

2-Mercaptobenzothiazol – Bestimmung von 2-Mercaptobenzothiazol in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

2-Mercaptobenzothiazol, MBT, Vulkanisationsbeschleuniger, Biomonitoring, Urin, LC-MS/MS

W. Gries¹
K. Küpper¹
G. Leng¹
G. Scherer²

D. Krnac²
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, ABF GmbH – Analytisch-biologisches Forschungslabor München, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg, 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)

Abstract

Citation Note:

Gries W, Küpper K, Leng G, Scherer G, Krnac D, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. 2-Mercaptobenzothiazol – Bestimmung von 2-Mercaptobenzothiazol in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2020 Okt;5(3):Doc067. DOI: [10.34865/bi14930d5_3or](https://doi.org/10.34865/bi14930d5_3or)

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 method enables the selective detection of the vulcanisation accelerator 2-mercaptobenzothiazole (MBT) in urine. After adding a labelled internal standard (MBT-d₄), the samples are enzymatically hydrolysed to release free MBT from the conjugated MBT compounds. After online purification and enrichment, the analytes are separated from accompanying components by liquid chromatography and analysed using tandem mass spectrometry. Calibration standards are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed.

Manuskript abgeschlossen:
24 Nov 2016

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	Urin
Analytisches Messprinzip	LC-MS/MS
Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe	

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
2-Mercaptobenzothiazol (MBT)	149-30-4	MBT	149-30-4
Zinksalz des 2-Mercaptobenzothiazols	155-04-4		

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

2-Mercaptobenzothiazol (MBT)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,3 \%, 1,9 \%$ bzw. $1,6 \%$
	Streubereich	$u = 5,1 \%, 4,2 \%$ bzw. $3,6 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $10 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ bzw. $1000 \mu\text{g}$ MBT pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,3 \%, 5,8 \%$ bzw. $3,4 \%$
	Streubereich	$u = 9,6 \%, 13,0 \%$ bzw. $7,6 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $10 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ bzw. $1000 \mu\text{g}$ MBT pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 86 \%, 96 \%$ bzw. 96%
	bei einer Sollkonzentration von $10 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ bzw. $1000 \mu\text{g}$ MBT pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,4 \mu\text{g}$ MBT pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$1,2 \mu\text{g}$ MBT pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu 2-Mercaptobenzothiazol

2-Mercaptobenzothiazol (MBT) ist eine organische Verbindung aus der Gruppe der Heteroaromaten. Die Substanz liegt unter Normalbedingungen in Form von leicht gelblichen Kristallen vor, die in Wasser schwer löslich sind. Die industrielle Herstellung erfolgt durch Umsetzung von Anilin, Schwefelkohlenstoff und Schwefel unter Hochdruck bei hohen Temperaturen von etwa $230 \text{ }^\circ\text{C}$ (Greim 1999; IARC 2018).

MBT wird hauptsächlich als Vulkanisationsbeschleuniger in der Reifenproduktion und der Herstellung von technischen Gummiartikeln eingesetzt. Zusätzlich kommen das Zinksalz des Mercaptobenzothiazols sowie die Sulfenamide, eine vom MBT ausgehende Verbindungsklasse, als mögliche Quelle für MBT in Frage. So ist MBT potentiell in vielen täglichen Gebrauchsgegenständen zu finden, wie z. B. in Reifen, Kabeln, Gummihandschuhen, Gummi-

bändern und -dichtungen, sowie Bohr- und Schneidölen. Weiterhin wird es als Reagenz bei der quantitativen nass-chemischen Metallanalytik eingesetzt (IARC 2018).

2-Mercaptobenzothiazol liegt in zwei tautomeren Formen vor, bei denen das Gleichgewicht auf die Seite des 2-(3H)-Benzothiazolthions (NH-Form) verschoben ist (vgl. Abbildung 1).

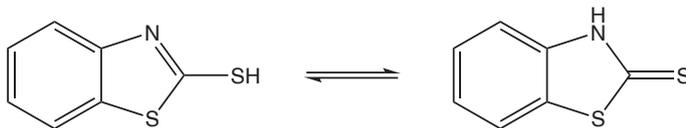


Abb. 1 Tautomere Strukturen des MBT

Die Kommission hat MBT in Kategorie 3B der krebserzeugenden Arbeitsstoffe eingestuft und einen MAK-Wert von 4 mg/m³ E festgelegt. Zudem wurde MBT von der Kommission in die Schwangerschaftsgruppe C eingestuft und es wurde eine Sh-Markierung (Gefahr der Sensibilisierung der Haut) vergeben (DFG 2019). Die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) stuft MBT als wahrscheinlich krebserzeugend für den Menschen (Gruppe 2A) ein (IARC 2018). Details zur toxikologischen Bewertung von MBT können der entsprechenden MAK-Dokumentation sowie einer IARC-Monographie entnommen werden (Greim 1999; IARC 2018).

MBT wird im Tierversuch sowohl nach oraler als auch nach dermalen Gabe schnell resorbiert und vorrangig über den Urin ausgeschieden (IARC 2018). Aus Metabolismusstudien an Ratten ist bekannt, dass mehr als 90 % des oral verabreichten MBT innerhalb von 4 Tagen im Urin ausgeschieden werden. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend konjugiert als Glucuronid oder als Sulfat (Fukuoka et al. 1995; IARC 2018). Ausgehend von Daten aus Tierversuchen liegt die Eliminationshalbwertszeit von MBT im Urin unter 8 Stunden (Greim 1999; IARC 2018).

Die hier beschriebene Analysenmethode wurde bereits auf ein kleines Kollektiv beruflich exponierter Personen (n = 4) angewandt, wobei MBT in allen Urinproben nachgewiesen werden konnte (Bereich 567 µg/l bis 6210 µg/l) (Gries et al. 2015).

Aufgrund der vielfältigen Einsatzgebiete des MBT in täglichen Gebrauchsgegenständen und des möglichen Eintrags in die Umwelt (z. B. Reifenabrieb), ist ebenfalls von einer Exposition der Allgemeinbevölkerung gegen MBT auszugehen. Zur Bestimmung eventueller Hintergrundbelastungen wurden 40 Individualurine von nicht beruflich gegen MBT exponierten Personen mit der hier beschriebenen Methode analysiert. Die Untersuchung erfolgte dabei sowohl von den Entwicklern der Methode, als auch im Rahmen der Methodenprüfung. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zudem erfolgte die Bestimmung von MBT in Urinproben der Allgemeinbevölkerung mit der vorliegenden Methode im Rahmen der Deutschen Umweltstudie zur Gesundheit (GerES V, *German Environmental Survey, Part V*). Hierfür wurde eine Unterstichprobe des GerES V-Kollektivs von 516 Urinproben von Kindern und Jugendlichen (3–17 Jahre) untersucht. Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Gehalte an MBT in Urinproben beruflich nicht gegen MBT exponierter Personen

Kollektiv	Anzahl	Anzahl > BG ^{a)}	Median (Bereich) [µg/l]	95. Perzentil [µg/l]	Literatur
Allgemeinbevölkerung	40	1	< BG (< BG–10,8)	< BG	Gries et al. 2015
Allgemeinbevölkerung	40	13	< BG (< BG–7,9)	2,4	Erhobene Daten aus Methodenprüfung
Allgemeinbevölkerung (3–17 Jahre)	516	256	< BG (< BG–43,5)	4,8	Murawski et al. 2020

^{a)} BG: Bestimmungsgrenze

3 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode dient der selektiven Erfassung des Vulkanisationsbeschleunigers 2-Mercaptobenzothiazol im Urin. Nach Zugabe eines markierten internen Standards (MBT-d₄) werden die Proben enzymatisch hydrolysiert, um die gebundenen MBT-Anteile freizusetzen. Nach online-Aufreinigung und -Anreicherung werden die Analyten flüssigchromatographisch von Begleitkomponenten getrennt und mittels nachgeschalteter Tandemmassenspektrometrie analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Poolurin 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 gekoppelt mit Waters Quattro Ultima Tandem MS (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- Analytische Säule: Zorbax Eclipse XDB-C8 5 µm, 4,6 × 50 mm (z. B. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Nr. 946975-906)
- Anreicherungssäule: Oasis HLB 25 µm, 2,1 × 20 mm (z. B. Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186002036)
- Schüttler (z. B. IKA Vibrax VXR, Eppendorf AG, Hamburg)
- Pasteurpipetten (z. B. Transferpipetten aus PE von Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Analysenwaage (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Wärmeschrank (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Verschiedene Messkolben und Bechergläser (z. B. BRAND GMBH & Co. KG, Wertheim)
- Variabel einstellbare Pipetten (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipette (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Einmalpipetten 3,5 ml (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 1,5-ml-Glasvials mit Bördelkappen (z. B. Waters GmbH, Eschborn, Nr. 186000327C)
- pH-Meter (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

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

- Acetonitril, SupraSolv® (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100017)
- Hochreines Wasser (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 116754)
- β-Glucuronidase (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 03707598001)
- Eisessig, 100 % (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100066)
- Ameisensäure, 98–100 % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 56302)

- Ammoniumacetat (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 101116)
- 2-Mercaptobenzothiazol, 97 % (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. M3302)
- 2-Mercaptobenzothiazol-d₄ (MBT-d₄) (z. B. Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada, Nr. B206652)

4.3 Lösungen

- Ammoniumacetat-Puffer (1 mol/l, pH 6,5)
Genau 38,5 g Ammoniumacetat werden in ein 400-ml-Becherglas eingewogen und in etwa 250 ml hochreinem Wasser gelöst. Nach erfolgter pH-Einstellung mit Eisessig auf pH 6,5 (pH-Meter) wird die Lösung quantitativ in einen 500-ml-Messkolben überführt und mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.
- Eluent B (1%ige wässrige Ameisensäure)
In einem 1000-ml-Messkolben werden etwa 700 ml hochreines Wasser vorgelegt, mit 10 ml Ameisensäure versetzt und gut durchmischt. Im Anschluss wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens eine Woche haltbar.

4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg MBT-d₄ werden in einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen, in Acetonitril gelöst und mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (10 mg/l)
100 µl der ISTD-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die Stamm- und die Dotierlösung des internen Standards sind bei Lagerung bei 4 °C (im Kühlschrank) etwa vier Wochen haltbar. Bei einer längeren Lagerung wurde ein signifikanter Abbau festgestellt (Gries et al. 2015).

4.5 Kalibrierstandards

- MBT-Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg MBT werden in einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- MBT-Dotierlösung 1 (100 mg/l)
1 ml der MBT-Stammlösung wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Messkolben mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- MBT-Dotierlösung 2 (10 mg/l)
100 µl der MBT-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

- MBT-Dotierlösung 3 (1 mg/l)
1 ml der MBT-Dotierlösung 2 wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Messkolben mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- MBT-Dotierlösung 4 (0,1 mg/l)
100 µl der MBT-Dotierlösung 2 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Messkoben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- MBT-Dotierlösung 5 (0,01 mg/l)
100 µl der MBT-Dotierlösung 3 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die Standardlösungen werden bei 4 °C (im Kühlschrank) in Glasgefäßen gelagert und sind unter diesen Bedingungen etwa vier Wochen haltbar.

Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 0,5 µg/l bis 10 000 µg/l werden in Poolurin nach dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema hergestellt. Als Leerwert wird undotierter Poolurin mitgeführt. Die Kalibrierstandards werden arbeitstäglich frisch angesetzt. Für die Anwendung der Methode im umweltmedizinischen Bereich ist in der Regel eine Kalibrierung bis 50 µg/l ausreichend. Die Kalibrierstandards werden analog zu den Proben aufgearbeitet und analysiert.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrierstandards für die Bestimmung von MBT in Urin

Kalibrierstandard	MBT-Dotierlösung	Volumen MBT-Dotierlösung [µl]	Volumen Poolurin [µl]	Konzentration MBT [µg/l]
0	–	–	500	0
1	5	25	475	0,5
2	5	50	450	1
3	4	10	490	2
4	4	25	475	5
5	4	50	450	10
6	3	10	490	20
7	3	25	475	50
8	3	50	450	100
9	2	10	490	200
10	2	25	475	500
11	2	50	450	1000
12	1	10	490	2000
13	1	25	475	5000
14	1	50	450	10 000

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in geeigneten Kunststoffbehältern gesammelt und bis zur Analyse bei –20 °C gelagert.

5.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Urinproben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Ein Aliquot von 0,5 ml Urin wird entnommen und in ein 1,5-ml-Vial pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl der ISTD-Dotierlösung sowie die Zugabe von 1 ml des Ammoniumacetatpuffers (pH 6,5). Zur Hydrolyse wird die Probe mit 5 µl des Enzyms β -Glucuronidase versetzt, gut durchmischt und anschließend bei 37 °C für drei Stunden im Wärmeschrank inkubiert. Ein Aliquot der Probenlösung kann im Anschluss direkt für die analytische Bestimmung mittels LC-MS/MS eingesetzt werden.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekonfiguration aus einem Waters Alliance HPLC-System gekoppelt mit einem Waters Quattro Ultima Tandem-Massenspektrometer.

6.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Analytische Säule:	Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 4,6 × 50 mm
Anreicherungssäule:	Oasis HLB 25 µm, 2,1 × 20 mm
Trennprinzip:	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
Eluent:	A: hochreines Wasser B: 1 % wässrige Ameisensäure C: Acetonitril
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	100 µl
Fluss:	0,2 ml/min, konstant
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 3
Schaltprogramm:	0–3,5 min über Anreicherungssäule; 3,5–15 min über Anreicherungssäule und analytische Säule (siehe schematische Darstellung des Schaltprogrammes in Abbildung 2)

Tab. 3 Programm der Gradientenpumpe

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	70	10	20
4	70	10	20
5	0	10	90
8	0	10	90
8,5	70	10	20
12	70	10	20
15	70	10	20

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

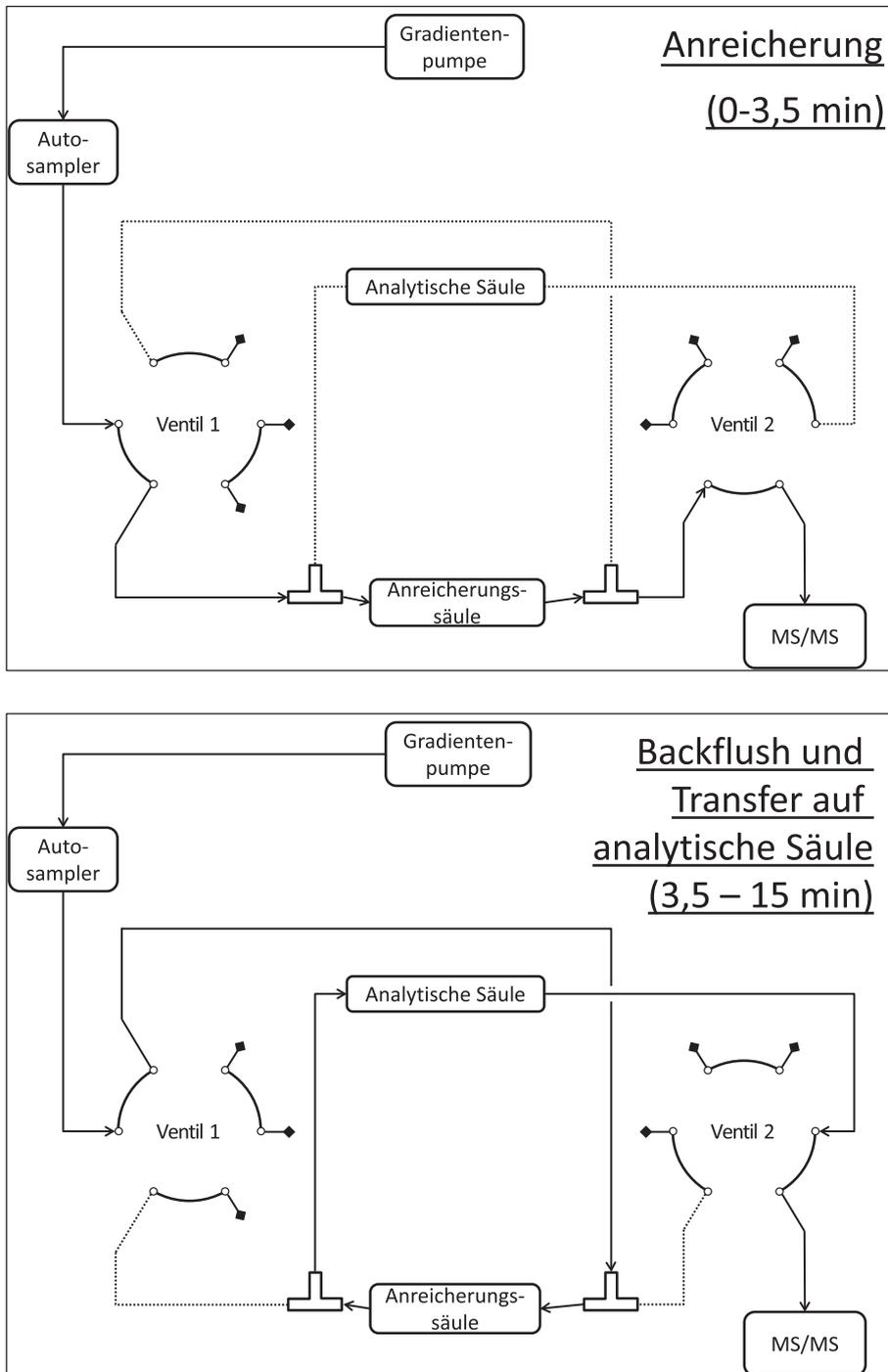


Abb. 2 Schematische Darstellung des Schaltprogrammes zur Säulenschaltung

6.2 Tandemmassenspektrometrie

Ionisationsmodus:	Positive Elektrospray-Ionisation
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	300 °C
Cone-Gasfluss:	100 l/h
Desolvationsgasfluss:	636 l/h
Dwell time:	0,2 s
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 4

Tab. 4 Parameterspezifische Einstellungen für den Analyten MBT und den internen Standard

Analyt	Retentionszeit [min]	Ausgangs-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]
MBT	12,94	167,9	135,1
			124,2 (Qualifier)
MBT-d ₄ (ISTD)	12,90	171,9	139,1
			128,2 (Qualifier)

Sämtliche Einstellungen sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Produkt-Ionenspektren des Analyten MBT und des ISTD.

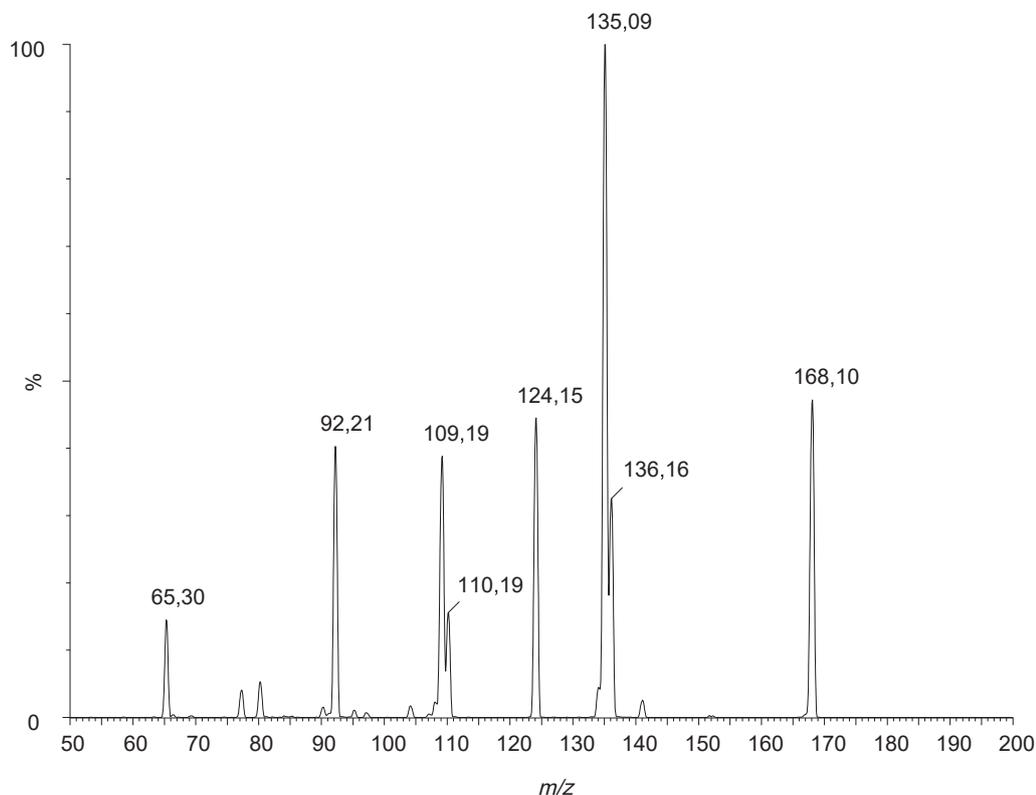


Abb. 3 Produkt-Ionenspektrum des Analyten MBT

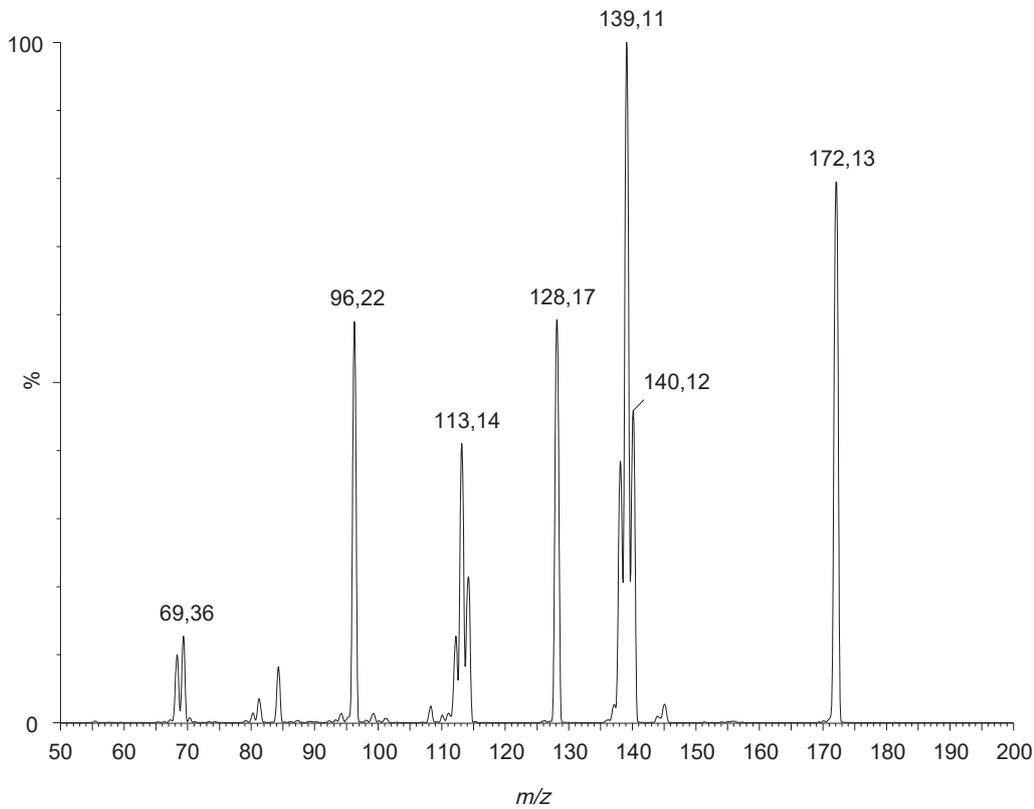


Abb. 4 Produkt-Ionenspektrum des internen Standards MBT-d₄

7 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 5 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 100 µl in das LC-MS/MS-Gerät injiziert und zunächst auf die Anreicherungssäule übertragen. Durch Rückspülung (*back flush*) der Probe wird der Analyt von der Anreicherungssäule auf die Trennsäule aufgebracht. Danach erfolgt die eigentliche analytische Trennung. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und der spezifischen Ionenübergänge. Die Retentionszeiten des Analyten und des internen Standards sowie die registrierten Ionenübergänge sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die in Tabelle 4 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten des Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 5 bis 7 sind beispielhaft Chromatogramme eines Reagenzienleerwertes, einer nativen Urinprobe sowie einer mit MBT dotierten Urinprobe dargestellt.

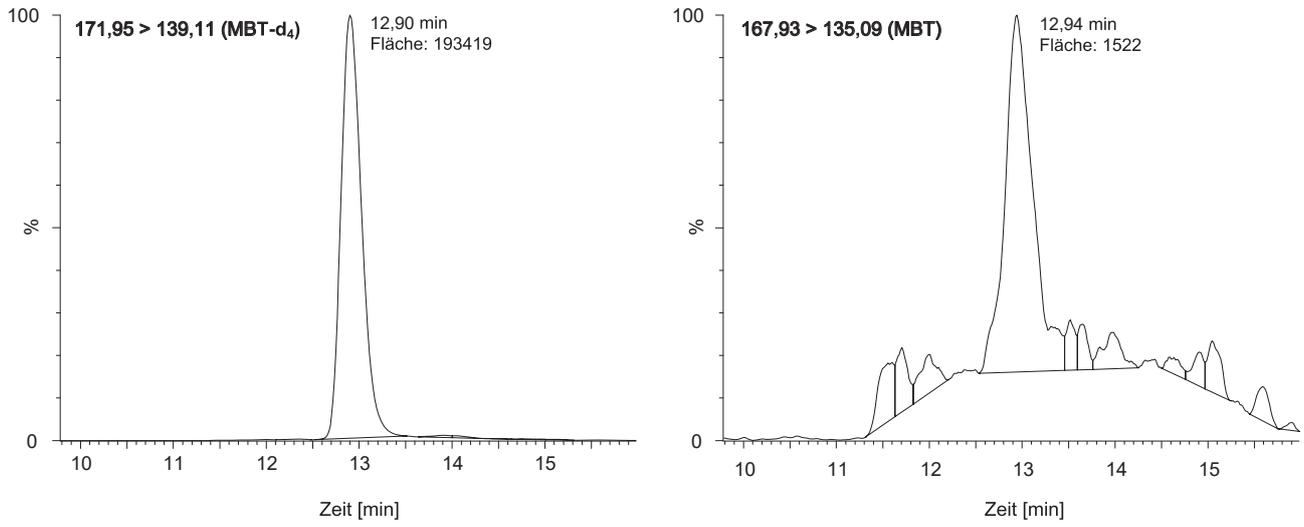


Abb. 5 Chromatogramm eines Reagenzienleerwertes (MBT-Gehalt < NWG)

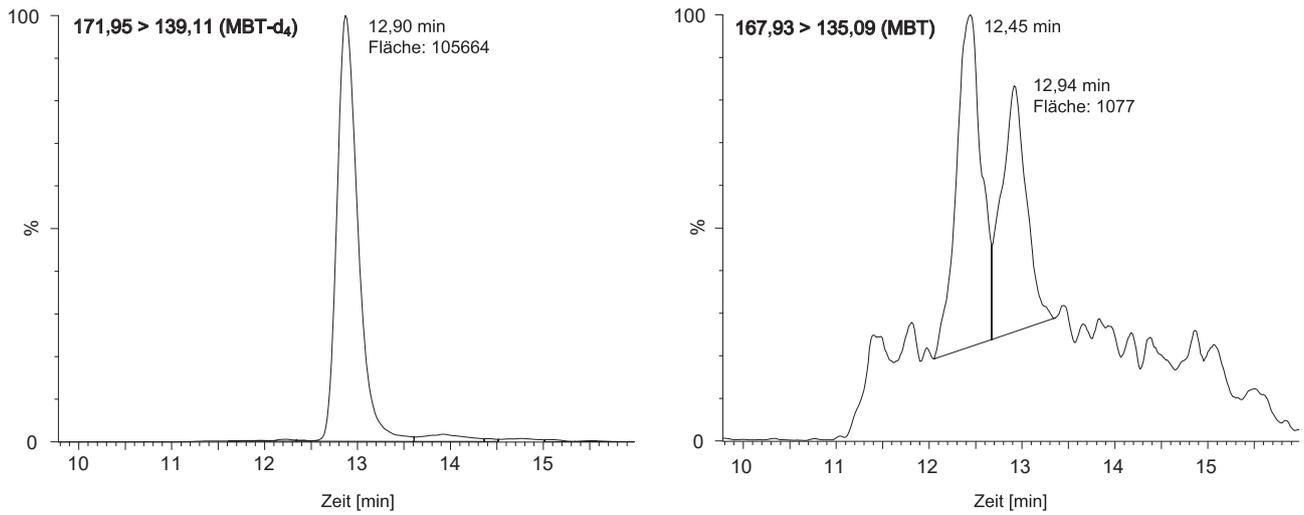


Abb. 6 Chromatogramm einer nativen Urinprobe (MBT-Gehalt < NWG)

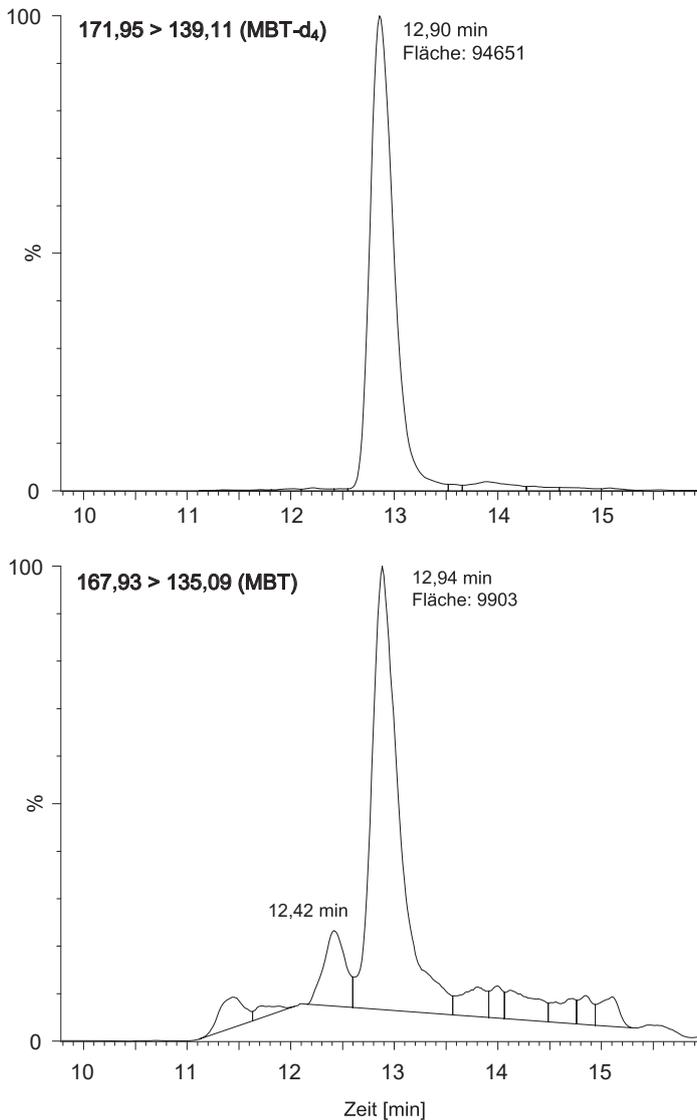


Abb. 7 Chromatogramm einer mit 10 µg MBT/l dotierten Urinprobe

8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 5.2) und mittels LC-MS/MS (vgl. Abschnitt 6) analysiert. Die Erstellung der Kalibrierkurven erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die dotierte Konzentration der jeweiligen Kalibrierstandards. Im Messbereich von der Nachweisgrenze bis 2000 µg/l ergibt sich eine lineare Kalibrierfunktion. Im erweiterten Kalibrierbereich bis 10 000 µg/l empfiehlt sich die Anwendung einer quadratischen Regression. In Abbildung 8 ist beispielhaft eine Kalibrierkurve des Analyten in Urin dargestellt.

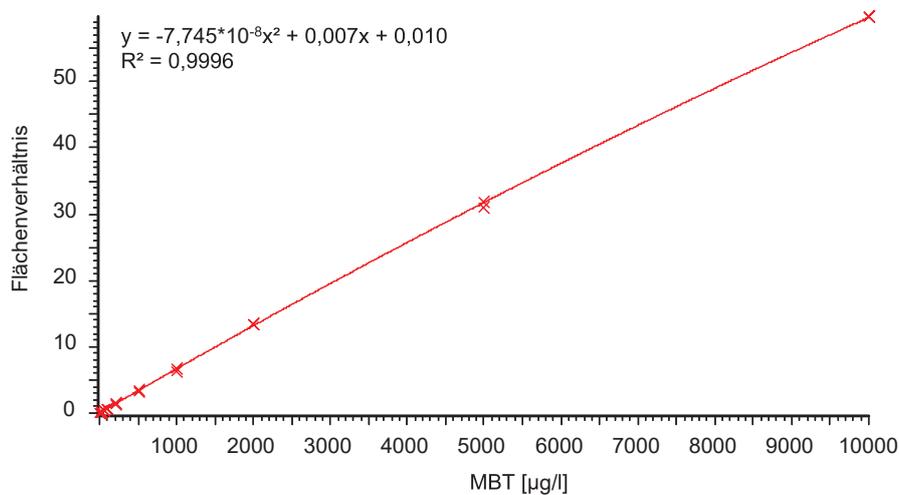


Abb. 8 Kalibrierkurve für die Bestimmung von MBT in Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die ermittelte Peakfläche des MBT wird durch die Peakfläche des internen Standards MBT- d_4 dividiert. Durch Einsetzen des erhaltenen Quotienten in die entsprechende Kalibrierfunktion (vgl. Abschnitt 8) wird die Analytkonzentration in $\mu\text{g/l}$ Urin berechnet. Eventuelle Reagenzienleerwerte sowie Hintergrundgehalte im eingesetzten Poolurin werden durch Subtraktion berücksichtigt. Die Berechnung der Analytkonzentration erfolgte mit der Gerätesoftware MassLynx 4.1 von Waters.

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 Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit untersucht, die bekannte Konzentrationen des Analyten aufweisen. Da kein käuflich zu erwerbendes Qualitätskontrollmaterial zur Verfügung steht, muss dieses selbst hergestellt werden. Dazu wird Poolurin von beruflich nicht gegen MBT exponierten Personen eingesetzt und mit Dotierlösungen des Analyten versetzt, so dass die Konzentration des Kontrollmaterials im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegt (z. B. 10 $\mu\text{g/l}$, 100 $\mu\text{g/l}$ und 1000 $\mu\text{g/l}$). Aliquote dieser Proben 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 10 Tagen je eine Analyse der Kontrollmaterialien) ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurden die unter Abschnitt 10 beschriebenen Kontrollmaterialien eingesetzt. Die dotierten Poolurinproben wurden wie beschrieben zehnfach parallel aufgearbeitet (Abschnitt 5.2) und analysiert (Abschnitt 6). Die hieraus ermittelten Präzisionsdaten in der Serie sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5 Präzision in Serie für die Bestimmung von MBT in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
MBT	10	2,3	5,1
	100	1,9	4,2
	1000	1,6	3,6

Zur Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden die unter Abschnitt 10 beschriebenen Kontrollmaterialien an fünf verschiedenen Tagen je zweifach aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen von Tag zu Tag sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab. 6 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von MBT in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
MBT	10	4,3	9,6
	100	5,8	13,0
	1000	3,4	7,6

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde aus den Daten zur Bestimmung der Präzision in Serie und der Präzision von Tag zu Tag (vgl. Abschnitt 11.1) ermittelt. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

Tab. 7 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von MBT in Urin aus der Präzision in Serie (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Mittlere relative Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
MBT	10	87	85–91
	100	93	90–96
	1000	90	89–94

Tab. 8 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von MBT in Urin aus der Präzision von Tag zu Tag (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Mittlere relative Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
MBT	10	86	81–93
	100	96	93–112
	1000	96	91–102

Zur Ermittlung der Richtigkeit in unterschiedlichen Matrices wurden weiterhin zehn verschiedene Urinproben undotiert sowie mit 10 bzw. 100 µg MBT pro Liter dotiert und analysiert, um den Einfluss unterschiedlicher Urinmatrices zu ermitteln. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von MBT in Individualurinproben (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere relative Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
MBT	10	84	76–105
	100	95	92–99

11.3 Hydrolyse

Um die Analysenmethode an realen Urinproben zu testen und die Notwendigkeit einer Hydrolyse der Urinproben zu prüfen, wurde Urin von fünf Probanden untersucht, von denen vier im Rahmen ihrer beruflichen Tätigkeit Umgang mit MBT hatten (Proben 2–5). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Chromatogramme einer aufgearbeiteten Urinprobe ohne Hydrolyse sowie mit Hydrolyse sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Tab. 10 MBT-Gehalte in Urin mit und ohne Hydrolyse (n = 5)

Probe	Kreatinin [g/l]	MBT ohne Hydrolyse [µg/l]	MBT mit Hydrolyse [µg/l]	Konjugatanteil [%]
1	0,86	< BG	2,5	100
2	0,58	< BG	567	100
3	1,24	67	3840	98
4	1,99	73	5261	99
5	3,29	137	6210	98

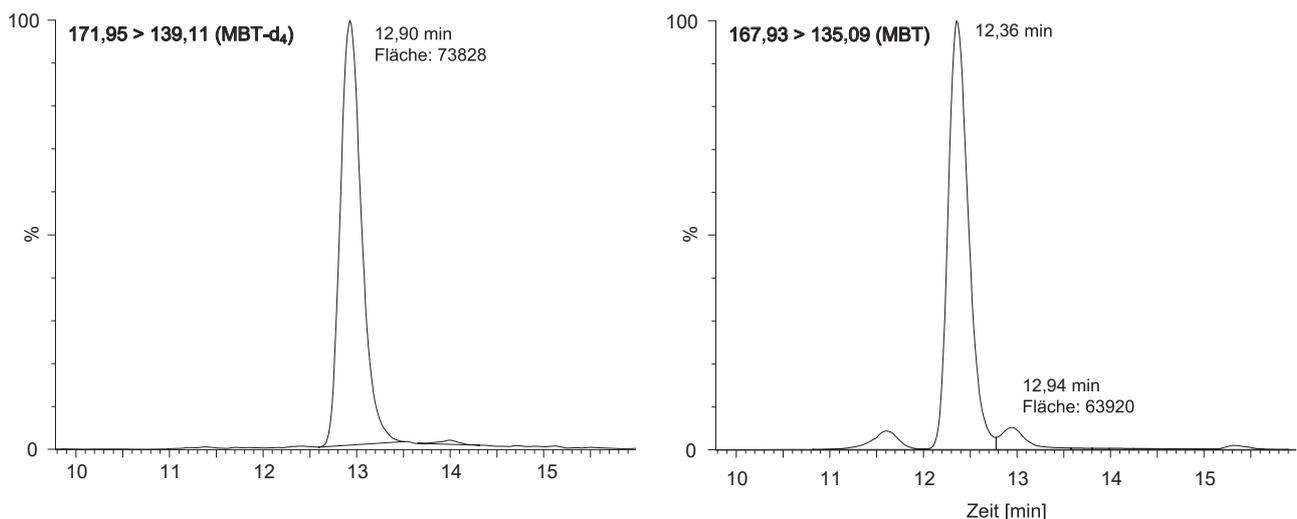


Abb. 9 Chromatogramm einer nativen Urinprobe ohne enzymatische Hydrolyse (ermittelter MBT-Gehalt 67 µg/l)

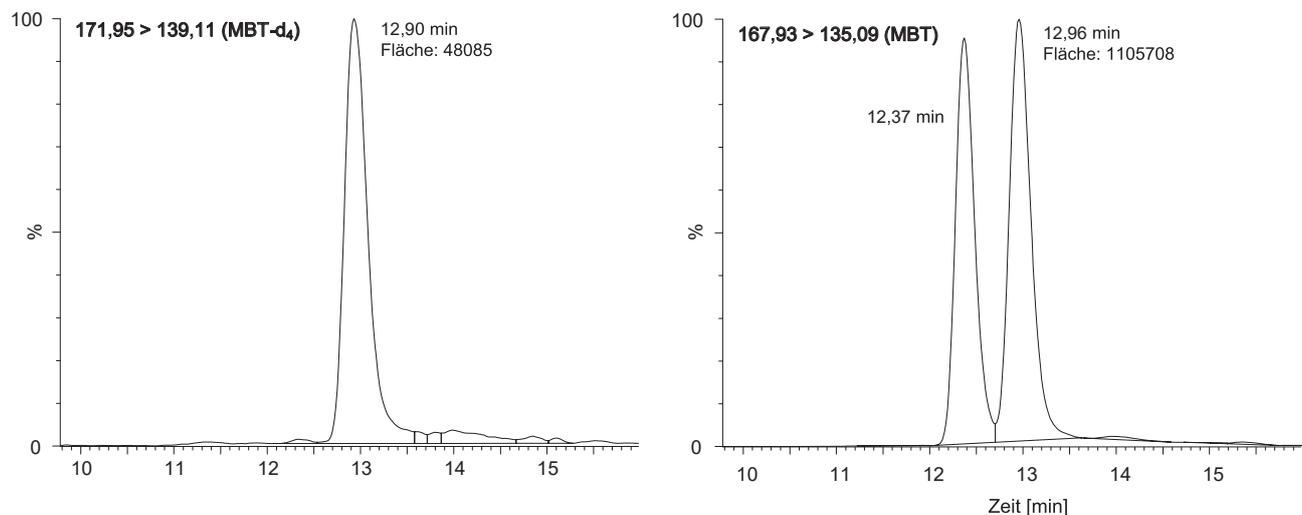


Abb. 10 Chromatogramm einer nativen Urinprobe mit enzymatischer Hydrolyse (ermittelter MBT-Gehalt 3840 µg/l)

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte nach der Kalibriergeradenmethode auf Grundlage der sechs untersten Kalibriermesspunkte. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11 Nachweis- und Bestimmungsgrenze von MBT in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
MBT	0,4	1,2

11.5 Störeinflüsse

Es wurde ein Reagenzienleerwert von ca. 1 µg MBT/l detektiert, der über die komplette Methodenentwicklung konstant blieb und auf eine Verunreinigung aus dem internen Standard zurückgeführt werden konnte. Ein solcher Leerwert muss durch Subtraktion bei allen Proben und Kalibrierstandards berücksichtigt werden. Weitere Leerwerte aus den Reagenzien oder anderen Materialien wurden nicht beobachtet.

Weiterhin ist zu beachten, dass MBT als Standard in Lösung nicht stabil ist. Es wurde ein ca. 20%iger Abbau innerhalb von drei Monaten beobachtet. Nach neunmonatiger Lagerung zeigte der Standard nur noch 40 % der Peakintensität im Vergleich zu einem frisch angesetzten Standard und dies obwohl der Standard in Acetonitril gelöst und im Kühlschrank bei 4 °C dunkel gelagert wurde. Die Standardlösungen sollten daher mindestens alle vier Wochen frisch hergestellt werden.

Im Rahmen der Methodenprüfung wurden die aufarbeitungsbedingten Verluste abgeschätzt, indem eine Standardlösung einmal mit und einmal ohne Anreicherungssäule vermessen wurde. Hierbei wurde ein etwa 10%iger Verlust des Analyten auf der Anreicherungssäule festgestellt.

Bereits in der Anfangsphase der LC-MS/MS-Methodenentwicklung wurde beobachtet, dass der in der Literatur für die GC-MS-Analytik erwähnte interne Standard 2-Mercaptobenzoxazol (Manninen et al. 1996) nicht geeignet ist, da sein abweichendes chemisch-physikalisches Verhalten die analysenbedingten Schwankungen mittels LC-MS/MS nicht kompensieren konnte. Der Einsatz von MBT-d₄ als interner Standard mit gleichartiger Fragmentierung ermög-

licht eine gute Kompensation der analytischen Schwankungen, was durch die sehr guten Präzisionsdaten bestätigt wird. Versuche mit aufgestockten Individualurinproben bestätigen zudem die Robustheit der Analysenmethode.

12 Diskussion der Methode

In der Anfangsphase der Methodenentwicklung wurde versucht, MBT mithilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Urin zu isolieren. Wegen der dabei erzielten absoluten Wiederfindungsraten von < 10 % wurde diese Variante nicht weiterverfolgt. Die stark adsorptiven Eigenschaften des MBT aufgrund seiner polaren Struktur und einer schwachen Acidität an der SH-Gruppe führten auch bei Einsatz einer externen Festphasenextraktion nicht zu signifikant besseren Wiederfindungsraten. Aufgrund der adsorptiven Eigenschaften des MBT wurde die gesamte Analytik schließlich in nur einem Analysengefäß durchgeführt, um aufarbeitungsbedingte Verluste weitestgehend zu reduzieren. Die Anreicherung und Aufreinigung der hydrolysierten Analysenprobe erfolgte dabei online auf einer Waters Oasis HLB-Säule. Nach Rückspülung (*back flush*) wurde die Probe auf der nachgeschalteten Zorbax Eclipse HDB-C8 Säule chromatographisch getrennt und tandemmassenspektrometrisch detektiert.

Ein weiterer Optimierungsschritt war die Etablierung der enzymatischen Hydrolyse, die im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen sauren Hydrolyse (Manninen et al. 1996) zu einer vierfach höheren Hydrolyseausbeute führte (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Analyse von Urinproben beruflich gegen MBT exponierter Personen zeigte zudem, dass deutlich über 90 % des über den Urin eliminierten MBT in Form von Konjugaten vorliegt (vgl. Abschnitt 11.3). Demnach ist eine Hydrolyse zur korrekten Bestimmung von MBT in Urin zwingend erforderlich.

Insgesamt ermöglicht die vorliegende Methode eine zuverlässige Quantifizierung von MBT im Urin beruflich exponierter Personen. Die Untersuchungen zur Hintergrundbelastung mit MBT im Urin der Allgemeinbevölkerung (siehe Tabelle 1) belegen, dass mit der vorliegenden Methode auch diese zum Teil erfasst werden kann.

Verwendete Messgeräte Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekonfiguration aus einem Waters Alliance HPLC-System gekoppelt mit einem Waters Quattro Ultima Tandem-Massendetektor.

Literatur

- 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)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Ärztebl 111: A1583–A1618. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=161921>, abgerufen am 08 Mai 2020
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (Hrsg) (2019) MAK- und BAT-Werte-Liste 2019, Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung Nr. 55. Wiley-VCH, Weinheim. DOI: [10.1002/9783527826155](https://doi.org/10.1002/9783527826155)
- Fukuoka M, Satoh M, Tanaka A (1995) Metabolism of 2-thiobenzothiazoles in the rat. Arch Toxicol 70: 1–9. DOI: [10.1007/s002040050241](https://doi.org/10.1007/s002040050241)
- Greim H (Hrsg) (1999) 2-Mercaptobenzothiazol (2-(3H)-Benzothiazolthion). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 29. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb14930kskd0029](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb14930kskd0029)
- Gries W, Küpper K, Leng G (2015) Rapid and sensitive LC-MS-MS determination of 2-mercaptobenzothiazole, a rubber additive, in human urine. Anal Bioanal Chem 407: 3417–3423. DOI: [10.1007/s00216-015-8533-5](https://doi.org/10.1007/s00216-015-8533-5)
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2018) 2-Mercaptobenzothiazole. In: Some industrial chemicals, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Bd 115. IARC Press, Lyon, 73–101. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/5402/625abf3783052317affafe28e7497a31e92109f8.pdf, abgerufen am 05 Jun 2020
- Manninen A, Auriola S, Vartiainen M, Liesivuori J, Turunen T, Pasanen M (1996) Determination of urinary 2-mercaptobenzothiazole (2-MBT), the main metabolite of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole (TCMTB) in humans and rats. Arch Toxicol 70: 579–584. DOI: [10.1007/s002040050315](https://doi.org/10.1007/s002040050315)
- Murawski A, Schmied-Tobies MIH, Schwedler G, Rucic E, Gries W, Schmidt-kunz C, Küpper K, Leng G, Conrad A, Kolossa-Gehring M (2020) 2-Mercaptobenzothiazole in urine of children and adolescents in Germany – Human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). Int J Hyg Environ Health 228: 113540. DOI: [10.1016/j.ijheh.2020.113540](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113540)