

7-Hydroxycitronellal – Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin mittels UPLC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

M. Stöckelhuber¹
G. Scherer¹
T. Jäger²

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

Keywords

7-Hydroxycitronellal;
7-Hydroxycitronellylsäure;
Duftstoff; Biomonitoring; Urin;
UPLC-MS/MS

- ¹ *Methodenentwicklung, ABF – Analytisch-biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg, Deutschland*
- ² *Methodenprüfung, BASF SE, Corporate Health Management, FEH/CB, 67056 Ludwigshafen, Deutschland*
- ³ *Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, 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.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

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.

The 7-hydroxycitronellal metabolite 7-hydroxycitronellylic acid is determined in urine after enzymatic cleavage. After adding the deuterated internal standard (ISTD) (D₆-7-hydroxycitronellylic acid) to one millilitre of urine, the conjugates are enzymatically cleaved with β -glucuronidase/arylsulfatase. The hydrolysate is then subjected to liquid-liquid extraction with dichloromethane. The extract is evaporated to dryness and reconstituted in the eluent, a mixture of ultra-pure water and methanol (1 : 1, (v/v)). The analytes are separated by UPLC and then analysed by tandem mass-spectrometry using negative electro spray ionisation (ESI⁻).

Citation Note:

Stöckelhuber M, Scherer G, Jäger T, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. 7-Hydroxycitronellal – Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin mittels UPLC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2021 Mrz;6(1):Doc020. DOI: https://doi.org/10.34865/bi10775d6_1or

Manuskript abgeschlossen:
09 Mai 2018

Publikationsdatum:
31 Mrz 2021

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	UPLC-MS/MS

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
7-Hydroxycitronellal (7-Hydroxy-3,7-dimethyloctanal)	107-75-5	7-Hydroxycitronellylsäure (7-Hydroxy-3,7-dimethyloctansäure)	56046-15-2

Zuverlässigkeitskriterien

7-Hydroxycitronellylsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,5 \%, 3,5 \%$ bzw. $2,8 \%$
	Streubereich	$u = 12,5 \%, 9,72 \%$ bzw. $7,77 \%$
	bei einer Konzentration von $6,3 \mu\text{g}$, $73,8 \mu\text{g}$ bzw. $515 \mu\text{g}$ 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,6 \%, 3,8 \%$ bzw. $3,7 \%$
	Streubereich	$u = 24,7 \%, 9,77 \%$ bzw. $9,51 \%$
	bei einer Konzentration von $5,9 \mu\text{g}$, $71,8 \mu\text{g}$ bzw. $504 \mu\text{g}$ 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 97,8 \%, 106 \%$ bzw. 103%
bei einer Soll-Konzentration von $1,0 \mu\text{g}$, $5,0 \mu\text{g}$ bzw. $500 \mu\text{g}$ 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,17 \mu\text{g}$ 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,5 \mu\text{g}$ 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu 7-Hydroxycitronellal

7-Hydroxycitronellal (chemische Struktur siehe [Abbildung 1](#)) ist ein synthetischer Duftstoff mit Fliedergeruch, der in Kosmetikprodukten, in Wasch- und Reinigungsmitteln, in Polituren und Wachsen sowie in Bioziden breite Anwendung findet (ECHA 2020). So werden in Europa zwischen 100 und 1000 Tonnen 7-Hydroxycitronellal pro Jahr produziert bzw. in den Europäischen Wirtschaftsraum importiert (ECHA 2020). Durch den weitverbreiteten Gebrauch sind sowohl Verbraucher als auch Beschäftigte gegen 7-Hydroxycitronellal exponiert.

Der häufige oder regelmäßige Kontakt mit 7-Hydroxycitronellal führt zu einer Sensibilisierung der Haut, so dass die Kommission den Stoff mit „Sh“ markiert hat (Greim 2003). Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz oder in biologischem Material wurden von der Kommission nicht abgeleitet. Vom *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) wurden zahlreiche Studien zur allergenen Wirkung von Duftstoffen ausgewertet. Dabei wurde ebenfalls eine hautsensibilisierende Wirkung des 7-Hydroxycitronellals festgestellt (SCCS 2012). Aufgrund dessen wurde der Anteil an 7-Hydroxycitronellal in Verbrauchsprodukten, die mit der Haut in Kontakt kommen, gemäß der *International Fragrance Association* (IFRA) Guideline begrenzt (IFRA 2020). Zudem muss das in Kosmetikprodukten enthaltene 7-Hydroxycitronellal als Inhaltsstoff angegeben werden, sofern der Gehalt in *leave-on*-Produkten $0,001 \%$ bzw. in *rinse-off*-Produkten $0,01 \%$ überschreitet (European Commission 2019).

In einem *In-vitro*-Versuch wurden nach dermalen Applikation von ^{14}C -7-Hydroxycitronellal auf Rattenhaut 50% der applizierten Substanzmenge resorbiert ($T_{\max} = 30 \text{ h}$) (Tonge 1995). In Tierversuchen an Kaninchen wurden nach ein-

maliger oraler Gabe 7-Hydroxycitronellol und 7-Hydroxycitronellylsäure als Metabolite im Urin nachgewiesen (Ishida et al. 1989). Im Rahmen des BMU/VCI (Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit; Verband der Chemischen Industrie e. V.)-Kooperationsprojektes zur Entwicklung des hier dargestellten Biomonitoring-Verfahrens wurde auch der Metabolismus des 7-Hydroxycitronellals beim Menschen untersucht. Die wichtigsten Metabolite des 7-Hydroxycitronellals sowie deren Toxikokinetik wurden in einer Metabolismusstudie an fünf Freiwilligen ermittelt. Die Metabolismusstudie umfasste dabei zum einen die einmalige orale Einnahme und zum anderen die einmalige dermale Applikation von 7-Hydroxycitronellal. Es konnten 7-Hydroxycitronellol und 7-Hydroxycitronellylsäure als Metabolite nachgewiesen werden (Stoekelhuber et al. 2017). Der postulierte Metabolismus von 7-Hydroxycitronellal ist in [Abbildung 1](#) dargestellt.

Während 7-Hydroxycitronellol nach erforderlicher Derivatisierung nur in Spuren detektiert werden konnte, scheint 7-Hydroxycitronellylsäure der Hauptmetabolit zu sein, da sie in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Nicht-metabolisiertes 7-Hydroxycitronellal konnte nicht gefunden werden. Daher stützt sich die im Folgenden beschriebene Methode auf die Quantifizierung der 7-Hydroxycitronellylsäure als Biomarker für die Exposition gegen 7-Hydroxycitronellal.

Die Entwickler der Methode haben 40 Spontanurinproben beruflich nicht gegen 7-Hydroxycitronellal exponierter Personen (23 Männer und 17 Frauen; Alter: 18–83 Jahre) auf 7-Hydroxycitronellylsäure untersucht. Die mittlere 7-Hydroxycitronellylsäure-Konzentration lag bei 33,6 µg/l mit einem Median von 14,2 µg/l (Bereich: 3,1–627 µg/l).

Pluym et al. (2020) haben 329 Urinproben (24-Stundensammelurine) junger Erwachsener (20–29 Jahre) auf 7-Hydroxycitronellylsäure untersucht. Die Proben stammten aus der Umweltprobenbank und sind in den Jahren 2000 bis 2018 gesammelt worden. Die mittlere 7-Hydroxycitronellylsäure-Konzentration in diesen Proben betrug 14,9 µg/l mit einem Median von 8,1 µg/l. Daten zu einer beruflichen Belastung gegen 7-Hydroxycitronellal lagen nicht vor.

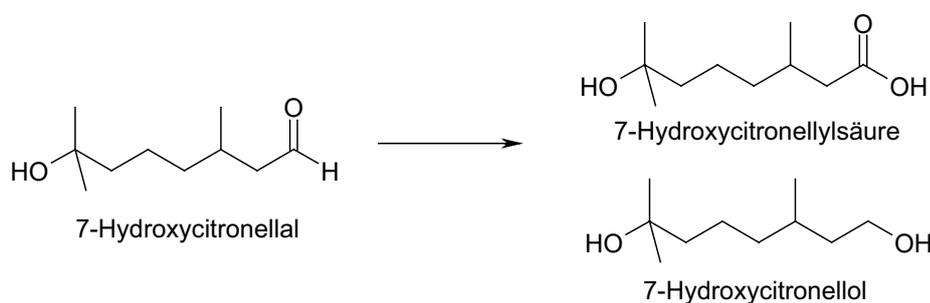


Abb. 1 Postulierter Metabolismus des 7-Hydroxycitronellals

3 Grundlage des Verfahrens

Der 7-Hydroxycitronellalmetabolit 7-Hydroxycitronellylsäure wird nach enzymatischer Spaltung im Urin bestimmt. Nach Zugabe des deuterierten internen Standards (ISTD) (D_6 -7-Hydroxycitronellylsäure) ([Abbildung 2](#)) zu einem Milliliter Urin wird eine enzymatische Spaltung der Konjugate mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase durchgeführt. Das Hydrolysat wird einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan unterzogen. Der Extrakt wird zur Trockne eingedunstet und im Laufmittel, einer Mischung aus hochreinem Wasser und Methanol (1 : 1, (V/V)), wiederaufgenommen. Die Analyten werden mittels Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie (*ultra-performance liquid chromatography*; UPLC) getrennt und anschließend nach negativer Elektrospray-Ionisation (ESI⁻) mittels Tandemmassenspektrometrie analysiert.

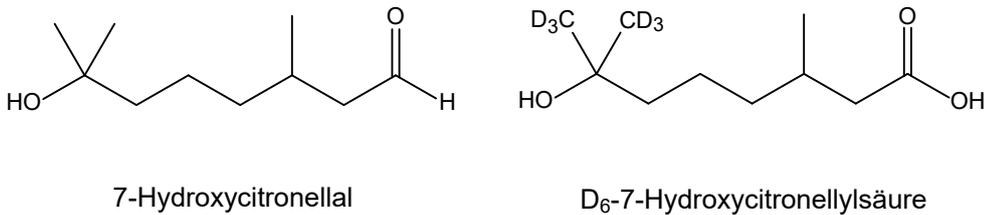


Abb. 2 Strukturformel des 7-Hydroxycitronellals und der D₆-7-Hydroxycitronellylsäure

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- UPLC-System (z. B. Acquity UPLC I-Class System, Waters GmbH, Eschborn) bestehend aus einem SM-FTN-Sample Manager, einem I-Class Binary Solvent Manager, einem Column Manager und einem Sample Organizer verbunden mit einem Xevo-TQ-S Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- HPLC-Säule (z. B. Acquity UPLC BEH C8 1,7 µm; 2,1 × 150 mm, Waters GmbH, Eschborn)
- Wärmeschrank mit Schüttelapparat (z. B. Incucell 111 mit Schüttler GFL 3005, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg)
- Vakuumzentrifuge (z. B. Jouan GmbH, Unterhaching)
- Zentrifuge (z. B. Rotixa KS, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Stickstoffgenerator (z. B. cmc Instruments GmbH, Eschborn)
- Präzisionswaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Rollenmischer (z. B. Stuart SRT 6, Cole Parmer Ltd, Stone, Vereinigtes Königreich)
- Multi Tube Vortex-Mischer (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- pH-Meter mit pH-Elektrode (z. B. CG 842, SCHOTT AG, Mainz)
- Multipette® (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Pipetten (1–20 µl, 10–200 µl, 100–1000 µl und 500–5000 µl) (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Messpipette aus Glas (z. B. BRAND GMBH & CO KG, Wertheim)
- Verschiedene Messkolben (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Verschiedene Messzylinder (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- 4-ml-Schraubgläschen (z. B. Nr. 130400, BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden) mit Schraubkappen (z. B. Nr. 2.301158, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 1,8-ml-Probengläschen mit Mikroinserts (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 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.

Referenzmaterialien

- 7-Hydroxycitronellylsäure (Auftragssynthese, Dr. Belov, Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- D₆-7-Hydroxycitronellylsäure (Auftragssynthese, Dr. Belov, Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

Sonstige Chemikalien

- Acetonitril, trocken, 99,8 % (z. B. Nr. 271004, Merck KGaA, Darmstadt)
- Dichlormethan (z. B. Nr. 15633730, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze)
- Essigsäure, ≥ 99,8 % (z. B. Nr. 15633920, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze)
- β-Glucuronidase/Arylsulfatase (aus *Helix pomatia*) (30 U/ml; 60 U/ml) (z. B. Nr. 1041140002, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol (z. B. Nr. 136878, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- Natriumhydroxid, Plätzchen (z. B. Nr. 106469, Merck KGaA, Darmstadt)
- *ortho*-Phosphorsäure, 85 % (z. B. Nr. 5.43828, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Nr. 15634670, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze)

Eluenten

- Eluent A: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure (z. B. Nr. 019378, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- Eluent B: Hochreines Wasser + 0,1 % Ameisensäure (z. B. Nr. 232478, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)

4.3 Lösungen

- Natronlauge (5 mol/l)

In einem 250-ml-Becherglas werden 70 ml hochreines Wasser vorgelegt und darin unter Eiskühlung 20 g Natriumhydroxid-Plätzchen gelöst. Die Natronlauge wird in einen 100-ml-Messkolben überführt und dieser bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt. Anschließend wird die Natronlauge zur Lagerung in eine 100-ml-Braunglasflasche umgefüllt.

- Natriumacetatpuffer (pH = 5,1)

In ein 1000-ml-Becherglas werden etwa 800 ml hochreines Wasser vorgelegt und 57 ml Essigsäure zupipettiert. Die Lösung wird anschließend mit Natronlauge (5 mol/l) auf einen pH-Wert von pH 5,1 eingestellt und in einen 1000-ml-Messkolben überführt. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

- *ortho*-Phosphorsäure (20 %)

In einem 100-ml-Messkolben werden 70 ml hochreines Wasser vorgelegt und 23,5 ml 85 %ige *ortho*-Phosphorsäure zugegeben. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur in Laborglasflaschen gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar.

- Enzymsuspension
In einem 2-ml-Gewindefläschchen werden 100 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase (30 U/ml; 60 U/ml) und 600 µl hochreines Wasser zusammenpipettiert und gut gemischt. Die Enzymsuspension wird bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und ist bei dieser Temperatur mindestens sechs Monate stabil.

4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung (10 000 mg/l)
Etwa 10 mg D₆-7-Hydroxycitronellylsäure werden in einen 1-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- ISTD-Arbeitslösung (100 mg/l)
100 µl der ISTD-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- ISTD-Dotierlösung (1 mg/l)
100 µl der ISTD-Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösungen des internen Standards werden in braunen Gewindefläschchen bei –20 °C dunkel gelagert.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (1000 mg/l)
Etwa 10 mg 7-Hydroxycitronellylsäure werden in einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und in Acetonitril gelöst. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- Dotierlösung I (100 mg/l)
500 µl der Stammlösung werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- Dotierlösung II (10 mg/l)
50 µl der Stammlösung werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- Dotierlösung III (1 mg/l)
500 µl der Dotierlösung II werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.
- Dotierlösung IV (0,1 mg/l)
50 µl der Dotierlösung II werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Standardlösungen werden in braunen Schraubgläschen bei –20 °C dunkel gelagert.

Die Kalibrierstandards werden in hochreinem Wasser angesetzt, da aufgrund von Hintergrundgehalten kein unbelasteter Urin verfügbar ist. Die Steigung der in Wasser angesetzten Kalibriergeraden unterscheidet sich nicht signifikant von der Steigung einer in Urin angesetzten Kalibriergeraden.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen I bis IV gemäß dem in [Tabelle 1](#) angegebenen Pipettierschema mit hochreinem Wasser zu einem Endvolumen von 1 ml gemischt. Die Kalibrierlösungen können auch in einem größeren Ansatz hergestellt und zu je 1 ml aliquotiert werden. In diesem Fall werden die Kalibrierlösungen in 4-ml-Schraubgläschen bei -20 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens sechs Monate haltbar. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards erfolgt analog zu der Probenaufbereitung wie unter [Abschnitt 5](#) angegeben.

Tab. 1 Pipettierschema für die Herstellung von Kalibrierstandards zur Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen hochreines Wasser [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
0	–	–	1000	0
1	IV	2	998	0,2
2	IV	5	995	0,5
3	IV	10	990	1
4	IV	20	980	2
5	IV	50	950	5
6	III	10	990	10
7	III	40	960	40
8	III	100	900	100
9	II	50	950	500
10	I	10	990	1000
11	I	20	980	2000

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Polypropylenbehältern gesammelt. Bei Raumtemperatur können die Proben 24 Stunden ohne Analytverlust gelagert werden. Für eine längerfristige Lagerung der Urinproben bietet sich das Einfrieren bei -20 °C an, auch wenn die Langzeitstabilität des Analyten nicht untersucht wurde. Allerdings spricht die Frier-Tau-Stabilität der Qualitätskontrollproben über sechs Frier-Tau-Zyklen für eine gewisse Stabilität des Analyten in den bei -20 °C gelagerten Proben.

5.2 Probenaufbereitung

Vor der Analyse wird der Urin aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt.

Je 1 ml Urin wird in ein 4-ml-Gewindfläschchen pipettiert und mit 0,5 ml Natriumacetatpuffer ($\text{pH} = 5,1$) versetzt. Nach Zugabe von 10 µl der Enzymsuspension und 10 µl der ISTD-Dotierlösung (1 mg/l) werden die Proben gut gemischt und in einem Wärmeschrank bei 37 °C für drei Stunden bei etwa 100 Umdrehungen pro Minute schüttelnd inkubiert.

Anschließend werden die Proben jeweils mit 50 µl Phosphorsäure (20 %) und 1,5 ml Dichlormethan versetzt und für 30 Minuten auf dem Rollenmischer durchmischt. Danach werden die Proben für 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert und die organische Phase wird jeweils in ein 1,8-ml-Probengläschen überführt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Die Rückstände werden jeweils in 100 µl Methanol/Wasser (1 : 1, (V/V)) aufgenommen. Die

Probenlösungen werden in 1,8-ml-Probengläschen mit Mikroinsert überführt und zur Analyse mittels UPLC-MS/MS eingesetzt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem UPLC-System gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer.

6.1 Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie

Analytische Säule:	C8, 1,7 µm; 2,1 × 150 mm
Eluent:	A: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure B: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
Säulentemperatur:	50 °C, isotherm
Autosampler:	10 °C, gekühlt
Injektionsvolumen:	5 µl
Flussrate (binäre Pumpe):	0,5 ml/min
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 2

Tab. 2 Gradientenprogramm für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
1	80	20
5	20	80
5,5	20	80
5,51	80	20
7	80	20

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisationsmodus:	Negative Elektrospray-Ionisierung (ESI ⁻)
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	500 °C
Cone-Gasfluss:	148 l/h
Desolvationsgasfluss:	798 l/h
Kollisionsgasfluss:	0,14 ml/min
Detektionsmodus:	MRM
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 3

Sämtliche Einstellungen sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

7 Analytische Bestimmung

Von den nach [Abschnitt 5](#) aufgearbeiteten Proben werden jeweils 5 µl in das UPLC-MS/MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenübergänge und der Retentionszeiten (siehe [Tabelle 3](#)). Die in [Tabelle 3](#) 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.

Tab. 3 Parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin

Analyt	Retentionszeit [min]	Ausgangs-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]	Cone [V]	Kollisionsenergie [V]
7-Hydroxycitronellylsäure	2,73	187,03	127,09 56,97 ^{a)}	24	16 20
D ₆ -7-Hydroxycitronellylsäure (ISTD)	2,73	193,16	62,93	2	18

^{a)} Qualifier

[Abbildung 3](#) zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines mit dem 7-Hydroxycitronellal-Metaboliten 7-Hydroxycitronellylsäure dotierten Urins.

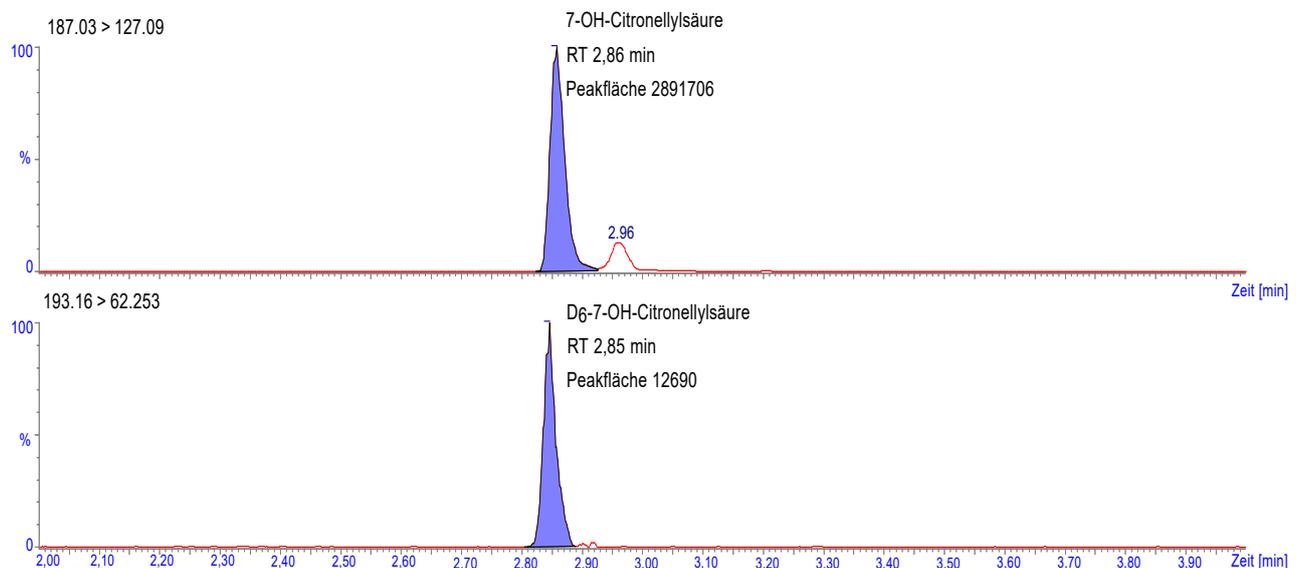


Abb. 3 Chromatogramm einer mit 500 µg 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter dotierten Urinprobe

8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Methode werden die unter [Abschnitt 4.5](#) beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vergleiche [Abschnitt 5](#)) und mittels UPLC-MS/MS (vergleiche [Abschnitt 6](#) und [7](#)) analysiert. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragung des Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des ISTD gegen die dotierte Konzentration des jeweiligen Kalibrierstandards. Die Kalibrierfunktion ist unter den beschriebenen Analysenbedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2000 µg/l linear

mit einem Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,999$. [Abbildung 4](#) zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade von in Wasser angesetzten Kalibrierstandards für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin.

Die Auswertung der Signale erfolgt mit der MassLynx Software Version 4.1 (Waters GmbH, Eschborn).

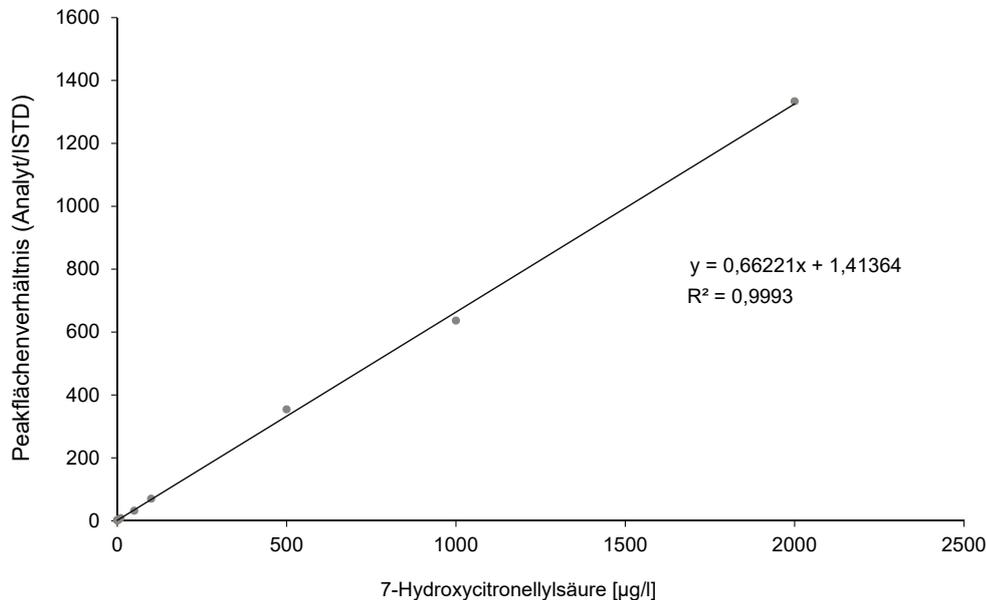


Abb. 4 Kalibriergerade für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehaltes in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des ISTD gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion ([Abschnitt 8](#)) kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in µg/l Urin berechnet werden. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

Bei jeder Analysenserie wird ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser) mitgeführt. Gegebenenfalls vorliegende Leerwerte werden von den Ergebnissen abgezogen.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Präzisionskontrolle werden mit jeder Analysenserie mindestens drei Qualitätskontrollproben mit niedriger, mittlerer und hoher Analytkonzentration untersucht, die eine konstante Konzentration des Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden, indem Nichtraucher-Poolurin mit Standardlösungen des Analyten dotiert wird. Die Analytkonzentration im Qualitätskontrollmaterial sollte dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (z. B. 1 µg/l, 5 µg/l und 500 µg/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 zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Die Präzision in der Serie wurde bei drei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Dazu wurde der mit drei unterschiedlichen 7-Hydroxycitronellylsäure-Konzentrationen dotierte Urin fünffach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in [Tabelle 4](#) zusammengestellt.

Tab. 4 Präzision in der Serie für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin (n = 5)

Analyt	Ermittelter Gehalt [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
7-Hydroxycitronellylsäure	6,3	4,5	12,5
	73,8	3,5	9,72
	515	2,8	7,77

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte durch Aufarbeitung und Analyse derselben Urinproben an sechs unterschiedlichen Tagen innerhalb von zwei Wochen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in [Tabelle 5](#) zusammengefasst.

Tab. 5 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin (n = 6)

Analyt	Ermittelter Gehalt [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
7-Hydroxycitronellylsäure	5,9	9,3	24,7
	71,8	3,8	9,77
	504	3,7	9,51

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Vermessen eines Urins bestimmt, der mit 1 μg , 5 μg bzw. 500 μg 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter Urin dotiert war. Die niedrigste Konzentration lag unter dem dreifachen Wert der Bestimmungsgrenze, die höchste im oberen Bereich der Kalibriergeraden. Aufarbeitung und Analyse erfolgten jeweils für die undotierten sowie die dotierten Urinproben. Die Berechnung der relativen Wiederfindung erfolgte anhand der ermittelten Gehalte in den dotierten Urinen unter Abzug eventueller Hintergrundgehalte in den undotierten Proben. Je Konzentration wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in [Tabelle 6](#) dargestellt.

Tab. 6 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Mittlere relative Wiederfindungsrate r [%]	Bereich [%]
7-Hydroxycitronellylsäure	1,0	97,8	87,7–124
	5,0	106	102–109
	500	103	98,2–107

11.3 Absolute Wiederfindung

Die Bestimmung der absoluten Wiederfindung diente der Abschätzung der aufarbeitungsbedingten Verluste und wurde mit einem mit 1 µg, 5 µg bzw. 500 µg 7-Hydroxycitronellylsäure pro Liter dotierten Urin durchgeführt. Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte durch Vergleich mit einer Referenzprobe. Als Referenzprobe diente dieselbe Urinmatrix, die jedoch erst nach der Aufarbeitung mit dem Analyten dotiert wurde. Bei allen drei Konzentrationen wurden die Referenzproben dreimal und die dotierten Proben sechsmal untersucht. Die absolute Wiederfindung lag zwischen 76,7 und 95,5 % (siehe [Tabelle 7](#)).

Tab. 7 Absolute Wiederfindungsraten für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere absolute Wiederfindungsrate [%]	Bereich [%]
7-Hydroxycitronellylsäure	1,0	95,5	93,3–96,8
	5,0	88,2	86,4–89,3
	500	76,7	73,2–79,9

11.4 Matrixeffekte

Die bei der UPLC-MS/MS-Messung auftretenden Matrixeffekte wurden an drei verschiedenen nativen Urinproben untersucht. Die Urinproben wurden ohne Dotierung aufgearbeitet und erst direkt vor der eigentlichen UPLC-MS/MS-Analyse mit dem ISTD und dem Analyten in einer niedrigen bzw. einer hohen Konzentration dotiert. Die Berechnung der Matrixeffekte erfolgte durch Vergleich der Peakflächen des Analyten mit den Peakflächen der gleichen Analytmengen in reinem Lösungsmittel. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in [Tabelle 8](#) zusammengefasst. Die Analytsignalstärken sind aufgrund starker Matrixeffekte deutlich verringert.

Tab. 8 Matrixeffekte bei der Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere relative Wiederfindung [%]	Bereich [%]
7-Hydroxycitronellylsäure	2,0	21,3	20,0–23,7
	40	23,8	21,7–26,9
D ₆ -7-Hydroxycitronellylsäure (ISTD)	10	23,0	20,3–28,5

11.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze des Analyten (siehe [Tabelle 9](#)) wurden durch die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses in verschiedenen Matrixproben mit Hilfe der entsprechenden Funktion in der Auswertesoftware MassLynx V4.1 ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde zunächst bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von neun berechnet und anschließend durch Bestimmung der Präzision und Richtigkeit in drei verschiedenen, an der Bestimmungsgrenze dotierten Matrixproben verifiziert. Dabei galten als Kriterien eine zu erreichende Präzision von maximal 20 % und eine Richtigkeit von 80–120 %.

Die Nachweisgrenze wurde aus der Bestimmungsgrenze berechnet und entspricht der Konzentration, die ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens drei besitzt.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
7-Hydroxycitronellylsäure	0,17	0,5

11.6 Störeinflüsse

Die Stabilität des Analyten wurde bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen untersucht: die Kurzzeitstabilität der 7-Hydroxycitronellylsäure wurde durch Lagerung von Urinproben für 24 Stunden bei Raumtemperatur ($n = 3$), die Frier-Tau-Stabilität durch bis zu sechsmaliges Auftauen der Proben für mindestens sechs Stunden und anschließendes Wiedereinfrieren bei -20 °C ($n = 3$) und die Stabilität bereits aufgearbeiteter und vermessener Proben durch Lagern der Proben im Autosampler bei 10 °C für zwei Wochen und nochmaliger Vermessung ($n = 3$) geprüft. Die Lagerungsversuche ergaben, dass das 7-Hydroxycitronellal unter den getesteten Bedingungen stabil ist, die aufgearbeiteten und vermessenen Proben zeigten keinen Analytverlust.

Als ein weiterer möglicher Störeinfluss wurden Verschleppungseffekte im chromatographischen System, wie das Injektions-Carryover“, untersucht. Nach fünf Injektionen einer Probe mit hohem Analytgehalt wurde zweimal eine Leerwertprobe eingespritzt und analysiert. Dabei wurden keine Interferenzsignale mit der Retentionszeit des Analyten oder des ISTD beobachtet.

Was mögliche Leerwertgehalte anbelangt, so wurde im Natriumacetatpuffer eine Kontamination mit 7-Hydroxycitronellylsäure festgestellt. Um den daraus resultierenden Leerwert von Probe zu Probe konstant zu halten, ist auf genaue Zugabe des Volumens an Puffer zu achten. Ebenfalls zu empfehlen ist die zusätzliche Vermessung eines Reagenzienleerwerts, der analog zu [Abschnitt 5](#) aufgearbeitet wird.

Im Rahmen der Methodenüberprüfung fiel auf, dass der lineare Arbeitsbereich geräteabhängig gegebenenfalls kleiner sein kann als angegeben. In diesem Fall müssen Proben mit hohen Analytgehalten verdünnt und erneut aufgearbeitet und analysiert werden.

12 Diskussion der Methode

Das dargestellte Biomonitoring-Verfahren, das die Erfassung einer 7-Hydroxycitronellal-Exposition der Allgemeinbevölkerung erlaubt, wurde im Rahmen des BMUB/VCI-Kooperationsprojektes entwickelt und ist bereits international publiziert (Stoekelhuber et al. 2017).

Die umfassend validierte UPLC-MS/MS Methode erlaubt die sensitive Bestimmung von 7-Hydroxycitronellylsäure als Hauptmetabolit von 7-Hydroxycitronellal. Die Methode ist selektiv und weist eine gute Richtigkeit und Linearität auf. Die im Rahmen der Methodvalidierung bestimmten relativen und absoluten Wiederfindungsraten sind ausreichend. Die Bestimmungsgrenze von $0,5\text{ µg/l}$ reicht aus, um die Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung mit diesem Analyten zu quantifizieren.

Verwendete Messgeräte UPLC-System (Acquity UPLC I-Class System, Waters GmbH, Eschborn) bestehend aus Sample Manager (SM-FTN), I-Class Binary Solvent Manager, Column Manager und Sample Organizer sowie einem Xevo TQ-S Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn).

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. 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: <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- ECHA (European Chemicals Agency) (2020) Substance infocard – 7-hydroxycitronellal. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.003.199>, abgerufen am 16 Dez 2020
- European Commission (2019) Commission Regulation (EU) 2019/1966 of 27 November 2019 amending and correcting Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Off J Eur Union L (307): 15–26
- Greim H (Hrsg) (2003) Hydroxycitronellal. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 36. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb10775d0036>
- IFRA (International Fragrance Association) (2020) Hydroxycitronellal. IFRA Standard, amendment 49. IFRA, Geneva. https://ifrafragrance.org/standards/IFRA_STD_043.pdf, abgerufen am 16 Dez 2020
- Ishida T, Toyota M, Asakawa Y (1989) Terpenoid biotransformation in mammals. V. Metabolism of (+)-citronellal, (±)-7-hydroxycitronellal, citral, (-)-perillaldehyde, (-)-myrtenal, cuminaldehyde, thujone, and (±)-carvone in rabbits. Xenobiotica 19(8): 843–855. DOI: <https://doi.org/10.3109/00498258909043145>
- Pluym N, Petreanu W, Weber T, Scherer G, Scherer M, Kolossa-Gehring M (2020) Biomonitoring data on young adults from the Environmental Specimen Bank suggest a decrease in the exposure to the fragrance chemical 7-hydroxycitronellal in Germany from 2000 to 2018. Int J Hyg Environ Health 227: 113508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113508>
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2012) Opinion on fragrance allergens in cosmetic products. European Commission, Brussels. DOI: <https://doi.org/10.2772/77628>
- Stoekelhuber M, Krnac D, Pluym N, Scherer M, Leibold E, Scherer G (2017) A validated UPLC-MS/MS method for biomonitoring the exposure to the fragrance 7-hydroxycitronellal. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1068–1069: 261–267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.040>
- Tonge RP (1995) The cutaneous disposition of the sensitizing chemicals hydroxycitronellal and dinitrochlorobenzene. Dissertation, University of London, London