendung eines alternativen Tandemmassenspektrometers (AB Sciex QTrap 5500; AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt) Nachweisgrenzen in Höhe von $0,02 \mu\text{g/l}$ (α -HBCDD und β -HBCDD) und $0,01 \mu\text{g/l}$ (γ -HBCDD) sowie Bestimmungsgrenzen von $0,05 \mu\text{g/l}$ (α -HBCDD und β -HBCDD) und $0,03 \mu\text{g/l}$ (γ -HBCDD) ermittelt. Trotz verbesserter Bestimmungsgrenzen konnten die Prüfer bei Vermessung von 30 Plasmaproben aus der Allgemeinbevölkerung in keiner Probe HBCDD quantifizieren. Analoge Beobachtungen wurden auch durch die Entwickler der Methode nach Übertragung auf ein empfindlicheres LC-MS/MS-Gerät gemacht (Waters Xevo TQ-S mit Waters Acquity UPLC H-Class, Säule: Acquity UPLC HSS T3, $1,8 \mu\text{m}$, 100 \AA , $2,1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ (Waters GmbH, Eschborn)). Insbesondere konnten auf diesem Gerät erheblich bessere relative

Standardabweichungen bei der Präzision in der Serie (2–9 %, statt 7–21 %) und bei der Präzision von Tag zu Tag (2–12 %, statt 7–18 %) erreicht werden, wobei die Wiederfindungsraten gleichbleibend gut waren. Die Richtigkeit dieser weiterentwickelten Methode konnte durch die erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen im Rahmen des HBM4EU-Projektes bestätigt werden (Dvorakova et al. 2020; Lankova et al. 2018, 2019 a, b).

Verwendete Messgeräte LC-MS/MS System: Waters Alliance LC 2695 gekoppelt mit Waters Quattro Ultima Tandem MS. LC-Säule: Waters Atlantis T3 3 µm, 3,0 × 50 mm. Gerätesoftware: MassLynx 4.1 von Waters (Waters GmbH, Eschborn).

Literatur

- Abdallah MA, Harrad S (2009) Personal exposure to HBCDs and its degradation products via ingestion of indoor dust. *Environ Int* 35: 870–876. DOI: [10.1016/j.envint.2009.03.002](https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.03.002)
- Abdallah MA, Harrad S (2011) Tetrabromobisphenol-A, hexabromocyclododecane and its degradation products in UK human milk: Relationship to external exposure. *Environ Int* 37: 443–448. DOI: [10.1016/j.envint.2010.11.008](https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.008)
- Arsenault G, Chittim B, McAlees A, McCrindle R (2007 a) Nuclear magnetic resonance spectral characterization of confirmation and semi-empirical calculations of confirmations of alpha- and gamma-1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane. *Chemosphere* 67: 1684–1694. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2006.05.122](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.122)
- Arsenault G, Konstantinov A, Marvin CH, MacInnis G, McAllees A, McCrindle R, Riddell N, Tomy GT, Yeo B (2007 b) Synthesis of the two minor isomers, delta- and epsilon-1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, present in commercial hexabromocyclododecane. *Chemosphere* 68: 887–892. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2007.02.005](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.005)
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. Allgemeine Vorbemerkungen. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material*, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bireliabd0019](https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019)
- Bjermo H, Aune M, Cantillana T, Glynn A, Lind PM, Ridefelt P, Darnerud PO (2017) Serum levels of brominated flame retardants (BFRs: PBDE, HBCD) and influence of dietary factors in a population-based study on Swedish adults. *Chemosphere* 167: 485–491. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2016.10.008](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.008)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111: A1583–1618. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=161921>, abgerufen am 20 Apr 2020
- Covaci A, Voorspoels S, Ramos L, Neels H, Blust R (2007) Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds. *J Chromatogr A* 1153: 145–171. DOI: [10.1016/j.chroma.2006.11.060](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.060)
- Dodder NG, Peck AM, Kucklick JR, Sander LC (2006) Analysis of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: chromatographic selectivity and ionization matrix effects. *J Chromatogr A* 1135: 36–42. DOI: [10.1016/j.chroma.2006.09.024](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.024)
- Dvorakova D, Pulkrabova J, Hajslova J (2020) HBM4EU ICI EQUAS report, BFR in serum, round 4. <https://www.hbm4eu.eu/mdocs-posts/hbm4eu-ici-equas-report-bfr-in-serum-round-4/>, abgerufen am 17 Jun 2020
- Eljarrat E, Guerra P, Martínez E, Farré, Alvarez JG, López-Teijón M, Barceló D (2009) Hexabromocyclododecane in human breast milk: levels and enantiomeric patterns. *Environ Sci Technol* 43: 1940–1946. DOI: [10.1021/es802919e](https://doi.org/10.1021/es802919e)
- ECHA (European Chemicals Agency) (2010 a) Committee for Risk Assessment RAC. Annex 1 background document to the opinion proposing harmonised classification and labelling at Community level of hexabromocyclododecane (HBCDD). ECHA/RAC/CLH-O-0000001050-94-03/A1. ECHA, Helsinki. <https://echa.europa.eu/documents/10162/b6275976-b743-df31-dbf6-66818f7388fb>, abgerufen am 16 Apr 2020
- ECHA (European Chemicals Agency) (2010 b) Annex XV dossier. Proposal for the identification of a substance as a CMR CAT 1 or 2, PBT, vPvB or a substance of an equivalent level of concern. Proposal for identification of hexabromocyclododecane as a SVHC. ECHA, Helsinki. <https://echa.europa.eu/documents/10162/3f5de199-8732-4881-aec6-730bf9499a36>, abgerufen am 16 Apr 2020
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Scientific opinion on hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in food. *EFSA J* 9: 2296. DOI: [10.2903/j.efsa.2011.2296](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2296)
- EU (Europäische Union) (2011 a) Verordnung (EU) Nr. 143/2011 der Kommission vom 17. Feb 2011 zur Änderung von Anhang XIV der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R0143-20110221&from=DE>, abgerufen am 17 Jun 2020
- EU (European Union) (2011 b) Risk assessment hexabromocyclododecane. CAS-No.: 25637-99-4, EINECS-No.: 247-148-4, final report May 2008. <https://echa.europa.eu/documents/10162/661bff17-dc0a-4475-9758-40bdd6198f82>, abgerufen am 17 Jun 2020

- EU (Europäische Union) (2016) Verordnung (EU) 2016/293 der Kommission vom 1. Mrz 2016 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 850/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über persistente organische Schadstoffe hinsichtlich des Anhangs I. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0293&qid=1595336252769&from=DE>, abgerufen am 21 Jul 2020
- Geyer HJ, Schramm K-W, Darnerud PO, Aune M, Feicht EA, Fried KW, Henkelmann B, Lenoir D, Schmid P, McDonald TA (2004) Terminal elimination half-lives of the brominated flame retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen Compounds* 66: 3820–3825. <http://dioxin20xx.org/wp-content/uploads/pdfs/2004/04-149.pdf>, abgerufen am 21 Jul 2020
- Heeb NV, Schweizer WB, Kohler M, Gerecke AC (2005) Structure elucidation of hexabromocyclododecanes – a class of compounds with a complex stereochemistry. *Chemosphere* 61: 65–73. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2005.03.015](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.015)
- Heeb NV, Schweizer WB, Mattrel P, Haag R, Gerecke AC, Schmid P, Zennegg M, Vonmont H (2008) Regio- and stereoselective isomerization of hexabromocyclododecanes (HBCDs): kinetics and mechanism of gamma- to alpha-HBCD isomerization. *Chemosphere* 73: 1201–1210. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2008.07.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.045)
- ICRP (International Commission on Radiological Protection) (1975) Report of the task group on reference man. Pergamon Press, Oxford
- IOM (Institute of Occupational Medicine) (2008) Data on manufacture, import, export, uses and releases of HBCD as well as information on potential alternatives to its use. IOM Consulting, supported by BRE, PFA and Entec under framework contract ECHA/2008/2. <https://echa.europa.eu/documents/10162/eb5129cf-38e3-4a25-a0f7-b02df8ca4532>, abgerufen am 17 Jun 2020
- Janák K, Covaci A, Voorspoels S, Becher G (2005) Hexabromocyclododecane in marine species from the Western Scheldt estuary: diastereomer- and enantiomer-specific accumulation. *Environ Sci Technol* 39: 1987–1994. DOI: [10.1021/es0484909](https://doi.org/10.1021/es0484909)
- Kalantzi OI, Geens T, Covaci A, Siskos PA (2011) Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. *Environ Int* 37: 349–353. DOI: [10.1016/j.envint.2010.10.005](https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.005)
- Kakimoto K, Akutsu K, Konishi Y, Tanaka Y (2008) Time trend of hexabromocyclododecane in the breast milk of Japanese women. *Chemosphere* 71: 1110–1114. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2007.10.035](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.035)
- Lankova D, Pulkrabova J, Hajslova J (2018) HBM4EU ICI EQUAS report, BFR in serum, round 1. <https://www.hbm4eu.eu/mdocs-posts/ici-01-bfrs-in-serum/>, abgerufen am 17 Jun 2020
- Lankova D, Pulkrabova J, Hajslova J (2019 a) HBM4EU ICI EQUAS report, BFR in serum, round 2. <https://www.hbm4eu.eu/mdocs-posts/hbm4eu-ici-equas-report-bfr-in-serum-round-2/>, abgerufen am 17 Jun 2020
- Lankova D, Pulkrabova J, Hajslova J (2019 b) HBM4EU ICI EQUAS report, BFR in serum, round 3. <https://www.hbm4eu.eu/mdocs-posts/hbm4eu-ici-equas-report-bfr-in-serum-round-3/>, abgerufen am 17 Jun 2020
- Li P, Yang CQ, Jin J, Wang Y, Liu WZ, Ding WW (2014) [Correlations between HBCD and thyroid hormone concentrations in human serum from production source area]. *Huan Jing Ke Xue* 35: 3970–3976. DOI: [10.13227/j.hj.kx.2014.10.046](https://doi.org/10.13227/j.hj.kx.2014.10.046)
- Marvin CH, MacInnis G, Alaei M, Arsenault G, Tomy GT (2007) Factors influencing enantiomeric fractions of hexabromocyclododecane measured using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21: 1925–1930. DOI: [10.1002/rcm.3040](https://doi.org/10.1002/rcm.3040)
- NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme) (2012) Hexabromocyclododecane. Priority existing chemical assessment report No. 34. NICNAS, Sidney. <https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/PEC34-Hexabromocyclododecane-HBCD.pdf>, abgerufen am 15 Apr 2020
- Phillips DL, Pirkle JL, Burse VW, Bernert JT, Henderson LO, Needham LL (1989) Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch Environ Contam Toxicol* 18: 495–500. DOI: [10.1007/BF01055015](https://doi.org/10.1007/BF01055015)
- Rawn DFK, Ryan JJ, Sadler AR, Sun W-F, Weber D, Laffey P, Haines D, Macey K, Van Oostdam J (2014) Brominated flame retardant concentrations in sera from the Canadian Health Measures Survey (CHMS) from 2007 to 2009. *Environ Int* 63: 26–34. DOI: [10.1016/j.envint.2013.10.012](https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.10.012)
- Roosens L, Abdallah MAE, Harrad S, Neels H, Covaci A (2009) Exposure to hexabromocyclododecanes (HBCDs) via dust ingestion, but not diet, correlates with concentrations in human serum: preliminary results. *Environ Health Perspect* 117: 1707–1712. DOI: [10.1289/ehp.0900869](https://doi.org/10.1289/ehp.0900869)
- Tang C (2010) Quantitative determination of the diastereoisomers of hexabromocyclododecane in human plasma using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878: 3317–3322. DOI: [10.1016/j.jchromb.2010.10.015](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.015)
- Thomsen C, Molander P, Daae HL, Janák K, Frøshaug M, Liane VH, Thorud S, Becher G, Dybing E (2007) Occupational exposure to hexabromocyclododecane at an industrial plant. *Environ Sci Technol* 41: 5210–5216. DOI: [10.1021/es0702622](https://doi.org/10.1021/es0702622)
- Thomsen C, Knutsen HK, Liane VH, Frøshaug M, Kvaalem HE, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Becher G (2008) Consumption of fish from a contaminated lake strongly affects the concentrations of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in serum. *Mol Nutr Food Res* 52: 228–237. DOI: [10.1002/mnfr.200700123](https://doi.org/10.1002/mnfr.200700123)

- UBA (Umweltbundesamt) (2015) Stoffmonographie für 1,2,5,6,9,10-Hexabromcyclododecan (HBCDD) – HBM-Werte für HBCDD im Fettanteil der Muttermilch oder des Blutplasmas. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 58: 889–907. DOI: [10.1007/s00103-015-2193-7](https://doi.org/10.1007/s00103-015-2193-7)
- UN (United Nations) (2017) United Nations Environment Programme. Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs). <http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-2017.English.pdf>, abgerufen am 15 Jun 2020
- Weiss J, Meijer L, Sauer P, Linderholm L, Athanassiadis I, Bergman Å (2004) PBDE and HBCDD levels in blood from Dutch mothers and infants – analysis of a Dutch Groningen infant cohort. Organohalogen Compounds 66: 2647–2652. <http://dioxin20xx.org/wp-content/uploads/pdfs/2004/04-328.pdf>, abgerufen am 21 Jul 2020
- Weiss J, Wallin E, Axmon A, Jönsson BA, Åkesson H, Janák K, Hagmar L, Bergman Å (2006) Hydroxy-PCBs, PBDEs and HBCDDs in serum from an elderly population of Swedish fishermen’s wives and associations with bone density. Environ Sci Technol 40: 6282–6289. DOI: [10.1021/es0610941](https://doi.org/10.1021/es0610941)