

2-Phenoxyethanol – Bestimmung von Phenoxyessigsäure und 4-Hydroxyphenoxyessigsäure in Urin mittels UPLC-ESI-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

2-Phenoxyethanol;
Phenoxyessigsäure;
4-Hydroxyphenoxyessigsäure;
Biomonitoring; Urin;
UPLC-ESI-MS/MS

T. Jäger¹

M. Bader¹

L. Kuhlmann²

T. Göen^{2,3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

¹ *Methodenentwicklung, BASF SE, Corporate Health Management, ESG/CB – H306, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen*

² *Methodenprüfung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*

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

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

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

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

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented method for the biomonitoring of exposure to 2-phenoxyethanol, an important biocide. The method described herein allows for the determination of the two main metabolites of 2-phenoxyethanol, specifically phenoxyacetic acid (PhAA) and 4-hydroxyphenoxyacetic acid (4-OH-PhAA), in urine. The urine samples are mixed with diluted formic acid and the internal standards. The analytes are separated from matrix components by liquid chromatography and subsequently analysed by tandem mass spectrometry using electrospray ionisation. Quantitative evaluation is carried out via external calibration in ultra-pure water. Good precision data with standard deviations below 7.19% for PhAA and below 8.07% for 4-OH-PhAA as well as good accuracy data with mean relative recoveries in the range of 98.7–109% for PhAA and of 92.6–107% for 4-OH-PhAA show that the method provides reliable and accurate analytical results. The method is both selective and sensitive, and the limits of quantitation of 8.2 µg PhAA/l urine and 7.6 µg 4-OH-PhAA/l urine are sufficient to determine occupational exposure as well as background exposure of the general population to 2-phenoxyethanol.

Citation Note:

Jäger T, Bader M, Kuhlmann L, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. 2-Phenoxyethanol – Bestimmung von Phenoxyessigsäure und 4-Hydroxyphenoxyessigsäure in Urin mittels UPLC-ESI-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Dec;8(4):Doc091. https://doi.org/10.34865/bi12299d8_4or

Manuskript abgeschlossen:
14 Jun 2022

Publikationsdatum:
20 Dez 2023

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



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektrospray-Ionisation und Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-ESI-MS/MS)

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
2-Phenoxyethanol	122-99-6	Phenoxyessigsäure	122-59-8
		4-Hydroxyphenoxyessigsäure	1878-84-8

Zuverlässigkeitskriterien

Phenoxyessigsäure (PhAA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,16 mg, 0,83 mg oder 15,3 mg PhAA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$s_w = 2,79\%$, 1,08 % bzw. 2,04 % $u = 6,23\%$, 2,40 % bzw. 4,54 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,14 mg, 0,80 mg oder 15,0 mg PhAA pro Liter Urin und n = 11 Bestimmungen	$s_w = 7,19\%$, 5,08 % bzw. 4,48 % $u = 16,0\%$, 11,3 % bzw. 10,0 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) unter Verwendung von zehn nativen Urinproben und bei dotierten Konzentrationen von 0,07 mg, 0,65 mg oder 6,50 mg PhAA pro Liter Urin	$r = 98,7\%$, 108 % bzw. 109 %
Nachweisgrenze:	2,5 µg PhAA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	8,2 µg PhAA pro Liter Urin	

4-Hydroxyphenoxyessigsäure (4-OH-PhAA) mit 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,08 mg, 0,21 mg oder 5,38 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$s_w = 4,90\%$, 3,16 % bzw. 3,24 % $u = 10,9\%$, 7,06 % bzw. 7,22 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,08 mg, 0,21 mg oder 5,65 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin und n = 11 Bestimmungen	$s_w = 8,07\%$, 4,01 % bzw. 4,61 % $u = 18,0\%$, 8,94 % bzw. 10,3 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) unter Verwendung von zehn nativen Urinproben und bei dotierten Konzentrationen von 0,07 mg, 0,65 mg oder 6,50 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	$r = 95,0\%$, 107 % bzw. 104 %
Nachweisgrenze:	3,1 µg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	10,2 µg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	

4-Hydroxyphenoxyessigsäure (4-OH-PhAA) mit d₄-4-OH-PhAA als ISTD^{a)}

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,02\%$, 1,77 % bzw. 2,14 %
	Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,04 mg, 0,11 mg oder 1,78 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$u = 9,08\%$, 4,01 % bzw. 4,84 %
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,31\%$, 3,85 % bzw. 3,00 %
	Streubereich bei einer mittleren Konzentration von 0,04 mg, 0,11 mg oder 1,80 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	$u = 16,2\%$, 9,89 % bzw. 7,72 %
Richtigkeit:	Wiederfindung (rel.) unter Verwendung von zehn nativen Urinproben und bei dotierten Konzentrationen von 0,07 mg, 0,65 mg oder 6,50 mg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	$r = 92,6\%$, 96,3 % bzw. 98,5 %
Nachweisgrenze:	2,2 µg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	7,6 µg 4-OH-PhAA pro Liter Urin	

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

2 Allgemeine Informationen zu Phenoxyethanol

2-Phenoxyethanol ist eine farblose, leicht viskose Flüssigkeit mit einem schwachen, rosenartigen Duft und wird durch die Hydroxyethylierung von Phenol gewonnen (Fiege et al. 2000). 2-Phenoxyethanol wird in Mengen von $\geq 10\,000$ t/a bis $< 100\,000$ t/a im Europäischen Wirtschaftsraum hergestellt oder in diesen importiert (ECHA 2023).

2-Phenoxyethanol ist biozid wirksam und wird als aktive Substanz in Biozidprodukten für die kleinskalige Desinfektion von Oberflächen durch professionelle Anwender eingesetzt (BPC 2018 b, c). Aufgrund seiner bioziden Wirksamkeit ist es auch als aktive Substanz in Handdesinfektionsmitteln zugelassen (BPC 2018 a) und wird in kosmetischen Mitteln und pharmazeutischen Produkten als Konservierungsstoff verwendet, wobei ein Höchstgehalt von 1% festgelegt ist (EU 2009; Uhr et al. 2013). Auch in Schneidölen für die Metallbearbeitung wird 2-Phenoxyethanol als Biozid eingesetzt (Uhr et al. 2013).

Darüber hinaus wird 2-Phenoxyethanol als Intermediat in der Herstellung von Weichmachern, Arzneimitteln und Duftstoffen sowie in der Parfümindustrie als Fixativ verwendet. 2-Phenoxyethanol wird auch als Lösungsmittel für Celluloseacetat vermarktet (Fiege et al. 2000).

2-Phenoxyethanol ist als akut toxisch (Kategorie 4; H 302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken) und augenreizend (Kategorie 2; H 319 Verursacht schwere Augenreizungen) nach GHS eingestuft (EU 2008). Von der Kommission wurde für 2-Phenoxyethanol ein MAK-Wert von 1 ml/m^3 ($5,7\text{ mg/m}^3$) mit Spitzenbegrenzungskategorie I und Überschreitungsfaktor 1 festgelegt. Darüber hinaus wurde die Substanz der Schwangerschaftsgruppe C zugeordnet (DFG 2023). Eine ausführliche Darstellung und Diskussion der toxikologischen Eigenschaften von 2-Phenoxyethanol findet sich in den Begründungen der Kommission (Greim 1998; Hartwig und MAK Commission 2017) sowie an anderer Stelle (BPC 2018 a, b, c; SCCS 2016; Scognamiglio et al. 2012).

Zum Hauptaufnahmeweg von 2-Phenoxyethanol am Arbeitsplatz liegen keine Angaben vor. Eine inhalative Exposition ist unter Normalbedingungen aufgrund des geringen Dampfdrucks hauptsächlich durch Aerosole und weniger durch Dämpfe anzunehmen (IFA 2023). Zur Resorption nach inhalativer Aufnahme sind keine Daten publiziert (Hartwig und MAK Commission 2017).

Nach dermalen oder oraler Exposition wird 2-Phenoxyethanol von Mensch und Ratte gut resorbiert (Howes 1988). Nach Resorption wird es schnell metabolisiert und renal eliminiert. Tierversuche an weiblichen Wistar-Ratten haben ergeben, dass 2-Phenoxyethanol vor allem zu PhAA verstoffwechselt wird (ca. 60 % der verabreichten Dosis). Im Urin lag die PhAA sowohl frei als auch konjugiert vor. Nicht metabolisiertes bzw. konjugiertes Phenoxyethanol wurden in

den Untersuchungen nur in Spuren (<1% der verabreichten Dosis) bzw. zu einem geringen Anteil (ca. 5% der verabreichten Dosis) im Urin nachgewiesen. Auch ringhydroxylierte Metaboliten und deren Konjugate wurden zu einem nur geringen Anteil im Urin gefunden (Hartwig und MAK Commission 2017). [Abbildung 1](#) zeigt die Strukturformeln von 2-Phenoxyethanol und seinen Metaboliten. Eine Übersicht über den postulierten Metabolismus gibt [Abbildung 2](#).

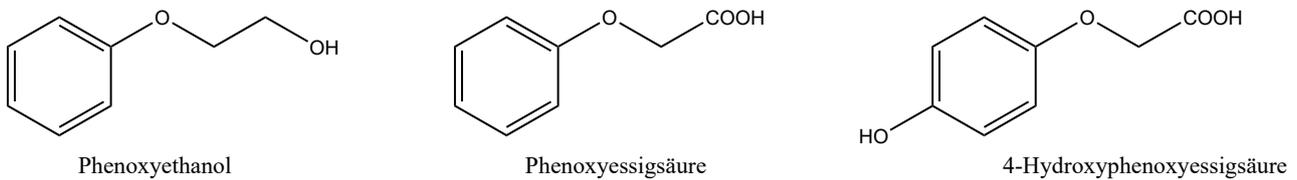


Abb. 1 Strukturformeln von 2-Phenoxyethanol, Phenoxyessigsäure sowie 4-Hydroxyphenoxyessigsäure

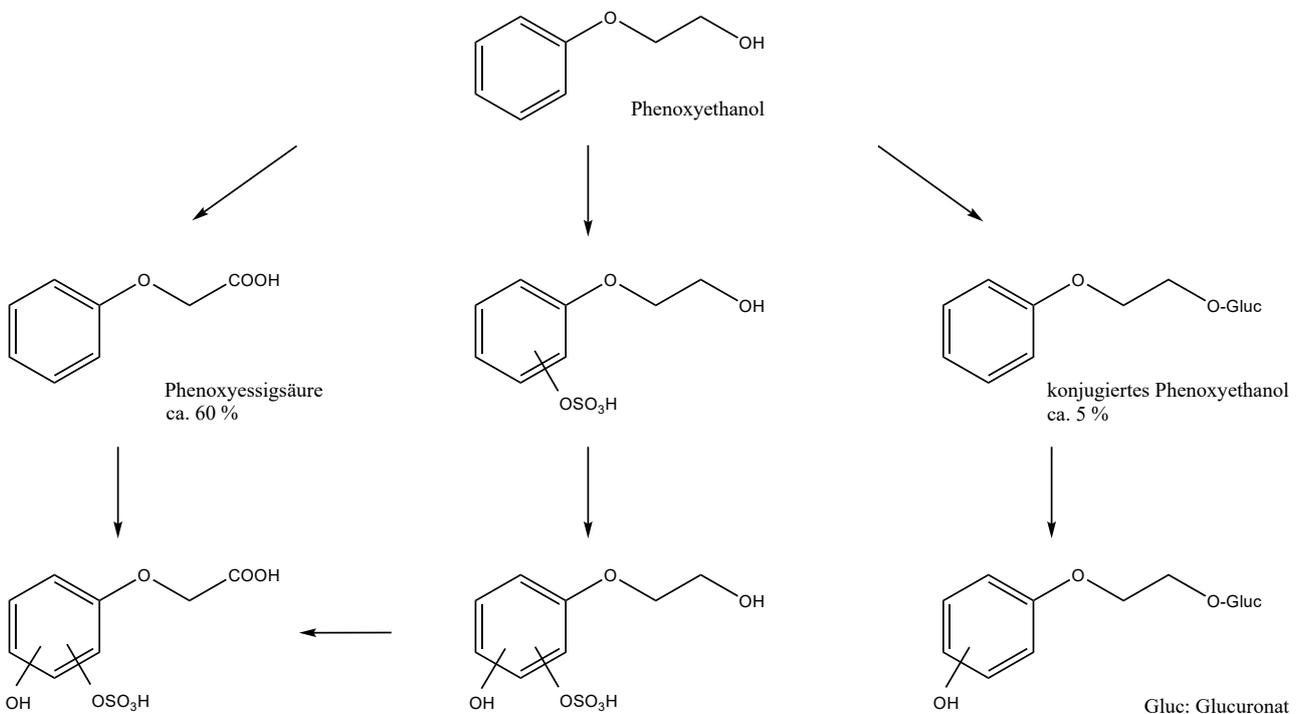


Abb. 2 Schema des postulierten Metabolismus von 2-Phenoxyethanol

Auch beim Menschen stellt PhAA den Hauptmetaboliten dar, während 4-OH-PhAA in deutlich geringeren Konzentrationen gebildet wird (Greim 1998; Jäger et al. 2022). Unmetabolisiertes 2-Phenoxyethanol wurde bisher weder nach oraler noch nach dermalen Applikation nachgewiesen (Hartwig und MAK Commission 2017).

Daten zur Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung sind in [Tabelle 1](#) und [Tabelle 2](#) zusammengestellt. Während es einige Studien zu PhAA-Gehalten im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung gibt, wurden zu 4-OH-PhAA bislang nur von Jäger et al. (2022) Daten veröffentlicht.

Tab. 1 PhAA im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung

Studienkollektiv	NWG	BG	Phenoxyessigsäure			Literatur
			Median	GM	Bereich	
Männer, Frankreich, 53, n = 22 >NWG	0,05 mg/l	–	< NWG	–	< NWG–2,03 mg/g Krea	Multigner et al. 2007
Schwangere Frauen, Frankreich, 200, n = 194 >NWG	0,001 mg/l	–	–	0,58 mg/g Krea	< NWG–73,91 mg/g Krea	Labat et al. 2008
Allgemeinbevölkerung, Deutschland, 31 ♀, 13 ♂, n = 44 >NWG	–	0,01 mg/l	1,33 mg/g Krea	–	0,02–79,1 mg/g Krea	Fromme et al. 2013
Schwangere Frauen, Frankreich, 519, n = 484 >NWG	0,05 mg/l	–	0,48 mg/l	–	< NWG–36,0 mg/l	Garlantézac et al. 2013
Allgemeinbevölkerung, Deutschland, 94 ♂, 59 ♀, n = 151 >BG	–	0,01 mg/l	1,27 mg/g Krea (0,99 mg/l)	–	< BG–84,11 mg/g Krea (< BG–53,83 mg/l)	Jäger et al. 2022

BG: Bestimmungsgrenze; GM: geometrischer Mittelwert; Krea: Kreatinin; NWG: Nachweisgrenze

Tab. 2 4-OH-PhAA im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung

Studienkollektiv	NWG	BG	4-Hydroxyphenoxyessigsäure			Literatur
			Median	GM	Bereich	
Allgemeinbevölkerung, Deutschland, 94 ♂, 59 ♀, n = 144 >BG	–	0,02 mg/l	0,15 mg/g Krea (0,11 mg/l)	–	< BG–4,98 mg/g Krea (< BG–6,55 mg/l)	Jäger et al. 2022

BG: Bestimmungsgrenze; GM: geometrischer Mittelwert; Krea: Kreatinin; NWG: Nachweisgrenze

Von der Kommission wurde bereits eine Biomonitoringmethode zur Bestimmung von PhAA in Urin publiziert. Allerdings ist die Nachweisgrenze dieser Methode mit 0,1 mg/l nicht ausreichend, um die Hintergrundbelastung in der Allgemeinbevölkerung sicher zu erfassen (Göen et al. 2006).

3 Grundlage des Verfahrens

Mit dem im Folgenden beschriebenen Verfahren werden die beiden wichtigsten Metaboliten des 2-Phenoxyethanols, PhAA und 4-OH-PhAA, im Urin bestimmt. Die Urinproben werden mit verdünnter Ameisensäure und internen Standards (ISTDs) versetzt. Als ISTDs werden d_5 -PhAA sowie 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure bzw. d_4 -4-OH-PhAA verwendet. Die Analyten werden flüssigkeitschromatographisch von Begleitkomponenten getrennt und anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels externer Kalibrierung in wässrigem Medium.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (z. B. Waters UPLC H-Class, Waters GmbH, Eschborn) mit Massenspektrometer (z. B. Waters Xevo-TQS, Waters GmbH, Eschborn)
- UPLC-Säule (z. B. ACQUITY UPLC HSS T3, 100 Å, 1,8 µm × 2,1 mm × 150 mm, Nr. 186003540, Waters GmbH, Eschborn)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Laborschüttler (z. B. Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)

- Wasseraufbereitungsanlage (z. B. Milli-Q[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- 1000-ml-Glasflaschen mit Dispenser (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 1,8-ml-Injektionsflaschen mit Schraubverschluss (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- 100-ml-Kunststoffflaschen (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 100-ml-Braunglasflaschen (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Verschiedene Pipetten mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Verschiedene Messkolben (z. B. witeg Labortechnik GmbH, Wertheim)
- 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

- Phenoxyessigsäure, 98 % (z. B. Nr. 158518, Merck KGaA, Darmstadt)
- d₅-Phenoxyessigsäure, > 98 % (z. B. Nr. D-6655, C/D/N Isotopes Inc., Quebec, Kanada)
- 4-Hydroxyphenoxyessigsäure, > 98 % (z. B. Nr. 11429773, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- d₄-4-Hydroxyphenoxyessigsäure, ≥ 95 % (z. B. Auftragsynthese, ChiroBlock GmbH, Wolfen)
- 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure, ≥ 97 % (z. B. Nr. 55730, Merck KGaA, Darmstadt)

Sonstige Chemikalien

- Acetonitril, ≥ 99,9 %, CHROMASOLVTM (z. B. Nr. 34851, FlukaTM, Honeywell Deutschland Holding GmbH, Offenbach)
- Ameisensäure, 98–100 %, reinst, zur Analyse (z. B. Nr. 05311, AnalytiChem GmbH, Duisburg)
- Natronlauge, min. 10 %, zur Analyse, EMSURE[®] (z. B. Nr. 105588, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol, für die Flüssigkeitschromatographie (z. B. Nr. M/4058/17, Fisher Chemicals, Geel, Belgien)
- Stickstoff 5.0 (z. B. Nippon Gases Deutschland GmbH, Biebesheim am Rhein)
- Argon 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q[®] Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Lösungen

- Ameisensäure (0,033 %; pH = 2,9)
2 ml der konzentrierten Ameisensäure werden mit hochreinem Wasser auf 6 l aufgefüllt und, falls notwendig, mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 2,9 eingestellt.

Die verdünnte Ameisensäure wird bei Raumtemperatur gelagert und ist ein Jahr lang stabil.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

Bei der Entwicklung der Methode wurde für die Quantifizierung der 4-OH-PhAA ein anderer ISTD verwendet als bei der Methodenprüfung. So setzten die Methodenentwickler die strukturanaloge 4-Hydroxymethyl-PhAA ein, die Methodenprüfer den in Auftragssynthese hergestellten strukturidentischen deuterierten ISTD (d_4 -4-OH-PhAA). Im Folgenden werden beide ISTDs optional genannt, auch die Zuverlässigkeitskriterien für 4-OH-PhAA sind sowohl für die Verwendung des einen wie des anderen ISTD gegeben.

- ISTD-Stammlösungen (1000 mg/l)
10 mg d_5 -PhAA und 10 mg d_4 -4-OH-PhAA (bzw. 4-Hydroxymethyl-PhAA) werden jeweils in 10-ml-Messkolben exakt eingewogen und in 5 ml Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (10 mg/l)
100 μ l der d_5 -PhAA-Stammlösung und 100 μ l der d_4 -4-OH-PhAA-Stammlösung (bzw. der 4-Hydroxymethyl-PhAA-Stammlösung) werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stammlösungen und die Dotierlösung der ISTDs werden bei -18°C gelagert und sind bei dieser Lagerungstemperatur ein Jahr lang stabil.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg/l)
In 10-ml-Messkolben werden 10 mg PhAA bzw. 4-Hydroxymethyl-PhAA einzeln eingewogen und jeweils in 5 ml Methanol gelöst. Die Messkolben werden anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (100 mg/l)
Von jeder Stammlösung werden 100 μ l in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend werden 800 μ l hochreines Wasser zugegeben.
- Dotierlösung II (10 mg/l)
Von jeder Stammlösung werden 100 μ l in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung III (1 mg/l)
1 ml der Dotierlösung II wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Kalibrierstandards werden gemäß dem in [Tabelle 3](#) angegebenen Pipettierschema hergestellt, im Kühlschrank bei 4°C gelagert und maximal vier Wochen verwendet. Für die Aufarbeitung werden 20 μ l der jeweiligen Kalibrierstandards eingesetzt. Da für 4-OH-PhAA Konzentrationen zu erwarten sind, die deutlich unter denen von PhAA liegen, kann es gegebenenfalls sinnvoll sein, für die Bestimmung von 4-OH-PhAA einen niedrigeren Konzentrationsbereich zu verwenden.

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [μ l]	Dotierlösung II [μ l]	Dotierlösung III [μ l]	Hochreines Wasser [μ l]	Konzentration [mg/l]
0	–	–	–	1000	0,0
1	–	–	10	990	0,01
2	–	–	20	980	0,02
3	–	–	50	950	0,05

Tab. 3 (Fortsetzung)

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Dotierlösung III [µl]	Hochreines Wasser [µl]	Konzentration [mg/l]
4	–	10	–	990	0,1
5	–	20	–	980	0,2
6	–	50	–	950	0,5
7	10	–	–	990	1,0
8	20	–	–	980	2,0
9	50	–	–	950	5,0
10	100	–	–	900	10,0
11	200	–	–	800	20,0
12	400	–	–	600	40,0

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in einem verschließbaren Polypropylengefäß gesammelt und bis zur Probenaufbereitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung (> drei Tage) sollten die Urinproben bei –18 °C eingefroren werden.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend gut gemischt. In eine 1,8-ml-Injektionsflasche werden 1000 µl verdünnte Ameisensäure (0,033 %) vorgelegt, 50 µl ISTD-Dotierlösung zugegeben und anschließend 20 µl der Urinprobe hinzupipettiert. Die Flasche wird verschlossen und kräftig geschüttelt (10 s auf dem Schüttler). 10 µl der so verdünnten Urinprobe werden in das UPLC-MS/MS injiziert.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer UPLC-Anlage und einem Tandem-Massenspektrometer unter Verwendung negativer Elektrospray-Ionisierung (UPLC-ESI-MS/MS).

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Waters Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 × 150 mm)
Trennprinzip:	<i>Reversed Phase</i>
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	30 °C
Flussrate:	0,2 ml/min
Eluent:	A: Ameisensäure (0,033 %) B: Acetonitril
Laufzeit:	15 min

Gradientenprogramm: siehe [Tabelle 4](#)

Tab. 4 Gradientenprogramm für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	80	20
10,0	10	90
13,0	10	90
13,1	80	20
15,0	80	20

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Elektrospray, negativ (ESI-)
Detektionsmodus:	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM)
Kapillarspannung:	3,0 kV
Cone-Spannung:	38 V
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	500 °C
Cone-Gasfluss:	150 l/h
Desolvationsgasfluss:	1000 l/h
Kollisionsgas:	Argon
Kollisionsgasfluss:	0,15 ml/h

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter sind für das für die Methodenentwicklung verwendete System bestimmt und optimiert worden. Für PhAA und 4-OH-PhAA wurden zwei Fragment-Ionenübergänge ausgewählt. Ein Übergang dient zur Quantifizierung (Quantifier) und der andere zur Bestätigung (Qualifier). Für die jeweiligen ISTDs wurde nur ein Massenübergang verwendet. Die ausgewählten Fragment-Ionenübergänge sind zusammen mit den Retentionszeiten in [Tabelle 5](#) dargestellt. In [Abbildung 3](#) sind die Strukturformeln der ausgewählten Ionen (Parent, Quantifier, Qualifier) abgebildet.

Tab. 5 MRM-Parameter für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Massenübergang [m/z]	Status	Cone [V]	Kollisionsenergie [V]	Dwell time [s]
PhAA	5,48	150,7 → 93,0	Quantifier	32	12	0,025
		150,7 → 107,0	Qualifier	32	10	0,025
d ₅ -PhAA (ISTD)	5,43	155,7 → 98,1	Quantifier	32	12	0,025
4-OH-PhAA	3,32	166,8 → 109,1	Quantifier	34	12	0,025
		166,8 → 81,0	Qualifier	34	22	0,025
4-Hydroxymethyl-PhAA (ISTD)	3,21	181,0 → 105,0	Quantifier	38	20	0,025
d ₄ -4-OH-PhAA (ISTD)	3,30	170,8 → 113,1	Quantifier	30	14	0,025

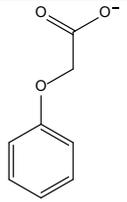
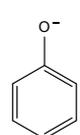
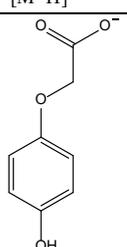
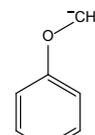
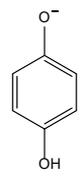
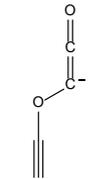
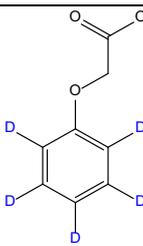
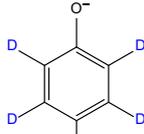
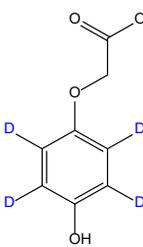
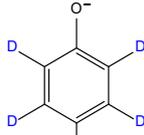
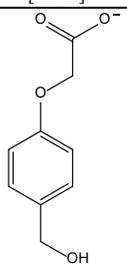
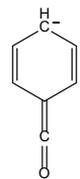
	Quantifier	Qualifier
PhAA	 m/z 150,7 [M-H] ⁻	 m/z 93,0 [M-CH ₂ -COO] ⁻
4-OH-PhAA	 m/z 166,8 [M-H] ⁻	 m/z 107,0 [M-COO] ⁻
		 m/z 109,0 [M-CH ₂ -COO] ⁻
		 m/z 81,0 [M-C ₄ H ₄ O ₂] ⁻
ISTDs		
d ₅ -PhAA	 m/z 155,7 [M-H] ⁻	 m/z 98,1 [M-CH ₂ -COO] ⁻
d ₄ -4-OH-PhAA	 m/z 170,8 [M-H] ⁻	 m/z 113,1 [M-CH ₂ -COO] ⁻
4-Hydroxymethyl-PhAA	 m/z 181,0 [M-H] ⁻	 m/z 105,1 [M-CH ₂ -COO] ⁻

Abb. 3 Strukturformeln der ausgewählten Ionen (Parent, Quantifier, Qualifier) für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin

7 Analytische Bestimmung

Es werden 10 µl der verdünnten Urinprobe (siehe [Abschnitt 5.2](#)) in das UPLC-MS/MS-System injiziert. Die analytische Trennung erfolgt mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie. Die jeweiligen Analyten werden unter Zuhilfenahme der Retentionszeit und der spezifischen Massenübergänge identifiziert. Die in [Tabelle 5](#) für die Analyten und ISTDs angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der von ihm verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen.

Exemplarische Chromatogramme für die einzelnen Analyten sind in [Abbildung 4](#), [5](#) und [6](#) dargestellt. Für die Bestimmung von 4-OH-PhAA sind sowohl Chromatogramme unter Verwendung des strukturidentischen isotoptenmarkierten ISTDs d_4 -4-OH-PhAA ([Abbildung 5](#)) als auch unter Verwendung des strukturanalogen ISTDs 4-Hydroxymethyl-PhAA ([Abbildung 6](#)) dargestellt.

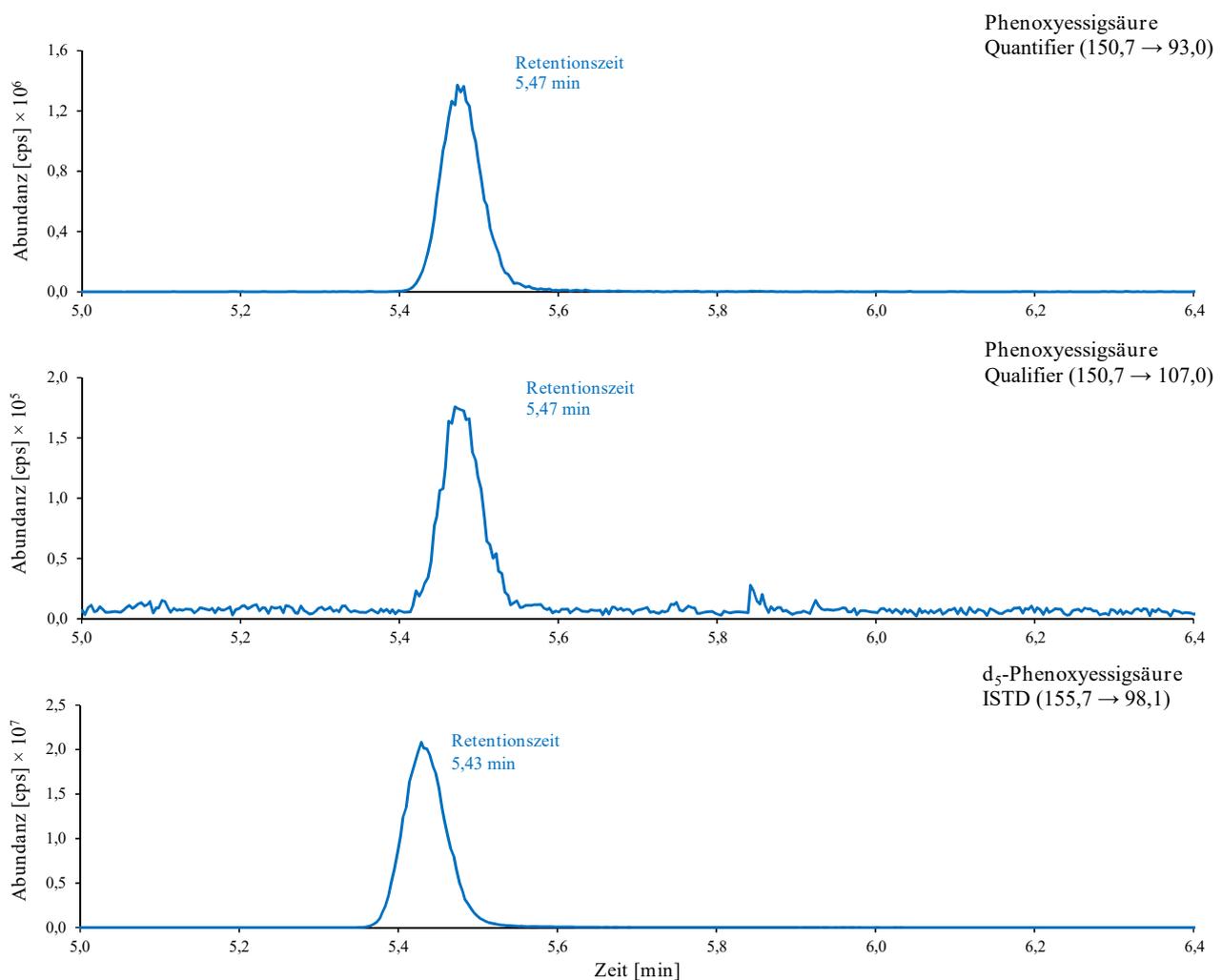


Abb. 4 Chromatogramme einer mit 0,98 mg PhAA pro Liter dotierten Urinprobe (ISTD: d_5 -PhAA)

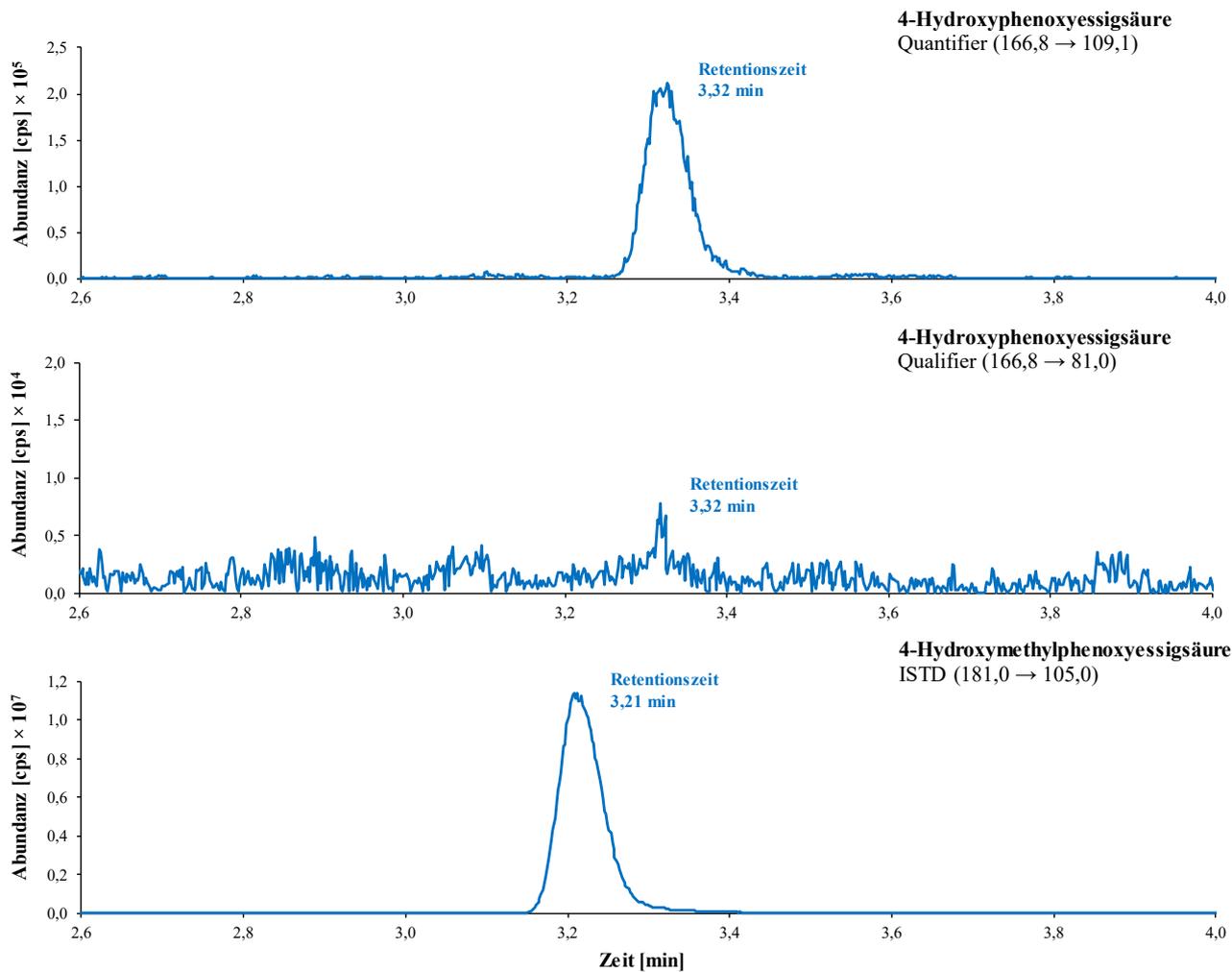


Abb. 5 Chromatogramme einer mit 0,20 mg 4-OH-PhAA pro Liter dotierten Urinprobe (ISTD: 4-Hydroxymethyl-PhAA)

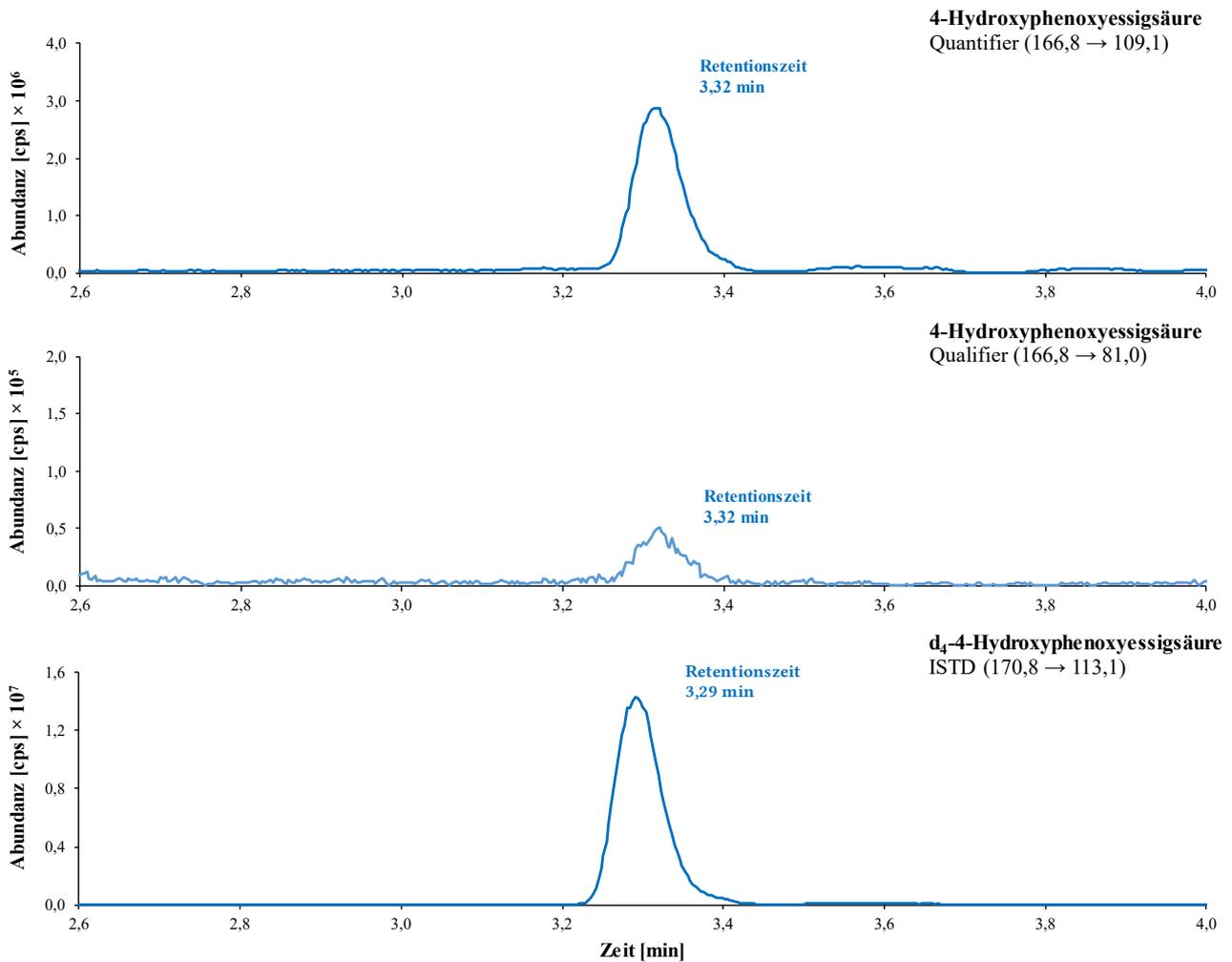


Abb. 6 Chromatogramme einer mit 5,0 mg 4-OH-PhAA dotierten Urinprobe (ISTD: d₄-4-OH-PhAA)

8 Kalibrierung

Die Kalibrierlösungen werden wie in [Abschnitt 4.5](#) beschrieben hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des entsprechenden ISTDs gegen die jeweils dotierte Konzentration des Analyten aufgetragen wird. Am eingesetzten Analysengerät wurde ein linearer Messbereich von der Bestimmungsgrenze bis 40,0 mg/l erreicht (siehe [Abbildung 7](#)). Beim Auftreten von Reagenzienleerwerten müssen diese gegebenenfalls durch Subtraktion berücksichtigt werden.

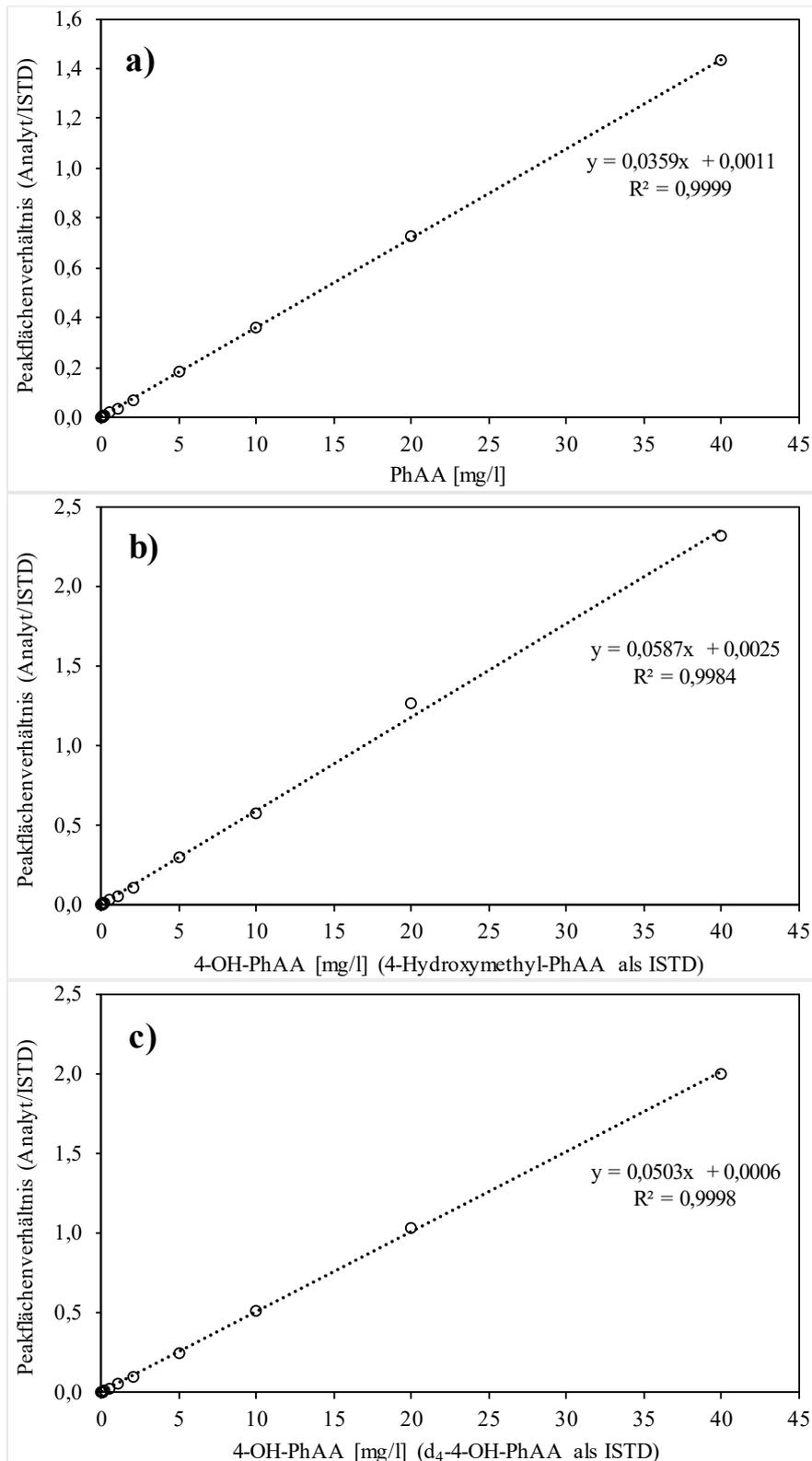


Abb. 7 Kalibriergeraden für die Bestimmung von a) PhAA, b) 4-OH-PhAA unter Verwendung von 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD und c) 4-OH-PhAA unter Verwendung von d₄-4-OH-PhAA als ISTD in Urin (lineare Regression)

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Der Analytgehalt einer Probe in mg/l Urin wird durch Einsetzen des Peakflächenverhältnisses des Analyten zum dazugehörigen ISTD in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion berechnet. Der Kalibrierbereich muss gegebenenfalls an die zu erwartenden Konzentrationen angepasst werden. Bei Analytkonzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs müssen die Proben nochmals analysiert werden. Hierzu werden Urinaliquote so mit hochreinem Wasser verdünnt, dass die Analytkonzentration im Kalibrierbereich liegt und anschließend aufgearbeitet und gemessen.

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).

Mindestens drei Kontrollurinproben mit bekannten Analytkonzentrationen (niedrige, mittlere und hohe Konzentration) werden pro Analysenlauf parallel zu den zu messenden Proben aufgearbeitet und analysiert. Da derzeit weder für PhAA noch für 4-OH-PhAA käufliches Kontrollmaterial zur Verfügung steht, muss dieses selbst hergestellt werden. Hierzu werden native Urinproben mit unterschiedlichen PhAA- und 4-OH-PhAA-Hintergrundgehalten gepoolt oder gepoolte Urinproben mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen dotiert. Das angesetzte Qualitätskontrollmaterial wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei -18°C tiefgefroren. Gleichzeitig wird in jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert analysiert.

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden drei native Urinproben mit unterschiedlicher PhAA- sowie 4-OH-PhAA-Konzentration an einem Tag zehnfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse der Präzision in der Serie sind in [Tabelle 6](#) zusammengefasst. Für die Bestimmung der Präzisionsdaten wurde von den Entwicklern der Methode für 4-OH-PhAA mit 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD gearbeitet. Bei der Prüfung der Methode wurde der strukturidentische isopenmarkierte Standard d_4 -4-OH-PhAA verwendet. Von den Daten der Methodenprüfung sind in [Tabelle 6](#) nur die Werte für 4-OH-PhAA aufgeführt.

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin (n = 10)

Analyt	Konzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
PhAA	0,16	2,79	6,23
	0,83	1,08	2,40
	15,3	2,04	4,54

Tab. 6 (Fortsetzung)

Analyt	Konzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
4-OH-PhAA (4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD)	0,08	4,90	10,9
	0,21	3,16	7,06
	5,38	3,24	7,22
4-OH-PhAA ^{a)} (d_4 -4-OH-PhAA als ISTD)	0,04	4,02	9,08
	0,11	1,77	4,01
	1,78	2,14	4,84

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

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde durch Aufarbeitung und Analyse von drei nativen Urinproben mit unterschiedlicher PhAA- und 4-OH-PhAA-Konzentration ermittelt. Hinsichtlich 4-OH-PhAA wurde von den Entwicklern der Methode mit 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD gearbeitet. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden die Urinproben an elf verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Bei der Methodenprüfung wurde für 4-OH-PhAA der strukturidentische isotope markierte Standard d_4 -4-OH-PhAA verwendet und die Urinproben wurden an sechs Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die errechneten Daten finden sich in [Tabelle 7](#). Von den Daten der Methodenprüfung sind nur die Werte für 4-OH-PhAA aufgeführt.

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin (n = 11 bzw. n = 6)

Analyt	Konzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
PhAA	0,14	7,19	16,0
	0,80	5,08	11,3
	15,0	4,48	10,0
4-OH-PhAA (4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD)	0,08	8,07	18,0
	0,21	4,01	8,94
	5,65	4,61	10,3
4-OH-PhAA ^{a)} (d_4 -4-OH-PhAA als ISTD)	0,04	6,31	16,2
	0,11	3,85	9,89
	1,80	3,00	7,72

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

11.2 Richtigkeit

Zur Überprüfung von Matrixeffekten wurden von den Entwicklern der Methode zehn native Urinproben (Kreatiningehalte von 0,56–1,96 g/l) jeweils mit 0,07 mg, 0,65 mg oder 6,50 mg PhAA sowie 4-OH-PhAA pro Liter Urin dotiert. Anschließend wurden die Urinproben sowohl dotiert als auch undotiert wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

Um die Matrixeffekte unter Verwendung von d_4 -4-OH-PhAA als ISTD zu überprüfen, haben die Prüfer der Methode zehn native Urinproben (Kreatiningehalte von 0,13–1,43 g/l) jeweils mit 0,07 mg, 0,65 mg oder 6,50 mg PhAA sowie 4-OH-PhAA pro Liter Urin dotiert. Die Urinproben wurden anschließend sowohl dotiert als auch undotiert wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

Die ermittelten relativen Wiederfindungen sind in [Tabelle 8](#) zusammengefasst, wobei von den Daten der Methodenprüfung nur die Werte für 4-OH-PhAA aufgeführt sind.

Tab. 8 Relative Wiederfindung von PhAA und 4-OH-PhAA in Individualurinen (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [mg/l]	Wiederfindung (rel.) r [%]	
		Mittelwert ± SD	Bereich
PhAA	0,07	98,7 ± 13,0	81,3–120
	0,65	108 ± 8,3	88,9–116
	6,50	109 ± 5,4	99,3–116
4-OH-PhAA (4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD)	0,07	95,0 ± 11,7	76,6–110
	0,65	107 ± 5,4	98,1–114
	6,50	104 ± 8,9	89,3–122
4-OH-PhAA ^{a)} (d ₄ -4-OH-PhAA als ISTD)	0,07	92,6	86,3–97,3
	0,65	96,3	89,0–103
	6,50	98,5	91,7–102

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

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach DIN 32645. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze errechnet sich nach DIN 32645 aus der Standardabweichung der erhaltenen Kalibrierfunktion am Leerwert (DIN 2008).

Von den Entwicklern der Methode wurde jeweils eine äquidistante 10-Punktkalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,005–0,05 mg/l in wässriger Lösung und in Poolurin erstellt und zusammen mit einem Leerwert aufgearbeitet und analysiert (n = 3). Dabei wurde für 4-OH-PhAA 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD verwendet.

Bei der Methodenprüfung wurden die äquidistanten 10-Punktkalibrierungen in einem Konzentrationsbereich von 0,01–0,1 mg/l in hochreinem Wasser sowie in einem Individualurin erstellt und zusammen mit einem Leerwert aufgearbeitet und analysiert (n = 3). Die Prüfer der Methode verwendeten d₄-4-OH-PhAA als ISTD für 4-OH-PhAA.

In [Abbildung 8](#) sind die Kalibriergeraden der 10-Punktkalibrierung für PhAA und für 4-OH-PhAA unter Verwendung der unterschiedlichen ISTDs dargestellt. Die Hintergrundgehalte an PhAA sowie 4-OH-PhAA in Urin sind gut zu erkennen. [Tabelle 9](#) zeigt die für die Matrix Urin ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. In [Abbildung 8](#) und in [Tabelle 9](#) sind von den Ergebnissen der Methodenprüfung nur die Werte für 4-OH-PhAA aufgeführt.

Tab. 9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
PhAA	2,5	8,2
4-OH-PhAA (4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD)	3,1	10,2
4-OH-PhAA ^{a)} (d ₄ -4-OH-PhAA als ISTD)	2,2	7,6

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

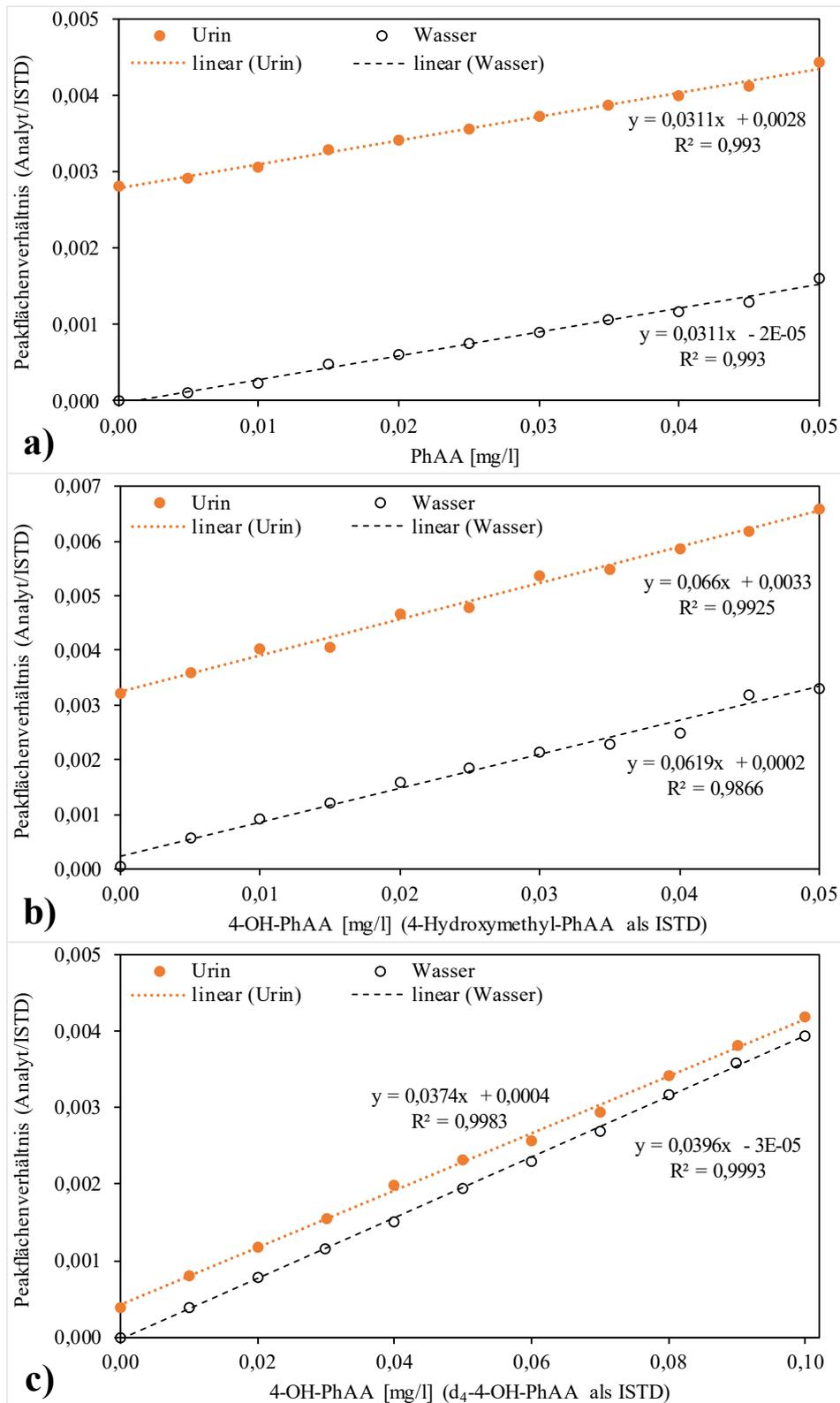


Abb. 8 In Wasser oder in Urin angesetzte Kalibriergeraden zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645: a) PhAA, b) 4-OH-PhAA unter Verwendung von 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD und c) 4-OH-PhAA unter Verwendung von d₄-4-OH-PhAA als ISTD

11.4 Störeinflüsse

Die bisherigen Erfahrungen mit der hier beschriebenen Methode zur Bestimmung von PhAA und 4-OH-PhAA zeigen, dass keine große Gefahr externer Kontaminationen besteht. Es ist allerdings sinnvoll, in jeder Analysenserie einen Reagenzienleerwert mitzuführen, um mögliche Verunreinigungen oder Kontaminationen zu erkennen.

12 Diskussion der Methode

Die vorliegende Methode erlaubt die schnelle, sensitive und spezifische Quantifizierung von PhAA und 4-OH-PhAA in Humanurin. Die erreichten niedrigen Bestimmungsgrenzen ermöglichen die Erfassung beider Phenoxyethanolmetaboliten in weit über 90 % der Urinproben der Allgemeinbevölkerung. So wurden mit der hier dargestellten Methode 153 Spontanurinproben (Kreatininkonzentrationen von 0,09–4,87 g/l) von 153 Mitarbeitern aus der chemischen Industrie ohne berufliche Exposition gegen 2-Phenoxyethanol untersucht. PhAA konnte in 151 der 153 Proben (99 %) und 4-OH-PhAA in 146 der 153 Proben (95 %) detektiert werden. Der Median lag bei 0,99 mg/l (Bereich: < BG–53,8 mg/l, 95. Perzentil: 14,9 mg/l) für den Metaboliten PhAA und bei 0,11 mg/l (< BG–4,98 mg/l, 95. Perzentil: 2,08 mg/l) für 4-OH-PhAA. Die vorliegende Methode ist sensitiver und im niedrigen Konzentrationsbereich präziser als das für die Bestimmung von PhAA bereits publizierte, laborseitig aufwändigere Verfahren (Göen et al. 2006).

Während der Methodenentwicklung wurde zur Quantifizierung der 4-OH-PhAA mit der strukturanalogen 4-Hydroxymethyl-PhAA gearbeitet. Nach Abschluss der Methodvalidierung durch die Entwickler der Methode wurde die Synthese eines isotoptenmarkierter ISTD für 4-OH-PhAA (d_4 -4-OH-PhAA) in Auftrag gegeben. Bei der Methodenprüfung wurde dann der deuterierte Standard zur Quantifizierung der 4-OH-PhAA-Gehalte verwendet.

Wenn eine nicht-isotoptenmarkierte Verbindung eingesetzt wird, kann insbesondere bei der Verwendung der LC-MS/MS nicht ausgeschlossen werden, dass nicht alle auftretenden Störungen zuverlässig kompensiert werden. Um zu überprüfen, ob der zur Quantifizierung der 4-OH-PhAA-Gehalte verwendete ISTD einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurden Vergleichsmessungen an 87 Urinproben durchgeführt. Die Ergebnisse sind sowohl als lineare Korrelation als auch als Bland-Altman-Plot in [Abbildung 9](#) dargestellt. Die Untersuchung zeigte weder einen eindeutigen Trend noch einzelne matrixbedingte Ausreißer, sodass grundsätzlich beide ISTDs eingesetzt werden können.

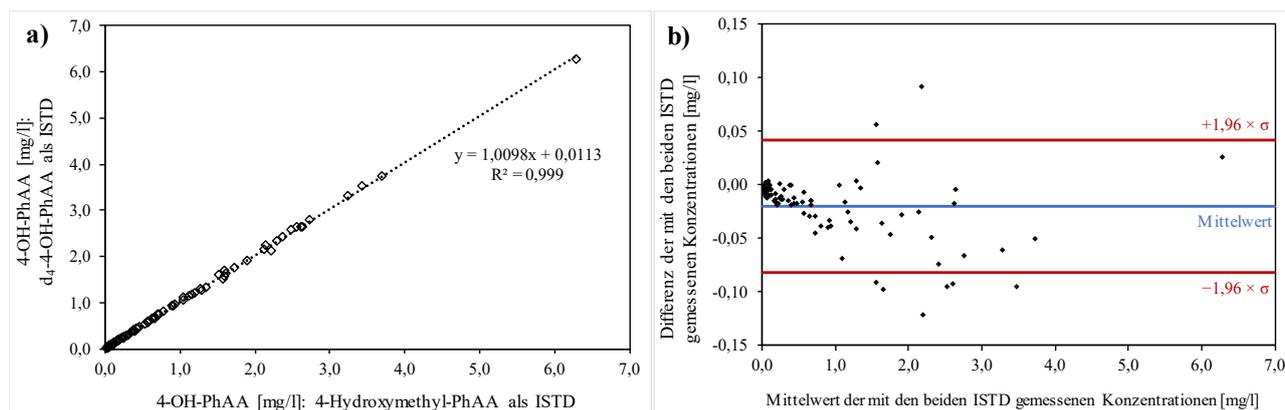


Abb. 9 Vergleichende Bestimmung von 4-OH-PhAA unter Verwendung von 4-Hydroxymethyl-PhAA bzw. d_4 -4-OH-PhAA als ISTD: a) lineare Korrelation und b) Bland-Altman-Plot

In der Literatur zum PhE-Metabolismus wird beschrieben, dass PhAA von Ratte und Kaninchen sowohl konjugiert als auch unkonjugiert ausgeschieden wird (Greim 1998; Hartwig und MAK Commission 2017). Um für Humanproben die Notwendigkeit einer Hydrolyse im Zuge der Probenaufbereitung zu prüfen, wurden insgesamt 29 Urinproben ohne Hydrolyse sowie nach saurer Hydrolyse analysiert. Für die saure Hydrolyse wurden 200 μ l Urin nach Zugabe

von 80 µl Salzsäure (37%) für eine Stunde bei 95 °C in einem Aluminiumheizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Probe mit 70 µl Natronlauge (10 mol/l) und 50 µl hochreinem Wasser versetzt. 40 µl der Probenlösung wurden mit 980 ml Ameisensäure (0,033%) verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl der ISTD-Dotierlösung wurde der Probenansatz gut gemischt und 10 µl der Lösung in das UPLC-MS/MS injiziert.

Die saure Hydrolyse führte bei beiden Metaboliten nicht zu erhöhten Analytkonzentrationen (siehe [Abbildung 10](#)). Folglich ist davon auszugehen, dass PhAA und 4-OH-PhAA unkonjugiert ausgeschieden werden und auf eine Hydrolyse verzichtet werden kann.

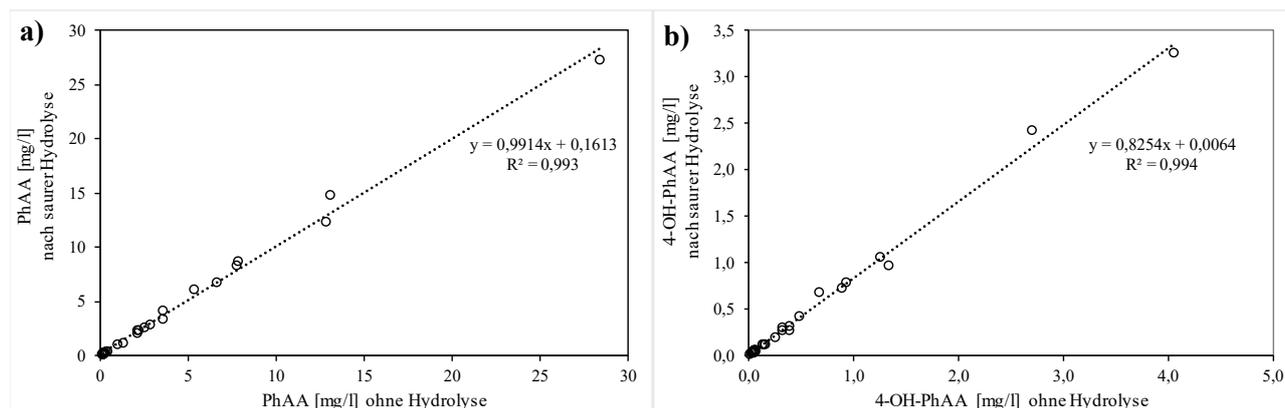


Abb. 10 Ergebnisse der Vergleichsmessung mit und ohne Hydrolyse: a) PhAA und b) 4-OH-PhAA unter Verwendung von 4-Hydroxymethyl-PhAA als ISTD

Verwendete Messgeräte Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (Waters UPLC H-Class, Waters GmbH, Eschborn) mit Massenspektrometer (Waters Xevo-TQS, Waters GmbH, Eschborn), UPLC-Säule (ACQUITY UPLC HSS T3, 100 Å, 1,8 µm × 2,1 mm × 150 mm, Nr. 186003540, Waters GmbH, Eschborn)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

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

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- BPC (Biocidal Products Committee) (2018 a) Opinion on the application for approval of the active substance: 2-phenoxyethanol, product type: 1. ECHA/BPC/190/2018. Helsinki: European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/documents/10162/13ad12c5-feeac686-2e0c-84722c8d287d>, abgerufen am 04 Sep 2023
- BPC (Biocidal Products Committee) (2018 b) Opinion on the application for approval of the active substance: 2-phenoxyethanol, product type: 2. ECHA/BPC/191/2018. Helsinki: European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/documents/10162/29c00050-2868-7e92-28a3-74eb022322c1>, abgerufen am 04 Sep 2023

- BPC (Biocidal Products Committee) (2018 c) Opinion on the application for approval of the active substance: 2-phenoxyethanol, product type: 4. ECHA/BPC/192/2018. Helsinki: European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/documents/10162/2d980290-ea99-72d0-00a3-77d30dfe394f>, abgerufen am 04 Sep 2023
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Hrsg (2023) MAK- und BAT-Werte-Liste 2023. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 59. Düsseldorf: German Medical Science. https://doi.org/10.34865/mbwl_2023_deu
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2023) 2-Phenoxyethanol (CAS Number 122-99-6). Substance infocard, last modification 3 Apr 2023. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.004.173>, abgerufen am 04 Sep 2023
- EU (Europäische Union) (2008) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl L (353): 1–1355
- EU (Europäische Union) (2009) Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel (Neufassung). ABl L (342): 59–209
- Fiege H, Voges H-W, Hamamoto T, Umemura S, Iwata T, Miki H, Fujita Y, Buysch H-J, Garbe D, Paulus W (2000) Phenol derivatives. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Band 26. Weinheim: Wiley-VCH. S. 521–582. https://doi.org/10.1002/14356007.a19_313
- Fromme H, Nitschke L, Boehmer S, Kiranoglu M, Göen T, HBMnet (2013) Exposure of German residents to ethylene and propylene glycol ethers in general and after cleaning scenarios. Chemosphere 90(11): 2714–2721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.051>
- Garlantézec R, Warembourg C, Monfort C, Labat L, Pulkkinen J, Bonvallot N, Multigner L, Chevrier C, Cordier S (2013) Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. Environ Health Perspect 121(10): 1167–1173. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206103>
- Göen T, Bader M, Müller G (2006) Alkoxycarbonsäuren im Urin als Metabolite von Glykolethern mit primärer Alkoholgruppe. In: Angerer J, Greim H, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 17. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi62545d0017>
- Greim H, Hrsg (1998) 2-Phenoxyethanol. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 26. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12299kskd0026>
- Hartwig A, MAK Commission (2017) 2-Phenoxyethanol. MAK Value Documentation in German language. MAK Collect Occup Health Saf 2(2): 836–877. <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12299kskd0063>
- Howes D (1988) Absorption and metabolism of 2-phenoxyethanol in rat and man. In: 15th IFSCC International Congress on Cosmetic Science. New York, NY: IFSCC. S. 415–434
- IFA (Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) (2023) Ethylenglykolmonophenylether. GESTIS-Stoffdatenbank. <https://gestis.dguv.de/data?name=020470>, abgerufen am 04 Sep 2023
- Jäger T, Eckert E, Leibold E, Bader M (2022) Reliable determination of the main metabolites of 2-phenoxyethanol in human blood and urine using LC-MS/MS analysis. Anal Methods 14(43): 4408–4417. <https://doi.org/10.1039/d2ay01407f>
- Labat L, Humbert L, Dehon B, Multigner L, Garlantézec R, Nisse C, Lhermitte M (2008) Dosage des métabolites urinaires des éthers de glycol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [Determination of urinary metabolites of glycol ethers by gas chromatography mass spectrometry]. Ann Toxicol Anal 20(4): 227–232. <https://doi.org/10.1051/ata/2009036>
- Multigner L, Ben Brik E, Arnaud I, Haguenoer JM, Jouannet P, Auger J, Eustache F (2007) Glycol ethers and semen quality: a cross-sectional study among male workers in the Paris Municipality. Occup Environ Med 64(7): 467–473. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.023952>
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2016) Opinion on phenoxyethanol. SCCS/1575/16. Luxembourg: European Commission. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_195.pdf, abgerufen am 16 Okt 2023
- Scognamiglio J, Jones L, Letizia CS, Api AM (2012) Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. Food Chem Toxicol 50 Suppl 2: S244–S255. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.030>
- Uhr H, Mielke B, Exner O, Payne KR, Hill E (2013) Biocides. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. S. 1–26. https://doi.org/10.1002/14356007.a16_563.pub2