

STUDIE

Upptag av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) vid brandövningar



Faktaruta

Upptag av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) vid brandövningar

2016-01-01 – 2016-12-31

FOI, Totalförsvarets forskningsinstitut, CBRN-skydd och säkerhet, 901 82 Umeå

Jenny Rattfelt Nyholm och Håkan Wingfors

I den här studien studerades förändringar av PAH deponerat på hud och metaboliter i urin hos 20 frivilliga elever före och efter en övning. I genomsnitt ökade mängden PAH på hud och halten hydroxypyren i urin åtta gånger i prover tagna efter övningen jämfört med prover tagna före från samma individ. Utifrån jämförelser med litteraturvärden på föreslagna riktvärden verkar exponeringen från en övning innebära en låg risk.

MSB:s kontaktpersoner:
Cecilia Hammar Wijkmark, 0771-240240

Foto: Håkan Wingfors, FOI

Publikationsnummer MSB1036 – November 2016
ISBN 978-91-7383-691-3

MSB har beställt och finansierat genomförandet av denna forskningsrapport (alt. studierapport).
Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll.

Innehållsförteckning

Innehållsförteckning	3
Sammanfattning	5
1. Introduktion	6
1.1 Bakgrund	6
1.2 Polycykliska aromatiska kolväten (PAH)	7
1.3 Syfte.....	7
2. Material och metod	8
2.1 Försökspersoner	8
2.2 Övning	8
2.3 Provtagning	8
2.4 Kemisk analys.....	8
2.5 Statistisk behandling.....	9
3. Resultat	10
3.1 Huddeposition	10
3.2 Urinmetaboliter	11
3.3 Korrelation huddeponering och urinmetaboliter	12
4. Diskussion och slutsatser	14
Referenser	16

Sammanfattning

De senaste tio åren har yrkesexponering för brandpartiklar uppmärksammats i Räddningstjänsten i Sverige bland annat genom projektet "Friska brandmän". På MSB:s övningsskolor genomförs utbildning av räddningstjänstpersonal genom en rad olika övningsscenarior där en del omfattar rökdykning. I den här studien genomfördes provtagning på hud och av urin för analys av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) respektive av deras metaboliter hos 20 frivilliga studerande före och efter en standardiserad rökdykningsövning. I genomsnitt ökade både mängden PAH på hud och deras metaboliter i urin med ca åtta gånger i prover tagna efter övningen jämfört med prover tagna före från samma individ. I jämförelse med studier där risker utretts för andra mer välstuderade yrkesgrupper med en uttalad PAH-exponering såsom asfaltsläggare, koksarbetare och sotare verkar exponeringen vid en övning i den här studien utgöra relativt låga värden. Tidigare råd och rekommendationer om att avlägsna kontaminerade larmställ, genomföra dusch och byta till rena kläder i direkt anslutning till avslutad övning bör dock fortsättningsvis tillämpas.

1. Introduktion

I en överenskommelse med MSB (dnr 2016-854) har en forskningsstudie genomförts där upptaget av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) under rökdykningsövningar har studerats hos deltagare genom mätning av huddeposition och utsöndring av urinmetaboliter.

1.1 Bakgrund

Brandmän är en yrkesgrupp som utsätts både för hård fysisk belastning och exponering för kemiska ämnen och partiklar i brandrök. De allra flesta brandmän drabbas inte av någon yrkesrelaterad sjukdom, men det finns några epidemiologiska studier som pekar på en överrepresentation för vissa cancerformer (Daniels *et al.* 2014, LeMasters *et al.* 2006, Ahn *et al.* 2012, Deemers *et al.* 2011). Orsakssambanden är inte utredda, men noterbart är att stödet för respiratoriska besvär och lungcancer är svagare (Crawford *et al.* 2012). En hypotes som många forskare lyfter är att exponering för brandpartiklar med associerade cancerframkallande ämnen såsom PAH:er kan vara involverad som en av huvudorsakerna.

Under senare år har också medvetenheten och kunskapen om arbetsmiljörisker kopplade till exponering av brandpartiklar ökat hos svenska brandmän, till stor del genom projektet "Friska brandmän" eller Skellefteåmodellen (Magnusson och Hultman, MSB743) som den ibland kallas.

Vid MSB:s övningsområden vid Sandö och Revinge utbildas räddningstjänstpersonal. Tidigare studier har visat att exponering för PAH kan ske vid brandövningar inom MSB:s utbildning, bland annat genom penetration av skyddskläder och deponering på hud (Wingfors *et al.* 2014, 2015). Studierna har även visat att det förekommer förhöjda nivåer av dessa ämnen i luft och på ytor i olika lokaler på Revinge och Sandö. Resultaten pekar dock på att exponeringen till största delen verkar ske via huden och inte via luftvägarna om nuvarande arbetsrutiner med friskluftsmask och andra andningsskydd följs. Ovanstående projekt och studier har resulterat i råd och rekommendationer som bygger på att kontaminerade larmställ ska tas av och att personal/studerande bör duscha så snabbt som möjligt efter övningar eller insatser.

Det finns idag relativt få publicerade undersökningar om brandmäns arbetsmiljöexponering för brandpartiklar och för att hitta jämförelsematerial är det intressant titta på mer välstuderade yrkesgrupper såsom sotare, asfalts-, koks- och aluminiumarbetare. Dessa har visats att ha en exponering av PAH:er som till stor del sker via hudexponering ($\geq 50\%$) (Bofetta *et al.* 1997, McClean *et al.* 2004, Jongeleelen 2001, 2014, Carstensen *et al.* 1999 etc.). När dessa yrkesgruppers exponering har studerats har man ofta valt att mäta utsöndring av PAH-metaboliter i urin, eftersom detta speglar den totala exponeringen för PAH via hud, inandning och eventuellt födointag. Den metabolit som är mest studerad är hydroxypyren, då dess modersubstans pyren ofta förekommer i PAH-blandningar i relativt hög halt och den är relativt lätt att mäta i urinprover. En nackdel med att välja metaboliten av pyren som är något lättare kan vara att den inte är den bästa representanten för just de tyngre PAH:er som har klassats som carcinogena, såsom benso[a]pyren. Följden har blivit att det ännu inte finns ett specifikt biologiskt gränsvärde i många länder såsom Sverige, utan enbart rekommenderade riktvärden att förhålla sig till (Jongeleelen 2001, 2014).

1.2 Polycykliska aromatiska kolväten (PAH)

Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) är ett namn på en grupp ämnen som består av två eller fler bensenringar. Lättare PAH-föreningar är mer flyktiga och förekommer främst i gasfas medan tyngre PAH är svårflyktiga och associerar lättare till partiklar i luften. Partiklarna kan i sin tur vara både luftburna och deponera på ytor, vilket gör att exponeringen kan ske på flera olika sätt. Exponering för PAH kan leda till förhöjd cancerrisk då vissa PAH har visat sig vara carcinogena.

1.3 Syfte

Syftet med den här forskningsstudien var att undersöka om PAH-ämnen tas upp i kroppen via huden under en rökdykningsövning genom att mäta utsöndring av hydroxypyren i urinprov från frivilliga försökspersoner före och efter en vanligt förekommande typ av rökdykningsövning. En underliggande frågeställning är att mäta ett brett spektrum av PAH som deponeras på hud för att korrelera mot urinmetaboliters utsöndring för att undersöka om detta kan vara en kompletterande och eventuellt smidigare metod för exponeringsanalys.

2. Material och metod

2.1 Försökspersoner

Tjugo av tjugosex tillfrågade studerande gav sitt informerade samtycke att delta i forskningsprojektet som godkänts av regionala etikprövningsnämnden i Umeå (dnr 2016/91-31). Inga rökare ingick bland de 20 frivilliga som även ombads att inte delta i andra brandövningar samt undvika rökt eller grillad mat under den föregående helgen. De studerande som eventuellt använde kosttillskottet kreatininmonohydrat ombads ta en paus med detta tillskott dagarna före försöket.

2.2 Övning

Examinationsövningen som genomfördes för fyra grupper (2-3 maj 2016) (enheter) syftar till att examinatorn ska utvärdera i princip samtliga steg i en utryckningsinsats för brandbekämpning. Varje enhet bestod av 6-7 studerande och delades i sin tur upp i en förstyrka (2 studerande/personer) och en huvudstyrka (ca 4-5 studerande/personer) som larmades till en brand i en tänkt källare. Hela övningen tog ca 3 h och själva insatsen på övningsplatsen ca 1 timme. Beroende på roll eller uppgift under insatsen kan tiden inne i ett rökfyllt objekt variera. En brandlärare från Revinge övervakade två av övningarna för att säkerställa att examinationsövningen inte synnerligen avvек från övningar på Revinge övningsområde. Detta för att säkerställa att resultaten var representativa för motsvarande övning vid MSBs båda verksamhetsställen.

2.3 Provtagning

Dagen inleddes med att hudavstrykningsprov togs före övningen. Avstrykningsprovet bestod av ett lätt fuktat glasfiberfilter ($\text{\O} = 47 \text{ mm}$) (0,5 ml ren aceton), som ströks på en yta av ca 30 cm² på ena sidan av nacken. Direkt efter övningen (i vagnhallen före dusch) togs ett nytt hudavstrykningsprov.

Tre urinprover (à 20 ml) lämnades från varje försöksperson. Det första lämnades före övningen (nollprov), det andra och det tredje provet lämnades efter 6 respektive 20 h efter avslutad övning. Urinproverna förvarades i kyl (+8 °C) och filter i frys (-18 °C) fram till analys.

2.4 Kemisk analys

Hudavstrykningsprover analyserades med avseende på PAH efter extraktion med diklormetan och rening och fraktionering på en silikakolonn. Den instrumentella analysen utfördes med gaskromatografi kopplad till masspektrometri (GC-MS). Urinprover (5 ml) analyserades efter provupparbetning och derivatisering med gaskromatografi kopplad till tandem-masspektrometri (GC-MS/MS) med avseende på hydroxylerade PAH (PAH-metaboliter). Analysresultaten normaliseras mot halten kreatinin som bestämdes med vätskekromatografi kopplad till masspektrometri. En utförlig beskrivning finns i bilaga 1.

2.5 Statistisk behandling

I huvudsak har Excel använts för att göra univariat statistik såsom Anova och parade t-tester och framställa diagram. Värden har 10-logaritmerats vid skeva distributioner.

3. Resultat

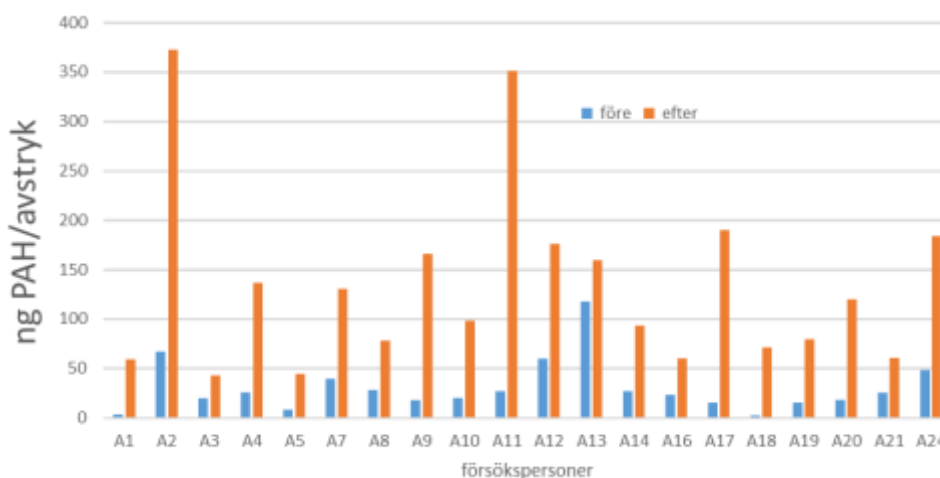
3.1 Huddeposition

Resultaten för huddeposition av PAH finns presenterat i enheten ng PAH/avstryk i tabell 1. Totalt analyserades 23 PAH:er med ångtryck från 10^{-3} - 10^{-8} atm och för att bättre representera ämnen bundna till partiklar ströks de mer flyktiga PAH:er som mestadels återfinns i gasfas. Summan av PAH baseras i uträkningarna på de 14 mindre flyktiga (\geq tre kondenserade bensenringar). Medelvärdet för gruppen var signifikant högre i proverna efter övningen än före (parat t-test, 2-sidigt, \log_{10}). Det var en relativt stor spridning i enskilda halter både före och efter övningen. I samma tabell har resultat från en tidigare undersökning vid en rökdykningsövning (Wingfors *et al.* 2015) lagts till som jämförelsevärden. Där gjordes också sex mätningar på en oexponerad kontrollgrupp som visade på låga halter. I den studien erhöles liknande huddepositionshalter på tolv elever både före och efter.

Tabell 1. Huddeposition uttryckt som ng PAH/ avstryk

Summa PAH ng/avstryk	Denna studie		Referens Wingfors et al 2015		
	Före övning n=20	Efter övning n=20	Före övning n=12	Efter övning n=12	Kontroll n=6
Median(min-max)	24 (2-117)	109 (42-373)	39 (23-113)	151 (72-159)	17 (11-21)
Geometriskt medelvärde	24	109	43	144	15
25-75 percentil	18-33	68-168	32-52	112-176	-

I figur 1 visas mängden PAH i hudavstrykningsproverna från försökspersonerna före och efter övning. I snitt var halten på huden åtta gånger högre efter övningen på individnivå.



Figur 1. Försökspersonernas hudavstryksmängder före och efter övning i enheten ng PAH/avstryk.

3.2 Urinmetaboliter

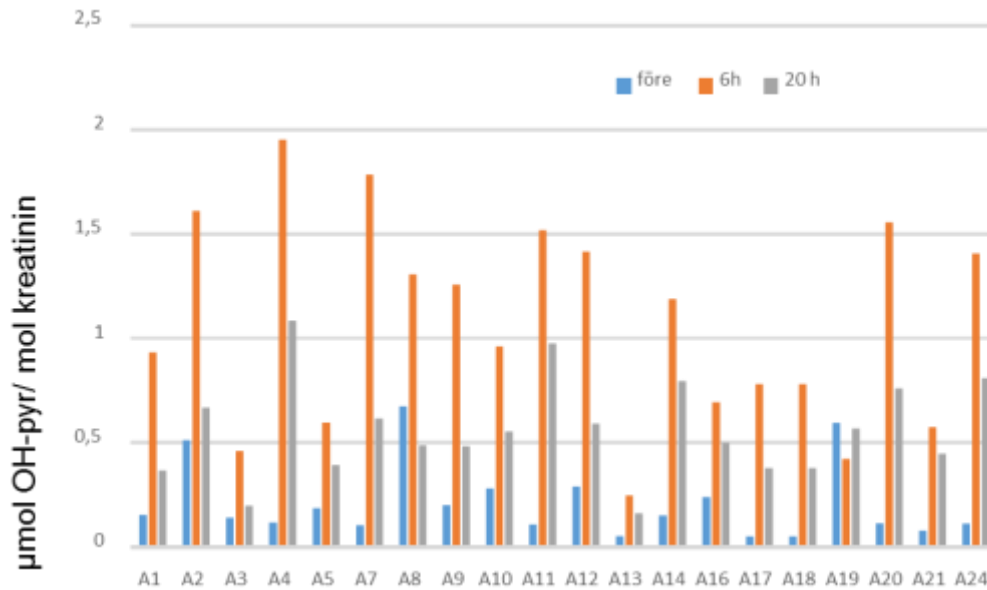
Resultaten för analys av hydroxypyren i urin finns presenterade i tabell 2. För att kompensera för varierande urinproduktion är koncentrationen av PAH-metaboliten, hydroxypyren, i tabell 2 normaliserad mot mängden utsöndrad kreatinin. De flesta referensvärden är dessutom presenterade i molkoncentrationer och för att underlätta en jämförelse är enheten omräknad till $\mu\text{mol OH-pyren/mol kreatinin}$.

Tabell 2. Koncentration av hydroxypyren i urin (uttryckt som $\mu\text{mol hydroxypyren/mol kreatinin}$)

$\mu\text{mol OH-pyren /mol kreatinin}$	Före övning n=20	Efter 6 h n=20	Efter 20 h n=20	Referens Al fabrik n=20	Larmställ 8h n=1
Median (min-max)	0,14 (0,05- 0,67)	1,1 (0,24- 1,9)	0,52 (0,16- 1,1)	2,4 (0,49- 5,7)	5,1
25-75 percentil	0,10-0,25	0,67-1,4	0,39-0,69	-	-

Mediankoncentrationen före övningen var 0,14 $\mu\text{mol hydroxypyren/mol kreatinin}$ och var jämförbar eller något lägre än referenskoncentrationer för icke-exponerade kontrollgrupper från litteraturen (Jongeneelen 2001, 2014). Detta tyder på att eventuell exponering från tidigare vecka eller annan bakgrundsexponering var liten eller försumbar. Urinproverna tagna 6 h efter övningens avslutande visade på signifikant högre genomsnittskoncentration på 1,1 $\mu\text{mol/mol}$ ($p < 0,005$, 2-sidigt parat t-test, \log_{10}). Mediannivån vid 20 h, 0,52 $\mu\text{mol/mol}$, var lägre än efter 6 h men har dock inte gått ner till bakgrundsnivån ($p < 0,005$, 2-sidigt parat t-test, \log_{10}). Som jämförelse kan ett referensvärde på 2,4 $\mu\text{mol/mol}$ från yrkesexponerade svenska aluminiumarbetare ses i tabellen (Carstensen *et al.* 1999), där proverna tagits i slutet av en arbetsvecka. Ytterligare ett jämförelsevärde på 5,1 $\mu\text{mol/mol}$ kan ses i tabellen, vilket uppmätts i ett urinprov från en försöksperson som burit ett kontaminerat larmställ (lärarställ) under en arbetsdag (provet togs i samband med studien presenterad i Wingfors *et al.* 2015 och analyserades tillsammans med urinprover från den här studien).

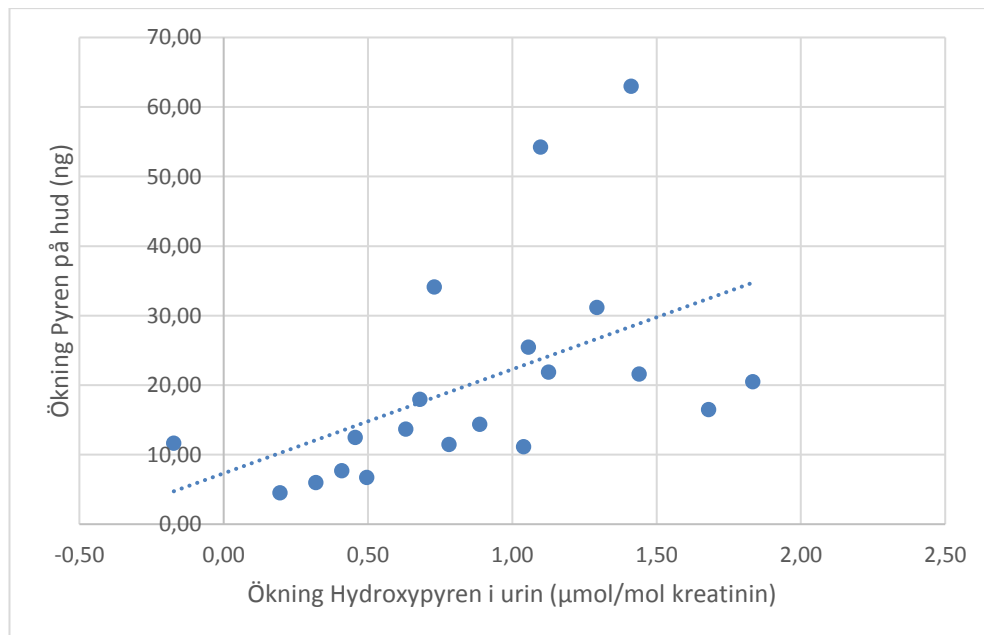
I figur 2 är koncentrationerna presenterade för alla försökspersoner i ett stapeldiagram och där ses att metaboliten generellt också är lägre vid 20 h provtagningen än vid 6 h-provtagningen. I genomsnitt ökade koncentrationen av hydroxypyren åtta gånger efter 6 h jämfört med före övningen. Av de andra urinmetaboliterna som mättes: 1-OH-naftalen, 2-OH-naftalen, 1-OH-acenaften, 1-OH-fluoren, 2-OH-fluoren och 9-OH-fenantren, ökade de i genomsnitt ca fyra gånger.



Figur 2. Koncentrationen av hydroxypyren i $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin före övning, efter 6 h och efter 20 h hos försökspersonerna.

3.3 Korrelation huddeponering och urinmetaboliter

För att undersöka om det fanns en korrelation mellan den mängd PAH som deponerat på hud under övningen och den mängd som utsöndrats som urinmetaboliter gjordes ett spridningsdiagram och en korrelationskoefficient räknades ut. I figur 3 är korrelationslinjen utritad som en streckad linje och koefficienten (Pearson) har ett värde på 0,50, vilket tyder på en positiv korrelation om än relativt svag.



Figur 3. Spridningsdiagram där ökningen av pyren på hud har plottats mot ökningen av hydroxypyren i urin efter 6 h.

Tolkningen av detta kan vara att det också kan finnas andra faktorer som påverkar exponeringen såsom exponering från kontaminerade larmställ, olika roller vid övningen, eller annan sekundärexponering. Alternativt kan avvikelser från linjen förklaras av att det finns faktorer som påverkar utsöndringen, som till exempel skillnader i hudpenetration och metabolism.

4. Diskussion och slutsatser

I den här undersökningen framgår det tydligt att PAH-ämnen deponerar på hud vid en standardiserad rökdykningsövning. PAH tas upp i kroppen och kan spåras med en ökad utsöndring av deras metaboliter i urin. I genomsnitt genererade en övning en ökning med åtta gånger både avseende PAH i huddepositionsprover och utsöndrad hydroxypyren i urin på individnivå.

Det var överlag en relativt stor spridning i resultaten mellan olika försökspersoner. Detta beror troligen på att exponeringen skiljer sig mellan de olika roller och uppgifter eleverna hade under övningen. Vidare finns det inga uppgifter om graden av kontamination på larmställ före övningen, vilket skulle kunna ge ett extra bidrag i exponering. Analysdata från bärandet av larmställ under en arbetsdag indikerar att detta kan vara ett betydande bidrag i exponering. Risken för exponering via inandning bedöms däremot som liten eftersom fordon placerades uppvinds brandobjektet och andningsmasker användes föredömligt av de som deltog i övningen. I valet av provtagningsmetod, hud eller urinprover, pekar resultaten på att det kan finnas behov av båda beroende på exponeringsscenario.

I inledningen nämndes att det att det finns relativt få studier av brandmäns exponering för brandpartiklar och därmed en brist på värden att jämföra dessa resultat med. I en studie som är relativt lik den här, gjord på brandlärare i Finland (Laitinen *et al.* 2012), observerades att koncentrationen av hydroxypyren ökade 3,6 gånger 6 h efter en dag med tre rökdykningsövningar. I den studien togs dock inte hudavstrykningsprover. I en annan studie från USA (Fernando *et al.* 2016) som inkluderade 28 brandmän kunde till exempel inte hydroxypyren detekteras i majoriteten av proverna efter 24 h. Istället fann man en statistiskt signifikant ökning för lättare hydroxy-PAH:er och vissa metoxyfenoler framför allt i urinprov för de brandmän som gjorde personsök och räddning gentemot de som släckte. Mängden PAH på hud ökade i genomsnitt fyra gånger efter övningen jämfört med prover tagna före, vilket tyder på en hudexponering liknande data analyserat i den här studien. Man fann även här en stor mellanindividvariation i resultaten. I en tredje studie (Fent *et al.* 2014) fann man enbart ökade halter av hydroxypyren i en av två genomförda övningar hos 15 brandmän. I Finland har en biologisk aktionsgräns¹ för hydroxypyren satts till 1,4 µmol/mol kreatinin. Laitinen *et al.* (2012) argumenterar att beroende på komplex sammansättning av PAH i brandrök kan dock den här aktionsgränsen variera mellan 0,68–6,0 µmol/mol kreatinin för brandlärare. Ett större arbete kring framtagande av riktvärden för hydroxypyren har gjorts i Holland (Jongeleen 2001, 2014) och där har 1 µmol/mol satts som det första riktvärdet där inga genotoxiska effekter har kunnat påvisas och 1,9 µmol/mol som det andra, vilket är den lägsta nivå där genotoxiska effekter har kunnat påvisas.

Oavsett begränsningar och olika synvinklar avseende tillämpbarhet av dessa gränsvärden verkar en standardövning involverande brandrök (het övning) under MSBs utbildningar ge en exponering strax under eller i det nedre intervallet av dessa riktvärden. Vid flera övningar samma dag och

¹ Aktionsgränsen innebär oftast att uppföljning av exponering ska ske till dess att upprepade mätvärden under aktionsgränsen erhålls.

vecka kan däremot inte hälsorisker uteslutas. De råd som tidigare har lämnats gällande att undvika bärandet av kontaminerade larmställ och att genomföra dusch i direkt anslutning till övning bör även fortsättningsvis tillämpas.

Referenser

1. Ahn Y-S, Jeong Y-S, Kim K-S. 2012. Cancer morbidity of professional emergency responders in Korea. *Am J Ind Med.* 55:768-778.
2. Arbetsmiljöverkets författningssamling AFS 2007:07
3. Bofetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control* 8:444-472.
4. Carstensen U, Yang K, Levin J.O, Östman C, Nilsson T, Hemminki K, Hagmar L. 1999. Genotoxic exposures of potroom workers. *Scand J Work Environ Health* 25:24-32.
5. Crawford JO, Graveling RA. 2012. Non-cancer occupational health risks in firefighters. *Occ Med* 62:485.
6. Daniels R.D., Kubale T.L., Yiin J. H., Dahm M .M., Hales T. R., BarisD, Zahm S. H., Beaumont J. J., Waters K.M., Pinkerton L.E. 2014 Mortality and cancer incidence in a pooled cohort of US firefighters from San Fransisco, Chicago and Philadelphia (1050-2009). *Occup Environ Med* 71:388-397.
7. Demers P, Martinsen JI, Weiderpass E, Kjaerheim K, Lynge E, Sørensen P, Pukkala E. 2011. Cancer incidence among Nordic firefighters. *Occ Env Med* 68:A19-20.
8. Fent KW, Eisenberg J, Snawder J., Sammons D., Pleil JD, Stiegel MA., Mueller C., Horn GP, Dalton J. 2014. Systemic Exposure to PAHs and Benzene in firefighters suppressing controlled structure fires. *Ann Occup Hyg* 58:830-845.
9. Fernando S, Shaw L, Shaw D, Gallea M, VandenEnden L, House R, Verma DK., Britz-McKibbin P, McCarry BE. 2016. Evaluation of firefighter exposure to wood smoke during training exercises at burn houses. *Env Sci&Technol* 50:1535-1543.
10. Jongeneelen FJ. 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 45:3-13
11. Jongeneelen FJ. 2014. A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett* 231:239-241.
12. LeMasters GK, Genaidy AM, Succop P, Deddens J, Sobeih T, Barriera-Viruet H, Dunning K, Lockey J. 2006. Cancer risk among firefighters: a review and meta-analysis of 32 studies. *J Occ Env Med* 48:1189.
13. Laitinen J, Makela M, Mikkola M, Mikkola J, Hutto I. 2012. Firefighters multiple exposure assessment in practice. *Toxicol Lett* 213:129– 133
14. Magnusson S, Hultman D. 2014. Friska brandmän-Skellefteåmodellen förbättrar arbetsmiljön. MSB 743. www.msb.se
15. McClean MD, Rinehart RD, Ngo L, Eisen EA, Kelsey KT, Herrick RF. Inhalation and dermal exposure among asphalt paving workers. *Ann Occup Hyg* 2004;48:663-671.
16. Wingfors H, Tengel T, Arnoldsson K, Magnusson R. 2015. Studie-Utredning av sekundärexponering av brandpartiklar och PAH vid brandmannautbildning. FOI-R-4178-SE.

17. Wingfors H, Söderström R, Magnusson R. 2014. Kartläggning av arbetsmiljörisker vid heta övningar-
övningsfälten Sandö och Revinge: mättrapport. FOI Memo
5116.

Bilaga 1: Kemisk analys

Hudavstryksprover

Hudavstrykningsprov (filter) spikades med internstandard (Naphtalen-d8, Acenaphthene-d10, Fenantren-d10, Krysen-d12, Perylen-d12) och extraherades i ultraljudsbad med 5 ml diklormetan. Extraktet fördes över till en ren vial och extraktionen av filtret upprepades två gånger. De kombinerade extrakten indunstades under ett flöde av kvävgas till 0,5 ml varpå 1 ml hexan tillsattes och indunstningen fortsatte till 0,2 ml återstod. Extrakten renades på en silikakolonn (10 % deaktiverad) där en PAH-fraktion erhöles, vilken dunstades in i toluen till en slutvolym av 50 µl. Dessa fraktioner analyserades med GC-MS med selektiva jonspår (SIM) enligt tidigare protokoll.

Urinprover

Urin (5 ml) fördes över till ett centrifugrör (15 ml) och spikades med 20 µl internstandard (¹³C₆-1-hydroxypyren, 100 ng/ml i acetonitril). 2 ml acetatbuffert (0,5 M, pH 5) och 20 µl β-glucuronidase (type H-2 from Helix pomatia; activity 10⁵ U/ml) tillsattes och provet inkuberades vid 37 °C över natt. Provet extraherades med hexan (5 ml). Natriumsulfat (1 g) tillsattes och rören centrifugerades vid 3000 rpm i 10 minuter för att underlätta fassparation. Hexanextraktet fördes över till en ren vial och extraktionen upprepades. De kombinerade extrakten indunstades under ett flöde av kvävgas till torrhet. Återstoden av extraktet löstes upp i 50 µl acetonitril och derivatiserades med 50 µl BSTFA.

De derivatiserade extrakten analyserades med GC-EI-MS/MS (Thermo Scientific).

Injektionsvolym: 1 µl, Injektionstemperatur: 260 °C, GC-temperaturprogram: 60 °C/min (1 min), 10 °C/min till 315°C/min(4 min), Transfer line: 280 °C.

