

# **Entwicklung von validierten Analysemethoden zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Lebensmittelchemiker Lutz Elflein  
geboren am 28. Dezember 1972 in München

**2003**

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von August 2000 bis Oktober 2003 am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Gerold Wünsch

Korreferent: Prof. Dr. Karsten Levsen

Tag der Promotion: 14. Januar 2004

## **Kurzzusammenfassung**

Für die Bekämpfung von Schädlingen und Lästlingen in Innenräumen stehen dem gewerblichen und privaten Anwender eine Vielzahl an Mitteln und Präparaten zur Verfügung. Die darin als Wirkstoffe am häufigsten eingesetzten Insektizide und Akarizide gehören zu den Stoffklassen der Pyrethroide, Organophosphate und Carbamate. Untersuchungen haben gezeigt, dass die im Innenraum ausgebrachten Insektizide und Akarizide auch über längere Zeiträume, z.T. über Jahre, in den behandelten Räumen in der Luft, im Schwebstaub, im Hausstaub und auf Oberflächen (z.B. Möbel) nachzuweisen sind. Zur Beurteilung einer möglichen gesundheitlichen Belastung ist es notwendig, dass analytische Methoden zur Verfügung stehen, mit denen die insektiziden und akariziden Wirkstoffe in den Innenraummatrices bzw. deren Metabolite in den Körperflüssigkeiten exponierter Personen hinreichend gut bestimmt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue standardisierte Analyseverfahren zur simultanen Bestimmung häufig verwendeter Wirkstoffe (vor allem Pyrethroide, Organophosphate, Carbamate) in Raumluft und Hausstaub mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) entwickelt und validiert, mit deren Hilfe eine Abschätzung der äußeren Belastung exponierter Personen möglich ist (Innenraummonitoring). Zusätzlich wurde ein kommerziell erhältlicher Immunoassay (ELISA) für die Bestimmung von Typ II Pyrethroiden in Raumluft- und Hausstaubproben eingesetzt und es wurden die Vor- und Nachteile gegenüber den entwickelten GC-MS Methoden herausgearbeitet. Des Weiteren wurde eine neue, sehr empfindliche Methode zur Bestimmung von Chrysanthemumdicarbonsäure in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und negativer chemischer Ionisation entwickelt und validiert. Es handelt sich hierbei um einen Metaboliten der Pyrethrine (insektizide Bestandteile des natürlichen Pyrethrums) sowie bestimmter Kurzzeitpyrethroide (Allethrin, Phenothrin, Resmethrin und Tetramethrin), welcher als Biomarker für eine Exposition gegenüber diesen Wirkstoffen dienen kann. Schließlich wurde mittels Untersuchung von Realproben (Luft-, Hausstaub- und Urinproben) die Praxistauglichkeit der neu entwickelten Methoden aufgezeigt.

**Schlagwörter:** Innenraummonitoring, Biomonitoring, Insektizide

## **Abstract**

A large variety of pest control products for indoor use is available on the market both for consumers and professionals. Most of the insecticides and acaricides used as active ingredients in such products are pyrethroids, organophosphates and carbamates. Studies have shown that some of these active ingredients may persist in the indoor environment (e. g. in the air, house dust, or on furniture surfaces) over a long period of time, some of them even for years after application. Therefore, it is necessary that suitable analytical methods are available for the determination of insecticides/acaricides and their metabolites in indoor matrices and body fluids, respectively, in order to assess external and internal burden which may affect the health of exposed humans. New standardized analytical methods for a simultaneous determination of the most common active ingredients (mainly pyrethroids, organophosphates, carbamates) in indoor air and house dust by high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were developed and validated in the course of this work. Thereby, indoor monitoring can be performed in order to assess the external burden of exposed persons. Additionally, a commercially available immunoassay (ELISA) was used for the determination of type II pyrethroids in indoor air and house dust samples, and the advantages and disadvantages compared to the newly developed GC-MS methods were evaluated. Furthermore, a new and highly sensitive method for the determination of chrysanthemumdicarboxylic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization was developed and validated. This substance is a mammalian metabolite of pyrethrins (occurring in natural pyrethrum) and certain pyrethroids with short-term insecticidal knock-down and kill effect (allethrin, phenothrin, resmethrin, tetramethrin), which can be used as a biomarker indicating the exposure of human beings to these active ingredients. Finally, the practical applicability of the newly developed and validated analytical methods was demonstrated by analyses of real life samples from air, house dust and urine containing the investigated analytes.

**Key words:** indoor monitoring, biomonitoring, insecticides

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XIV
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	XVIII
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <u>Allgemeine Einführung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 <u>Pestizide (Insektizide, Akarizide) und deren Bedeutung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 <u>Innenraummonitoring</u></b>	<b>4</b>
<b>1.1.3 <u>Biomonitoring</u></b>	<b>7</b>
<b>1.2 <u>Untersuchte Wirkstoffklassen: Auswahl, Chemie und Toxikologie</u></b>	<b>8</b>
<b>1.2.1 <u>Pyrethroide</u></b>	<b>10</b>
<b>1.2.2 <u>Organophosphate (OP)</u></b>	<b>16</b>
<b>1.2.3 <u>Carbamate</u></b>	<b>21</b>
<b>1.2.4 <u>Sonstige Wirkstoffe</u></b>	<b>23</b>
<b>1.3 <u>Metabolismus von Pyrethrinen und Pyrethroiden</u></b>	<b>27</b>
<b>1.3.1 <u>Allgemeines</u></b>	<b>28</b>
<b>1.3.2 <u>Der Metabolit E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA)</u></b>	<b>31</b>
<b>1.4 <u>Literaturübersicht zur Analytik der Pestizide in Luft, Hausstaub und biologischen Matrices</u></b>	<b>32</b>
<b>1.4.1 <u>Luft</u></b>	<b>32</b>
<b>1.4.2 <u>Hausstaub</u></b>	<b>34</b>
<b>1.4.3 <u>Biologische Matrices</u></b>	<b>35</b>
<b>1.5 <u>Zielsetzung der Arbeit</u></b>	<b>37</b>

<b>2 GRUNDLAGEN DER PROBENAHEME, PROBENVORBEREITUNG UND INSTRUMENTELLEN BESTIMMUNG</b>	<b>39</b>
<b>2.1 <u>Probenahme</u></b>	<b>39</b>
<b>2.1.1 <u>Luftprobenahme in Innenräumen</u></b>	<b>39</b>
<b>2.1.2 <u>Hausstaubprobenahme</u></b>	<b>41</b>
<b>2.1.3 <u>Urinproben</u></b>	<b>43</b>
<b>2.2 <u>Probenvorbereitung</u></b>	<b>44</b>
<b>2.2.1 <u>Extraktion</u></b>	<b>44</b>
<b>2.2.2 <u>Extraktaufreinigung mittels Festphasenextraktion</u></b>	<b>46</b>
<b>2.3 <u>Derivatisierung</u></b>	<b>48</b>
<b>2.3.1 <u>Allgemeines</u></b>	<b>48</b>
<b>2.3.2 <u>Veresterung von Carbonsäuren mittels Carbodiimid-Kupplung</u></b>	<b>49</b>
<b>2.4 <u>Chromatographie</u></b>	<b>51</b>
<b>2.4.1 <u>Allgemeines</u></b>	<b>51</b>
<b>2.4.2 <u>Chromatographische Leistungsparameter</u></b>	<b>51</b>
<b>2.4.3 <u>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</u></b>	<b>54</b>
<b>2.4.4 <u>Kapillargaschromatographie (Kapillar-GC)</u></b>	<b>56</b>
<b>2.5 <u>Detektion</u></b>	<b>58</b>
<b>2.5.1 <u>UV- und Diodenarray-Detektor</u></b>	<b>58</b>
<b>2.5.2 <u>Quadrupol-Massenspektrometrie (Elektronenstoß- und chemische Ionisation)</u></b>	<b>58</b>
<b>2.6 <u>Immunologische Bestimmungsmethoden (ELISA)</u></b>	<b>62</b>
<b>2.7 <u>Strukturaufklärung mit Kernresonanzspektroskopie</u></b>	<b>63</b>
<b>2.7.1 <u>Allgemeines</u></b>	<b>63</b>
<b>2.7.2 <u>NMR: hilfreiche Technik zur Herstellung eines Vergleichsstandards</u></b>	<b>65</b>
<b>2.8 <u>Validierung von Analyseverfahren</u></b>	<b>66</b>

2.8.1	<u>Allgemeines</u>	66
2.8.2	<u>Validierungsparameter (Definitionen)</u>	66
3	EXPERIMENTELLER TEIL	68
3.1	<u>Chemikalien und Geräte (für alle Methoden)</u>	68
3.1.1	<u>Chemikalien und Reagenzien</u>	68
3.1.2	<u>Analytisches Gerät und sonstige Materialien</u>	69
3.2	<u>Methoden</u>	70
3.2.1	<u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in der Raumluft mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)</u>	70
3.2.1.1	Arbeitsvorschrift	70
3.2.1.2	Anmerkungen und Erläuterungen	74
3.2.2	<u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)</u>	75
3.2.2.1	Arbeitsvorschrift	76
3.2.2.2	Anmerkungen und Erläuterungen	79
3.2.3	<u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Diodenarraydetektion (HPLC-DAD)</u>	79
3.2.3.1	Arbeitsvorschrift	79
3.2.3.2	Anmerkungen und Erläuterungen	81
3.2.3.3	Alternative HPLC-Methode mit Calixaren-Trennsäulen	81
3.2.4	<u>Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA</u>	82
3.2.4.1	Arbeitsvorschrift	82
3.2.5	<u>Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA) in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektro- metrie (GC-MS) und negativer chemischer Ionisation (NCI)</u>	84
3.2.5.1	Arbeitsvorschrift	85
3.2.5.2	Anmerkungen und Erläuterungen	89

3.2.5.3	<i>Fraktionierung des Synthesegemisches von E-cis/trans-CDCA mittels HPLC-DAD zur Identifizierung der Isomere mittels <sup>1</sup>H-NMR</i>	89
3.2.5.4	<i>Fraktionierung des Synthesegemisches von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> bzw. PDAA(HFIP)<sub>2</sub> mittels HPLC-DAD zur Identifizierung und Quantifizierung der Isomere mittels <sup>1</sup>H-NMR und Herstellung der E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>- und PDAA(HFIP)<sub>2</sub>-Vergleichsstandards</i>	90
3.2.5.5	<i>Synthese von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> zur Herstellung von GC-Vergleichsstandards (für die Bestimmung der Derivatisierungsausbeute)</i>	91
3.2.5.6	<i>Identifizierung und Quantifizierung der CDCA-Isomere im Syntheseprodukt sowie der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Isomere und des PDAA(HFIP)<sub>2</sub> in den Extrakten der HPLC-Fraktionierung</i>	91
3.3	<b><u>Realproben</u></b>	93
3.3.1	<b><u>Realproben Raumluf</u></b>	93
3.3.2	<b><u>Realproben Hausstaub</u></b>	94
3.3.3	<b><u>Realproben Chrysanthemumdicarbonsäure</u></b>	94
4	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	95
4.1	<b><u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Raumluf</u></b> <b><u>Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)</u></b>	95
4.1.1	<b><u>Chromatographische Trennung</u></b>	95
4.1.2	<b><u>Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) der untersuchten Wirkstoffe</u></b>	97
4.1.3	<b><u>Arbeitsbereich, Linearität und Reproduzierbarkeit der Messungen</u></b>	108
4.1.4	<b><u>Wiederfindungsstudien</u></b>	119
4.1.4.1	<b><u>Wiederfindungen auf Glasfaserfiltern (GFF)</u></b>	119
4.1.4.2	<b><u>Wiederfindungen auf Polyurethanschäumen (PUF's)</u></b>	122
4.1.4.3	<b><u>Wiederfindungen auf der Kombination von Glasfaserfilter und zwei Polyurethanschäumen</u></b>	125



4.1.5	<b><u>Verwendung von internen Standards</u></b>	130
4.1.6	<b><u>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</u></b>	135
4.1.7	<b><u>Robustheit und Spezifität der Methode</u></b>	136
4.1.8	<b><u>Realproben</u></b>	137
4.1.9	<b><u>Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in der Luft</u></b>	142
4.2	<b><u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub</u></b>	144
4.2.1	<b><u>Vorversuche zur säulenchromatographischen Aufreinigung des Hausstaubextraktes</u></b>	144
4.2.2	<b><u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels GC-MS</u></b>	146
4.2.2.1	<b>Chromatographische Trennung</b>	146
4.2.2.2	<b>Elektronenstoßionisations-Massenspektren der untersuchten Wirkstoffe</b>	146
4.2.2.3	<b>Arbeitsbereich und Linearität</b>	146
4.2.2.4	<b>Wiederfindungen bei Aufreinigung mit Kieselgel-SPE-Kartuschen</b>	148
4.2.2.5	<b>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</b>	153
4.2.2.6	<b>Robustheit und Spezifität der Methode</b>	154
4.2.2.7	<b>Realprobe</b>	156
4.2.3	<b><u>Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels HPLC-DAD</u></b>	157
4.2.3.1	<b>Chromatographische Trennung und Leistungsparameter</b>	157
4.2.3.2	<b>HPLC-DAD Spektren der untersuchten Wirkstoffe</b>	159
4.2.3.3	<b>Arbeitsbereich und Linearität</b>	164
4.2.3.4	<b>Wiederfindungen bei Aufreinigung mit Kieselgel-SPE-Kartuschen</b>	165
4.2.3.5	<b>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</b>	175
4.2.3.6	<b>Robustheit und Spezifität der Methode</b>	176
4.2.3.7	<b>HPLC-Methode mit Calixaren-Trennsäulen</b>	176

4.2.4	<u>Alternative Extraktion in der Soxhlet-Apparatur</u>	179
4.2.5	<u>Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub</u>	179
4.3	<u>Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA</u>	181
4.3.1	<u>Messung von Pyrethroiden in Luftprobenextrakten</u>	181
4.3.2	<u>Messung von Pyrethroiden in Hausstaubprobenextrakten</u>	182
4.3.3	<u>Zusammenfassung</u>	183
4.4	<u>Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA) in Urin mittels GC-MS und negativer chemischer Ionisation (NCI)</u>	185
4.4.1	<u>Synthese von E-cis/trans-CDCA</u>	185
4.4.2	<u>HPLC-Fraktionierung des Synthesegemisches der freien Säuren</u>	185
4.4.3	<u>HPLC-Fraktionierung des Synthesegemisches der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Ester</u>	186
4.4.4	<u>Identifizierung und Quantifizierung von E-cis/trans-CDCA bzw. deren HFIP-Ester sowie des HFIP-Esters von PDAA (interner Standard)</u>	189
4.4.5	<u>Messung mit GC-MS (NCI)</u>	190
4.4.6	<u>Arbeitsbereich und Linearität</u>	193
4.4.7	<u>Ermittlung der Wiederfindungsraten in der Festphasenextraktion (SPE)</u>	196
4.4.8	<u>Derivatisierungsausbeute (Grad der Umsetzung)</u>	201
4.4.9	<u>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</u>	204
4.4.10	<u>Robustheit und Spezifität der Methode</u>	208
4.4.11	<u>Realproben</u>	210
4.4.12	<u>Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von E-cis/trans- CDCA in Urin</u>	212
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	214

<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>218</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>240</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>241</b>
<b>Danksagung</b>	<b>243</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Strukturformeln der untersuchten Pyrethroide.	11
<b>Abb. 2:</b>	Strukturformeln der untersuchten Organophosphate.	18
<b>Abb. 3:</b>	Wirkschema von Organophosphaten (OP) auf die Signalübertragung am synaptischen Spalt zwischen Nervenzellen.	19
<b>Abb. 4:</b>	Physostigmin und das Carbamat-Insektizid Propoxur.	22
<b>Abb. 5:</b>	Strukturformeln von Chlordecon, Lindan, Diflubenzuron und Piperonylbutoxid.	24
<b>Abb. 6:</b>	Postulierter Mechanismus der irreversiblen Hemmung des Cytochrom-P450 Enzyms durch den Synergisten Piperonylbutoxid.	27
<b>Abb. 7:</b>	Hauptwege der Metabolisierung von Pyrethrinen und Allethrin in Ratten.	29
<b>Abb. 8:</b>	Hauptwege der Metabolisierung von Tetramethrin, Resmethrin und Phenothrin in der Ratte.	30
<b>Abb. 9:</b>	Strukturformeln von E-cis- und E-trans-Chrysanthemumdicarbonsäure.	32
<b>Abb. 10:</b>	Probenahmekopf zur Sammlung gasförmiger und partikelgetragener Substanzen in der Innenraumluft.	41
<b>Abb. 11:</b>	Derivatisierung von Chrysanthemumdicarbonsäure mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol und N,N'-Diisopropylcarbo-diimid.	50
<b>Abb. 12:</b>	Erläuterung der chromatographischen Kenngrößen anhand eines Musterchromatogramms.	52
<b>Abb. 13:</b>	Struktur von Calixarenen.	55
<b>Abb. 14:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml).	95
<b>Abb. 15a-v:</b>	EI-MS-Spektren der untersuchten Wirkstoffe.	97-107
<b>Abb. 16a-v:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Lineare Kalibriergeraden der untersuchten Wirkstoffe (externe Kalibrierung mit reinen Standardlösungen).	110-115

<b>Abb. 16a'-v':</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Kalibriergeraden der untersuchten Wirkstoffe (externe Kalibrierung in der Matrix: GFF + 10 m <sup>3</sup> Luft).	110-115
<b>Abb. 17:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml, in der Matrix GFF + 10 m <sup>3</sup> Luft).	115
<b>Abb. 18a-v:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Kalibriergeraden der untersuchten Wirkstoffe (externe Kalibrierung in der Matrix PUF + 10 m <sup>3</sup> Luft).	116-118
<b>Abb. 19:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml, in der Matrix PUF + 10 m <sup>3</sup> Luft).	119
<b>Abb. 20:</b>	EI-MS Spektrum von Permethrin-phenoxy- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> .	131
<b>Abb. 21:</b>	EI-MS Spektrum von Bifenthrin.	131
<b>Abb. 22:</b>	EI-MS Spektrum von Chlorpyrifos-diethyl-d10.	134
<b>Abb. 23:</b>	Interne Kalibrierung von Fenthion mit Chlorpyrifos-diethyl-d10 als internen Standard.	134
<b>Abb. 24:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des GFF-Extraktes.	139
<b>Abb. 25:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF1-Extraktes.	139
<b>Abb. 26:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF2-Extraktes.	140
<b>Abb. 27:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 2. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des GFF-Extraktes.	140

<b>Abb. 28:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 2. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF1-Extraktes.	141
<b>Abb. 29a-p:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. Externe Kalibrierfunktionen der untersuchten Wirkstoffe (Kalibrierung in der Matrix).	146-148
<b>Abb. 30:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).	151
<b>Abb. 31:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A eines unbelasteten Hausstaubes.	152
<b>Abb. 32:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).	152
<b>Abb. 33:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat B eines unbelasteten Hausstaubes.	153
<b>Abb. 34:</b>	Kontrollkarte für die Messung von dotierten Hausstäuben (10 µg/g, Eluat A) sowie der Kontrollstandards (1 µg/ml, mit Matrix von Eluat A einer Leerwertprobe).	154
<b>Abb. 35:</b>	Kontrollkarte für die Messung von dotierten Hausstäuben (10 µg/g, Eluat B) sowie der Kontrollstandards (1 µg/ml, mit Matrix von Eluat B einer Leerwertprobe).	155
<b>Abb. 36:</b>	Wiederfindungen der Wirkstoffe in dotierten Hausstaubproben in Prozent der Sollkonzentration, ermittelt aus den Rohdaten von Abb. 34.	155
<b>Abb. 37:</b>	Wiederfindungen der Wirkstoffe in dotierten Hausstaubproben in Prozent der Sollkonzentration, ermittelt aus den Rohdaten von Abb. 35.	156
<b>Abb. 38:</b>	GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A einer Realprobe, Fraktion ≤ 63 µm.	157
<b>Abb. 39:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm des Multistandards (10 µg/ml).	158

<b>Abb. 40a-r:</b>	UV-Spektren (200-400 nm) der untersuchten Wirkstoffe.	160-164
<b>Abb. 41:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Standards (1 µg/ml).	167
<b>Abb. 42:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Reagenzienleerwertes.	167
<b>Abb. 43:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Standards (1 µg/ml).	168
<b>Abb. 44:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Reagenzienleerwertes.	168
<b>Abb. 45:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).	171
<b>Abb. 46:</b>	zu Abb. 45. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Hausstaub-Leerwertes.	171
<b>Abb. 47:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (100 µg/g).	172
<b>Abb. 48:</b>	zu Abb. 47. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Hausstaub-Leerwertes.	172
<b>Abb. 49:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).	173
<b>Abb. 50:</b>	zu Abb. 49. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Hausstaub-Leerwertes.	173

<b>Abb. 51:</b>	HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (100 µg/g).	174
<b>Abb. 52:</b>	zu Abb. 51. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Hausstaub-Leerwertes.	174
<b>Abb. 53:</b>	HPLC-DAD Methode mit Calixaren-Trennsäulen. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm einer Standardlösung (10 µg/ml); Säule: Caltrex Science.	177
<b>Abb. 54:</b>	HPLC-DAD Methode mit Calixaren-Trennsäulen. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm einer Standardlösung (10 µg/ml); Säule: Caltrex B I.	178
<b>Abb. 55:</b>	Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA; Kalibrierfunktion für Cyfluthrin.	182
<b>Abb. 56:</b>	HPLC-UV (260 nm) Chromatogramm des Synthesegemisches der freien Säuren (E-trans-CDCA, E-cis-CDCA, Z-trans-CDCA und unbekannte Konstitutionsisomere).	186
<b>Abb. 57:</b>	HPLC-UV (260 nm) Chromatogramm des Synthesegemisches der HFIP-Ester (E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , Z-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , HFIP-Ester eines der unbekanntenen Konstitutionsisomere).	187
<b>Abb. 58:</b>	Stabilität von PDAA(HFIP) <sub>2</sub> in Methanol.	188
<b>Abb. 59:</b>	Stabilität von CDCA(HFIP) <sub>2</sub> in Methanol.	188
<b>Abb. 60:</b>	TIC(SIM)-Chromatogramm der GC-MS(NCI) Trennung des derivatisierten Synthesegemisches (E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , Z-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> , unbekannte Konstitutionsisomere).	191
<b>Abb. 61:</b>	NCI-Massenspektrum von CDCA(HFIP) <sub>2</sub> .	192
<b>Abb. 62:</b>	NCI-Massenspektrum von PDAA(HFIP) <sub>2</sub> .	193
<b>Abb. 63:</b>	Kalibrierfunktionen von E-cis- CDCA(HFIP) <sub>2</sub> und E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> in n-Hexan.	194
<b>Abb. 64:</b>	Interne Kalibrierung von E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> mit PDAA(HFIP) <sub>2</sub> als internem Standard. Kalibrierung in der Matrix (Pool-Urin). Drei Messungen pro Level.	195



<b>Abb. 65:</b>	Interne Kalibrierung von E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> mit PDAA(HFIP) <sub>2</sub> als internem Standard. Kalibrierung in der Matrix (Pool-Urin). Drei Messungen pro Level.	195
<b>Abb. 66a:</b>	TIC-Chromatogramm von leerwertfreiem Pool-Urin, dotiert mit je 1 µg/l E-cis/trans-CDCA und PDAA.	200
<b>Abb. 66b:</b>	Extrahierte Ionenchromatogramme von leerwertfreiem Pool-Urin, dotiert mit je 1 µg/l E-cis/trans-CDCA und PDAA.	201
<b>Abb. 67:</b>	Abhängigkeit des Messsignals von E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> und E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> vom molaren Überschuss der Derivatisierungsreagenzien HFIP und DIC.	202
<b>Abb. 68:</b>	Abhängigkeit des Messsignals von E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> und E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> von der Reaktionszeit bei konstantem Molverhältnis.	202
<b>Abb. 69:</b>	zu Tabelle 34: graphische Darstellung der Kalibrierfunktion von E-trans-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin.	205
<b>Abb. 70:</b>	zu Tabelle 35: graphische Darstellung der Kalibrierfunktion von E-cis-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin.	206
<b>Abb. 71:</b>	Schwankungen der Messwerte (Normierung auf Sollkonzentration) bei externer Kalibrierung; Konzentration der Analyten (E-trans-CDCA, E-cis-CDCA, PDAA) in der Urinprobe: 25 µg/l.	208
<b>Abb. 72:</b>	Schwankungen der Messwerte (Normierung auf Sollkonzentration) bei interner Kalibrierung; Konzentration der Analyten (E-trans-CDCA; E-cis-CDCA) in der Urinprobe: 25 µg/l.	209
<b>Abb. 73a:</b>	TIC-Chromatogramm der Urinprobe von Person A (24 h Urin) nach Exposition mit d-Allethrin.	210
<b>Abb. 73b:</b>	Extrahierte Ionenchromatogramme der Urinprobe von Person A (24 h Urin) nach Exposition mit d-Allethrin.	211

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Theoretische Stereoisomerenzahl, Isomerenzahl im technischen Produkt, optische Konfiguration an den chiralen Zentren und biologisch aktivstes Isomer der Pyrethroide.	13
<b>Tabelle 2:</b>	Dampfdrücke und Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Pyrethroide.	13
<b>Tabelle 3:</b>	LD <sub>50</sub> - und LC <sub>50</sub> -Werte der untersuchten Pyrethroide. Testorganismus Ratte.	14
<b>Tabelle 4:</b>	LD <sub>50</sub> - und LC <sub>50</sub> -Werte der untersuchten Organophosphate. Testorganismus Ratte.	18
<b>Tabelle 5:</b>	Dampfdrücke und Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Organophosphate.	18
<b>Tabelle 6:</b>	Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) der linearen Kalibriergeraden, erstellt mit reinen Standardlösungen, und Reproduzierbarkeit der Messung einer Standardlösung der Konzentration 1 µg/ml: (a) Standard in Ethylacetat, (b) Standard mit Matrix GFF + 10 m <sup>3</sup> Luft, (c) Standard mit Matrix PUF + 10 m <sup>3</sup> Luft.	109
<b>Tabelle 7:</b>	Mittlere Wiederfindungen und relative Standardabweichungen in Prozent auf dotierten Glasfaserfiltern (1 µg absolut), ermittelt durch Quantifizierung mit reinen Standardlösungen. Berechnung mit einer Kalibrierung vor der Serie bzw. nach der Serie, sowie Differenz der Wiederfindungen.	120
<b>Tabelle 8:</b>	Mittlere Wiederfindungen und relative Standardabweichungen in Prozent auf dotierten Glasfaserfiltern (1 µg absolut), ohne und mit 10 m <sup>3</sup> Luftdurchsatz; berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix.	121
<b>Tabelle 9:</b>	Mittlere Wiederfindungen und relative Standardabweichungen in Prozent auf dotierten PUF's (1 µg absolut), ohne Luftdurchsatz und mit 10 m <sup>3</sup> Luftdurchsatz; berechnet mit einer Kalibrierung mit reinen Standardlösungen.	123
<b>Tabelle 10:</b>	Mittlere Wiederfindungen und relative Standardabweichungen in Prozent auf dotierten PUF's (1 µg absolut), ohne Luftdurchsatz und mit 10 m <sup>3</sup> Luftdurchsatz; berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix.	124
<b>Tabelle 11:</b>	Mittlere Wiederfindungen in Prozent auf GFF, PUF1 und PUF2 in der Probenahmeinheit nach Luftdurchsatz von 10 m <sup>3</sup> . Dotierungen: 1 µg absolut (d.h. 0,1 µg/m <sup>3</sup> ) und 0,1 µg absolut (d.h. 0,01 µg/m <sup>3</sup> ); berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix.	125/6

<b>Tabelle 12:</b>	Wiederfindungen in Prozent auf dotierten GFF/PUF/PUF-Kombinationen (Dotierung: 1 µg absolut) mit unterschiedlichem Luftdurchsatz.	128
<b>Tabelle 13:</b>	Wiederfindungen in µg/m <sup>3</sup> auf GFF bzw. GFF/PUF/PUF- und PUF/PUF/GFF-Kombinationen nach Aerosolbringung, sowie prozentuale Verteilung der Wirkstoffe auf die Sammelmedien.	129
<b>Tabelle 14:</b>	Messung von matrixbelasteten Proben (PUF + 10 m <sup>3</sup> Luft). Wiederfindungen der Sollwertkonzentration der Sytemteststandards in Prozent: externe Kalibrierung mit reinen Standardlösungen und interne Kalibrierung über Bifenthrin mit reinen Standardlösungen.	132
<b>Tabelle 15:</b>	Sprayversuch im Innenraum. Konzentrationen in µg/m <sup>3</sup> auf GFF/PUF/PUF-Kombinationen; berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; prozentuale Verteilung des Wirkstoffes auf den Sammelmedien.	138
<b>Tabelle 16:</b>	Ermittlung der Elutionsfenster und der Wiederfindung der Wirkstoffe in Prozent aus einer Standardlösung nach Elution der Kieselgelkartusche mit n-Hexan, sowie Eluat A und Eluat B in Fraktionen zu je 2 ml.	145
<b>Tabelle 17:</b>	Wiederfindungen in Prozent (± relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Standardlösungen auf Kieselgelkartuschen; Beladung der Kartusche: 10 µg je Wirkstoff (Level 1) und 1 µg je Wirkstoff (Level 2). Messung mit GC-MS.	149
<b>Tabelle 18:</b>	Wiederfindungen in Prozent (± relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Extrakten dotierter Hausstäube auf Kieselgelkartuschen; Level 1: 100 µg/g; Level 2: 10 µg/g; Level 3: 1 µg/g. Messung mit GC-MS.	150
<b>Tabelle 19:</b>	Chromatographische Leistungsparameter und Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode, sowie relative Standardabweichung der Retentionszeiten und der Peakflächen bei wiederholter Injektion einer Standardlösung.	159
<b>Tabelle 20:</b>	Daten der linearen HPLC-Kalibrierfunktionen $F = A_1 \times C + A_0$ mit der Steigung $A_1$ , dem Achsenabschnitt $A_0$ und dem Korrelationskoeffizienten $r^2$ ; Kalibrierkonzentrationen: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 µg/ml.	165
<b>Tabelle 21:</b>	Wiederfindungen in Prozent (± relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Standardlösungen auf Kieselgelkartuschen; Beladung der Kartusche: 10 µg je Wirkstoff (Level 1) und 1 µg je Wirkstoff (Level 2). Messung mit HPLC-DAD.	166

<b>Tabelle 22:</b>	Wiederfindungen in Prozent ( $\pm$ relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Extrakten dotierter Hausstäube auf Kieselgelkartuschen; Level 1: 100 $\mu\text{g/g}$ ; Level 2: 10 $\mu\text{g/g}$ . Messung mit HPLC-DAD.	169
<b>Tabelle 23:</b>	Instrumentelle Nachweisgrenzen der HPLC-Methode.	175
<b>Tabelle 24:</b>	Nachweisgrenzen der HPLC-Methode fur die Hausstaubeluat A und B.	175
<b>Tabelle 25:</b>	Pyrethroidkonzentrationen in dotierten Luftprobenextrakten. Messung mit ELISA und GC-MS.	181
<b>Tabelle 26:</b>	Pyrethroidkonzentrationen in dotierten Hausstaubprobenextrakten. Messung mit ELISA und GC-MS.	182
<b>Tabelle 27:</b>	$^1\text{H-NMR}$ Daten von E-cis/trans-CDCA bzw. E-cis/trans-CDCA(HFIP) $_2$ in DMSO-d $_6$ bzw. Cyclohexan-d $_{12}$ .	189
<b>Tabelle 28:</b>	Prozentuale Gehalte von E-cis/trans-CDCA im Synthesegemisch, bestimmt mit NMR.	190
<b>Tabelle 29:</b>	Konzentrationen der HFIP Ester in den Cyclohexan-d $_{12}$ Extrakten der HPLC-Fraktionen, bestimmt mit NMR.	190
<b>Tabelle 30:</b>	Daten der externen und internen Kalibrierfunktionen fur E-cis/trans-CDCA(HFIP) $_2$ und PDAA(HFIP) $_2$ (0,1 bis 2 $\mu\text{g/l}$ Urin).	194
<b>Tabelle 31:</b>	Wiederfindungen von E-cis/trans-CDCA und PDAA im Urin (Dotierung 25 $\mu\text{g/l}$ ) mit externer und interner Kalibrierung.	198
<b>Tabelle 32:</b>	Wiederfindungen von E-cis/trans-CDCA und PDAA im Urin (Dotierung 1 $\mu\text{g/l}$ ) mit externer und interner Kalibrierung.	200
<b>Tabelle 33:</b>	Derivatisierungsausbeuten fur die HFIP-Ester von E-cis/trans-CDCA und PDAA und relative Standardabweichungen auf den beiden Dotierungsniveaus (1 & 25 $\mu\text{g/l}$ ), bestimmt durch Standardaddition.	203
<b>Tabelle 34:</b>	Daten der Kalibrierfunktion von E-trans-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin nach DIN 32645.	204
<b>Tabelle 35:</b>	Daten der Kalibrierfunktion von E-cis-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin nach DIN 32645.	206

<b>Tabelle 36:</b>	Robustheit der GC-MS(NCI) Methode, ermittelt durch wiederholte Messung einer dotierten Urinprobe (25 bzw. 0,8 µg/l): gefundene Konzentrationen ausgedrückt in Prozent der Sollkonzentration ( $\pm$ relative Standardabweichungen) und absolute Schwankungen der Einzelwerte.	208
<b>Tabelle 37:</b>	Konzentrationen von E-trans-CDCA in Urinproben (24 h Urin) von vier Personen nach Exposition mit d-Allethrin.	210

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

∅	Durchmesser
$\alpha$	Relative Retention, Trennfaktor
3-PBA	3-Phenoxybenzoesäure
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AGLMB	Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Medizinalbeamten/innen der Länder
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ASTM	American Society for Testing and Materials
AUH	Ausschuss für Umwelthygiene
BAT	Biologischer Arbeitsplatz-Toleranzwert
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CDCA	Chrysanthemumdicarbonsäure
CI	Chemische Ionisation
Cl <sub>2</sub> CA	cis/trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure
DAD	Diodenarraydetektion (UV 190-400 nm)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIH	N,N'-Diisopropylharnstoff
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	European Commission, Europäische Kommission
ECD	Elektroneneinfang (engl.: capture) -Detektor
EHC	Environmental Health Criteria (WHO)
EI	Elektronenstoßionisation
EKA	Expositionsäquivalente für krebserregende Arbeitsstoffe
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EN	Europäische Norm
EPA	Environmental Protection Agency, Umweltschutzbehörde (USA)
ESI	Elektrospray Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
FT-NMR	Fourier-Transformations-Kernresonanzspektroskopie
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFF	Glasfaserfilter
GLP	Gute Laborpraxis
HBM	Kommission Human-Biomonitoring (Umweltbundesamt)
HF	High Frequency, Hochfrequenz
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektion
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry, Hochauflösende Massenspektrometrie
ID	Innendurchmesser
IRK	Innenraumlufthygiene-Kommission (Umweltbundesamt)
ISO	International Standardization Organisation (Genf)
k'	Kapazitätsfaktor
k.A.	Keine Angabe
LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LD <sub>50</sub> /LC <sub>50</sub>	Letale (tödliche) Dosis bzw. Konzentration, bei der 50 % der einer Wirkung ausgesetzten Individuen zu Tode kommen
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LO(A)EL	Lowest Observed (Adverse) Effect Level
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MIP	Molecularly Imprinted Polymer, molekular geprägtes Polymer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSD	Massenspektrometrischer Detektor
MS	Massenspektrometrie
MS <sup>n</sup>	Mehrdimensionale Massenspektrometrie z.B. Tandemmassen-

spektrometrie ( $MS^2$ ) oder Massenspektrometrie mit Ionenfallen, bei der Tochterionen des Analytmoleküls weiter fragmentiert werden können ( $MS^{2-12}$ )

m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis eines Ions
N	Normalität, z.B. 1N (normale) Salzsäure (= 1 Mol/l)
NCI	Negative Chemische Ionisation
NIST	National Institute of Standards and Technology (USA)
NP	Normalphase
NPD	Stickstoff- und Phosphor-sensitiver Detektor
OP	Organophosphate
PBO	Piperonylbutoxid
PCI	Positive chemische Ionisation
PCP	Pentachlorphenol
PDAA	para-Phenylendiessigsäure (engl. : para-Phenylendiacetic Acid)
PE	Polyethylen
POP	Persistent Organic Pollutants, persistente organische Umweltkontaminanten
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PU(F)	Polyurethane (Foam), Polyurethan (-schaum)
R	Auflösung (engl.: Resolution) zweier Peaks
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SAA	Standardarbeitsanweisung
SCAN	MS-Datenerfassung von Ionen eines m/z-Bereiches (50-550)
SFE	Supercritical Fluid Extraction, Extraktion mit überkritischen Fluiden
SIM	Selected Ion Monitoring, MS-Datenerfassung weniger ausgewählter und substanzspezifischer Ionen
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
SPMD	Solid Phase Matrix Dispersion, Festphasen-Matrix-Dispersion
SPME	Solid Phase Micro-Extraction, Festphasenmikroextraktion
T	Asymmetriefaktor, Tailingfaktor eines Peaks
TEPP	Tetraethylpyrophosphat
TIC	Total Ion Current, Totalionenstrom



TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (Time Of Flight MS)
$t_R$	Retentionszeit eines Peaks
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
TRK	Technische Richtkonzentrationen
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
UV	Ultraviolett
VDI	Verband Deutscher Ingenieure
(V)VOC	(Very) Volatile Organic Compounds

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Allgemeine Einführung

### 1.1.1 Pestizide (Insektizide, Akarizide) und deren Bedeutung

Der Oberbegriff **Pestizide** (von *pestis (lat.)*: Seuche, Unheil und -zid von *caedere (lat.)*: töten, vernichten) ist die allgemeine Bezeichnung für Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel (PBSM). Pestizide werden üblicherweise nach ihrer Wirkungsweise bzw. nach den Zielobjekten, für deren Behandlung oder Bekämpfung sie bestimmt sind, eingeteilt. Man unterscheidet im Wesentlichen folgende Gruppen von Pestiziden (Frehse und Thier, 1986):

- **Herbizide** (gegen Unkräuter und -gräser, *herba (lat.)*: Kraut, Gras)
- **Insektizide** (gegen Schadinsekten bzw. deren Larven und Eier)
- **Fungizide** (gegen Pilze, *fungus (lat.)*: Pilz)

als die wichtigsten Vertreter, sowie

- Akarizide (gegen Milben, *akari (griech.)*: Milbe, ein Spinnentier)
- Nematizide (gegen Nematoden, auch Fadenwürmer genannt)
- Molluskizide (gegen Mollusken bzw. Schnecken im engeren Sinne)
- Rodentizide (gegen Nagetiere, *rodere (lat.)*: nagen, insbes. Mäuse und Ratten)
- Algizide (gegen Algen)
- Avizide (gegen Schadvögel, z.B. Tauben)

Die in dieser Arbeit untersuchten Insektizide, von denen einige auch als Akarizide Verwendung finden, werden nach ihrer Wirkart in Atem-, Kontakt- und Fraßgifte unterschieden, wobei eine eindeutige Abgrenzung oft nicht möglich ist und viele Insektizide sowohl als Kontakt- als auch Fraßgift wirken können. Sogenannte systemisch wirkende Insektizide werden von Pflanzen über die Blätter oder die Wurzeln aufgenommen und gelangen über das Gefäßsystem der Pflanze zum Wirkort (Abtötung von Schädlingen in und auf der Pflanze).

Des weiteren gibt es noch den Begriff **Biozide** (frei übersetzt "Lebens-töter"), unter dem sich die Insektizide ebenfalls einordnen lassen. Unter Bioziden versteht man Wirkstoffe, die dazu dienen, auf chemischem und biologischem Wege Schadorganismen abzuschrecken, unschädlich zu machen oder zu vernichten und damit Schädigungen von Lebensmitteln,

Bedarfsgegenständen, Baumaterialien (z.B. Holz) und anderen Produkten zu verhindern sowie die Hygiene in Gebäuden zu gewährleisten. Zu den Biozidprodukten zählen Desinfektionsmittel, Schutzmittel (z.B. Holzschutzmittel), Schädlingsbekämpfungsmittel (z.B. Insektizide, Akarizide), und sonstige Produkte wie Antifoulingmittel (z.B. Organozinnverbindungen).

Während es im agrarischen Bereich schon sehr lange rechtliche Regelungen für die Zulassung und Verwendung von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln gibt und genaue Grenzwertregelungen getroffen wurden (Pflanzenschutzmittelgesetz, Rückstandshöchstmengenverordnung), gab es für Biozidprodukte bis vor kurzem kaum rechtliche Regelungen und Richtlinien (gewerbliche Anwendung: Chemikaliengesetz, Gefahrstoffverordnung, TRGS 523: Schädlingsbekämpfung). Im Rahmen der amtlichen Schädlingsbekämpfung dürfen in Deutschland nach §18 Infektionsschutzgesetz (früher §10c Bundesseuchengesetz) nur Mittel eingesetzt werden, die vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL, früher Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, BgVV) und Umweltbundesamt geprüft und in der Liste der geprüften und anerkannten Mittel und Verfahren zur Bekämpfung von tierischen Schädlingen amtlich bekannt gemacht wurden. Ferner werden (Tier-) Arzneimittel zur Parasitenbekämpfung nach dem Arzneimittelgesetz geregelt. Rechtliche Vorschriften für das Inverkehrbringen von Biozidprodukten mit anderer Anwendungsbestimmung (z.B. Insektensprays für den privaten Gebrauch im Haushalt), wurden erstmals mit der EU-Richtlinie 98/8/EG ("Biozidrichtlinie") vom 16.02.1998 getroffen (in Abgrenzung zu Pflanzenschutz- und Tierarzneimitteln). Damit wurde das Vorsorgeprinzip für Gesundheit und Umwelt auch für Biozidprodukte eingeführt. Die Biozidrichtlinie wurde mit dem Biozidgesetz (Zulassung, Kennzeichnung, Werbung) und der Biozidverordnung (Einstufung, Kennzeichnung, Verpackung) in nationales Recht umgesetzt, welche am 28.6.2002 bzw. 9.7.2002 in Kraft getreten sind. Allerdings gilt eine 10-jährige Übergangsfrist für Produkte, die bereits vor dem 14.5.2000 im Handel waren.

Das weltweite Handelsvolumen von Pestiziden betrug 1999 knapp 30 Mrd. US Dollar. An erster Stelle standen die USA (30 %), gefolgt von Westeuropa (25 %), Lateinamerika (15 %), dem asiatisch-pazifischem Raum (13 %), Japan (9 %) und Osteuropa (3 %). Betrachtet man den Anteil der Wirkstoffklassen am Handelsvolumen, so machen die Herbizide mit rund 49 % den größten Anteil aus, gefolgt von den Insektiziden (27 %) und den Fungiziden (20 %). Der meistproduzierte und verkaufte Wirkstoff war 1999 das Herbizid Glyphosat (Roundup), auf Platz zwei und drei folgten die Insektizide Imidacloprid und Chlorpyrifos. Die größten Wachstumsmärkte sind China, Indien und Südkorea, während in den westlichen Industrieländern die Umsätze stagnieren oder rückläufig sind und Reduktionen im Pestizideinsatz angestrebt werden (Knowles, 2001). In Westeuropa sind die Länder mit dem größten Umsatz an Pestizidprodukten Frankreich (28 %), Deutschland (18 %), Italien (13 %), Spanien (11 %) und Großbritannien (10 %). In Deutschland wurden 2002 nach Angaben des Industrieverbandes Agrar (70 % des deutschen Marktes) etwa 87000 Tonnen Pestizide produziert (24 % Herbizide, 45 % Fungizide, 12 % Insektizide) und knapp 27000 Tonnen abgesetzt, davon 45 % Herbizide, 36 % Fungizide und 2 % Insektizide (IVA, 2003). Der Insektizidbedarf ist in Deutschland (wie auch in anderen Ländern mit gemäßigttem Klima) naturgemäß geringer als in tropischen Ländern.

Aus den genannten Zahlen geht die enorme wirtschaftliche Bedeutung der Pestizide hervor, die zum weitaus größten Teil im Agrarbereich zur Vermeidung von Ernteaussfällen bzw. Steigerung der Produktionserträge eingesetzt werden.

Sehr gering ist dagegen der Anteil von Insektiziden, die von privaten Anwendern oder professionellen Schädlingsbekämpfern für die Bekämpfung von Schädlingen und Lästlingen im Innenraumbereich verwendet werden (z.B. als Sprays, Spritzmittel, Elektroverdampfer-Plättchen und Schabenfallen). In Deutschland wurden im Jahr 2002 etwa 69 Tonnen an Pestiziden (0,08 % der produzierten Gesamtmenge) für den häuslichen Gebrauch abgesetzt, davon waren 78 % Schädlingsbekämpfungsmittel, 10 % Ameisenmittel, 6 % Ratten- und Mäusemittel und 6 % Pflanzenschutzmittel (IVA, 2003). Dennoch darf die

Bedeutung dieses Sektors nicht unterschätzt werden, z.B. in der Vermeidung von Vorratsschäden bei Lebensmitteln oder der Verhinderung der Übertragung von Krankheitserregern durch Vektororganismen wie Schaben oder Stechmücken. Außerdem können Insektizide in privaten Räumen als Holzschutzmittel (baurechtlich vorgeschrieben bei tragenden und aussteifenden Teilen, z.B. Dachstühle, Deckenbalken; DIN 68800 und Bauverordnungen der Länder) oder aufgrund der Motten- und Käferschutzausrüstung in Textilien und Wollteppichen vorkommen. Ein weiteres Anwendungsgebiet sind Mittel gegen Läuse und Milben (Kopfhairbefall beim Menschen, Krätze) oder gegen Ektoparasiten bei (Haus-)Tieren. Zu den Innenraumanwendungen zählt ebenfalls die Desinsektion von Flugzeugen mit Insektiziden (siehe Def. Innenraum im nächsten Kapitel), die von einigen Ländern (Australien, Indien, Kuba, Marokko, Ägypten, Seychellen, Jamaika, Mexiko, u.a.) verlangt wird, um die Einschleppung von Schädlingen und Krankheiten (Malaria, Denguefieber) zu verhindern. Dies geschieht teilweise vor der Landung in Anwesenheit von Passagieren und Crew (WHO, 2000; BgVV, 2002a). Insbesondere bei Anwendungen von Insektiziden (und Akariziden) in geschlossenen Räumen stellt sich die Frage nach der gesundheitlichen Belastung von Personen, die sich während und nach der Anwendung von Schädlingsbekämpfungsmitteln in den behandelten Räumen aufhalten. Zur Klärung dieser Frage sind umfangreiche Untersuchungen durch Innenraum- und Biomonitoring notwendig.

### **1.1.2 Innenraummonitoring**

Der in diesem Zusammenhang verwendete Begriff "Innenraum" ist folgendermaßen definiert:

Innenräume sind Wohnungen mit Wohn-, Schlaf-, Bastel-, Sport- und Kellerräumen, Küchen und Badezimmern; Arbeitsräume in Gebäuden, die in Hinblick auf gefährliche Stoffe (u.a. Luftschadstoffe) nicht dem Geltungsbereich der Gefahrstoffverordnung unterliegen (z.B. Büroräume, teilw. Verkaufsräume); öffentliche Gebäude (Bereiche in Krankenhäusern, Schulen, Kindergärten, Sporthallen, Bibliotheken, Gaststätten, Theatern,

Kinos und anderen öffentlichen Veranstaltungsräumen) sowie die Kabinen von Kraftfahrzeugen und öffentlichen Verkehrsmitteln (SRU, 1988)

Das Innenraummonitoring ist Teil des "Umweltmonitoring", also der systematischen qualitativen und quantitativen Erfassung von (Schad-) Stoffen in der Umgebung des Menschen (z.B. Wasser, Boden, Luft, Lebensmittel, Bedarfsgegenstände) mit analytischen Methoden. Speziell in Innenräumen werden dazu die Matrices Luft, Hausstaub, Oberflächen und Materialien (z.B. Möbel) untersucht, wobei in der Luft (Schad-)Stoffe gasförmig oder partikelgetragen, d.h. an Schwebstaub gebunden, vorliegen können. Der Mensch ist in Gebäuden oft einer Vielzahl von gesundheitsrelevanten Stoffen ausgesetzt, wie z.B. flüchtigen organischen Verbindungen (Volatile Organic Compounds = VOC's) aus Ausdünstungen von Teppichen und Teppichklebern, sonstigen Bodenbelägen, Duftstoffen, Haushalts- und Heimwerkerchemikalien, Formaldehyd (Möbel), Asbestfasern, Schimmelpilzen, sowie bioziden Wirkstoffen aus Schädlingsbekämpfungsmitteln, Holzschutzmitteln, Baumaterial, Ausstattungs- und Bedarfsgegenständen (Pluschke, 1996).

Ziel des Innenraummonitorings ist es, Kenntnisse über das Vorkommen und die Konzentration der genannten Stoffe in Gebäuden zu gewinnen, um somit Abschätzungen von Gesundheitsgefährdungen oder möglichen Ursachen beobachteter Erkrankungen ("Sick Building Syndrom (SBS)", "Multiple Chemical Sensitivity (MCS)") vornehmen zu können.

Im gewerblichen Bereich wurde in Deutschland zur Beurteilung von Schadstoffkonzentrationen in der Luft der sogenannte MAK-Wert (maximale Arbeitsplatzkonzentration) eingeführt. Dies ist die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft am Arbeitsplatz, die nach gegenwärtigem Stand der Kenntnis auch bei wiederholter und langfristiger, i.d.R. achtstündiger Exposition (40 Std. Woche) im Allgemeinen die Gesundheit nicht beeinträchtigt und diese nicht unangemessen belästigt (DFG, 2002). Für krebserzeugende oder erbgutverändernde Stoffe werden keine MAK-Werte definiert ("Null-Toleranz"), stattdessen gelten die sogenannten TRK-Werte (technische Richtwertkonzentrationen). Das sind Konzentrationen von Stoffen in der Luft am Arbeitsplatz, die nach dem gegenwärtigen Stand der

Technik erreicht werden können. Für einige Pestizide wurden MAK-Werte festgelegt, z.B. Diazinon ( $0,1 \text{ mg/m}^3$ ), Dichlorvos ( $1 \text{ mg/m}^3$ ), Fenthion ( $0,2 \text{ mg/m}^3$ ), Lindan ( $0,1 \text{ mg/m}^3$ ), Malathion ( $15 \text{ mg/m}^3$ ), Propoxur ( $2 \text{ mg/m}^3$ ) und Pyrethrum ( $5 \text{ mg/m}^3$ ). Eine Übersicht der "Luftgrenzwerte" am Arbeitsplatz gibt die TRGS 900.

Für den nichtgewerblichen Bereich sind diese Grenzwerte aufgrund der o.g. Definition nicht anwendbar. Zudem hält sich der moderne hochindustrialisierte Mensch deutlich länger, bis zu 91 % des Tages (63 % Zuhause, 28 % Büro) in Innenräumen auf (Spengler, 2001). Da es praktisch keine Richt- bzw. Grenzwertregelungen für Pestizide in Innenräumen gibt (Ausnahme: Richtlinie für PCP und Lindan,  $1 \mu\text{g/m}^3$ ), ist die Bewertung der festgestellten Innenraumkonzentrationen schwierig. Falls ein Grenzwert für den Arbeitsplatz vorliegt, wurde als Faustregel für eine erste Näherung ein Richtwert in Höhe von  $1/40$  des berufsbezogenen Grenzwertes vorgeschlagen (Nielsen et al., 1997). Außerdem wurde von der Ad-hoc-Arbeitsgruppe der Innenraumlufthygiene-Kommission (IRK) des Umweltbundesamtes und des Ausschusses für Umwelthygiene (AUH) der Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Medizinalbeamtinnen und Medizinalbeamten der Länder (AGLMB) ein Basisschema zur Ableitung von Richtwerten für die Innenraumluft entwickelt, mit dessen Hilfe für derzeit 10 Stoffe bzw. Stoffgruppen Richtwerte auf der Grundlage von LO(A)EL (Lowest Observed (Adverse) Effect Level) -Werten unter Berücksichtigung verschiedener Sicherheitsfaktoren festgelegt wurden (Ad-hoc AG, 1996; Sagunski, 1996; Witten et al., 1997; Ad-hoc AG, 1997; Englert, 1997; Englert, 1998; Sagunski, 1998; Link, 1999; Seifert, 1999; Wolf und Stirn, 2000; Sagunski und Roskamp, 2002). Zusätzlich werden Werte aus Vergleichsuntersuchungen und epidemiologischen Feldstudien herangezogen, in denen typische Pestizidkonzentrationen in Raumluft, Hausstaub und Materialien von Haushalten mit und ohne Pestizidanwendung bestimmt wurden (Pluschke, 1996; Schenk et al., 1997; Salthammer, 1999; Walker et al., 1999; Butte et al. 2001; BMBF, 2001). Hieraus lassen sich Orientierungswerte für den Grad der Schadstoffbelastung ableiten. Als Referenzwerte (Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung) für an Hausstaub gebundene Schadstoffe

(Fraktion < 63 µm) werden z.B. für Chlorpyriphos 0,5 mg/kg, Propoxur 0,1 mg/kg und Piperonylbutoxid 5 mg/kg angegeben. Diese Referenzwerte ergeben sich als 95 % Perzentil von Stichprobenuntersuchungen, bei deren Überschreiten von einer über die Hintergrundbelastung hinausgehenden Kontamination ausgegangen werden kann (Walker et al., 1999; HBM, 1996a).

Für toxikologische Betrachtungen werden die ADI- (Acceptable Daily Intake) und DTA- (Duldbare Tägliche Aufnahme) Werte herangezogen, die die Maximalmenge eines Stoffes (in mg/kg Körpergewicht pro Tag) angeben, die der Verbraucher lebenslang durch orale Aufnahme von Lebensmitteln zu sich nehmen kann, ohne gesundheitliche Schäden zu befürchten. Die ADI- und DTA-Werte werden aus den im Tierversuch ermittelten NO(A)EL-Werten (No Observed (Adverse) Effect Level bei oraler Verabreichung) unter Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren abgeleitet. Obwohl eine orale Aufnahme von Pestiziden in Innenräumen kaum vorkommt (denkbar: 20-200 mg Hausstaub bei krabbelnden Kleinkindern, die die Hände und Spielzeug in den Mund nehmen), können diese Werte zur Ableitung von Richtwerten für die inhalative Aufnahme (Luft, Schwebstaub) mittels Rechenmodellen (60 kg Körpergewicht, 20 m<sup>3</sup> Atemvolumen pro Tag, 100 % Resorption, zusätzliche Sicherheitsfaktoren) herangezogen werden, sofern keine Erkenntnisse aus tierexperimentellen Inhalationsstudien vorliegen.

Zusammenfassend stellt das Innenraummonitoring also ein wichtiges Instrument der Gefahrenerkennung und -abwehr, also des vorbeugenden Gesundheitsschutzes dar.

### **1.1.3 Biomonitoring**

Da es, wie im vorigen Abschnitt geschildert, schwierig ist, aus den Umweltmessdaten auf die daraus resultierende individuelle innere Belastung des (menschlichen) Organismus zu schließen, bedient man sich des Biomonitorings.

Der Begriff "Biomonitoring" wird in zwei Unterbegriffe unterteilt: Belastungs- und Effektmonitoring. Wenn im weiteren Verlauf der Arbeit von



"Biomonitoring" gesprochen wird, so ist das Belastungsmonitoring gemeint, worunter man die systematische, einmalige oder wiederholte, Messung von Stoffen oder deren Stoffwechselprodukten (Metabolite) in biologischen Materialien wie z.B. Blut, Serum, Muttermilch, Urin, Haaren, Zähnen, Ausatemluft und Sektionsmaterial versteht (HBM, 1996b). Es wird also die innere Belastung des Organismus mit (Schad-)Stoffen und/oder deren Metabolite erfasst. Hierdurch ist eine Charakterisierung der individuellen Schadstoffbelastung möglich und es lassen sich gegebenenfalls Korrelationen mit der äußeren Belastung (aber auch zu Aufnahmepfaden, Resorption, Kinetik und Ausscheidung) herstellen. Dies ermöglicht eine bessere Abschätzung bzw. Beurteilung eines Gesundheitsrisikos.

Zur Beurteilung von Schadstoffkonzentrationen gibt es im gewerblichen Bereich als Pendant zu den MAK- Werten (äußere Belastung) die ebenfalls von der DFG veröffentlichten BAT (Biologische Arbeitsplatz Toleranzwerte) -Werte (innere Belastung). Diese können unterschiedlich definiert sein, z.B. 25 µg/l Lindan im Serum oder Hemmung der erythrozytären Acetylcholinesteraseaktivität auf 70 % des Bezugswertes (für Diazinon, Fenthion, Malathion). Als Pendant zu den TRK-Werten werden sogenannte Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) angegeben. Liegen keine solchen Grenzwerte vor oder handelt es sich um Proben aus dem nichtgewerblichen Bereich (Privatpersonen), so müssen Vergleichswerte aus epidemiologischen Studien (Hintergrundbelastung), Untersuchungen von Vergiftungsfällen (toxische Konzentrationen) und extrapolierte Richtwerte aus toxikologisch-tierexperimentellen Studien zur gesundheitlichen Beurteilung herangezogen werden. Als Referenzwerte für die Hintergrundbelastung z.B. mit Permethrin wurden für die Metabolite Cl<sub>2</sub>CA und 3-PBA Konzentrationen von je 0,7 µg/l Urin festgelegt (Butte et al., 1998).

## **1.2 Untersuchte Wirkstoffklassen: Auswahl, Chemie und Toxikologie**

Die wichtigsten Pestizid-Wirkstoffklassen sind Organophosphate, Carbamate, Pyrethroide, Triazine, Chloracetanilide und Phenoxycarbonsäuren (Barr und Needham, 2002; Sogorb und Vilanova, 2002). Sie haben die früher weitverbreiteten Organochlorpestizide, wie z.B. DDT, weitgehend abgelöst, die

aufgrund ihrer Persistenz und Bioakkumulation und der damit einhergehenden Umwelt- und Gesundheitsgefährdung heute praktisch nicht mehr (Ausnahme: z.B. Lindan) eingesetzt werden.

Im Innenraumbereich werden heutzutage hauptsächlich Organophosphate, Carbamate und Pyrethroide als insektizide und akarizide Wirkstoffe zur Schädlingsbekämpfung verwendet (WWF, 2002). Daneben hat Pyrethrum, ein aus Chrysanthemenblüten (v.a. *Tanacetum cinerariifolium*) gewonnenes natürliches Insektizid, Bedeutung als rasch wirkendes Kurzzeitinsektizid (Knock-Down-Effekt). Aufgrund seiner raschen Photolyse und Oxidierbarkeit im Freien wird Pyrethrum in Verbindung mit Synergisten wie Piperonylbutoxid bevorzugt im Innenraumbereich wegen seiner im Vergleich zu Organophosphaten und Carbamaten geringeren Toxizität eingesetzt. Piperonylbutoxid hat selbst keine oder nur geringe insektizide Wirkung, hemmt aber den raschen metabolischen Abbau der Pyrethrine in Arthropoden und verlängert damit die Wirkdauer.

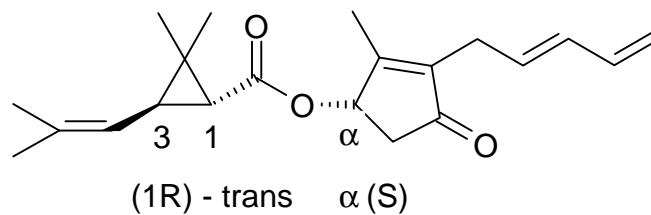
Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe orientiert sich im Wesentlichen an der Liste der geprüften und anerkannten Schädlingsbekämpfungsmittel und -verfahren des ehemaligen BgVV und des Umweltbundesamtes (BgVV, 2000).

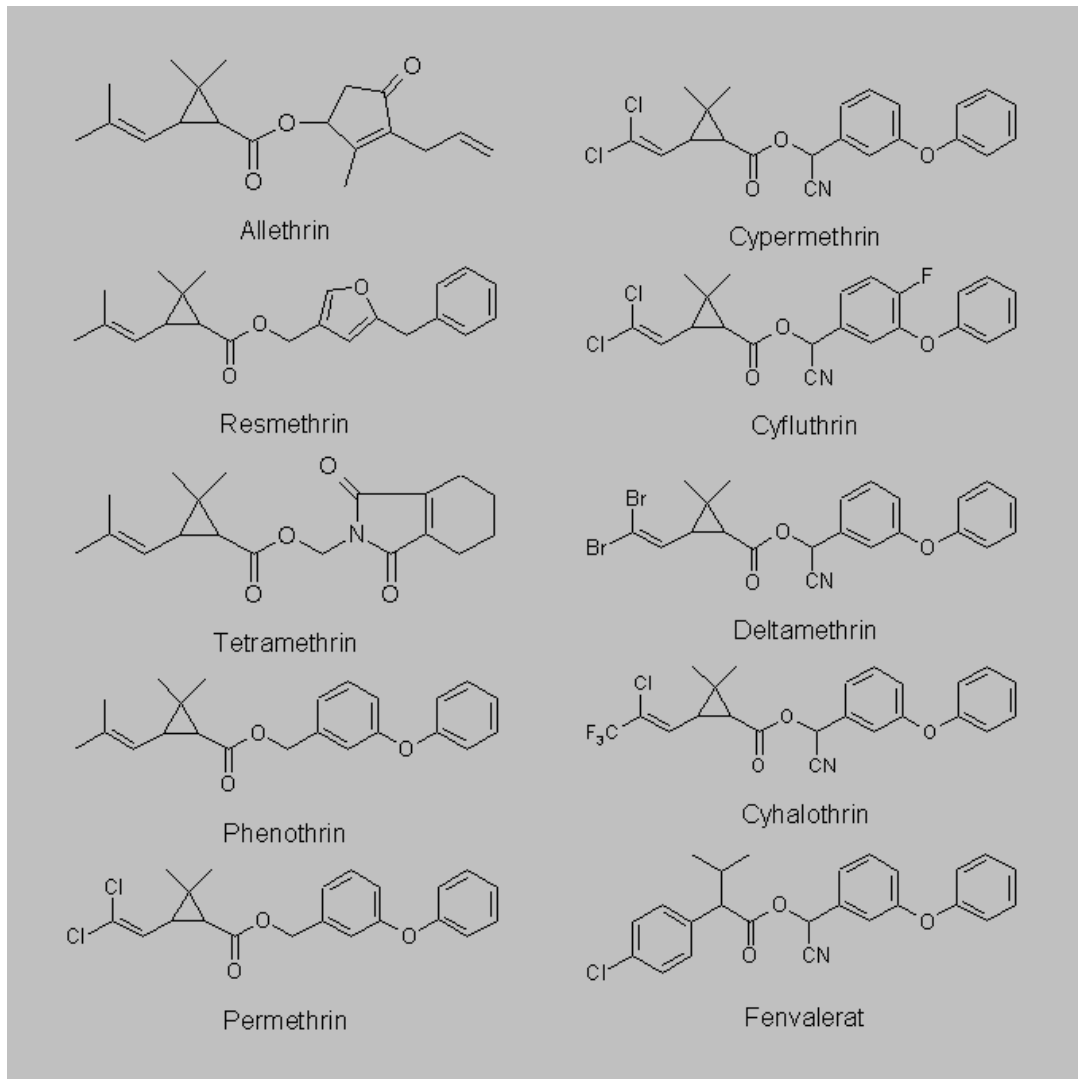
Da die Nomenklatur von chemischen Verbindungen nach IUPAC meist sehr komplizierte Namen ergibt, werden die in dieser Arbeit untersuchten Pestizide mit ihren Common Names bezeichnet, welche von der International Organization for Standardization (ISO, 1988) nach bestimmten Kriterien festgelegt werden. Dabei liefern Schlüsselsilben Hinweise auf die chemische Struktur oder wichtige Substituenten, z.B. *carb* (Carbamate), *phos* (Organophosphate), *thrin* (pyrethroide Cyclopropancarbonsäureester), *fen* (Phenylgruppe). Allerdings gibt es auch Common Names, die diesen Regeln nicht gehorchen, weil die Verbindungen bereits kurze chemische Namen oder Trivialnamen besitzen, z.B. Pentachlorphenol, Parathion, Bioallethrin.

### 1.2.1 Pyrethroide

Pyrethroide (**Abb. 1**) sind synthetische Analoga zu den Pyrethrinen, insektizid wirksamen Estern des natürlichen Pyrethrum. Pyrethrum, d. h. getrocknete Blüten (1,3 % Pyrethrine) von *Tanacetum cinerariifolium* bzw. ein daraus gewonnener Extrakt (25 % Pyrethrine), wurde bereits im Altertum in China (Chou Dynastie) und im Nahen und Mittleren Osten verwendet, wo die Pflanze endemisch ist. Im Mittelalter gelangte es über die Seidenstrassen durch Taschkent und Persien schließlich bis an die dalmatinische Küste (daher der Begriff "dalmatisches Insektenpulver"), von wo es ab Mitte des 19. Jahrhunderts nach Europa und den USA gelangte (Plimmer, 2003; Leahey, 1985). Pyrethrum-Pflanzen werden heute hauptsächlich in Kenia, Tansania, Ecuador, China, Neuguinea, Australien, Tasmanien und den USA angebaut.

Von den 6 optisch aktiven Estern des Pyrethrum, die auch unter dem Begriff "Pyrethrine" zusammengefasst werden (i.e. Pyrethrin I+II, Cinerin I+II, Jasmolin I+II), sind Pyrethrin I und II diejenigen Komponenten mit der stärksten insektiziden Wirkung (Plimmer, 2003). Allen Pyrethrinen gemeinsam ist die identische optische Konfiguration [(1R)-trans,  $\alpha$ (S)]. Das **Pyrethrin I**, ein Ester aus (1R)-trans-Chrysanthemumsäure und (S)-Pyrethrolon, ist die Leitstruktur für die Synthese der Pyrethroide:





**Abb. 1:** Strukturformeln der untersuchten Pyrethroide.

Als erstes Pyrethroid wurde Allethrin 1949 als racemisches Gemisch ( $2^3 = 8$  Isomere, da drei chirale Zentren an  $C_1$ ,  $C_3$  und  $C_\alpha$ ) aus cis/trans-Chrysanthemumsäure und Allethrolon synthetisiert, das sich lediglich in der Länge der Cyclopentenolon-Seitenkette vom Pyrethrin I unterscheidet. Als Hinweis auf die ähnliche Stereochemie zum natürlich vorkommenden Pyrethrin I bezeichnet man das Syntheseprodukt von (1R)-trans-Chrysanthemumsäure mit (R,S)-Allethrolon als Bioallethrin (2 Isomere). Weitere Modifikationen der Alkoholkomponente führten zu den Pyrethroiden Tetramethrin (1964) und Resmethrin (1967), welche einen größeren Knock-down-Effekt und eine höhere insektizide Wirksamkeit als Pyrethrum und Allethrin bei gleichzeitig geringerer Toxizität in Tierversuchen zeigen. Trotz dieser Modifikationen werden Allethrin,

Tetramethrin und Resmethrin ähnlich rasch wie die Pyrethrine durch Sonnenlicht, Hitze und Luftsauerstoff zersetzt, so dass sie für den Einsatz im agrarischen Bereich wenig geeignet sind. Erst die Verwendung von 3-Phenoxybenzylalkohol als Alkoholkomponente (Phenothrin, 1969) ergab eine verbesserte Lichtstabilität. Untersuchungen zeigten, dass die Isobutenylseitenkette ebenfalls photolysiert wird, was im Jahre 1973 zur Entwicklung des ersten kommerziell verwendeten photostabilen Pyrethroids Permethrin führte, bei dem die endständigen Methylgruppen durch Chloratome ersetzt wurden. Die Einführung einer Cyano-Gruppe am  $\alpha$ -C-Atom führte zu einer weiteren Steigerung der biologischen Aktivität, wobei die (1R)-cis-Isomere höhere Wirksamkeit besitzen als die (1R)-trans-Isomere (im Gegensatz zu den Chrysanthematen). Des Weiteren wird die Aktivität durch die stereochemische Konfiguration des  $\alpha$ -Substituenten beeinflusst [ $\alpha(S) > \alpha(R)$ ]. Als eines der wirksamsten Pyrethroide überhaupt resultierte daraus das Deltamethrin (1974), welches aus einem einzigen Isomer mit der Konfiguration [(1R)-cis,  $\alpha(S)$ ] besteht. Die Entdeckung der insektiziden Wirkung von Phenylessigsäureestern führte schließlich zur Entwicklung des ersten Pyrethroids ohne Cyclopropangruppe, Fenvalerat (1976), wobei das [(2S),  $\alpha(S)$ ] Isomer die höchste biologische Aktivität aufweist. Das Vorhandensein der Cyclopropangruppe ist also keine elementare Voraussetzung für die insektizide Wirkung.

In **Tabelle 1** sind für die Pyrethroide Informationen zur Zahl der theoretischen und im technischen Produkt enthaltenen Stereoisomere, der optischen Konfiguration an den chiralen C-Atomen, sowie dem jeweils biologisch aktivsten Isomer aufgelistet.

Bei den Pyrethroiden handelt es sich um wenig- bis schwerflüchtige, lipophile Substanzen (**Tabelle 2**). Es wurden bereits über 1000 verschiedene Pyrethroide synthetisiert (Sogorb M. A., Vilanova E., 2002)

**Tabelle 1:** Theoretische Stereoisomerenzahl ( $N_{TH}$ ), Isomerenzahl im technischen Produkt ( $N_P$ ), optische Konfiguration an den chiralen Zentren ( $C_1$ ,  $C_3$ ,  $C_\alpha$ ) und biologisch aktivstes Isomer der Pyrethroide (Plimmer, 2003).

Wirkstoff	$N_{TH}$	$N_P$	cis/trans	$C_1$	$C_3$	$C_\alpha$	aktivstes Isomer
Allethrin	8	8	50/50	R,S	R,S (trans) S,R (cis)	R,S	(1R)-trans, $\alpha$ (S)
d-Allethrin	8	4	20/80	R	R (trans) S (cis)	R,S	-
Resmethrin	4	4	20/80	R,S	R,S (trans) S,R (cis)	-	(1R)-trans
Tetramethrin	4	4	20/80	R,S	R,S (trans) S,R (cis)	-	(1R)-trans
Phenothrin	4	4	50/50	R,S	R,S (trans) S,R (cis)	-	(1R)-trans
d-Phenothrin	4	2	20/80	R	R (trans) S (cis)	-	-
Permethrin	4	4	40/60	R,S	R,S (cis) S,R (trans)	-	(1R)-cis
Cyhalothrin	16	4	100/0	R,S	R,S (cis)	R,S	(1R)-cis, $\alpha$ (S)
Cyfluthrin	8	8	40/60	R,S	R,S (cis) S,R (trans)	R,S	(1R)-cis, $\alpha$ (S)
Cypermethrin	8	8	50/50	R,S	R,S (cis) S,R (trans)	R,S	(1R)-cis, $\alpha$ (S)
Fenvalerat	4	4	-	R,S	-	R,S	(2S), $\alpha$ (S)
Deltamethrin	8	1	100/0	R	R (cis)	S	(1R)-cis, $\alpha$ (S)

**Tabelle 2:** Dampfdrücke und Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logarithmisch,  $\log P_{OW}$ ) der Pyrethroide (<sup>1</sup>Environmental Health Criteria (WHO), 1989, 1990; <sup>2</sup>IVA, 2000; <sup>3</sup>Tomlin, 2000; <sup>4</sup>Plimmer, 2003).

Wirkstoff	Dampfdruck [mPa]	(Temperatur [ $^{\circ}$ C])	$\log P_{OW}$
Allethrin	16 <sup>1</sup>	(30)	4,7 <sup>1</sup>
d-Allethrin	0,165 <sup>2</sup>	(22)	5,0 <sup>4</sup>
Resmethrin	0,0015 <sup>1</sup>	(30)	3,5 <sup>1</sup>
Tetramethrin	2,1 <sup>2</sup>	(25)	4,6 <sup>4</sup>
Phenothrin	0,016 <sup>4</sup>	(20)	7,4 <sup>4</sup>
d-Phenothrin	0,019 <sup>3</sup>	(21)	6,0 <sup>4</sup>
Permethrin	0,0025 (cis) <sup>3</sup> 0,0015 (trans) <sup>3</sup>	(20) (20)	6,8 <sup>4</sup> 7,4 <sup>4</sup>
Cyhalothrin	0,001 <sup>1</sup>	(20)	6,9 <sup>1</sup>
Cyfluthrin	0,00002-0,00096 <sup>1</sup>	(20)	~6 <sup>4</sup>
Cypermethrin	0,00019 <sup>1</sup>	(20)	6,3 <sup>1</sup>
Fenvalerat	0,037 <sup>1</sup>	(25)	6,2 <sup>1</sup>
Deltamethrin	0,002 <sup>1</sup>	(25)	5,4 <sup>1</sup>

Die Pyrethroide sind nicht systemische Kontakt- und Fraßgifte und wirken selektiv gegen Insekten und Milben. Die Pyrethroide vom Typ I (ohne  $\alpha$ -Cyano-Gruppe) zeigen meist einen raschen Knock-down Effekt

(Bewegungsunfähigkeit als Folge der paralyisierenden Wirkung) ohne Langzeitwirkung (Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin, Phenothrin). Der Tod tritt erst verspätet ein, so dass sich die Insekten durch metabolischen Abbau des Pyrethroids unter Umständen wieder erholen können. Aus diesem Grund wird oft Piperonylbutoxid als Synergist hinzugefügt, welches die Metabolisierung hemmt (Gupta H. C. L; 1999, Leahey J. P., 1985).

Das Typ I Pyrethroid Permethrin und v.a. Typ II Pyrethroide (mit  $\alpha$ -Cyano-Gruppe) zeichnen sich in der Regel durch eine höhere insektizide Wirkung bzw. höhere Toxizität (auch für Säuger) und eine längere Wirkdauer (Residualwirkung) aus, weil sie durch die chemischen Modifikationen wesentlich langsamer auf abiotischem und biotischem Wege abgebaut werden. Hierdurch verbessert sich die insektizide Wirkung, gleichzeitig erhöht sich aber auch die gesundheitliche Gefährdung bei Anwendung im Innenraum. Pyrethroide besitzen eine beträchtlich höhere Selektivität gegenüber den Zielorganismen (Mittelwert Insekt/Ratte: 1:4500) als z.B. Organophosphate (1:33) und Carbamate (1:16) (Casida & Quistad, 1995), können daher in wesentlich geringeren Aufwandmengen eingesetzt werden und besitzen dadurch auch ein geringeres toxikologisches Gefährdungspotenzial für Mensch und Tier (ausgenommen Fischtoxizität). Entsprechend sind die LD<sub>50</sub>-Werte für Ratten recht hoch (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** LD<sub>50</sub>- und LC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Pyrethroide. Testorganismus Ratte. Angaben in mg/kg KG (oral, dermal) und mg/m<sup>3</sup> (inhalativ). (<sup>1</sup>EHC, 1989, 1990; <sup>2</sup>WHO, 2002; <sup>3</sup>Perkow, 2002).

Wirkstoff	LD <sub>50</sub> (oral)	LC <sub>50</sub> (dermal)	LC <sub>50</sub> (inhalativ)
Allethrin	720-2430 <sup>1</sup>	> 5000 <sup>1</sup>	2630 (4h) <sup>1*</sup>
d-Allethrin	900-2150 <sup>2</sup>	2660-4390 <sup>2</sup>	260 (2h) <sup>1</sup>
Resmethrin	1400-1600 <sup>3</sup>	4200 <sup>3</sup>	k. A.
Tetramethrin	> 5000 <sup>1,3</sup>	> 5000 <sup>1,3</sup>	> 2500 (3h) <sup>1,3</sup>
Phenothrin	> 10000 <sup>3</sup>	> 10000 <sup>3</sup>	k. A.
d-Phenothrin	> 5000 <sup>1</sup>	> 5000 <sup>1</sup>	> 3760 (4h) <sup>1</sup>
Permethrin	4000-6000 <sup>3</sup>	> 4000 <sup>3</sup>	> 23500 (4h) <sup>3</sup>
Cyhalothrin	144-243 <sup>1</sup>	200-2000 <sup>1</sup>	k. A.
Cyfluthrin	250-400 <sup>3</sup>	> 5000 <sup>3</sup>	469-592 (4h) <sup>3</sup>
Cypermethrin	200-800 <sup>3</sup>	> 1600 <sup>1,3</sup>	k. A.
Fenvalerat	451-3200 <sup>1,3</sup>	> 5000 <sup>1,3</sup>	k. A.
Deltamethrin	31-139 <sup>1</sup>	700 <sup>1</sup>	600 (4h) <sup>3</sup>

\*Esbiothrin

k. A.: keine Angabe

Aufgrund ihrer geringen bis mittleren Toxizität gegenüber Wirbeltieren werden die Pyrethroide auch oft als "sichere" Insektizide bezeichnet (Plimmer, 2003). Es wurden keine negativen Wirkungen bei subchronischer Exposition und Langzeitexpositionen mit niedrigen Dosen bei den Testorganismen festgestellt. Die Pyrethroide reichern sich nicht an und haben keine karzinogene oder teratogene Wirkung (Leahey, 1985). Bei Deltamethrin, Fenvalerat und Permethrin wurden mutagene Effekte festgestellt (Darvas und Polgar, 1998).

Die Pyrethroide wirken in Insekten und Säugern vor allem als funktionelle Neurotoxine auf die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle in den Nervenzellmembranen durch Interaktion mit Rezeptormakromolekülen. Dadurch wird die Kanalöffnung verlängert, es kommt zu sehr schnellen wiederholten Nervenimpulsen bis hin zur Depolarisation der Nervenzellmembranen und damit zu abnormalen Funktionsstörungen des Nervensystems (Leahey, 1985). Die wesentlich geringere Toxizität gegenüber Säugern resultiert aus der effektiveren Metabolisierung, so dass die Wirkstoffe den eigentlichen Wirkort erst gar nicht oder nur in geringer Konzentration erreichen, aus der höheren Körpertemperatur (negativer Temperaturkoeffizient der Wirkung bei Typ I Pyrethroiden) und einer um den Faktor 100 geringeren Sensitivität der  $\text{Na}^+$ -Kanäle in Mensch und Tier (Krieger, 2001). Bei den Insekten erreichen die Pyrethroide über Sinnesorgane, Gelenkspalten und Kutikula (und bei Fischen über die Kiemen) dagegen sehr schnell ihren Wirkort.

Bei der Intoxikation wird zwischen zwei Phänomenen der Wirkung unterschieden (Appel und Michalak, 1994): (I) dem sogenannten T-Syndrom, welches sich durch die Beeinflussung des peripheren Nervensystems in Tremor (Zittern, unwillkürliche Bewegungsstörung), Ataxie (Fehlkoordination von Bewegungsabläufen) und rezeptiver Überempfindlichkeit auf äußere Reize manifestiert, und (II) dem sogenannten CS-Syndrom, welches durch Wirkung auf das zentrale Nervensystem Choreoathetose (Bewegungsunruhe, Zuckungen, Krämpfe) und Salivation (Speichelfluß, Sekretion) hervorruft. Hierbei können Pyrethroide ohne  $\alpha$ -Cyano-Gruppe im Wesentlichen dem Wirktyp I zugeordnet werden und Pyrethroide mit  $\alpha$ -Cyano-Gruppe in der Regel dem



Wirktyp II. Daneben gibt es auch noch Mischformen (TS-Syndrom, z.B. Permethrin).

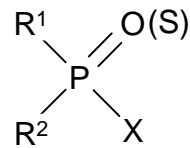
Als Symptome beim Menschen für eine Pyrethroidexposition werden Parästhesien (Brennen, Jucken, Kribbeln der Haut) bei dermale Kontakt, Reizung und Taubheitsgefühl der Atemwege, Übelkeit, Kopfschmerz, Benommenheit und Schwindel beobachtet. Bei akuten Intoxikationen mit hohen Dosen kann es zu Herzrhythmusstörungen, Muskelkrämpfen, Bewusstseinsstörungen, Lungenödem und Atemlähmung kommen (BMBF, 2001). Nach Ende der Exposition sind die Symptome reversibel, Langzeitschäden und irreversible Schädigungen des Nervensystems konnten bis jetzt nicht eindeutig belegt werden (Fromme, 1995; Krieger, 2001).

Die Pyrethroide werden dermal nur sehr schlecht resorbiert (1 %). Hauptaufnahmewege sind daher die Inhalation und orale Aufnahme (z.B. aus Lebensmitteln). Die Metabolisierung erfolgt rasch und nach ca. 2 (Allethrin) bis 8 Tagen (Deltamethrin) wird die aufgenommene Menge über Urin und Faeces wieder ausgeschieden (EHC, 1989, 1990).

### **1.2.2 Organophosphate (OP)**

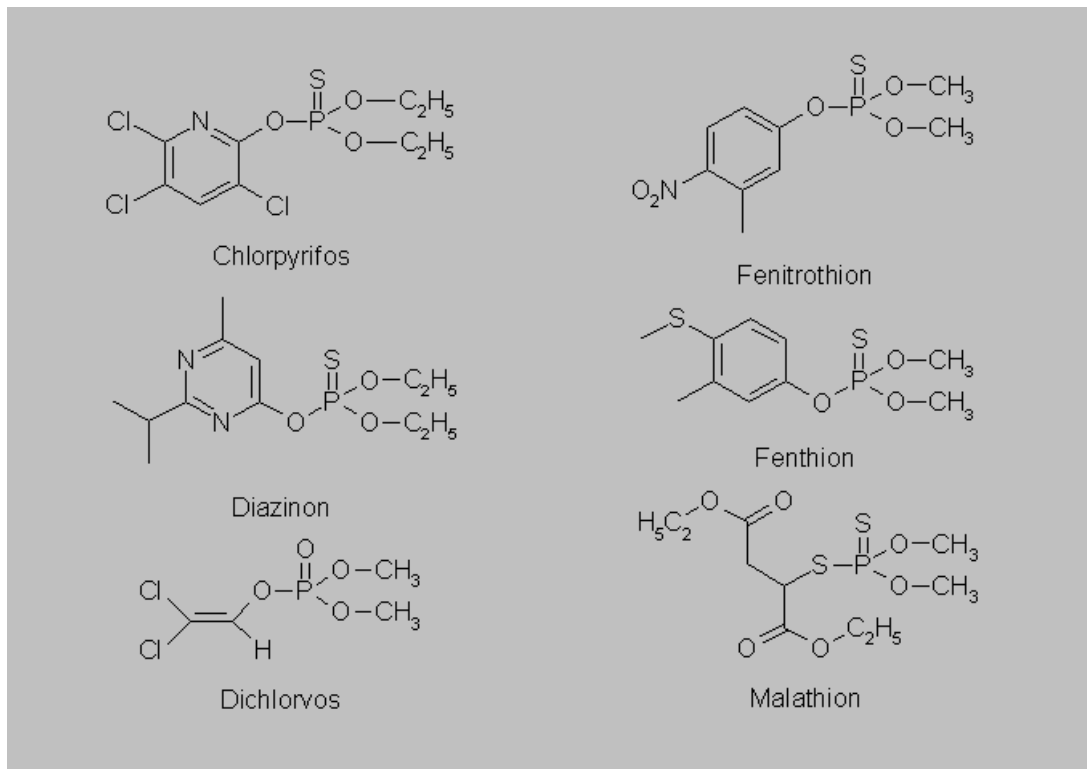
Ursprünglich wurde die toxische Wirkung von Organophosphorverbindungen bei der Forschung nach chemischen Kampfstoffen im 2. Weltkrieg entdeckt (z.B. Sarin, 1940). Der deutsche Forscher Gerhard Schrader produzierte daneben auch die ersten kommerziellen Insektizide wie Tetraethylpyrophosphat (TEPP, 1937) und Parathion (1944). Nach dem 2. Weltkrieg stieg dann das Interesse an dieser Wirkstoffklasse stark an. Leider sind viele dieser OP nicht nur für Insekten, sondern auch für Tiere und Menschen sehr toxisch (Selektivitätsmittelwert 1:33). Mit der Herstellung von Malathion im Jahre 1950 wurde eines der sichersten OP eingeführt, das eine LD<sub>50</sub> von 2800 mg/kg (oral, Ratte) hat, wogegen die anderen hier untersuchten OP LD<sub>50</sub>-Werte von 56-850 mg/kg aufweisen (**Tabelle 4**).

Die Grundstruktur der Organophosphate ist aus der sogenannten Schrader-Formel ersichtlich:



Hierbei kann R eine Alkyl-, Aryl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Aminogruppe sein. Der Substituent X ist eine leicht abspaltbare Gruppe von Enolen, Mercaptanen, (Thio-) Phenolen, Oximen u.a. mit –I - bzw. –M -Effekt. Er wird im Englischen auch "leaving group" genannt, weil X bei der Phosphorylierung von Acetylcholinesterase (an der OH-Gruppe des Serins), dem primären Target-Enzym, abgespalten wird (Krieger, 2001; Plimmer, 2003).

Die hier untersuchten Organophosphate (**Abb. 2**) gehören zu den Klassen der Phosphorsäure- und Thiophosphorsäureester. Thiophosphate sind weniger toxisch und stabiler als ihre (P=O)-Analoge und können aufgrund ihrer geringeren Polarität die Kutikula der Insekten besser durchdringen. Sie werden leicht zum entsprechenden Phosphat oxidiert, womit meist eine biologische Aktivierung verbunden ist (Malathion → Malaaxon). Die Ethylester sind akut toxischer und weniger leicht hydrolysierbar als die Methylhomologen (Frehse und Thier, 1986). Obwohl das P-Atom ein asymmetrisches Zentrum darstellt und die optisch aktiven Isomere unterschiedliche biologische Wirkung zeigen, werden i.d.R. racemische Gemische eingesetzt (Krieger, 2001). Die OP stellen eine Klasse von kostengünstigen, hocheffizienten und in der Umwelt rasch abbaubaren Insektiziden dar. Es handelt sich um mäßig flüchtige bis sehr flüchtige (Dichlorvos) Substanzen mit sehr unterschiedlicher Polarität (**Tabelle 5**). Aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit besitzt Dichlorvos die höchste Toxizität der vorgestellten OP (vgl. Tabelle 4). Chlorpyrifos, Diazinon, Dichlorvos, Fenitrothion und Malathion besitzen sowohl insektizide als auch akarizide Wirkung (Tomlin, 2000; Perkow und Ploss, 2002; Wood, 2003).



**Abb. 2:** Strukturformeln der untersuchten Organophosphate.

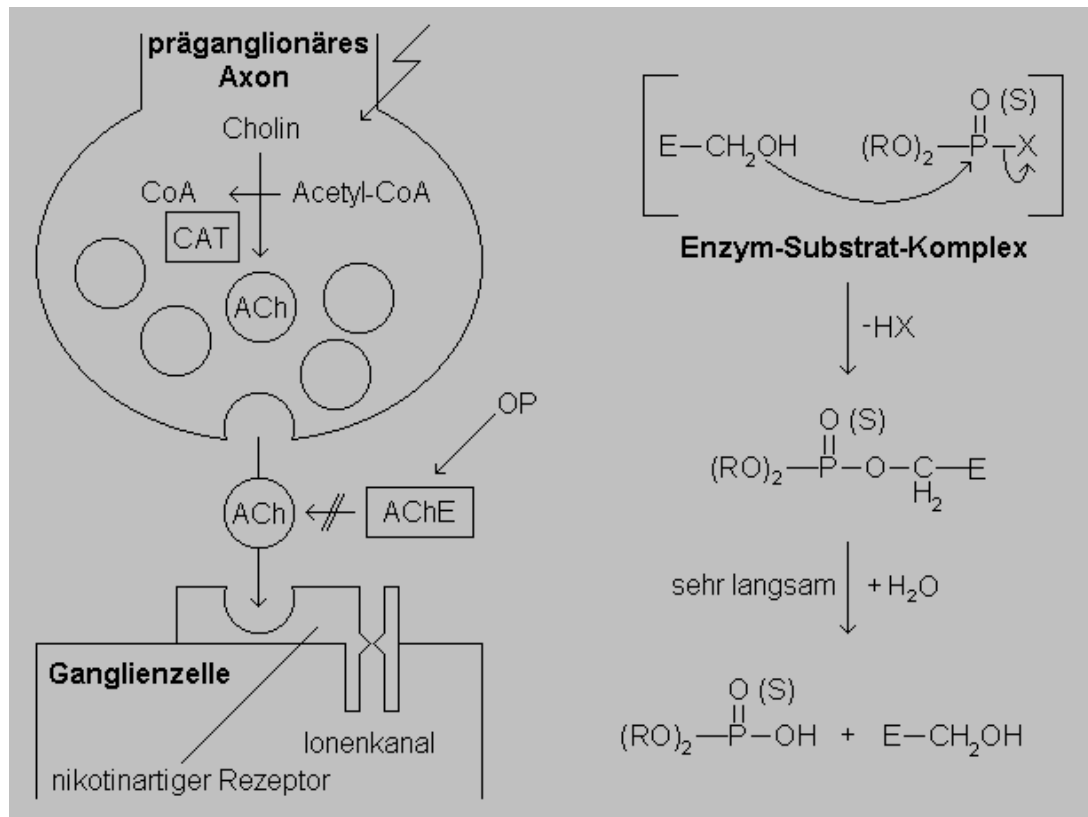
**Tabelle 4:**  $LD_{50}$ - und  $LC_{50}$ -Werte der untersuchten Organophosphate. Testorganismus Ratte. Angaben in mg/kg KG (oral, dermal) und  $mg/m^3$  (inhalativ). k. A.: keine Angabe (<sup>1</sup>EHC, 1986; <sup>2</sup>Gupta H. C. L., 1999; <sup>3</sup>PIP 1993, 1995, 1996; <sup>4</sup>Perkow und Ploss, 2002).

Wirkstoff	$LD_{50}$ (oral)	$LC_{50}$ (dermal)	$LC_{50}$ (inhalativ)
Chlorpyrifos	135-163 <sup>1,2</sup>	> 2000 <sup>1,3</sup>	> 200 (4h) <sup>3,4</sup>
Diazinon	300-850 <sup>1,2</sup>	> 2150 <sup>1,2,4</sup>	2330 (4h) <sup>4</sup>
Dichlorvos	56-108 <sup>1,2</sup>	75-210 <sup>1,2</sup>	15 (4h) <sup>3</sup>
Fenitrothion	250-500 <sup>2</sup>	> 890 <sup>3</sup>	>2210 (4h) <sup>4</sup>
Fenthion	190-315 <sup>1,2</sup>	330-500 <sup>1,2,3</sup>	500 (4h) <sup>4</sup>
Malathion	1375-2800 <sup>2,4</sup>	4100 (Kaninchen) <sup>1,4</sup>	k. A.

**Tabelle 5:** Dampfdrücke und Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logarithmisch,  $\log P_{OW}$ ) der Organophosphate (<sup>1</sup> Environmental Health Criteria (WHO), 1986, 1988, 1992, 1997; <sup>2</sup> Plimmer, 2003).

Wirkstoff	Dampfdruck [mPa]	(Temperatur [°C])	$\log P_{OW}$
Chlorpyrifos	2,5 <sup>1</sup>	(25)	5,0 <sup>1</sup>
Diazinon	9,7 <sup>1</sup>	(20)	3,1 <sup>1</sup>
Dichlorvos	1600 <sup>1</sup>	(20)	1,5 <sup>1</sup>
Fenitrothion	0,8 <sup>1</sup>	(20)	3,2 <sup>1</sup>
Fenthion	0,37 <sup>2</sup>	(20)	4,8 <sup>2</sup>
Malathion	5,3 <sup>2</sup>	(30)	2,8 <sup>2</sup>

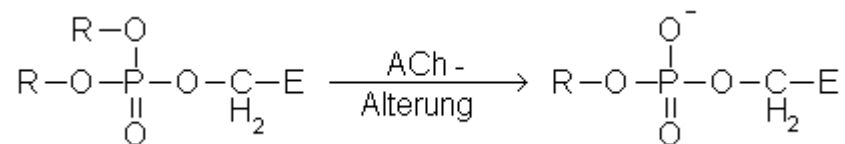
Die primäre Wirkungsweise der Organophosphate als Acetylcholinesterasehemmer ist in **Abb. 3** veranschaulicht.



**Abb. 3:** Wirkschema von Organophosphaten (OP) auf die Signalübertragung am synaptischen Spalt zwischen Nervenzellen. CAT: Cholin-Acetyl-Transferase. Ach: Acetylcholin. AchE und E-CH<sub>2</sub>OH: Acetylcholinesterase, CoA: Coenzym A.

Acetylcholin ist ein wichtiger Regulator bei der Weiterleitung von Impulsen (Neurotransmitter) im Nervensystem von Insekten und Säugern. Durch Erregung (elektrischer Impuls) des präganglionären Axons wird Acetylcholin aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an nikotinartige Cholinrezeptoren, wodurch Ionenkanäle (Na<sup>+</sup>-Einstrom) geöffnet und damit eine Erregung der Ganglienzelle bewirkt wird. Die Wirkung von Acetylcholin wird durch die Acetylcholinesterase unterbrochen, welche das Molekül in Acetat und Cholin spaltet. Die acetylierte Acetylcholinesterase wird durch Hydrolyse anschließend rasch regeneriert. Organophosphate reagieren mit einem Serinrest (E-CH<sub>2</sub>OH, Abb. 3) im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase (Phosphorylierung), was zu einer praktisch irreversiblen Inaktivierung führt, weil die zur Regeneration notwendige Hydrolyse der P-O-Bindung nur sehr langsam

abläuft (Stunden bis Tage). Dadurch erfolgt eine Kumulation von Acetylcholin im synaptischen Spalt, so dass es zu einer starken Erregung kommt und die normale Übertragung von Nervenimpulsen gestört wird (Cremllyn, 1991). Durch das sogenannte "Altern" (Verlust einer der Alkylgruppen am OP) wird das Enzym irreversibel inaktiviert, da durch Ausbildung einer negativen Ladung die Hydrolyse durch nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls verhindert wird:



OP mit Thiophosphorylgruppe sind meist nur schwache Inhibitoren, sie werden aber in vivo durch multifunktionelle Oxidasen (Cytochrom P450 Monooxygenase) zu den entsprechenden stark inhibitorisch wirksamen Phosphaten oxidiert (Chlorpyrifos-oxon, Diazoxon, Malaoxon, etc.). Malathion zeigt dabei eine große Differenz in der toxischen Wirkung auf Insekten und Säugetiere. Der Grund ist eine stark unterschiedliche Carboxylesteraseaktivität im Metabolismus von Insekten und Wirbeltieren. Dieser hydrolytische Abbau durch Abspaltung der Carboxyethylreste geht in Säugetieren schneller vonstatten als die biologische Aktivierung durch oxidative Desulfurierung (Krieger, 2003). Die anderen OP besitzen keine Carboxylgruppen und sind dementsprechend toxischer.

Symptome für akute Intoxikationen lassen sich nach ihrer Wirkung auf muskarinartige und nikotinartige Cholinrezeptoren unterscheiden:

- (a) muskarinartige Rezeptoren: Bronchialsekretion, Schwitzen, erhöhte Drüsensekretion, Augentränen, verengte Pupillen, Verengung der Luftröhren, Krämpfe, Erbrechen, Diarrhoe und Herzrhythmusstörungen;
- (b) nikotinartige Rezeptoren: Bluthochdruck, Faszikulation (Zusammenziehen) von glatter Muskulatur, Zwerchfell und Muskeln des Respirationstraktes, Zuckungen, Herzrasen, Schwächegefühl.

Zudem werden durch Wirkung auf das Zentralnervensystem Kopfschmerzen, Benommenheit, Ruhelosigkeit, Ängstlichkeit, Verwirrung, Sekretion, Depression des Atemzentrums und Koma (< 10 % AchE-Aktivität) hervorgerufen.

OP-Intoxikationen können mit Atropin (Antagonist für muskarinartige Rezeptoren), Oximen (Acetylcholinesterase-Reaktivatoren, falls keine Alterung eingetreten ist) und in schweren Fällen zusätzlich Diazepam (Linderung der Effekte auf das ZNS) behandelt werden (EHC, 1986).

Einige OP wie Dichlorvos und Chlorpyrifos (als Oxon) können die sogenannte verzögerte OP-induzierte Neuropathie auslösen, deren Folgen (Kribbeln und Taubheitsgefühl in Armen und Beinen, Muskelschwäche, Spasmus) erst bis zu 4 Wochen nach schwerer Intoxikation und Abklingen der akuten Symptome auftreten. Ursache hierfür ist eine Veränderung des Neuropathie-Target-Enzyms (NTE, ein Membranprotein in Neuronen) durch Inaktivierung in Analogie zur Reaktion der OP mit Acetylcholinesterase und anschließender Alterung (Plimmer, 2003).

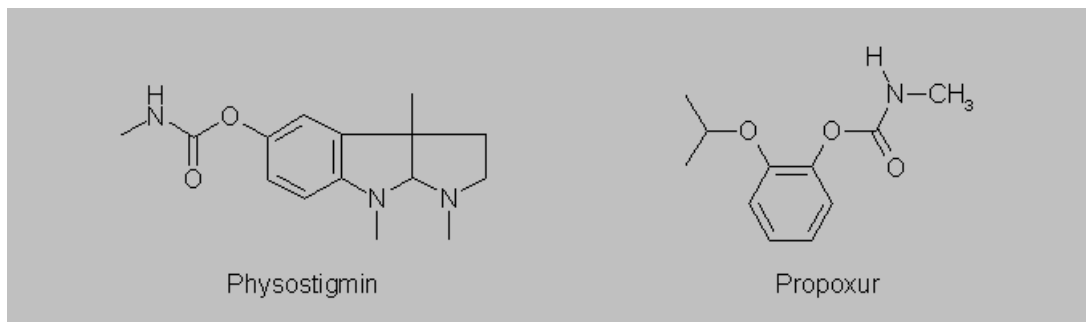
Wirkungen von Langzeitexpositionen mit niedrigen Konzentrationen an OP werden zur Zeit kontrovers diskutiert (auch im Zusammenhang mit dem Golfkriegsyndrom, Plimmer 2003).

Abgesehen von Intoxikationen durch orale Aufnahme erfolgt die Resorption von OP bei Exposition in erster Linie dermal und inhalativ. Insbesondere bei leichterflüchtigen OP wie z.B. Dichlorvos überwiegt der inhalative Aufnahmeweg.

### **1.2.3 Carbamate**

Die Entwicklung der Carbamat-Insektizidklasse geht auf die Entdeckung und Strukturaufklärung des Naturstoffes Physostigmin (**Abb. 4**) durch Stedman (1925) zurück, bei dem die N-Methylcarbamat-Gruppierung als Träger der toxischen Wirkung erkannt wurde (Wegler, 1970). Physostigmin ist ein Acetylcholinesterase-hemmendes Alkaloid aus der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*, Leguminosae). Afrikanische Eingeborene benutzen sie in "Gerichtsverfahren", um über Schuld und Unschuld zu entscheiden. Überlebt der Beschuldigte die Einnahme, so ist er unschuldig. Physostigmin wird in der Medizin v. a. als Miotikum eingesetzt (Roche, 1999). Das Physostigmin selbst besitzt keine insektizide Wirkung. Ursache hierfür ist die Ionisierung des Moleküls in wässriger Lösung (starke Base), so dass die Lipidschutzschicht des Nervensystems der Insekten nicht durchdrungen werden kann (Wegler, 1970; Cremlly, 1991).

In den 50er Jahren wurden von Metcalf ringsubstituierte Phenyl-N-methylcarbamate untersucht und von Gysin Dimethylcarbamate cyclischer Enole als insektizid wirksame Substanzen entwickelt. Nach der Entdeckung der insektiziden Wirkung von Carbamaten der Phenole und Kresole (Bayer) wurde das erste kommerzielle Carbamat-Insektizid Carbaryl, ein N-Methylcarbamat von 1-Naphthol, von der amerikanischen Firma Union Carbide 1956 entwickelt. Boots (1962) und Futuko (1983) entdeckten, dass die Substitution des H-Atoms am Carbamyl-Stickstoff zu einer wesentlich geringeren Warmblütertoxizität bei etwa gleichbleibender Toxizität gegenüber Insekten führt (Krieger, 2003). Mit dieser Erkenntnis wurden z.B. N-Sulfenyl-N-methylcarbamate als Proinsektizide entwickelt, die in Säugetieren wesentlich langsamer zu den entsprechenden N-Methylcarbamaten metabolisch konvertiert werden als in Insekten (z.B. Carbosulfan → Carbofuran).



**Abb. 4:** Physostigmin und das Carbamat-Insektizid Propoxur.

Propoxur ist ein nichtsystemisches, insektizides und akarizides Kontaktgift mit Knock-down und Residualwirkung (Cremlin, 1991). Es ist wenig flüchtig (Dampfdruck 0,86 mPa/20 °C) und relativ polar ( $\log P_{OW} = 1,6$ ). Propoxur ist ähnlich toxisch wie Dichlorvos und Deltamethrin ( $LD_{50}$ : 95-104 mg/kg oral, 1000-2400 mg/kg dermal,  $LC_{50}$ : > 1400 mg/m<sup>3</sup> (1h) inhalativ, Testorganismus Ratte), wird aber im Säugetierorganismus schnell metabolisiert (Metabolit 2-Isopropoxyphenol, 90 % in 24 h) und in der Umwelt rasch hydrolytisch (40 min Halbwertszeit bei pH 10) durch Luftsauerstoff und UV-Licht abgebaut (Perkow und Ploss, 2002). Die bei der Hydrolyse entstehende methylierte Carbaminsäure ist instabil und zerfällt zu Kohlendioxid und Amin. Propoxur ist nicht mutagen und

kanzerogen, teratogene Effekte wurden nur bei sehr hohen oralen Dosen festgestellt (PIP, 1996).

Die Carbamate haben dieselbe toxische Wirkweise wie die Organophosphate, sie sind Acetylcholinesterasehemmer. Das dabei gebildete carbamylierte Enzym ist wesentlich stabiler gegen hydrolytische Regeneration als das acetylierte Enzym (Reaktion mit Acetylcholin, Hydrolyse im Millisekunden-Bereich), aber weniger stabil als das phosphorylierte Enzym (Reaktion mit OP). Zudem kann keine Alterung des carbamylierten Enzyms wie beim phosphorylierten Enzym eintreten, weshalb die Hemmung reversibel ist. Daher sind Carbamate weniger toxisch für den Säugetierorganismus als Organophosphate. Dennoch ist die Hemmung lange genug (einige min), um eine Kumulation von ACh im synaptischen Spalt zu bewirken und so die Funktion des Nervensystems zu stören. Im Vergleich zu den Organophosphaten ist aber das Verhältnis zwischen tödlicher Dosis (LD<sub>50</sub>) und der Dosis, die nötig ist, um Vergiftungssymptome zu erzeugen, beträchtlich größer (EHC, 1986).

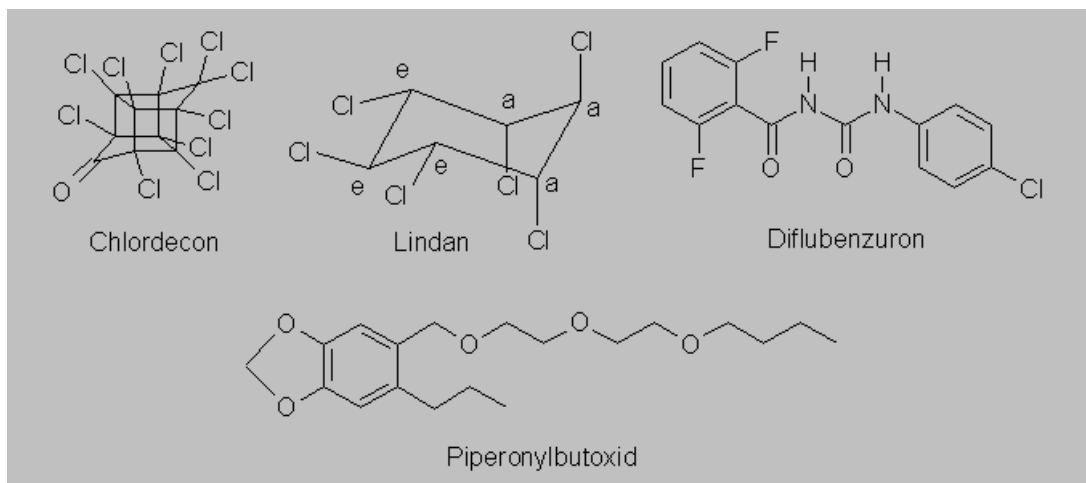
Bei Exposition gegenüber Carbamaten erfolgt die Resorption hauptsächlich dermal, aber auch inhalativ bei erhöhten Temperaturen (z.B. in Gewächshäusern). Die Symptome bei Intoxikationen sind aufgrund des gleichen Wirkmechanismus ähnlich denen bei Organophosphatvergiftungen. Sie klingen aber im Gegensatz zu diesen schneller wieder ab (meist innerhalb einiger Stunden). Im Englischen wird zur Beschreibung der Symptome auch der Begriff "MUDDLES" (muddle (engl.): Durcheinander, Wirrwarr) verwendet, eine Abkürzung für Miosis, Urination, Diarrhoe, Diaphoresis, Lacrimation, Excitation und Salivation. Es wurden zum Teil auch neuropathologische Effekte bei chronischer Langzeitexposition beschrieben. Es gibt aber wenige gesicherte Daten (Krieger, 2001).

#### **1.2.4 Sonstige Wirkstoffe**

**Chlordecon** und **Lindan** (Abb. 5) sind Organochlorpestizide, die aufgrund ihrer bereits eingangs erwähnten Persistenz und Bioakkumulation nicht mehr oder nur eingeschränkt verwendet werden. Chlordecon wurde als Fraßgift in Köderdosen eingesetzt (Perkow und Ploss, 2002). Es wurde



aber inzwischen aufgrund der UNECE POP-Konvention (POP: Persistent Organic Pollutants) zum weltweiten Verbot von besonders gefährlichen Dauergiften aus der BgVV-Liste der Entwesungsmittel gestrichen (BgVV, 2002b). Chlordecon ist wenig flüchtig (der Dampfdruck beträgt 0,04 mPa/25 °C) und relativ unpolar ( $\log P_{OW} = 4,5$ ). Chlordecon kann oral, dermal und inhalativ aufgenommen werden, verteilt sich leicht im Körper und akkumuliert v. a. in der Leber. Es ist moderat toxisch ( $LD_{50}$ : 95-132 mg/kg oral, 2000 mg/kg dermal, Testorganismus Ratte) (EHC, 1984). Chlordecon kann das Nervensystem, die Leber, die Haut und das Reproduktionssystem schädigen. Es besteht der Verdacht auf Karzogenität, es ist foetotoxisch und besitzt endokrine Wirksamkeit (Krieger, 2001).



**Abb. 5:** Strukturformeln von Chlordecon, Lindan, Diflubenzuron und Piperonylbutoxid (PBO).

Lindan hat, abgesehen vom Einsatz in der Landwirtschaft (in Dtl. seit 1998 im agrarischen Bereich nicht mehr zugelassen), als Ersatz für das hochgiftige und verbotene Holzschutzmittel Pentachlorphenol weitverbreitet Anwendung gefunden und wird erst in jüngerer Zeit sukzessive durch andere Wirkstoffe wie Permethrin ersetzt (Schenk et. al, 1997, Walker et. al, 1999). Heute findet es aufgrund seiner insektiziden und akariziden Wirkung vor allem noch Anwendung in Cremes und Shampoos zur Behandlung von Laus- und Milbenbefall (z.B. "Jacutin"). Unter der Bezeichnung Lindan (benannt nach dem deutschen Chemiker van der Linden, der es erstmals isolierte) versteht man das gamma-Isomer

des Hexachlorcyclohexans (ca. 14-15 % des technischen Produkts). Es ist das einzige insektizid wirkende der insgesamt 8 Stereoisomere, welches eine aaaaaa-Konfiguration der Chloratome aufweist (a: axiale Stellung, e: äquatoriale Stellung, Abb. 5). Lindan ist mäßig flüchtig (Dampfdruck 1,2 mPa/20 °C) und mittelpolar ( $\log P_{OW} = 3,2-3,7$ ) (EHC, 1991). Lindan hat eine geringere Persistenz als Chlordecon und andere Organochlorpestizide und wird in der Umwelt durch Dechlorierung und Hydroxylierung abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt je nach Medium bis zu 3 Jahre, in Ackerböden liegt sie bei etwa 40-70 Tagen (EHC, 1991; Krieger 2001). Lindan besitzt eine mittlere Toxizität ( $LD_{50}$ : 60-250 mg/kg oral, 900-1000 mg/kg dermal,  $LC_{50}$ : > 1600 mg/m<sup>3</sup> (4h) inhalativ, Testorganismus Ratte) (Gupta, 1999; EHC, 1991). Es ist wegen seiner Persistenz und schlechten Abbaubarkeit inzwischen ubiquitär in der Umwelt verteilt und reichert sich im Organismus an (Fettgewebe, Blut, Muttermilch, Knochenmark, ZNS). Die Durchschnittskonzentration in der deutschen Bevölkerung liegt bei 0,3 µg/l Blut (HBM, 1999). Lindan wird als hormonell wirksame Substanz angesehen (EC, 2000). Bei chronischer Exposition kann eine Leber- und Nierenschädigung eintreten. Lindan gilt als potenzielles Karzinogen (EPA, 2002).

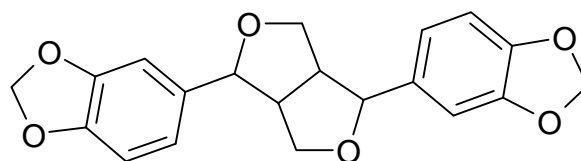
Lindan und Chlordecon sind wiederum neurotoxische Substanzen, deren Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Gupta, 1999). Sie sind nichtkompetitive Inhibitoren an der Picrototoxin-Bindungsstelle des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors der Chlorid-Ionenkanäle. GABA ist die Abkürzung für gamma-Aminobuttersäure, ein wichtiger Neurotransmitter mit hemmender Wirkung im Nervensystem von Insekten und Säugetieren (Forth et al., 2001). GABA hat die Aufgabe, die Freisetzung anderer Neurotransmitter wie Acetylcholin aus einer präsynaptischen Nervenzelle zu hemmen. Dazu wird von einem angrenzenden inhibitorischen Nervenende GABA in den synaptischen Spalt entlassen, die zur präsynaptischen Nervenzelle diffundiert und an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor der Chlorid-Ionenkanäle bindet. Dadurch strömen Chlorid-Ionen in die Nervenzelle ein, es kommt zur Hyperpolarisation, die Freisetzung von Acetylcholin wird somit gehemmt und die Stimulation der postsynaptischen Nervenzelle reduziert. Blockieren entsprechende Inhibitoren den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, so wird Acetylcholin

weiterhin freigesetzt. Es erfolgt eine Kumulation von ACh und damit eine Hyperstimulation des postsynaptischen Nervenendes. Symptome von akuten Intoxikationen sind z.B. Tremor, Koordinationsstörungen, Übelkeit, Muskelkrämpfe, Nervosität und Kopfschmerzen.

Als weiterer Wirkmechanismus für Chlordecon wird die Interaktion bei der oxidativen Phosphorylierung bzw. die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase genannt (Perkow und Ploss, 2002; Krieger, 2001).

**Diflubenzuron** (Abb. 5) ist ein Benzoylphenylharnstoff-Insektizid und wirkt als Kontakt- und Fraßgift. Es ist ein Chitinsyntheseinhibitor und verhindert die Häutung. Diflubenzuron hat ovizide Wirkung und ist wirksam gegen Raupen und Larven, nicht aber gegen Adulte, und wird damit zu den Wachstumsregulatoren gezählt (Perkow und Ploss, 2002). Daher ist die zeitlich richtige Anwendung zu beachten. Im Gegensatz zu den Organochlorpestiziden wird es in der Umwelt schnell abgebaut (Gupta, 1999). Aufgrund seiner selektiven Wirkung auf Insekten und des raschen Metabolismus durch Hydrolyse und Hydroxylierung im Säugetierorganismus ist es wenig toxisch für Mensch und Tier ( $\text{LD}_{50}$ : 4640 mg/kg oral, > 10000 mg/kg dermal,  $\text{LC}_{50}$ : > 13800 mg/m<sup>3</sup> inhalativ, Testorganismus Ratte) (EHC, 1996). Diflubenzuron ist schwerflüchtig (Dampfdruck 0,00012 mPa/25 °C) und mittelpolar ( $\log P_{\text{OW}} = 3,7$ ).

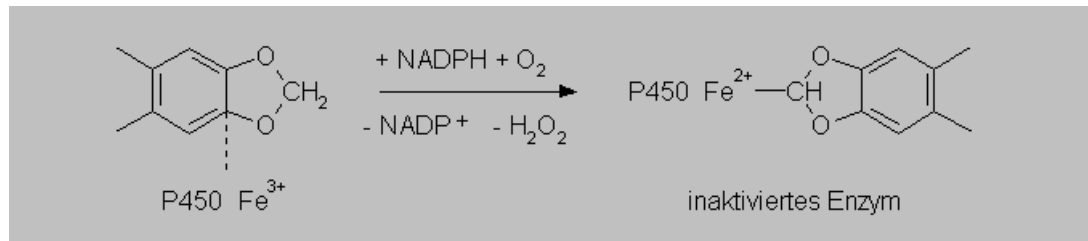
**Piperonylbutoxid** (PBO, Abb. 5) wird als Synergist v. a. für Pyrethrum und Pyrethroide eingesetzt (im Verhältnis 5:1 bis 20:1) und besitzt selbst keine oder nur geringe insektizide Wirkung (siehe 1.2.1). Bereits nach dem 2. Weltkrieg wurde die synergistische Wirkung von Sesamöl erkannt. Das darin enthaltene Sesamin mit seiner Methylendioxygruppe ist für die synergistische Wirkung verantwortlich (Naumann, 1981).



Sesamin

Da Sesamin in unpolaren organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, wurde die insektizide Wirkung anderer Methylenedioxyverbindungen wie Safrol und seiner Derivate untersucht. PBO erwies sich dabei als wirksamster Synergist bei ausreichender Lipidlöslichkeit.

PBO hemmt unspezifisch die multifunktionellen Oxidasen (Cytochrom P450) in Insekten, so dass die Metabolisierung von Pyrethrum und Pyrethroiden verlangsamt bzw. verhindert wird. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar. Es wird vermutet, dass ein Carben-Derivat des PBO an die Häm-Gruppe von Cytochrom P450 bindet und es damit inaktiviert (**Abb. 6**, Hodgson und Philpot, 1974; Krieger, 2001).



**Abb. 6:** Postulierter Mechanismus der irreversiblen Hemmung des Cytochrom P450 Enzyms durch den Synergisten Piperonylbutoxid.

Der Synergismus besteht darin, dass die biologische Aktivität der Insektizide erhöht bzw. verlängert wird und damit die einzusetzenden Biozidkonzentrationen verringert werden können. PBO ist wenig flüchtig (Dampfdruck 0,12 mPa/20 °C), relativ unpolar ( $\log P_{OW} = 4,3$ ) und wenig toxisch ( $LD_{50}$ : > 4000 mg/kg oral , > 2000 mg/kg dermal beim Kaninchen,  $LC_{50}$ : > 5900 mg/m<sup>3</sup> inhalativ, Testorganismus Ratte). Die dermale Resorptionsrate beträgt etwa 2 %. Bei chronischer Exposition mit hohen Konzentrationen wurden Leber- und Nierenschädigungen in Tierversuchen festgestellt. Toxische Wirkungen beim Menschen (auch bei berufsbedingter Langzeitexposition) sind nicht bekannt (Krieger, 2001).

### 1.3 Metabolismus von Pyrethrinen und Pyrethroiden

Von den vorgestellten Insektizidklassen wird im Folgenden nur der Metabolismus der Pyrethrine und Pyrethroide vorgestellt, da dies für die Zielsetzung der Arbeit (siehe 1.5) von Bedeutung ist.

### 1.3.1 Allgemeines

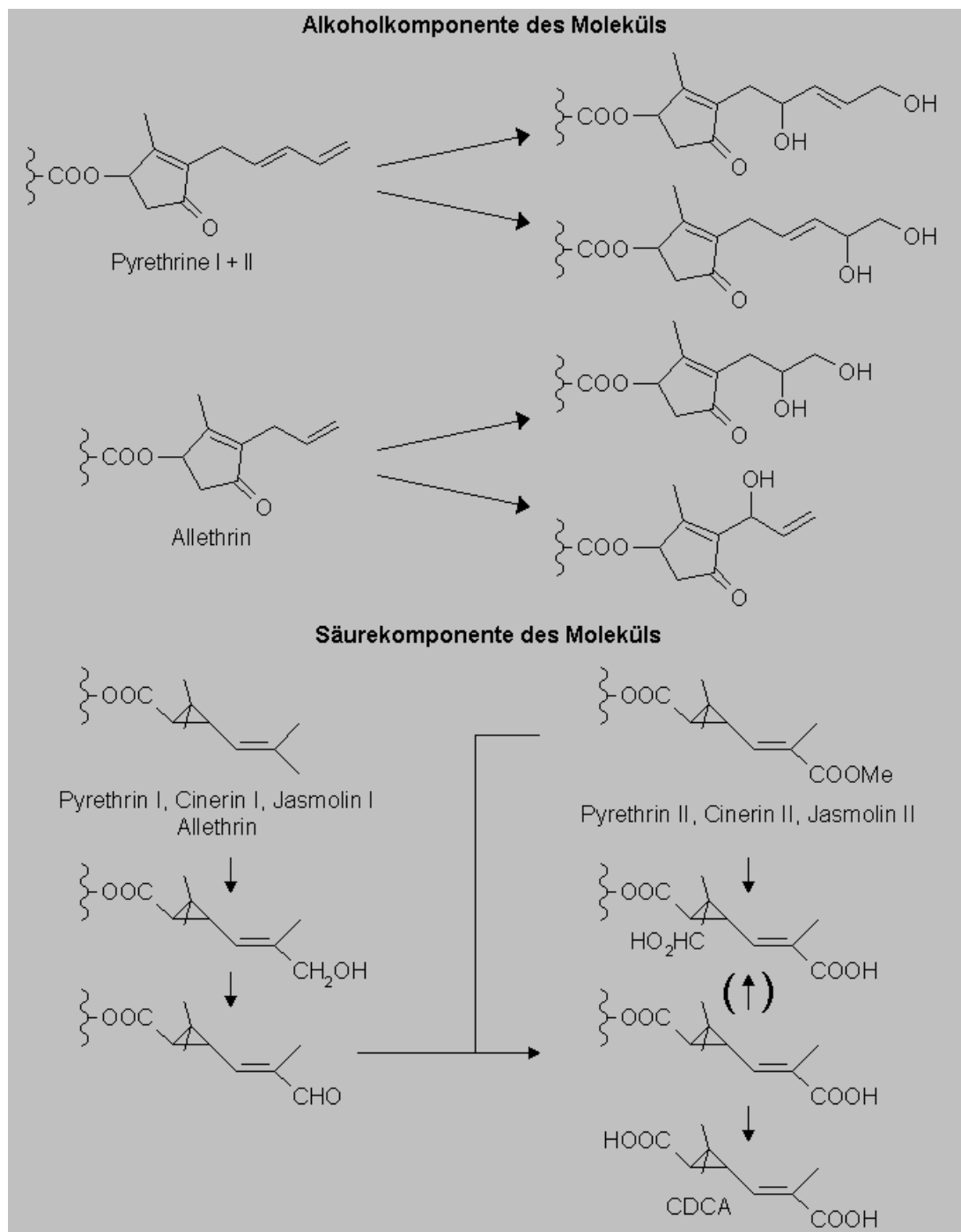
Die Pyrethrine und die Pyrethroide werden hauptsächlich durch Esterspaltung (Carboxyesterasen) und oxidativen Abbau (Cytochrom P450 Monooxygenasen) metabolisiert (Phase I Reaktionen). Anschließend werden die entstandenen Metabolite ganz oder teilweise mit Glucose (COOH-Gruppen) oder Sulfat (OH-Gruppen) konjugiert und als Glucuronide bzw. Sulfate ausgeschieden (Phase II Reaktionen) (Haug und Hoffmann, 1989).

Aufgrund der Fülle an Informationen zum Metabolismus vom Pyrethroiden sei hier nur auf den für diese Arbeit wichtigen Metabolismus der Pyrethrine und der Pyrethroide vom Typ I (ohne Cyano-Gruppe) und den Metaboliten Chrysanthemumdicarbonsäure näher eingegangen.

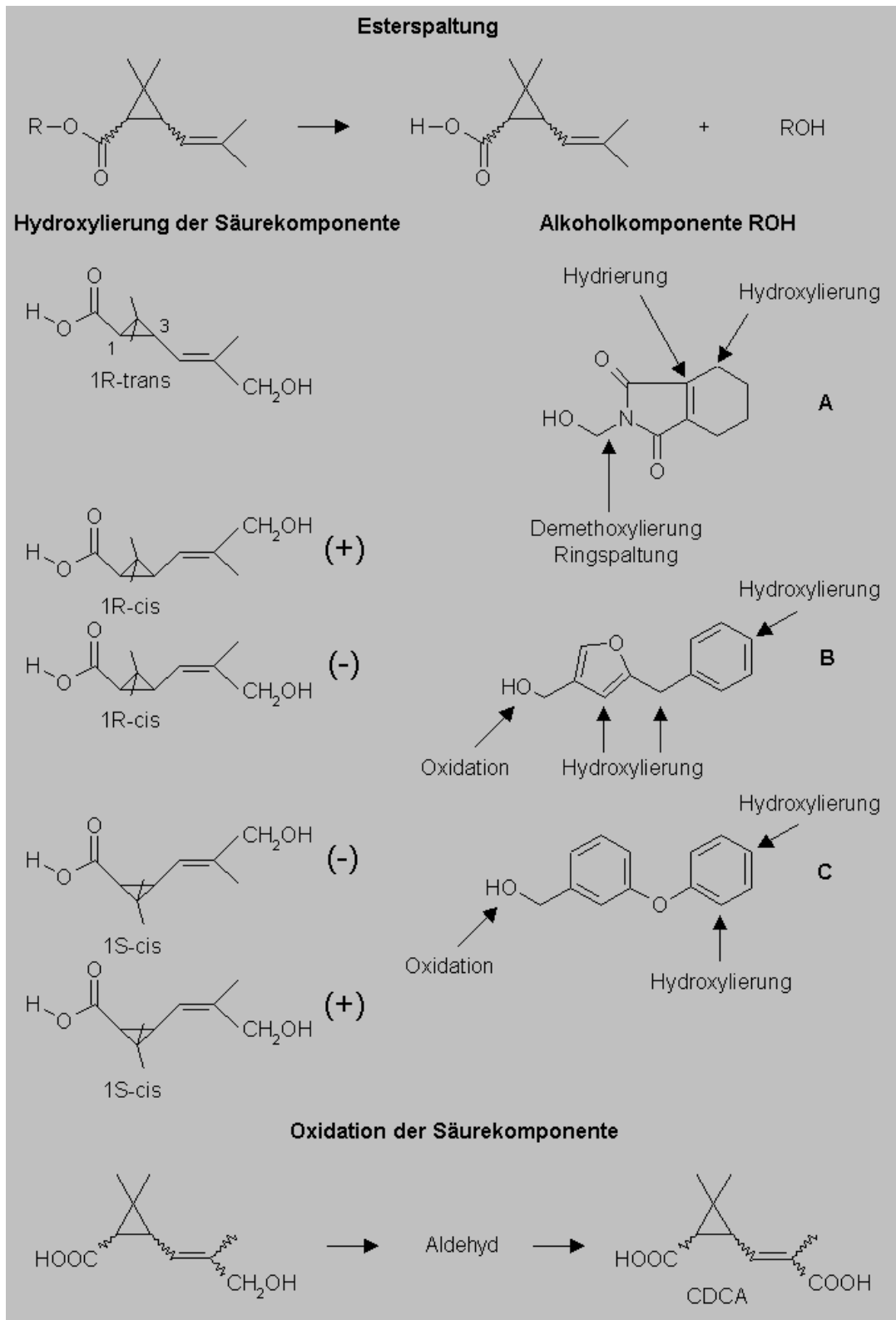
Bei den Pyrethrinen und Allethrin erfolgt vorwiegend ein oxidativer Abbau, Esterspaltung findet nur in geringerem Ausmaß statt. Dabei werden die Pyrethrine zumeist erst an Alkoholkomponente des Moleküls oxidiert (Epoxidierung), wogegen Allethrin zuerst an der Säurekomponente des Moleküls oxidiert wird (**Abb. 7**).

Bei Tetramethrin, Resmethrin und Phenothrin hängt das Ausmaß von Esterspaltung durch Carboxyesterasen bzw. oxidativem Abbau durch Oxygenasen von der cis/trans-Konfiguration ab. Bei trans-Isomeren erfolgt die Esterspaltung schnell und praktisch quantitativ. Angriffspunkte für den oxidativen Abbau sind die Alkoholkomponente des Moleküls und die in der Säurekomponente zum Cyclopropanring trans-ständige Methylgruppe der Isobutenyl-Seitenkette. Diese wird zunächst hydroxyliert und sukzessiv zum Aldehyd und zur Carbonsäure oxidiert (**Abb. 8**). Umgekehrt ist es bei den cis-Isomeren. Die Verseifung spielt hier eine untergeordnete Rolle (sterisch ungünstig) und findet, soweit sie erfolgt, durch eine (langsamere) oxidative Esterspaltung statt. Die cis-Isomere werden hauptsächlich auf oxidativem Wege abgebaut, wobei Unterschiede zwischen 1R-cis- und 1S-cis-Isomeren zu beobachten sind (siehe Abb. 8). Bei den cis-Isomeren kann eine Oxidation an beiden Methylgruppen der Isobutenylseitenkette stattfinden, wobei bei 1R-cis-Isomeren vorwiegend die zum Cyclopropanring trans-ständige Methylgruppe, bei 1S-cis-Isomeren dagegen bevorzugt die zum Cyclopropanring cis-ständige Methylgruppe

oxidiert wird (Chambers, 1980). Sowohl bei cis- als auch bei trans-Isomeren kann es zu einer Isomerisierung am C<sub>3</sub> des Cyclopropanringes kommen, wobei vorwiegend cis → trans Isomerisierung stattfindet. Bei cis-Isomeren kommt es mitunter auch zur Hydroxylierung der geminalen Methylgruppen am Cyclopropanring (z.B. Phenothrin).



**Abb. 7:** Hauptwege der Metabolisierung von Pyrethrinen und Allethrin in Ratten. CDCA: Chrysanthemumdicarbonsäure (nach Casida, 1973; EHC, 1989; Casida und Quistad, 1995).



**Abb. 8:** Hauptwege der Metabolisierung von Tetramethrin (A), Resmethrin (B) und Phenothrin (C) in der Ratte. Hydroxylierung in der Säurekomponente des Moleküls: (+) mehr, (-) weniger. CDCA: Chrysanthemumdicarbonsäure (nach Casida, 1973; Chambers, 1980; EHC, 1989, 1990).

Aufgrund der raschen Hydrolyse der trans-Isomere werden diese schneller metabolisiert und ausgeschieden als die entsprechenden cis-Isomere. Dabei werden Esterspaltprodukte bevorzugt im Urin, Metaboliten mit intakter Estergruppe bevorzugt im Stuhl ausgeschieden (EHC, 1989, 1990; Leahey, 1985).

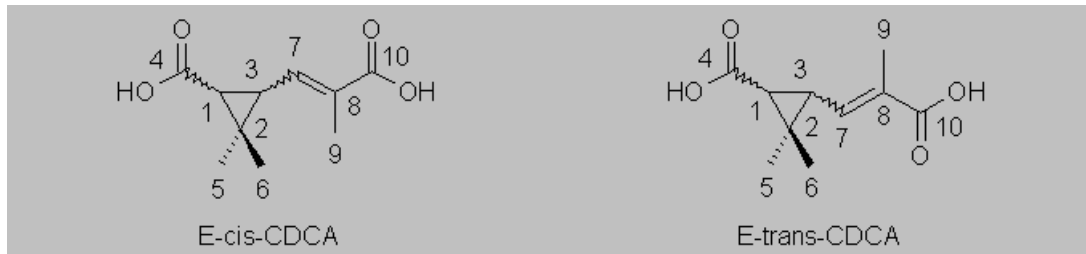
Der Metabolismus in Insekten ist prinzipiell ähnlich. Ein wichtiger Aspekt der toxischen Wirkung ist, dass Insekten (nicht resistente Stämme) eine wesentlich geringere Carboxylaseaktivität besitzen als Säugetiere und die Metabolisierung daher nicht so effektiv ist (Chambers, 1980). Im Säugetierorganismus werden die genannten Pyrethroide in einem Zeitraum von einigen Stunden bis 8 Tagen vollständig metabolisiert und ausgeschieden (EHC, 1989, 1990). Bei den toxischeren Typ II Pyrethroiden dagegen wird die Bildung der Metabolite cis/trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (CL<sub>2</sub>CA), cis-3-(2,2-Dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (BR<sub>2</sub>CA), 3-Phenoxybenzoesäure (3-PBA) und 4-Fluor-3-phenoxybenzoesäure (F-PBA) durch die Cyano-Gruppe und die Substitution der Methylgruppen der Isobutenylseitenkette mit Halogenatomen erschwert (Chambers, 1980; Leahey 1985).

### **1.3.2 Der Metabolit E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA)**

Chrysanthemumdicarbonsäure entsteht, wie im vorigen Abschnitt gezeigt, bei der Metabolisierung von Pyrethrinen und den Typ I Pyrethroiden Allethrin, Tetramethrin, Phenothrin und Resmethrin nach Esterhydrolyse und Oxidation der Isobutenylseitenkette in der Säurekomponente des Moleküls. Aufgrund der Tatsache, dass CDCA bei der Metabolisierung von allen genannten Verbindungen gebildet wird, und dass sich die anderen Metabolite wegen ihrer großen Variabilität in der Art und Quantität kaum als Biomarker eignen, liegt es nahe, CDCA als Leitsubstanz für Biomonitoringzwecke heranzuziehen. Die Strukturformeln von E-cis/trans-CDCA sind in **Abb. 9** dargestellt. Jeder Strukturformel lassen sich zwei Isomere zuordnen. Die exakte Bezeichnung nach IUPAC-Nomenklatur lautet für die cis-Isomere (1RS,3SR)-3-[(E)-2-Carboxy-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure und für die trans-Isomere (1RS,3RS)-3-



[(E)-2-Carboxy-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarbonsäure. Hierbei beziehen sich die Bezeichnung "cis" oder "trans" auf die Stellung der Substituenten am Cyclopropanring und "E" (bzw. "Z") auf die Stellung der Substituenten an der Doppelbindung.



**Abb. 9:** Strukturformeln von E-cis- und E-trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA).

Von den insgesamt 8 möglichen Isomeren der CDCA werden nur die vier genannten näher betrachtet, da sie zum einen als die hauptsächlichen im Urin anzutreffenden Isomere der biologisch (insektizid) aktiven Pyrethroid-Typ-I-Isomere [(1R)-trans] anzutreffen sind (vgl. Abb. 8, cis-Isomere werden eher über den Stuhl ausgeschieden), und zum anderen, weil die E-Isomere für die Herstellung eines Referenzstandards synthetisch gut zugänglich sind (Leng et al., 1999). Näheres dazu im experimentellen Teil.

## 1.4 Literaturübersicht zur Analytik der Pestizide in Luft, Hausstaub und biologischen Matrices

### 1.4.1 Luft

Die Pestizide können entweder gasförmig oder an Schwebstaub gebunden bzw. als Flüssigkeitströpfchen in der Luft vorliegen. Die Bestimmung der Pestizide in der Luft wird schon seit den fünfziger Jahren durchgeführt (van Dyk and Visweswariah, 1975). Die bereits sehr früh zur Sammlung der Pestizide eingesetzten Filtermaterialien (Papier, Glasfaser, Membranen) eignen sich aber, wenn überhaupt, nur zur Sammlung partikelgebundener Wirkstoffe. Gasförmige Stoffe werden kaum oder gar nicht zurückgehalten und bei hohem Luftdurchsatz kann es zu Verlusten durch Verdampfung von der Filteroberfläche kommen (Herzel und Lahmann, 1972). Erste Sammelmedien für gasförmige Pestizide waren Kieselgel, aktiviertes Aluminiumoxid und Aktivkohle. In der historischen Entwicklung wurden als

weitere Geräte zur Probenahme Impinger bzw. Scrubber (mit Absorptionsflüssigkeit gefüllte Waschflaschen, in welche die Luft über Düsen oder Fritten eingeleitet wird) oder Impaktoren (Abscheidung von Partikeln aus dem Luftstrom auf Oberflächen, z.B. Filtereinsätze, aufgrund ihrer Massenträgheit) zur Bestimmung von Pestiziden erprobt (van Dyk and Visweswariah, 1975).

Heutzutage haben sich für die Analytik von Pestiziden in der Luft Glas- oder Quarzfaserfilter zur Sammlung partikelgebundener Pestizide bewährt (Haraguchi et al., 1994; Millet et al., 1996; Berger-Preiss et al., 1997a/b; Gordon et al., 1999; Murayama et al., 2000; Foreman et al., 2000; Lewis et al., 2001). Gasförmig in der Luft vorliegende Pestizide können durch Adsorption an anorganische Stoffen wie Aluminiumoxid (van Dyk and Visweswariah, 1975), Kieselgel (Class, 1991; Katsura et al., 1996), Aktivkohle (Harper, 2000) oder an Polymerharzen wie Chromosorb (Leidy und Wright, 1991), Tenax (Roinestad et al., 1993; Riegner und Schmitz, 1994; Siebers und Mattusch, 1996; Schenk et al., 1997, Matoba et al., 1998) und XAD (Haraguchi et al., 1994; Millet et al., 1996; Kuo und Lee, 1999) gesammelt werden. Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften dieser Materialien zur Adsorption von organischen Stoffen aus der Luft ist in (DFG, 2000) zu finden. Grobporiger Polyurethanschaum hat sich ebenfalls zur Sammlung von Luftproben, insbesondere auch großer Volumina, bewährt (Bidleman und Olney, 1974; Turner und Glotfelty, 1977; Hsu et al., 1988; Leidy und Wright, 1991; Schenk et al., 1997; Majewski et al., 1998; Foreman et al., 2000; Lewis et al., 2001). Kieselgel, Tenax und Polyurethanschaum werden z.T. auch alleine, d.h. ohne Vorschaltung von Filtern für partikelgebundene Wirkstoffe, zur Sammlung von Pestiziden eingesetzt (Hsu et al., 1988; Riegner und Schmitz, 1994; Schenk et al., 1997). Außerdem finden noch Membrandisks, z.B. mit C18 Material (Murayama et al., 2000), und Plastikbeutel (Ramesh und Vijayalakshmi, 2001) für die Luftprobenahme Verwendung. Da die Pestizide je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (v.a. Dampfdruck) sowohl partikelgebunden als auch gasförmig in der Luft vorliegen können bzw. wenn mehrere Pestizide mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften gleichzeitig gesammelt werden sollen, empfiehlt sich die

Kombination von Sammelmedien für partikelgetragene und gasförmige Wirkstoffe, z.B. Glasfaserfilter und XAD bzw. Glasfaserfilter und Polyurethanschaum (Haraguchi et al., 1994; Guardino et al., 1998; Foreman et al., 2000).

Die Probenextraktion erfolgt mit organischen Lösemitteln wie Ethylacetat, Aceton, Diethylether, Hexan und Dichlormethan. Die Extrakte werden meist direkt zur weiteren Analyse eingesetzt, nur in wenigen Fällen wird eine Extraktaufreinigung, z. B. mittels Festphasenextraktion (Gordon et al., 1999) oder Säulenchromatographie (Haraguchi et al., 1994; Foreman et al., 2000) vorgeschaltet.

In den genannten Literaturstellen werden für die qualitative und quantitative Bestimmung der Analyten ausschließlich chromatographische Methoden, hauptsächlich Gaschromatographie (GC) mit Elektroneneinfangdetektor (ECD), Stickstoff- und Phosphor-sensitivem Detektor (NPD bzw. TID) oder massenspektrometrischen Detektor (MSD) sowie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion, herangezogen. Alle hier vorgestellten Methoden beschränken sich auf die Bestimmung einzelner oder einiger weniger Wirkstoffe, die meist derselben Verbindungsklasse (hauptsächlich Organochlorverbindungen und Organophosphate) angehören.

Nähere Einzelheiten zur Luftprobenahme werden in Kapitel 2.1.1 erläutert.

#### **1.4.2 Hausstaub**

Zur Bestimmung von Pestiziden im Hausstaub werden die gleichen Methoden wie bei der Luftanalytik eingesetzt, hauptsächlich GC gekoppelt mit ECD oder MS (Roinestad et al., 1993; Fischer und Eikmann, 1996; Mukerjee et al., 1997; Schenk et al., 1997; Berger-Preiss et al., 1997 a/b; Walker et al., 1999; Gordon et al., 1999; Liroy et al., 2000; Butte et al., 2001; Lewis et al., 2001; Berger-Preiss et al., 2002). Vereinzelt finden auch andere Methoden Anwendung, z.B. HPLC gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) (Rehwagen et al., 2000).

Die Sammlung des Hausstaubes erfolgt meistens mit dem Staubsauger und handelsüblichen Staubsaugerbeuteln, es werden aber auch Filter oder Filterhülsen anstatt des Staubsaugerbeutels verwendet (Berger-Preiss et

al., 1997 a/b; Schenk et al., 1997; Gordon et al., 1999). Zudem finden auch speziell entwickelte Geräte für die Hausstaubprobenahme Verwendung (Mukerjee et al., 1997; Liyo et al., 2000; Lewis et al., 2001).

Es werden entweder der Gesamtstaub oder einzelne Staubfraktionen (< 2 mm, < 150 µm, < 90 µm, < 63 µm, < 53 µm) zur weiteren Analyse herangezogen (Näheres dazu im 2. Kapitel).

Die Extraktion des Hausstaubes erfolgt mit organischen Lösemitteln wie Ethylacetat, Toluol, Hexan, Aceton, Diethylether und 2-Propanol. Auch die Verwendung der ASE-Technik (Accelerated Solvent Extraction) unter Verwendung von erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur wurde beschrieben (Rehwagen et al., 2000).

Aufgrund der gegenüber Luft komplexeren Matrix gewinnt die Extraktreinigung an Bedeutung, z.B. mittels Festphasenextraktion (Gordon et al., 1999), Säulenchromatographie (Berger-Preiss et al., 1997 a; Lewis et al., 2001), HPLC-Fraktionierung (Schenk et al., 1997) oder Größenausschlusschromatographie (Hong et al., 2001; Moate et al., 2002).

#### **1.4.3 Biologische Matrices**

In aktuellen Übersichtsartikeln (Aprea et al., 2002; Barr und Needham, 2002) wird eine umfassende Darstellung von analytischen Methoden zum Human-Biomonitoring von Pestiziden der verschiedensten Verbindungsklassen bzw. deren Metabolite gegeben. Die Analytik umfasst die Bestimmung z.B. in Vollblut, Serum, Plasma, Urin, Muttermilch, Fettgewebe, Leber und Niere. Dabei gibt es die meisten Methoden zur Untersuchung von Urin, gefolgt von Blut. Für die Isolierung der Wirkstoffe bzw. deren Metabolite aus der Matrix werden u.a. flüssig-flüssig Verteilung, Festphasenextraktion, Festphasenmikroextraktion, Säulenchromatographie, Gelpermeationschromatographie, azeotrope Destillation und Matrix-Festphasen-Dispersion (Barker, 2000) angewendet. Die qualitative und quantitative Bestimmung erfolgt hauptsächlich mit GC, gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor (FID), flammenphotometrischen Detektor (FPD), ECD, NPD oder MSD. Zum Teil wird auch mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC-HRMS) oder Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) gearbeitet. In letzter Zeit kommen auch

neuere Kopplungsmethoden (HPLC-MS/MS mit APCI-, Thermospray- oder Elektrospray-Ionenquelle) und Techniken wie Kapillarelektrophorese zum Einsatz (Driskell, 1991; Beeson, 1999; Baker, 2000; Mardones, 2000; Olson, 2001).

Bei Pestiziden, die im Organismus rasch metabolisiert werden (Organophosphate, Carbamate, Pyrethroide/Pyrethrine), erfolgt die Bestimmung im Blut (Serum, Plasma) größtenteils über die Wirkstoffe selbst (Wintersteiger und Ofner, 1994; Taylor et al., 1997; Zuccari-Bissacot und Vassilieff, 1997; Frenzel et al., 2000; Barr et al., 2002). Im Urin dagegen werden die entsprechenden Metabolite bestimmt (Kühn et al., 1996; Leng et al., 1996, Leng et al., 1997a/b; Angerer und Ritter, 1997; Aprea et al., 1999; Arrebola et al., 1999; DFG, 1999; Hardt und Angerer, 1999; Moate et al., 1999; Martinez-Fernandez et al., 2000; Sancho et al., 2000; Heudorf und Angerer, 2001a/b; Schettgen et al., 2002).

In der genannten Literatur werden u.a. Methoden zur Bestimmung verschiedener Pyrethroidmetaboliten vorgestellt. Zur Bestimmung des Metaboliten Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA) im Urin gibt es derzeit nur eine publizierte Methode (Leng et al., 1999). CDCA wird nach Freisetzung aus seiner konjugierten Form mittels flüssig-flüssig-Extraktion aus dem Urin isoliert und nach Derivatisierung zum entsprechenden Methyl-, Ethyl- oder Propylester mit GC-MS quantitativ bestimmt.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die in den vorigen Abschnitten vorgestellten Insektizide und Akarizide werden in Innenräumen zur Bekämpfung von Schädlingen und Lästlingen eingesetzt. Dabei steht den gewerblichen und privaten Anwendern eine Vielzahl an Präparaten zur Verfügung. Untersuchungen haben gezeigt, dass die in den Präparaten enthaltenen Wirkstoffe häufig über längere Zeiträume, z.T. über Jahre, in Innenräumen (in den Matrices Luft, Schwebstaub, Hausstaub, Oberflächen) nachzuweisen sind und damit eine potenzielle Belastungsquelle für Bewohner darstellen. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob die Exposition gegenüber diesen bioziden Wirkstoffen gesundheitlich unbedenklich ist. Aus diesen Gründen ist es erforderlich, dass analytische Methoden zur Verfügung stehen, mit denen die Wirkstoffe bzw. deren Metabolite hinreichend gut bestimmt werden können.

Im Vorlauf wurden am Fraunhofer Institut in Hannover bereits Methoden zur Bestimmung von Pyrethrum und einzelner Pyrethroide in Innenraummatrices etabliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weiterführend standardisierte Probennahme- und Analyseverfahren zur gemeinsamen Bestimmung ausgewählter Wirkstoffe der wichtigsten Stoffklassen (v. a. Pyrethroide, Carbamate und Phosphorsäureester) in den Matrices Luft/Schwebstaub und Hausstaub zur Erfassung der äußeren Belastung sowie ein Biomonitoringverfahren (Urinmetabolite) zur Abschätzung der tatsächlichen internen Belastung der Bewohner mit Pyrethrinen und ausgewählten Pyrethroiden entwickelt und validiert werden.

Obwohl in der Literatur eine Vielzahl von analytischen Methoden für das Innenraummonitoring einzelner Wirkstoffe beschrieben ist, fehlen bis heute Multimethoden zur simultanen Bestimmung mehrerer Insektizide aus unterschiedlichen Pestizidklassen in der Raumluft und im Hausstaub. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Eignung der Sammelmedien Glasfaserfilter und Polyurethanschaum in Kombination für die simultane Luftprobennahme von Organophosphaten, Carbamaten und Pyrethroiden und die charakteristische Verteilung der Wirkstoffe auf die beiden Sammelmedien untersucht, je nachdem, ob sie gasförmig und/oder an Partikel gebunden vorliegen. Hierbei wurde erstmals der Einfluss der Probenmatrix auf die

quantitativen Ergebnisse (insbesondere bei quantitativer Bestimmung mit der Gaschromatographie) für die ausgewählten Wirkstoffe eingehend untersucht. Des Weiteren sollte eine immunologische Methode (ELISA) auf ihre Eignung zur Bestimmung von Typ II Pyrethroiden in der Raumluft und im Hausstaub getestet werden. Die ELISA-Methoden haben einerseits den Vorteil, dass sie schnell und kostengünstig sind, andererseits können fehlerhafte Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit strukturähnlichen Verbindungen bzw. durch Matrixeinflüsse erhalten werden. Daher sollten die Messwerte des ELISA-Tests mit den entsprechenden Ergebnissen aus gaschromatographischen Messungen verglichen werden.

Eine weitere Aufgabe war es, im Rahmen des Biomonitorings eine empfindliche Methode zur Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure im Urin als Biomarker für eine Exposition gegenüber Pyrethrinen, Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin zu entwickeln. Da bisher publizierte Methoden ungeeignet sind, auch kleine Konzentrationen ( $\leq 1 \mu\text{g/l}$  Urin) des Biomarkers zu erfassen, wurde eine neue Methode mit hoher Nachweisempfindlichkeit entwickelt und validiert.

Die Auswahl der Methoden und die Ergebnisse der experimentellen Arbeiten werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

## 2 GRUNDLAGEN DER PROBENAHEME, PROBENVORBEREITUNG UND INSTRUMENTELLEN BESTIMMUNG

### 2.1 Probenahme

Ziel der Probenahme ist es, repräsentative Proben zu gewinnen, die nach Durchführung des gesamten Analyseverfahrens eine problemorientierte Aussage anhand der Analysenergebnisse ermöglichen. Insofern kommt der korrekten, auf das analytische Problem zugeschnittenen, Probenahme eine wesentliche Bedeutung zu, ohne die eine sinnvolle und richtige Ergebnisbewertung nicht möglich ist.

#### 2.1.1 Luftprobenahme in Innenräumen

Anders als die Überwachung der Luftqualität der Außenluft und der Luftqualität am gewerblichen Arbeitsplatz ist die Beschaffenheit der Innenraumluft in nicht-gewerblich genutzten Räumen erst in den letzten Jahren verstärkt in das Interesse von Wissenschaft und Öffentlichkeit gerückt. Dies liegt in erster Linie an der zunehmenden Abdichtung der Gebäude gegenüber der Außenluft aus Energiespargründen und an den zunehmenden Schadstoffemissionen aufgrund der Verwendung neuartiger Materialien und Produkte (VDI, 1995).

Aus lufthygienischer Sicht hat die Verunreinigung der Innenraumluft durch organische Verbindungen eine große Bedeutung. Quellen von Luftverunreinigungen in Innenräumen sind z.B. Möbel, Bodenbeläge, Tapeten, Anstriche, Haushaltschemikalien, Textilien und raumlufttechnische Anlagen. Typische Raumluftkonzentrationen solcher Luftverunreinigungen bewegen sich meist im unteren  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ -Bereich, weshalb oft eine Anreicherung der organischen Spurenkomponenten notwendig ist (VDI, 2000).

Die Art und Weise der Probenahme hängt von der Fragestellung und der Kontaminationsquelle ab. Der Innenraum ist kein statischer Raum, so dass die Konzentration eines Schadstoffes in der Raumluft von der Quellart und -stärke, den raumklimatischen Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Luftwechselrate) und Abbauvorgängen abhängt. Ein Beispiel für eine kontinuierliche Quelle mit regelmäßigem Emissionsmuster ist z.B. die Ausdünstung von Formaldehyd aus Spanplatten. Die Anwendung von



Insektizidsprays stellt dagegen eine diskontinuierliche Quelle mit unregelmäßigem Emissionsmuster dar.

Die Messung von Innenraumluftverunreinigungen läuft meist in zwei Schritten ab: (1) Probenahme vor Ort mit einem möglichst handlichen und einfachen Gerät und (2) Analyse der Probe in einem Laboratorium. Methoden und Möglichkeiten zur Luftprobenahme und Analytik wurden bereits in Kapitel 1.4.1 dargestellt.

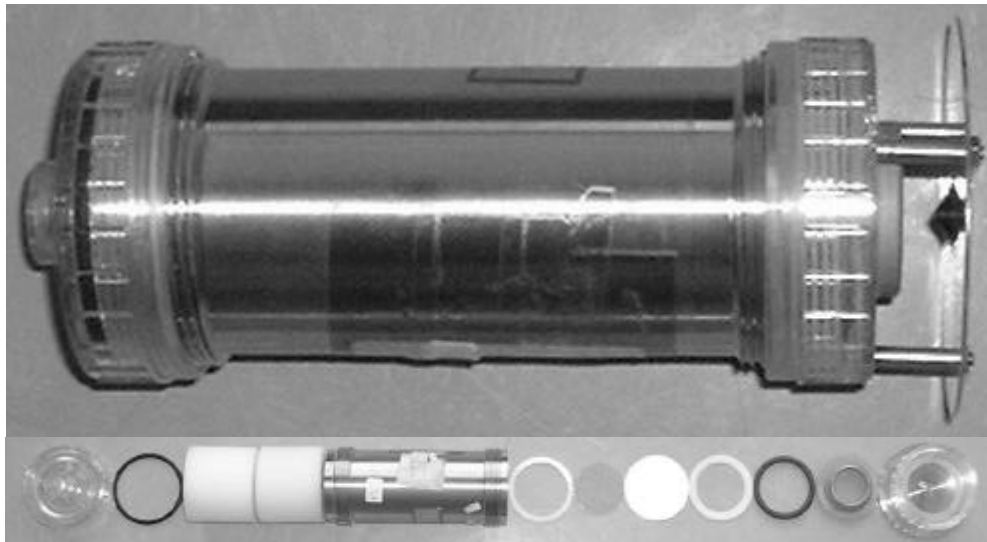
Zur Probenahme können sowohl aktive als auch passive Probenahmesysteme eingesetzt werden. Da Passivsammler nach dem Diffusionsprinzip arbeiten, eignen sie sich nur bei langen Probenahmezeiten  $\geq 8$  Stunden. Daher werden meist aktive Probenahmesysteme, bestehend aus einer Pumpe und einem Probenahmekopf mit dem Sammelmedium, verwendet.

Wenn das Sammelmedium es zulässt, kann eine hohe Anreicherung bei relativ geringem Zeitaufwand erreicht werden, indem Pumpen mit hohem Luftdurchsatz verwendet werden. Ein genormtes Probenahmesystem ist z.B. in der VDI Norm 2463 Teil 7 (VDI, 1982) beschrieben. Es besteht aus einer Pumpe mit einem Luftdurchsatz von etwa  $2,8 \text{ m}^3/\text{h}$  und einem rotationssymmetrischen Probenahmekopf zur Aufnahme eines Filters als Sammelmedium. Es gibt auch einen modifizierten Probenahmekopf, der zusätzlich zum Filter noch zwei Polyurethan-(PU)-Schäume als Sammelmedien aufnehmen kann (**Abb. 10**). Die Anströmgeschwindigkeit am Filter beträgt etwa  $0,6 \text{ m/s}$ .

Als Sammelmedium für partikelgetragene (an Schwebstaub gebundene) Stoffe in der Luft eignen sich Glasfaserfilter, Quarzfaserfilter oder Membranfilter aus z.B. PTFE, Cellulosenitrat, Celluloseacetat, Polycarbonat. Bei der Auswahl der Filter ist der Abscheidegrad, der Strömungswiderstand und die Inertheit des Filtermaterials entscheidend. Ein recht universeller Filter ist z.B. der Glasfaser-Rundfilter GF10 (Fa. Schleicher und Schüll), welcher einen Abscheidegrad von  $> 99 \%$  (Partikel  $\geq 0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , Anströmgeschwindigkeit  $0,6 \text{ m/s}$ ) bei relativ geringem Durchflusswiderstand ( $2240 \text{ N/m}^2$ ) besitzt (VDI, 1999a).

Als Sammelmedium für gasförmige Stoffe in der Luft werden anorganische Materialien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid, Aktivkohle und

Polymermaterialien wie XAD (Styrol), Tenax (Phenyl-Phenylenoxid) oder PU-Schaum verwendet. Aktivkohle eignet sich zum Sammeln sehr flüchtiger Komponenten (VOC: Very Volatile Organic Compounds), für weniger flüchtige Stoffe ist sie ungeeignet, da sich diese Substanzen kaum noch desorbieren lassen (Salthammer, 1999). Der PU-Schaum kann durch seine offenporige Zellstruktur auch bei hohen Durchflussraten verwendet werden (VDI, 1997a/b).



**Abb. 10:** Probenahmekopf zur Sammlung gasförmiger und partikelgetragener Substanzen in der Innenraumluft. Bauteile (von rechts nach links): Anströmplatte, abgerundete Einströmöffnung, Gummiring, Teflonring, Glasfaserfilter, Drahtnetz, Teflonring, Probenahmekopf mit Aufnahme für Filter und PU-Schäume, PU-Schaum 1 und 2, Gummiring, Anschlussgewinde (Pumpe).

Die Probenahme sollte nach der VDI-Norm normalerweise in einer Höhe von ca. 1 bis 1,5 m über dem Fußboden und etwa 1 m Abstand zur Wand erfolgen, kann aber bei speziellen Fragestellungen abweichen, z.B. bei Ermittlung der Belastung für krabbelnde Kindern (25 cm).

Das stündlich angesaugte Probenvolumen sollte nicht mehr als 10 % des Raumvolumens betragen, um Störungen des Gleichgewichtes der Raumatmosphäre durch die Probenahme zu vermeiden (luftreinigender Effekt).

### **2.1.2 Hausstaubprobenahme**

Der Hausstaub setzt sich aus einer Vielzahl natürlicher und anthropogener Stoffe zusammen (Haut, Haare, Textilienabrieb, Sand, Nahrungsreste,

Rußpartikel, Mikroorganismen etc.) und kann je nach Raumausstattung, Art der Bewohner und Stoffeintrag aus der Umgebung in seiner Zusammensetzung erheblich variieren. In Abgrenzung zum Schwebstaub, der aufgrund der Partikelgröße von  $\leq 30 \mu\text{m}$  in der Luft suspendiert vorliegt, sedimentiert sich Hausstaub als Niederschlag auf Oberflächen. Die Hausstaubpartikel weisen eine erheblich variierende Größenverteilung ( $\mu\text{m}$  bis  $\text{mm}$ ) auf. Der Anteil an organischem Material kann zwischen  $< 5$  und  $> 95 \%$  schwanken. Schwerflüchtige Substanzen können sich im Hausstaub anreichern. Stoffe lagern sich je nach ihren physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark an die einzelnen Korngrößenfraktionen des Hausstaubes an (VDI, 1999b).

Eine Darstellung der angewandten Methoden zur Hausstaubanalytik wurde bereits in Kapitel 1.4.2 gegeben. Die Hausstaubprobenahme kann prinzipiell aktiv durch Absaugen mit einem Staubsauger bzw. durch Abwischen (bei glatten Oberflächen) oder passiv durch Sammlung des Depositionsstaubes mit einem Auffanggefäß (bei Langzeituntersuchungen) erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass beim Absaugen mit einem Staubsauger Verluste bei flüchtigen Stoffen entstehen können. Außerdem kann eine zu geringe Ansauggeschwindigkeit oder eine elektrostatische Aufladung der zu beprobenden Oberfläche eine quantitative Sammlung des Hausstaubes erschweren. Leere Staubsaugerbeutel halten in der Regel nur Partikel  $> 10 \mu\text{m}$  vollständig zurück. Sobald der Beutel zu mehr als einem Drittel gefüllt ist, tritt dieses Problem aber in den Hintergrund.

Bei der weiteren Behandlung des Hausstaubes wird sehr unterschiedlich verfahren. Einerseits wird der Gesamtstaub analysiert (Berger-Preiß et al., 1997 a/b; Ball et al., 1993; Roinestad et al., 1993), andererseits wird der Hausstaub auf bestimmte Korngrößenfraktionen gesiebt, z.B.  $< 2 \text{ mm}$  (Krause et al., 1995; Friedrich et al., 1998; Berger-Preiß et al., 2002),  $< 150 \mu\text{m}$  (Lewis et al., 2001; ASTM, 1999) und  $< 63 \mu\text{m}$  (Walker et al., 1999; Butte et al., 2001; Gordon et al., 1999). Dabei ist zu beachten, dass die Pestizidkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen erhebliche Unterschiede aufweisen können. Im Allgemeinen steigt die Pestizidkonzentration mit abnehmendem Partikeldurchmesser (Lioy et al.,

2000), so dass in der  $< 63 \mu\text{m}$  Fraktion i.d.R. die höchsten Biozidkonzentrationen anzutreffen sind (Walker et al., 1999).

Dennoch wird nach den zur Zeit vorliegenden Erfahrungen die  $< 63 \mu\text{m}$  Fraktion für die Analytik favorisiert, da diese Fraktion am homogensten ist und die Ergebnisse hier am wenigsten streuen und somit gut reproduzierbar sind (Salthammer, 1999).

### **2.1.3 Urinproben**

Die Probenahme von Urin erfolgt meist als Spontanurin bei Kurzzeitexpositionen (1 Tag), z.B. nach der Arbeitsschicht, oder als 24-Stunden-Urin (Kurzzeit- oder Langzeitexposition). Falls möglich, ist immer der 24-Stunden-Urin vorzuziehen, da erfahrungsgemäß viele Stoffe einen circadianen Rhythmus der Ausscheidung zeigen (DFG, 1999). Zur genauen Vorgehensweise bei der Urinprobenahme gibt es entsprechende Richtlinien (EPA, 1996; Aprea et al., 2002). Die Sammlung des 24-Stunden-Urins sollte, anhängig vom Analyten, in Kunststoffgefäßen (PE, PP) oder Glasgefäßen erfolgen. Spielen adsorptive Effekte an Gefäßwandungen keine Rolle (z.B. chlorierte Kohlenwasserstoffe an Kunststoff), so sind Kunststoffgefäße vorzuziehen, da darin der Urin zum einen eine bessere Haltbarkeit aufweist und zum anderen zur Lagerung problemlos eingefroren ( $-18$  bis  $-21 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) werden kann. Die pH-Wert Messung des frischen Sammelurins ist wichtig bei sauren oder basischen Analyten. Instabile Substanzen müssen gegebenenfalls stabilisiert werden (z.B. durch Ansäuern des Urins, Zugabe der Säure vor der Sammlung). Am Ende der Probenahme ist das Gesamtvolumen festzustellen. Bis zur Probenaufarbeitung ist die Urinprobe im Kühlschrank ( $4$  bis  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aufzubewahren. Mit der Zeit erfolgt eine bakterielle Zersetzung des Urins, wodurch sich der pH-Wert in den alkalischen Bereich verschiebt. Es kommt auch zur Bildung von Bodensatz, weshalb darauf zu achten ist, dass die Probe dann vor der Analyse gründlich durchmischt wird (Okklusion des Analyten im Niederschlag). Zur Vermeidung eines Bodensatzes kann der Urin eingefroren oder z.B. durch Zugabe von 1 % Chloroform stabilisiert werden (Haltbarkeit bis zu 5 Wochen bei  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Kühn et al., 1996). Vor jeder Probenahme sollte, falls möglich, mindestens eine Leerwertprobe

des 24-Stunden-Urins genommen werden, damit eine eventuelle Hintergrundbelastung berücksichtigt werden kann (EPA, 1996). Je nach Exkretionscharakteristik des Analyten (Metaboliten) kann auch eine längere Probenahmedauer als 24 Stunden erforderlich sein.

## **2.2 Probenvorbereitung**

### **2.2.1 Extraktion**

Bei der Extraktion macht man sich die unterschiedlich starke Verteilung eines Analyten zwischen zwei nicht mischbaren Phasen (Extraktionsphase und Probenmatrix) zunutze. Das Ausmaß der Anreicherung in der einen Phase bzw. der Abreicherung in der anderen Phase wird durch den Nernst'schen Verteilungskoeffizienten  $K_{EP}$  beschrieben (Otto, 1995):

$$K_{EP} = \frac{C_E}{C_P}$$

Dabei sind  $C_E$  und  $C_P$  die Konzentrationen (korrekt: Aktivitäten) des Analyten in der Extraktionsphase (z.B. organisches Lösemittel) bzw. in der Probenmatrix (z.B. Wasser) (flüssig-flüssig Extraktion). Je höher der Wert für  $K_{EP}$  ist, desto effektiver ist die Extraktion. Da  $K_{EP}$  einen endlichen Wert hat, ist eine einmalige Extraktion niemals quantitativ. Durch mehrmalige Extraktion des Probenmaterials und entsprechende Wahl des Extraktionsmittels kann aber eine nahezu quantitative Extraktion erreicht werden.

Liegt die Extraktionsphase in festem Aggregatzustand vor, lässt sich der Verteilungskoeffizient folgendermaßen beschreiben (Pawliszyn, 2002):

$$K_{EP} = \frac{S_E}{C_P}$$

Hierbei ist  $S_E$  die Oberflächenkonzentration des Analyten, welcher adsorptiv an die Extraktionsphase gebunden ist (fest-flüssig Extraktion, Festphasenextraktion). Für eine effektive Extraktion ist also die Affinität des Analyten zur Extraktionsphase und die Größe der zur Verfügung stehenden Adsorptionsoberfläche bedeutsam.

Da die Gleichgewichtseinstellung aufgrund der langsamen Diffusionsvorgänge meist einige Zeit benötigt, ist es sinnvoll, die Extraktionsrate mittels intensiver Durchmischung der Phasen bzw. Einsatz

dünnen Schichten und damit einhergehender Verkürzung der Diffusionswege bzw. Erhöhung des Massentransfers zu steigern (Pawliszyn, 2002). So ist es auch einsichtig, dass eine mehrmalige Extraktion mit kleinen Lösemittelvolumina effektiver ist als eine einmalige Extraktion mit einem großen Lösemittelvolumen (Jennings und Rapp, 1983). Zur Verstärkung der Extraktionswirkung wird häufig mit Ultraschall gearbeitet. Flüssigkeiten werden durch Ultraschallwellen abwechselnd gedehnt (Unterdruckphase) und komprimiert (Überdruckphase), wobei sich mikroskopisch kleine Blasen bilden (bis 100  $\mu\text{m}$ ), die schließlich implodieren (Kavitation). Anfangs lösen sich die in der Flüssigkeit enthaltenen Gase in den Blasen, wodurch die Implosionen gedämpft werden und die Bläschen an die Oberfläche steigen (Entgasung von Lösemitteln). Später enthalten die Bläschen kaum noch Gase, so dass sich der Inhalt bei der Implosion stark erhitzt, was zu einer allmählichen Erwärmung der Flüssigkeit führt. Befinden sich feste Oberflächen in der Flüssigkeit, wird die Implosion der Bläschen so zur Oberfläche gerichtet, dass ein Flüssigkeitsstrahl entsteht, der mit sehr hoher Geschwindigkeit (bis zu 400 km/h) auf die Oberfläche prallt. Die bessere Extraktionswirkung ist also durch den Effekt der Kavitation bedingt und wird durch das zusätzliche Schwingen der zu extrahierenden Partikel und das Entstehen von Mikroströmungen unterstützt (Jatzwauk und Schöne, 2000).

Um das eingesetzte Lösemittelvolumen bei mehrmaliger Extraktion zu verringern, kann z.B. eine Soxhlet-Apparatur eingesetzt werden. Hierbei wird das Extraktionsmittel durch Destillation aus dem Extrakt und anschließende Kondensation zurückgewonnen und kann wiederholt für die Extraktion eingesetzt werden.

Das zur Extraktion verwendete Lösemittel muss einerseits geeignet sein, die Analyten aus der Probenmatrix zu lösen, andererseits sollte es kompatibel zu den verwendeten Analysemethoden sein. In der Gaschromatographie z.B. werden möglichst leichtflüchtige Lösemittel benötigt, welche die stationäre Phase der Trennsäulen nicht angreifen und die Chromatographie nicht stören.

Im Laufe der Zeit wurden neben der klassischen flüssig-flüssig Extraktion viele weitere Extraktionstechniken entwickelt, z.B. Festphasenextraktion

(SPE), Festphasenmikroextraktion (SPME), Headspace-GC, (Flüssig-) Membranextraktion, Extraktion mit überkritischen Phasen (SFE), Festphasen-Matrix-Dispersion (SPMD), Mikrowellen-unterstützte Extraktion und viele andere. Im Folgenden soll hier kurz auf die Festphasenextraktion als die weitverbreitetste und bedeutendste Extraktionstechnik eingegangen werden, welche auch in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat.

### **2.2.2 Extraktaufreinigung mittels Festphasenextraktion**

Die Festphasenextraktion (SPE) kann als alleinige Extraktionsmethode zur Isolierung und Anreicherung des Analyten aus der (flüssigen) Probenmatrix dienen oder sie kann sich z.B. einer vorangehenden Extraktion einer flüssigen oder festen Probe anschließen, um den erhaltenen Extrakt weiter aufzureinigen. Von beiden Möglichkeiten wurde in dieser Arbeit Gebrauch gemacht. Für die Festphasenextraktion gelten die Gesetzmäßigkeiten der Chromatographie (Näheres im entsprechenden Kapitel).

Als Festphasenmaterialien stehen verschiedenste Arten von Adsorbentien zur Verfügung (Simpson, 2000). Handelt es sich z.B. um Kieselgel (Abk.: Si), Aluminiumoxid oder Magnesiumsilikat (Florisil), so spricht man von Normalphasen (NP). Modifizierte Kieselgele mit unpolaren Gruppen (z.B. C8, C18) werden als Umkehr- oder Reversed-Phasen (RP) bezeichnet. Weiterhin gibt es Festphasenmaterial mit funktionellen Gruppen (z.B. Sulfonsäuren (SCX), quarternäre Amine (SAX)), welche Ionenaustauscherfunktionen ausüben können, um ionische Verbindungen selektiv zu adsorbieren. Ein Spezialfall der flüssig-flüssig Extraktion ist die Verwendung von trockenem Kieselgur als Festphasenmaterial zur Aufarbeitung wässriger Proben. Hierbei legt sich die wässrige Probe als dünner Film auf die Kieselgur-Partikel und wird dadurch zur quasistationären Phase, die dann durch Elution mit organischen hydrophoben Lösemitteln extrahiert werden kann. Neuerdings werden verstärkt Polymerphasen eingesetzt, die aufgrund ihrer pH-Beständigkeit, der Unempfindlichkeit gegenüber Trockenlaufen, der größeren Analyt-Kapazität und der Möglichkeit, mehrere Adsorptionsmechanismen zu kombinieren (Mixed-Mode-SPE, z.B. Reversed-Phase plus Ionenaustauscher), Vorteile gegenüber den herkömmlichen Phasen haben

(Hennion, 1999). Die NP-SPE wird angewandt, wenn die (relativ polaren) Analyten in einem unpolaren organischen Lösung (z.B. Hexan) vorliegen, während die RP-SPE verwendet wird, um die (relativ unpolaren) Analyten aus polaren Lösungen (z.B. Wasser) zu extrahieren. In beiden Fällen kommt die Adsorption vorwiegend durch van-der-Waals und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (z.T. auch Wasserstoffbrückenbindungen) zustande. Daher ist hierbei die Art des Lösemittels bzw. dessen Elutionsstärke von entscheidender Bedeutung, ob die Analyten von der Festphase retardiert (zurückgehalten) werden oder eluieren. Bei ionischen Verbindungen ist der pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Abhängig vom (eingestellten) pH-Wert der Probe und dem  $pK_S$ -Wert des Analyten liegt dieser dissoziiert oder undissoziiert vor, so dass entweder eine Ionenaustauscher-SPE oder eine RP-SPE durchgeführt werden kann. Liegt der Analyt dissoziiert vor, kann auch mit Hilfe eines Ionenpaar-Reagenz (Bildung eines unpolaren Komplexes bzw. Salzes) eine RP-SPE angewendet werden. Für die Aufarbeitung biologischer Proben werden häufig sogenannte Restricted-Access-Materialien verwendet (Poole, 2003). Dabei sind die niedermolekularen Analyten klein genug, um in die Poren des Festphasenmaterials hinein zu diffundieren und mit den dort angebrachten funktionellen Gruppen Wechselwirkungen eingehen zu können, wogegen hochmolekulare Bestandteile der Probenmatrix (z.B. Peptide, Proteine) unretardiert eluiert werden. Schließlich seien noch Immunoaffinitätsphasen und molekular-geprägte synthetische Polymere (MIP's) als Festphasenmaterialien erwähnt, die aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. wegen ihres sterischen Designs (genau festgelegte räumliche Anordnung funktioneller Gruppen) sehr spezifisch mit bestimmten Analyten wechselwirken können.

Die Festphasenextraktion gliedert sich im Allgemeinen in folgende Schritte: (1) Vorbereitung der SPE-Säule mit organischem Lösemittel (Aktivierung) und/oder Lösemittel der Probe (Konditionierung), (2) Probenaufgabe, (3) Spülen der Säule mit geeigneten Lösemitteln (bzw. Lösemittelgemischen) zur Entfernung von Bestandteilen der Probenmatrix und (4) Elution der Analyten von der Säule.



Von den genannten Arten der SPE wurden für die vorliegende Arbeit sowohl eine Normalphasen-SPE (Si) zur Extraktaufreinigung von Hausstaubproben (Ethylacetat-Extrakt), als auch eine Mixed-Mode-SPE (Polymer mit RP- und Anionenaustauscher-Eigenschaften) zur Anreicherung von Chrysanthemumdicarbonsäure aus Urin eingesetzt. Die Mixed-Mode-Phase bietet aufgrund ihrer bifunktionellen Wechselwirkungen die Möglichkeit, reinere Extrakte von Proben mit komplexer Matrix zu erhalten, als dies mit monofunktionalen Phasen möglich ist (Hennion, 1999; Simpson, 2000).

## **2.3 Derivatisierung**

### **2.3.1 Allgemeines**

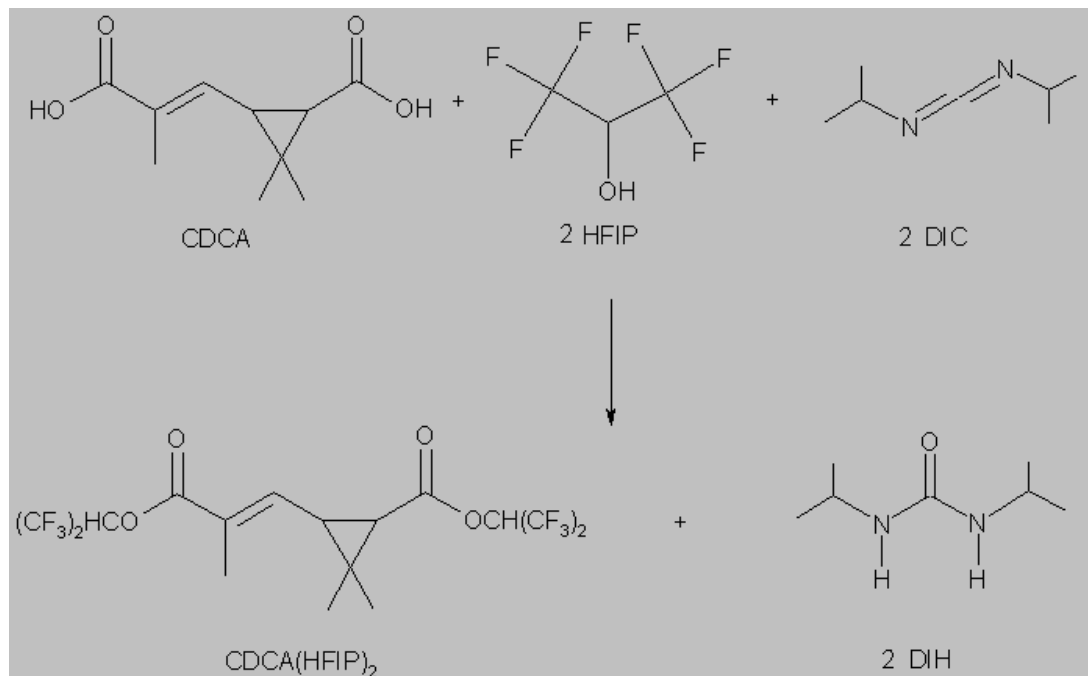
Die Derivatisierung ist eine weitverbreitete Technik in der Analytischen Chemie und vor allem in der Chromatographie (GC, HPLC). Dabei werden die Analyten mit bestimmten Reagenzien umgesetzt, um gezielt funktionelle Gruppen einzufügen (Moldoveanu und David, 2002). In der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird die Derivatisierung hauptsächlich dazu eingesetzt, um bestimmte Verbindungen im UV- oder Fluoreszenzdetektor überhaupt oder empfindlicher detektierbar zu machen (Einbau chromophorer Gruppen, z.B. Fluoreszenzmessung von Aminosäuren nach Umsatz mit Dansylchlorid). Dabei erfolgt die Derivatisierung i.d.R. nach der chromatographischen Auftrennung. Anders in der Gaschromatographie (GC), wo die Derivatisierung vor der chromatographischen Trennung erfolgt. Dort wird die Derivatisierung hauptsächlich dazu benutzt, nichtflüchtige Analyten in "GC-gängige" flüchtigere Derivate zu überführen oder die chromatographische Trennung von Analyten mit ähnlichem Retentionsverhalten zu verbessern (z.B. bessere Auftrennung von Propylestern gegenüber Methylestern). Eine weitere wichtige Anwendung, die auch in dieser Arbeit Verwendung fand, ist die Steigerung der Detektionsempfindlichkeit, z.B. durch Einführung von funktionellen Gruppen mit Halogenatomen (Elektrophore), welche mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder einem Massenspektrometer mit negativer chemischer Ionisation (NCI-MS) empfindlich gemessen werden können (Maurer, 2002). Die Fähigkeit, Elektronen einzufangen zu

können, nimmt in der Reihe der Halogene vom Jod zum Fluor ab. Da aber die Jod-, Brom- und Chlorverbindungen wesentlich weniger flüchtig sind als die entsprechenden Fluorverbindungen, werden primär Fluorelektrophore eingesetzt. Die relativen Elektroneneinfangkonstanten nehmen mit der Anzahl der Halogenatome X zu (-CX<sub>3</sub> : -CHX<sub>2</sub> : -CH<sub>2</sub>X = 60000 : 100 : 1) (Dressler, 1986). Ein zusätzlicher nützlicher Effekt bei Verwendung solcher Detektoren gegenüber unspezifischen Detektoren (z.B. FID) ist die bevorzugte Erfassung solcher funktioneller Gruppen, wodurch störende Signale von Matrixbestandteilen verringert werden.

### **2.3.2 Veresterung von Carbonsäuren mittels Carbodiimid-Kupplung**

Als Derivatisierungsmöglichkeiten für Carbonsäuren bieten sich vor allem die Veresterung mit Alkoholen sowie die Silylierung an (Blau und King, 1978; Knapp, 1979; Drozd, 1981). Um diese oft schwerflüchtigen Verbindungen "GC-gängig" zu machen und durch Adsorptionseffekte hervorgerufenen Peak tailing zu vermeiden, wird meist die schnell und einfach durchzuführende Silylierung vorgenommen (z.B. mit Trimethylchlorsilan (TCMS), Hexachlordisilazan (HDMS), N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)). Für die Veresterung sind in der Regel Katalysatoren notwendig (Säuren, Basen, Bortrifluorid, Kronenether etc.) oder das entstehende Reaktionswasser muss durch azeotrope Destillation bzw. Verwendung von Anhydriden entfernt werden (Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf die Produktseite). Auch die Umsetzung mit Diazoalkanen und die Umesterung zu höheren Alkoholen sind gängige Methoden. Sehr elegant und einfach lassen sich Veresterungen mit Kupplungsreagenzien wie Carbodiimiden (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)) durchführen. Ursprünglich eingesetzt in der Peptidsynthese zur Verknüpfung von Aminosäuren unter Ausbildung einer Amidbindung (Mortimer, 1990), lässt sich diese Reaktion auch zur Veresterung von Carbonsäuren mit Alkoholen einsetzen. Dabei abstrahiert ein Stickstoffatom des Carbodiimids zunächst das azide H-Atom der Carboxylgruppe. Im nächsten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des Carboxylat-Anions auf das C-Atom der Diimidbindung. Die so aktivierte Carbonsäure besitzt nun eine gute Abgangsgruppe. Es erfolgt eine

nukleophile Substitution durch den Alkohol unter Abspaltung des entsprechenden Harnstoffderivates (Christen und Vögtle, 1988). Für die Durchführung der Reaktion wird der Analyt meist im entsprechenden Alkohol gelöst und das Carbodiimid in leichtem Überschuss zugegeben. Gelegentlich werden tertiäre Amine wie Pyridin als Katalysatoren zugefügt (Blau und King, 1978). Bei Zugabe in großem Überschuss lassen sich die Carbonsäuren auch in unpolaren Lösemitteln wie Hexan mit Alkohol und Carbodiimid derivatisieren. Eine solche Reaktion ist am Beispiel von Chrysanthemumdicarbonsäure mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) und N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in **Abb. 11** dargestellt.



**Abb. 11:** Derivatisierung von Chrysanthemumdicarbonsäure mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) und N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC). DIH: N,N'-Diisopropylharnstoff.

Die Reaktion mit HFIP verläuft aufgrund des im Vergleich zu anderen Alkoholen niedrigen  $pK_S$ -Wertes sehr schnell. Verwendet man dagegen polarere Lösemittel, so wird die nukleophile Substitution durch den Alkohol zurückgedrängt und es bildet sich ein unreaktives N-Acyl-Harnstoffderivat (Mortimer, 1990). Da die Chrysanthemumdicarbonsäure zwei Carboxylgruppen besitzt, werden durch diese Derivatisierung insgesamt 12 Fluoratome in das Molekül eingebaut, so dass der Analyt sehr empfindlich mit den o. g. Techniken detektiert werden kann. Der bei der Reaktion

entstehende Harnstoff und überschüssiges HFIP werden nach der Derivatisierung durch wässrig-alkalisches Waschen entfernt.

## **2.4 Chromatographie**

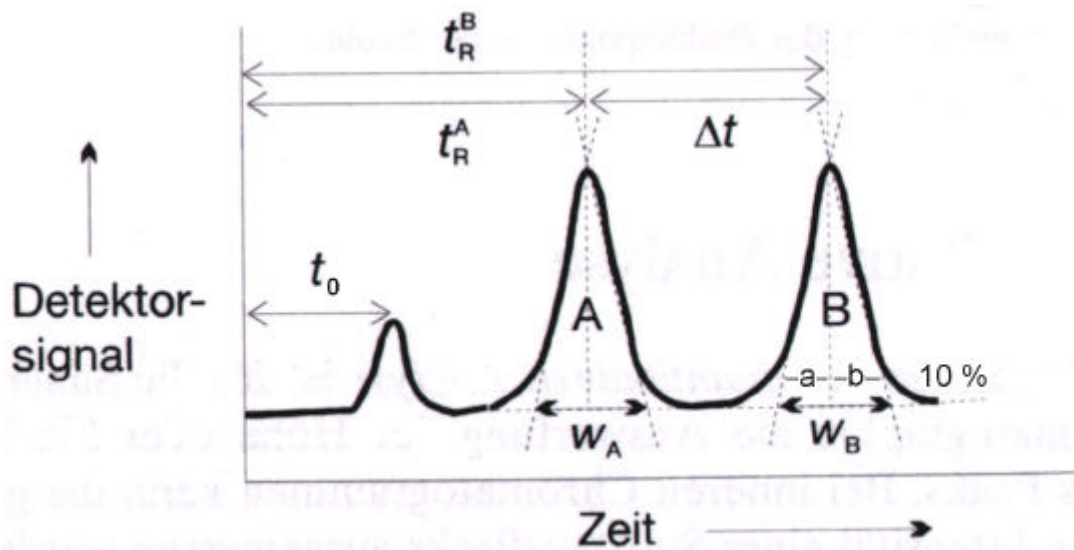
### **2.4.1 Allgemeines**

Die Chromatographie ist die heutzutage bedeutendste Technik zur Identifizierung und Quantifizierung organischer Stoffe in der apparativen chemischen Analytik (Karasek und Clement, 1988; Schwedt, 1994; Otto, 1995). Unter Chromatographie versteht man die physikalische Trennung von Stoffgemischen durch Adsorption an bzw. Verteilung in einer stationären (fest, flüssig, fluid) und einer sich an der stationären Phase vorbeibewegenden mobilen Phase (flüssig, gasförmig), welche untereinander nicht mischbar sind (Schwedt, 1996). Die Auftrennung der einzelnen Analyten beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im chromatographischen System. Die Entwicklung der Säulenchromatographie, insbesondere der Kapillargaschromatographie und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, erlaubt die Trennung komplexer Stoffgemische, wie sie z.B. in Umweltproben und Proben biologischen Materials vorkommen. Um eine qualitative und quantitative Aussage über die getrennten Stoffe zu erhalten, sind weitere Systeme (Detektoren) notwendig, die eine massen- oder konzentrationsabhängige Erfassung der Analyten unmittelbar nach der chromatographischen Trennung ermöglichen (Kopplung der Chromatographie mit Detektoren).

### **2.4.2 Chromatographische Leistungsparameter**

Die graphische Darstellung der Änderung des Detektorsignals (Y-Achse) mit der Zeit (X-Achse) wird als Chromatogramm bezeichnet (Otto, 1995). Die getrennten Substanzen werden nacheinander aus der Säule eluiert und vom Detektor erfasst. Im Chromatogramm erscheinen die einzelnen Substanzen als sogenannte Peaks, welche im Idealfall symmetrische Gaußkurven darstellen. Aus dem Chromatogramm lassen sich Kenngrößen zur Charakterisierung der Trennung ableiten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kenngrößen sollen kurz erläutert werden (siehe auch **Abb. 12**).

Damit die einzelnen Substanzen getrennt werden können, müssen sie sich in ihrer Aufenthaltsdauer in bzw. an der stationären Phase unterscheiden. Die Retentionszeit ( $t_R$ , gemessen im Peakmaximum) ist charakteristisch für jede Substanz und i. d. R. unabhängig von der Konzentration des Analyten im Eluenten (konstantes Verhältnis der Substanzmengen in stationärer und mobiler Phase). Ausnahmen hiervon sind z.B. Überladungseffekte. Die Retentionszeit ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit (Flussrate  $F$  in ml/min) des Eluenten und der Länge der Trennsäule. Sie setzt sich additiv aus der Aufenthaltszeit in der stationären Phase ( $t_R'$ , Netto-Retentionszeit) und der mobilen Phase ( $t_0$ , Totzeit) zusammen. Die Retentionszeit bzw. das Retentionsvolumen ( $V_R = t_R \times F$ ) dient zur Identifizierung der Substanz (gegenüber einem Standard), während die Signalhöhe eine Information über die Konzentration des Analyten im Eluenten gibt (Peakfläche proportional zur eingespritzten Stoffmenge) (Meyer, 1990).



**Abb. 12:** Erläuterung der chromatographischen Kenngrößen anhand eines Musterchromatogramms.  $t_R^{A,B}$ : Retentionszeiten der Analyten A und B;  $t_0$ : Retentionszeit einer unretardierten Substanz (Totzeit);  $w_{A,B}$ : Basisbreiten der Analytpeaks A und B; a und b: Zeitwerte zur Ermittlung des Asymmetriefaktors  $T = a/b$  (modifiziert nach Otto, 1995).

Das Verhältnis der Aufenthaltszeiten in der stationären und mobilen Phase wird als Kapazitätsfaktor  $k'$  ( $k' = t_R' / t_0$ ) bezeichnet. Der Kapazitätsfaktor ist unabhängig von der Säulenlänge und bei nicht zu hohen Flussraten auch

unabhängig von der Eluentengeschwindigkeit (Engelhardt, 1977). Die relative Retention  $\alpha$ , auch Trennfaktor genannt, ist der Quotient aus den Kapazitätsverhältnissen zweier Substanzen ( $\alpha = k_2'/k_1' = t_{R2}'/t_{R1}'$ ) und ein Maß für die Selektivität des Trennsystems. Haben beide Substanzen gleiche  $k'$ -Werte ( $\alpha = 1$ ), so können sie nicht voneinander getrennt werden (Meyer, 1992).

Die Auflösung zweier Peaks lässt sich aus den jeweiligen Retentionszeiten und den Peakbasisbreiten berechnen ( $R = 2([t_{R2} - t_{R1}]/[w_1 + w_2])$ ). Die Basisbreite  $w$  eines Peaks ergibt sich hierbei aus den Schnittpunkten der Wendepunkt tangentialen mit der Basislinie des Peaks ( $w = 4\sigma$  bei Gaußkurven,  $\sigma$ : Standardabweichung des Gaußpeaks). Ist  $R = 1$ , so überlappen sich die Peakflächen zweier benachbarter Peaks um 2 % ( $4\sigma$ -Trennung). Bei einer Auflösung von  $R = 1,5$  ( $6\sigma$ -Trennung) sind die Peakflächen vollständig getrennt. Wenn die Peakhöhen der benachbarten Peaks nicht zu unterschiedlich sind, sind daher Auflösungen von  $R = 1-1,5$  ausreichend für eine quantitative Bestimmung und höhere Auflösungen als 1,5 verlängern nur die Analysenzeit (Meyer, 1992; Otto, 1995).

Die Trennleistung wird durch die Trennstufen- bzw. Bodenzahl  $N$  ( $N = 16 (t_R/w)^2$ ) und die Trennstufen- bzw. Bodenhöhe  $H$  ( $H = L/N$ ,  $L$ : Länge der Trennsäule) charakterisiert. Die Bodenhöhe ist die Strecke, auf der sich das chromatographische Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase einmal einstellt (Meyer, 1992). Sie ist auch ein Maß für die Bandenverbreiterung, welche durch Diffusionsvorgänge (Eddy-Diffusion, Longitudinaldiffusion, Diffusion in und aus den Poren der stationären Phase) sowie durch unterschiedliche laminare Strömungen innerhalb der Trennsäule verursacht wird (Engelhardt, 1977). Je kleiner die Bodenhöhe und je größer die Bodenzahl, desto besser ist die Trennleistung und damit die erreichbare Auflösung zwischen den einzelnen Peaks.

In der Praxis sind die Peaks eines Chromatogramms oft nicht symmetrisch (Fronting, Tailing). Ein Maß hierfür ist der Asymmetriefaktor  $T$  ( $T = a/b$ ). Hierbei sind  $a$  und  $b$  Zeitwerte, welche sich aus der Distanz der Peakfront bzw. des Peakendes zum Lot vom Peakmaximum auf die Basislinie (gemessen in 10 % der Peakhöhe) ergeben. Bei  $T = 1$  ist der Peak vollkommen symmetrisch, bei  $T < 1$  liegt Peakfronting, bei  $T > 1$

Peaktailing vor. Bei Werten von z.B.  $T \geq 3$  wird die quantitative Peakflächenmessung fehlerhaft, weil nicht mehr genau erkennbar ist, wo der Peak die Nulllinie erreicht (Meyer, 1992).

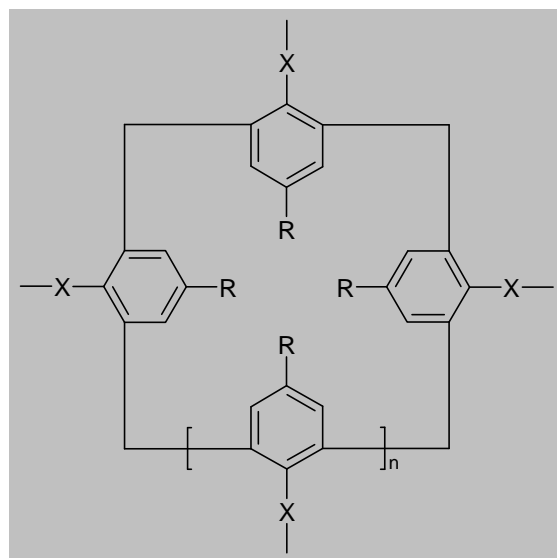
### **2.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Anders als bei der klassischen Säulenchromatographie, bei der sich die mobile Phase aufgrund der Schwerkraft durch die stationäre Phase bewegt, oder bei der SPE, bei der gelegentlich Vakuum angelegt wird, um eine Bewegung der mobilen Phase zu erreichen, wird bei der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) der Eluent aktiv durch die chromatographische Trennsäule (typisch: 50-250 cm lang, 2-4,6 mm ID) gepumpt (Parris, 1984). Um zur Erzielung einer hohen Trennleistung bei gleichzeitiger Minimierung der Peakdispersion im Optimum der Van-Deemter-Kurve arbeiten zu können, wird im analytischen Bereich mit kleinen Teilchen stationärer Phase (typisch: 3 bis 10  $\mu\text{m}$ ) und entsprechenden Flussraten (typisch: 0,5 bis 2 ml/min) gearbeitet (Skoog und Leary, 1996; Böcker, 1997). Deshalb sind hohe Drücke notwendig, um die mobile Phase mit der nötigen Geschwindigkeit durch die stationäre Phase durchzupressen, was ohne leistungsfähige Pumpen nicht möglich ist.

Die am häufigsten angewendete HPLC-Methode ist die sogenannte Reversed-Phase-HPLC unter Verwendung unpolarer stationärer Phasen (z.B. C18, siehe Kapitel SPE) und wässrig-organischer Lösemittel (Böcker, 1997; Schwedt, 1994). Als Eluenten dienen meist binäre Gemische aus Wasser und organischem Lösemittel wie Acetonitril oder Methanol. In der HPLC wird die Auftrennung der Analyten vorwiegend durch Variation der Eluentenzusammensetzung erreicht. Bei schwierigen Trennproblemen kann die Verwendung von ternären und quarternären Lösemittelgemischen hilfreich sein (Böcker, 1997). So wurden in der vorliegenden Arbeit mit einer C18-Säule und einem ternären Eluentengemisch aus Wasser, Acetonitril und Methanol gute Ergebnisse erzielt, da durch die veränderte Selektivität eine bessere Auftrennung gelang. Ein weiterer Vorteil der HPLC ist die Möglichkeit der Gradientenelution. Während bei der isokratischen Elution die Zusammensetzung des Eluenten konstant bleibt,

wird bei der Gradientenelution der organische Lösemittelanteil mit fortschreitender Analysendauer kontinuierlich erhöht. Dies ermöglicht einerseits, dass stärker retardierte Substanzen schneller eluieren (schärfere Peaks), und andererseits, dass wenig retardierte Substanzen trotzdem noch genügend aufgetrennt werden können. Ergebnis ist also eine kürzere Analysenzeit mit schärferen Peaks und oftmals besserer Auflösung. Besonders im Hinblick auf die Entwicklung von Multimethoden zur simultanen Analyse mehrerer Verbindungen ist die Gradientenelution der isokratischen Methode überlegen (Jandera und Churacek, 1985).

Als weitere stationäre HPLC-Phase wurden neuartige Calixarensäulen (Sokoließ et al., 2001), insbesondere im Hinblick auf die Trennung von Pyrethroiden, untersucht. Calixarene sind zyklische Kondensationsprodukte aus para-substituierten Phenolen und Formaldehyd. Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer kelchartigen Struktur (*griech.*: calix = Kelch). Wie die RP-Phasen werden die Calixarene chemisch an Silika-Trägermaterial gebunden. Es werden folgende Calixaren-Säulentypen eingesetzt (**Abb. 13**):



**Abb. 13:** Struktur von Calixarenen. X: Spacer zum Silikagel; R: H oder Alkyl-; n = 1, 3 oder 5.

Die Calixarene vereinigen die Trennmechanismen der RP (z.B.  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen von Halogenen mit dem aromatischen System) und des Größenausschlusses in sich. Calixarene mit n = 1 eignen sich z.B. zur



Trennung von kleineren Molekülen wie z.B. pharmazeutischen Wirkstoffen oder Pestiziden, wogegen solche mit  $n = 3$  besser für große Moleküle wie Peptide geeignet sind. Der Alkylrest bewirkt eine Aufweitung des Hohlraumes, so dass Moleküle besser in die Calixarene hineindiffundieren können. Die Phasen vertragen 100 % Wasser als Eluent.

#### **2.4.4 Kapillargaschromatographie (Kapillar-GC)**

Die Kapillargaschromatographie ist die am häufigsten eingesetzte Technik in der Pestizidanalytik (van der Hoff und van Zoonen, 1999). In der Kapillargaschromatographie benutzt man als Trennsäulen sehr lange Quarzkapillarsäulen (*engl.*: fused silica columns) mit geringem Innendurchmesser (Helmig, 1999). In dieser Arbeit wurde eine 60 m Säule mit einem ID von 250  $\mu\text{m}$  benutzt. Damit die Säulen nicht brechen, sind sie mit einer Polyimidbeschichtung überzogen, so dass sie sich platzsparend aufwickeln und in den Säulenofen einbauen lassen. Im Gegensatz zu gepackten Säulen ist die stationäre Phase an der Säulenwandung angebracht (WCOT: wall coated open tubular, Schichtdicken 0,1 bis 5  $\mu\text{m}$ ). Bei konstantem ID der Säule nimmt die Trennleistung, die Eignung für schwerer flüchtige Substanzen und die Verkürzung der Analysenzeit aufgrund geringerer Elutionstemperaturen mit abnehmender Schichtdicke zu. Allerdings wird dann auch die Beladungskapazität geringer (Hübschmann, 1996). Insofern ist die Schichtdicke der verwendeten Säule (0,25  $\mu\text{m}$ ) für den Zweck der Rückstandsanalytik optimiert. Häufig werden als stationäre Phase Silicone verwendet, im vorliegenden Fall ein relativ unpolares Phenylmethylsilicon (5 % Diphenyl-, 95 % Dimethylpolysiloxan). Als mobile Phase dient ein Trägergas (He, Ar, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). Die Wahl des Trägergases ist abhängig vom verwendeten Detektor und der Probe. Helium ist ein universell einsetzbares Trägergas, da es sich zum einen sicher handhaben lässt und zum anderen das Optimum der Van-Deemter-Kurve bei einer relativ hohen linearen Fließgeschwindigkeit (24 cm/s) liegt, wodurch kurze Analysenzeiten möglich sind (Hübschmann, 1996; Böcker, 1997). Auch höhere Trägergasgeschwindigkeiten sind dank des flachen Anstiegs der Van-Deemter-Kurve ohne großen Verlust an Trennleistung möglich. Außerdem ist Helium besonders zur Kopplung der GC mit der

Elektronenstoßmassenspektrometrie geeignet, da es eine kleine Masse und eine hohe Ionisierungsenergie besitzt (Chapman, 1994).

Für die Gaschromatographie eignen sich nur Verbindungen, die sich in einem Temperaturbereich von 50-300 °C (Stabilitätsbereich der Säulen) unzersetzt im Injektor verdampfen lassen oder unter Zersetzung reproduzierbar verdampfbar sind (Schwedt, 1994). Nichtflüchtige Stoffe, z.B. Carbonsäuren, lassen sich aber meist durch chemische Umsetzung (wie im Kapitel Derivatisierung beschrieben) in flüchtige Derivate umwandeln, die dann mit der GC analysiert werden können. Insgesamt lassen sich so etwa 20-25 % aller organischen Verbindungen mit der GC untersuchen (Karasek und Clement, 1988; Oehme, 1996).

Die Trennung der einzelnen Verbindungen einer Probe erfolgt aufgrund unterschiedlicher Dampfdrücke (Temperaturprogramm) und unterschiedlich starker Wechselwirkung mit der stationären Phase. Verbindungen mit gleichem Dampfdruck können also getrennt werden, wenn sie unterschiedlich mit der stationären Phase wechselwirken und umgekehrt. Aufgrund des gasförmigen Zustandes (hohe Diffusionsgeschwindigkeiten der Substanzen) erfolgt die Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase in sehr rascher zeitlicher Abfolge, wodurch eine im Vergleich zur HPLC hohe Trennleistung bei kurzer Analysendauer ermöglicht wird (Kientz, 1998; Niessen, 2001).

Da durch Anwendung eines Temperaturprogramms zur gaschromatographischen Trennung eines Substanzgemisches die physikalischen Eigenschaften des Trägergases (Viskosität, Kompressibilität) verändert werden, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, den Trägergasfluss zu regeln: (a) konstanter Säulenvordruck bei veränderlicher Trägergasgeschwindigkeit und (b) konstante Trägergasgeschwindigkeit bei variablem Säulenvordruck. In dieser Arbeit wurde von Variante b Gebrauch gemacht (*engl.*: "constant flow mode"), bei der der Säulenvordruck mit zunehmender Temperatur erhöht wird, um die Flussrate konstant zu halten (Viskosität des Trägergases steigt mit zunehmender Temperatur).

## **2.5 Detektion**

### **2.5.1 UV- und Diodenarray-Detektor**

In der HPLC werden hauptsächlich Detektoren zur photometrischen Messung von Lichtabsorptionen oder -emissionen (UV, Fluoreszenz) durch Analyten im Eluenten verwendet (Scott, 1986; Otto, 1995). Im Gegensatz zu herkömmlichen UV-Detektoren, welche nur eine vorher eingestellte Wellenlänge oder bestimmte in Zeitfenstern festgelegte Wellenlängen (programmierbarer UV-Detektor) detektieren, kann der in dieser Arbeit eingesetzte Photodiodenarray-Detektor zu jedem Zeitpunkt im Chromatogramm einen ganzen Wellenlängenbereich (190-400 nm) erfassen. Man erhält ein dreidimensionales Chromatogramm mit zusätzlicher Wellenlängenskala als z-Achse (x-Achse: Retentionszeit; y-Achse: Absorption). Der Vorteil liegt darin, dass zur Identifizierung einer Substanz neben der Retentionszeit zusätzlich das UV-Spektrum herangezogen werden kann. Bei sehr ähnlichen Verbindungen bringt diese zusätzliche Möglichkeit jedoch meist keinen Vorteil, da sich die UV-Spektren sehr stark ähneln. Der Photodiodenarray-Detektor bietet darüber hinaus bei der HPLC-Methodenentwicklung den Vorteil, dass sich mit Hilfe der UV-Spektren oftmals Peaküberlagerungen einfach erkennen lassen. Die Analyten müssen natürlich ein UV-aktives Chromophor besitzen, um detektiert werden zu können (Huber und George, 1993).

### **2.5.2 Quadrupol-Massenspektrometrie (Elektronenstoß- und chemische Ionisation)**

Die Massenspektrometrie ist die am häufigsten eingesetzte Technik zur Charakterisierung chromatographischer Peaks (GC-MS, GC-MS<sup>n</sup>, LC-MS, LC-MS<sup>n</sup>) (Böcker, 1997). Hiervon macht die einfache GC-MS-Kopplung noch immer den Hauptanteil aus, während die anderen Kopplungen (insbesondere LC-MS<sup>n</sup>) aufgrund der technischen Weiterentwicklung der Interfaces und der damit verbundenen höheren Robustheit in Zukunft die Spitzenstellung auch in der Routineanalytik einnehmen werden (Niessen, 1999 und 2001). Als Detektor für die Gaschromatographie wurde ein Quadrupol-Massenspektrometer verwendet. Zusammen mit den Ionenfallen sind sie heutzutage die am häufigsten eingesetzten

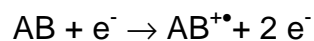
(niedrigauflösenden) massenspektrometrischen Detektoren. Gründe hierfür sind die schnelle Signalregistrierung (wichtig für eine Kopplung mit der Chromatographie), der relativ günstige Preis und die Robustheit der Geräte (Otto, 1995; Oehme, 1996; van der Hoff und van Zoonen, 1999; Cserhati, 2002). Neuerdings werden jedoch auch Flugzeitmassenspektrometer (TOF: Time Of Flight) Geräte verwendet. Die genaue Funktionsweise der Massentrennung und -detektion in (Quadrupol-) Massenspektrometern wurde in der Literatur ausführlich beschrieben, weshalb für detaillierte Informationen hierauf verwiesen wird (Campana, 1980; Batey, 1987; Chapman, 1994; Oehme, 1996; Skoog und Leary, 1996; Hübschmann, 1996; Budde, 2001; Gross und Caprioli, 2003). Die massenspektrometrische Detektion eignet sich besonders für die Spurenanalytik, da sie neben den immunologischen Methoden (siehe nächstes Kapitel) und der Messung des radioaktiven Zerfalls die empfindlichste derzeit bekannte Messmethode darstellt (Oehme, 1994; Oehme, 1996).

Das Massenspektrometer ist ein ähnlich universeller Detektor wie z.B. der Diodenarray-Detektor in der HPLC. Im Falle der Elektronenstoßionisation (EI) werden sämtliche gasförmige Verbindungen in der Ionenquelle ionisiert und die Fragmente nach Trennung aufgrund ihres unterschiedlichen Masse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) detektiert. Die ionisierten Moleküle zerfallen oft in strukturspezifische Fragmente, welche charakteristisch für die entsprechende Substanz sind. In Analogie zum Diodenarray-Detektor bei der HPLC erhält man also zur Identifizierung einer Substanz neben der Retentionszeit aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) zusätzlich noch das jeweilige Massenspektrum. Im Falle der EI gibt es gut untersuchte Gesetzmäßigkeiten der Fragmentierung (Budzikiewicz, 1992; McLafferty und Turecek, 1993; Hesse et al., 2002), so dass wichtige Hinweise zur Strukturaufklärung unbekannter Substanzen gewonnen werden können. Ferner existieren für die EI umfangreiche Spektrenbibliotheken (NIST, 2002), welche die Suche nach unbekanntem Verbindungen in der Probe erleichtern. Damit die Ionen eine genügend freie Weglänge haben, muss im Hochvakuum ( $\leq 10^{-5}$  mbar)

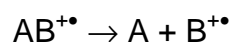
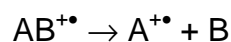
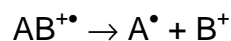
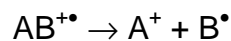
gearbeitet werden. Die freie Weglänge beträgt ca. 100 cm bei  $10^{-5}$  mbar und ca. 1 cm bei  $10^{-3}$  mbar (Message, 1984; Oehme, 1996).

Die Empfindlichkeit des Quadrupol-Massenspektrometers kann noch gesteigert werden, indem anstatt eines Massebereiches ( $m/z$  50-550, SCAN-Modus) nur substanzspezifische Ionenspuren (i.d.R. zwei pro Substanz, SIM-Modus) gemessen werden (selektive Detektion). Im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) wird damit eine um den Faktor 10-100 höhere Empfindlichkeit erzielt, da mehr Messzeit pro Ion zur Verfügung steht (Chapman, 1994; Oehme, 1996). Da bei dieser Technik das komplette Massenspektrum einer Substanz nicht aufgenommen wird, wird das Intensitätsverhältnis der ausgewählten Ionenspuren zueinander zur Absicherung der Identifizierung herangezogen. Dieses muss innerhalb bestimmter Grenzen (erfahrungsgemäß:  $\pm 20\%$ ) konstant bleiben.

Die EI ist eine relativ "harte" Ionisierungstechnik. Die Elektronen müssen genügend kinetische Energie besitzen (festgelegt auf 70 eV zur optimalen Ionenausbeute und zur Vergleichbarkeit von Massenspektren), um die Analyten in Ionen überführen zu können (benötigt werden meist  $\geq 15$  eV; Hübschmann, 1996). Sie ist die am häufigsten verwendete Ionisierungsmethode (Standardionisierungsverfahren). Es werden vorwiegend positive Ionen gebildet (Budzikiewicz, 1992; Chapman, 1994; Otto, 1995):



Der weitere Zerfall ist von der Überschussenergie und der Fähigkeit zur inneren Stabilisierung abhängig:



Häufig ist der Molekülionenpeak aufgrund der starken Fragmentierung nicht der intensivste Peak im EI-Massenspektrum, manchmal fehlt er sogar ganz. Isotopenpeaks im Massenspektrum können wichtige Hinweise auf bestimmte Elemente im Molekül geben (z.B. relative Häufigkeit  $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl} \cong 3/1$ ,  $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br} \cong 1/1$ ).

Die chemische Ionisation (CI) ist eine "weiche" Ionisierungstechnik (Jennings, 1979; Harrison, 1992). In die Ionenquelle wird ein Überschuss an Reaktandgas (z.B. Methan, ca. 1 mbar) eingebracht, das von den Elektronen ionisiert wird. Die Reaktandgasionen (bei Methan zu 98 %  $\text{CH}_5^+$  und  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  im positiven Modus, PCI) ionisieren dann in einem zweiten Schritt die Probenmoleküle durch Ladungsübertragung, Ionen-Molekül-Reaktionen (Protonen- oder Hydridtransfer, echte CI) oder Adduktbildung. Als Ergebnis erhält man zumeist Massenspektren mit wenigen Fragmentationenpeaks und einem intensiven Quasimolekülionenpeak. Daher wird die chemische Ionisation vorwiegend zur Analyse bekannter Verbindungen bzw. zur Ermittlung der Molmasse benutzt (Hübschmann, 1996).

In dieser Arbeit wurde die chemische Ionisation im negativen Modus (NCI) verwendet. Die von der Ionenquelle emittierten Elektronen werden durch Kollision mit dem Reaktandgas (Methan) in energiearme thermische Elektronen überführt, welche durch Verbindungen mit hoher Elektronenaffinität unter Bildung negativer Ionen ( $\text{M}^-$ ) eingefangen werden können (Analogie zum Elektroneneinfangdetektor). Dabei muss die Elektronenaffinität des Probenmoleküls größer als die des Reaktandgases sein. Insbesondere halogenhaltige Verbindungen erfüllen diese Eigenschaft, weshalb sie mit dieser Technik sehr selektiv und empfindlich nachgewiesen werden können (Harrison, 1992; Chapman, 1994; Maurer, 2002). Die NCI-MS kann um den Faktor 100-1000 empfindlicher sein als die PCI-MS. Mit der NCI-MS wurden die bis dato niedrigsten Nachweisgrenzen (bis zu  $10^{-16}$  g) in der organischen Massenspektrometrie erreicht. In der Praxis hat sich gezeigt, dass Substanzen mit  $\geq 5-6$  Halogenatomen einen höheren Response zeigen als in der EI-MS (Rosen, 1987; Hübschmann, 1996). Um einen hohen Response für den Pyrethroid-Metaboliten zu bekommen, müssen daher soviel Halogenatome wie möglich mittels Derivatisierung in das Molekül eingebaut werden.

## **2.6 Immunologische Bestimmungsmethoden (ELISA)**

Immunologische Methoden bedienen sich der Antigen-Antikörper-Reaktion zum Nachweis von biologisch aktiven Stoffen (Antigenen) oder sogenannten Haptenen (niedermolekularen Stoffen, die nicht immunogen wirken, in Verbindung mit einem Trägerprotein). Sie sprechen daher sehr spezifisch auf bestimmte Wirkstoffe oder Wirkstoffgruppen an (Schwedt, 1996; Weller, 1997). Die Antigen-Antikörper-Reaktion beruht auf einer nichtkovalenten Bindung unter Ausbildung eines Immunkomplexes aufgrund der sterisch passenden Konfiguration des Antigens zu einem bestimmten Teil (aktives Zentrum) des Antikörpers nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Zur Detektion können die Messung von Lumineszenzerscheinungen, enzymatischen Aktivitäten oder Radioaktivitäten herangezogen werden. Als wichtige immunochemische Verfahren sind die Bioaffinitätschromatographie, der Radioimmunoassay (RIA, radioaktive Detektion) und der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA, enzymatische Detektion) zu nennen (Schwedt, 1994; Otto, 1995). Sie besitzen vor allem in der Drogen- und Hormonanalytik eine herausragende Bedeutung.

Es gibt kompetitive ELISA sowie direkte (nicht-kompetitive) und indirekte Sandwich-ELISA. Als wichtigster Vertreter sei der in dieser Arbeit verwendete kompetitive ELISA näher vorgestellt.

Beim kompetitiven ELISA konkurrieren Analytmoleküle und durch Enzymmarkierung modifizierte Antigene (z.B. mit Meerrettich-Peroxidase markiertes Cypermethrin) um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen der auf einem Trägermaterial (Mikrotiterplatten) immobilisierten Antikörper (Hock et al., 1995; Oepkemeier et al., 1999; Shan et al., 2000; Watanabe et al., 2001; Lee et al., 2002). Je mehr Analytmoleküle in der Probe vorhanden sind, desto weniger enzymmarkierte Antigene können an die Antikörper binden und umgekehrt. Nichtgebundene Antigene werden durch einen Waschschrift entfernt. Nach Zugabe eines Farbreagens als Substrat wird durch die an den Antikörpern gebundenen Antigen-Enzym-Komplexe ein (meist gelber) Farbstoff freigesetzt, der photometrisch gemessen wird. Die Konzentration der Analytmoleküle in der Probelösung ist also umgekehrt proportional zur Farbintensität. Es ergibt sich eine sigmoide Kalibrierkurve, deren linearer Abschnitt zur quantitativen Auswertung herangezogen wird. Der in dieser

Arbeit untersuchte ELISA detektiert empfindlich Pyrethroide vom Typ II, ist also gruppenspezifisch, und liefert damit einen Summenwert bei gleichzeitiger Anwesenheit mehrerer Typ II Pyrethroide in der Probelösung. Kreuzreaktionen mit ähnlichen Verbindungen sind bei immunologischen Methoden immer zu beachten. Hierdurch können die Messergebnisse beeinflusst werden, im vorliegenden Fall z.B. durch Typ I Pyrethroide.

## **2.7 Strukturaufklärung mit Kernresonanzspektroskopie**

### **2.7.1 Allgemeines**

Es soll hier nur kurz das Prinzip der Methode erklärt werden. Für eine ausführliche Darstellung wird auf die Literatur verwiesen (Günther, 1998). Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist die wichtigste Methode für die Strukturaufklärung in der analytischen Chemie (Otto, 1995). Sie beruht auf der Resonanz-Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und in einem äußeren Magnetfeld  $B_0$  befindlichen Atomkernen. Hierbei macht man sich das magnetische Moment  $\mu$  zunutze, welches Atomkerne mit einem Kernspin (Kerne mit ungerader Protonen- oder Neutronenzahl) besitzen. Beispiele für NMR-aktive Atomkerne sind  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  und  $^{31}\text{P}$ . Bringt man diese Atomkerne in ein magnetisches Feld, so führen sie eine Präzessionsbewegung (Kegel-Kreisbewegung eines Kreisel) mit der Lamorfrequenz  $\nu_L$  um die Richtung des  $B_0$ -Feldes aus. Spins und magnetisches Moment können sich dabei nur in bestimmten Richtungen des äußeren Magnetfeldes einstellen. Bei einer Kernspinquantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  (wie es beim  $^1\text{H}$  der Fall ist) ergeben sich zwei Einstellmöglichkeiten der Kernspins (parallele oder antiparallele Ausrichtung zum magnetischen Feld), wobei die parallele Ausrichtung energetisch bevorzugt ist (Boltzmann-Verteilung). Übergänge zwischen diesen beiden Energiezuständen sind durch Aufnahme von Energiequanten möglich, deren Frequenz der Lamor-Frequenz entspricht. Diese Energieabsorption wird als NMR-Signal registriert. Die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung im Resonanzfall ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$\nu_L = \frac{\tilde{a}}{2\pi} B_0$$



Hierbei ist  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis, eine für jeden Atomkern typische Stoffkonstante. Jedoch gibt es für Atome einer Kernart (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) keine allgemeingültige Resonanzbeziehung. Die exakte Resonanzfrequenz hängt vom Bindungszustand des betreffenden Kerns ab, da am Ort des Kerns nur ein durch die äußere Elektronenhülle abgeschwächtes Magnetfeld  $B_{0,\text{eff}}$  wirksam wird (Abschirmungseffekt). Dieses Phänomen bezeichnet man als chemische Verschiebung ( $\delta$  [ppm] =  $10^6 \cdot (v_{\text{Probe}} - v_{\text{Standard}}) / v_0$ ;  $v_0$ : Arbeitsfrequenz des Spektrometers), welches beispielsweise bei Protonen dazu führt, dass sich die Resonanzfrequenzen einzelner Protonen bei konstantem  $B_0$  um bis zu ca. 15 ppm unterscheiden können.

Bei der heute üblichen FT-NMR-Spektroskopie werden die unterschiedlich gebundenen Kerne (einer Kernart) über einen starken HF-Impuls, welcher alle Frequenzkomponenten enthält, gleichzeitig angeregt. Nach der Anregung wird der zeitliche Abfall der Signale registriert (Impulsinterferogramm,  $F(t)$ ) und daraus mittels Fouriertransformation das entsprechende NMR-Spektrum ( $F(\nu)$ ) berechnet. Die drei wichtigsten Informationen, die dem NMR-Spektrum entnommen werden können, sind die Signallage (chem. Verschiebung  $\delta$ ), die Feinstruktur der Signale (Kopplungsmuster und Aufspaltung) und die Signalintensität. Während  $\delta$  durch die Elektronendichte (abhängig von Bindungszustand) am Ort des Kerns bestimmt wird, hängt die Feinstruktur der Signale von der Wechselwirkung benachbarter Kerne mit  $B_0$  ab (indirekte Kernspinkopplungen). Im  $^1\text{H}$ -Spektrum lassen sich aus dem Kopplungsmuster Rückschlüsse auf die Zahl der an benachbarte Kohlenstoffatome gebundenen Protonen ziehen. Die Größe der Signalaufspaltung (Kopplungskonstante  $J$ ) liefert Informationen über die stereochemische Konfiguration. Die Signalintensität ist (bei Einhaltung bestimmter Randbedingungen) streng proportional zur Anzahl der Protonen, welche das entsprechende Signal bilden, proportional zur Konzentration der betreffenden Verbindung in der Lösung, sowie umgekehrt proportional zu deren Molekulargewicht. Daher können in der NMR-Spektroskopie quantitative Bestimmungen nach folgender Gleichung durchgeführt werden (Kasler, 1973; Günther, 1998; Hesse et al., 2002):

$$C_X = \frac{C_S \cdot R_S \cdot n_S \cdot A_X \cdot M_X}{n_X \cdot A_S \cdot M_S}$$

Hierbei sind  $C_X$  bzw.  $C_S$  die Massenkonzentrationen des Analyten X bzw. des Standards S in der Lösung,  $A_X$  und  $A_S$  die Integralflächenwerte der entsprechenden Protonensignale,  $n_X$  bzw.  $n_S$  die Anzahl der Protonen, welche die Signalintegralflächen  $A_X$  bzw.  $A_S$  hervorrufen,  $M_X$  bzw.  $M_S$  die relativen Molmassen und  $R_S$  die Reinheit des Standards.

### **2.7.2 NMR: hilfreiche Technik zur Herstellung eines Vergleichsstandards**

Bei der quantitativen Bestimmung mit chromatographischen Verfahren muss für jede zu bestimmende Verbindung eine Kalibrierung erstellt werden, damit der jeweilige Detektorresponse (Messwert) einer realen Konzentration zugeordnet werden kann (relatives Verfahren). Die für die Kalibrierung verwendeten Substanzen (Kalibrierstandards) müssen daher über definierte Gehalts- und Reinheitsangaben verfügen und werden zumeist kommerziell bezogen. Ist dies wie im Falle neuer Metabolite nicht möglich, müssen diese Substanzen selbst synthetisiert werden. Kann dies aus Kostengründen nur in kleinen Mengen erfolgen, so lassen sie sich in der Regel bezüglich ihrer Reinheit nicht so umfassend charakterisieren wie kommerziell erhältliche Kalibrierstandards. Sie werden daher nachfolgend als Vergleichsstandards bezeichnet. Für die Gehaltsbestimmung des Vergleichsstandards in der zur Kalibrierung eingesetzten Lösung kann die NMR-Methode vorteilhaft eingesetzt werden, einerseits, weil es sich um eine Absolutmethode handelt, die es erlaubt, die Gehaltsbestimmung des Vergleichsstandards gegen einen weiteren frei wählbaren (und umfassend charakterisierten) Standard durchzuführen, und andererseits, weil dafür nur sehr kleine Substanzmengen (50-100 µg) benötigt werden (Berger-Preiss et al., 1997b). Bei einem Signal-/Rauschverhältnis > 100 kann die Bestimmung mit einer Genauigkeit von 1-2 % durchgeführt werden (Godejohann und Preiss, 1998; BAM, 2000 und 2002). Gleichzeitig können im NMR-Spektrum mögliche Verunreinigungen durch organische Verbindungen (Synthesenebenprodukte, Restlösemittel) erkannt werden. Zweckmäßigerweise wird die NMR-Gehaltsbestimmung in einem GC-kompatiblen Lösemittel durchgeführt, damit die Lösung danach unmittelbar

bzw. nach entsprechender Verdünnung für die Kalibrierung des GC-Verfahrens eingesetzt werden kann.

## **2.8 Validierung von Analysenverfahren**

### **2.8.1 Allgemeines**

Die Validierung von Analysenverfahren ist ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung im Labor und zur Vergleichbarkeit von Messergebnissen auf nationaler und internationaler Ebene. Als Beispiel sei hier die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) genannt (BfR, 2003). Prüflaboratorien müssen heutzutage im Allgemeinen akkreditiert sein (ISO 17025, DIN/EN 45000ff, DIN/EN 9000ff), damit die produzierten Prüf- und Kalibrierergebnisse vergleichbar sind und allgemein akzeptiert werden. Dies ist insbesondere wichtig bei der Überwachung von Grenzwerten und zur Transparenz in Gerichtsverfahren. Aufgrund der geforderten Rückverfolgbarkeit der Analyseergebnisse lassen sich eventuelle Fehler bei der Messwertgewinnung auch im Nachhinein feststellen. Die gute Laborpraxis (GLP, §19(1) Chemikaliengesetz) fordert ebenfalls die Anfertigung von Standardarbeitsanweisungen (SAA) und die Rückverfolgbarkeit der Analyseergebnisse, so dass eine Validierung der Methoden sinnvoll und notwendig ist.

### **2.8.2 Validierungsparameter (Definitionen)**

Unter Validierung versteht man die Sicherstellung, dass ein Analyseverfahren reproduzierbare und verlässliche Resultate liefert, die für den beabsichtigten Einsatzbereich genau genug sind (Otto, 1995). Als wichtige Validierungskriterien dienen bei einem Analyseverfahren u. a. folgende Parameter (Funk et al., 1992; DIN 32645, 1994; Otto, 1995):

**Kalibration:** funktionaler Zusammenhang von Messwert und Analytkonzentration in der Probe.

**Empfindlichkeit:** ergibt sich aus der Steilheit der Kalibriergerade, bei linearen Regressionskurven konstant, bei quadratischen (gekrümmten) abhängig von der Analytkonzentration.

**Arbeitsbereich:** durch die Kalibrierung festgelegtes Intervall zwischen der niedrigsten und höchsten bestimmbaren Analytkonzentration.

**Präzision:** Streuung der Messwerte um den wahren bzw. richtigen Wert (zufällige Abweichung).

**Richtigkeit:** Übereinstimmung der Messwerte mit dem wahren bzw. richtigen Wert (systematische Abweichung).

**Nachweisgrenze:** kleinste Konzentration eines Analyten in der Probe, die mit genügender Sicherheit von der Streuung der Leerwerte unterschieden werden kann (qualitative Aussage).

**Bestimmungsgrenze:** kleinste Konzentration eines Analyten in der Probe, die mit einer festgelegten Analysenpräzision (Streuung, Wiederfindung) bestimmt werden kann (quantitative Aussage).

Nachweis- und Bestimmungsgrenze können über das Signal/Rausch-Verhältnis oder nach standardisierten Verfahren aus der Kalibrierfunktion (DIN 32645, 1994; Frehse und Thier, 1991) ermittelt werden.

**Wiederfindungsrate:** Vergleich der Analytmenge vor und nach Durchlauf des gesamten Analyseverfahrens.

**Robustheit:** beschreibt den Einfluss kleiner Änderungen (z.B. Geräteschwankungen des Messsystems, geringfügige Abweichung von der SAA) auf das Messergebnis bei Beobachtung über einen längeren Zeitraum hinweg. Die Ermittlung der Robustheit kann z.B. laborintern mittels Qualitätsregelkarten und extern durch Ringversuche mit mehreren Laboren ermittelt werden.

**Spezifität:** Fähigkeit des Analyseverfahrens, nur den gesuchten Stoff zu erfassen, ohne dass Bestandteile der Probenmatrix die Bestimmung stören (Maß für die Anfälligkeit der Methode gegenüber Störkomponenten).

**Selektivität:** Fähigkeit des Analyseverfahrens, mehrere nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen bzw. hinreichend voneinander zu unterscheiden.

Die validierten Analysemethoden werden in Form von Standardarbeitsanweisungen schriftlich niedergelegt, damit die einheitliche Anwendung der Methode gewährleistet ist und auch nicht mit den Verfahren vertraute sachkundige Personen die Methoden ohne große Einarbeitungszeit anwenden können.

### **3 EXPERIMENTELLER TEIL**

#### **3.1 Chemikalien und Geräte (für alle Methoden)**

##### **3.1.1 Chemikalien und Reagenzien**

###### Standardsubstanzen:

Bifenthrin (99 %), Chlordecon (98 %), Chlorpyrifos (99 %), Cyfluthrin (98,2 %), Cypermethrin (95,8 %), Deltamethrin (99,8 %), Diazinon (98,8 %), Dichlorvos (98,8 %), Diflubenzuron (99,9 %), 1,4-Dioxan (99 %), Fenitrothion (97,6 %), Fenthion (97 %), Lindan (99,9 %), Malathion (98,1 %), Permethrin (95,4 %), Piperonylbutoxid (98,8 %) und Propoxur (99,9 %) (Riedel-de-Haen, Seelze); Allethrin (96 %), Cyhalothrin (98,5 %), Fenvalerat (96 %), Phenothrin (92 %), Resmethrin (94 %) und Tetramethrin (99,1 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg); E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA), Syntheseprodukt (Bachem, Weil am Rhein); p-Phenylendiessigsäure (PDAA, 97 %) (Sigma-Aldrich, München); Maleinsäure (99, 91 %) (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin).

###### Weitere Chemikalien und Lösemittel:

Ethylacetat (Pestanal) (Riedel-de-Haen, Seelze); Aceton (Suprasolv), Ameisensäure (98-100 %), Dichlormethan (Suprasolv), n-Hexan (Unisolv), Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Ammoniak (25 %), Salzsäure (25 %) (Merck, Darmstadt); Acetonitril (Baker HPLC Analyzed), Methanol (Baker HPLC Analyzed) (Omnichem, Bremen); entionisiertes Wasser (Millipore, Eschborn); Dimethylsulfoxid-d6 (DMSO-d6, 100 %), Cyclohexan-d12 (99,5 %) (Deutero , Kastellaun); 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP, 99,8 %), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC, 99 %) (Sigma-Aldrich, München).

###### Silylierungsreagenz zur Silanisierung von Laborglasgeräten und GC-Injektor-Linern:

Sylon-CT (5 % Dimethyldichlorsilan in Toluol) (Sigma-Aldrich, München).

### **3.1.2 Analytisches Gerät und sonstige Materialien**

#### Allgemeines Labor- und Analysematerial:

Sonorex RK100H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin); Mikroliterpipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg); silanisierte Glaswatte (Macherey-Nagel, Düren); Bechergläser, Messkolben (1 und 10 ml), Spitzkolben (250 ml), Nasenkolben (5 ml Skalierung), Zentrifugengläser aus Duranglas mit Schraubkappen und Teflondichtungen, Pasteurpipetten (Omnilab, Gehrden); Rotationsverdampfer Rotavapor R110 (Büchi, Essen); Turbovap II Probenkonzentrationseinheit (Zymark, Rüsselsheim); 2 ml Probefläschchen mit Schraub- oder Bördelkappen und Kautschuk/Teflon- bzw. Silikon/Teflon-Septen für den automatischen Probengeber, dazu passend 100 µl Mikroinserte bzw. 250 µl silanisierte Mikroinserte (Agilent, Waldbronn); Analysen-Feinwaage RC 210S-0D1 (Genauigkeit 0,01 mg, Sartorius, Göttingen); Trockenschrank UT5050E (Heraeus, Hanau); Vibrax VXR Rotationsschüttler (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.); Laborzentrifuge Labofuge A (Heraeus, Hanau); Laborschüttelmaschine GFL 3016 (GfL, Burgwedel).

#### Geräte und Materialien für die Probenahme und Probenaufarbeitung:

KleinfILTERGERÄT GS 050-N bzw. GS 050-3D mit Probenahmekopf SPM-G (Ingenieurbüro Derenda, Berlin); Glasfaserfilter GF10, Ø 5 cm (Schleicher & Schüll, Dassel); Polyurethanschaum (engl. Abk.: PUF), Ø 6 cm × 5 cm (Ziemer, Mannheim); Staubsauger mit Staubsaugerbeutel; Analysensiebe mit 2000, 560, 250, 125 und 63 µm Maschenweite, 20 cm ID (Retsch, Haan); Minisart RC15 Membranfilter, 0,2 µm (Sartorius, Göttingen); LiChrolut Si 60 Kieselgel SPE-Kartuschen, 3 ml, 500 mg (Merck, Darmstadt); Waters Oasis MAX SPE-Kartuschen, 6 ml, 150 mg (Waters, Eschborn); Supelco Visiprep Vakuumeinheit für die SPE (Supelco, Taufkirchen)

#### GC-MS (EI/CI):

Agilent 6890 GC mit Split/Splitless-Injector; Agilent 7683 automatischer Probengeber mit 10 µl Injektionsspritze; HP-5MS Kapillarsäule (60m, ID:

250µm, d<sub>f</sub>: 0.25µm) mit ca. 1 m langer Vorsäule gleichen Typs; Agilent 5973/5973N MSD mit EI- bzw. CI-Ionenquelle; HP/Agilent Chemstation Auswertungssoftware, Version B00.00 oder C00.00.

#### HPLC-DAD:

Waters 2690 Alliance Separationsmodul und Waters 996 DAD-Detektor (Waters, Eschborn); Nucleosil 120-3 C18, 250 × 3 mm mit Vorsäule 8 × 3 mm gleichen Typs (Macherey-Nagel, Düren); Caltrex Science 250 × 4 mm (5 µm), Caltrex B I 250 × 4 mm (5 µm) (Synaptec, Greifswald).

#### ELISA:

ELISA-Testkit EP012 (Envirologix Inc., Portland ME, USA); Microplate Reader MRX (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly VA, USA).

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in der Raumluft mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

##### Prinzip der Methode:

Die Insektizide und Akarizide werden mit einem Probenahmesystem, bestehend aus einem Probenahmekopf, der mit einem Glasfaserfilter (GFF) und zwei hintereinanderliegenden PUF's bestückt ist, und einer Pumpe, aus der Luft angereichert. Glasfaserfilter und PUF's werden anschließend getrennt voneinander mit einem organischen Lösemittel extrahiert und die Analyten in den jeweiligen Extrakten mittels GC-MS(EI) qualitativ und quantitativ bestimmt.

##### **3.2.1.1 Arbeitsvorschrift**

###### Vorreinigung der PUFs:

- Je vier PUF's vor dem erstmaligen Gebrauch nacheinander mit Aceton (16h) und Ethylacetat (16h) in einer 1 Liter Soxhlet-Apparatur vorreinigen. PUF's mit Hilfe von zwei 600 ml Bechergläsern ausquetschen und anschließend im Exsikkator

unter leichtem Stickstoffstrom trocknen. PUF's bis zur Probenahme in brauner 250 ml Weithalsflasche luftdicht aufbewahren.

- Zur erneuten Verwendung bereits benutzter PUF's genügt die beschriebene Aufreinigung mit Ethylacetat.

#### Probenahme:

Einen GFF und zwei PUF's in den Probenahmekopf einsetzen (vgl. Abb. 10). Den Probenahmekopf an das Kleinfiltergerät anschrauben. Beim Kleinfiltergerät GS 050-N Stand des Volumenstromzählers vor Beginn der Probenahme notieren. Am Ende der Probenahme Gesamtvolumen der Probe durch Ablesen des neuen Zählerstandes und Differenzbildung mit dem notierten Zählerstand ermitteln (erfolgt automatisch beim Kleinfiltergerät GS 050-3D). Das Probenahmenvolumen beträgt i.d.R. 10 m<sup>3</sup> (Volumenstrom 2,8 m<sup>3</sup>/h) Nach der Probenahme GFF und PUF's nacheinander aus dem Probenahmekopf herausnehmen und einzeln in luftdichten Glasgefäßen vor Licht und Wärme geschützt (nach Möglichkeit gekühlt) bis zur Probenaufarbeitung aufbewahren.

#### Extraktion:

- GFF und PUF's schnellstmöglich nach der Probenahme extrahieren.
- GFF mit einer Schere zerkleinern, in einem kleinen 50 ml Becherglas mit ca. 10 ml Ethylacetat überschichten und 5 min im Ultraschallbad extrahieren. Den Vorgang zweimal wiederholen. Die vereinigten Extrakte in einem graduierten Nasenkolben am Rotationsverdampfer oder mit dem Turbovap auf ca. 0,5 ml einengen und durch eine mit etwas silanisierter Glaswatte gepfropfte 1 ml Eppendorf-Pipettenspitze filtrieren. Mit ca. 0,4 ml Ethylacetat nachspülen und Probelösung in einem Messkolben auf 1 ml auffüllen.
- PUF in ein 600 ml Becherglas legen und ca. 50 ml Ethylacetat über den PUF geben. Becherglas ins Ultraschallbad stellen und



während der zweiminütigen Extraktion den PUF mit einem 300 ml Becherglas periodisch quetschen. Den Vorgang dreimal wiederholen. Die vereinigten Extrakte in einem 250 ml Spitzkolben am Rotationsverdampfer auf ca. 2-3 ml einengen und in einen graduierten Nasenkolben umfüllen. Extrakt am Rotationsverdampfer bzw. mit dem Turbovap auf ca. 0,5 ml einengen und weiter wie bei der GFF-Extraktion verfahren.

#### Standardlösungen:

- Standardsubstanzen: Allethrin, Chlordecon, Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Diazinon, Dichlorvos, Diflubenzuron, Fenitrothion, Fenthion, Fenvalerat, Lindan, Malathion, Permethrin, Phenothrin, Piperonylbutoxid, Propoxur, Resmethrin, Tetramethrin.
- Zur Herstellung von Stammlösungen der Standardsubstanzen ca. 20 mg des Wirkstoffes in 10 ml Ethylacetat (Messkolben) lösen (Konzentration ca. 2 mg/ml). Die Stammlösungen in 10 ml Braunglasflaschen umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Je ca. 0,5 ml der Stammlösungen in einen 10 ml Messkolben pipettieren und mit Ethylacetat zur Marke auffüllen (Multistandard 100 µg/ml). Den Multistandard in eine 10 ml Braunglasflasche umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Kalibrierstandards (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µg/ml) durch weitere Verdünnung des Multistandards mit Ethylacetat herstellen. Zur **Kalibrierung in der Matrix** anstatt Ethylacetat GFF- und PUF-Extrakte leerwertfreier Luftproben (mit dem selben Luftvolumen wie die Probe!) verwenden.

#### GC-MS Parameter:

Gaschromatograph:

- Temperatur-Programm: 60 °C (1 min), 60-170 °C (10 °C/min), 170-280 °C (4 °C/min), 280 °C (25 min)
- Injektorblocktemperatur: 250 °C
- HP5-MS Kapillarsäule (siehe 3.1.2)

- Transfer-Line (AUX2) -Temperatur: 280 °C
- Trägergas: Helium, 1.4 ml/min (Constant-Flow Modus)
- Injektionsvolumen: 1 µl splitless

MS-Detektor:

- Ionenquelle: EI, 70 eV, Temperatur 230 °C
- Quadrupol-Temperatur: 150 °C
- Datenaufnahme: Selected-Ion-Monitoring (SIM) Modus
- Target- und Qualifier-Ionenspuren (Masse/Ladung, m/z): Allethrin (123/79), Chlordecon (272/237), Chlorpyrifos (197/314), Cyfluthrin (163/215), Cyhalothrin (181/141), Cypermethrin (163/127), Deltamethrin (181/93), Diazinon (179/137), Dichlorvos (109/185), Fenitrothion (277/125), Fenthion (278/125), Fenvalerat (167/125), Lindan (181/219), Malathion (173/125), Permethrin (183/127), Phenothrin (123/183), Piperonylbutoxid (176/119), Propoxur (110/152), Resmethrin (123/171), Tetramethrin (164, 123); für Diflubenzuron die thermischen Zersetzungsprodukte p-Chlorbenzolisocyanat (153/90) und 2,6-Difluorbenzamid (141/157). Die unterstrichenen Massen in den Klammern dienen zur Quantifizierung (Target-Ionen), die anderen Massen zur qualitativen Absicherung (Qualifier-Ionen). Die Identifizierung erfolgt über die Retentionszeit (tolerierte Abweichung ≤ 1 %) und das Responseverhältnis von Target- und Qualifier-Ion (tolerierte Abweichung ± 20 %).

#### Quantitative Auswertung:

Der dem Messwert F entsprechende Konzentrationswert C in der Probelösung wird per Software aus der zuvor erstellten externen Kalibrierfunktion  $F = A_2C^2 + A_1C + A_0$  berechnet. Die Lösungsformel lautet  $C_{1,2} = [-A_1 \pm (A_1^2 - 4A_2(A_0 - F))^{0,5}] / 2A_2$ , wobei nur das Ergebnis mit positivem Vorzeichen sinnvoll ist. Der Messwert der Probe muss sich innerhalb des von der Kalibrierfunktion abgedeckten Konzentrationsbereiches befinden. Andernfalls ist die Probe entsprechend zu verdünnen. Bei der Berechnung des Analytgehaltes

in der Probe sind das Volumen der Probe und Verdünnungsfaktoren zu berücksichtigen. Die Berechnung der Probengehalte in der Raumluft erfolgt nach folgender Formel:

$$C_L = (C_{PR} \cdot V_{PR} \cdot F) / V_L$$

mit

$C_L$ : Konzentration des Wirkstoffes in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  Raumluft

$C_{PR}$ : Konzentration des Wirkstoffes in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Probelösung (GC-MS Messung)

$V_{PR}$ : Volumen der Probelösung in ml

$F$ : Verdünnungsfaktor (falls die Probelösung verdünnt wurde)

$V_L$ : Volumen der Probe in  $\text{m}^3$

Bei Einhaltung der Arbeitsvorschrift reduziert sich die Gleichung auf:

$$C_L = C_{PR} / V_L \quad \text{mit } V_{PR} = 1 \text{ ml und } F = 1.$$

### **3.2.1.2 Anmerkungen und Erläuterungen**

- a) Die Vorreinigung der PUF's ist notwendig, um möglichst saubere Leerwerte zu erhalten (Entfernung von Weichmachern, Polymerisationshilfsstoffen und Monomeren). Zur Vorreinigung muss das später zur Extraktion der Analyten verwendete Lösemittel benutzt werden.
- b) Die PUF's nehmen unter Lichteinfluss mit der Zeit eine Gelbfärbung an, was aber die Funktion nicht beeinträchtigt.
- c) Für die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus ist es üblich, die zwei intensivsten Fragmentationen aus dem Fullscan-Massenspektrum als Target-Ion (Basispeak) und Qualifier-Ion (zweitintensivster Peak) zu wählen. Unterscheiden sich die zwei intensivsten Massen in ihrer Intensität nur wenig, so wird die größere Masse als Target-Ion eingesetzt, da diese normalerweise charakteristischer ist als eine kleinere Masse. Die Qualifier-Ionen von Cyfluthrin ( $m/z = 206$ ), Cyhalothrin ( $m/z = 197$ ), Cypermethrin

( $m/z = 181$ ), Deltamethrin ( $m/z = 253$ ), Permethrin ( $m/z = 163$ ) und Piperonylbutoxid ( $m/z = 149$ ) mussten durch weniger intensive Ionenspuren ersetzt werden, da diese häufig durch Interferenzen von Weichmachern (149), Säulenbluten (206 und 253) oder Störkomponenten aus der Matrix (163, 181 und 197) überlagert werden.

- d) Die Stammlösungen und der Multistandard sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4-7 °C) über den beobachteten Zeitraum (3 Jahre) stabil.
- e) Kalibrierlösungen, die mit Matrixextrakten hergestellt wurden, sind täglich frisch anzusetzen. Fenthion ist in diesen Lösungen, auch bei Lagerung im Kühlschrank, nicht stabil.
- f) Um Überbefunde zu vermeiden, ist eine Kalibrierung in der Matrix notwendig. Vor Messung der ersten Probe einen Standard mit Matrix fünfmal einspritzen, um aktive Stellen im System abzusättigen. Von Zeit zu Zeit einen Standard zwischen den Proben messen (Erfahrungswerte: GFF jede 10. Probe, PUF jede 5. Probe), um die Kalibrierung zu überprüfen (Systemtest). Bei Abweichungen > 20 % Kalibrierung korrigieren bzw. neu kalibrieren.
- g) Soweit möglich, sind immer Leerwerte bei der Analyse zu berücksichtigen.

### **3.2.2 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

#### Prinzip der Methode:

Der Hausstaub wird mit einem handelsüblichen Haushaltsstaubsauger gesammelt. Anschließend wird der gesamte Inhalt des Staubsaugerbeutels auf eine definierte Partikelfraktion gesiebt. Diese Fraktion wird mit einem organischen Lösemittel extrahiert und der Extrakt mit Hilfe von Kieselgel-SPE-Kartuschen aufgereinigt. Die in den Kieselgel-Eluaten enthaltenen Wirkstoffe werden mittels GC-MS(EI) identifiziert und quantifiziert.

### 3.2.2.1 **Arbeitsvorschrift**

#### Probenahme:

Je nach Problemstellung, i.d.R. mit dem Staubsauger. Siehe auch Kapitel 2.1.2.

#### Hausstaubfraktionierung:

Analysensiebe mit zunehmender Maschenweite aufeinander stecken. Den gesamten Inhalt des Staubsaugerbeutels möglichst quantitativ in den obersten Sieb überführen. Die Siebkaskade mit dem Deckel verschließen, auf einer Schüttelmaschine einspannen und ca. 30 min schütteln. Ein Aliquot von ca. 100 mg aus der Fraktion mit dem kleinsten Partikeldurchmesser ( $\leq 63 \mu\text{m}$ ) zur Analyse abnehmen.

#### Extraktion:

Den Hausstaub in einem 25 ml Becherglas dreimal mit ca. 5 ml Ethylacetat im Ultraschallbad 5 min extrahieren. Die Extrakte über eine Pipettenspitze mit silanisierter Glaswatte filtrieren, das Filtrat zentrifugieren (3000 rpm, 5 min) und anschließend durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Membranfilter filtrieren. Extraktionsgefäß, Pipettenspitze und den Membranfilter je zweimal mit wenig Essigester nachspülen. Die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer oder mit dem Turbovap auf ca. 0,5 ml einengen, in einen 1 ml Messkolben überführen und bis zur Marke auffüllen.

#### Extraktaufreinigung mittels Kieselgelkartuschen:

- Den auf 1 ml eingengten Extrakt mit Stickstoff zur Trockne einengen und in 0,5 ml n-Hexan aufnehmen (Ultraschallbad).
- Die Kieselgelkartusche auf die Vakuumeinheit stecken und unter leichtem Unterdruck mit 5 ml n-Hexan konditionieren.
- Den umgelösten Extrakt auf die konditionierte Kartusche geben.
- Sobald die Flüssigkeit den oberen Rand des Kieselgels erreicht hat, mit 5 ml n-Hexan nachwaschen. Dabei mit den ersten beiden

Millilitern das Gefäß, welches die Probelösung enthielt, noch einmal nachspülen und auf die Kartusche geben.

- Hat das n-Hexan den oberen Rand des Füllmaterials erreicht, die Vorlage wechseln und das Hexan-Eluat verwerfen.
- Zur Elution von Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Deltamethrin, Fenitrothion, Fenthion, Phenothrin, Permethrin und Resmethrin 5 ml eines Gemisches von n-Hexan/Dichlormethan (50+50, V/V) auf die Kartusche geben (Eluat A). Hierbei wiederum die ersten beiden Milliliter zum Nachspülen des Gefäßes, welches die Probelösung enthielt, verwenden.
- Die Vorlage wechseln.
- Zur Elution von Allethrin, Diazinon, Dichlorvos, Diflubenzuron, Malathion, Piperonylbutoxid und Propoxur 5 ml eines Gemisches von n-Hexan/Aceton (75+25, V/V) auf die Kartusche geben (Eluat B). Hierbei wiederum die ersten beiden Milliliter zum Nachspülen des Gefäßes, welches die Probelösung enthielt, verwenden.
- Die Eluate A und B mit Stickstoff auf ca. 100 µl einengen und mit Ethylacetat auf 1 ml auffüllen. Die so erhaltenen Probelösungen mittels GC-MS(EI) messen.

#### Standardlösungen:

- Standardsubstanzen: Allethrin, Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Deltamethrin, Diazinon, Dichlorvos, Diflubenzuron, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Permethrin, Phenothrin, Piperonylbutoxid, Propoxur, Resmethrin.
- Zur Herstellung von Stammlösungen der Standardsubstanzen ca. 20 mg des Wirkstoffes in 10 ml Ethylacetat (Messkolben) lösen (Konzentration ca. 2 mg/ml). Die Stammlösungen in 10 ml Braunglasflaschen umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Je ca. 0,5 ml der Stammlösungen in einen 10 ml Messkolben pipettieren und mit Ethylacetat zur Marke auffüllen (Multistandard 100 µg/ml). Den Multistandard in eine 10 ml Braunglasflasche umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.

- Kalibrierstandards (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µg/ml) durch weitere Verdünnung des Multistandards mit Ethylacetat herstellen. Zur **Kalibrierung in der Matrix** anstatt Ethylacetat Eluate (A, B) leerwertfreier Hausstaubproben verwenden.

GC-MS Parameter:

- Siehe 3.2.1.1.
- Hinweis: es werden nur folgende Target- und Qualifier-Ionenspuren (m/z) benötigt: Allethrin (123/79), p-Chlorbenzolisocyanat (153/90), Chlorpyrifos (197/314), Cyfluthrin (163/215), Deltamethrin (181/93), Diazinon (179/137), Dichlorvos (109/185), 2,6-Difluorbenzamid (141/157), Fenitrothion (277/125), Fenthion (278/125), Malathion (173/125), Permethrin (183/127), Phenothrin (123/183) Piperonylbutoxid (176/119), Propoxur (110/152), Resmethrin (123/171).

Quantitative Auswertung:

Der dem Messwert entsprechende Konzentrationswert in der Probelösung wird per Software aus der zuvor erstellten externen Kalibrierfunktion berechnet (siehe 3.2.1.1). Der Messwert der Probe muss sich innerhalb des von der Kalibrierfunktion abgedeckten Konzentrationsbereiches befinden. Andernfalls ist die Probe entsprechend zu verdünnen. Bei der Berechnung des Analytgehaltes in der Probe sind Einwaage und Verdünnungsfaktoren zu berücksichtigen. Die Berechnung der Probengehalte im Hausstaub erfolgt nach folgender Formel:

$$C_{HS} = (C_{PR} \cdot V_{PR} \cdot F) / m_{HS}$$

mit

$C_{HS}$ : Konzentration des Wirkstoffes in µg/g (bzw. mg/kg) Hausstaub

$C_{PR}$ : Konzentration des Wirkstoffes in µg/ml Probelösung (GC-MS Messung)

$V_{PR}$ : Volumen der Probelösung in ml

*F:* Verdünnungsfaktor (falls die Probelösung verdünnt wurde)

*m<sub>HS</sub>:* Einwaage des Hausstaub-Aliquots in g

Bei Einhaltung der Arbeitsvorschrift reduziert sich die Gleichung auf:

$$C_{HS} = C_{PR} / m_{HS} \quad \text{mit } V_{PR} = 1 \text{ ml und } F = 1.$$

### **3.2.2.2 Anmerkungen und Erläuterungen**

Siehe 3.2.1.2 Punkte c) bis f). Abweichend hiervon einen Systemtest bei jeder 5. Messung durchführen.

### **3.2.3 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Diodenarraydetektion (HPLC-DAD)**

#### Prinzip der Methode:

Der Hausstaub wird mit einem handelsüblichen Haushaltsstaubsauger gesammelt. Anschließend wird der gesamte Inhalt des Staubsaugerbeutels auf eine definierte Partikelfraktion gesiebt. Diese Fraktion wird mit einem organischen Lösemittel extrahiert und der Extrakt mit Hilfe von Kieselgel-SPE-Kartuschen aufgereinigt. Die in den Kieselgel-Eluaten enthaltenen Wirkstoffe werden mittels HPLC-DAD identifiziert und quantifiziert.

#### **3.2.3.1 Arbeitsvorschrift**

##### Probennahme:

Siehe 3.2.2.1.

##### Hausstaubfraktionierung:

Siehe 3.2.2.1.

##### Extraktion:

Siehe 3.2.2.1.



Extraktreinigung mittels Kieselgelkartuschen:

Siehe 3.2.2.1. Die Eluate A und B mit Stickstoff zur Trockne einengen und in 1 ml Acetonitril aufnehmen (Ultraschallbad). Die so erhaltenen Probelösungen mittels HPLC-DAD messen.

Standardlösungen:

- Standardsubstanzen: siehe 3.2.2.1.
- Zur Herstellung von Stammlösungen der Standardsubstanzen ca. 20 mg des Wirkstoffes in 10 ml Acetonitril (Messkolben) lösen (Konzentration ca. 2 mg/ml). Die Stammlösungen in 10 ml Braunglasflaschen umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Je ca. 0,5 ml der Stammlösungen in einen 10 ml Messkolben pipettieren und mit Acetonitril zur Marke auffüllen (Multistandard 100 µg/ml). Den Multistandard in eine 10 ml Braunglasflasche umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Kalibrierstandards (0,1 bis 100 µg/ml) durch weitere Verdünnung des Multistandards mit Acetonitril herstellen.

HPLC-DAD-Parameter:

- Trennsäule: Nucleosil (siehe 3.1.2)
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Säulenofen-Temperatur: 30 °C
- Detektionswellenlänge: UV 220 nm (Spektren: 200-400 nm)
- Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% H <sub>2</sub> O	% AcCN	% MeOH	Flußrate
0	60	35	5	0,5 ml/min
55	20	75	5	
65	20	75	5	
66	60	35	5	
75	60	35	5	

H<sub>2</sub>O: dest. Wasser, AcCN: Acetonitril, MeOH: Methanol

Die Identifizierung der Wirkstoffe erfolgt anhand der Retentionszeit und den UV-Absorptionsspektren.

#### Quantitative Auswertung:

Der dem Messwert  $F$  entsprechende Konzentrationswert  $C$  in der Probelösung wird per Software aus der zuvor erstellten externen Kalibrierfunktion  $F = A_1C + A_0$  berechnet. Die Lösungsformel lautet  $C = (F - A_0)/A_1$ . Weiter gemäß Kapitel 3.2.2.1.

#### **3.2.3.2 Anmerkungen und Erläuterungen**

- a) Die Stammlösungen, der Multistandard und die Kalibrierlösungen sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4-7 °C) über den beobachteten Zeitraum (3 Jahre) stabil.
- b) Zur Vermeidung von falsch positiven Befunden bzw. zur Vermeidung von Fehlern bei der Quantifizierung sind Reagenzienleerwerte (und, soweit verfügbar, auch Hausstaubleerwerte) zu vermessen und die UV-Spektren der Analyten auf Überlagerungen mit UV-absorbierenden Matrixkomponenten ähnlicher Retentionszeit zu überprüfen.
- c) Bei Messung der Eluate A einen Lösemittellauf (Injektion von Acetonitril) zwischen jeder Probe durchführen (zur vollständigen Elution der mitextrahierten Hausstaubmatrix von der Säule)!

#### **3.2.3.3 Alternative HPLC-Methode mit Calixaren-Trennsäulen**

##### Standardlösungen:

- Standardsubstanzen: siehe 3.2.2.1, Cypermethrin anstatt Deltamethrin.
- Zur Herstellung von Stammlösungen der Standardsubstanzen ca. 20 mg des Wirkstoffes in 10 ml Methanol (Messkolben) lösen (Konzentration ca. 2 mg/ml). Die Stammlösungen in 10 ml Braunglasflaschen umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Je ca. 0,5 ml der Stammlösungen in einen 10 ml Messkolben pipettieren und mit Methanol zur Marke auffüllen (Multistandard 1, 100 µg/ml). Den Multistandard in eine 10 ml Braunglasflasche umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.

- Multistandard 2 (10 µg/ml) durch 1:10 Verdünnung des Multistandard 1 mit Methanol herstellen.

HPLC-DAD-Parameter:

- Trennsäule: Caltrex Science oder B I (siehe 3.1.2)
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Säulenofen-Temperatur: 30 °C
- Detektionswellenlänge: UV 220 nm (Spektren: 200-400 nm)
- Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% H <sub>2</sub> O	% AcCN	% MeOH	Flußrate
0	40	40	20	1 ml/min
30	30	45	25	
70	24	48	28	

H<sub>2</sub>O: dest. Wasser, AcCN: Acetonitril, MeOH: Methanol

Die Identifizierung der Wirkstoffe erfolgt anhand der Retentionszeit und der UV-Absorptionsspektren.

### **3.2.4 Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA**

Prinzip der Methode:

Der Analyt wird in der Probelösung mittels kompetitivem ELISA quantitativ bestimmt (Näheres siehe Kapitel 2.6). Bei Vorliegen mehrerer Typ II Pyrethroide (z.B. Cyfluthrin und Deltamethrin) wird die Gesamtkonzentration der Wirkstoffe erfasst (Summenmethode).

#### **3.2.4.1 Arbeitsvorschrift**

Herstellung und Dotierung der Luftprobenextrakte:

2,5 m<sup>3</sup> pyrethroidfreie Luft analog 3.2.1.1 über einen Glasfaserfilter ziehen. Filter mit Ethylacetat extrahieren und den Extrakt mit Cyfluthrin dotieren, so dass eine Konzentrationen von 35 ng/ml Extrakt (entsprechend einer Konzentration von 14 ng/m<sup>3</sup> Luft) erhalten wird. Zwei weitere Extrakt-dotierungen auf gleiche Weise mit 70 ng/ml Cyfluthrin (entsprechend einer Konzentration von 28 ng/m<sup>3</sup>

Luft) bzw. je 35 ng/ml Cyfluthrin und Deltamethrin (entsprechend einer Summenkonzentration von 70 ng/ml bzw. 28 ng/m<sup>3</sup> Luft) herstellen.

Herstellung und Dotierung der Hausstaubprobenextrakte:

Einen auf 63 µm gesiebten, pyrethroidfreien Hausstaub mit Ethylacetat extrahieren. Extrakt mit Cyfluthrin in einer Konzentration von 35 ng/ml dotieren (entsprechend einer Konzentration von 0,35 µg/g Hausstaub). Zwei weitere Extrakt-dotierungen auf gleiche Weise mit 70 ng/ml Cyfluthrin (entsprechend einer Konzentration von 0,7 µg/g Hausstaub) bzw. je 35 ng/ml Cyfluthrin und Deltamethrin (entsprechend einer Summenkonzentration von 70 ng/ml bzw. 0,7 µg/g Hausstaub) herstellen. Zur Untersuchung von Kreuzreaktionen einen weiteren Extrakt mit Permethrin in den Konzentrationen 100, 350 und 700 ng/ml Extrakt (entsprechend einer Konzentration von 1; 3,5 und 7 µg/g Hausstaub) dotieren.

Messung der Proben:

Der Testkit enthält als Negativkontrolle Methanol, drei Kalibrierlösungen (Cyfluthrin 4, 20 und 80 ppb in Methanol), Natriumhydroxidlösung, Cypermethrin-Peroxidase-Konjugat, Substratlösung und Stop-Lösung (1N Salzsäure). Je Probe ist eine Doppelbestimmung durchzuführen.

Die (dotierten) Probenextrakte mit Stickstoff zur Trockne einengen und in Methanol umlösen. 1 ml Extrakt mit 25 µl Natriumhydroxidlösung versetzen, mixen und 30 min inkubieren. Anschließend 100 µl der behandelten Probelösung in ein mit 2 ml destilliertem Wasser beschicktes Reaktionsröhrchen pipettieren und mixen. In derselben Weise je 100 µl der Negativkontrolle und der Kalibrierlösungen verdünnen.

Je 100 µl der verdünnten Lösungen in jeweils eine Kavität des ELISA-Teststreifens pipettieren und unmittelbar im Anschluss je 100 µl Cypermethrin-Peroxidase-Konjugat zugeben. Die Teststreifen mit Parafilm bedecken, 1h auf einem Rotationsschüttler bei 200 rpm

inkubieren und anschließend fünfmal mit kaltem Leitungswasser auswaschen. Zur Entfernung der Wasserreste Teststreifen kopfüber auf Küchenpapier trockenklopfen. 100 µl Substratlösung je Kavität zugeben, Teststreifen erneut mit Parafilm bedecken und 30 min auf dem Rotationsschüttler bei 200 rpm inkubieren. Zur quantitativen Auswertung nach Ende der Inkubation je 100 µl Stop-Lösung zugegeben, mixen und die Absorption des gelben Farbstoffes bei 450 nm (Referenz 630 nm) innerhalb von 30 min messen.

Quantitative Auswertung:

Die Absorptionswerte der Kalibrierlösungen durch Quotientenbildung mit dem Absorptionswert der Negativkontrolle normieren und als Y-Werte gegen die Konzentrationswerte (X-Achse, logarithmisch) auftragen. Lineare Regressionsgerade (mit negativer Steigung, umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration) berechnen und die Konzentration der Probe durch Einsetzen des Absorptionswertes in die Kalibrierfunktion ermitteln.

**3.2.5 Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA) in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und negativer chemischer Ionisation (NCI)**

Prinzip der Methode:

E-cis/trans-CDCA wird durch alkalischer Hydrolyse aus evtl. vorhandenen konjugierten Formen (Glucuronide) freigesetzt und mittels Mixed-Mode Festphasenextraktion aus dem Urin extrahiert. Nach Derivatisierung der freien Dicarbonsäuren zu den entsprechenden 1,1,1,3,3,3-Hexafluordiisopropylestern erfolgt die qualitative und quantitative Bestimmung mittels GC-MS(NCI).

### 3.2.5.1 **Arbeitsvorschrift**

#### Probenahme:

Je nach Fragestellung Spontanurin bzw. Sammelurin in PE- oder PP-Flaschen füllen und bis zur Analyse entweder im Gefrierschrank (-18 bis -21 °C) lagern oder bei Lagerung im Kühlschrank (4 bis 7 °C) mit 1% Chloroform konservieren (Haltbarkeit mindestens 1 Jahr).

#### Hydrolyse der Urinkonjugate:

10 ml Urin in einem verschließbaren Zentrifugenglas mit internem Standard und 1 ml 10M Kalilauge versetzen und 15 min bei 70 °C im Trockenschrank erhitzen. Nach dem Abkühlen mit 1 ml konzentrierter Salzsäure ansäuern und mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnen.

#### Anmerkungen:

- Bei Urinproben mit hohem Matrixanteil nur 5 ml Urin einsetzen und mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen.
- Sollte sich bei der Lagerung der Urinprobe ein Bodensatz gebildet haben, so ist der Urin vor der Entnahme des 10 ml Aliquots gut zu durchmischen.

#### Mixed-Mode Festphasenextraktion:

Kartuschen nacheinander mit je 6 ml Ethylacetat, Methanol, destilliertem Wasser und 0,1 N Salzsäure (pH 1) konditionieren. Angesäuerte Probe aufgeben und mit 6 ml 0,1 N Salzsäure nachwaschen (Entfernung von Salzen). Kartusche im Stickstoffstrom (1 bar) ca. 5 min trocknen. Anschließend mit 6 ml verdünnter Ammoniaklösung (1:50 Verdünnung von 25 %iger Ammoniaklösung, pH 10) alkalisch waschen (Bindung der Analyten an den Anionenaustauscher) und nacheinander mit je 6 ml Methanol und Ethylacetat spülen (Entfernung unpolarer bis mittelpolarer Matrixkomponenten). Kartuschen wie oben trocknen und mit 6 ml 0,1 N Salzsäure ansäuern (Überführung der Analyten in die undissoziierte Form). Kartusche erneut trocknen und Analyten mit 6 ml

Methanol/Ethylacetat (5/95, V/V) in ein silanisiertes Zentrifugenglas eluieren.

Derivatisierung:

Eluat der Festphasenextraktion mit Stickstoff zur Trockne einengen. Zum Rückstand 5 ml n-Hexan, 50 µl 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) und 75 µl N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) zugeben, 1 min im Ultraschallbad und 30 min auf einem Rotationsschüttler (Vibrax) bei 1000 rpm mischen. Überschüssiges Derivatisierungsreagenz durch flüssig-flüssig Verteilung (5 min) mit 5 ml fünfprozentiger Kaliumcarbonatlösung (pH 12) entfernen. Aliquot der Hexanphase abnehmen und in ein 2 ml Probengläschen mit silanisiertem Mikroeingang abfüllen.

*Anmerkung:* wurden nur 5 ml der Urinprobe eingesetzt, kann die Hexanphase zum Erreichen der gleichen Empfindlichkeit vor der Messung im Stickstoffstrom aufkonzentriert werden.

Standardlösungen:

- Standardsubstanzen: CDCA (Syntheseprodukt, ermittelter Gehalt an E-cis/trans-CDCA: 27,2 bzw. 26,4 %), p-Phenylendiessigsäure (PDAA, interner Standard)
- Zur Herstellung von Stammlösungen 37,4 mg des CDCA-Syntheseproduktes bzw. 10,4 mg PDAA in 10 ml Acetonitril (CDCA) bzw. Methanol (PDAA) lösen (Konzentration ca. 1 mg/ml). Die Stammlösungen in 10 ml Braunglasflaschen umfüllen und mit Teflonseptum verschließen.
- Die Stammlösungen mit dem entsprechenden Lösemittel 1:1000 verdünnen (Standardlösung 1; 1 µg/ml) und in eine Braunglasflasche mit Teflonseptum umfüllen.
- Die Standardlösungen 1 mit dem entsprechenden Lösemittel nochmals 1:10 verdünnen (Standardlösungen 2, 0,1 µg/ml) und in eine Braunglasflasche mit Teflonseptum umfüllen.

- Standards für die interne Kalibrierung (Konzentrationen 0,1; 0,3; 0,7; 1,3; 2,0 µg/l E-cis/trans-CDCA bzw. 1 µg/l PDAA): 10, 30, 70, 130 und 200 µl von Standardlösung 2 des CDCA-Gemisches bzw. je 100 µl von Standardlösung 2 des internen Standards PDAA in ein silanisiertes Zentrifugenglas pipettieren und mit Stickstoff zur Trockne einengen. Rückstand in 10 ml unbelastetem Pool-Urin lösen (Ultraschallbad).
- Externe Kalibrierstandards zur Ermittlung der Wiederfindung:
  - a) *Kalibrierung 1 (Wiederfindungsversuche mit Dotierungen von 1 µg/l Urin):*  
 Je 10, 30, 70, 130 und 200 µl von Standardlösung 2 des CDCA-Gemisches bzw. des Standards PDAA in ein silanisiertes Zentrifugenglas pipettieren und mit Stickstoff zur Trockne einengen. Rückstand in 10 ml unbelastetem Pool-Urin lösen (Ultraschallbad). Es ergeben sich Konzentrationen von 0,1; 0,3; 0,7; 1,3; 2,0 µg/l Urin.
  - b) *Kalibrierung 2 (Wiederfindungsversuche mit Dotierungen von 25 µg/l Urin):*  
 Je 10, 50, 100, 250 und 500 µl von Standardlösung 1 des CDCA-Gemisches bzw. des Standards PDAA in ein silanisiertes Zentrifugenglas pipettieren und mit Stickstoff zur Trockne einengen. Rückstand in 10 ml unbelastetem Pool-Urin lösen (Ultraschallbad). Es ergeben sich Konzentrationen von 1; 5; 10; 25 und 50 µg/l Urin.  
*Alternative Art der Dotierung:* zur Trockne eingeeengte SPE-Extrakte eines unbelasteten Pool-Urins in entsprechender Weise dotieren.
- Vergleichsstandards für die Bestimmung der Derivatisierungsausbeute mittels Standardaddition: geeignete Verdünnungen der HPLC-Fraktionierungsextrakte von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> (Kapitel 3.2.5.5) mit n-Hexan herstellen und damit Messlösungen von jeweils drei Proben der Dotierungen 1 µg/l und 25 µg/l in etwa der gleichen Konzentration aufstocken.



### GC-MS Parameter:

Gaschromatograph:

- Temperatur-Programm: 50 °C (1 min), 50-190 °C (10 °C/min), 190-280 °C (25 °C/min), 280 °C (5 min)
- Injektorblocktemperatur: 250 °C
- Transfer-Line (AUX2) -Temperatur: 280 °C
- Trägergas: Helium, 1.4 ml/min (Constant-Flow Modus)
- Injektionsvolumen: 1 µl splitless

MS-Detektor:

- Ionenquelle: CI, 96 eV, Temperatur 150 °C
- Reaktandgas: 40 % Methan
- Quadrupol-Temperatur: 106 °C
- Datenaufnahme: Selected-Ion-Monitoring (SIM) Modus
- Target- und Qualifier-Ionenspuren (Masse/Ladung, m/z): E-cis/trans-CDCA (498/330), PDAA (298/326) Die unterstrichenen Massen in den Klammern dienen zur Quantifizierung (Target-Ionen), die anderen Massen zur qualitativen Absicherung (Qualifier-Ionen). Die Identifizierung erfolgt über die Retentionszeit (tolerierete Abweichung  $\pm 0,2$  min) und das Responseverhältnis von Target- und Qualifier-Ion (tolerierete Abweichung  $\pm 20$  %).

### Quantitative Auswertung:

Der dem Messwert entsprechende Konzentrationswert der Probe wird per Software aus der zuvor erstellten externen bzw. internen Kalibrierfunktion berechnet (siehe 3.2.3.1, wobei bei interner Kalibrierung F durch das Flächenverhältnis von Analyt und internem Standard ersetzt wird). Der Messwert der Probe muss sich innerhalb des von der Kalibrierfunktion abgedeckten Konzentrationsbereiches befinden. Andernfalls ist die Probe entsprechend zu verdünnen und der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Analyseergebnisses zu berücksichtigen.

### 3.2.5.2 **Anmerkungen und Erläuterungen**

- Da die Dicarbonsäuren bzw. deren HFIP-Ester leicht an Glaswandungen adsorbieren, ist darauf zu achten, dass silanisierte Glasgeräte und Liner für den GC-Injektorport verwendet werden, insbesondere dann, wenn die Analyten in unpolaren Lösemitteln wie n-Hexan vorliegen, oder beim Einengen bis zur Trockne. Im gesamten Analyseverfahren wurden ausschließlich Glasgeräte verwendet, die mit Sylon CT gemäß Gebrauchsanweisung des Herstellers silanisiert wurden. Ausnahme sind die silanisierten Mikroeinsätze für die Probengläschen, welche direkt vom Hersteller bezogen wurden.
- Die Stammlösungen sowie die Standardlösungen 1 und 2 sind bei Lagerung im Kühlschrank (4 bis 7 °C) mindestens 1 Jahr haltbar.

### 3.2.5.3 **Fraktionierung des Synthesegemisches von E-cis/trans-CDCA mittels HPLC-DAD zur Identifizierung der Isomere mittels <sup>1</sup>H-NMR**

#### HPLC-DAD-Parameter:

- Trennsäule: Nucleosil (siehe 3.1.2)
- Injektion: 100 µg CDCA-Gemisch in Eluent
- Säulenofen-Temperatur: 30 °C
- Detektionswellenlänge: UV 260 nm (Spektren: 190-400 nm)
- Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% HCOOH	% MeOH	% AcCN	Flußrate
0	95	5	5	0,5 ml/min
35	70	12	18	
46	67,8	13,3	18,9	

HCOOH: Ameisensäure 0,2 %, AcCN: Acetonitril, MeOH: Methanol

Die Auftrennung des Gemisches ergibt unter den gegebenen Bedingungen fünf Peaks, von denen die Eluate des ersten Peaks (E-trans-CDCA, ca. 35 bis 36 min) und des vierten Peaks (E-cis-CDCA, ca. 40,8 bis 41,8 min) fraktioniert und gesammelt werden.

**3.2.5.4 Fraktionierung des Synthesegemisches von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> bzw. PDAA(HFIP)<sub>2</sub> mittels HPLC-DAD zur Identifizierung und Quantifizierung der Isomere mittels <sup>1</sup>H-NMR und Herstellung der E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>- und PDAA(HFIP)<sub>2</sub>-Vergleichsstandards**

HPLC-DAD-Parameter:

- Trennsäule: Nucleosil (siehe 3.1.2)
- Injektion: 10 µl der Reaktionslösung (Kapitel 3.2.5.5), umgelöst in Acetonitril
- Säulenofen-Temperatur: 30 °C
- Gradientenprogramm zur Fraktionierung der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Isomere:

Zeit [min]	% H <sub>2</sub> O	% MeOH	% AcCN	Flußrate
0	67,8	13,3	18,9	0,5 ml/min
45	0	0	100	

H<sub>2</sub>O: dest. Wasser, AcCN: Acetonitril, MeOH: Methanol

- Detektionswellenlänge CDCA: UV 260 nm (Spektren: 190-400 nm)
- Isokratische HPLC-Aufreinigung von PDAA(HFIP)<sub>2</sub>:  
Eluent: H<sub>2</sub>O/AcCN (35/65, V/V)
- Detektionswellenlänge PDAA: UV 192 nm

Die Auftrennung des CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Gemisches ergibt unter den gegebenen Bedingungen vier Peaks, von denen die Eluate des ersten Peaks (E-cis-CDCA, ca. 34,5 bis 34,9 min) und des vierten Peaks (E-trans-CDCA, ca. 35,4 bis 35,8 min) fraktioniert und gesammelt werden.

Bei der HPLC-Aufreinigung von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> wird das Eluat des Peaks (ca. 8,6 bis 9,6 min) gesammelt.

### **3.2.5.5 *Synthese von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> zur Herstellung von GC-Vergleichsstandards (für die Bestimmung der Derivatisierungsausbeute)***

0,1 mMol des CDCA-Syntheseproduktes bzw. 0,1 mMol PDAA in 2,5 mMol HFIP lösen und 1,1 mMol DIC zugeben. Die Mischung zwei Stunden bei 80 °C im Trockenschrank erwärmen, bis eine klare Lösung entsteht. Reaktionslösungen gemäß Kapitel 3.2.5.4 fraktionieren. Fraktionen mit Cyclohexan-d<sub>12</sub> extrahieren und Konzentration der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Isomere bzw. von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> gemäß Kapitel 3.2.5.6 bestimmen. Vergleichsstandards für die Gaschromatographie durch Verdünnung mit n-Hexan herstellen (siehe auch Kapitel 3.2.5.1, Standardlösungen).

### **3.2.5.6 *Identifizierung und Quantifizierung der CDCA-Isomere im Syntheseprodukt sowie der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Isomere und des PDAA(HFIP)<sub>2</sub> in den Extrakten der HPLC-Fraktionierung***

#### NMR-Parameter:

- Bruker DRX 600 NMR-Instrument
- 2,5 mm <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C inverser dualer Probenkopf mit z-Gradient
- Probenröhrchen für die NMR (2 mm Außendurchmesser)
- Standard-Pulsprogramm zg30
- Aquisitionszeit: 2.5 s (DMSO-d<sub>6</sub>); 4.95 s (Cyclohexan-d<sub>12</sub>)
- Aquisitionsdelay: 30 s (DMSO-d<sub>6</sub>); 20 s (Cyclohexan-d<sub>12</sub>)
- Anzahl der Scans: 64 (freie Carbonsäuren), 3072 (HFIP-Ester)
- Registrierung der chemischen Verschiebung relativ zum Signal des deuterierten Lösemittels (<sup>TM</sup>DMSO-d<sub>6</sub>: 2,49 ppm; <sup>TM</sup>Cyclohexan-d<sub>12</sub>: 1,46 ppm)

#### CDCA-Isomere:

Zur Identifizierung Aliquote der HPLC-Fractionen (Kapitel 3.2.5.3) mit Stickstoff zur Trockne einengen und in DMSO-d<sub>6</sub> aufnehmen. Wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen E-cis- und E-trans-

CDCA ist die unterschiedliche chemische Verschiebung des olefinischen Protons an C<sub>7</sub>. Zur Quantifizierung ausreichende Menge an CDCA-Syntheseprodukt (Isomergemisch) und Maleinsäure als Quantifizierungsstandard in DMSO-d<sub>6</sub> lösen (etwa 2 bis 4 mg pro 100 µl DMSO-d<sub>6</sub>). Konzentration von E-cis-CDCA bzw. E-trans-CDCA über die Signalintegrale der Protonen an C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> und C<sub>7</sub> bestimmen.

CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Isomere und PDAA(HFIP)<sub>2</sub>:

Aliquote der Cyclohexan-d<sub>12</sub> Extrakte (Kapitel 3.2.5.4 und 3.2.5.5) mit 1,4-Dioxan als Quantifizierungsstandard versetzen. Konzentration von E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> über die Signalintegrale der Protonen an C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>9</sub> sowie der Protonen in den beiden HFIP-Resten bestimmen. Die Konzentration von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> über die Signalintegrale der aromatischen Protonen bzw. der Methylenprotonen bestimmen. Die Konzentrationen der Analyten und des 1,4-Dioxans lagen bei 10-20 µg pro 100 µl Cyclohexan-d<sub>12</sub>.

Quantitative Auswertung:

Die Konzentration berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$C_x = \frac{C_s \cdot R_s \cdot n_s \cdot A_x \cdot M_x}{n_x \cdot A_s \cdot M_s}$$

mit

C<sub>x</sub>, C<sub>s</sub>: Konzentrationen (Masse pro Volumeneinheit) des Analyten X bzw. des Standards S

A<sub>x</sub>, A<sub>s</sub>: Integralfächenwerte von Protonensignalen des Analyten X bzw. des Standards S

n<sub>x</sub>, n<sub>s</sub>: Anzahl der Protonen, welche die Signalintegralfächen A<sub>x</sub> und A<sub>s</sub> hervorrufen

M<sub>x</sub>, M<sub>s</sub>: Relative Molmassen des Analyten X bzw. des Standards S

R<sub>s</sub>: Reinheit des Standards S.

### **3.3 Realproben**

#### **3.3.1 Realproben Raumluf**

##### Sprayversuch im Innenraum:

Ein Modellraum mit einem Raumvolumen von 41 m<sup>3</sup>, ausgestattet mit einem Polstersofa, zwei Holztischen (beschichtet), drei Holzstühlen (teilweise mit Polsterauflage), einem Bücherregal (Holz) und einem Kleiderschrank (beschichtete Spanplatten), wurde für den Sprayversuch genutzt. Der Fußboden bestand aus einem Linoleumbelag, die Wände aus Gipskarton mit weißer Wandfarbe. Der Raum hat ein Fenster zur Westseite.

10 ml einer Standardlösung aller 21 untersuchten Wirkstoffe (100 µg/ml) in Petroleumbenzin/Aceton (90/10, V/V) wurden zehn Sekunden lang gleichmäßig im Raum mit einer Sprayflasche versprüht. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Wirkstoffe der Raumluf entspräche dies einer Konzentration von 24,4 µg/m<sup>3</sup> pro Komponente unmittelbar nach der Ausbringung.

Die erste Probe wurde 30 min nach der Ausbringung gezogen, wobei das Probenvolumen 10 % des Raumvolumens (4,1 m<sup>3</sup>) ausmachte. Eine zweite Probe mit einem Volumen von 10 m<sup>3</sup> wurde eine Woche später gezogen. Zwischen den beiden Probenahmen wurde der Raum nicht gelüftet. Die Raumtemperatur und die relative Luftfeuchte betrug bei beiden Versuchen 25 °C und 45 %.

##### Luftprobenahme im Flugzeug:

Im Rahmen eines anderen Projektes wurden an verschiedenen Terminen Probenahmen während und nach der Ausbringung des Wirkstoffes d-Phenothrin zur Desinsektion von Passagierflugzeugen des Typs Airbus A310 durch qualifiziertes Personal durchgeführt. Die Probenahme gliederte sich in zwei Probenahmeabschnitte (2 × 40 min), beginnend mit dem Start der Desinsektionsmaßnahme und dem Wechsel der Sammelmedien nach 40 min. Im Rahmen dieser Arbeit ist lediglich die Verteilung des Wirkstoffes auf die Sammelmedien GFF und PUF von Interesse. Des weiteren konnte eine Realprobe in einem Flugzeug genommen werden, in dem nach dem

Einsatz im afrikanischen Flugverkehr Desinsektionsmaßnahmen durchgeführt worden sind.

### **3.3.2 Realprobe Hausstaub**

Der Inhalt eines vollen Staubsaugerbeutels, der durch mehrwöchiges Staubsaugen in einem gewöhnlichen Haushalt anfiel, wurde auf eine Partikelfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  gesiebt und ein Aliquot der Partikelfraktion auf das Vorkommen von Haushaltsinsektiziden und -akariziden hin untersucht.

### **3.3.3 Realproben Chrysanthemumdicarbonsäure**

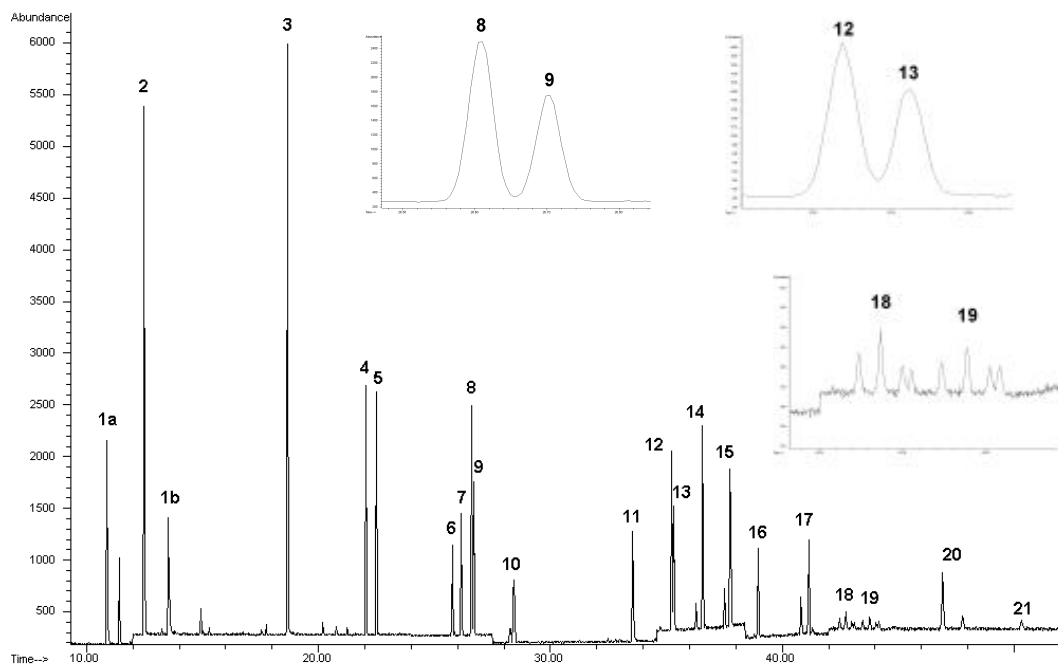
In einem Modellraum gemäß 3.3.1 wurde ein Elektroverdampfer für die Steckdose (Baygon Elektro-Insektenfrei), bestückt mit einem mit 40 mg d-Allethrin beladenen Verdampferplättchen, über einen Zeitraum von 190 min betrieben. Nach 30 min betraten vier freiwillige Personen den Raum und hielten sich die verbleibenden 160 min sitzend bzw. ruhend darin auf (Fenster und Tür geschlossen). Während dieser Zeit wurde eine Luftprobe gezogen. Vor dem Versuch wurde von jeder Person eine Probe Spontanurin zur Ermittlung von eventuellen Leerwerten gesammelt. Nach dem Versuch wurde von jedem Teilnehmer selbst eine 24-Stunden Urinprobe gesammelt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in der Raumluft mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden die Insektizide und Akarizide mit einem Probenahmesystem, bestehend aus einem Glasfaserfilter und zwei Polyurethanschäumen aus der Luft angereichert. Glasfaserfilter und PUF's wurden mit einem organischen Lösemittel extrahiert und die Wirkstoffe mittels GC-MS(EI) bestimmt.

#### 4.1.1 Chromatographische Trennung



**Abb. 14:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml). Peakzuordnung siehe Tabelle 6.

Zunächst wurden die chromatographischen Bedingungen optimiert, damit alle Wirkstoffe, die im Rahmen der Methodenentwicklung bestimmt werden sollten, optimal aufgetrennt werden. Das TIC-Chromatogramm des Multistandards, der alle Wirkstoffe in der niedrigsten Kalibrierkonzentration (0,1 µg/ml) enthält, ist in **Abb. 14** dargestellt. Alle Peaks sind praktisch



basisliniengetrennt. Die „kritischen“ Peakpaare Fenthion/Chlorpyrifos (8/9) und Piperonylbutoxid/Resmethrin (12/13) haben eine Auflösung von  $R = 1,3$  bzw.  $R = 1,1$ . Dies bedeutet, dass sich die Peakflächen zu weniger als 2 % (bei  $R = 1$ ) überlappen (siehe auch gezoomte Chromatogramme in Abb. 14). Diese Standardkonzentration stellt auch die Bestimmungsgrenze der Wirkstoffe Cyfluthrin/Cypermethrin (18/19) und Deltamethrin (21) dar. Diflubenzuron wird im Injektor quantitativ in die beiden Fragmentmoleküle p-Chlorbenzolisocyanat (1a) und 2,6-Difluorbenzamid (1b) zersetzt. Die Zersetzung ist bei konstanter Injektortemperatur ( $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) reproduzierbar. Aufgrund der Zersetzung ist die Split/Splitless-GC nicht die optimale Methode zur Bestimmung von Diflubenzuron. Die Ergebnisse der nächsten Kapitel (Kalibrierung, Reproduzierbarkeit, Wiederfindungen) zeigen aber, dass die Bestimmung über die Fragmentmoleküle möglich ist. Auch Propoxur wird zu 2-Isopropoxyphenol fragmentiert, aber im Gegensatz zu Diflubenzuron nur zu einem geringen Prozentsatz (kleiner Peak zwischen den Peaks 1a und 2 in Abb. 14). Da also Propoxur selbst bestimmt werden kann, wird der Peak des 2-Isopropoxyphenols im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

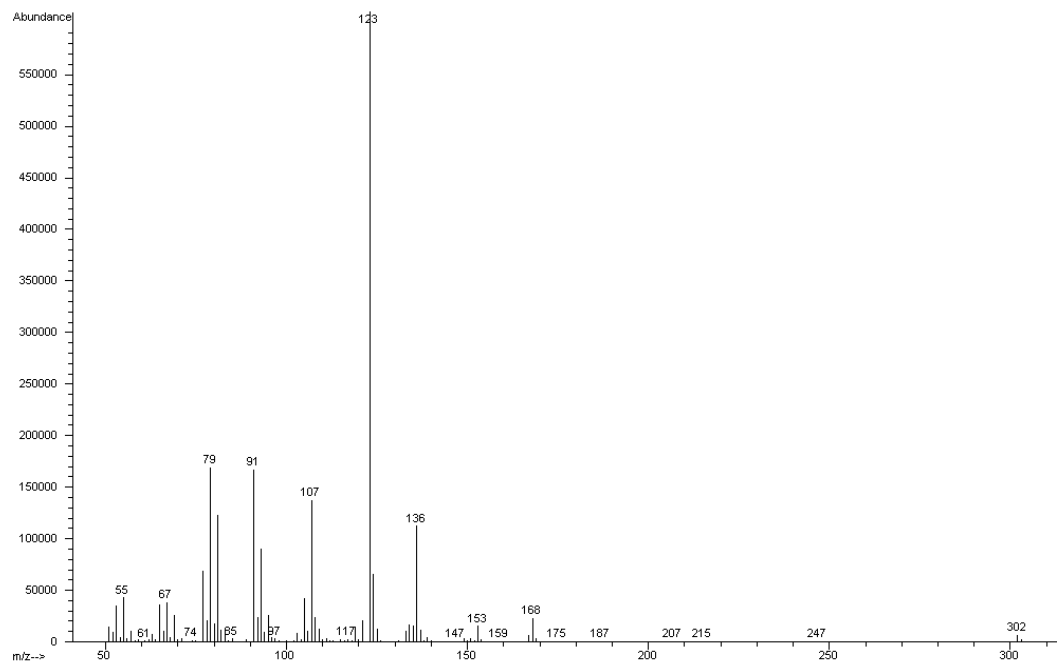
Bei den Pyrethroiden zeigen sich im Chromatogramm z.T. mehrere Isomerenpeaks: Allethrin (4), Tetramethrin (2), Phenothrin (2), Permethrin (2), Cyfluthrin (4), Cypermethrin (4) und Fenvalerat (2). Bei diesen Verbindungen wurde immer eine Peaksummenintegration durchgeführt.

Die Asymmetriefaktoren  $T$  der einzelnen Peaks sind wie folgt: p-Chlorbenzolisocyanat (1,8), 2,6-Difluorbenzamid (1,5), Dichlorvos (1,4), Propoxur (1,0), Lindan (1,1), Diazinon (1,0), Fenitrothion (0,8), Malathion (0,8), Fenthion (1,1), Chlorpyrifos (0,8), Allethrin (0,9), Chlordecon (0,9), Piperonylbutoxid (0,9), Resmethrin (1,0), Tetramethrin (1,0), Phenothrin (0,9), Cyhalothrin (0,9), Permethrin (0,9), Cyfluthrin (1,1), Cypermethrin (1,0), Fenvalerat (1,1) und Deltamethrin (1,0). Bei Verbindungen mit mehreren Isomerenpeaks sind dabei die Werte für denjenigen Isomerenpeak mit dem höchsten Responsefaktor angegeben. Das Tailing der früh eluierenden Peaks liegt an deren Polarität. Die verwendete Säule stellt eine Kompromisslösung dar, um alle genannten Wirkstoffe

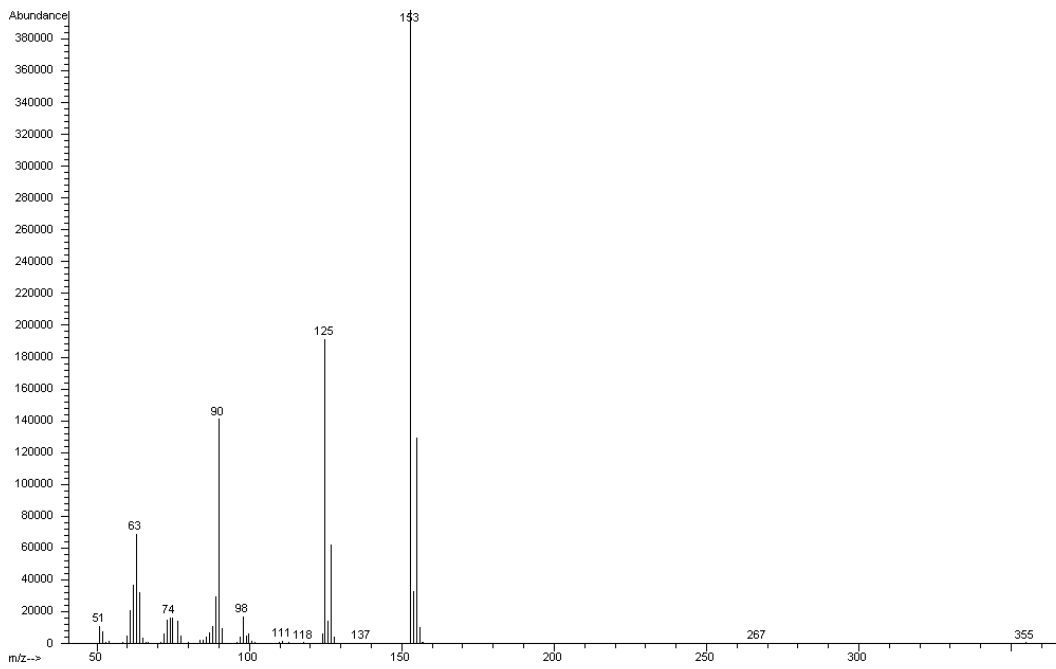
untersuchen zu können. Sie ist aufgrund ihres relativ unpolaren Charakters für die polaren Verbindungen weniger geeignet.

#### **4.1.2 Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) der untersuchten Wirkstoffe**

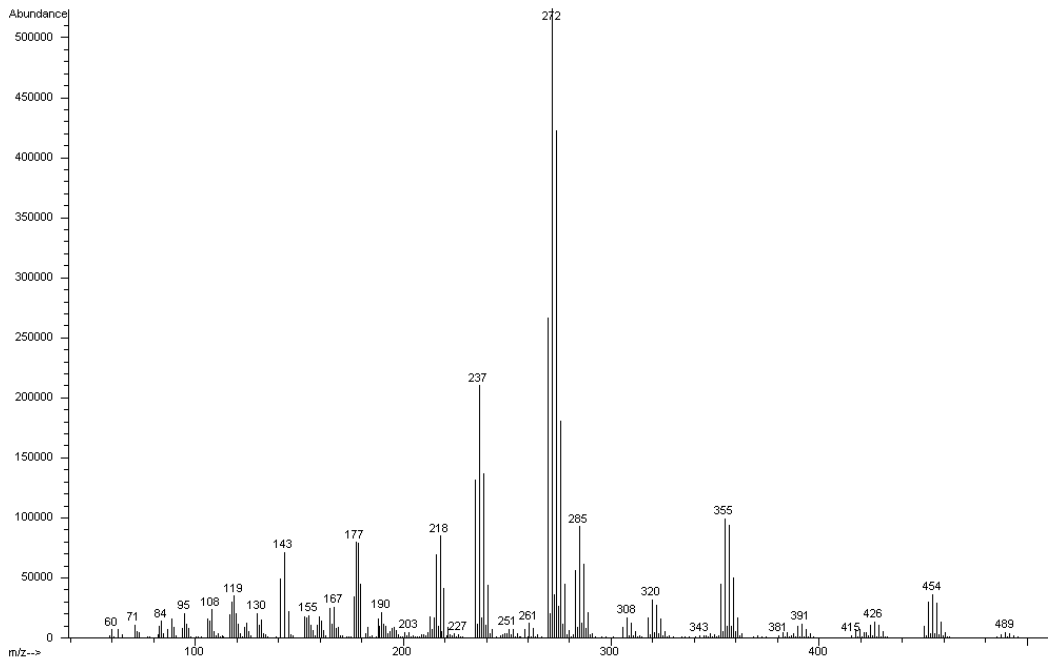
Die im SCAN-Modus aufgenommenen EI-Massenspektren sind nachfolgend aufgeführt (**Abb. 15a-v**). Sie dienen zur Identifizierung der Substanzen sowie zur Auswahl der Target- und Qualifierionen für die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus (siehe Kapitel 3.2.1).



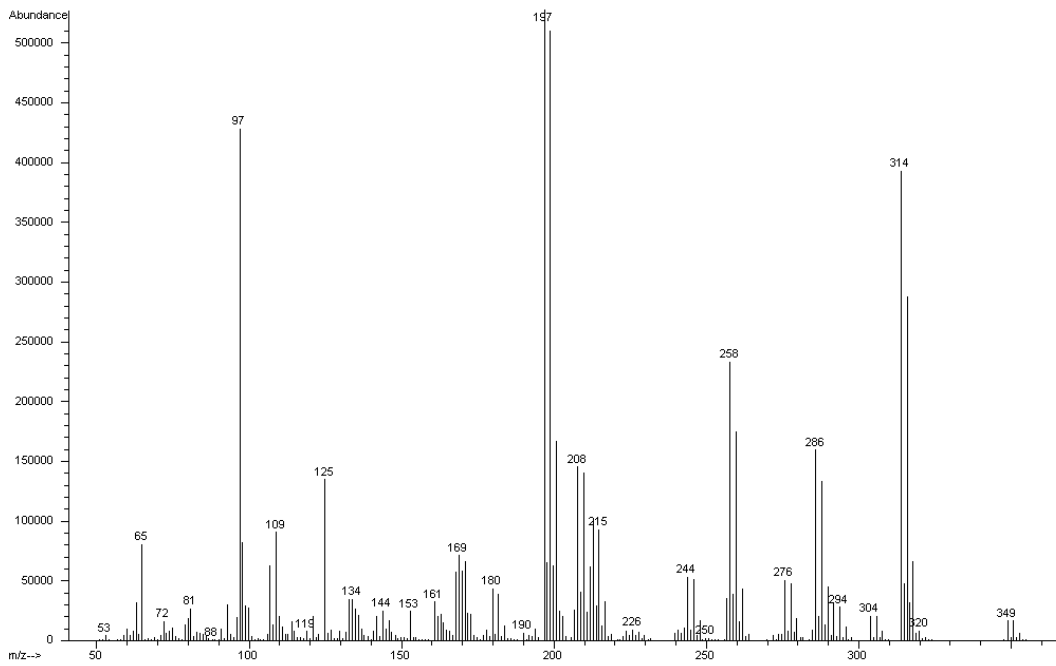
**Abb. 15a:** EI-MS-Spektrum von Allethrin (M = 302).



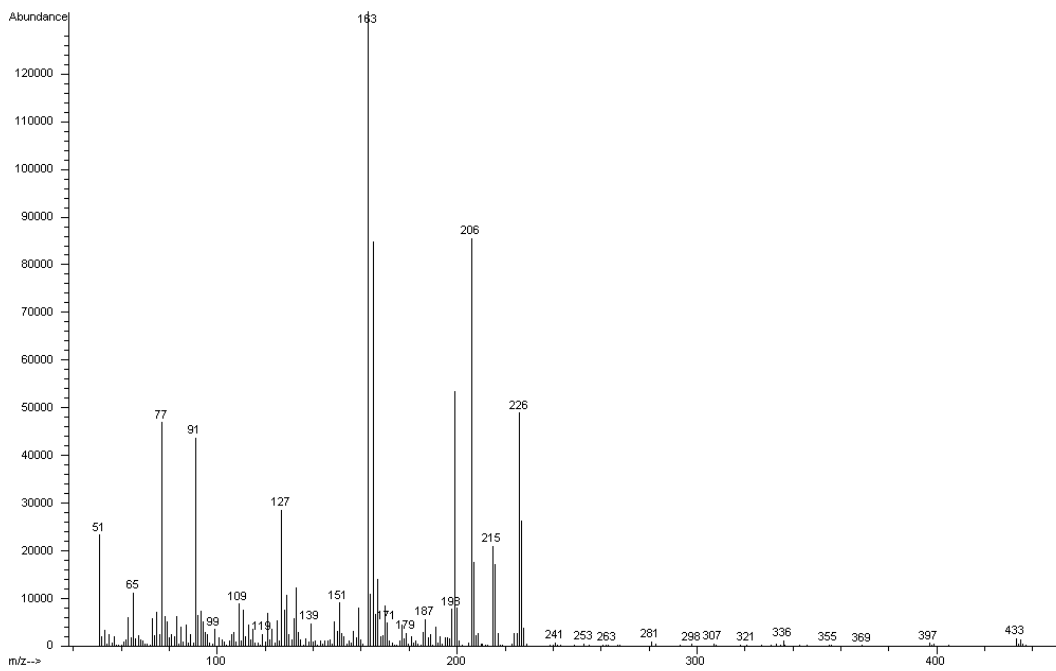
**Abb. 15b:** EI-MS-Spektrum von p-Chlorbenzylisocyanat ( $M = 153$ ).



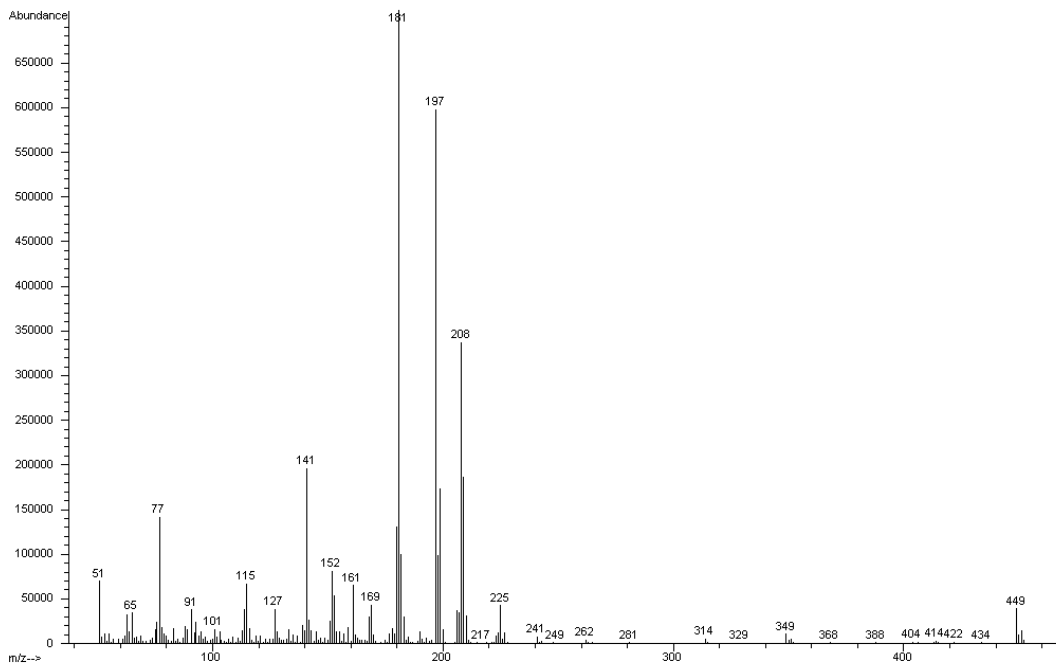
**Abb. 15c:** EI-MS-Spektrum von Chlordecon ( $M = 486$ ).



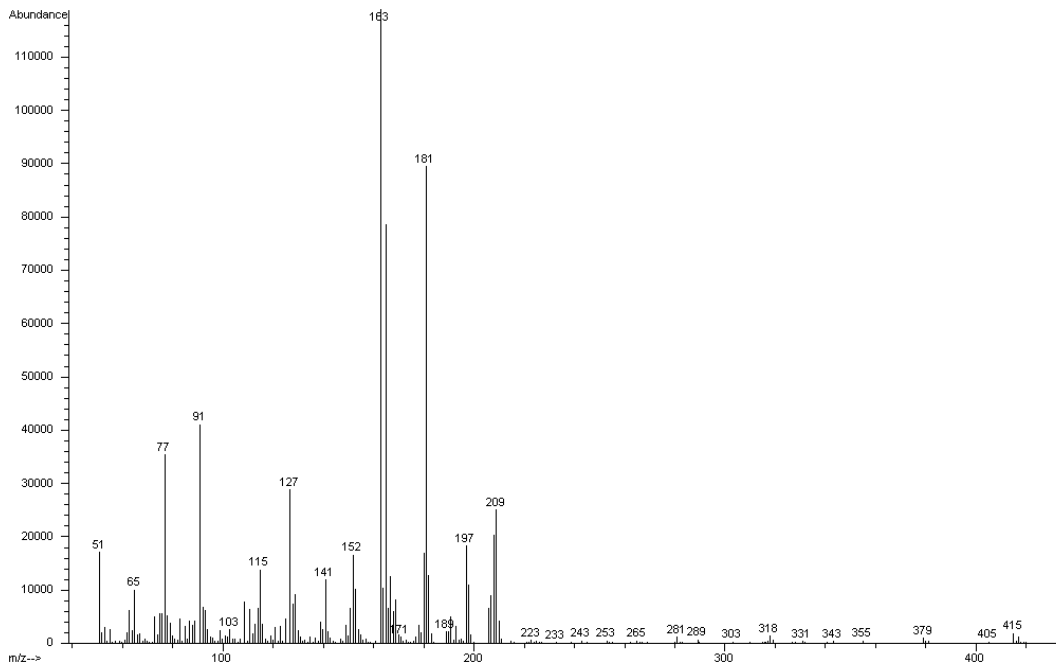
**Abb. 15d:** EI-MS-Spektrum von Chlorpyrifos ( $M = 349$ ).



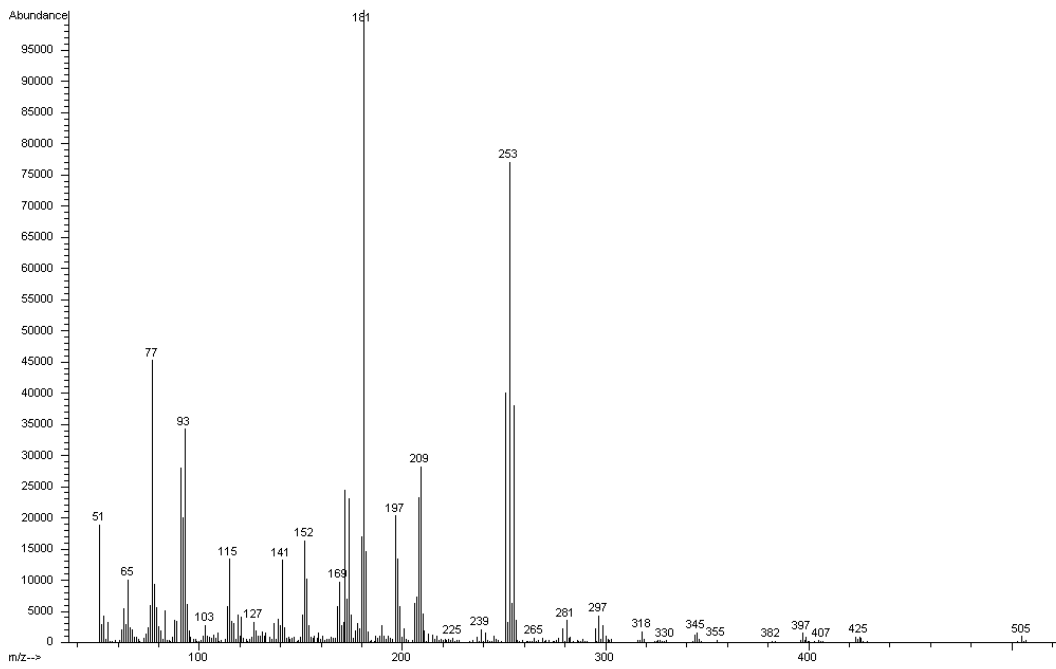
**Abb. 15e:** EI-MS-Spektrum von Cyfluthrin ( $M = 433$ ).



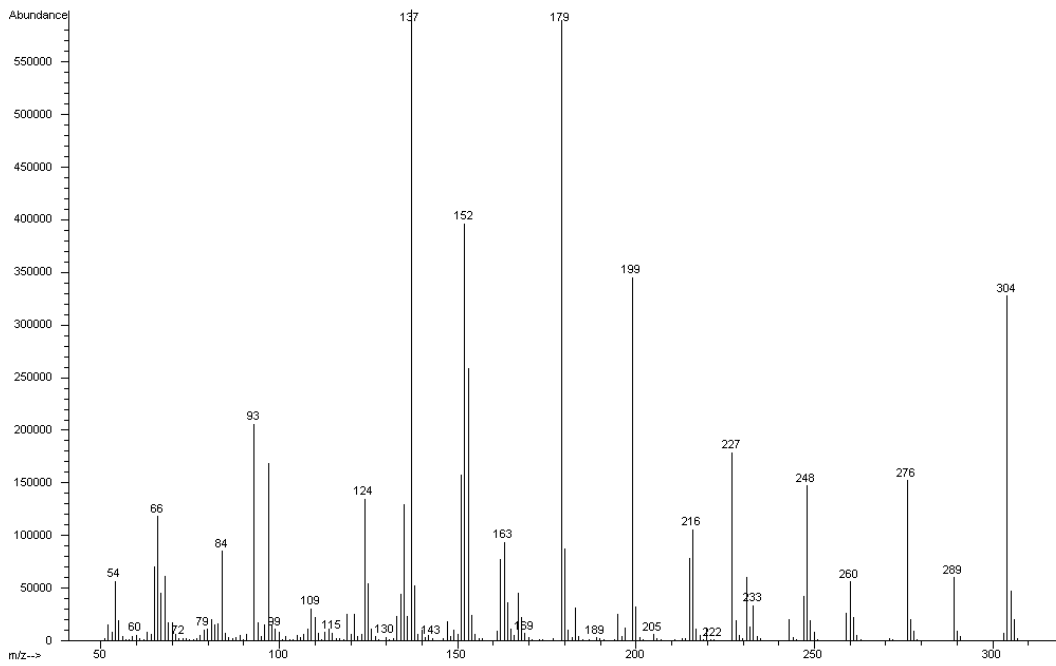
**Abb. 15f:** EI-MS-Spektrum von Cyhalothrin (M = 449).



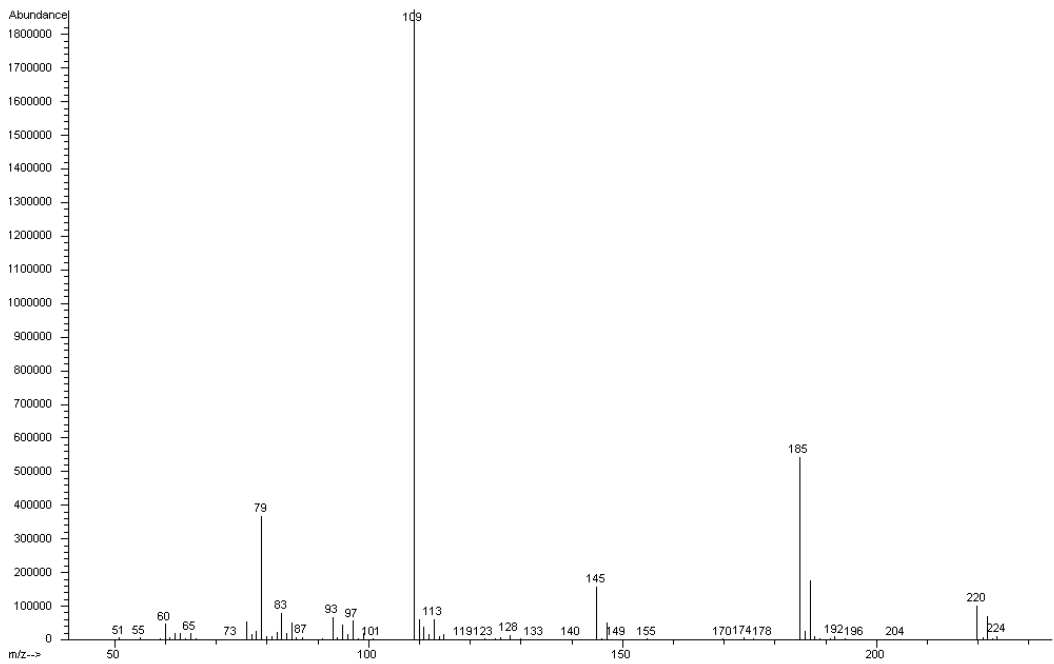
**Abb. 15g:** EI-MS-Spektrum von Cypermethrin (M = 415).



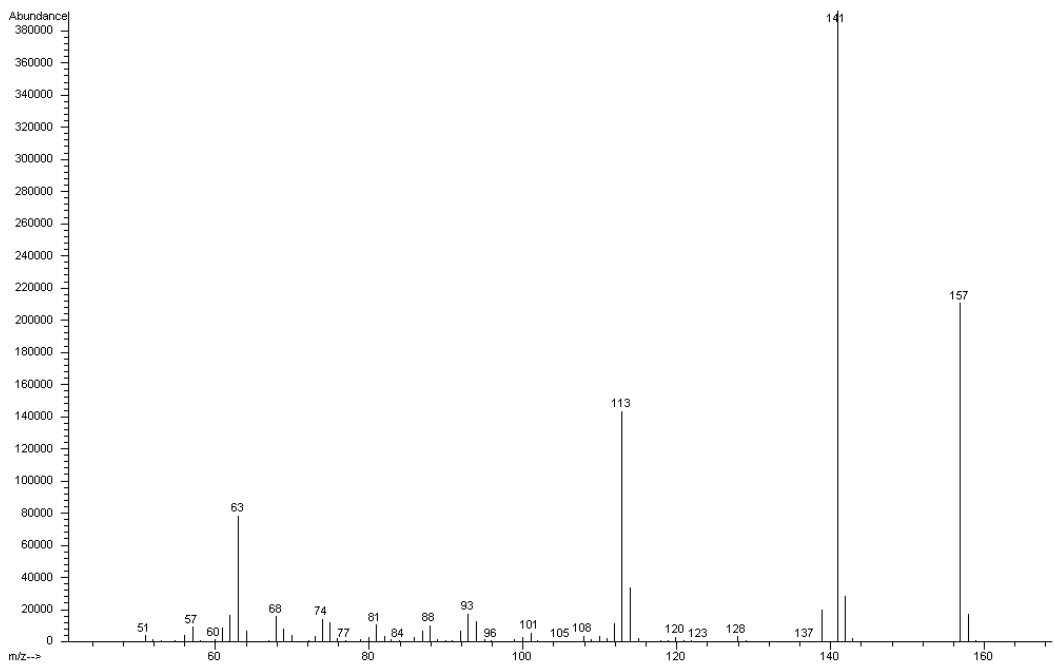
**Abb. 15h:** EI-MS-Spektrum von Deltamethrin (M = 505).



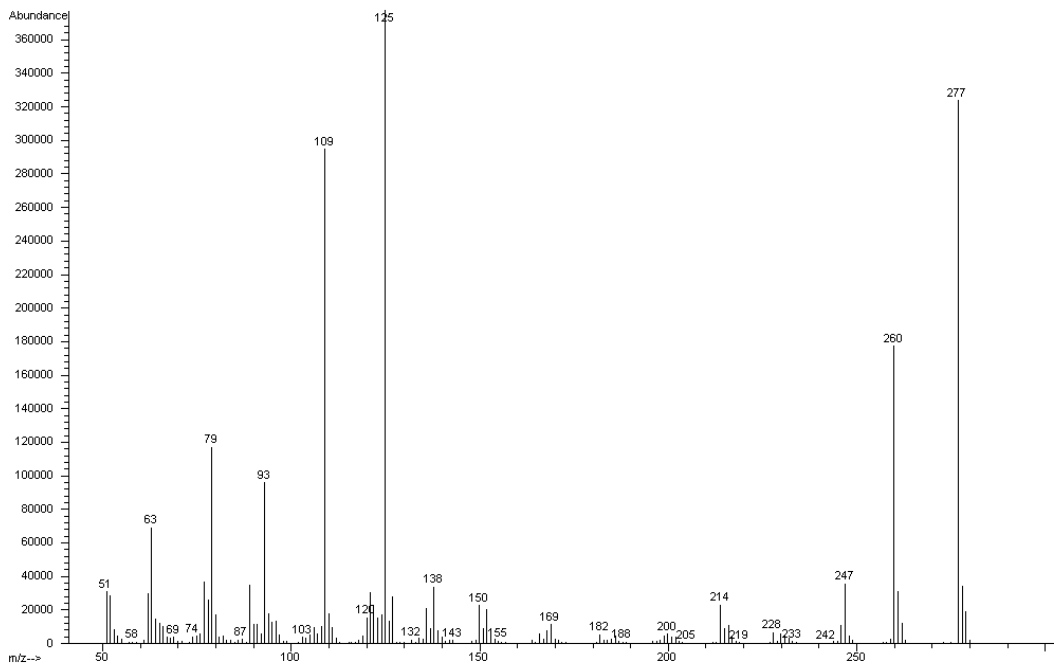
**Abb. 15i:** EI-MS-Spektrum von Diazinon (M = 304).



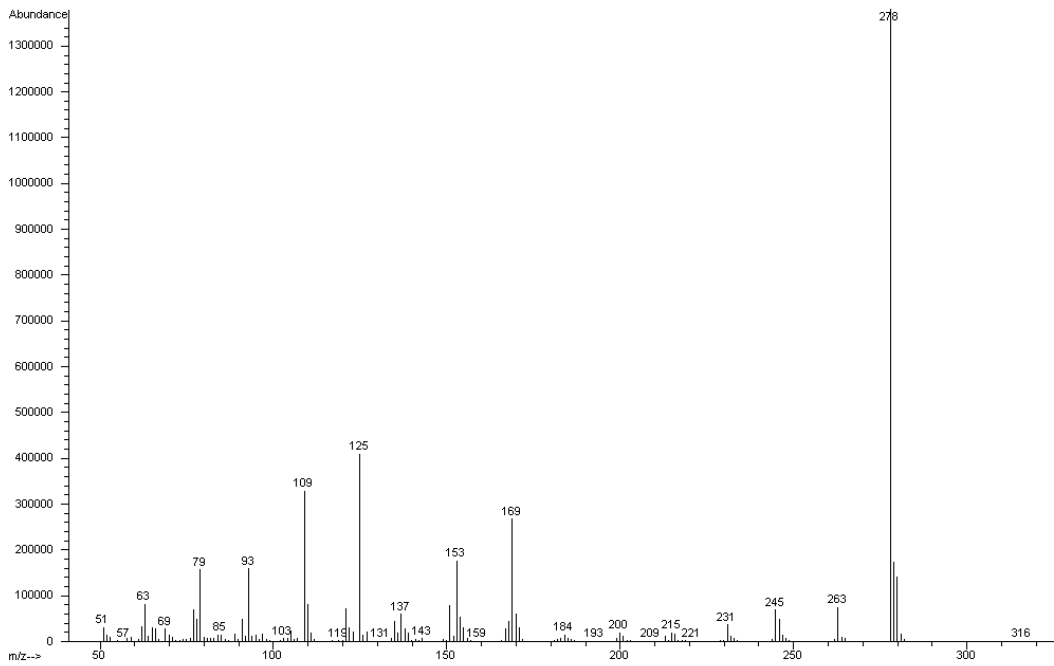
**Abb. 15j:** EI-MS-Spektrum von Dichlorvos (M = 220).



**Abb. 15k:** EI-MS-Spektrum von 2,6-Difluorbenzamid (M = 157).

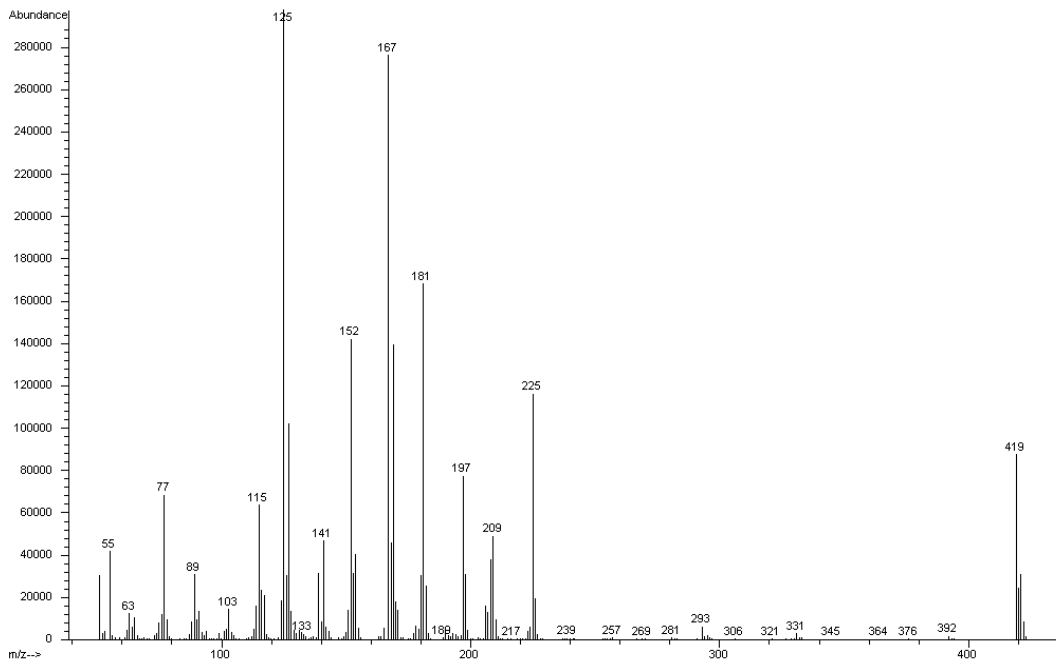


**Abb. 15l:** EI-MS-Spektrum von Fenitrothion (M = 277).

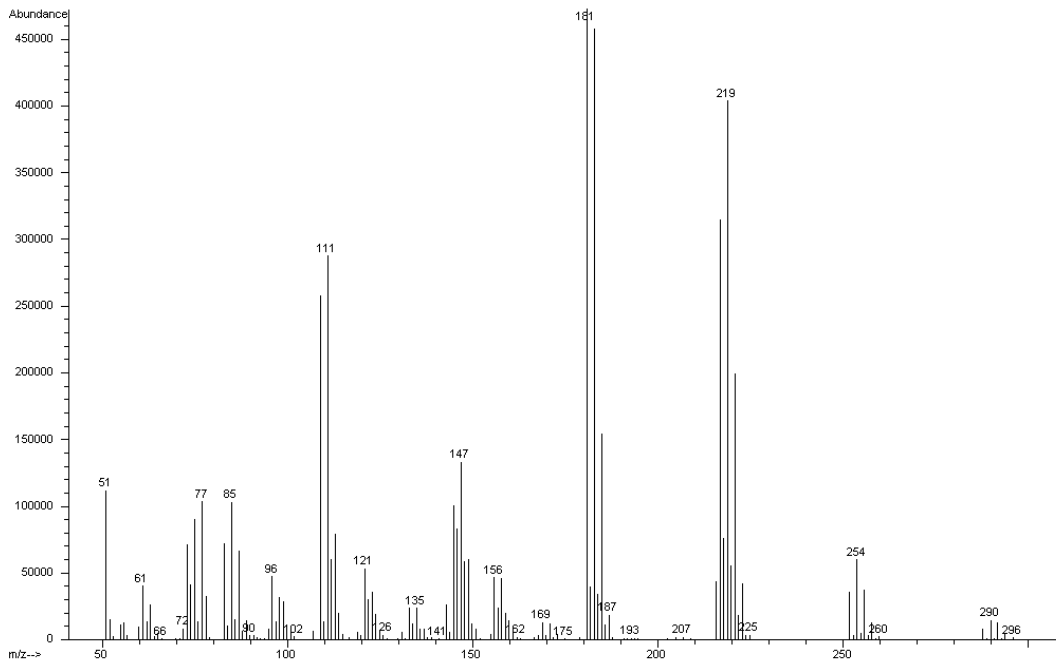


**Abb. 15m:** EI-MS-Spektrum von Fenthion (M = 278).

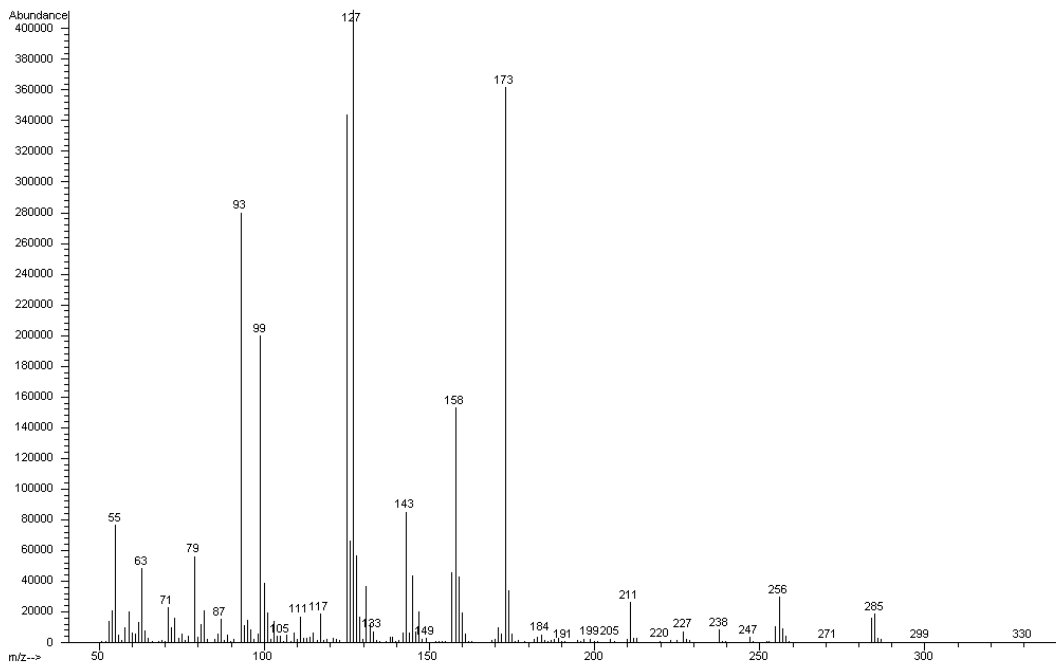




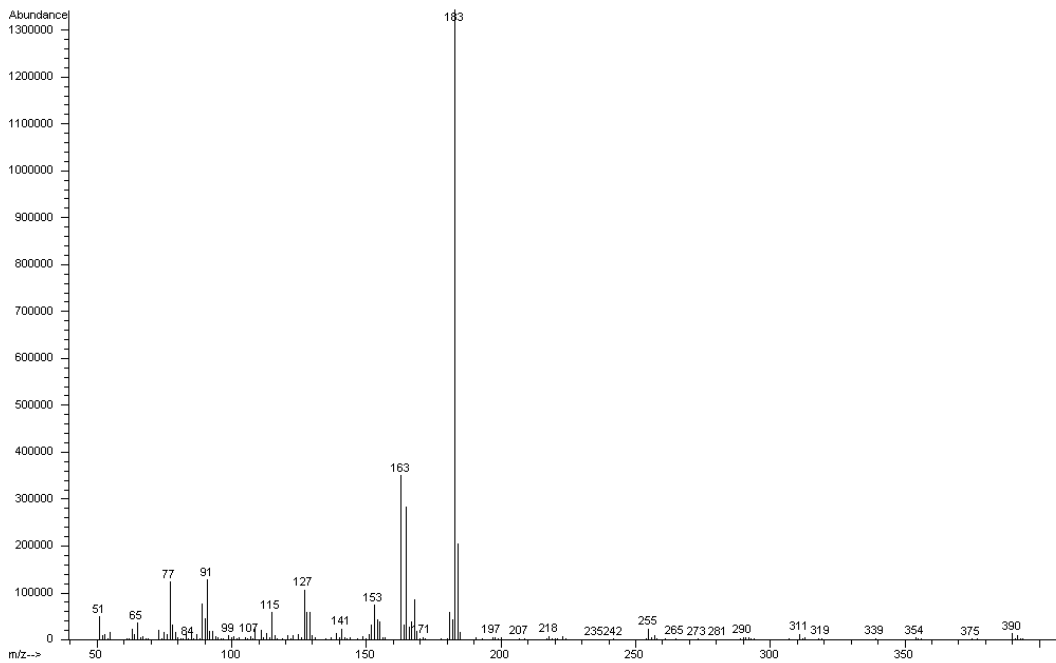
**Abb. 15n:** EI-MS-Spektrum von Fenvalerat (M = 419).



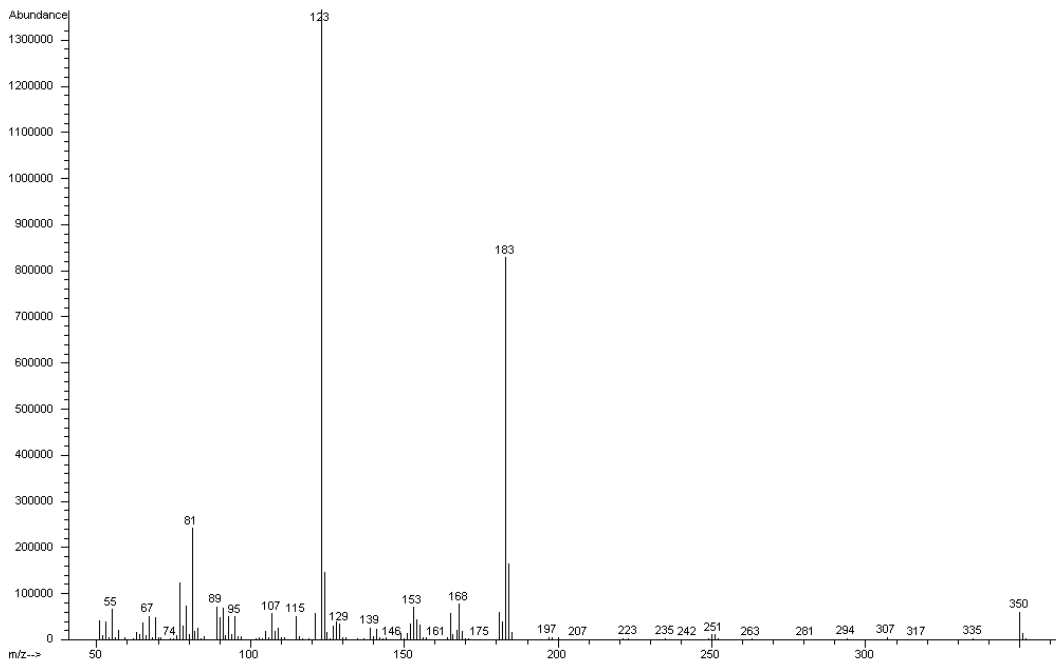
**Abb. 15o:** EI-MS-Spektrum von Lindan (M = 288).



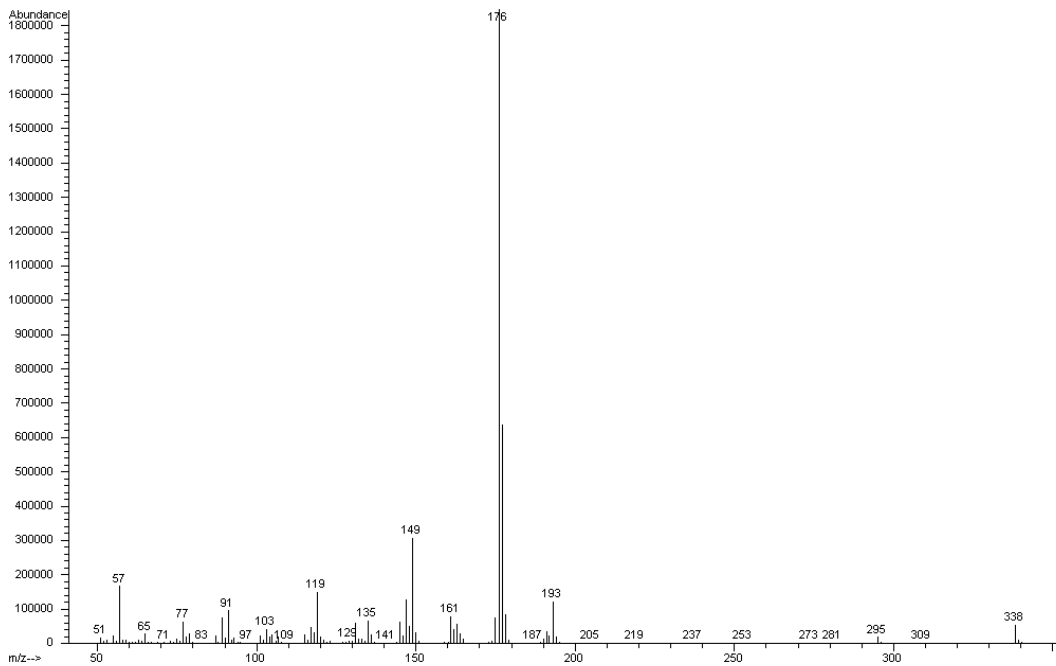
**Abb. 15p:** EI-MS-Spektrum von Malathion (M = 330).



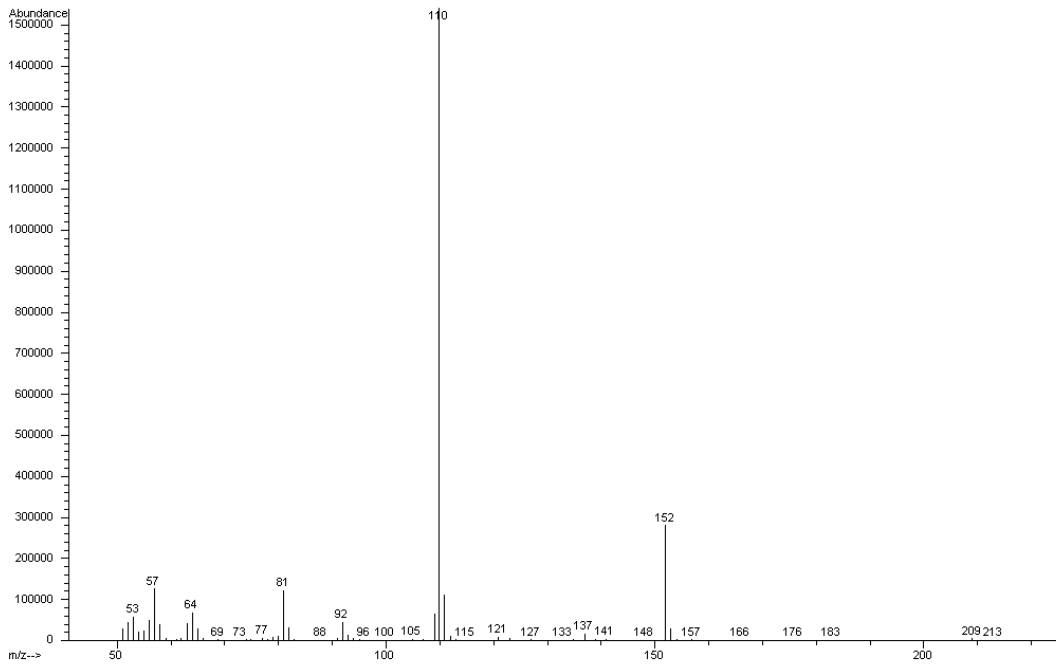
**Abb. 15q:** EI-MS-Spektrum von Permethrin (M = 390).



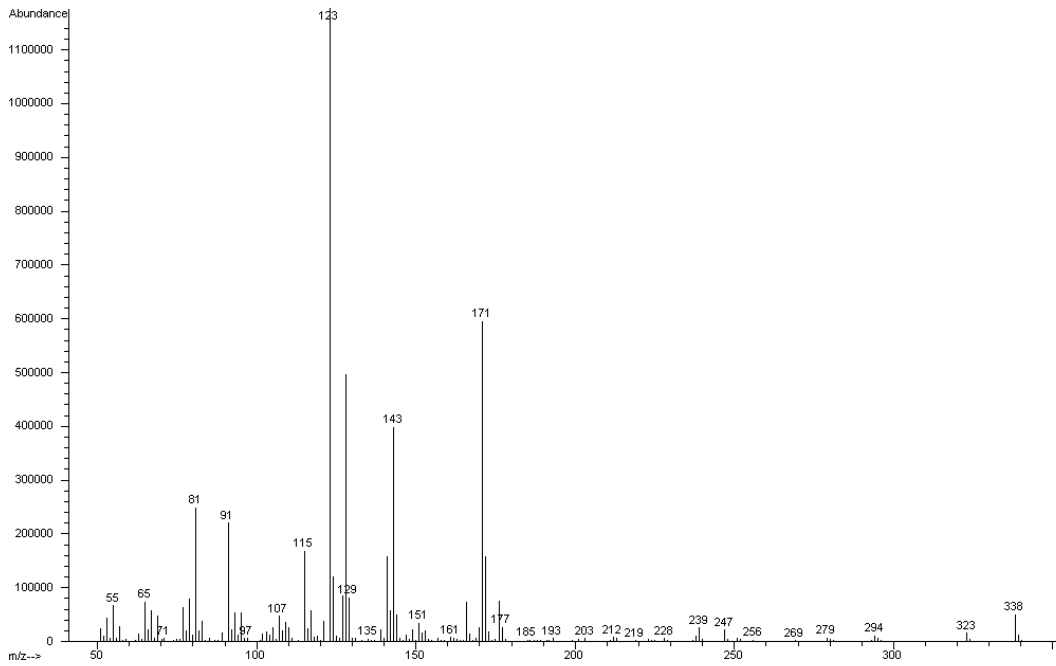
**Abb. 15r:** EI-MS-Spektrum von Phenothin (M = 350).



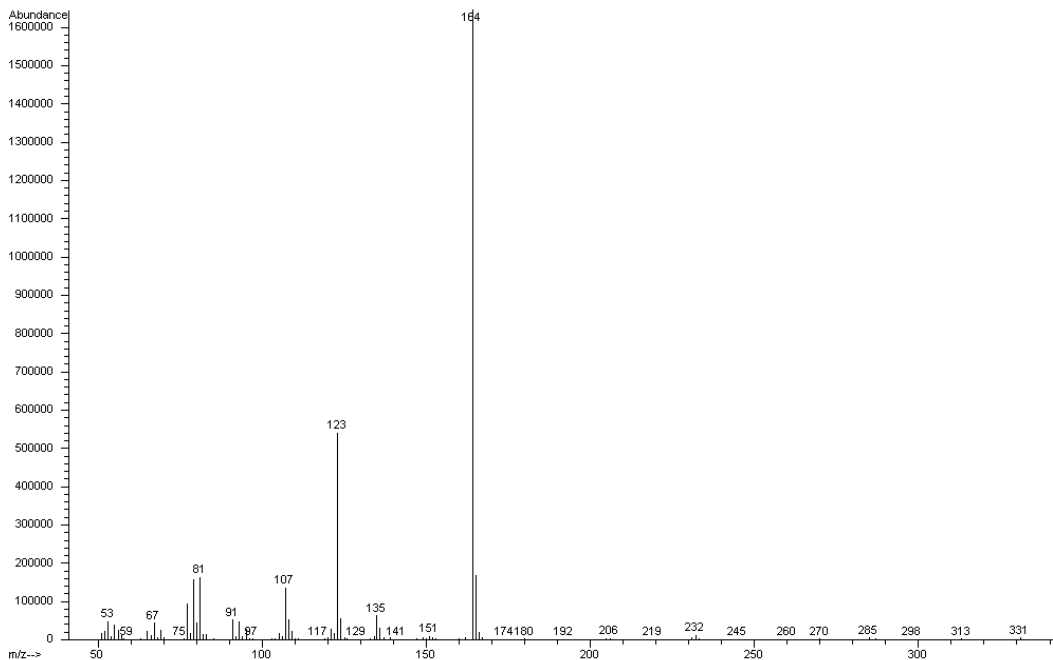
**Abb. 15s:** EI-MS-Spektrum von Piperonylbutoxid (M = 338).



**Abb. 15t:** EI-MS-Spektrum von Propoxur (M = 209).



**Abb. 15u:** EI-MS-Spektrum von Resmethrin (M = 338).



**Abb. 15v:** EI-MS-Spektrum von Tetramethrin (M = 331).

#### **4.1.3 Arbeitsbereich, Linearität und Reproduzierbarkeit der Messungen**

Die Kalibrierkurven einer Kalibrierung mit reinen Standardlösungen zeigen bei niedrigen Konzentrationen nur einen sehr engen linearen Bereich. Lineare Kalibrierkurven können in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 µg/ml (**Abb. 16a-v**) und 1 bis 2 µg/ml erhalten werden (**Tabelle 6**).

Kalibriert man über den gesamten Bereich von 0,1 bis 2 µg/ml, so kann nicht mehr von einer linearen Kalibrierfunktion gesprochen werden, da dann die Korrelationskoeffizienten unter  $r^2 = 0,98$  sinken. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei den Pyrethroiden und Organophosphaten. Dies hat ähnliche Gründe wie die weiter unten besprochene Signalverstärkung bei matrixbelasteten Proben. Aktive Oberflächen im Injektorport und auf der Säule führen zu Substanzverlusten, deren Anteil an der Gesamtkonzentration bei niedrigen Standardkonzentrationen größer ist als bei höheren Standardkonzentrationen. Dadurch steigt die Signalintensität (Response) mit zunehmender Analytkonzentration überproportional an.

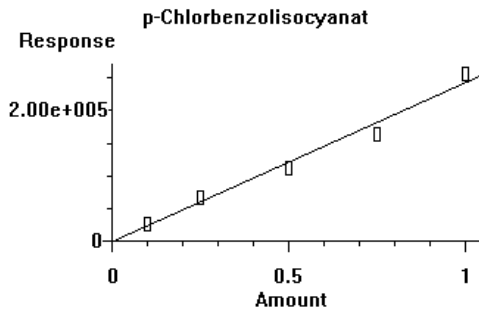
**Tabelle 6:** Spalten 3-4: Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) der linearen Kalibriergeraden, erstellt mit reinen Standardlösungen;  $K_1$ : 0,1 bis 1  $\mu\text{g/ml}$ ;  $K_2$ : 1 bis 2  $\mu\text{g/ml}$ . Spalten 5-7: Reproduzierbarkeit der Messung einer Standardlösung der Konzentration 1  $\mu\text{g/ml}$  (relative Standardabweichung der Peakfläche in Prozent): (a) Standard in Ethylacetat ( $n = 20$ ), (b) Standard mit Matrix GFF + 10  $\text{m}^3$  Luft (Systemtest jede 4. Messung von insgesamt 25), (c) Standard mit Matrix PUF + 10  $\text{m}^3$  Luft (Systemtest jede 4. Messung von insgesamt 25).

Peak Nr.	Wirkstoff	$r^2$ ( $K_1$ )	$r^2$ ( $K_2$ )	(a)	(b)	(c)
1a	p-Chlorbenzol- isocyanat	0,980	0,980	5,1	7,3	7,0
1b	2,6-Difluor- benzolid	0,984	0,988	3,9	8,0	4,9
2	Dichlorvos	0,998	0,996	2,7	4,6	6,0
3	Propoxur	0,998	0,998	2,8	6,2	5,4
4	Lindan	0,997	0,995	3,2	4,3	7,3
5	Diazinon	0,989	0,997	1,5	5,7	9,2
6	Fenitrothion	0,999	0,996	0,7	5,6	9,2
7	Malathion	0,998	0,998	1,3	6,5	8,4
8	Fenthion	0,988	0,994	4,7	7,3	9,1
9	Chlorpyrifos	0,985	0,998	2,6	5,8	5,6
10	Allethrin	0,996	0,997	0,9	4,6	9,9
11	Chlordecon	0,994	0,995	2,0	6,3	7,5
12	Piperonylbutoxid	0,996	0,994	0,8	6,4	9,9
13	Resmethrin	0,986	0,993	1,1	7,9	9,3
14	Tetramethrin	0,995	0,997	1,0	5,7	6,5
15	Phenothrin	0,986	0,996	1,1	6,3	8,4
16	Cyhalothrin	0,994	0,998	1,0	4,7	9,4
17	Permethrin	0,992	0,997	0,9	5,6	10,1
18	Cyfluthrin	0,996	0,995	0,9	5,1	8,9
19	Cypermethrin	0,990	0,998	0,9	3,8	8,0
20	Fenvalerat	0,990	0,998	0,9	3,6	10,3
21	Deltamethrin	0,992	0,993	0,8	7,1	9,5

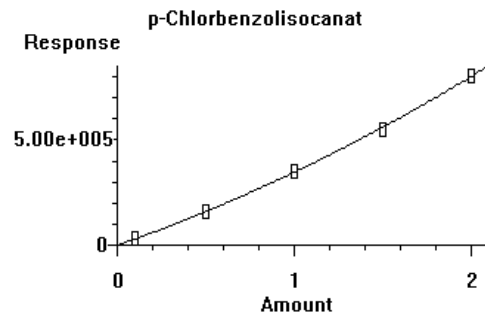
Da es wenig sinnvoll ist, in so engen Konzentrationsbereichen zu kalibrieren, wurden quadratische Kalibrierfunktionen verwendet (ohne Gewichtung der Kalibrierpunkte), mit denen eine bessere Anpassung der Regressionslinie an die Kalibrierpunkte erfolgt. Die dabei erzielten Korrelationskoeffizienten liegen bei  $r^2 \geq 0,997$  für alle Wirkstoffe. Nachfolgend sind die Kalibrierkurven für die Kalibrierung ohne und in der Matrix (GFF + 10  $\text{m}^3$  Luft bzw. PUF + 10  $\text{m}^3$  Luft) dargestellt.

Externe Kalibrierung ohne Matrix und in der Matrix GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft

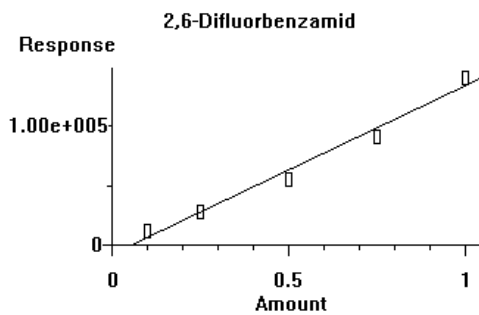
Kalibriergeraden der untersuchten Wirkstoffe (Abb. 16a-v und **Abb. 16a'**-**v'**). Legende: Y-Achse: Counts, X-Achse: Konzentration in µg/ml.



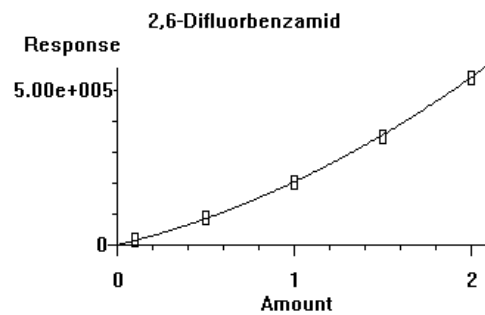
**Abb. 16a** (Ethylacetat)



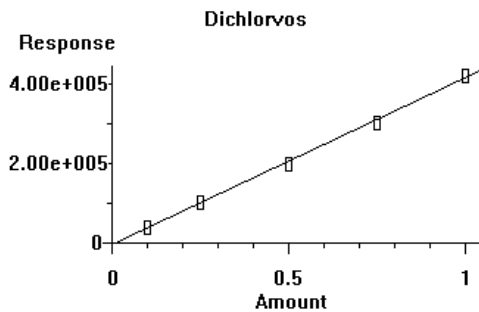
**Abb. 16a'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



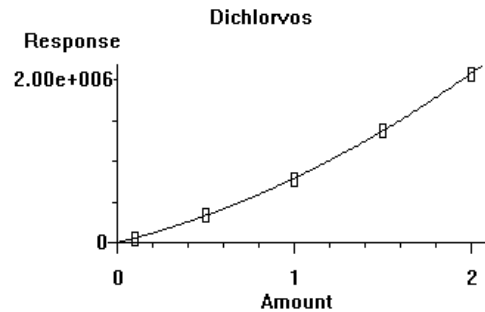
**Abb. 16b** (Ethylacetat)



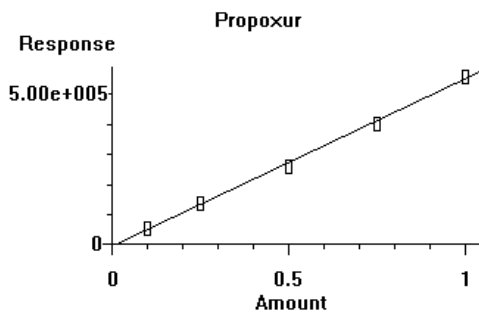
**Abb. 16b'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



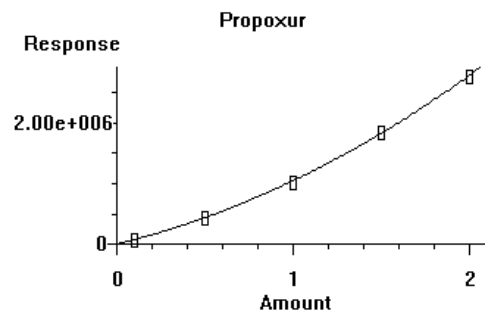
**Abb. 16c** (Ethylacetat)



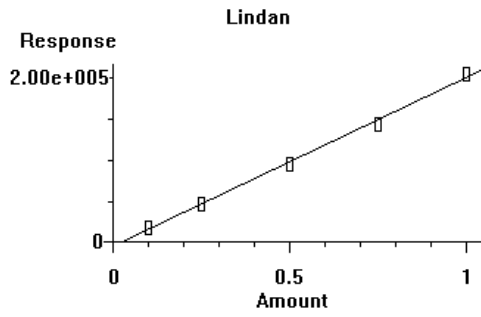
**Abb. 16c'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



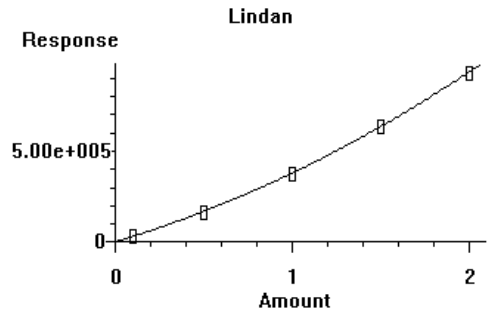
**Abb. 16d** (Ethylacetat)



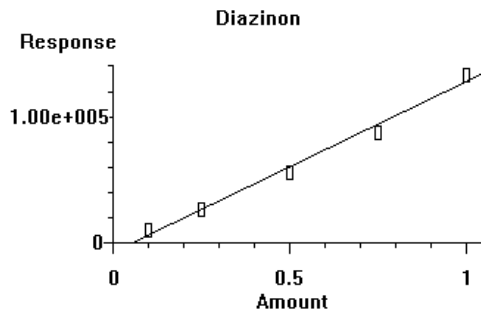
**Abb. 16d'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



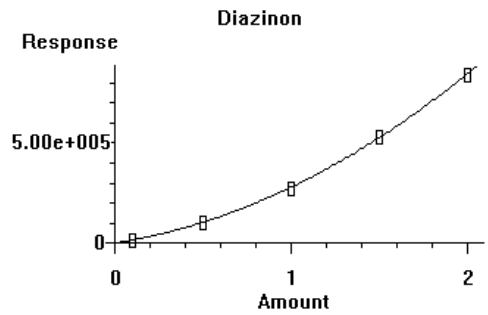
**Abb. 16e** (Ethylacetat)



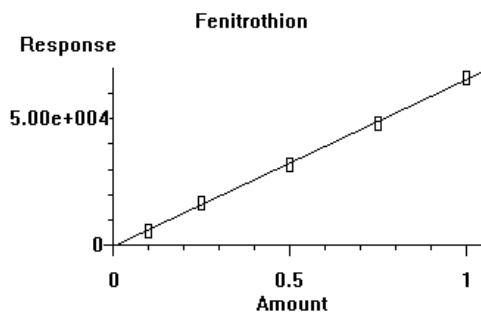
**Abb. 16e'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



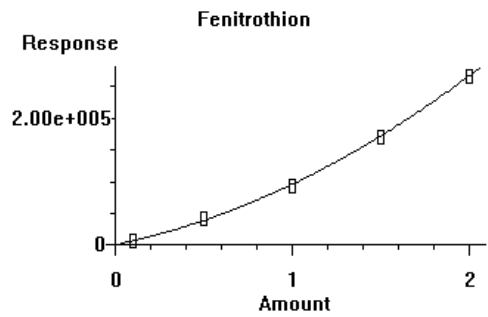
**Abb. 16f** (Ethylacetat)



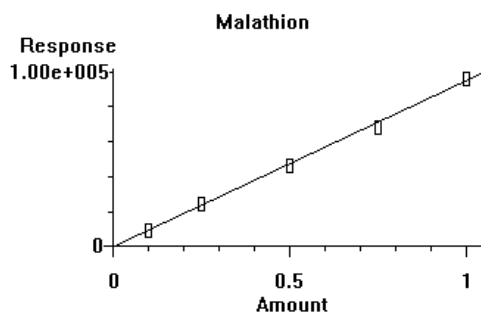
**Abb. 16f'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



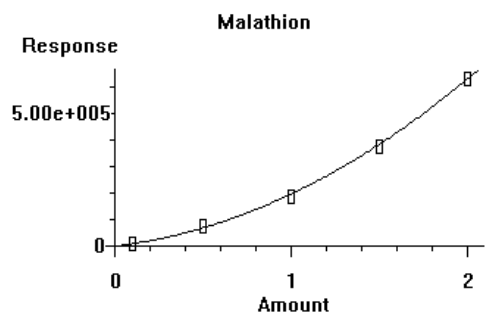
**Abb. 16g** (Ethylacetat)



**Abb. 16g'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)

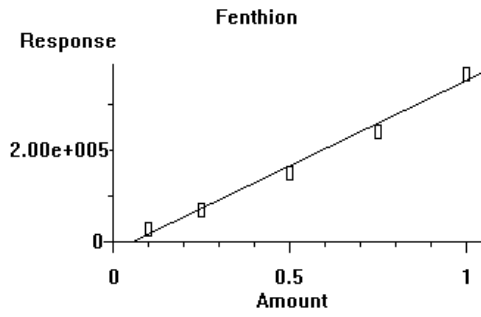


**Abb. 16h** (Ethylacetat)

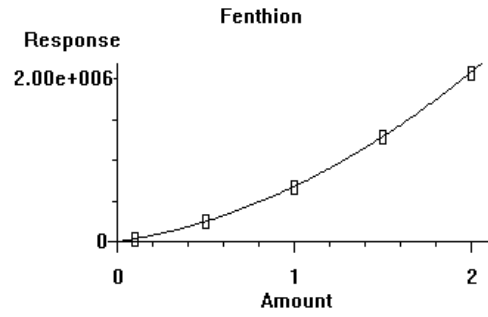


**Abb. 16h'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)

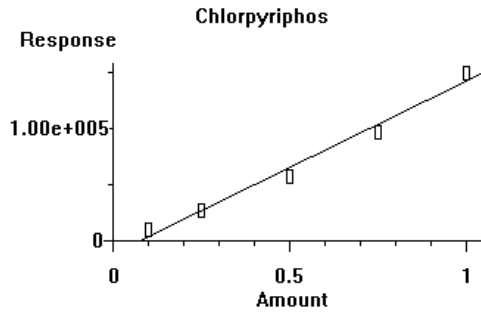




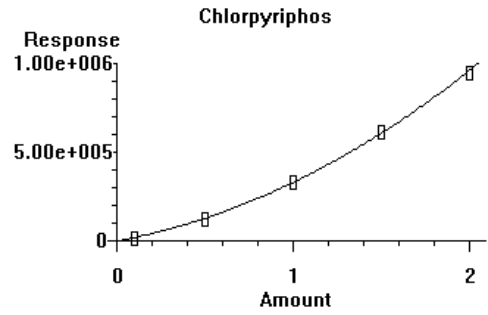
**Abb. 16i** (Ethylacetat)



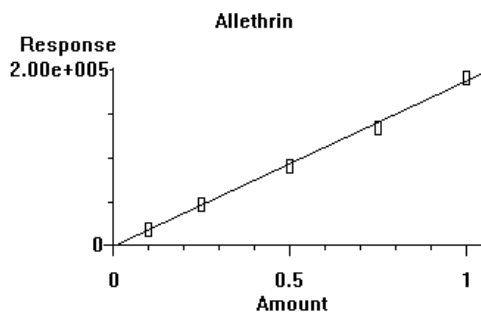
**Abb. 16i'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



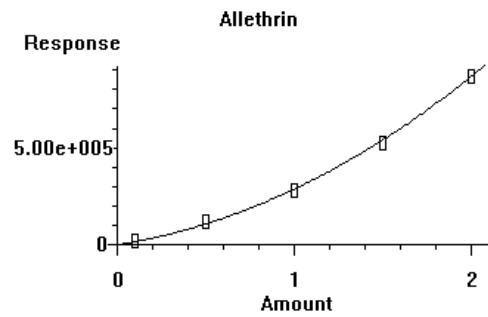
**Abb. 16j** (Ethylacetat)



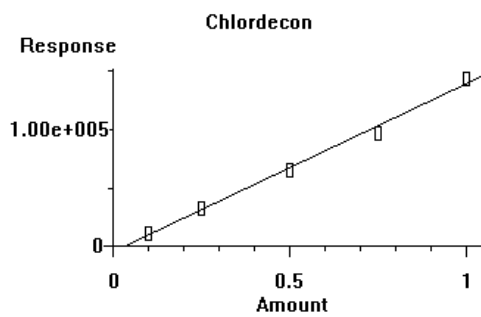
**Abb. 16j'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



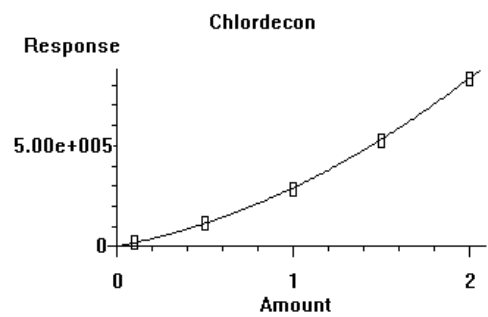
**Abb. 16k** (Ethylacetat)



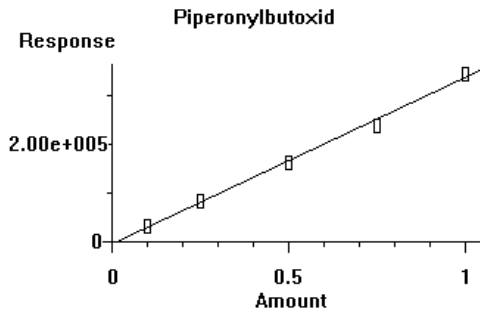
**Abb. 16k'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



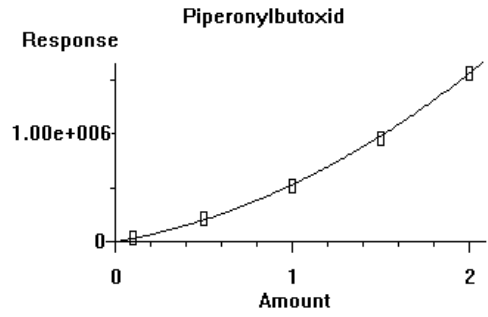
**Abb. 16l** (Ethylacetat)



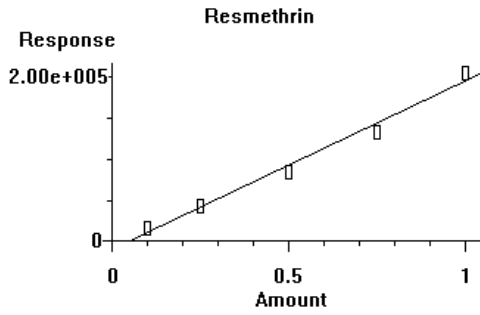
**Abb. 16l'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



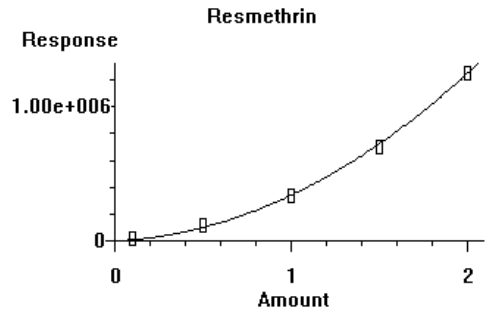
**Abb. 16m** (Ethylacetat)



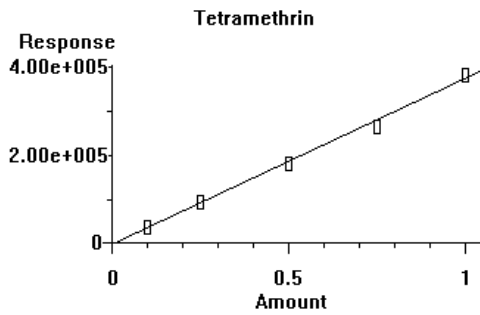
**Abb. 16m'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



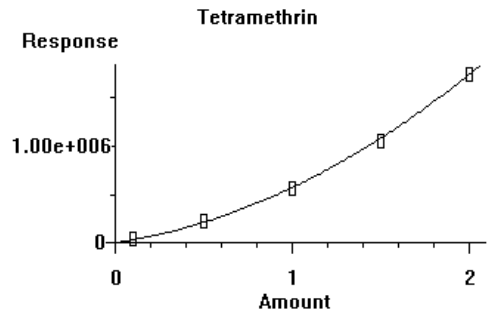
**Abb. 16n** (Ethylacetat)



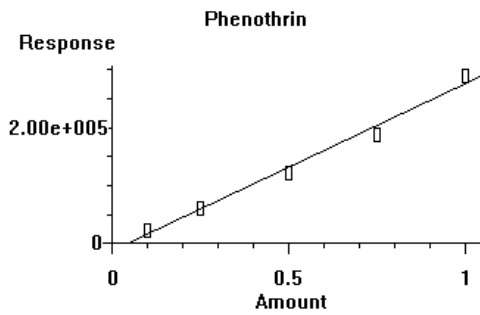
**Abb. 16n'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



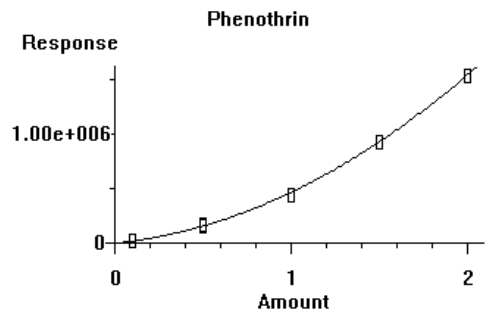
**Abb. 16o** (Ethylacetat)



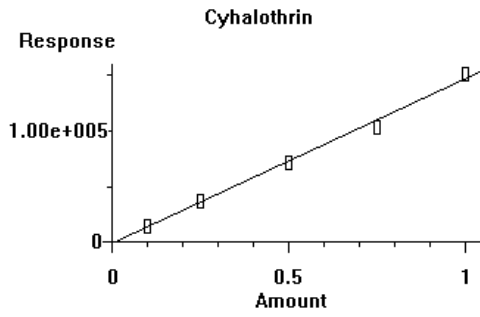
**Abb. 16o'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



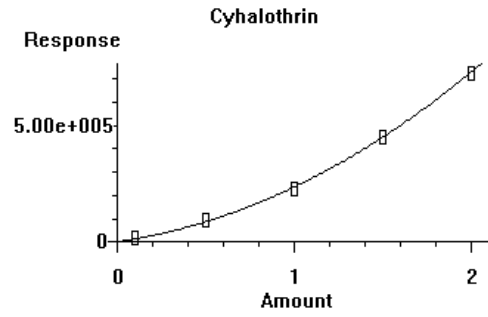
**Abb. 16p** (Ethylacetat)



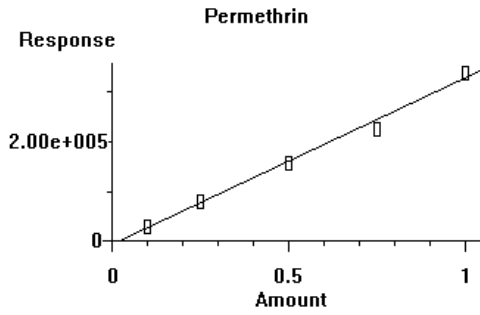
**Abb. 16p'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



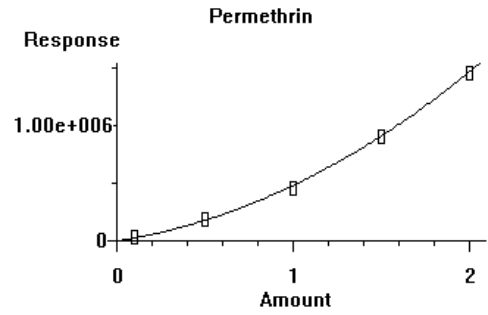
**Abb. 16q** (Ethylacetat)



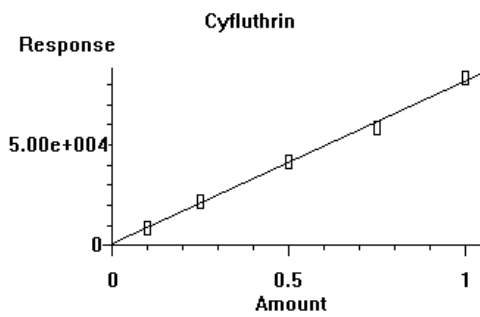
**Abb. 16q'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



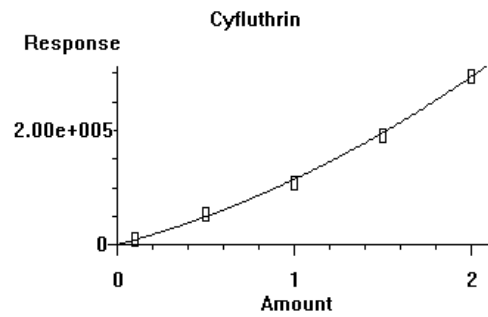
**Abb. 16r** (Ethylacetat)



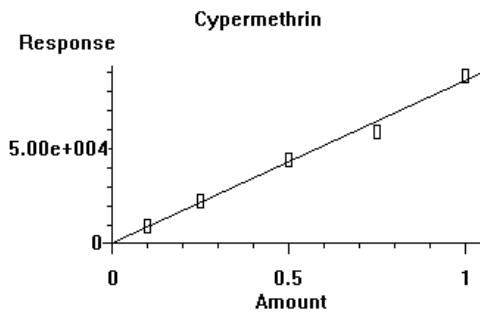
**Abb. 16r'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



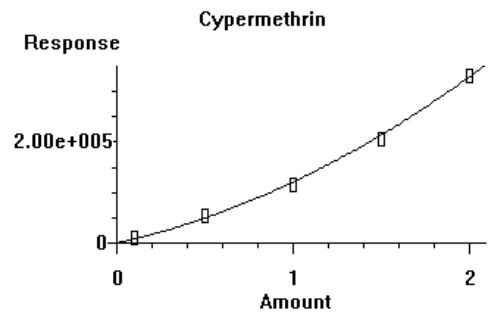
**Abb. 16s** (Ethylacetat)



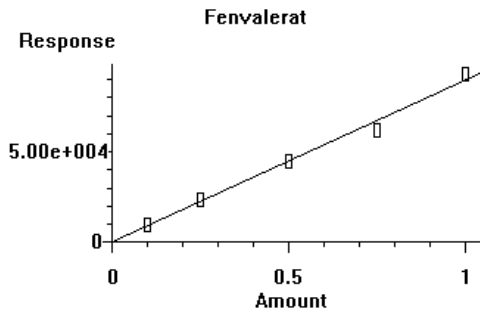
**Abb. 16s'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



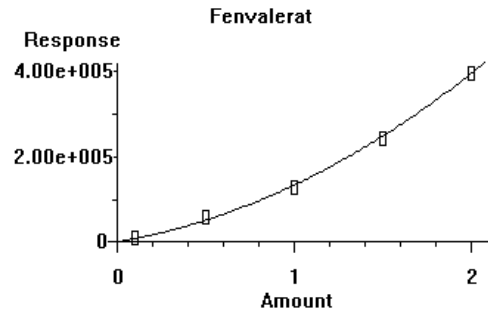
**Abb. 16t** (Ethylacetat)



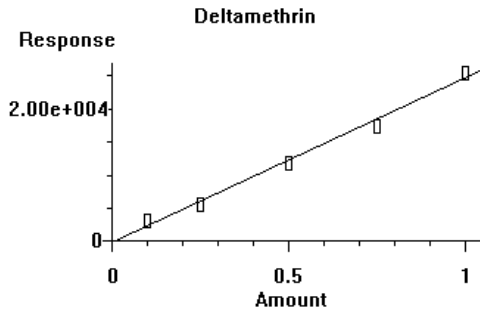
**Abb. 16t'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



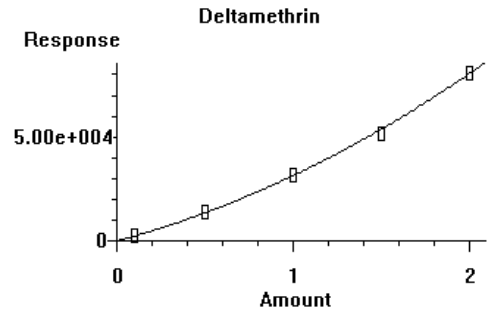
**Abb. 16u** (Ethylacetat)



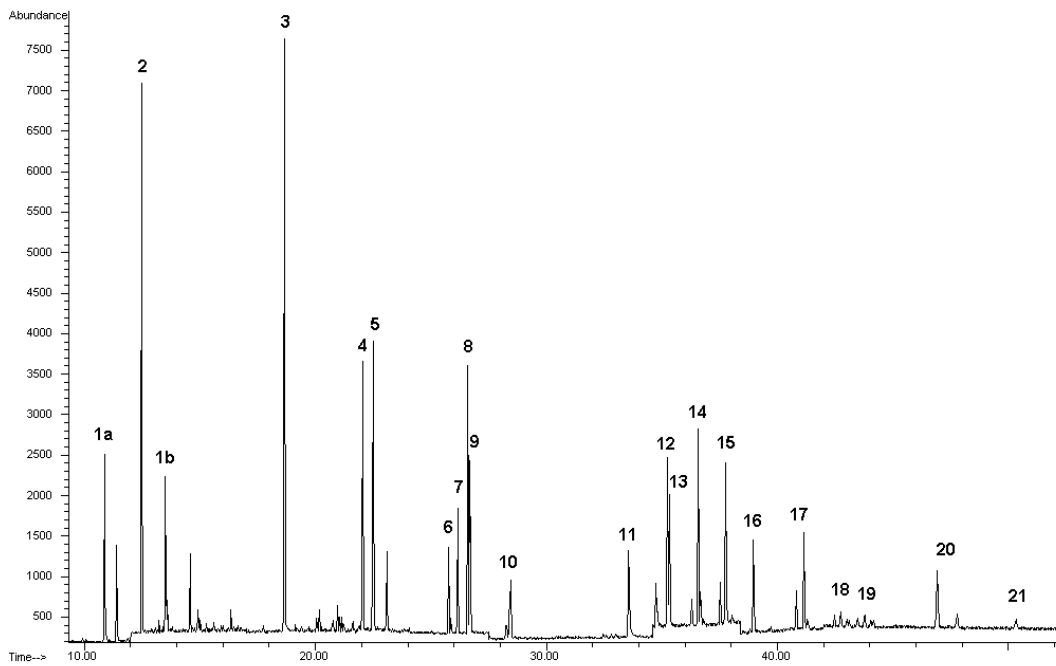
**Abb. 16u'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



**Abb. 16v** (Ethylacetat)



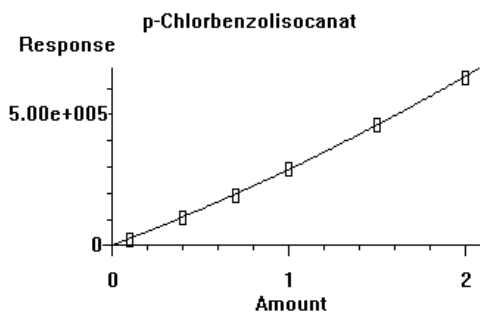
**Abb. 16v'** (GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft)



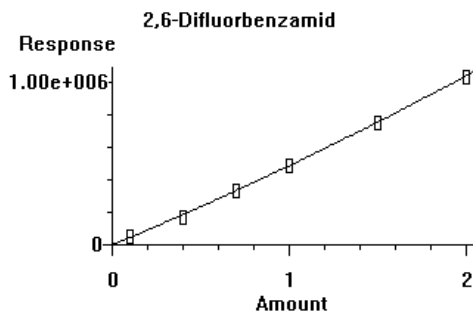
**Abb. 17:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml, in der Matrix GFF + 10 m<sup>3</sup> Luft). Peakzuordnung siehe Tabelle 6.

Externe Kalibrierung in der Matrix PUF + 10 m<sup>3</sup> Luft

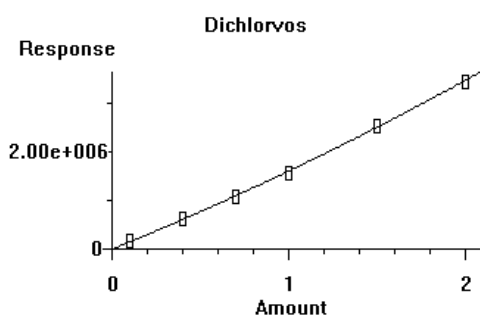
Kalibriergeraden der untersuchten Wirkstoffe (**Abb. 18a-v**). Legende: Y-Achse: Counts, X-Achse: Konzentration in µg/ml, abweichend von der Analysenvorschrift wurde anstatt 0,5 µg/ml mit 0,4 und 0,7 µg/ml kalibriert.



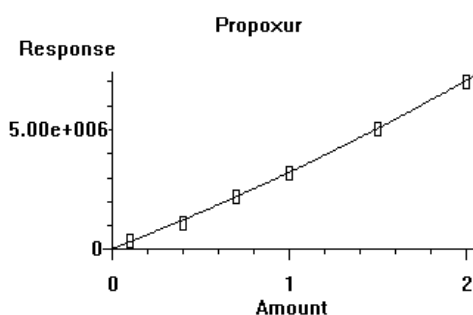
**Abb. 18a**



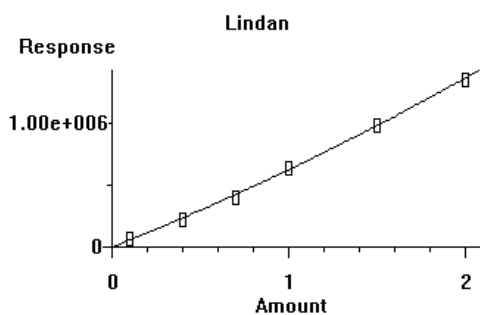
**Abb. 18b**



**Abb. 18c**



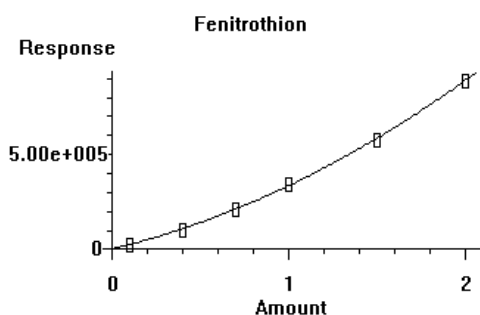
**Abb. 18d**



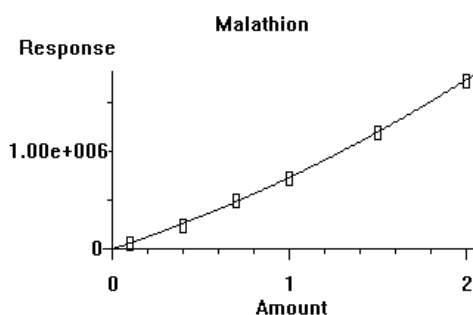
**Abb. 18e**



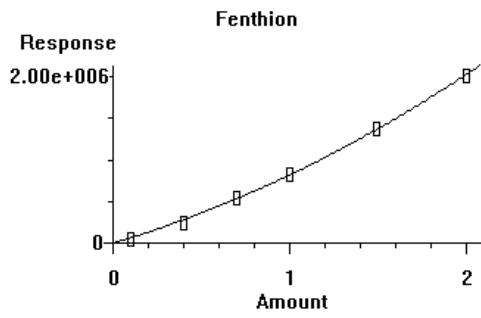
**Abb. 18f**



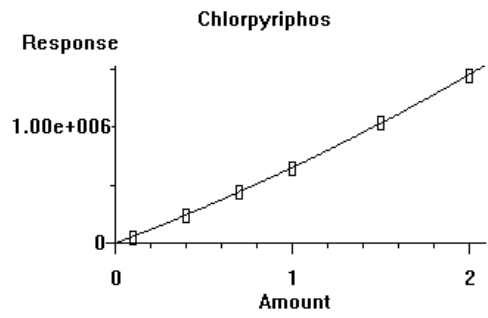
**Abb. 18g**



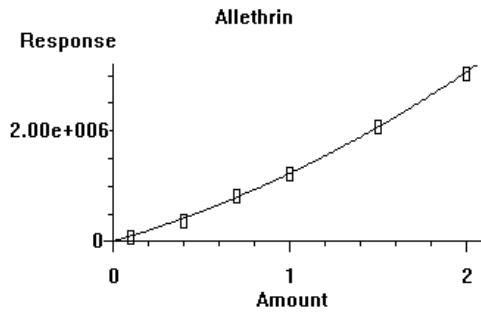
**Abb. 18h**



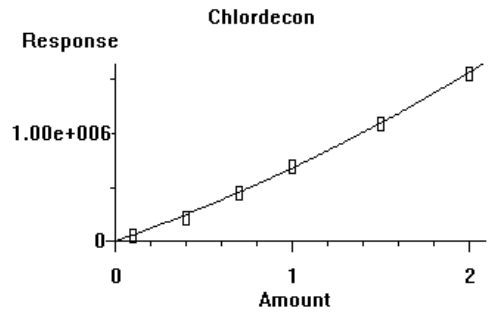
**Abb. 18i**



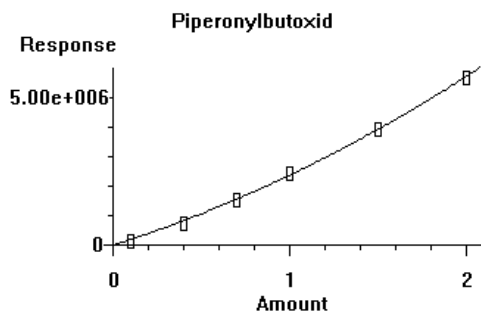
**Abb. 18j**



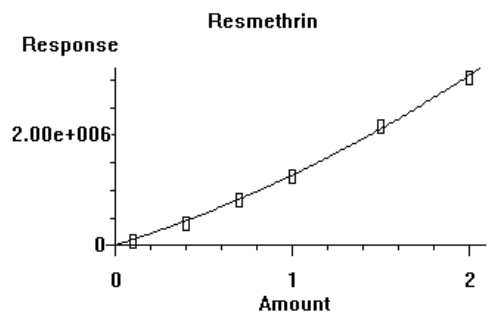
**Abb. 18k**



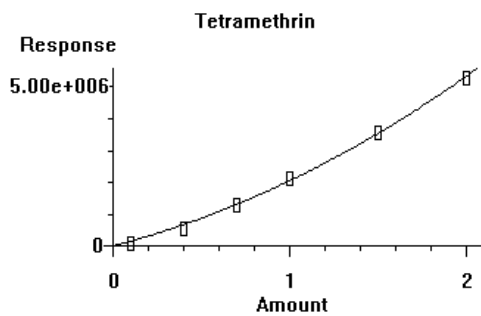
**Abb. 18l**



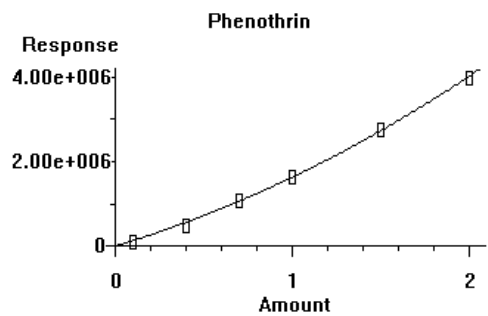
**Abb. 18m**



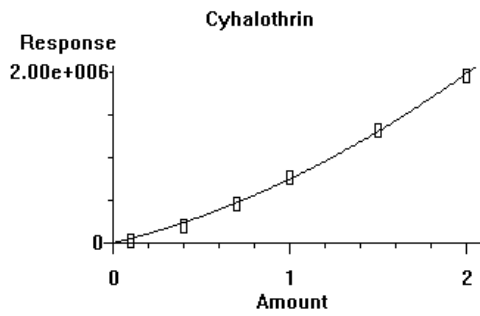
**Abb. 18n**



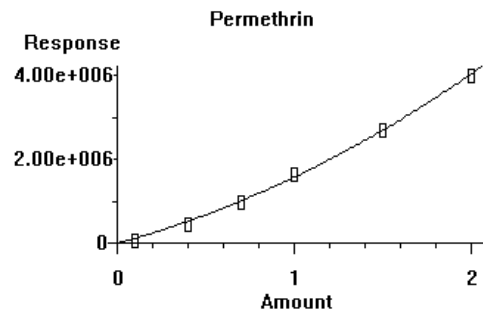
**Abb. 18o**



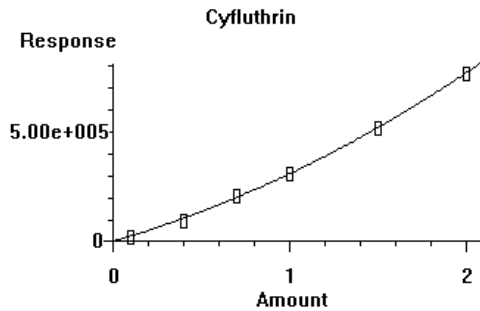
**Abb. 18p**



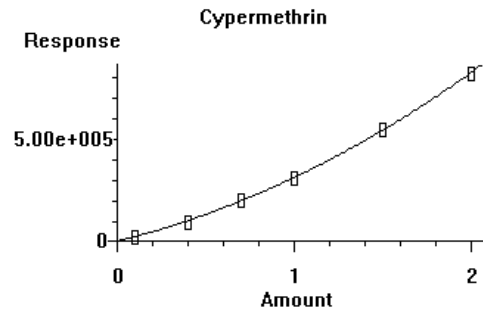
**Abb. 18q**



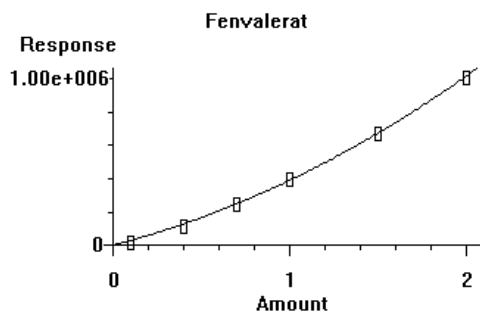
**Abb. 18r**



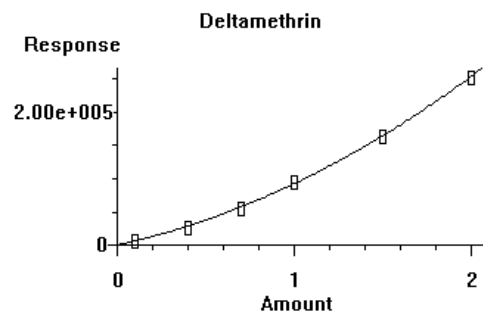
**Abb. 18s**



**Abb. 18t**



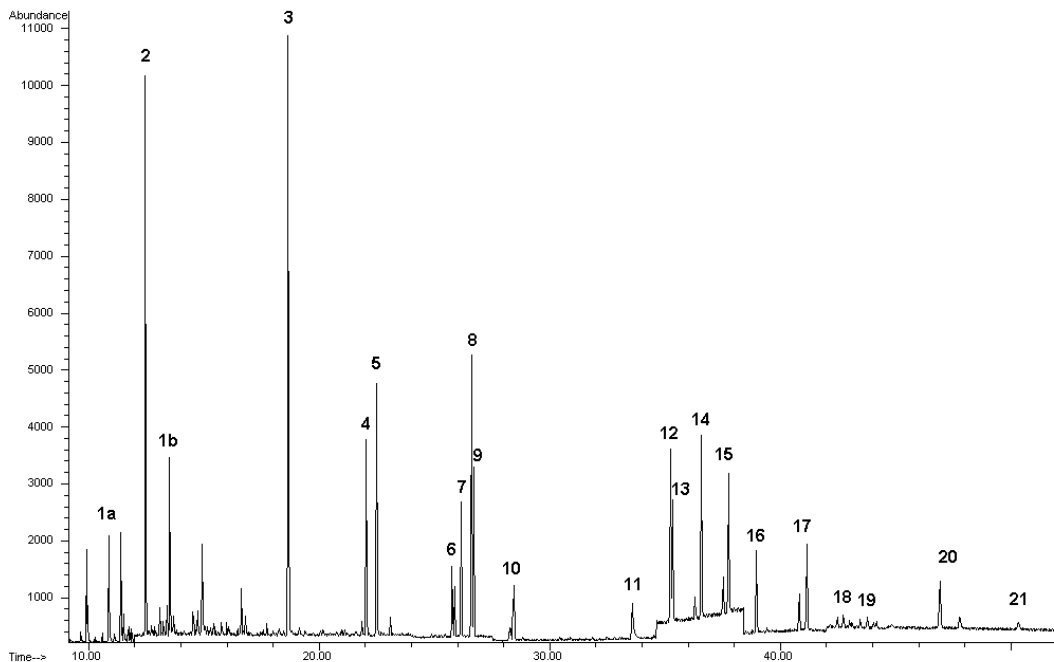
**Abb. 18u**



**Abb. 18v**

Aufgrund der höheren Matrixbelastung werden durch Absättigung aktiver Stellen im Meßsystem für die Wirkstoffe p-Chlorbenzolisocyanat, 2,6-Difluorbenzamid, Dichlorvos, Propoxur, Lindan, Diazinon, Chlorpyrifos und Chlordecon nun fast lineare Kalibrierfunktionen erhalten.

Die Reproduzierbarkeit wurde durch wiederholte Injektion eines Multistandards (1 µg/ml) bestimmt. Die Abweichungen lagen bei  $\leq 0,1\%$  für die Retentionszeiten und  $\leq 10\%$  für die Konzentrationswerte (sowohl bei Standards in reinem Lösemittel als auch bei Standards mit Matrix, vgl. Tabelle 6, Spalten 5-7).



**Abb. 19:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -Akariziden in der Raumluft. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des Multistandards (0,1 µg/ml, in der Matrix PUF + 10 m<sup>3</sup> Luft). Peakzuordnung siehe Tabelle 6.

#### 4.1.4 Wiederfindungsstudien

##### 4.1.4.1 *Wiederfindungen auf Glasfaserfiltern (GFF)*

Zur Ermittlung der Wiederfindungen wurden Glasfaserfilter mit 100 µl des Multistandards (10 µg/ml) dotiert. Nach Abdampfen des Lösemittels wurden die Wiederfindungen entweder direkt (Wiederfindungen ohne Luftdurchsatz) oder nach Durchsatz von 10 m<sup>3</sup> pestizidfreier Luft gemäß 3.2.1.1. bestimmt.

Zunächst wurde die externe Kalibrierung mit reinen Standardlösungen (ohne Matrix) durchgeführt. Dabei wurden für viele Wirkstoffe erhöhte Wiederfindungen (bis 133 %) festgestellt (**Tabelle 7**). Als Grund für das Auftreten von Überbefunden wurde eine Beeinflussung des chromatographischen Systems durch die Probenmatrix vermutet (die Überbefunde konnten trotz Berücksichtigung von ebenfalls gemessenen Leerwertproben nicht erklärt werden). Wie der Vergleich der Ergebnisse mit einer Kalibrierung vor und nach der Probenreihe



zeigt, weisen die Analyten unterschiedlich große Differenzen in den Wiederfindungen auf. Die Analytsignale werden also individuell verschieden stark von der Matrix (Bindemittel des Filters) beeinflusst. Nachfolgend wurden daher Wiederfindungsversuche durchgeführt, bei denen die Kalibrierung des analytischen Systems mit Matrixstandards durchgeführt wurde, d.h. es wurden Leerwertproben produziert, deren Extrakte zur Herstellung der Matrixstandards benutzt wurden. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 7:** Mittlere Wiederfindungen (WF) und relative Standardabweichungen (VK) in Prozent auf dotierten Glasfaserfiltern (1 µg absolut), ermittelt durch Quantifizierung mit reinen Standardlösungen. Berechnung mit einer Kalibrierung vor der Serie (a, n=9) bzw. nach der Serie (b, n=9); DWF: Differenz der Wiederfindungen.

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF (a)	% VK (a)	% WF (b)	% VK (b)	% ΔWF
1a	p-Chlorbenzol-isocyanat	76	5,9	95	5,3	19
1b	2,6-Difluorbenzolanilid	115	6,9	129	6,6	14
2	Dichlorvos	62	10,4	61	9,7	1
3	Propoxur	131	8,6	121	8,5	10
4	Lindan	105	6,7	106	6,9	1
5	Diazinon	125	6,7	124	6,5	1
6	Fenitrothion	116	8,8	111	8,9	5
7	Malathion	125	8,6	119	8,5	6
8	Fenthion	64	16,1	60	15,8	4
9	Chlorpyrifos	109	7,0	105	7,0	4
10	Allethrin	94	7,6	93	7,5	1
11	Chlordecon	108	9,1	106	9,1	2
12	Piperonylbutoxid	133	8,2	125	9,0	8
13	Resmethrin	89	5,7	82	6,5	7
14	Tetramethrin	103	7,2	97	7,5	6
15	Phenothrin	102	6,5	97	7,2	5
16	Cyhalothrin	119	6,2	115	6,8	4
17	Permethrin	120	6,0	114	7,0	6
18	Cyfluthrin	112	5,9	103	7,0	9
19	Cypermethrin	113	5,0	103	7,0	10
20	Fenvalerat	115	4,5	105	5,6	10
21	Deltamethrin	107	5,7	81	7,7	26

**Tabelle 8:** Mittlere Wiederfindungen (WF) und relative Standardabweichungen (VK) in Prozent auf dotierten Glasfaserfiltern (1 µg absolut); (a) ohne Luftdurchsatz (n=9), (b) mit 10 m<sup>3</sup> Luftdurchsatz (n=6); berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; n.d. nicht detektiert; S<sub>WF</sub>: Wiederfindungssymbol: ↗ (> 80%), → (20-80 %), ↘ (< 20 %).

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF (a)	% VK (a)	S <sub>WF</sub>	% WF (b)	% VK (b)	S <sub>WF</sub>
1a	p-Chlorbenzol-isocyanat	87	9,3	↗	93	4,4	↗
1b	2,6-Difluorbenzamid	118	9,6	↗	104	3,7	↗
2	Dichlorvos	42	5,8	→	n.d.	-	↘
3	Propoxur	107	3,2	↗	n.d.	-	↘
4	Lindan	102	2,9	↗	1	0,0	↘
5	Diazinon	103	3,1	↗	n.d.	-	↘
6	Fenitrothion	109	2,8	↗	50	8,9	→
7	Malathion	112	3,1	↗	60	7,5	→
8	Fenthion	106	8,8	↗	19	12,9	→
9	Chlorpyrifos	101	3,5	↗	n.d.	-	↘
10	Allethrin	102	2,9	↗	6,5	52,2	↘
11	Chlordecon	109	2,5	↗	106	3,7	↗
12	Piperonylbutoxid	111	3,3	↗	95	5,5	↗
13	Resmethrin	97	3,3	↗	9,7	63,3	↘
14	Tetramethrin	105	3,0	↗	28,3	41,9	→
15	Phenothrin	104	3,1	↗	23,2	43,6	→
16	Cyhalothrin	110	3,3	↗	104	4,1	↗
17	Permethrin	107	2,9	↗	105	5,0	↗
18	Cyfluthrin	104	3,5	↗	102	5,3	↗
19	Cypermethrin	107	2,9	↗	102	4,9	↗
20	Fenvalerat	108	3,1	↗	104	4,9	↗
21	Deltamethrin	107	4,9	↗	104	5,3	↗

Es zeigt sich, dass mit der Matrixkalibrierung und bei Proben ohne Luftdurchsatz gute Wiederfindungsergebnisse (87-118 %, Tabelle 8) erzielt werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit reinen Standardlösungen (Wiederfindungen 76-133 %) wurden die Überbefunde reduziert. Zudem fallen die Streuungen geringer aus. Bewegen sich die relativen Standardabweichungen bei Messungen ohne Matrixkalibrierung noch zwischen 5 und 16 Prozent, so verringern sie sich mit Matrixkalibrierung auf 3 bis 9 Prozent. Eine Ausnahme stellt dabei Dichlorvos dar, das aufgrund seines hohen Dampfdruckes von 1,6 Pa nicht quantitativ wiedergefunden werden konnte (siehe auch Ergebnisse der PUF-Dotierungen).

Ferner wurde festgestellt, dass Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin bereits nach dreistündiger Lagerung eines dotierten Filters bei Raumtemperatur praktisch nicht mehr wiedergefunden werden (auch bei Verwendung teflonbeschichteter Glasfaserfilter und n-Hexan als alternatives Lösemittel).

Betrachtet man die Ergebnisse der Messungen nach Luftdurchsatz von 10 m<sup>3</sup>, so ist zu festzustellen, dass Dichlorvos, Propoxur, Lindan, Diazinon und Chlorpyrifos nicht wiederzufinden sind. Die Wiederfindungen der Fragmentmoleküle des Diflubenzurons (p-Chlorbenzolisocyanat, 2,6-Difluorbenzamid) und von Chlordecon, Piperonylbutoxid, Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerat und Deltamethrin unterscheiden sich kaum von denen ohne Luftdurchsatz. Die relativen Standardabweichungen sind aber etwas höher. Die übrigen Wirkstoffe werden nur teilweise zurückgehalten. Ob dies auf eine Verflüchtigung der Wirkstoffe zurückzuführen ist oder ob andere Gründe eine Rolle spielen, sollten die nächsten Versuche zeigen. Insgesamt zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen, bei denen Quarzfaser-Extraktionsdisks verwendet wurden (Murayama et al., 2000).

#### **4.1.4.2 Wiederfindungen auf Polyurethanschäumen (PUF's)**

Zur Ermittlung der Wiederfindungen wurden PUF's ebenfalls mit 100 µl des Multistandards (10 µg/ml) gespikt. Nach Abdampfen des Lösemittels wurden die Wiederfindungen entweder direkt (Wiederfindungen ohne Luftdurchsatz) oder nach Durchsatz von 10 m<sup>3</sup> pestizidfreier Luft gemäß 3.2.1.1. bestimmt.

Der Einfluss der Probenmatrix auf die Wiederfindungen ist bei den PUF's noch ausgeprägter als bei den Glasfaserfiltern. Sind bei Kalibrierung mit reinen Standardlösungen die Werte der Proben ohne Luftdurchsatz noch akzeptabel (65-124 %), so steigen sie bei den Proben mit Luftdurchsatz auf bis zu 150 % (**Tabelle 9**).

Die Überbefunde werden durch Kalibrierung in der Matrix drastisch reduziert (**Tabelle 10**), insbesondere bei Proben mit Luftdurchsatz.

Allerdings sind die relativen Standardabweichungen bei den Proben mit Luftdurchsatz erwartungsgemäß etwas größer.

Anders als bei den Glasfaserfiltern treten kaum Substanzverluste auf (Ausnahme Dichlorvos, Tabelle 10), wenn durch die PUF's Luft gezogen wird. Daher sollten sich alle Wirkstoffe bis auf Dichlorvos, insbesondere diejenigen, die auf dem Glasfaserfilter nicht bzw. nur teilweise zurückgehalten werden, mit einer Kombination aus Glasfaserfilter und PU-Schäumen effektiv aus der Luft anreichern lassen.

**Tabelle 9:** Mittlere Wiederfindungen (WF) und relative Standardabweichungen (VK) in Prozent auf dotierten PUF's (1 µg absolut); (a) ohne Luftdurchsatz (n=6), (b) mit 10 m<sup>3</sup> Luftdurchsatz (n=2); berechnet mit einer Kalibrierung mit reinen Standardlösungen; n.d. nicht detektiert; S<sub>WF</sub>: Wiederfindungssymbol: ↗ (> 80%), → (20-80 %), ↘ (< 20 %).

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF (a)	% VK (a)	S <sub>WF</sub>	% WF (b)	% VK (b)	S <sub>WF</sub>
1a	p-Chlorbenzol-isocyanat	65	11,3	→	82	2,6	↗
1b	2,6-Difluorbenzamid	114	8,2	↗	116	5,5	↗
2	Dichlorvos	88	11,6	↗	97	5,8	→
3	Propoxur	119	10,1	↗	86	1,6	↗
4	Lindan	94	7,0	↗	103	0,7	↗
5	Diazinon	107	9,3	↗	99	18,6	↗
6	Fenitrothion	97	8,6	↗	139	2,0	↗
7	Malathion	116	9,2	↗	146	1,9	↗
8	Fenthion	20*	77,2*	→	114	4,4	↗
9	Chlorpyrifos	97	7,1	↗	115	1,2	↗
10	Allethrin	112	7,7	↗	150	4,3	↗
11	Chlordecon	97	5,6	↗	92	2,3	↗
12	Piperonylbutoxid	124	6,8	↗	150	4,3	↗
13	Resmethrin	119	7,4	↗	120	1,8	↗
14	Tetramethrin	106	6,5	↗	122	1,7	↗
15	Phenothrin	122	7,7	↗	107	0,7	↗
16	Cyhalothrin	111	6,9	↗	132	3,2	↗
17	Permethrin	115	8,6	↗	126	2,2	↗
18	Cyfluthrin	101	7,9	↗	120	4,1	↗
19	Cypermethrin	101	9,7	↗	119	2,4	↗
20	Fenvalerat	107	8,3	↗	130	9,3	↗
21	Deltamethrin	87	8,4	↗	94	6,0	↗

\*instabil in Lösungen mit Matrix, verzögerte Messung der Proben, daher Minderbefund (siehe Anmerkung e) zur Analysenvorschrift im Kapitel 3.2.1.2)

Interessant ist auch die Halbierung der Wiederfindung von Dichlorvos nach Luftdurchsatz. Offenbar ist Dichlorvos so flüchtig, dass es auch auf dem PUF nicht effektiv retardiert wird. Ähnliche Ergebnisse für Dichlorvos wurden unter Verwendung einer Kombination aus Glasfaserfilter und Tenax TA mit einer Wiederfindung von 40,2 % bei einem Luftdurchsatz von 4,2 Liter pro Minute erzielt (Roinestad et al., 1993). Die guten Wiederfindungen für Dichlorvos in Tabelle 9 sind offensichtlich auf Überbefunde zurückzuführen.

**Tabelle 10:** Mittlere Wiederfindungen (WF) und relative Standardabweichungen (VK) in Prozent auf dotierten PUF's (1 µg absolut); (a) ohne Luftdurchsatz (n=4), (b) mit 10 m<sup>3</sup> Luftdurchsatz (n=4); berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; n.d. nicht detektiert; S<sub>WF</sub>: Wiederfindungssymbol: ↗ (> 80%), → (20-80 %), ↘ (< 20 %).

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF (a)	% VK (a)	S <sub>WF</sub>	% WF (b)	% VK (b)	S <sub>WF</sub>
1a	p-Chlorbenzol-isocyanat	98	4,6	↗	108	5,3	↗
1b	2,6-Difluorbenzamid	100	5,0	↗	102	5,4	↗
2	Dichlorvos	65	19,6	→	33	26,8	→
3	Propoxur	98	5,8	↗	73	9,5	↗
4	Lindan	89	8,5	↗	85	6,0	↗
5	Diazinon	100	5,8	↗	87	6,4	↗
6	Fenitrothion	102	5,8	↗	90	8,5	↗
7	Malathion	100	5,7	↗	89	6,6	↗
8	Fenthion	106	8,8	↗	116	7,7	↗
9	Chlorpyrifos	97	4,8	↗	93	6,0	↗
10	Allethrin	106	7,7	↗	82	8,2	↗
11	Chlordecon	99	5,7	↗	91	7,2	↗
12	Piperonylbutoxid	106	7,4	↗	93	8,0	↗
13	Resmethrin	103	7,8	↗	80	9,7	↗
14	Tetramethrin	104	6,8	↗	87	9,9	↗
15	Phenothrin	107	6,4	↗	81	11,1	↗
16	Cyhalothrin	103	5,8	↗	92	9,6	↗
17	Permethrin	107	6,2	↗	93	9,4	↗
18	Cyfluthrin	99	5,9	↗	90	9,7	↗
19	Cypermethrin	98	6,1	↗	92	9,0	↗
20	Fenvalerat	104	6,8	↗	92	10,3	↗
21	Deltamethrin	102	6,8	↗	94	11,3	↗

#### 4.1.4.3 Wiederfindungen auf der Kombination von Glasfaserfilter und zwei Polyurethanschäumen

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate im gesamten Probenahmesystem (GFF/PUF/PUF) bzw. der Verteilung der einzelnen Wirkstoffe auf die verschiedenen Sammelmedien wurde der Filter gemäß 4.1.4.1 dotiert und nach Abdampfen des Lösemittels zusammen mit zwei PU-Schäumen in die Probenahmeeinheit eingesetzt. Es wurden 10 m<sup>3</sup> pestizidfreie Luft durch den Probenahmekopf gezogen und die Wiederfindungen nach getrennter Extraktion von GFF, PUF1 und PUF2 gemäß 3.2.1.1 bestimmt.

**Tabelle 11:** Mittlere Wiederfindungen (WF) in Prozent auf GFF, PUF1 und PUF2 in der Probenahmeeinheit nach Luftdurchsatz von 10 m<sup>3</sup>. Dotierungen: 1 µg absolut (d.h. 0,1 µg/m<sup>3</sup>, n=5) und 0,1 µg absolut (d.h. 0,01 µg/m<sup>3</sup>, n=3, Werte in Klammern); berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; n.d.: nicht detektiert; n.b.: nicht bestimmt; WF<sub>ges</sub> und VK<sub>ges</sub>: Summe der Wiederfindungen (WF) bzw. relative Standardabweichungen (VK) im gesamten Probenahmesystem.

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF GFF	% WF PUF1	% WF PUF2	% WF <sub>ges</sub>	% VK <sub>ges</sub>
1a	p-Chlorbenzol-isocyanat	85 (99)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	85 (99)	11,4 (19,2)
1b	2,6-Difluor-benzolamid	109 (93)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	109 (93)	7,9 (15,2)
2	Dichlorvos	n.d. (n.d.)	34 (34)	5 (16)	39 (50)	15,6 (10,1)
3	Propoxur	9 (1)	78 (87)	n.d. (n.d.)	87 (88)	8,8 (13,0)
4	Lindan	1 (2)	91 (94)	n.d. (n.d.)	92 (96)	5,1 (8,4)
5	Diazinon	n.d. (4)	97 (94)	n.d. (n.d.)	97 (98)	4,2 (3,5)
6	Fenitrothion	44 (48)	58 (34)	n.d. (n.d.)	102 (82)	6,2 (1,2)
7	Malathion	57 (49)	41 (29)	n.d. (n.d.)	98 (78)	4,8 (4,1)
8	Fenthion	19 (n.b.)	69 (n.b.)	n.d. (n.b.)	88 (n.b.)	5,1 (n.b.)
9	Chlorpyrifos	n.d. (7)	96 (87)	n.d. (n.d.)	96 (94)	2,8 (6,0)

**Fortsetzung Tabelle 11:** Mittlere Wiederfindungen (WF) in Prozent auf GFF, PUF1 und PUF2 in der Probenahmeeinheit nach Luftdurchsatz von 10 m<sup>3</sup>. Dotierungen: 1 µg absolut (d.h. 0,1 µg/m<sup>3</sup>, n=5) und 0,1 µg absolut (d.h. 0,01 µg/m<sup>3</sup>, n=3, Werte in Klammern); berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; n.d.: nicht detektiert; n.b.: nicht bestimmt; WF<sub>ges</sub> und VK<sub>ges</sub>: Summe der Wiederfindungen (WF) bzw. relative Standardabweichungen (VK) im gesamten Probenahmesystem.

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF GFF	% WF PUF1	% WF PUF2	% WF <sub>ges</sub>	% VK <sub>ges</sub>
10	Allethrin	1 (1)	17 (n.d.)	n.d. (n.d.)	18 (1)	24,5 (n.b.)
11	Chlordecon	105 (94)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	105 (94)	5,9 (8,2)
12	Piperonylbutoxid	99 (n.b.)	n.d. (n.b.)	n.d. (n.b.)	99 (n.b.)	5,8 (n.b.)
13	Resmethrin	2 (n.d.)	1 (n.d.)	n.d. (n.d.)	3 (n.d.)	43,4 (n.b.)
14	Tetramethrin	7 (4)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	7 (4)	52,0 (56,8)
15	Phenothrin	13 (1)	1 (n.d.)	n.d. (n.d.)	14 (1)	17,2 (n.b.)
16	Cyhalothrin	106 (76)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	106 (76)	6,1 (15,5)
17	Permethrin	107 (82)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	107 (82)	5,7 (16,9)
18	Cyfluthrin	103 (86)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	103 (86)	5,4 (11,8)
19	Cypermethrin	102 (86)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	102 (86)	5,0 (17,4)
20	Fenvalerat	103 (74)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	103 (74)	4,7 (15,0)
21	Deltamethrin	98 (97)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	98 (97)	4,9 (17,4)

Die Wiederfindungen sind mit 85 bis 109 Prozent und relativen Standardabweichungen von 4 bis 11 Prozent für die meisten Wirkstoffe gut (**Tabelle 11**, Werte ohne Klammern), wenn zur Kalibrierung Matrixstandards eingesetzt werden. Für Diflubenzuron (bestimmt als p-Chlorbenzolisocyanat bzw. 2,6-Difluorbenzamid), Chlordecon, Piperonylbutoxid, Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerat und Deltamethrin genügt der Glasfaserfilter als Sammelmedium zur quantitativen Erfassung. Für Fenitrothion, Malathion und Fenthion ist eine Kombination aus GFF und PUF notwendig. Propoxur, Lindan, Diazinon und Chlorpyrifos wurden

praktisch nur auf dem PUF wiedergefunden. Auf dem zweiten PUF wurde lediglich etwas Dichlorvos gefunden, ein Indiz dafür, dass dieser Wirkstoff schneller als die anderen Substanzen durchbricht. Dichlorvos kann daher, wie auch in den vorhergehenden Versuchen, nicht quantitativ gesammelt werden. Aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit verdampft möglicherweise schon ein Teil bei der Dotierung. Obwohl auf dem zweiten PUF nur Dichlorvos gefunden wird, ist dieser dennoch sinnvoll, da zum einen das Probenahmesystem für zwei PUF's konzipiert ist und zum anderen einem möglichen Durchbruch der Analyten bei höheren Konzentrationen bzw. Probenvolumina vorgebeugt wird.

Ein weiterer Versuch mit einer um den Faktor 10 geringeren Dotierung (entsprechend  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) zeigte etwas geringere Wiederfindungen von 74 bis 99 Prozent, mit relativen Standardabweichungen bis 19 % (siehe Tabelle 11, Werte in Klammern). Die Streuungen nehmen also erwartungsgemäß mit der Abnahme der Analytkonzentration zu.

#### *Pyrethroide mit unbefriedigender Wiederfindung:*

Überraschend waren die Ergebnisse für Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin. Aufgrund der Untersuchungen mit GFF bzw. PUF wurde gefolgert, dass diese Stoffe vom Filter abgeblasen werden, dann aber mit dem PUF zurückgehalten werden können. Diese Annahme konnte durch das oben aufgeführte Experiment nicht bestätigt werden, die Wiederfindungen für die genannten Verbindungen waren schlecht (3-18%). Auch mehrmalige Wiederholungen dieses Versuches bzw. Versuche mit den Einzelverbindungen führten zu den gleichen Ergebnissen. Die Wiederfindungen von dotierten Proben, bei denen unterschiedliche Luftvolumina durch das Probenahmesystem gezogen wurden, sind in **Tabelle 12** aufgeführt. Mit zunehmendem Luftvolumen werden die Wiederfindungen dieser Verbindungen auf dem Filter geringer, ohne dass es auf PUF1 zu einem Anstieg kommt. Lediglich beim Allethrin ist ein gewisser Transfer von GFF zu PUF1 erkennbar. Da die



Gesamtwiederfindungen (GFF/PUF1/PUF2) nicht konstant bleiben, sondern abnehmen, lässt sich vermuten, dass Zersetzungsmechanismen auf dem Filter eine Rolle spielen könnten.

**Tabelle 12:** Wiederfindungen (WF) in Prozent auf dotierten GFF/PUF/PUF-Kombinationen (Dotierung: 1 µg absolut) mit unterschiedlichem Luftdurchsatz; n.d.: nicht detektiert.

Peak Nr.	Wirkstoff	% WF GFF	% WF PUF1	% WF PUF2
Luftvolumen 1 m <sup>3</sup>				
10	Allethrin	25	n.d.	n.d.
13	Resmethrin	36	n.d.	n.d.
14	Tetramethrin	46	n.d.	n.d.
15	Phenothrin	45	n.d.	n.d.
Luftvolumen 5 m <sup>3</sup>				
10	Allethrin	7	2	n.d.
13	Resmethrin	16	n.d.	n.d.
14	Tetramethrin	22	n.d.	n.d.
15	Phenothrin	27	n.d.	n.d.
Luftvolumen 10 m <sup>3</sup>				
10	Allethrin	4	5	n.d.
13	Resmethrin	5	n.d.	n.d.
14	Tetramethrin	8	n.d.	n.d.
15	Phenothrin	9	n.d.	n.d.

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, bei denen (anstatt einer Dotierung des Filters mit einer Standardlösung in Ethylacetat und anschließendem Luftdurchsatz), die Wirkstoffe, nachdem sie als Aerosol bzw. als Gas in die Luft gebracht wurden, mit dem oben beschriebenen Probenahmesystem gesammelt wurden. Hierzu wurden Insektensprays mit Resmethrin, d-Tetramethrin und d-Phenothrin in einem Raum versprüht bzw. d-Allethrin mit einem Elektroverdampfer ausgebracht und unmittelbar danach Proben mit einer GFF/PUF/PUF-Kombination gezogen. Die Konzentrationen der Analyten bewegten sich zwischen 14 und 156 µg/m<sup>3</sup> bei Probevolumina zwischen 4 und 10 m<sup>3</sup>. Es zeigte sich, dass alle vier Verbindungen fast ausschließlich vom Filter zurückgehalten wurden (> 99 %). Nur beim Versuch mit 10 m<sup>3</sup> Probevolumen gingen etwa 6 % d-Allethrin auf PUF1 über (aufgrund der gasförmigen Ausbringung). Daraus lässt sich schließen, dass sich die Verbindungen ähnlich wie die anderen Pyrethroide verhalten, d.h. sie können mit dem Filter

gesammelt werden, ohne dass eine Zersetzung auftritt (vgl. hierzu auch Realproben). Das bei den Dotierungen für die Wiederfindungsversuche beobachtete Verhalten dieser Wirkstoffe sollte also mit der Art und Weise der Dotierung des Glasfaserfilters zusammenhängen. In einem weiteren interessanten Versuch mit den o.g. Verbindungen wurden Variationen am Probenahmesystem vorgenommen, d.h. es wurden parallel Proben mit GFF sowie den Kombinationen GFF/PUF/PUF und PUF/PUF/GFF genommen. Die Ergebnisse der Messungen (Beginn 30 Minuten nach der Aerosolabbringung) sind in **Tabelle 13** dargestellt.

**Tabelle 13:** Wiederfindungen (WF) in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  auf GFF bzw. GFF/PUF/PUF- und PUF/PUF/GFF-Kombinationen nach Aerosolabbringung. Probevolumen  $4 \text{ m}^3$ . Werte in Klammern: prozentuale Verteilung des Wirkstoffes auf die Sammelmedien.

Peak Nr.	Wirkstoff	GFF	GFF/PUF/PUF	PUF/PUF/GFF
10	d-Allethrin	28,8	27,8 ( 99/1/0)	28,1 (68/12/20)
13	Resmethrin	5,3	5,2 (100/0/0)	5,1 (59/12/29)
14	d-Tetramethrin	5,1	4,9 (100/0/0)	5,1 (55/13/32)
15	d-Phenothrin	9,6	9,4 (100/0/0)	9,8 (55/13/32)

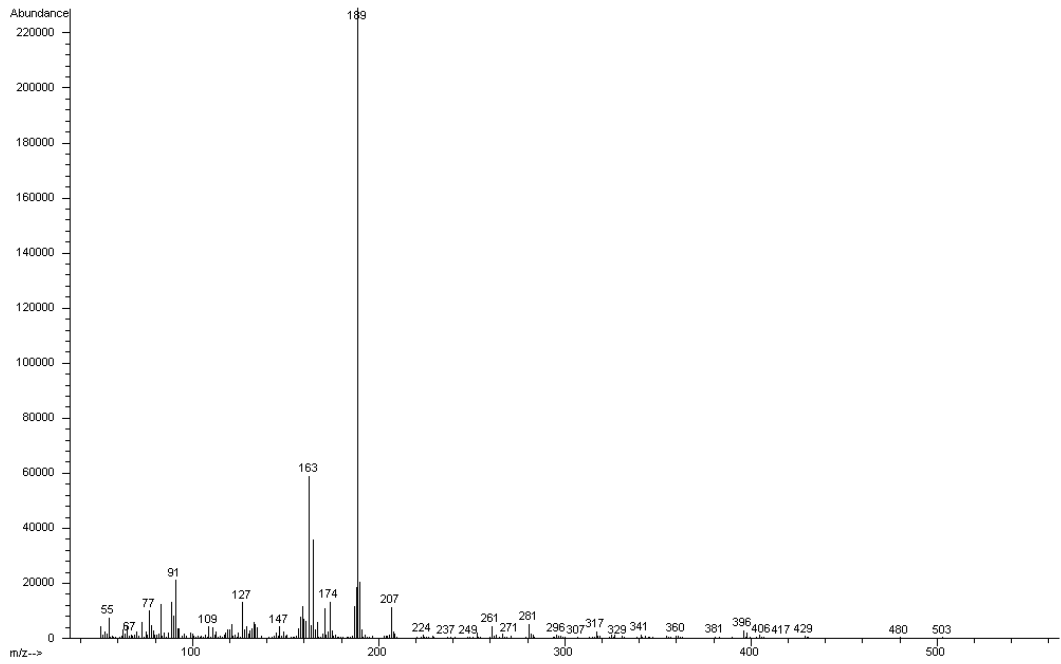
Die unterschiedlichen Konzentrationen der Stoffe in der Raumluft sind durch die Verwendung von zwei verschiedenen Sprays mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen, eines mit Resmethrin und eines mit d-Tetramethrin bzw. d-Phenothrin, sowie eines Elektroverdampfers (d-Allethrin) bedingt. Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, sind die mit den drei Probenahmesystemen jeweils ermittelten Gesamtkonzentrationen für die einzelnen Wirkstoffe praktisch gleich. Daraus ergibt sich, dass die PUF's wie bei den übrigen Pyrethroiden nicht unbedingt notwendig für die Probenahme von Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin sind. Ein Weglassen des GFF hat dagegen Substanzverluste zur Folge. Die PUF's vermochten nur etwa 70-80 % der Analyten zurückzuhalten. Dies mag bei geringeren Durchflussraten anders sein, da es Literaturstellen gibt, in denen die Luft ausschließlich mit PUF gesammelt wird, allerdings bei Volumenströmen von 1 bis 5 Liter/min (siehe Literaturübersicht, Kapitel 1.4). Die Durchflussrate des

verwendeten Derenda-Systems liegt jedoch bei etwa 50 Liter/min. Eine Bestätigung der gemachten Aussagen liefern auch die Realproben (Sprayversuch im Innenraum, siehe 4.1.8).

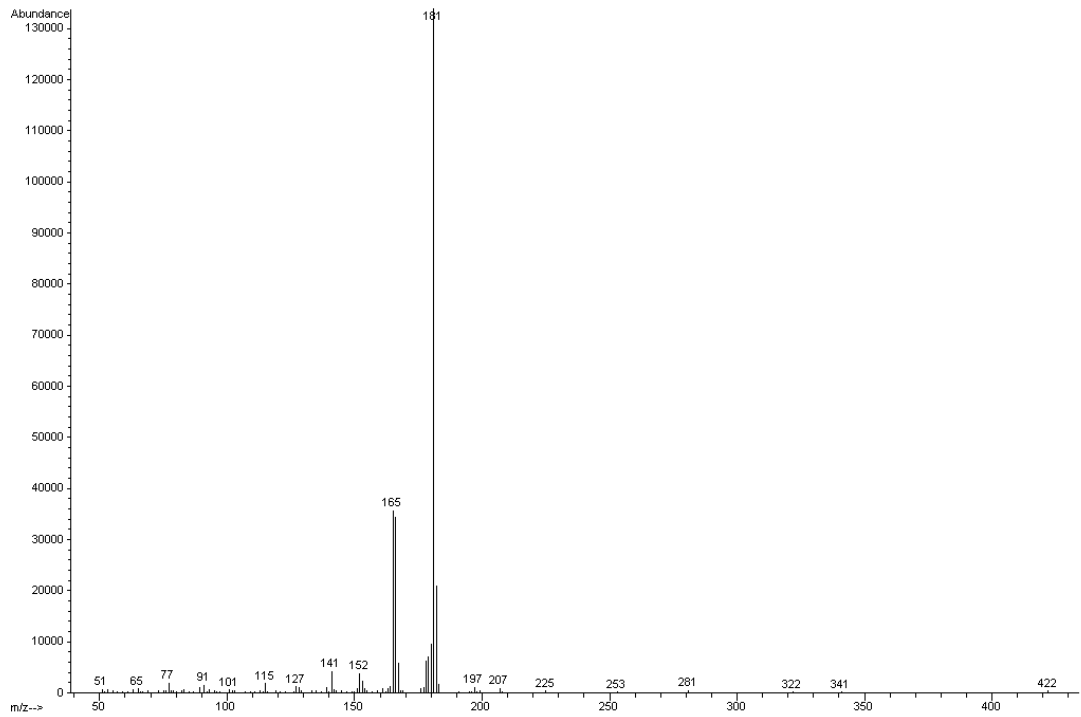
#### **4.1.5 Verwendung von internen Standards**

Als Alternative für eine Kalibrierung in der Matrix wurde die Verwendung von internen Standards in Betracht gezogen. Wichtig ist dabei, dass sich die internen Standards ähnlich wie die Analyten verhalten sollten. Aus diesem Grund werden häufig isotonenmarkierte ( $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -) Analoga der zu bestimmenden Verbindungen verwendet. Das bedeutet für diese Methode, dass mehrere interne Standards verwendet werden müssen, da die Analyten verschiedenen Stoffklassen angehören. Leider sind z. Zt. nicht für jeden Analyten bzw. jede Stoffklasse isotonenmarkierte Standards kommerziell erhältlich, wie das z.B. für die PAH-Analytik der Fall ist.

Das kommerziell erhältliche Permethrin-phenoxy- $^{13}\text{C}_6$  eignet sich, wie im Folgenden gezeigt, wenig als interner Standard. Das EI-Massenspektrum ist in **Abb. 20** dargestellt. Vergleicht man dieses mit dem entsprechenden Spektrum von Permethrin (Abb. 15q), so erkennt man, dass es lediglich einen signifikanten Unterschied in der Masse des Basispeaks gibt ( $m/z = 183$  bzw.  $m/z = 189$ ). Bei diesen Massenfragmenten handelt es sich jeweils um den Phenoxybenzylrest des Moleküls, der einzige Teil im Molekül, in dem sich Permethrin und Permethrin-phenoxy- $^{13}\text{C}_6$  unterscheiden. Da außerdem die Massen der Moleküle ( $m/z = 390$  bzw.  $m/z = 396$ ) nur eine sehr geringe Intensität aufweisen und daher nicht zur Identifizierung bzw. Quantifizierung im SIM-Modus herangezogen werden können, und da beide Substanzen praktisch die gleiche Retentionszeit besitzen, können Permethrin und Permethrin-phenoxy- $^{13}\text{C}_6$  also nur durch die Massen 183 und 189 unterschieden werden. Für eine sichere Identifizierung sind aber mindestens zwei unterschiedliche Massen als Target- und Qualifierion notwendig. Besser geeignet wäre hier ein deuteriertes Pyrethroid, welches aber z. Zt. nicht kommerziell erhältlich ist.



**Abb. 20:** EI-MS Spektrum von Permethrin-phenoxy- $^{13}\text{C}_6$  ( $M = 396$ ).



**Abb. 21:** EI-MS Spektrum von Bifenthrin ( $M = 422$ ).

Daher wurde ein unmarkiertes Pyrethroid als interner Standard getestet, das Bifenthrin, welches bisher nicht in Realproben gefunden wurde. Das EI-Massenspektrum des Bifenthrins ist in **Abb. 21** dargestellt. Diese Substanz eluiert im GC-Chromatogramm zeitgleich mit dem zweiten (größeren) Isomerenpeak des Tetramethrins. Aufgrund der unterschiedlichen Massenspuren der Fragmentationen lassen sie sich aber im SIM-Modus problemlos unterscheiden. Die Eignung als interner Standard für die Chromatographie wurde mittels Messung von Standardlösungen (in reinem Ethylacetat) zwischen den Messungen von je fünf Probelösungen (Matrix PUF + 10 m<sup>3</sup> Luft) untersucht (sogenannter Systemtest). Als Targetion für das Bifenthrin wurde m/z = 181 gewählt, als Qualifierion m/z = 165. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 14** aufgeführt.

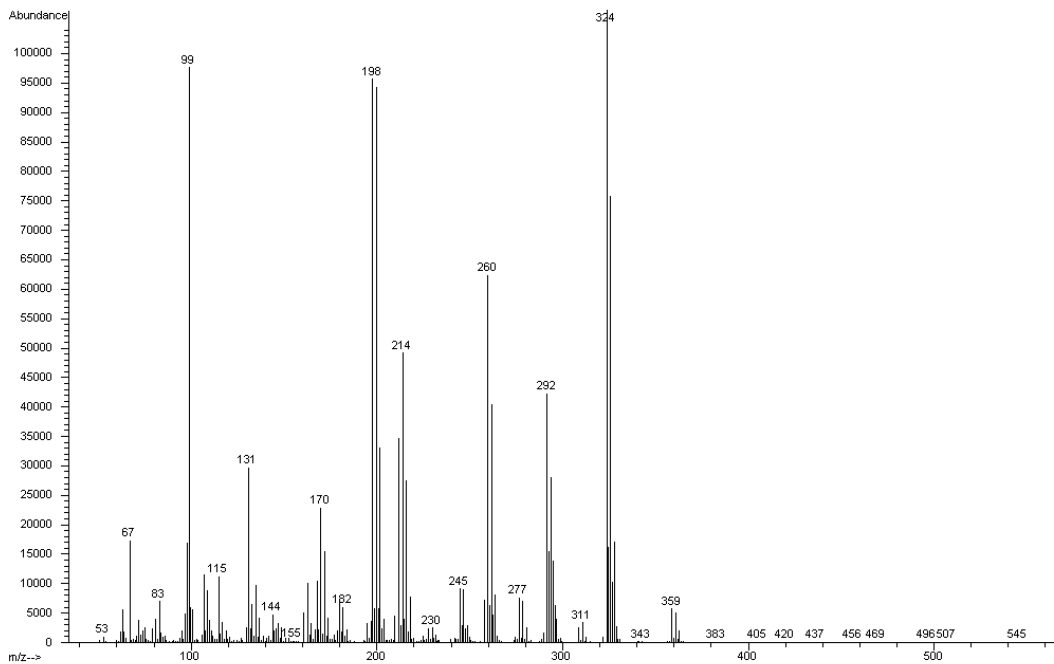
**Tabelle 14:** Messung von matrixbelasteten Proben (PUF + 10 m<sup>3</sup> Luft). Wiederfindungen der Sollwertkonzentration der Sytemteststandards in Prozent: (a) externe Kalibrierung mit reinen Standardlösungen, (b) interne Kalibrierung über Bifenthrin mit reinen Standardlösungen.  $DS_{max}$ : maximale Abweichung vom Sollwert.

	Probe 1	Probe 7	Probe 13	Probe 19	Probe 25	$\Delta S_{max}$
(a) Externe Kalibrierung						
Allethrin	102	141	144	151	140	51 %
Resmethrin	101	152	160	168	170	70 %
Bifenthrin	101	145	152	156	153	56 %
Tetramethrin	101	146	154	160	160	60 %
Phenothrin	101	146	153	159	161	61 %
Cyhalothrin	102	144	154	158	158	58 %
Permethrin	104	144	152	153	156	56 %
Cyfluthrin	104	160	172	168	165	72 %
Cypermethrin	103	144	152	151	151	52 %
Fenvalerat	103	144	157	159	158	59 %
Deltamethrin	103	135	145	143	136	45 %
(b) Interne Kalibrierung über Bifenthrin						
Allethrin	101	97	95	97	92	8 %
Resmethrin	100	105	105	108	111	11 %
Tetramethrin	100	101	101	103	105	5 %
Phenothrin	100	101	101	102	105	5 %
Cyhalothrin	101	99	101	101	103	3 %
Permethrin	103	99	100	98	102	3 %
Cyfluthrin	103	110	113	108	108	13 %
Cypermethrin	102	99	100	97	99	3 %
Fenvalerat	102	99	103	102	103	3 %
Deltamethrin	102	93	95	92	89	11 %

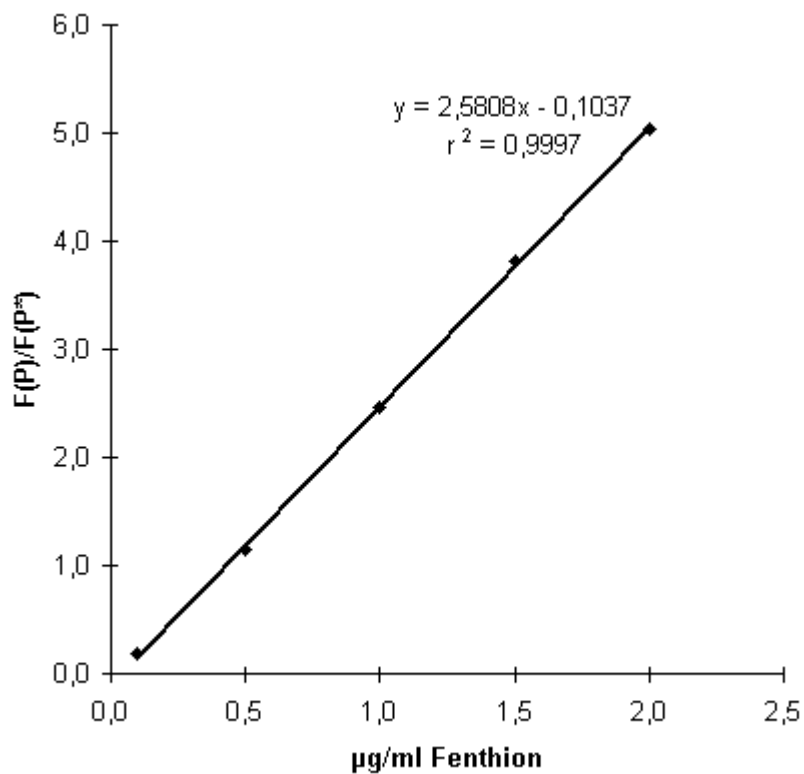
Wie man sieht, werden bei externer Kalibrierung Überbefunde bis 172 % für die Pyrethroide festgestellt. Bei interner Kalibrierung über das Bifenthrin betragen die Abweichungen von der tatsächlichen Konzentration nur noch maximal 13 %, was sich in einer Größenordnung bewegt, die auch durch Kalibrierung in der Matrix erzielt werden konnte. Das Bifenthrin verhält sich also im chromatographischen System ähnlich wie die anderen Pyrethroide. Trotz der relativ großen Abstände in der Retentionszeit (Allethrin ca. 28 min, Bifenthrin ca. 36 min) sollten sich aufgrund der Ergebnisse mittels interner Kalibrierung über Bifenthrin gute quantitative Ergebnisse für die Pyrethroide auch ohne Kalibrierung in der Matrix erzielen lassen. Über das der Probe zudosierte Bifenthrin, welches eine ähnlich große Signalerhöhung wie die Pyrethroidanalyten erfährt, werden die bei externer Kalibrierung auftretenden Überbefunde kompensiert. Weiterführende Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

Als interner Standard für die Organophosphate kann das kommerziell erhältliche Chlorpyrifos-diethyl-d10 verwendet werden. Es besitzt eine etwas andere Retentionszeit als Chlorpyrifos und eluiert im GC-Chromatogramm unmittelbar vor Fenthion. Außerdem gibt es im EI-Massenspektrum (**Abb. 22**) genügend Fragmentationen, die sich in ihrer Masse von den Fragmentationen des Chlorpyrifos (vgl. Abb. 15d) unterscheiden.

Neben der Verbesserung der quantitativen Ergebnisse für die untersuchten Analyten durch Verwendung eines internen Standards bei Kalibrierung mit reinen Standardlösungen, wie am Beispiel von Bifenthrin und den Pyrethroiden dargestellt, hat die interne Kalibrierung den weiteren Vorteil, dass lineare Kalibriergeraden mit sehr guten Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) erhalten werden (gültig sowohl für die Organophosphate als auch für die Pyrethroide). Dies sei am Beispiel von Fenthion in **Abb. 23** dargestellt.



**Abb. 22:** EI-MS Spektrum von Chlorpyrifos-diethyl-d10 (M = 359).



**Abb. 23:** Interne Kalibrierung von Fenthion mit Chlorpyrifos-diethyl-d10 als internen Standard (ISTD); F/F\*: Flächenwerte des Analyten bzw. des ISTD; y: lineare Kalibrierfunktion;  $r^2$ : Korrelationskoeffizient.

#### **4.1.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen**

Instrumentelle Nachweisgrenzen wurden durch Bestimmung des Signal-/Rauschverhältnisses mit der Chemstation Software (Signal-to-Noise Test) und Festlegung eines S/N-Verhältnisses von 3/1 für die Nachweisgrenze ermittelt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Target-Ionenspur ergaben sich folgende Werte (Angaben in pg pro µl Injektionsvolumen): p-Chlorbenzolisocyanat (1,0); 2,6-Difluorbenzamid (2,0); Dichlorvos (0,4); Propoxur (0,5); Lindan (0,6); Diazinon (0,9); Fenitrothion (1,1); Malathion (0,7); Fenthion (0,5); Chlorpyrifos (1,2); Allethrin (2,4); Chlordecon (1,3); Piperonylbutoxid (0,7); Resmethrin (1,5); Tetramethrin (1,5); Phenothrin (1,7); Cyhalothrin (2,5); Permethrin (2,5); Cyfluthrin (41,6); Cypermethrin (46,8); Fenvalerat (12,1); Deltamethrin (51,8). Daraus lassen sich theoretische Nachweisgrenzen der Methode unter Annahme einer 100 %igen Wiederfindung sowie der Abwesenheit von Leerwerten ableiten. Bei einem Luftvolumen von 10 m<sup>3</sup> und einem Probenendvolumen von 1 ml ergeben sich unter diesen Voraussetzungen erreichbare Nachweisgrenzen von 0,1 bis 0,3 ng/m<sup>3</sup> für die meisten Wirkstoffe. Lediglich Fenvalerat (1 ng/m<sup>3</sup>), Cyfluthrin (4 ng/m<sup>3</sup>), Cypermethrin und Deltamethrin (je 5 ng/m<sup>3</sup>) haben etwas höhere Nachweisgrenzen aufgrund der geringeren Empfindlichkeit. Die Nachweisgrenzen von Cyfluthrin, Cypermethrin und Deltamethrin entsprechen einer Konzentration in der Probelösung von 0,04 bis 0,05 µg/ml. Definiert man das doppelte Signal-/ Rauschverhältnis von S/N = 6 als Bestimmungsgrenze, so ergibt sich für diese drei Verbindungen eine Bestimmungsgrenze von 0,1 µg/ml Probelösung (1 ml Extrakt gemäß Analysenvorschrift). Daher wurde als unterstes Kalibrierniveau (entsprechend der Bestimmungsgrenze der am unempfindlichsten detektierten Verbindungen) eine Konzentration von 0,1 µg/ml festgelegt (vgl. Abb. 14, 17 und 19). Da die Peaks der Störkomponenten von matrixbelasteten Proben lediglich im vorderen Teil des GC-Chromatogramms auftreten, konnten die o. g. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der spät eluierenden Verbindungen Cyfluthrin, Cypermethrin und Deltamethrin auch in den dotierten Matrixproben und den Realproben erreicht werden. Für die früh eluierenden Verbindungen p-Chlorbenzolisocyanat, 2,6-Difluorbenzamid, Dichlorvos, Propoxur, Lindan



und Diazinon erhöhen sich die o. g. Nachweisgrenzen in den matrixbelasteten Proben (GFF bzw. PUF + 10 m<sup>3</sup> Luft) aufgrund des stärkeren Signalrauschens um den Faktor 2 bis 5 auf ca. 0,5 bis 1 ng/m<sup>3</sup>. Als Beispiel sei hier das in der Realprobe (Sprayversuch im Innenraum, Probe 2, siehe Kapitel 4.1.8) mit einer Konzentration von 1 ng/m<sup>3</sup> bestimmte Permethrin genannt, was exakt der Bestimmungsgrenze mit S/N = 6 entspricht (Peak 17 in Abb. 27, Nachweisgrenze: 0,5 ng/ m<sup>3</sup>).

#### **4.1.7 Robustheit und Spezifität der Methode**

Die Methode ist nicht robust, wenn die externe Kalibrierung mit reinen Standardlösungen (in Ethylacetat) erfolgt, da es, wie bereits geschildert, zu starken Schwankungen in den quantitativen Ergebnissen mit erheblichen Überbefunden kommen kann, wenn matrixbelastete Proben gemessen werden. Der Grund hierfür liegt in der sogenannten matrixinduzierten Signalverstärkung durch das chromatographische System (Erney und Pawlowski, 1997; Murayama et al., 2000; Hajslova et al., 1998). Dabei besetzt die Matrix aktive Stellen im Injektorport bzw. auf der Säule und reduziert damit Analytverluste, die ansonsten durch Wechselwirkungen mit diesen aktiven Stellen verursacht werden. Die praktischen Erfahrungen haben gezeigt, dass es notwendig ist, eine neue (Vor-) Säule bzw. einen neuen Injektorport-Liner mit fünf Injektionen eines Probenextraktes bzw. eines Matrixstandards zu konditionieren, um die aktiven Stellen abzusättigen. Nach anschließender Kalibrierung in der Matrix können Proben in Serien zu fünf (PUF) oder zehn (GFF) mit ausreichender Robustheit gemessen werden (Ergebnisschwankungen < 20 %). Sollten beim Systemtest Abweichungen von mehr als 20 % festgestellt werden, so ist gemäß Kapitel 3.2.1.2 Punkt f) zu verfahren. Das Injizieren von reinem Lösemittel oder Standards in reinem Lösemittel ist zu vermeiden, weil damit Matrix von der Säule heruntergespült wird, so dass wieder aktive Stellen freigelegt werden können. Sollten die Analytpeaks ein deutliches Tailing zeigen ( $T > 2$ ), so ist die Vorsäule zu wechseln und wie oben geschildert zu konditionieren. Die GC-MS-Methode ist aufgrund ihrer hohen Trennschärfe und der Detektion im SIM-Modus sehr spezifisch. Das Auftreten von falsch positiven Befunden durch Matrixbestandteile ist relativ

gering, wenn darauf geachtet wird, das sich das Responseverhältnis von Target- und Qualifiermasse im vorgegebenen Rahmen bewegt.

#### **4.1.8 Realproben**

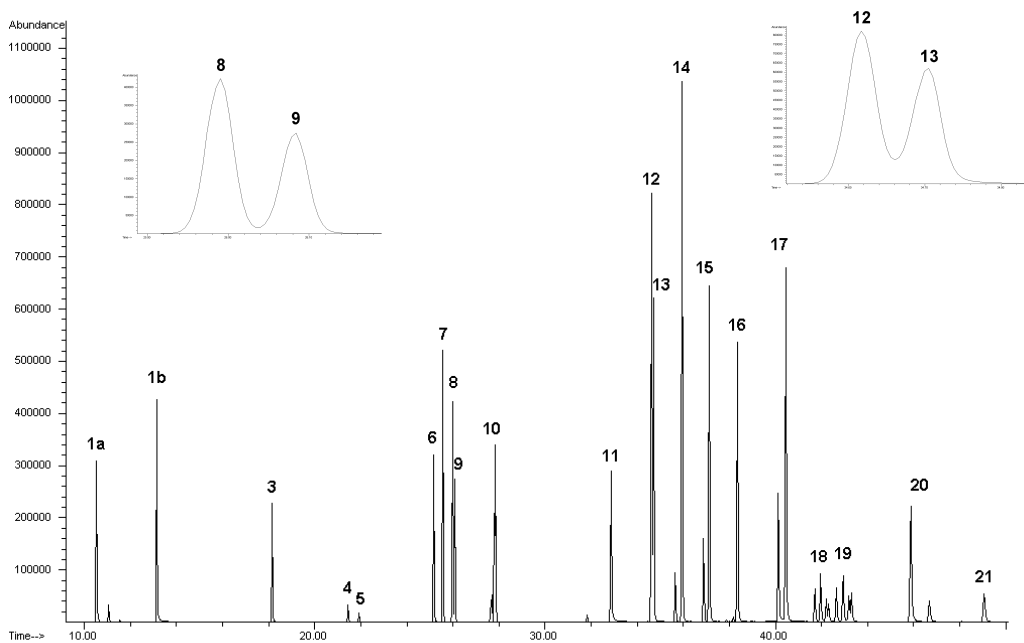
##### Sprayversuch im Innenraum:

Um die beschriebene Methode unter Praxisbedingungen zu testen, wurde eine Lösung, die alle der zu untersuchenden Verbindungen enthielt, in einem Innenraum versprüht (siehe 3.3.1). Die Ergebnisse des Sprayversuches sind in **Tabelle 15** und **Abb. 24-28** aufgeführt. Ein halbe Stunde nach der Ausbringung fanden sich durchschnittlich noch 13 % der ausgebrachten Wirkstoffmenge in der Raumluft (Probe 1). Der größte Anteil hatte sich bereits auf Oberflächen oder Staubpartikeln abgesetzt. Selbst ohne Lüftung des Raumes, z.B. durch Öffnen des Fensters, waren nach einer Woche mit Ausnahme von Piperonylbutoxid nur noch minimale Konzentrationen einiger Wirkstoffe in der Raumluft detektierbar (Probe 2). Die Verteilung der Wirkstoffe auf den Sammelmedien bei Probe 1 unterschied sich etwas von der Verteilung, die bei den Dotierungsversuchen festgestellt wurde. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Analyten 30 min nach der Ausbringung noch als mikroskopische Aerosoltröpfchen in der Raumluft vorliegen, so dass sie gänzlich auf dem Filter deponieren, z.B. bei den Wirkstoffen Fenitrothion, Fenthion und Malathion.

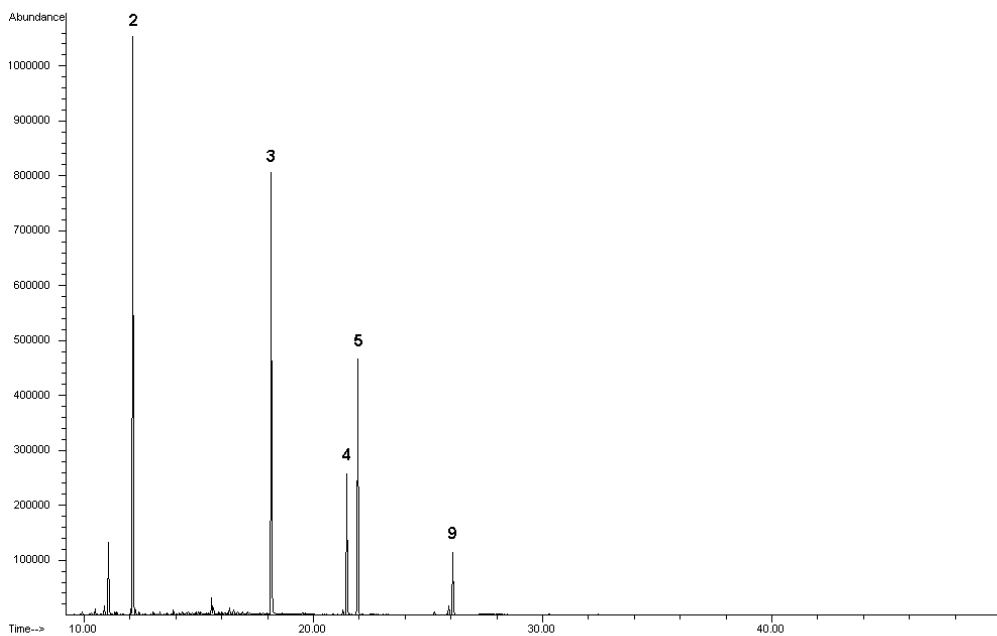
Ferner ist interessant, dass für Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin ähnliche Konzentrationen in der Raumluft wie für die übrigen Pyrethroide gemessen wurden. Da alle Wirkstoffe in der versprühten Lösung dieselbe Konzentration hatten, sollte auch dies bestätigen, dass diese Stoffe mit der erarbeiteten Methode sicher bestimmt werden können. Zudem wurden die Analyten ausschließlich vom Filter zurückgehalten. Der Versuch bestätigt also die im Kapitel 4.1.4.3 dargestellten Ergebnisse und Schlussfolgerungen für diese vier Wirkstoffe.

**Tabelle 15:** Sprayversuch im Innenraum. Konzentrationen in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  auf GFF/PUF/PUF-Kombinationen; berechnet mit einer Kalibrierung in der Matrix; n.d.: nicht detektiert; Werte in Klammern: prozentuale Verteilung des Wirkstoffes auf den Sammelmedien; bei Angaben ohne Klammer Wirkstoff zu 100 % auf dem Filter. Theoretische Konzentration in der Raumluft unmittelbar nach der Ausbringung:  $24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

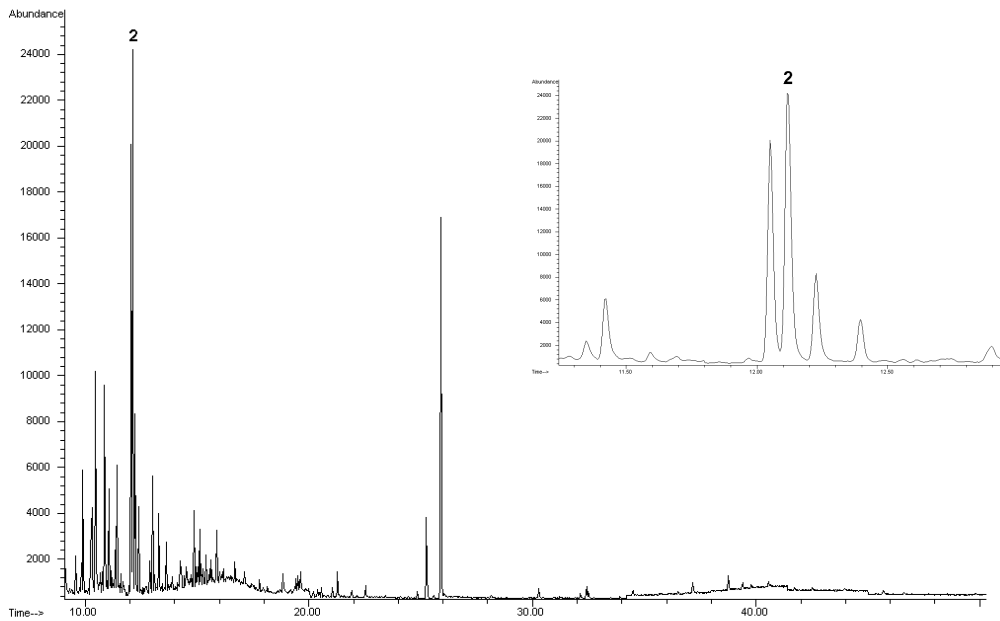
Peak Nr.	Wirkstoff	Probe 1 (nach 30 min)	Probe 2 (nach 7 Tagen)
1a	p-Chlorbenzol- isocyanat	3,6	n.d.
1b	2,6-Difluor- benzolid	3,7	n.d.
2	Dichlorvos	2,8 ( 0/98/2)	n.d.
3	Propoxur	2,6 (22/78/0)	0,010 (9/91/0)
4	Lindan	2,3 (11/89/0)	0,012 (7/93/0)
5	Diazinon	2,5 ( 4/96/0)	n.d.
6	Fenitrothion	2,4	0,003
7	Malathion	2,6	0,003
8	Fenthion	1,2	n.d.
9	Chlorpyrifos	2,2 (70/30/0)	0,006 (14/86/0)
10	Allethrin	2,8	n.d.
11	Chlordecon	3,6	n.d.
12	Piperonylbutoxid	4,1	0,118
13	Resmethrin	3,4	n.d.
14	Tetramethrin	3,9	n.d.
15	Phenothrin	3,7	n.d.
16	Cyhalothrin	3,9	n.d.
17	Permethrin	4,0	0,001
18	Cyfluthrin	4,4	n.d.
19	Cypermethrin	4,2	n.d.
20	Fenvalerat	4,2	n.d.
21	Deltamethrin	4,5	n.d.



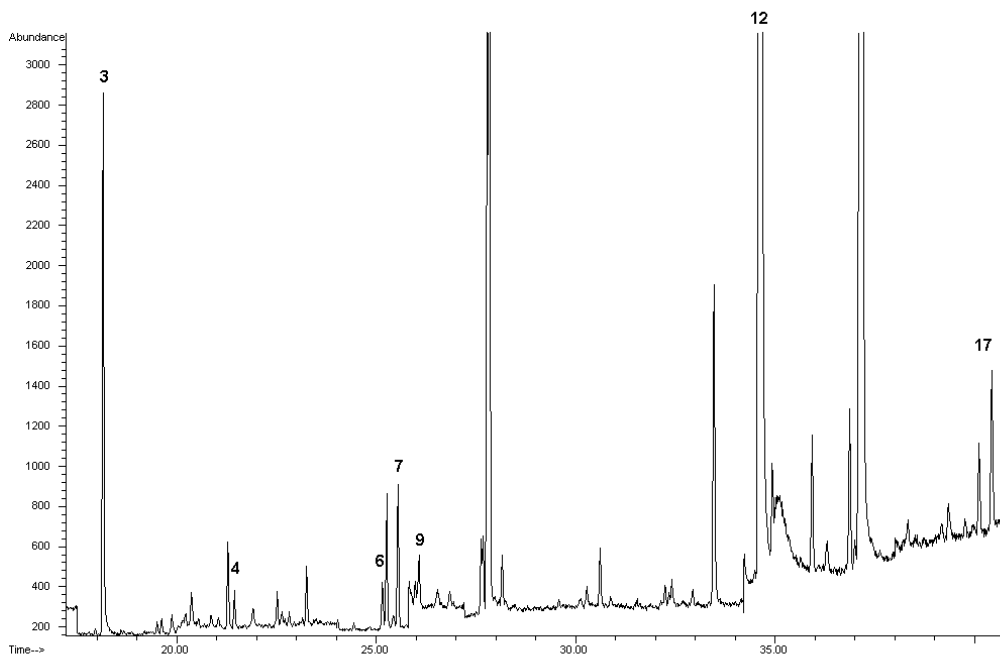
**Abb. 24:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des GFF-Extraktes; Peakzuordnung siehe Tabelle 15.



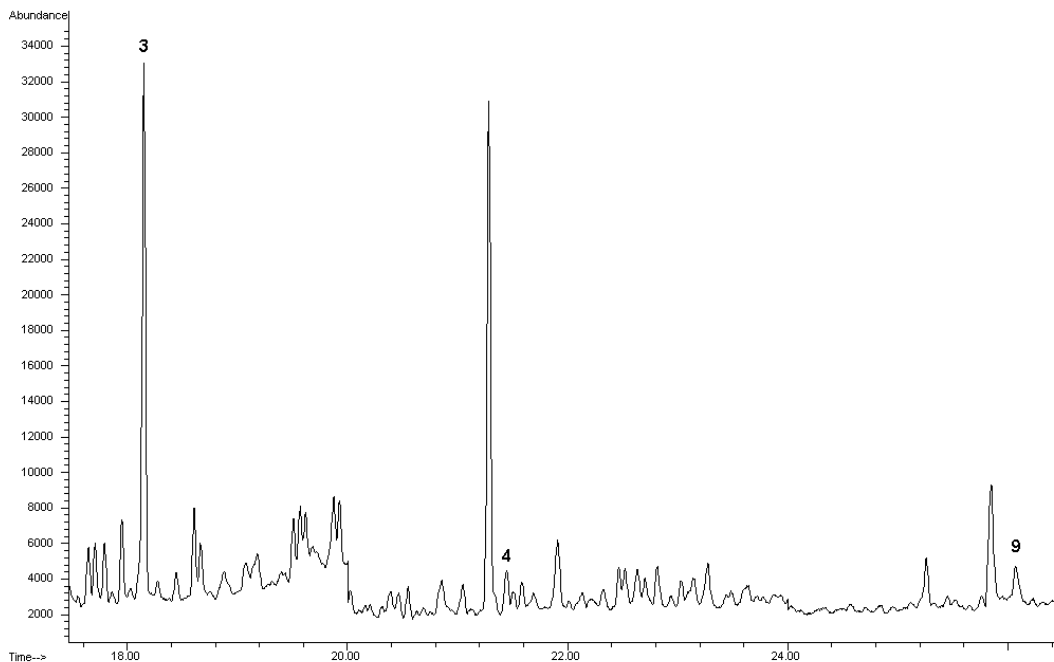
**Abb. 25:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF1-Extraktes; Peakzuordnung siehe Tabelle 15.



**Abb. 26:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -Akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 1. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF2-Extraktes; Peakzuordnung siehe Tabelle 15.



**Abb. 27:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -Akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 2. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des GFF-Extraktes; Peakzuordnung siehe Tabelle 15.



**Abb. 28:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden in der Raumluft. Sprayversuch im Innenraum, Probe 2. TIC-Chromatogramm (SIM-Modus) des PUF1-Extraktes; Peakzuordnung siehe Tabelle 15.

#### Probenahme nach Desinsektionsmaßnahmen im Flugzeug

An insgesamt sieben verschiedenen Terminen wurden Luftproben während der Durchführung von Desinsektionsmaßnahmen in einem Airbus A310 genommen, bei denen d-phenothrinhaltige Sprays eingesetzt wurden. Die Konzentrationen des d-Phenothrins in der Luft bewegten sich zwischen 60 und 1680  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  für die erste Probe (0-40 min nach der Ausbringung) bzw. 0,1 und 2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  für die zweite Probe (41-80 min nach der Ausbringung). In allen Fällen wurde das d-Phenothrin zu > 99,99 % auf dem Filter gefunden. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Versuchen im Innenraum (siehe oben und Kapitel 4.1.4.3).

Ferner bot sich die Gelegenheit, Luftproben einer Maschine, die im afrikanischen Flugverkehr eingesetzt war, zu untersuchen. Hierbei konnten die Wirkstoffe Permethrin (45  $\text{ng}/\text{m}^3$ ), Propoxur (21  $\text{ng}/\text{m}^3$ ) und Chlorpyrifos (65  $\text{ng}/\text{m}^3$ ) in der Luft nachgewiesen werden. Interessant ist die Verteilung der gefundenen Insektizide auf den Probenahmemedien. Permethrin und

Propoxur waren ausschließlich auf dem Filter zu finden, Chlorpyrifos zu 94 % auf dem Filter und zu 6 % auf dem ersten PUF (bei den Dotierungsversuchen mit Luftdurchsatz wurden Chlorpyrifos und Propoxur dagegen nur bzw. vorwiegend auf dem ersten PUF wiedergefunden). Es lässt sich vermuten, dass bei länger zurückliegenden Biozidanwendungen, die Wirkstoffe offensichtlich vermehrt an Partikel gebunden (insbesondere bei hoher Staubbelastung) vorkommen und deshalb bevorzugt auf dem Filter deponieren.

#### **4.1.9 Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in der Luft**

Es wurde eine GC-MS Methode entwickelt, mit der sich 16 Insektizide und Akarizide unterschiedlicher Stoffklassen (Diflubenzuron, Propoxur, Lindan, Diazinon, Fenitrothion, Malathion, Fenthion, Chlorpyrifos, Chlordecon, Piperonylbutoxid, Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerat, Deltamethrin) simultan in Innenräumen bis in den unteren ng/m<sup>3</sup> Bereich bestimmen lassen. Auch die Pyrethroide Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin, Phenothrin können nach den bisherigen Ergebnissen mit dieser Methode bestimmt werden, obwohl eine Ermittlung der Wiederfindungsrate über Dotierungsversuche aus letztendlich ungeklärten Gründen nicht möglich war. Dichlorvos kann mit dieser Methode aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit nur qualitativ und halbquantitativ bestimmt werden (Wiederfindung ca. 40 %). Da Diflubenzuron nur über seine Fragmentmoleküle bestimmt werden kann, sollten quantitative Ergebnisse nach Möglichkeit mit anderen Methoden, bei denen keine Zersetzung der Substanz erfolgt (z.B. HPLC), abgesichert werden.

Wie die Studien zur Verteilung der Wirkstoffe auf den einzelnen Sammelmedien sowie die Realproben zeigen, lassen sich die schwerflüchtigen Pyrethroide, Diflubenzuron, Chlordecon und Piperonylbutoxid alleine mit dem Filter sammeln. Für die flüchtigeren Organophosphate, Lindan und Propoxur wird zusätzlich PU-Schaum zur Adsorption des gasförmig vorliegenden Anteils benötigt. Ist also bekannt,

welche Wirkstoffe untersucht werden sollen (z.B. nur Pyrethroide), kann gegebenenfalls die Probenahme vereinfacht werden.

Um verlässliche quantitative Analysenergebnisse zu erhalten, muss in der Matrix kalibriert werden. Als Alternative zur externen Kalibrierung in der Matrix, welche relativ aufwendig ist, ist eine Kalibrierung mit internen Standards in Betracht zu ziehen. Da unterschiedliche Stoffklassen untersucht werden, sollte zumindest ein interner Standard für jede Stoffklasse verwendet werden. Optimal hierfür sind isotopenmarkierte Standards, weil sie sich einerseits aufgrund höherer Massen in SIM-Modus gut von den unmarkierten Substanzen unterscheiden lassen und sich andererseits ähnlich wie die zu untersuchenden Analyten verhalten. In ersten Versuchen erwiesen sich Bifenthrin für die Pyrethroide und Chlorpyrifos-diethyl-d10 als geeignete interne Standardverbindungen. Weitere Versuche hierzu müssen noch erfolgen, um beurteilen zu können, ob die interne Kalibrierung eine Alternative zur externen Kalibrierung in der Matrix darstellt.



## **4.2 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub**

Der Hausstaub wurde wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben mit einem organischen Lösemittel extrahiert und der Extrakt mit Hilfe von Kieselgel-SPE-Kartuschen aufgereinigt. Die in den Kieselgel-Eluaten enthaltenen Wirkstoffe wurden mittels GC-MS(EI) bzw. HPLC quantifiziert. Wegen der geringeren Trennleistung der HPLC-Methode wurden 15 ausgewählte Wirkstoffe untersucht (ohne Lindan, Chlordecon, Tetramethrin, Cyhalothrin, Cypermethrin und Fenvalerat, wie in der GC-MS Methode Raumluft).

### **4.2.1 Vorversuche zur säulenchromatographischen Aufreinigung des Hausstaubextraktes**

Um die o.g. Wirkstoffe in einer Hausstaubprobe bestimmen zu können, ist es erforderlich, dass die nach der Hausstaubextraktion mit Ethylacetat erhaltenen Proben aufgereinigt werden. Im vorliegenden Fall bietet sich eine Normalphasenchromatographie mit Kieselgel oder Florisil zur Aufreinigung der Extrakte an. Zunächst wurde mit reinen Standardlösungen gearbeitet, um die Eignung dieser beiden Adsorbentien zu testen. Damit die Wirkstoffe an einer Normalphase adsorbieren, müssen sie zunächst in einem möglichst unpolaren Lösemittel, z.B. n-Hexan aufgenommen werden (Ethylacetat selbst besitzt schon eine zu hohe Elutionskraft). Wie sich bei der Verwendung von Florisil-SPE-Kartuschen (1000 mg/6 ml, 150-250 µm Partikel) zeigte, werden einige Wirkstoffe (Chlorpyrifos, Resmethrin, Phenothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Deltamethrin) bereits im Wasch-Schritt mit n-Hexan teilweise eluiert, so dass sich dieses Adsorbens als nicht geeignet für die zu entwickelnde Multimethode erwies. Bei Verwendung von Kieselgel-SPE-Kartuschen (500 mg/3 ml, Si 60) blieben dagegen die Analyten im Wasch-Schritt mit n-Hexan auf der Säule, so dass damit die Grundvoraussetzung zur Entwicklung einer Aufreinigungsmethode gegeben war. In einem nächsten Schritt wurde nach einem geeignetem Lösemittelgemisch gesucht, um die zu untersuchenden Komponenten wieder vom Festphasenmaterial abzulösen. Nach empirischen Versuchen mit verschiedenen Lösemitteln erwiesen sich Gemische aus n-Hexan/Dichlormethan (50/50, V/V; Eluat A) und n-Hexan/Aceton (75/25, V/V; Eluat B) als geeignete Elutionsmittel. Die

Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tabelle 16** dargestellt. Es wurde 1 ml des Multistandards in Ethylacetat (10 µg/ml) nach Umlösen in n-Hexan auf die Kartusche gegeben und nach dem Spülschritt mit n-Hexan mit 2 ml Portionen der Eluate A und B sukzessive eluiert. In den Teileluaten A und B wurden anschließend die Analytkonzentrationen mit GC-MS bestimmt. Wie die Ergebnisse zeigen, ist die quantitative Elution nach jeweils 4 ml erreicht. Zur Sicherheit wurden die Elutionsvolumina der Eluate A und B für die folgenden Versuche auf 5 ml festgesetzt. Bemerkenswert ist die Möglichkeit, die Wirkstoffe ohne Überlappung in zwei Fraktionen von der Säule eluieren zu können.

**Tabelle 16:** Ermittlung der Elutionsfenster und der Wiederfindung der Wirkstoffe in Prozent aus einer Standardlösung nach Elution der Kieselgelkartusche mit  $E_H$ : n-Hexan (5 ml);  $E_A$ : Eluat A;  $E_B$ : Eluat B;  $Index_{1,2,3}$ : Fraktionen 1 bis 3 zu je 2 ml.

Wirkstoffe	Wiederfindung [%]							
	$E_H$	$E_{A1}$	$E_{A2}$	$E_{A3}$	$E_{B1}$	$E_{B2}$	$E_{B3}$	$E_{ges}$
Fenitrothion		14	65					79
Fenthion		71	3					74
Chlorpyrifos		100	0					100
Cyfluthrin		60	18					78
Resmethrin		74	3					77
Deltamethrin		89	7					96
Permethrin		102	1					103
Phenothrin		96	2					98
Dichlorvos					3	12		15
Propoxur					9	82		91
Malathion					93	2		95
p-Chlorbenzol- isocyanat					25	75		100
2,6-Difluor- benzolid					21	82		103
Diazinon					104	1		105
Piperonylbutoxid					102	1		103
Allethrin					99	1		100

## 4.2.2 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels

### GC-MS

#### 4.2.2.1 **Chromatographische Trennung**

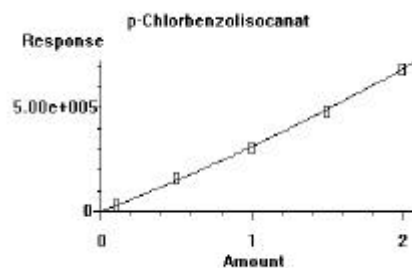
Siehe Kapitel 4.1.1.

#### 4.2.2.2 **Elektronenstoßionisations-Massenspektren der untersuchten Wirkstoffe**

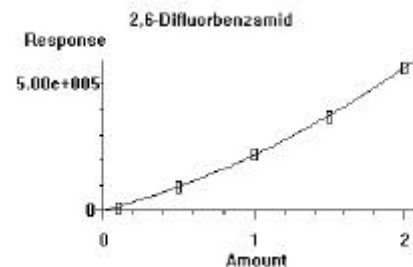
Siehe Kapitel 4.1.2.

#### 4.2.2.3 **Arbeitsbereich und Linearität**

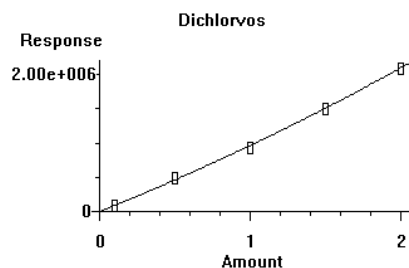
Um Überbefunde zu vermeiden, erfolgt die externe Kalibrierung in Analogie zur Luftmethode in der Matrix, d.h. je nach Wirkstoff in Eluat A bzw. Eluat B eines leerwertfreien Hausstaubes. Bezüglich Arbeitsbereich und Linearität gilt das in Kapitel 4.1.3 Gesagte. Die Kalibrierfunktionen der untersuchten Wirkstoffe sind in **Abb. 29a-p** dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten der quadratischen Funktionen betragen  $r^2 > 0,998$ .



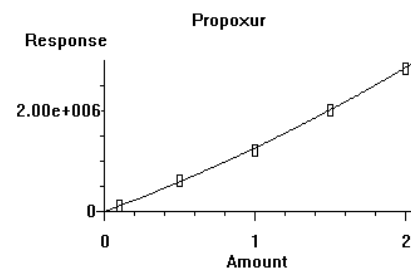
**Abb. 29a**



**Abb. 29b**



**Abb. 29c**



**Abb. 29d**

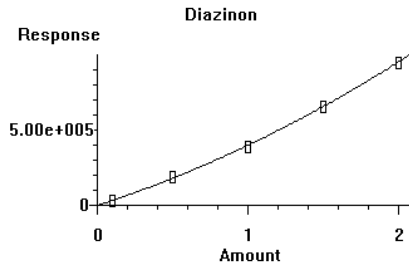


Abb. 29e

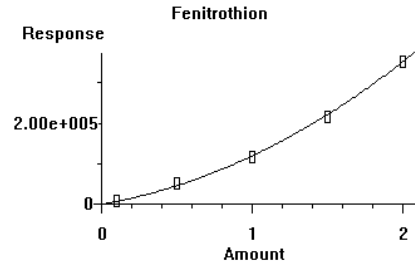


Abb. 29f

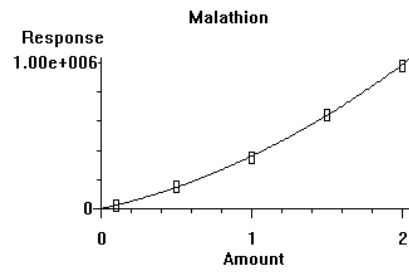


Abb. 29g

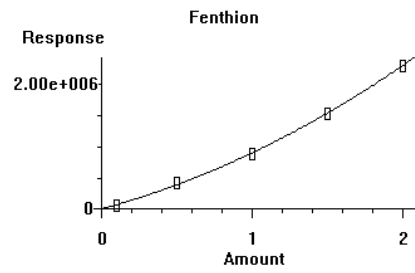


Abb. 29h

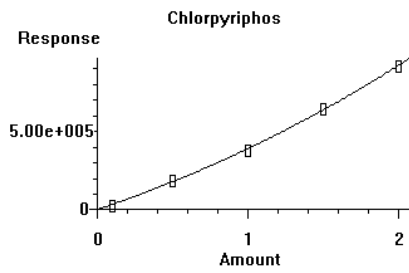


Abb. 29i

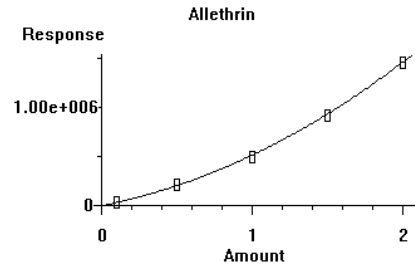


Abb. 29j

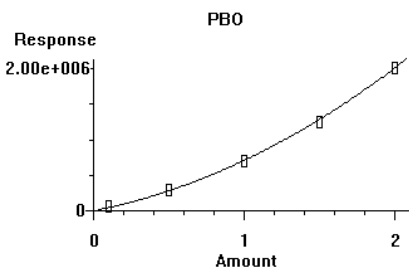


Abb. 29k

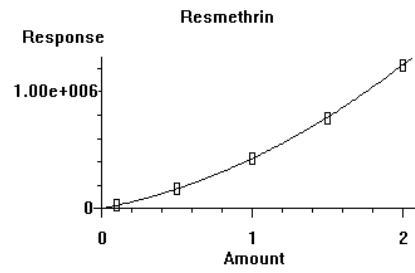
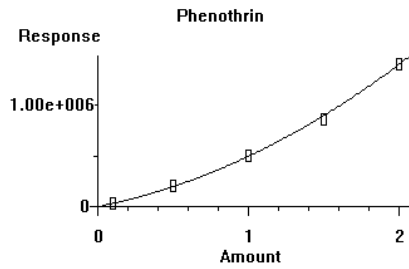
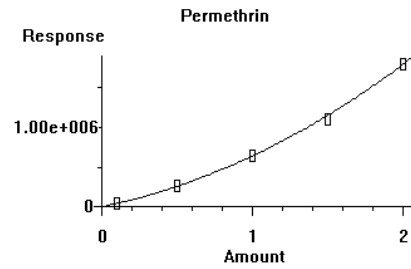


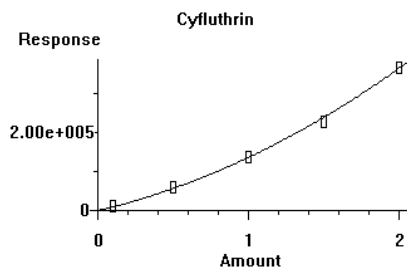
Abb. 29l



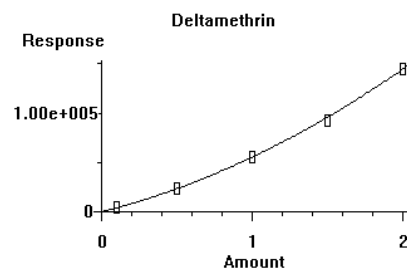
**Abb. 29m**



**Abb. 29n**



**Abb. 29o**



**Abb. 29p**

#### **4.2.2.4 *Wiederfindungen bei Aufreinigung mit Kieselgel-SPE-Kartuschen*** *Wiederfindungsraten mit Standardlösungen*

Nachdem das methodische Vorgehen zur Aufreinigung an Kieselgel-SPE-Kartuschen geklärt war (Kapitel 4.2.1), wurden zunächst Wiederfindungen mit Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen an Kieselgel-SPE-Kartuschen bestimmt. In der Regel werden befriedigende bis gute Wiederfindungsraten von 83 bis 115 Prozent erhalten (**Tabelle 17**). Die Wiederfindungen sind bei Level 2 (1 µg des jeweiligen Wirkstoffes auf der Kartusche) etwas höher. Die relativen Standardabweichungen sind auf beiden Konzentrationsniveaus  $\leq 10\%$  (mit Ausnahme der Diflubenzuron-Fragmentmoleküle und Dichlorvos bei Level 1).

Deutlich geringere Wiederfindungen wurden für Dichlorvos und p-Chlorbenzolisocyanat (bei Level 1, jeweils 10 µg Wirkstoff auf der Kartusche) beobachtet. Die geringeren Wiederfindungen von Dichlorvos werden offensichtlich durch das Umlösen der Standardlösung von Ethylacetat in n-Hexan verursacht. Ein Teil des

flüchtigen Dichlorvos geht dabei verloren. Wird das Abdampfen des Ethylacetats am Rotationsverdampfer unter Verwendung von Isooctan als Keeper durchgeführt, so werden schlechtere Wiederfindungen in der in n-Hexan aufgenommenen Probe beobachtet, als wenn das Einengen im Stickstoffstrom erfolgt (18 % mit Isooctan bzw. 26 % mit Stickstoff, bei Level 1). Daher wurde nachfolgend immer das Einengen im Stickstoffstrom zum Umlösen der Extrakte benutzt.

**Tabelle 17:** Wiederfindungen in Prozent ( $\pm$  relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Standardlösungen auf Kieselgelkartuschen; Beladung der Kartusche: 10  $\mu\text{g}$  je Wirkstoff (Level 1) und 1  $\mu\text{g}$  je Wirkstoff (Level 2). Messung mit GC-MS.

Wirkstoffe	Level 1 (n = 5)	Level 2 (n = 4)
Eluat A, Wiederfindung [%]		
Fenitrothion	99 $\pm$ 4,7	115 $\pm$ 5,8
Fenthion	83 $\pm$ 2,4	97 $\pm$ 2,7
Chlorpyrifos	92 $\pm$ 3,0	104 $\pm$ 2,3
Cyfluthrin	98 $\pm$ 5,5	107 $\pm$ 6,9
Resmethrin	92 $\pm$ 3,5	97 $\pm$ 8,4
Deltamethrin	99 $\pm$ 4,6	91 $\pm$ 9,1
Permethrin	98 $\pm$ 3,7	108 $\pm$ 6,8
Phenothrin	97 $\pm$ 3,3	112 $\pm$ 7,6
Eluat B, Wiederfindung [%]		
Dichlorvos	26 $\pm$ 34,1	66 $\pm$ 6,2
Propoxur	99 $\pm$ 5,1	106 $\pm$ 3,3
Malathion	97 $\pm$ 4,1	95 $\pm$ 2,7
p-Chlorbenzolisocyanat	64 $\pm$ 10,3	91 $\pm$ 4,2
2,6-Difluorbenzamid	93 $\pm$ 12,8	105 $\pm$ 4,4
Diazinon	94 $\pm$ 4,3	109 $\pm$ 3,5
Piperonylbutoxid	98 $\pm$ 3,6	112 $\pm$ 2,9
Allethrin	100 $\pm$ 3,8	101 $\pm$ 3,0

#### Wiederfindungsraten mit dotiertem Hausstaub

100 mg leerwertfreier, gesiebter Hausstaub (siehe Kapitel 3.2.2.1) wurden mit 1 ml Standardlösung (Multistandard 0,1 bzw. 1 bzw. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und homogenisiert. Nach vollständigem Verdunsten des Lösungsmittels und einstündiger Lagerung bei RT erfolgte die Aufarbeitung gemäß Analysenvorschrift. Zur Messung von Level 3 (Dotierung 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) wurde die Probelösung 1:10 aufkonzentriert.

**Tabelle 18:** Wiederfindungen in Prozent ( $\pm$  relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Extrakten dotierter Hausstäube auf Kieselgelkartuschen; Level 1: 100  $\mu\text{g/g}$ ; Level 2: 10  $\mu\text{g/g}$ ; Level 3: 1  $\mu\text{g/g}$ ;  $P_{\text{Nr.}}$ : Peaknummer im Chromatogramm. Messung mit GC-MS.

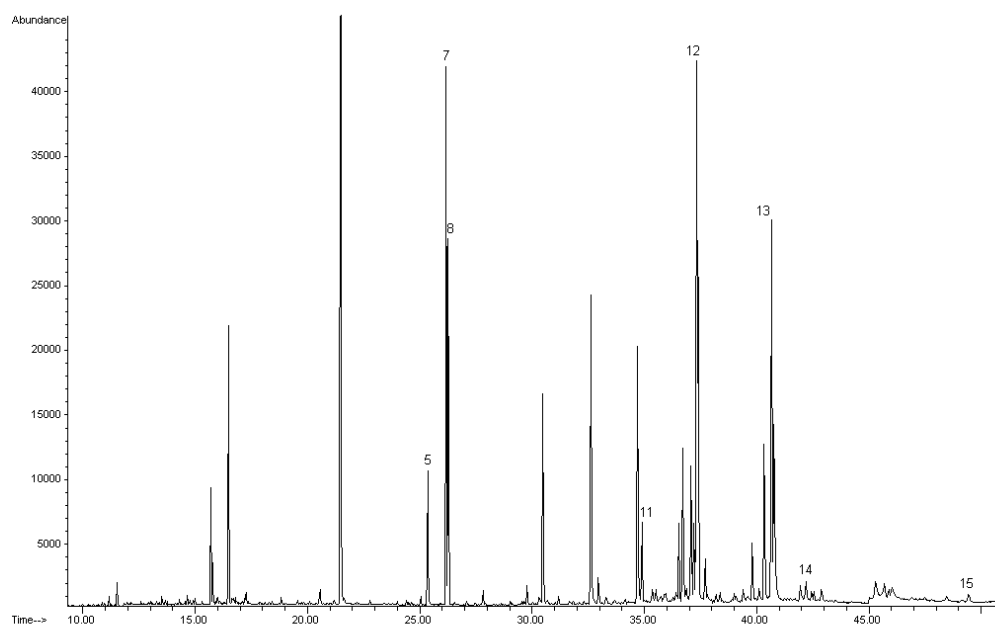
$P_{\text{Nr.}}$	Wirkstoffe	Level 1 (n = 5)	Level 2 (n = 4)	Level 3 (n = 4)
Eluat A, Wiederfindung [%]				
5	Fenitrothion	80 $\pm$ 6,7	104 $\pm$ 9,4	85 $\pm$ 11,3
7	Fenthion	76 $\pm$ 7,0	92 $\pm$ 6,0	11 $\pm$ 13,2
8	Chlorpyrifos	86 $\pm$ 6,5	96 $\pm$ 5,4	96 $\pm$ 9,6
14	Cyfluthrin	88 $\pm$ 7,4	94 $\pm$ 12,0	90 $\pm$ 8,0
11	Resmethrin	8 $\pm$ 25,1	35 $\pm$ 20,4	24 $\pm$ 17,1
15	Deltamethrin	88 $\pm$ 6,9	94 $\pm$ 8,0	91 $\pm$ 6,0
13	Permethrin	91 $\pm$ 6,2	101 $\pm$ 5,3	89 $\pm$ 5,6
12	Phenothrin	92 $\pm$ 4,3	89 $\pm$ 8,9	84 $\pm$ 10,7
Eluat B, Wiederfindung [%]				
2	Dichlorvos	60 $\pm$ 9,8	66 $\pm$ 6,4	80 $\pm$ 11,2
3	Propoxur	92 $\pm$ 4,8	107 $\pm$ 3,4	91 $\pm$ 8,2
6	Malathion	92 $\pm$ 3,8	108 $\pm$ 2,2	96 $\pm$ 9,7
1a	p-Chlorbenzolisocyanat	51 $\pm$ 3,5	37 $\pm$ 3,7	107 $\pm$ 1,6
1b	2,6-Difluorbenzamid	98 $\pm$ 5,2	80 $\pm$ 5,8	105 $\pm$ 7,9
4	Diazinon	91 $\pm$ 3,8	98 $\pm$ 3,1	93 $\pm$ 9,4
10	Piperonylbutoxid	96 $\pm$ 2,5	101 $\pm$ 3,1	101 $\pm$ 12,8
9	Allethrin	96 $\pm$ 3,2	98 $\pm$ 2,4	91 $\pm$ 10,1

Die Wiederfindungen sind für die meisten Verbindungen mit 76 bis 108 Prozent ausreichend bis gut. Die Ergebnisse in der **Tabelle 18** zeigen weiterhin, dass die im Hausstaub zu untersuchenden Verbindungen mit der entwickelten Aufreinigungsmethode gut reproduzierbar wiedergefunden werden können (Variationskoeffizienten 2-13 %). Ausnahmen, insbesondere bzgl. der Wiederfindungsraten werden für Fenthion, Resmethrin, Dichlorvos und p-Chlorbenzolisocyanat beobachtet. Fenthion wurde bei den Untersuchungen (Level 1 und 2) gut wiedergefunden, nicht jedoch bei Level 3. Die schlechte Wiederfindung des Fenthions bei diesem Versuch ist auf den Abbau des Wirkstoffes (in Lösung mit Matrix) zurückzuführen, da die Proben nicht unmittelbar nach der Extraktion gemessen werden konnten. Dieses Problem wurde bereits in Kapitel 4.1.4.2 beschrieben. Für Resmethrin ist die Wiederfindung im Hausstaub im Gegensatz zu den Ergebnissen mit reinen Standardlösungen schlecht (8-35 %), so dass als Ursache eine starke

Wechselwirkung mit der Hausstaubmatrix zu vermuten ist. Für Dichlorvos wurden Wiederfindungen zwischen 60-80 Prozent ermittelt, wobei die Wiederfindung bei der niedrigsten Dotierung am höchsten war. Offensichtlich verflüchtigt sich beim Umlösen nicht mehr so viel Dichlorvos aufgrund der vorhandenen Matrix, so dass akzeptable Wiederfindungen erzielt werden können.

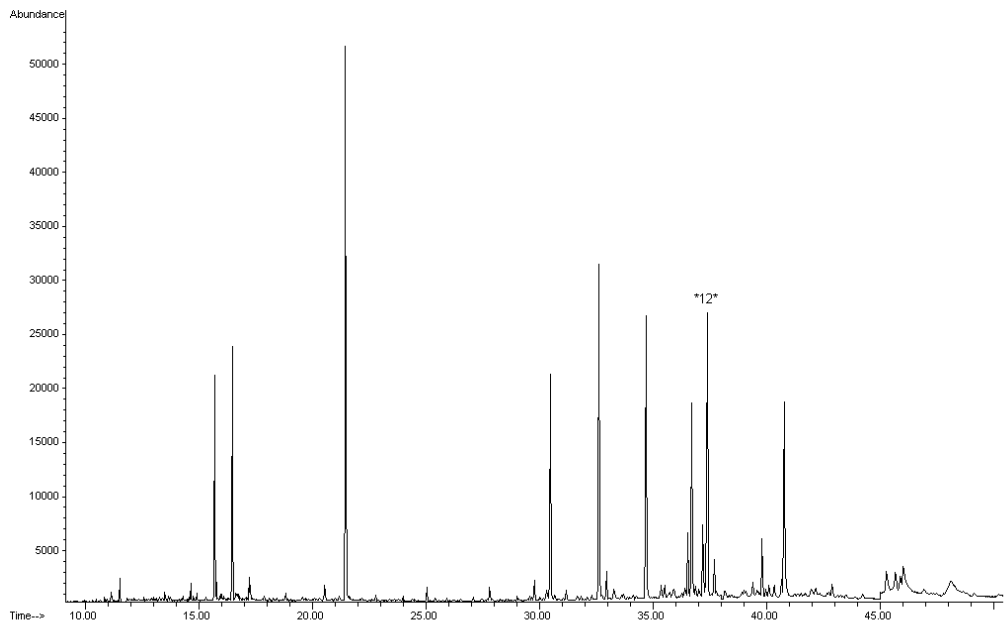
Auch für p-Chlorbenzolisocyanat wurden bei Level 1 und 2 niedrigere Wiederfindungen bestimmt, während das 2,6-Difluorbenzamid auf allen drei Levels gute Wiederfindungen zeigt. Folglich sollte das 2,6-Difluorbenzamid besser zur Abschätzung von Diflubenzurongehalten im Hausstaub geeignet sein.

Beispielchromatogramme sind in **Abb. 30-33** dargestellt.

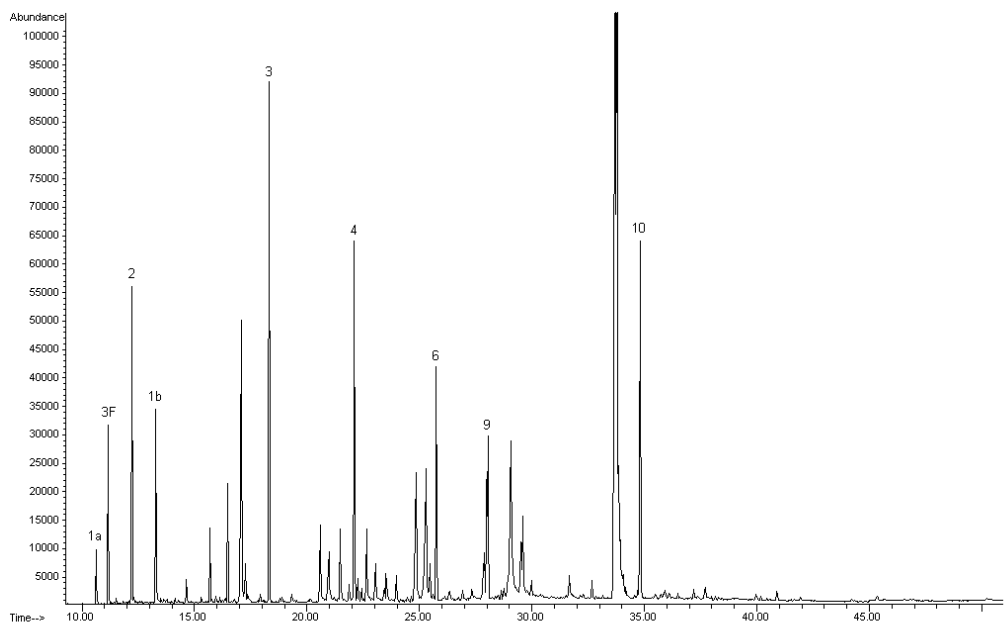


**Abb. 30:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g), Peakzuordnung siehe Tabelle 18.

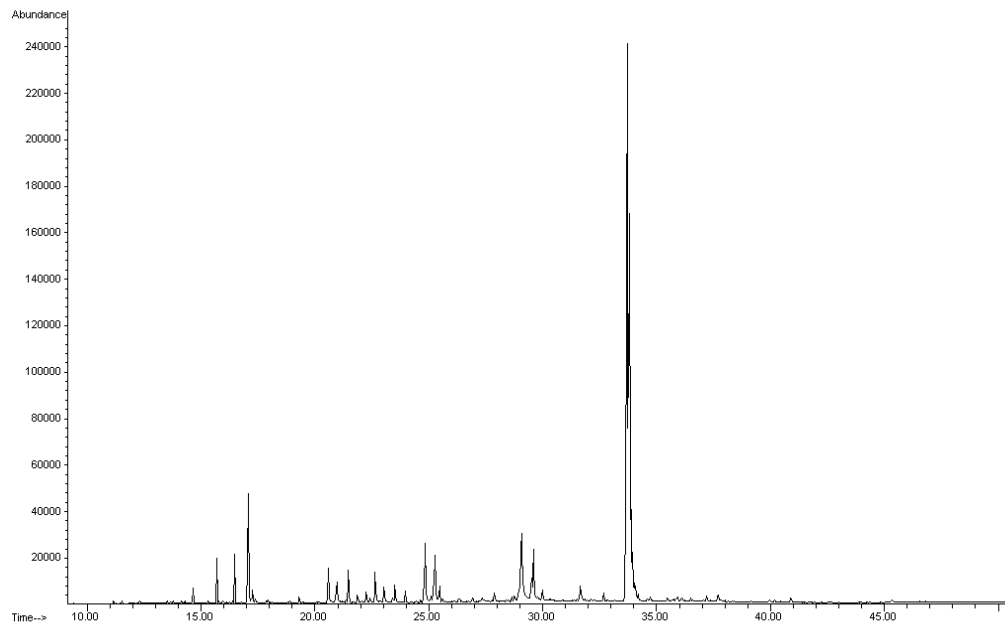




**Abb. 31:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A eines unbelasteten Hausstaubes; \*12\* Leerwert Targetmasse Phenothrin.



**Abb. 32:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g), Peakzuordnung siehe Tabelle 18.



**Abb. 33:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat B eines unbelasteten Hausstaubes. Keine Leerwerte.

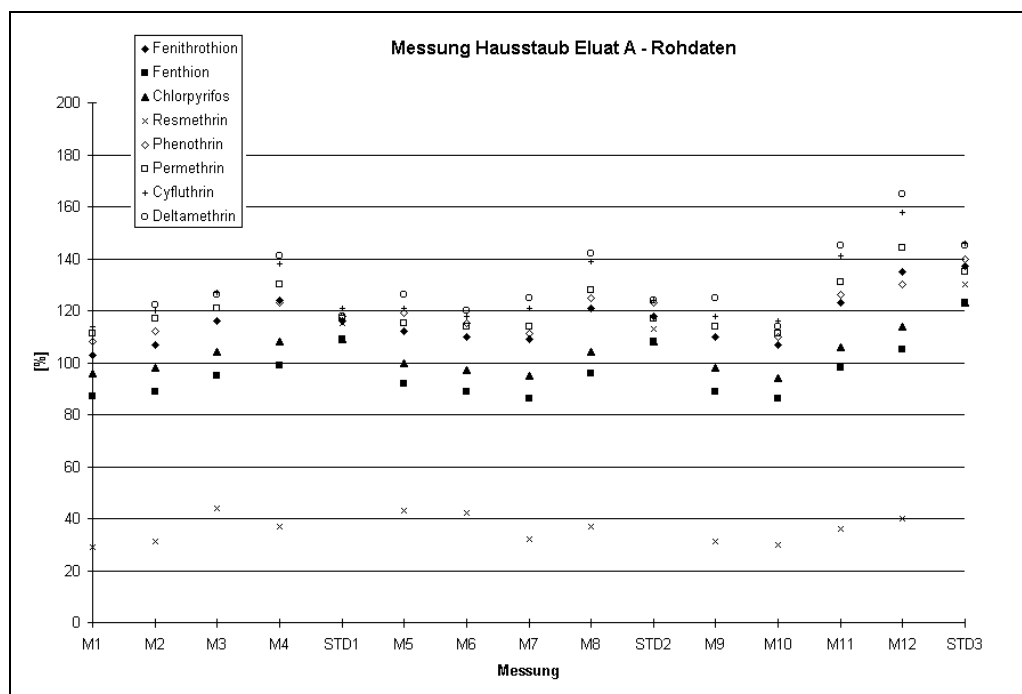
#### 4.2.2.5 **Nachweis- und Bestimmungsgrenzen**

Als instrumentelle Nachweisgrenzen gelten die in Kapitel 4.1.6 genannten Angaben. Bei einem Extraktvolumen von 1 ml, einer Hausstaubeinwaage von 100 mg und einer theoretischen Wiederfindung von 100 % ergeben sich daraus extrapolierte Nachweisgrenzen von 5 bis 25 ng/g für alle Wirkstoffe außer Cyfluthrin (420 ng/g) und Deltamethrin (520 ng/g). Anhand der an dotierten Hausstaubproben durchgeführten Messungen wurden folgende Nachweisgrenzen (S/N-Verhältnis = 3, Targetmasse) bestimmt: Fenitrothion (10 ng/g); Fenthion (10 ng/g); Chlorpyrifos (20 ng/g); Cyfluthrin (840 ng/g); Deltamethrin (720 ng/g); Permethrin (70 ng/g); Phenothrin (70 ng/g); Dichlorvos (50 ng/g); Propoxur (20 ng/g); Malathion (30 ng/g); p-Chlorbenzolisocyanat (40 ng/g); 2,6-Difluorbenzamid (190 ng/g); Diazinon (30 ng/g); Piperonylbutoxid (20 ng/g); Allethrin (190 ng/g). Man sieht also, dass trotz Aufreinigung die in den Hausstaubeluaten enthaltene Matrix die Nachweisgrenzen erhöht. Dabei hat Eluat B eine höhere Matrixbelastung als Eluat A,

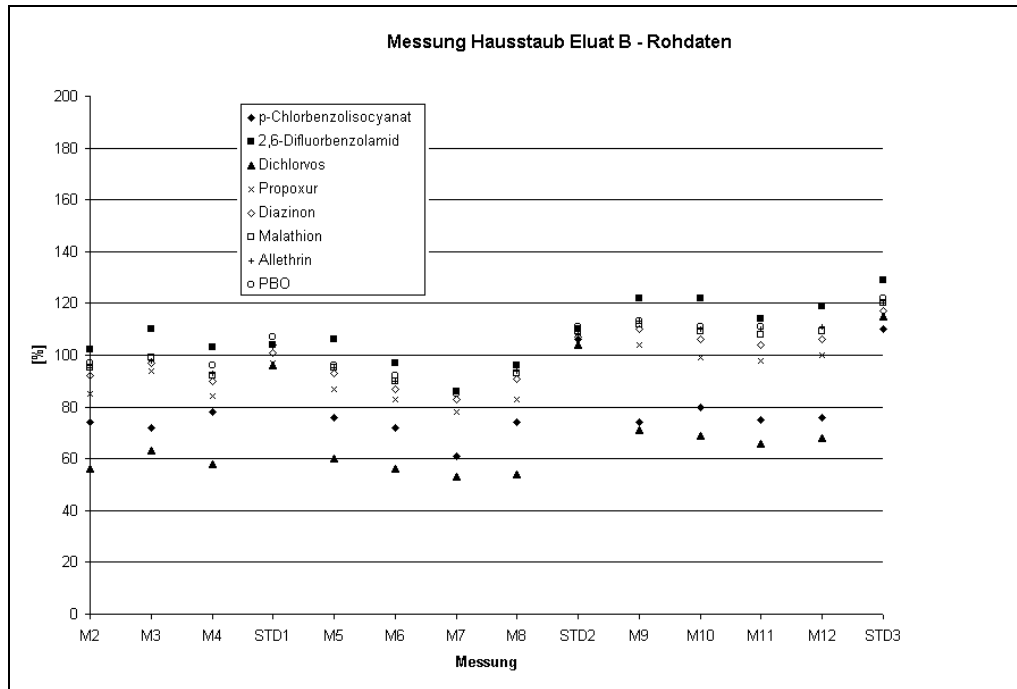
weil die polarerer Verbindungen nur mit einem Lösemittelgemisch höherer Elutionskraft von der SPE-Kartusche eluiert werden können. Entsprechend steigen die Nachweisgrenzen im Hausstaub gegenüber den instrumentellen Nachweisgrenzen um den Faktor 2-3 in Eluat A bzw. um den Faktor 4-10 in Eluat B. Als Bestimmungsgrenzen gelten die doppelten Werte mit einem S/N-Verhältnis von 6, wenn keine zusätzlichen Leerwerte vorhanden sind.

#### 4.2.2.6 Robustheit und Spezifität der Methode

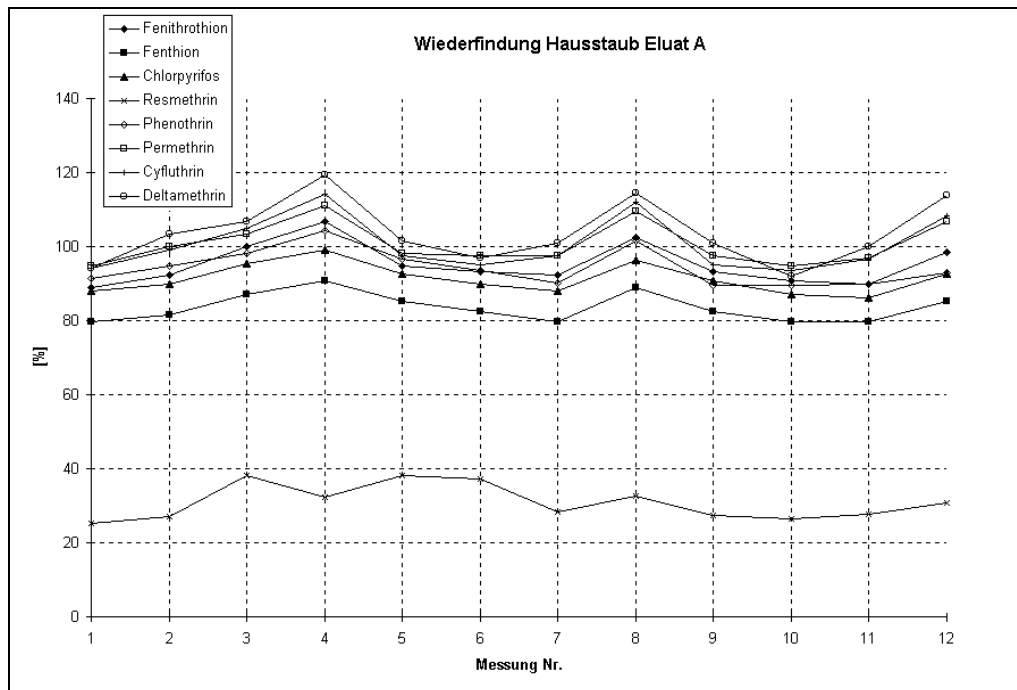
Um die Robustheit der Methode zu prüfen, wurde vor Beginn einer Messserie und nach jeder 4. bis 5. Probe ein Matrix-Standard als Kontrolle gemessen, um die Kalibrierung zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren. Zur Veranschaulichung können die prozentualen Abweichungen der Messwerte von der Sollkonzentration (Proben und Kontrollstandards) in Form einer Kontrollkarte (**Abb. 34-35**) aufgetragen werden (Systemtest). Die ermittelten Abweichungen betragen nicht mehr als 20 % (Eluat A) bzw. 25 % (Eluat B).



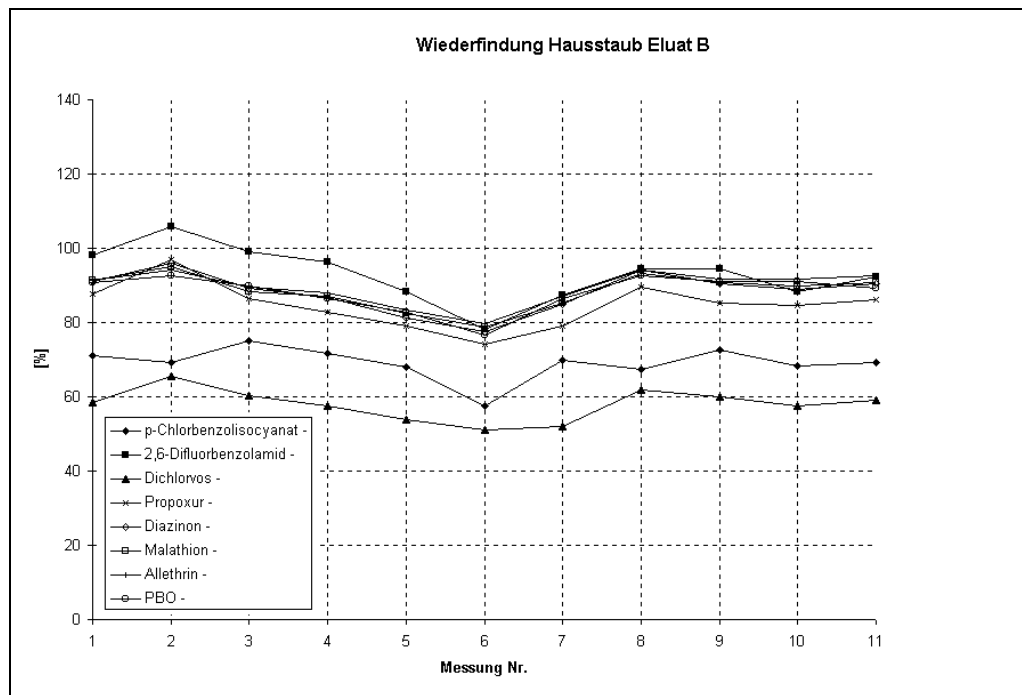
**Abb. 34:** Kontrollkarte für die Messung von dotierten Hausstäuben  $M_X$ ,  $X=1-12$  ( $10 \mu\text{g/g}$ , Eluat A) sowie der Kontrollstandards  $STD_Y$ ,  $Y=1-3$  ( $1 \mu\text{g/ml}$ , mit Matrix von Eluat A einer Leerwertprobe).



**Abb. 35:** Kontrollkarte für die Messung von dotierten Hausstäuben  $M_X, X=2-12$  ( $10 \mu\text{g/g}$ , Eluat B) sowie der Kontrollstandards  $STD_Y, Y=1-3$  ( $1 \mu\text{g/ml}$ , mit Matrix von Eluat B einer Leerwertprobe).



**Abb. 36:** Wiederfindungen der Wirkstoffe in dotierten Hausstaubproben in Prozent der Sollkonzentration, ermittelt aus den Rohdaten von Abb. 34.



**Abb. 37:** Wiederfindungen der Wirkstoffe in dotierten Hausstaubproben in Prozent der Sollkonzentration, ermittelt aus den Rohdaten von Abb. 35.

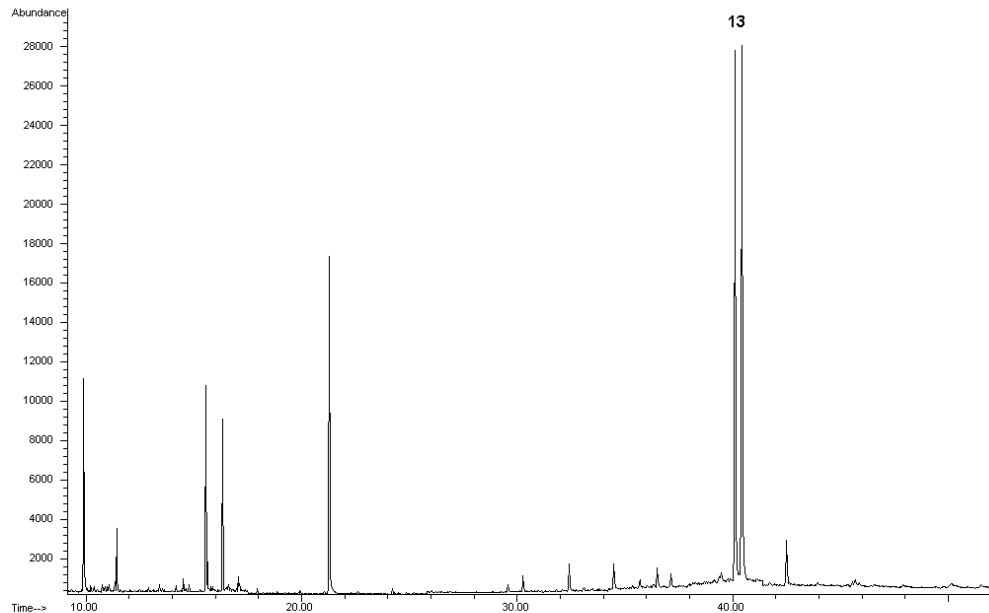
Die **Abb. 36** und **37** zeigen die prozentualen Wiederfindungen der Wirkstoffe in dotierten Hausstaubproben nach Korrektur der Kalibrierung durch die Kontrollstandards.

Generell ist zu erwähnen, dass die GC-MS-Methode aufgrund ihrer hohen Trennschärfe und der Detektion im SIM-Modus im Vergleich zur HPLC (Kapitel 4.2.3) sehr spezifisch ist. Das Auftreten von falsch positiven Befunden durch Matrixbestandteile ist relativ gering, wenn darauf geachtet wird, dass sich das Responseverhältnis von Target- und Qualifiziermasse im vorgegebenen Rahmen bewegt.

#### 4.2.2.7 *Realprobe*

In **Abb. 38** ist das Chromatogramm von Eluat A einer realen Hausstaubprobe dargestellt. Es konnte Permethrin in einer Konzentration von 23  $\mu\text{g/g}$  bestimmt werden. Andere Wirkstoffe wurden nicht detektiert, auch nicht in Eluat B, weshalb auf die Darstellung des Chromatogrammes verzichtet wird. Da in der beprobten Wohnung nach Wissen der Bewohner keine Schädlingsbekämpfungsmaßnahme durchgeführt worden war,

stammt das Permethrin wahrscheinlich aus (einem) Teppich(en) mit Motten- und Käferschutzausrüstung. Dies wird auch dadurch gestützt, das für die cis- und trans-Isomere des Permethrins gleich große Peaks erhalten wurden, was auf die Verwendung eines technischen Produktes hinweist.



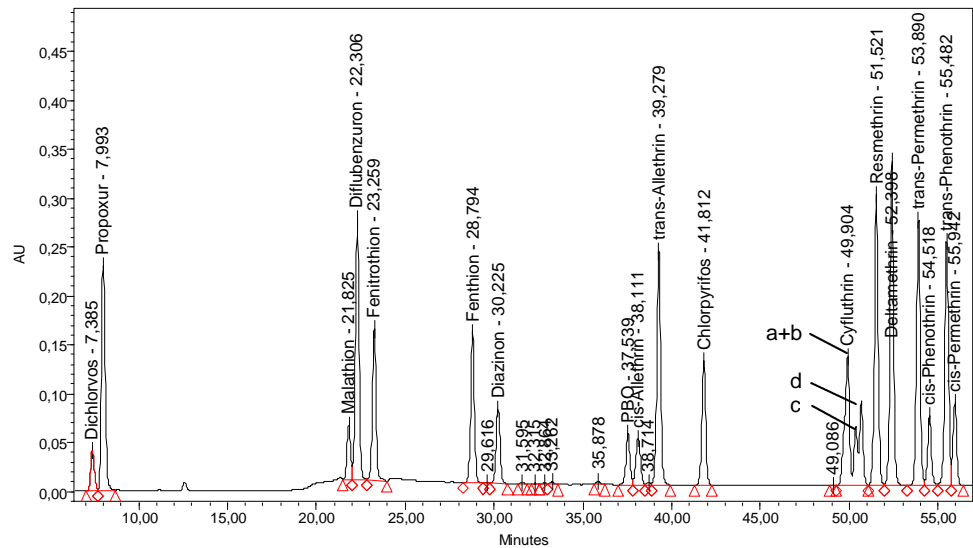
**Abb. 38:** GC-MS Methode zur Bestimmung von Innenraum-Insektiziden und -Akariziden im Hausstaub. TIC(SIM)-Chromatogramm von Eluat A einer Realprobe, Fraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ ; Permethrin (13).

#### **4.2.3 Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub mittels HPLC-DAD**

Zur Bestimmung der Insektizide und Akarizide im Hausstaub wurde des Weiteren die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektion eingesetzt, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

##### **4.2.3.1 Chromatographische Trennung und Leistungsparameter**

Das HPLC-Chromatogramm einer Standardlösung ist in **Abb. 39** dargestellt.



**Abb. 39:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm des Multistandards (10 µg/ml).

Die dazugehörigen chromatographischen Leistungsparameter der Trennsäule sind in **Tabelle 19** aufgelistet. Die Analyten sind mit Auflösungen > 1,3 praktisch basisliniengetrennt. Am schwierigsten zu trennen sind Malathion/Diflubenzuron und trans-Phenothrin/cis-Permethrin. Die Isomere von Phenothrin eluieren genau zwischen den Isomeren von Permethrin. Außerdem eluieren die Isomere von Phenothrin in umgekehrter Reihenfolge im Vergleich zur GC. Die Trennung mittels Lösemittelgradient wurde empirisch optimiert. Nur unter Verwendung eines tertiären Eluentengemisches konnte diese Auftrennung erreicht werden. Gemische von Acetonitril/Wasser bzw. Methanol/Wasser bringen schlechtere Ergebnisse. Es wurden auch verschiedene andere Reversed Phase HPLC-Säulen mit etwas anderen Selektivitäten (LiChrospher C18, RP select B, MZ-PBM) getestet, mit denen sich aber die Trennung wieder verschlechterte. Wie die Bodenzahlen zeigen, besitzt die verwendete Nucleosil-Säule eine hohe Trennleistung. Alle Peaks sind im Vergleich zur GC sehr symmetrisch. Bei wiederholter Injektion (n = 9) einer Standardlösung (1 µg/ml) ergaben sich Reproduzierbarkeiten in der Retentionszeit von ± 0,2 % und in den Peakflächen von ± 4 %, wie in der Tabelle 19 gezeigt.

**Tabelle 19:** Chromatographische Leistungsparameter und Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode: Asymmetriefaktor (T), Kapazitätsfaktor (k'), Trennfaktor ( $\alpha$ ), Bodenzahl (N) und Auflösung (R); Totzeit des Systems: 2,67 min; \*Mittelwert; \*\*letzter Peak; <sup>a</sup>: Peaksumme; relative Standardabweichung der Retentionszeiten (a) und der Peakflächen (b) bei wiederholter Injektion einer Standardlösung (1  $\mu$ g/ml, n=9).

Wirkstoff	T	k'	$\alpha$	N	R	(a)	(b)
Dichlorvos	1,1	1,8	-	14250	> 1,5	0,2	1,4
Propoxur	1,1	2,0	1,13	15430		0,2	0,4
Malathion	1,0	7,2	3,57	59400	1,3	0,1	4,0
Diflubenzuron	1,3	7,4	1,02	69440		0,1	0,8
Fenitrothion	1,0	7,8	1,05	71300	> 1,5	0,1	0,7
Fenthion	1,0	9,8	1,27	103140		0,1	1,5
Diazinon	1,0	10,4	1,06	97200		0,1	1,4
Piperonylbutoxid	1,0	13,1	1,26	165840	1,4	0,1	2,3
cis-Allethrin	1,1	13,3	1,02	115540		0,1	3,8
trans-Allethrin	1,0	13,8	1,03	163400	> 1,5	0,1	0,7
Chlorpyrifos	0,9	14,7	1,07	185000		0,1	1,1
Cyfluthrin <sup>a</sup>	*1,1	*17,9	1,21	**318900		0,1	1,2
Resmethrin	1,0	18,4	1,02	295800		0,1	1,1
Deltamethrin	1,0	18,7	1,02	340900		0,1	1,4
trans-Permethrin	1,0	19,2	1,03	341400	1,7	0,1	0,7
cis-Phenothrin	1,0	19,5	1,01	369000		0,1	2,0
trans-Phenothrin	1,0	19,8	1,02	343000	1,3	0,1	0,5
cis-Permethrin	1,0	20,0	1,01	411100		0,1	1,1

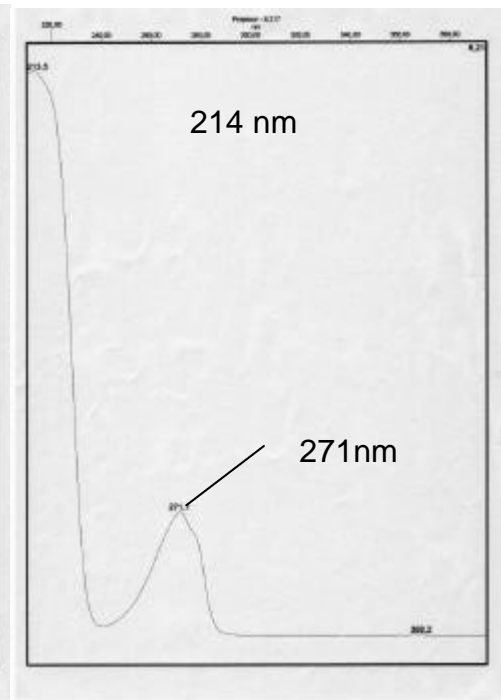
#### 4.2.3.2 HPLC-DAD Spektren der untersuchten Wirkstoffe

Die UV-Spektren (200-400 nm) der untersuchten Wirkstoffe sind in **Abb. 40a-r** dargestellt. Charakteristische Peakmaxima sind in den Abbildungen beschriftet.

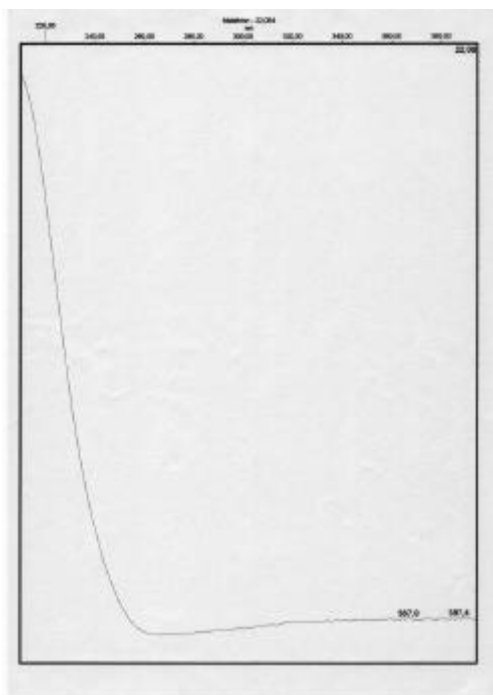




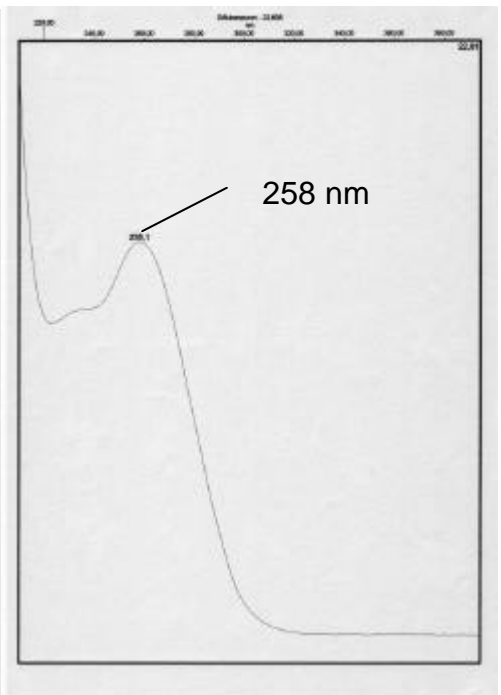
**Abb. 40a: Dichlorvos**



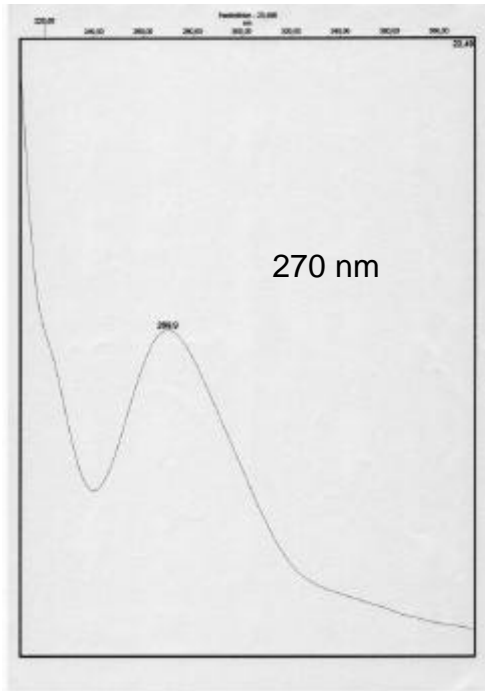
**Abb. 40b: Propoxur**



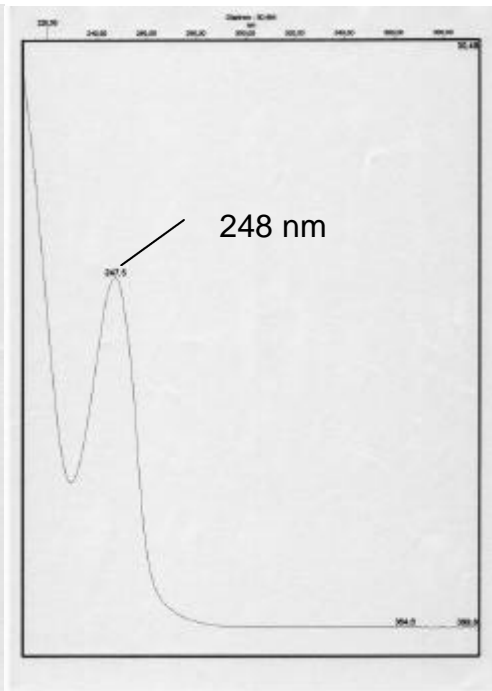
**Abb. 40c: Malathion**



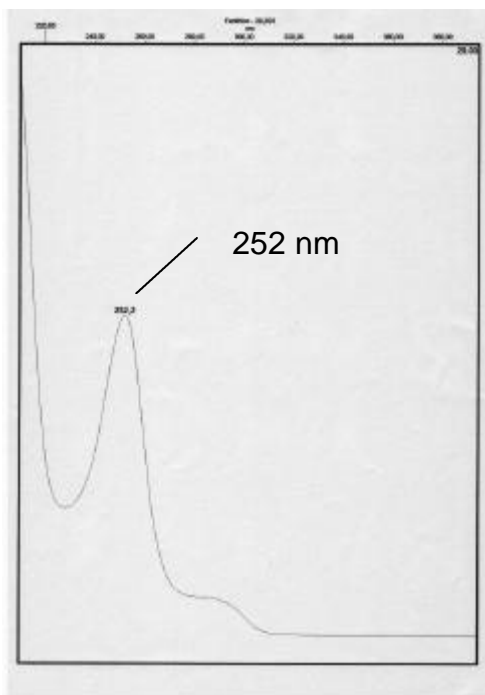
**Abb. 40d: Diflubenzuron**



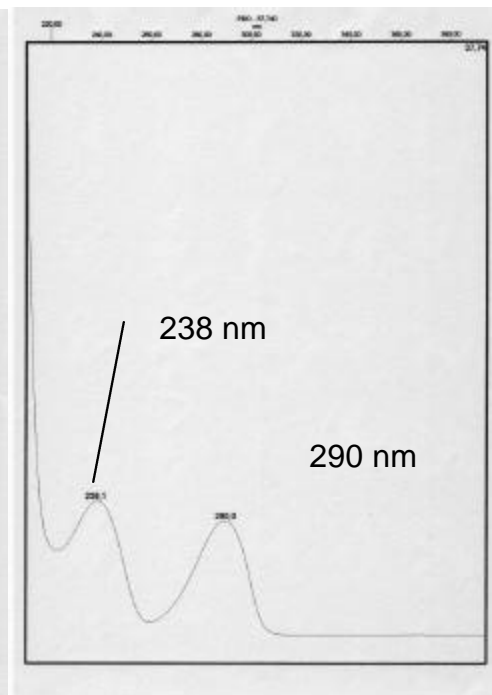
**Abb. 40e: Fenitrothion**



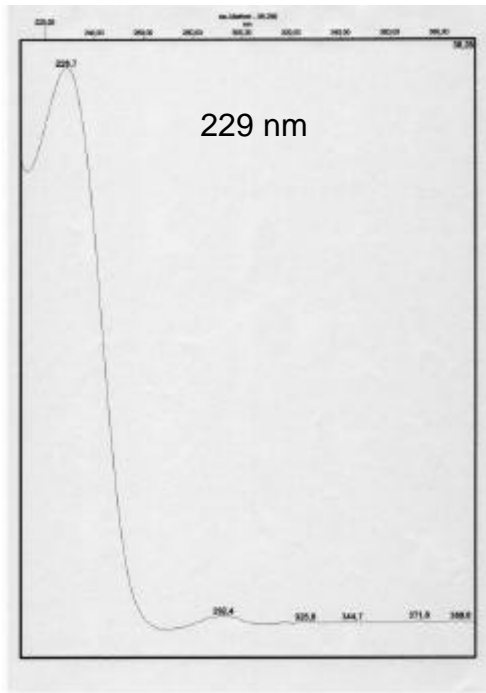
**Abb. 40f: Diazinon**



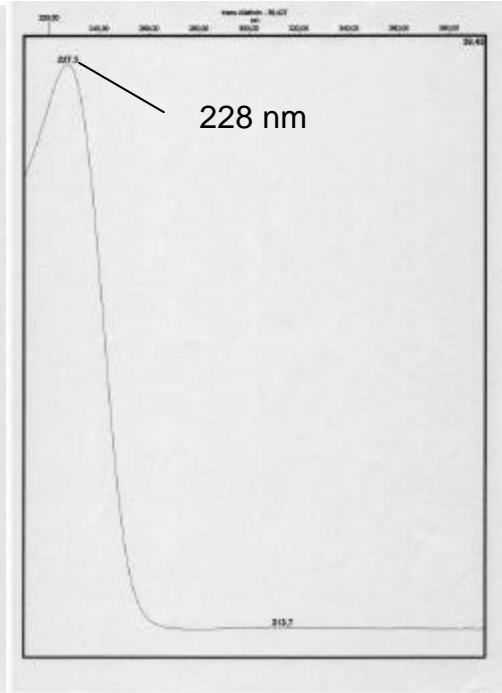
**Abb. 40g: Fenthion**



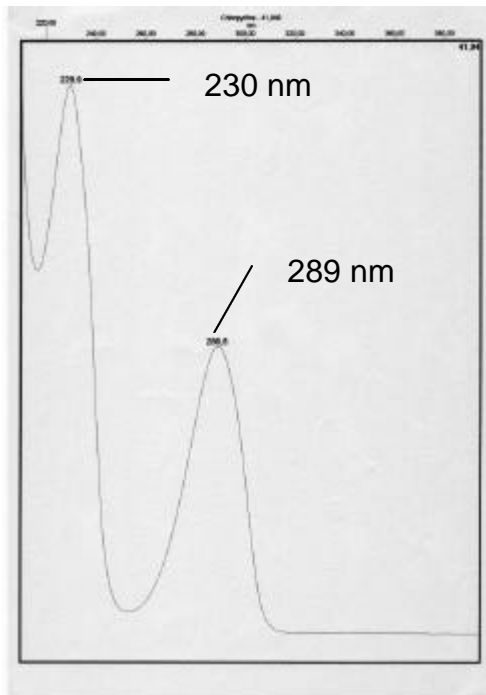
**Abb. 40h: Piperonylbutoxid**



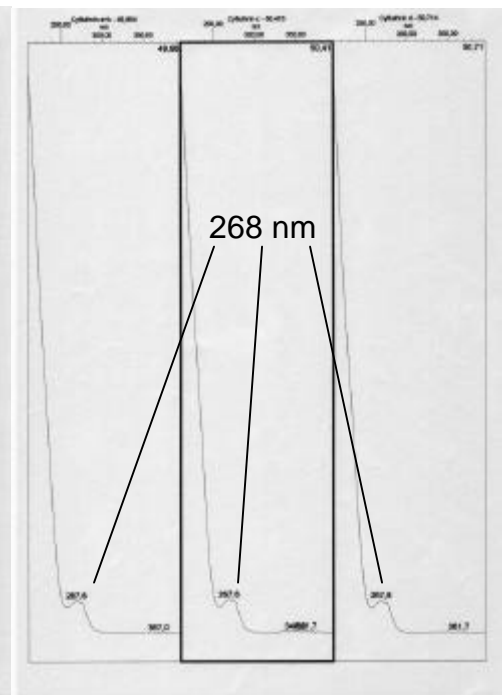
**Abb. 40i: cis-Allethrin**



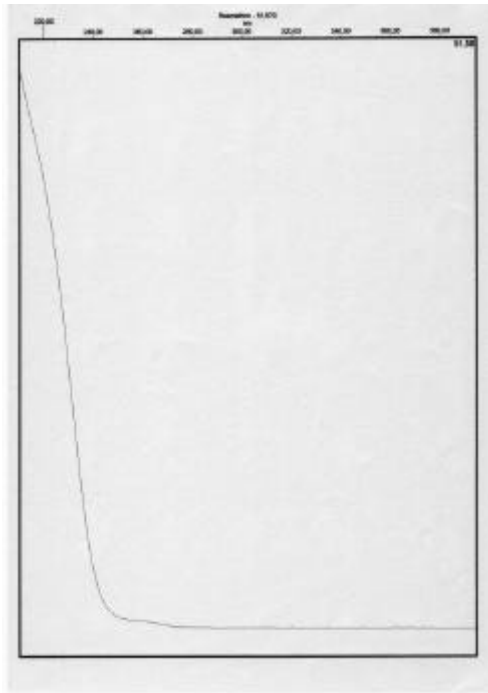
**Abb. 40j: trans-Allethrin**



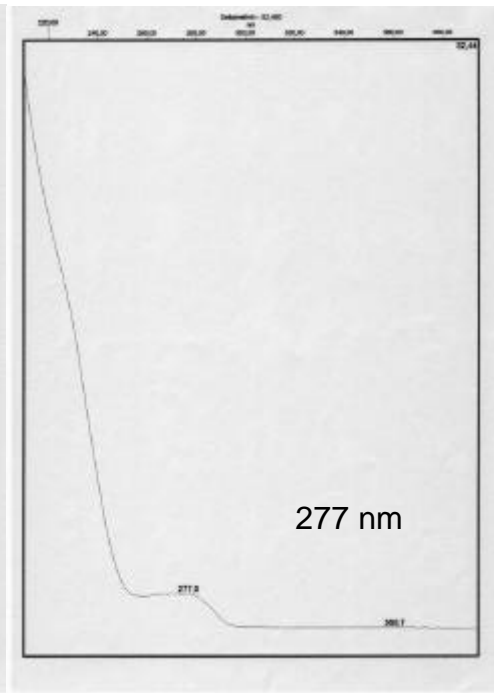
**Abb. 40k: Chlorpyrifos**



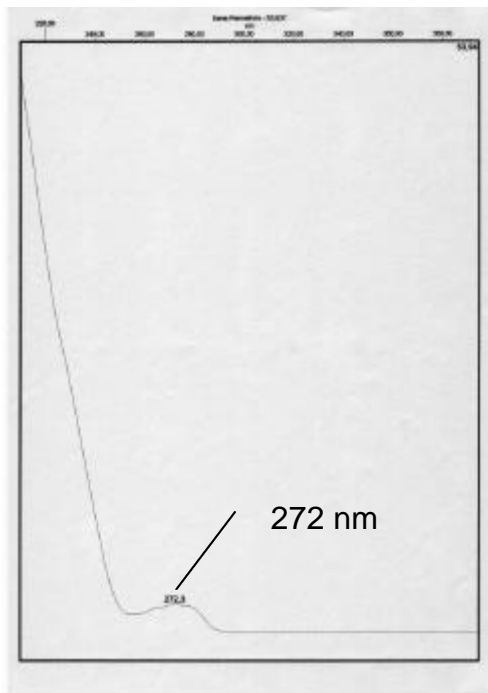
**Abb. 40l: Cyfluthrin (a+b,c,d)**



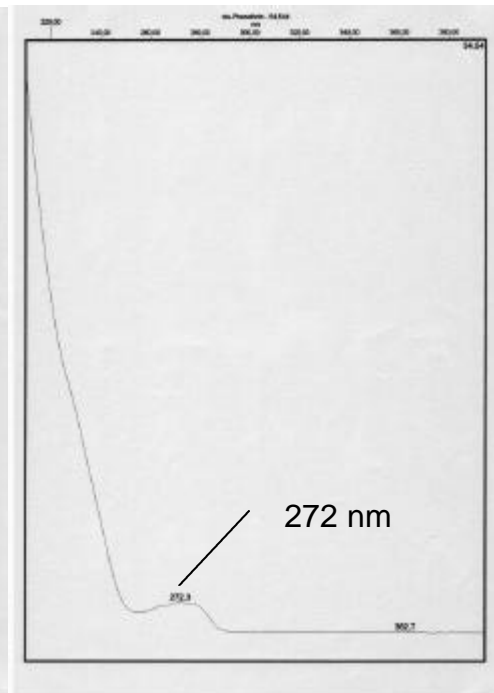
**Abb. 40m: Resmethrin**



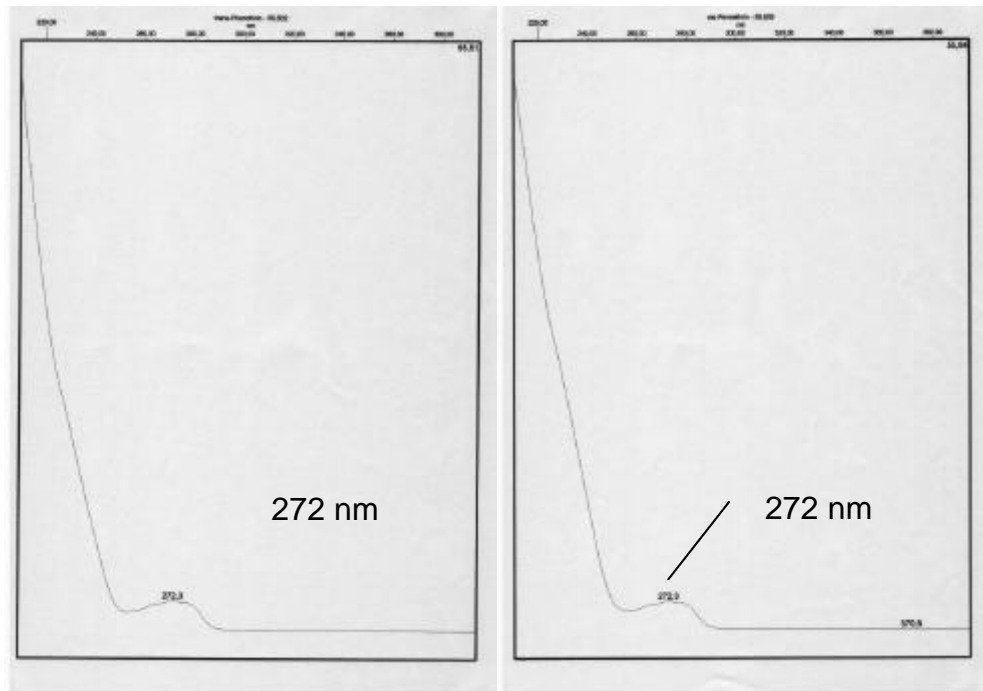
**Abb. 40n: Deltamethrin**



**Abb. 40o: trans-Permethrin**



**Abb. 40p: cis-Phenothrin**



**Abb. 40q: trans-Phenothrin**

**Abb. 40r: cis-Permethrin**

Die UV-Spektren der Pyrethroide sind sich bis auf das des Allethrins sehr ähnlich und daher wenig charakteristisch. Besser unterscheiden lassen sich die Organophosphate, Propoxur, Diflubenzuron und Piperonylbutoxid.

#### **4.2.3.3 *Arbeitsbereich und Linearität***

Der Arbeitsbereich der Methode erstreckt sich von 0,1 bis 100 µg/ml. Es werden lineare Kalibrierfunktionen mit hervorragenden Korrelationskoeffizienten  $\geq 0,9998$  erhalten (**Tabelle 20**). Aufgrund der geringen Streuung der Messpunkte um die Regressionsgerade wird auf eine graphische Darstellung verzichtet. Zwei Cyfluthrinisomere (a+b) wurden nicht aufgetrennt und daher gemeinsam bestimmt.

Die Kalibrierfunktionen ändern sich über einen längeren Zeitraum hinweg kaum, wenn die HPLC-Anlage ständig in Benutzung ist. Vor jeder Probenserie wurde ein Kontrollstandard gemessen und bei Abweichung  $> 5\%$  von der Sollkonzentration eine neue Kalibrierung erstellt. Für die HPLC-Messung der Hausstaubextrakte ist es nicht

nötig, in der Matrix zu kalibrieren. Starke Überbefunde wie bei den GC-Messungen wurden nicht beobachtet.

**Tabelle 20:** Daten der linearen HPLC-Kalibrierfunktionen  $F = A_1 \cdot C + A_0$  mit der Steigung  $A_1$ , dem Achsenabschnitt  $A_0$  und dem Korrelationskoeffizienten  $r^2$ ;  $F$ : Peakfläche;  $C$ : Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$ ; Kalibrierkonzentrationen: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Wirkstoff	$A_1$	$A_0$	$r^2$
Dichlorvos	37900	-701	1,000000
Propoxur	218000	-8970	0,999999
Malathion	51500	5170	0,999991
Diflubenzuron	252000	9800	0,999993
Fenitrothion	148000	-4110	0,999989
Fenthion	155000	9630	0,999991
Diazinon	83300	-7240	0,999943
Piperonylbutoxid	55800	-532	0,999995
cis-Allethrin	65000	-12700	0,999775
trans-Allethrin	260000	-34300	0,999825
Chlorpyrifos	139000	-9980	0,999948
Cyfluthrin a+b	191000	-18000	0,999998
Cyfluthrin c	54500	11900	0,999898
Cyfluthrin d	102000	-25900	0,999975
Resmethrin	322000	-24500	0,999975
Deltamethrin	355000	-33900	0,999996
trans-Permethrin	294000	-31000	0,999972
cis-Phenothrin	79200	-13500	0,999883
trans-Phenothrin	274000	-20000	0,999986
cis-Permethrin	94500	-23600	0,999786

#### 4.2.3.4 Wiederfindungen bei Aufreinigung mit Kieselgel-SPE-Kartuschen

##### Wiederfindungsraten mit Standardlösungen

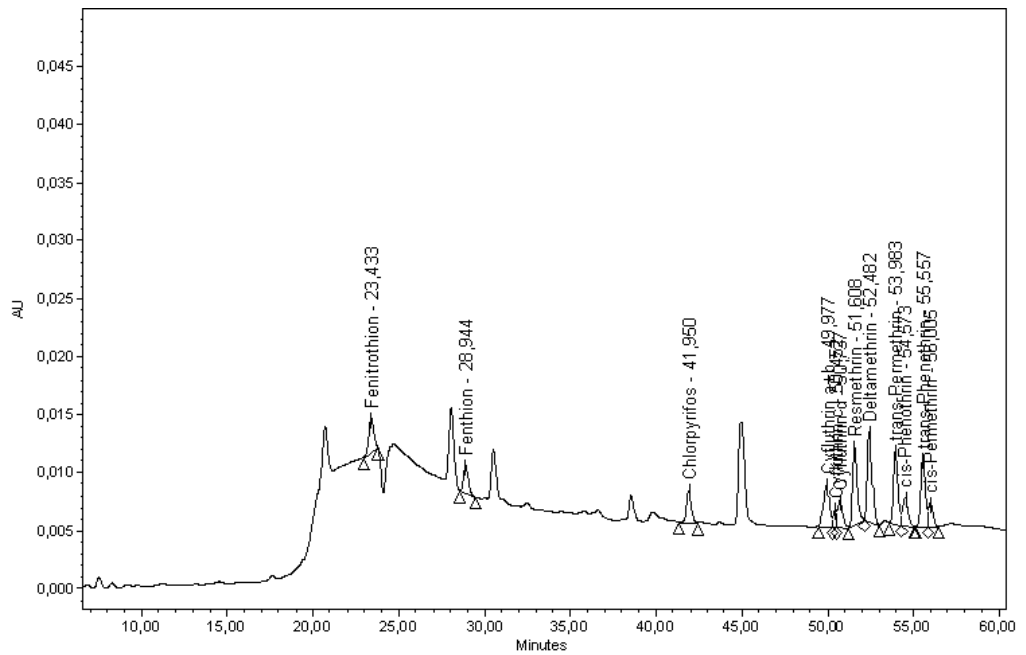
Die Wiederfindungsraten mit Standardlösungen sind in **Tabelle 21** aufgeführt und repräsentieren die komplementären Werte zu den Ergebnissen aus den GC-Messungen in Tabelle 17 (Kapitel 4.2.2.4). Für die mit der HPLC-Methode untersuchten Verbindungen ergeben sich Wiederfindungen zwischen 80 bis 120 Prozent. Die relativen Standardabweichungen sind in der Regel im Vergleich zu denen der GC-Messungen niedriger. Eine Ausnahme bildet Dichlorvos. Die Wiederfindungen sind noch geringer als bei den GC-Messungen, was durch das zusätzliche Einengen mit Stickstoff und Aufnahmen in

Acetonitril für die HPLC-Messung bedingt ist. Ansonsten sind die Wiederfindungen mit denen der GC-Messungen in etwa vergleichbar ( $\pm 15\%$ ).

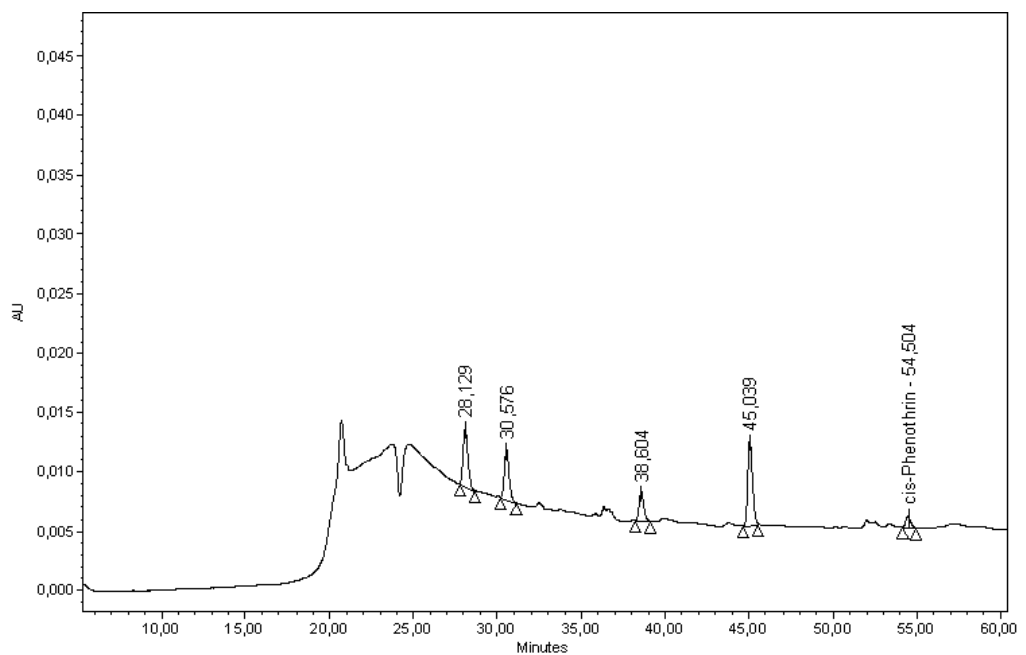
**Tabelle 21:** Wiederfindungen in Prozent ( $\pm$  relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Standardlösungen auf Kieselgelkartuschen; Beladung der Kartusche: 10  $\mu\text{g}$  je Wirkstoff (Level 1) und 1  $\mu\text{g}$  je Wirkstoff (Level 2). Messung mit HPLC-DAD.

Wirkstoffe	Level 1 (n = 5)	Level 2 (n = 4)
Eluat A, Wiederfindung [%]		
Fenitrothion	89 $\pm$ 2,7	109 $\pm$ 5,4
Fenthion	78 $\pm$ 2,9	90 $\pm$ 5,3
Chlorpyrifos	88 $\pm$ 2,6	105 $\pm$ 2,5
Cyfluthrin a+b	86 $\pm$ 1,7	107 $\pm$ 2,7
Cyfluthrin c	86 $\pm$ 3,4	105 $\pm$ 3,1
Cyfluthrin d	87 $\pm$ 4,2	119 $\pm$ 2,9
Resmethrin	88 $\pm$ 2,7	99 $\pm$ 2,8
Deltamethrin	89 $\pm$ 3,9	105 $\pm$ 2,9
trans-Permethrin	90 $\pm$ 2,7	105 $\pm$ 3,4
cis-Phenothrin	90 $\pm$ 2,7	91 $\pm$ 11,7
trans-Phenothrin	91 $\pm$ 2,4	107 $\pm$ 3,1
cis-Permethrin	103 $\pm$ 0,0	102 $\pm$ 3,5
Eluat B, Wiederfindung [%]		
Dichlorvos	15 $\pm$ 51,0	27 $\pm$ 34,5
Propoxur	91 $\pm$ 0,6	110 $\pm$ 6,9
Malathion	94 $\pm$ 0,8	103 $\pm$ 7,3
Diflubenzuron	86 $\pm$ 11,3	105 $\pm$ 2,4
Diazinon	92 $\pm$ 1,4	95 $\pm$ 5,5
Piperonylbutoxid	93 $\pm$ 0,9	106 $\pm$ 2,4
cis-Allethrin	94 $\pm$ 0,8	117 $\pm$ 3,2
trans-Allethrin	93 $\pm$ 0,6	104 $\pm$ 3,0

Beispielchromatogramme sind in den **Abb. 41-44** dargestellt. Der Anstieg der Basisline zwischen 20 und 27 min beruht auf der automatischen Kompensation des Säulenvordrucks wegen Änderung der Mischungsverhältnisse im tertiären Gradienten.

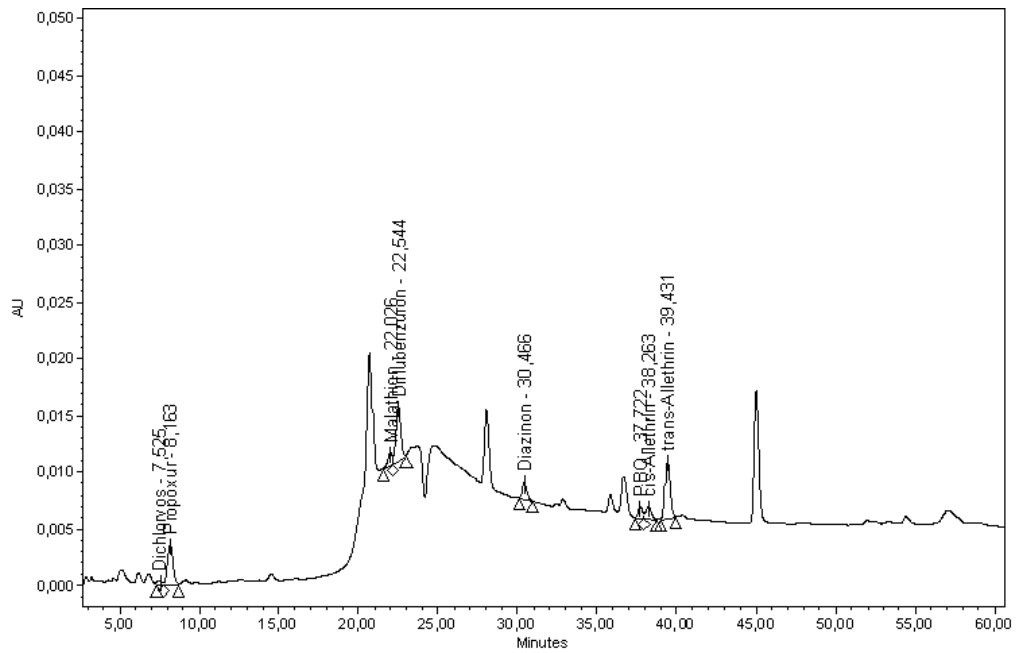


**Abb. 41:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Standards (1 µg/ml).

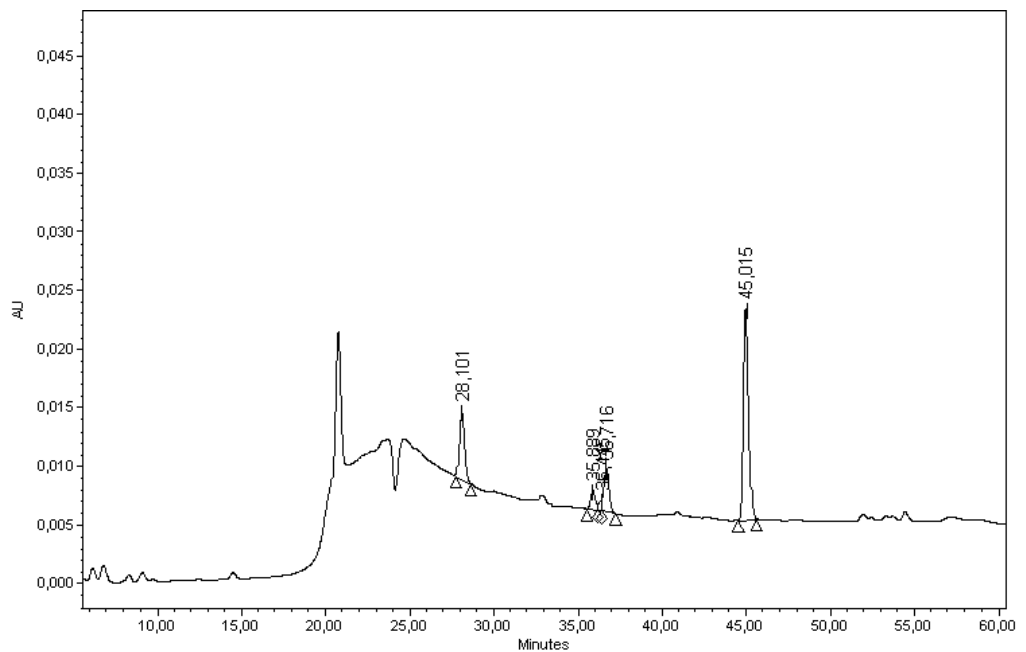


**Abb. 42:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Reagenzienleerwertes. Beachte Leerwert cis-Phenothrin.





**Abb. 43:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Standards (1 µg/ml).



**Abb. 44:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Reagenzienleerwertes.

### Wiederfindungsraten mit dotiertem Hausstaub

Die Wiederfindungsraten mit dotiertem Hausstaub sind in **Tabelle 22** aufgeführt und repräsentieren die komplementären Werte zu den Ergebnissen aus den GC-Messungen in Tabelle 18 (Kapitel 4.2.2.4).

Level 3 (Dotierung 1 µg je Wirkstoff/g Hausstaub) konnte mit der HPLC nicht mehr gemessen werden, da die Methode hierfür nicht empfindlich genug bzw. die UV-Detektion nicht spezifisch genug ist.

**Tabelle 22:** Wiederfindungen in Prozent ( $\pm$  relative Standardabweichungen) bei Aufgabe von Extrakten dotierter Hausstäube auf Kieselgelkartuschen; Level 1: 100 µg/g; Level 2: 10 µg/g. Messung mit HPLC-DAD.

Wirkstoffe	Level 1 (n = 5)	Level 2 (n = 4)
Eluat A, Wiederfindung [%]		
Fenitrothion	94 $\pm$ 3,8	102 $\pm$ 4,8
Fenthion	80 $\pm$ 3,0	90 $\pm$ 2,8
Chlorpyrifos	90 $\pm$ 3,4	89 $\pm$ 1,3
Cyfluthrin a+b	92 $\pm$ 3,8	89 $\pm$ 2,8
Cyfluthrin c	93 $\pm$ 5,0	94 $\pm$ 6,9
Cyfluthrin d	91 $\pm$ 3,7	103 $\pm$ 2,6
Resmethrin	7 $\pm$ 19,6	8 $\pm$ 27,6
Deltamethrin	85 $\pm$ 4,0	77 $\pm$ 1,4
trans-Permethrin	88 $\pm$ 5,0	88 $\pm$ 1,3
cis-Phenothrin	84 $\pm$ 5,1	99 $\pm$ 2,5
trans-Phenothrin	86 $\pm$ 7,1	97 $\pm$ 1,7
cis-Permethrin	78 $\pm$ 14,5	116 $\pm$ 0,7
Eluat B, Wiederfindung [%]		
Dichlorvos	49 $\pm$ 8,6	44 $\pm$ 17,1
Propoxur	96 $\pm$ 1,6	84 $\pm$ 7,5
Malathion	97 $\pm$ 2,9	75 $\pm$ 4,1
Diflubenzuron	97 $\pm$ 1,5	98 $\pm$ 1,8
Diazinon	88 $\pm$ 2,0	83 $\pm$ 11,0
Piperonylbutoxid	92 $\pm$ 1,5	71 $\pm$ 15,0
cis-Allethrin	86 $\pm$ 1,5	49 $\pm$ 14,3
trans-Allethrin	95 $\pm$ 1,4	65 $\pm$ 5,0

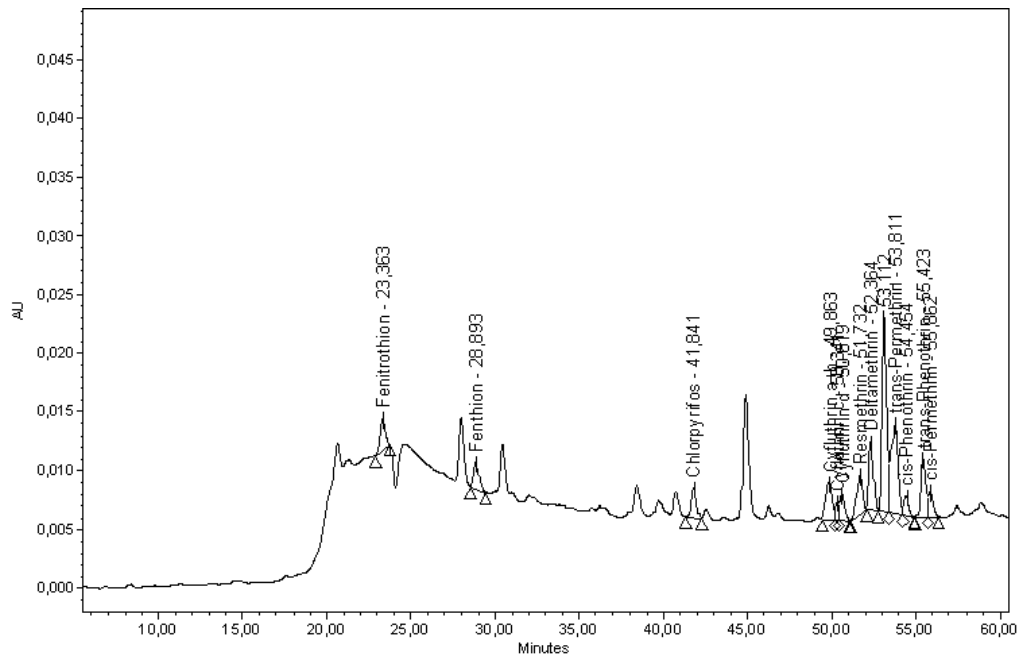
Bei Dotierungen von 100 µg je Wirkstoff/g Hausstaub (Level 1) ergeben sich beim Vermessen der Extrakte mittels HPLC in der Regel Wiederfindungen zwischen 80-97 % (Ausnahme: Dichlorvos und Resmethrin). Damit sind diese Werte vergleichbar mit den mittels GC bestimmten Ergebnissen, allerdings sind die relativen Standardabweichungen mit überwiegend 1-5 % deutlich besser. Wie die guten Wiederfindungsraten für Diflubenzuron zeigen (97 %) lässt sich dieser Wirkstoff mit der HPLC problemlos bestimmen, wogegen er mit der GC nur über 2,6-Difluorbenzamid befriedigend bestimmt werden kann.

Bei Level 2 (Dotierung 10 µg/g) zeigt sich für das Eluat A ein ähnliches Bild (Wiederfindungen 77-116 %). Für Eluat B dagegen sind die Wiederfindungen im Vergleich zu den GC-Messungen deutlich geringer und die Werte streuen mehr als bei Eluat A. Die Wiederfindungen für Allethrin sind bei dieser geringen Dotierung unbefriedigend. Wie aus den HPLC-Chromatogrammen (siehe Abb. 49/50) ersichtlich, enthält Eluat B noch viele Matrixbestandteile, da es, wie bereits erwähnt, schwierig ist, diese von den relativ polaren Analyten mit einer säulenchromatographischen Aufreinigung (z.B. Kieselgel-Kartuschen) abzutrennen. Da es auch in der HPLC-Trennung trotz Methodenoptimierung nicht immer möglich ist, eine Koelution (Peaküberlagerung mit Matrixkomponenten) auszuschließen, wird es aus diesem Grunde bei einer Dotierung von 10 µg/g Hausstaub schwierig, die Wirkstoffe Allethrin, Piperonylbutoxid und Malathion von den Matrixkomponenten mittels UV-Detektion zu unterscheiden (Piperonylbutoxid weist charakteristische UV-Maxima im längerwelligen Bereich auf, weshalb eventuell auf eine andere Detektionswellenlänge ausgewichen werden kann). Für die genannten Wirkstoffe liegt dieses Dotierungsniveau nur wenig oberhalb der Bestimmungsgrenze (siehe Kapitel 4.2.3.5).

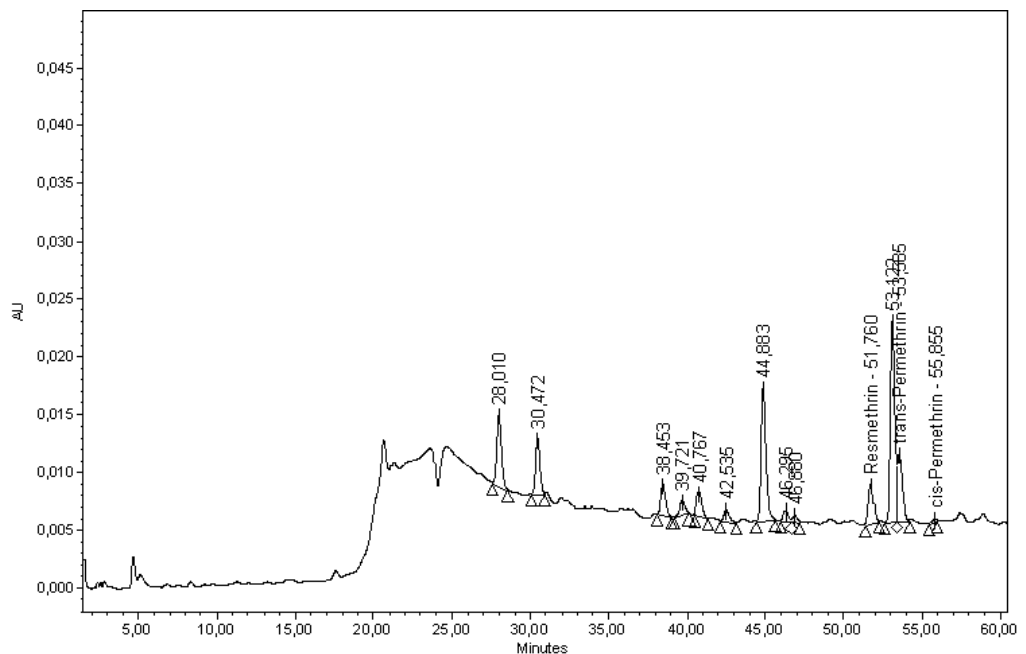
Für Dichlorvos wurden bei allen Messungen etwas geringere Wiederfindungsraten (44-49 %) als bei den GC-Messungen beobachtet, die möglichen Gründe hierfür wurden bereits erwähnt.

Resmethrin lässt sich, vergleichbar mit den Ergebnissen der GC-Messungen, auch mittels HPLC-Messung praktisch nicht wiederfinden. Da der Befund also unabhängig von der Meßmethode ist, lässt sich vermuten, dass Wechselwirkungen mit der Hausstaubmatrix die Extraktion dieses Wirkstoffes verhindern.

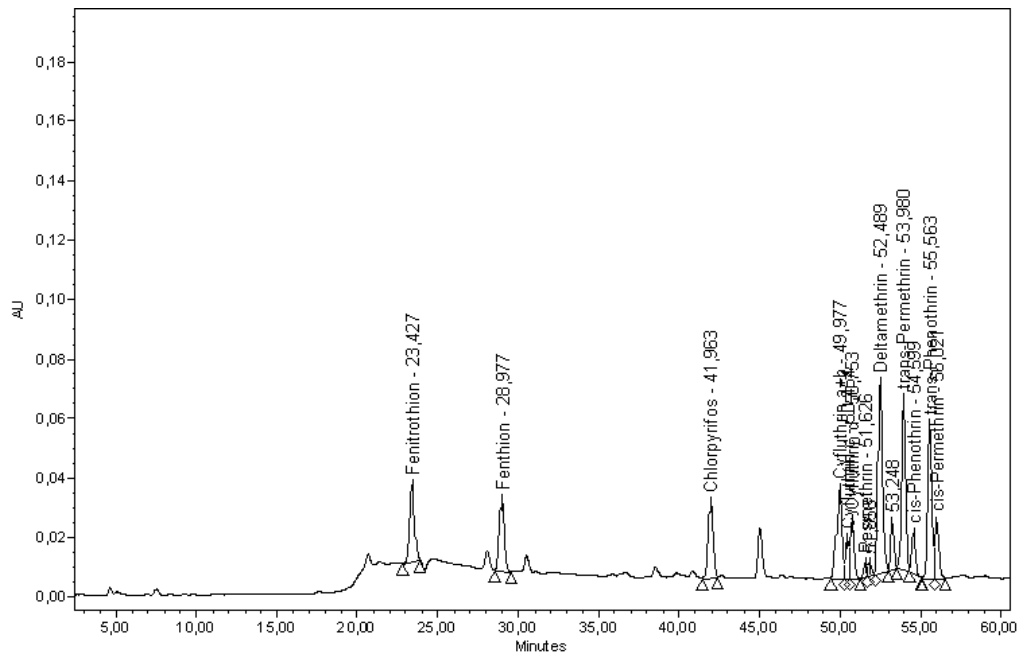
Beispielchromatogramme sind in dem **Abb. 45-52** dargestellt.



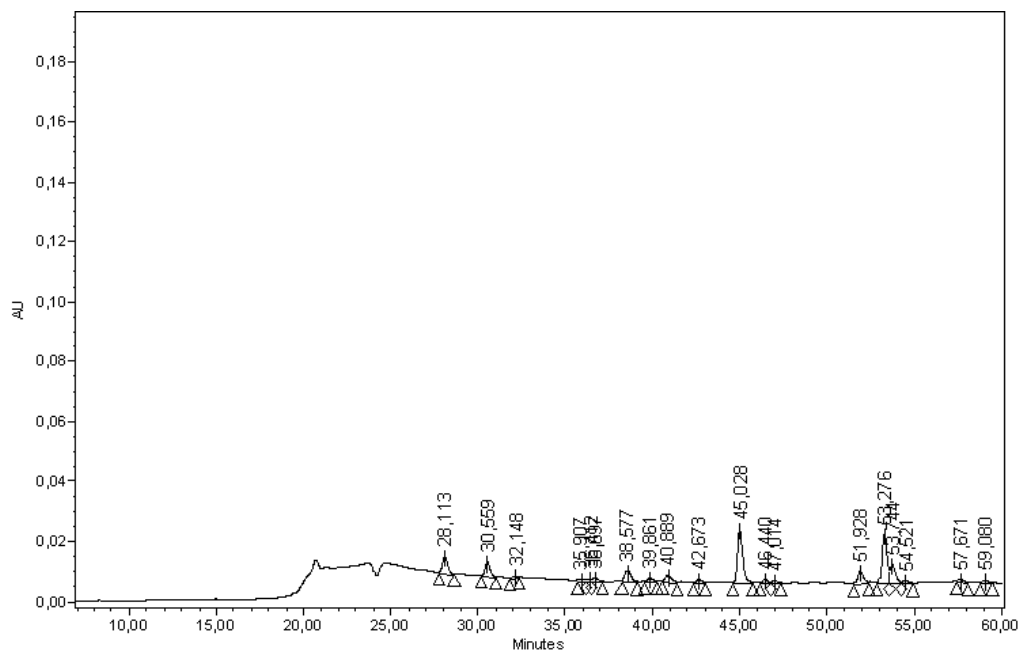
**Abb. 45:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).



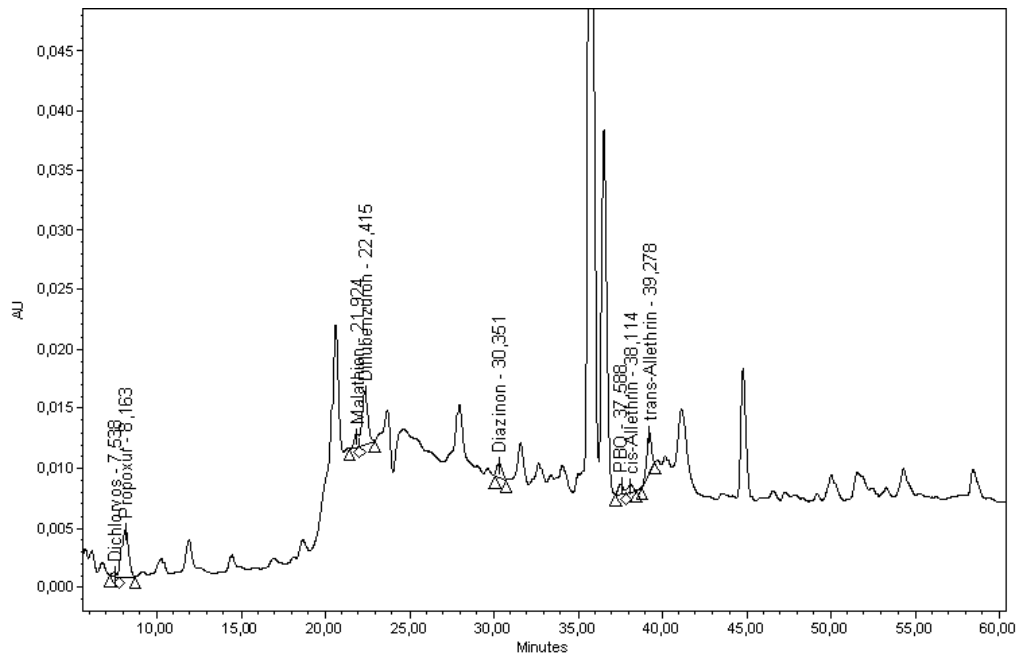
**Abb. 46:** zu Abb. 45. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Hausstaub-Leerwertes. Beachte Leerwerte für Resmethrin und Permethrin.



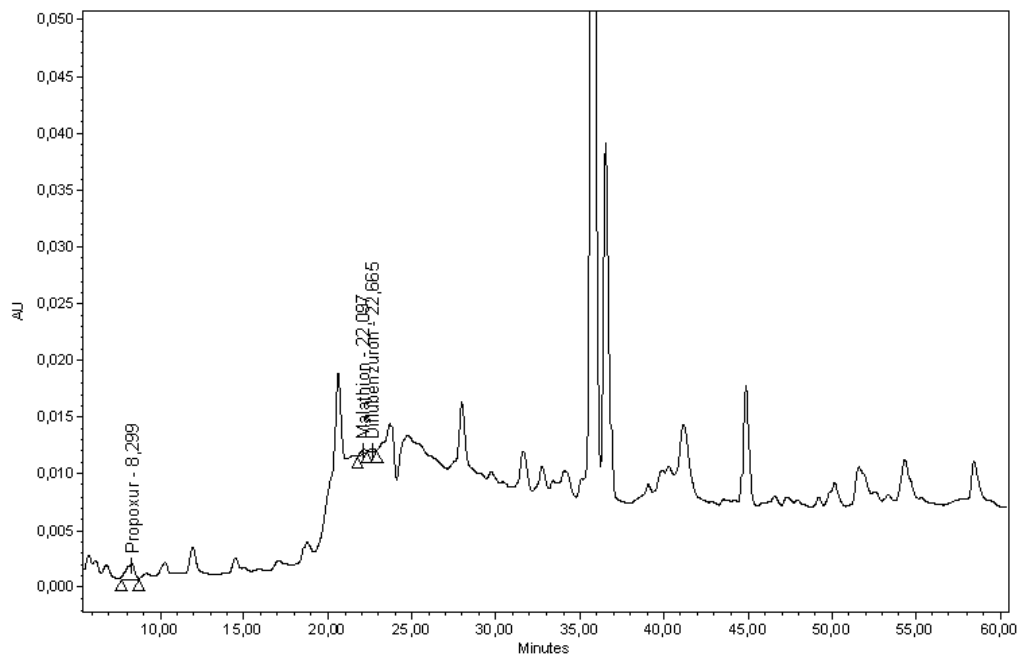
**Abb. 47:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines dotierten Hausstaubes (100 µg/g).



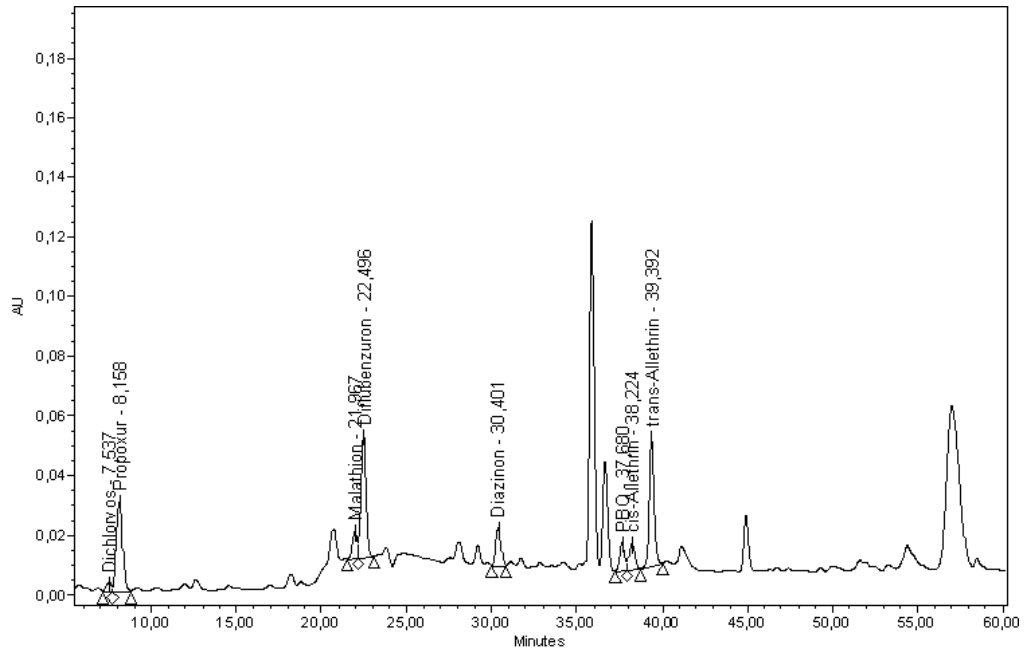
**Abb. 48:** zu Abb. 47. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat A eines Hausstaub-Leerwertes. Beachte Leerwerte für Resmethrin (51,928 min) und Permethrin (53,744 min).



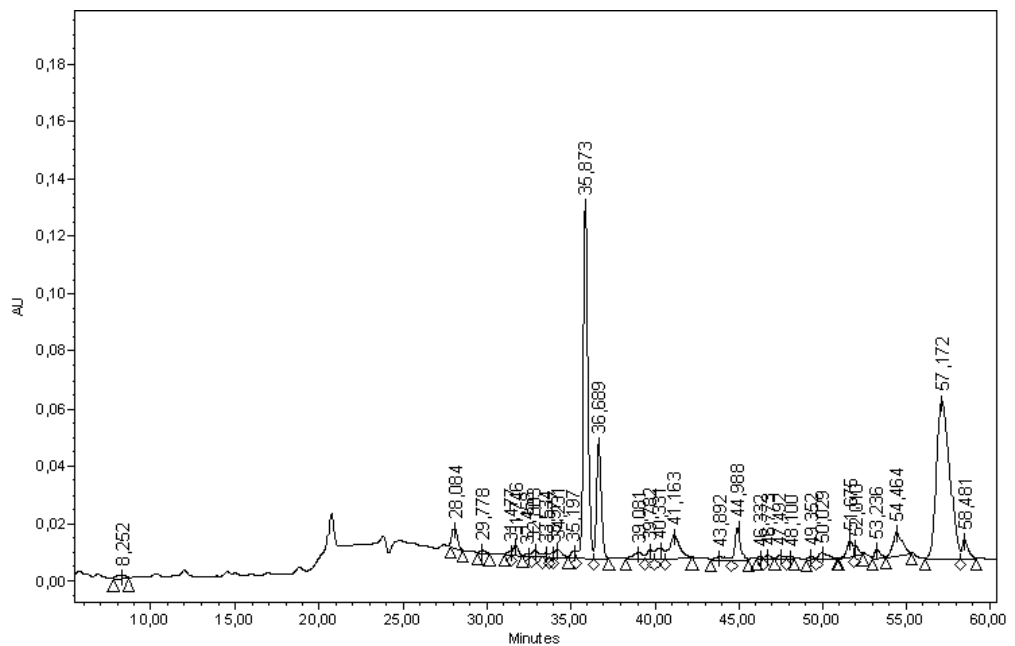
**Abb. 49:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (10 µg/g).



**Abb. 50:** zu Abb. 49. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Hausstaub-Leerwertes. Beachte Leerwerte für Propoxur, Malathion und Diflubenzuron.



**Abb. 51:** HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines dotierten Hausstaubes (100 µg/g).



**Abb. 52:** zu Abb. 51. HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenraum-insektiziden und -akariziden im Hausstaub. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm von Eluat B eines Hausstaub-Leerwertes. Beachte Leerwert für Propoxur (8,252 min).

#### 4.2.3.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die instrumentellen Nachweisgrenzen wurden durch Standardverdünnung abgeschätzt (S/N-Verhältnis = 3, Werte siehe **Tabelle 23**).

**Tabelle 23:** Instrumentelle Nachweisgrenzen der HPLC-Methode. Angaben in Nanogramm (Absolutwerte).

Wirkstoffe Eluat A	ng absolut	Wirkstoffe Eluat B	ng absolut
Fenitrothion	2,0	Dichlorvos	2,5
Fenthion	2,0	Propoxur	1,5
Chlorpyrifos	1,5	Malathion	2,5
Cyfluthrin a+b	1,5	Diflubenzuron	2,5
Cyfluthrin c	2,5	Diazinon	2,5
Cyfluthrin d	2,0	PBO	3,5
Resmethrin	1,5	cis-Allethrin	3,5
Deltamethrin	1,5	trans-Allethrin	1,5
trans-Permethrin	1,5		
cis-Phenothrin	2,5		
trans-Phenothrin	1,5		
cis-Permethrin	2,5		

Bei einem Injektionsvolumen von 20 µl bewegen sich die Nachweisgrenzen also im Bereich von ca. 0,1 bis 0,2 µg/ml.

Die Nachweisgrenzen für die Wirkstoffe im Hausstaub liegen bei etwa 0,5 bis 5 µg/g (S/N-Verhältnis = 3, siehe **Tabelle 24**).

**Tabelle 24:** Nachweisgrenzen der HPLC-Methode für die Hausstaubeluat A und B. Angaben in µg/g Hausstaub.

Wirkstoffe Eluat A	µg/g	Wirkstoffe Eluat B	µg/g
Fenitrothion	0,5	Dichlorvos	1,8
Fenthion	0,5	Propoxur	1,2
Chlorpyrifos	0,4	Malathion	1,9
Cyfluthrin a+b	0,5	Diflubenzuron	0,6
Cyfluthrin c	1,3	Diazinon	0,8
Cyfluthrin d	0,7	PBO	4,2
Resmethrin	-	cis-Allethrin	4,8
Deltamethrin	0,9	trans-Allethrin	2,5
trans-Permethrin	4,8		
cis-Phenothrin	1,1		
trans-Phenothrin	0,5		
cis-Permethrin	1,0		



Es können Nachweisgrenzen von 0,5 bis 1 µg/g erreicht werden, wenn die Signale der Analyten nicht durch Störkomponenten aus der Hausstaubmatrix beeinflusst werden. Sowohl für die unempfindlicheren Wirkstoffe bzw. Isomere als auch für diejenigen Analyten, für die Leerwerte gefunden wurden, liegen die Nachweisgrenzen bis zu fünfmal höher. Als Bestimmungsgrenzen wurden entsprechend die doppelten Werte festgesetzt.

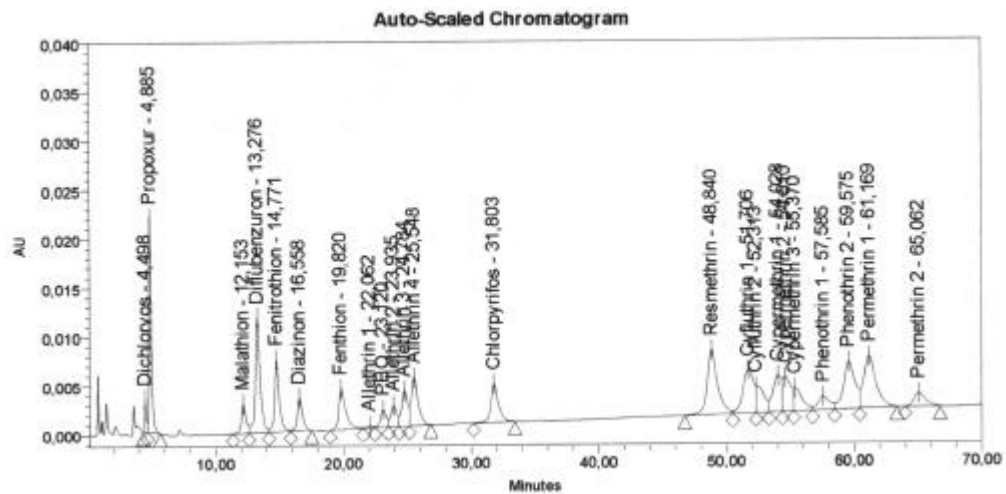
#### **4.2.3.6 *Robustheit und Spezifität der Methode***

Im Vergleich zur GC-Messung ist die HPLC-Methode sehr robust. Es werden keine Überbefunde festgestellt, die Kalibrierung ist stabil und die relativen Standardabweichungen sind gering. Wie in Kapitel 3.2.3.2 Punkt c) erwähnt, muss bei Messung von mehreren Eluaten A hintereinander nach jeder Probe ein Lösemittellauf durchgeführt bzw. ca. 15 min mit 100 % Acetonitril gespült werden, da ansonsten cis-Permethrin wegen Überlagerung mit einem Matrixpeak (57,2 min, vgl. Abb. 52) nicht bestimmt werden kann. Generell muss erwähnt werden, dass die HPLC-Methode sehr unspezifisch ist. Im Vergleich zur GC-MS-Methode ist häufiger mit falsch positiven Befunden aufgrund koeluierender Matrixbestandteile zu rechnen. Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, die UV-Spektren der Analyten auf Überlagerungen mit UV-adsorbierenden Matrixkomponenten zu prüfen.

#### **4.2.3.7 *HPLC-Methode mit Calixaren-Trennsäulen***

Im Zuge der Optimierung der HPLC-Trennung wurden weiterhin neuartige analytische Säulen mit Calixaren-modifizierten Kieselgelen (siehe Kapitel 2.4.3 und 3.2.3.3) getestet. Durch den speziellen Trennmechanismus wurde insbesondere für die in ihrer chemischen Struktur sehr ähnlichen Pyrethroide eine verbesserte Auftrennung erwartet. Je nach Typ der Caltrex-Säule (Größe der Calix, mit oder ohne Alkylrest) ergaben sich dabei unterschiedliche Elutionsfolgen und damit Selektivitäten für die Analyten. Das beste Ergebnis wurde mit einer Caltrex Science Säule erzielt, welche ein Säulenmaterial mit

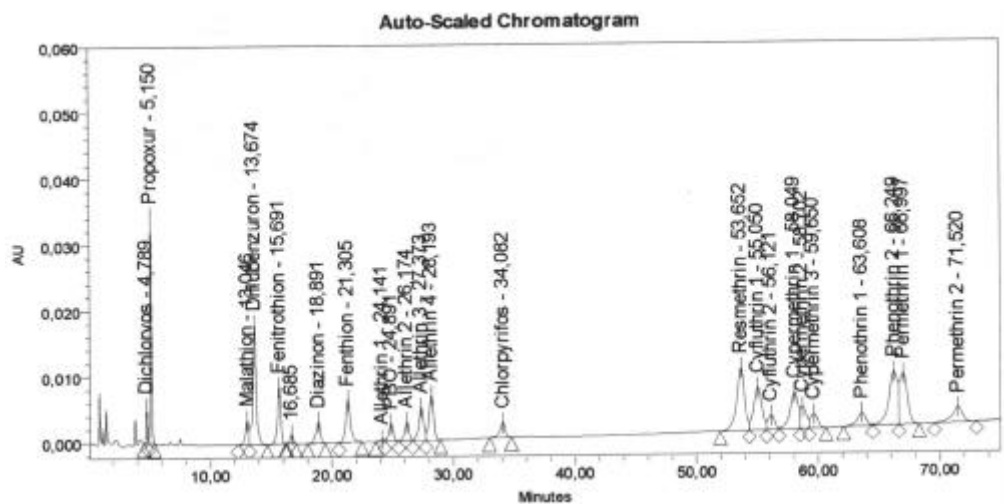
einer Mischung aller Calixarentypen enthält. Es konnten gleich viele Wirkstoffe wie auf der Nucleosil RP18 Säule mit befriedigender Auflösung ( $R \geq 1$ ) getrennt werden (**Abb. 53**).



**Abb. 53:** HPLC-DAD Methode mit Calixaren-Trennsäulen. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm einer Standardlösung (10 µg/ml); Säule: Caltrex Science; PBO: Piperonylbutoxid.

Als überraschend positives Ergebnis konnten auf der Caltrex-Science Säule Cyfluthrin und Cypermethrin voneinander getrennt werden (und Allethrin wird in vier Isomerenpaare aufgetrennt), was mit herkömmlichen Reversed Phase Materialien nicht gelang. Bemerkenswert ist dieses insoweit, da sich Cyfluthrin nur in einem einzigen zusätzlichen Fluoratom vom Cypermethrin unterscheidet (vgl. Abb. 1). Hierin wird auch der zu den RP 18 Säulen unterschiedliche Trennmechanismus (Moleküle diffundieren in die kelchartige Struktur) deutlich. Da dieser Diffusionsmechanismus aber relativ langsam ist und deswegen die Einstellung der Gleichgewichtszustände zwischen mobiler und stationärer Phase relativ lange dauert, resultieren daraus Peaks mit relativ hohen Basisbreiten. Dies und der Umstand, dass die Caltrex-Säulen zur Zeit nur mit 5 µm Partikeln erhältlich sind (während die Nucleosil Säule mit 3 µm Partikeln gepackt ist), sind die Gründe dafür, warum keine bessere Trennung erreicht wurde. Die Verwendung von Methanol im Lösemittelgradienten diente nicht nur zur Verbesserung der Trennung, sondern verhinderte auch ein durch freie Silanolgruppen im Trägermaterial verursachtes Peak tailing, welches andernfalls nur

durch Verwendung eines sauren Puffers hätte vermieden werden können. Die Auftrennung von Cyfluthrin und Cypermethrin konnte durch Verwendung einer Caltrex B I Säule (viergliedrige Calixarene ohne Alkylrest; n = 1; R = H; vgl. Abb. 13) noch verbessert werden (**Abb. 54**).



**Abb. 54:** HPLC-DAD Methode mit Calixaren-Trennsäulen. HPLC-UV (220 nm) Chromatogramm einer Standardlösung (10 µg/ml); Säule: Caltrex B I; PBO: Piperonylbutoxid.

Allerdings wird dann die Auftrennung von Phenothrin und Permethrin schlechter. Muss Phenothrin nicht bestimmt werden, können stattdessen Fenvalerat oder Deltamethrin, welche genau zwischen Cyfluthrin und Permethrin eluieren, mit guter Auflösung getrennt werden. Insgesamt kann also eine der beiden Caltrex Säulen eine Alternative zur Nucleosil Säule sein, insbesondere, wenn Cyfluthrin und Cypermethrin nebeneinander mit HPLC bestimmt werden sollen. Um aber eine noch bessere Trennleistung zu erreichen, was notwendig ist, um die Wirkstoffe auch in matrixbelasteten Proben messen zu können, sollte eine Caltrex Säule mit 3 µm Material eingesetzt werden. Eine solche Säule befindet sich beim Hersteller noch in der Entwicklungsphase.

#### **4.2.4 Alternative Extraktion in der Soxhlet-Apparatur**

Im Rahmen der Untersuchungen wurde neben der Ultraschallextraktion von Hausstaubproben die Extraktion im Soxhlet in Erwägung gezogen. Wegen der bei dieser Methode auftretenden thermischen Belastung wurden für die zu untersuchenden Wirkstoffe sowohl Stabilitätsversuche mit reinen Standardlösungen als auch Wiederfindungsversuche mit dotiertem Hausstaub analog der bereits geschilderten Experimente (Kapitel 4.2.2.4 und 4.2.3.4) durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Wirkstoffe Resmethrin (50 % Verlust) und Fenthion (100% Verlust) bereits in Standardlösungen als instabil (Extraktionsdauer 4-5 Stunden, 100 Zyklen). Die Ergebnisse der Wiederfindungen bei dotierten Hausstäuben waren in etwa vergleichbar mit denen der Ultraschallextraktion (sowohl für GC- als auch HPLC-Messungen), so dass auf eine detaillierte Darstellung verzichtet wird. Allerdings waren die relativen Standardabweichungen in der GC mit 10-20 % deutlich höher als bei der Messung der entsprechenden aufgereinigten Ultraschallextrakte (Kapitel 4.2.2.4), da durch die Heißextraktion mehr Matrixbestandteile in die Probelösung gelangten. Abweichend von der Ultraschallextraktion wurden die beiden Fragmentmoleküle des Diflubenzurons bei den GC-Messungen nur noch teilweise wiedergefunden (40-70 %), so dass hier eine Bestimmung des Diflubenzurons über p-Chlorbenzolisocyanat bzw. 2,6-Difluorbenzamid kaum noch möglich ist. Insgesamt ist die Soxhletextraktion zwar weniger arbeitsaufwendig, hat aber die genannten Nachteile gegenüber der Extraktion im Ultraschallbad.

#### **4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub**

Es wurde sowohl eine GC-MS Methode als auch eine HPLC-DAD Methode zur Bestimmung von Innenrauminsektiziden und -akariziden im Hausstaub entwickelt. Die Untersuchungen wurden auf 15 Verbindungen beschränkt, da mit der HPLC-Methode nur diese Wirkstoffe aufgetrennt werden konnten. Für beide Methoden wurden die Hausstaubextrakte mittels Kieselgel-SPE-Kartuschen aufgereinigt. Die entwickelte Aufreinigungsmethode erlaubte eine effektive Elution der Wirkstoffe in zwei Fraktionen A

und B mit guten Wiederfindungsraten (mit Ausnahme von Resmethrin und Dichlorvos). Die Fraktion A enthielt die unpolare und Fraktion B die polare Wirkstoffe. Die polare Wirkstoffe mussten mit Lösemitteln höherer Elutionskraft von der SPE-Kartusche eluiert werden, wodurch es zu einem höheren Anteil an Matrixbestandteilen im Eluat B kam, was für die nachfolgende Messung der Analyten nicht immer optimal war, insbesondere bei der HPLC-Methode. Durch Verwendung der GC-MS Methode, die sehr selektiv ist, lassen sich die zu untersuchenden Wirkstoffe jedoch sicher bestimmen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die gute Nachweisempfindlichkeit mit 0,01 bis 0,8 µg je Wirkstoff/g Hausstaub. Allerdings ist die GC-MS-Methode aufgrund ihrer geringen Robustheit sehr arbeitsaufwendig (Kalibrierung in der Matrix, regelmäßige Systemtests zwischen Probenserien und evtl. Neukalibrierung). Die HPLC-DAD Methode ist dagegen sehr robust, es kann eine große Anzahl von Proben in Serie gemessen werden. Der Nachteil liegt hier in der unspezifischen UV-Detektion. Bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors werden zwar die UV-Spektren der Analyten als weitere Information zusätzlich zur Retentionszeit erhalten, aber diese sind nur bei den Organophosphaten relativ aussagekräftig. Die UV-Spektren der Pyrethroide sind einander sehr ähnlich (außer Allethrin), weshalb eine Unterscheidung auch mit dem DAD kaum möglich ist. Außerdem liegen bei dieser Detektionsart die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen recht hoch, so dass die HPLC Methode nur bei relativ hohen Wirkstoffkonzentrationen ab 0,5 bis 5 µg/g praktikabel erscheint. Um eine höhere Empfindlichkeit bei gleichzeitig besserer Selektivität zu erreichen, sollte die HPLC, gekoppelt mit einem MS-Detektor (APCI- oder Elektrospray-Ionenquelle), die Methode der Wahl sein. Außerdem lassen sich durch Einsatz spezieller Trennsäulen, wie am Beispiel der Calixarene gezeigt, auch in der HPLC chemisch sehr ähnliche Verbindungen nebeneinander bestimmen, was ansonsten nur mit der GC möglich ist.

### **4.3 Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA**

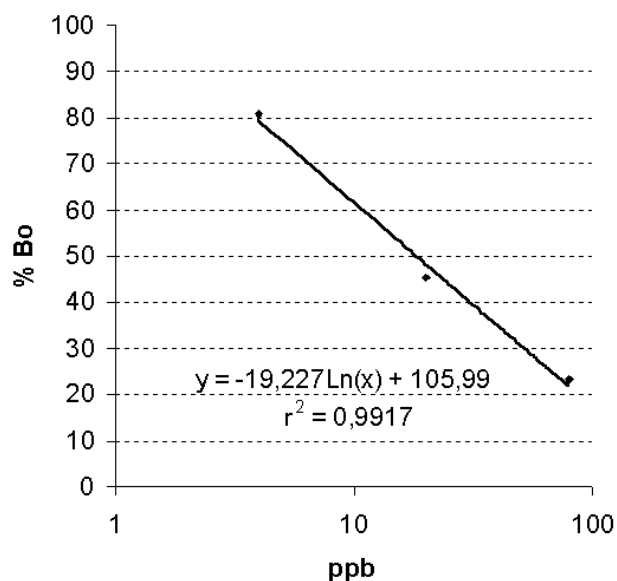
Um die Tauglichkeit einer immunologischen Methode zur Bestimmung von Pyrethroiden in der Luft und im Hausstaub zu prüfen, wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Test, wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben, zur Bestimmung der Typ II Pyrethroide (Cyfluthrin und Deltamethrin) in der Luft und im Hausstaub eingesetzt. Für Vergleichsmessungen wurden die Wirkstoffe mittels GC-MS (Kapitel 3.2.1 bzw. 3.2.2) bestimmt.

#### **4.3.1 Messung von Pyrethroiden in Luftprobenextrakten**

Die Ergebnisse der vergleichenden Messungen an Luftprobenextrakten sind in **Tabelle 25** dargestellt. Ein Beispiel für eine Kalibrierfunktion, wie sie mit dem ELISA für Cyfluthrin erhalten wurde, zeigt **Abb. 55**. Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, stimmen die Ergebnisse, die mittels ELISA bzw. GC-MS ermittelt wurden, gut überein und entsprechen den Dotierungen. Das heißt also, dass auch mit dem ELISA eine quantitative Bestimmung der ausgewählten Typ II Pyrethroide in den Luftprobenextrakten möglich ist, wenn auch mit geringerer Genauigkeit als mit GC-MS. Dabei ist der ELISA für diese Stoffe um den Faktor 10 empfindlicher (Nachweisgrenze 0,1 bis 0,3 ng/m<sup>3</sup>) als die GC-MS-Methode. Allerdings kann der ELISA die beiden Wirkstoffe nur als Summe erfassen.

**Tabelle 25:** Pyrethroidkonzentrationen in dotierten Luftprobenextrakten, Angaben entsprechend einer Konzentration in ng/m<sup>3</sup> Luft. Messung mit ELISA und GC-MS.

Wirkstoff	Dotierung	ELISA	GC-MS
Cyfluthrin	14	14,4	13,2
Cyfluthrin	28	23,2	26,8
Cyfluthrin + Deltamethrin	14	25,6	14,4
	14		13,6



**Abb. 55:** Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin mittels ELISA; Kalibrierfunktion für Cyfluthrin.

#### 4.3.2 Messung von Pyrethroiden in Hausstaubprobenextrakten

Die Ergebnisse der vergleichenden Messungen an Hausstaubextrakten sind in **Tabelle 26** dargestellt.

**Tabelle 26:** Pyrethroidkonzentrationen in dotierten Hausstaubprobenextrakten. Werte in Klammern: Dotierung eines verdünnten Hausstaubextraktes (Faktor 20). Angaben entsprechend einer Konzentration in  $\mu\text{g/g}$  Hausstaub. Messung mit ELISA und GC-MS.

Wirkstoff	Dotierung	ELISA	GC-MS
Cyfluthrin	0,35	0,54 (0,39)	0,34
Cyfluthrin	0,70	0,95 (0,69)	0,72
Cyfluthrin + Deltamethrin	0,35 0,35	0,91 (0,60)	0,29 0,33
Permethrin	1,0	0,4	1,1
Permethrin	3,5	2,1	4,2
Permethrin	7,0	4,9	6,2

Während die GC-MS Messungen durchweg eine gute Übereinstimmung mit den dotierten Sollkonzentrationen ergeben, kommt es zu Überbefunden für Cyfluthrin und Deltamethrin (30-55 %) beim ELISA (trotz

Leerwertkorrektur). Dies sollte auf die höhere Matrixbelastung (nicht aufgereinigter Hausstaubextrakt) zurückzuführen sein. Wird hingegen das Typ I Pyrethroid Permethrin mit dem ELISA gemessen, so werden Minderbefunde festgestellt. Um den Einfluss der Hausstaubmatrix auf das Ergebnis des ELISA-Tests näher zu untersuchen, wurde zur Reduzierung des Matrixeffektes ein um den Faktor 20 verdünnter Hausstaubextrakt in analoger Weise mit den Wirkstoffen dotiert. Wie aus Tabelle 26 (Werte in Klammern) deutlich wird, ergeben sich dann Messwerte, die in guter Übereinstimmung mit den Sollwerten sind. Dies belegt, dass die Matrix für die Überbefunde verantwortlich ist.

Für den ELISA-Testkit werden Nachweisgrenzen von 2,5 ppb für Cyfluthrin, 1 ppb für Deltamethrin und 25 ppb für Permethrin in methanolischer Lösung angegeben. Durch die notwendige Verdünnung wird die Empfindlichkeit der Methode herabgesetzt, so dass Cyfluthrin und Deltamethrin im vorliegendem Fall ab einer Konzentration von 1 µg/g Hausstaub bestimmt werden konnten. Permethringehalte im Hausstaub konnten ab einer Konzentration von etwa 4 µg/g detektiert werden, eine quantitative Erfassung war aber nicht möglich.

Beim ELISA spielen Kreuzreaktionen eine wichtige Rolle, die das Analysenergebnis beeinflussen können. Ist z.B. neben Cyfluthrin und Deltamethrin auch Permethrin im Hausstaub (oberhalb der Nachweisgrenze) vorhanden, so kommt es zu Minderbefunden. Für einen mit Permethrin belasteten Hausstaub (23 µg/g) wurden Minderbefunde für Cyfluthrin und Deltamethrin (bei den o.g. Dotierungen) von 50-70 % festgestellt. Die quantitative Bestimmung ( $\pm 15$  %) der empfindlich detektierbaren Pyrethroide Cyfluthrin und Deltamethrin wird allerdings dann nicht gestört, wenn die Probelösung so verdünnt wird, dass Permethrin nicht mehr nachweisbar ist.

#### **4.3.3 Zusammenfassung**

Ein kommerzieller ELISA für Typ II Pyrethroide wurde auf seine Tauglichkeit zur Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin in Luft- und Hausstaubproben untersucht. Dazu wurden dotierte Extrakte von Luft- und Hausstaubproben sowohl mittels ELISA als auch mit GC-MS gemessen.



Die mit beiden Methoden in Luftprobenextrakten ermittelten Cyfluthrin- und Deltamethrinkingonzentrationen waren vergleichbar (Abweichungen max. 15 %). Bei Hausstaubproben wurden mit dem ELISA Überbefunde (bis 55 %) festgestellt. Nur bei starker Verdünnung der Proben konnte der ELISA mit befriedigendem Ergebnis eingesetzt werden (Bestimmungsgrenze etwa 1 mg/kg). Durch Kreuzreaktionen mit Typ I Pyrethroiden (z.B. Permethrin) wurden beim ELISA Minderbefunde für Cyfluthrin und Deltamethrin beobachtet.

Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit und der einfachen Methodik ist der getestete ELISA gut geeignet, um als Schnelltest (Screening-Verfahren) zwischen unbelasteten und pyrethroidbelasteten (insbesondere Typ II Pyrethroide) Luft- und Hausstaubproben zu unterscheiden. Positive Ergebnisse sollten, insbesondere bei Hausstaubproben, anschließend mit GC-MS oder anderen Methoden qualitativ und quantitativ abgesichert werden.

Andere Pyrethroide wie z.B. Permethrin werden zu unempfindlich detektiert. Dazu wäre ein weiterer, speziell für Typ I Pyrethroide entwickelter, ELISA notwendig. Solch ein ELISA ist in der Literatur beschrieben (Shan et al, 2000; Watanabe et al., 2001), derzeit aber nach unserem Kenntnisstand kommerziell nicht erhältlich (und bei eigener Herstellung zu kosten- und arbeitsintensiv).

Bemerkenswert ist die Zeitersparnis, die durch die Verwendung des ELISA erreicht werden kann (96 Proben in ca. 3-4 Stunden), sowie die einfache Durchführung der Analyse (Verdünnen, Inkubieren, Messen).

#### **4.4. Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure (CDCA) in Urin mittels GC-MS und negativer chemischer Ionisation (NCI)**

E-cis- und E-trans-CDCA werden als Metabolite im Urin ausgeschieden, wenn eine Exposition mit den Kurzzeitpyrethroiden Allethrin, Tetramethrin, Resmethrin und Phenothrin bzw. den Pyrethrinen stattgefunden hat. Zur Bestimmung der ausgeschiedenen Menge dieser Metabolite im Urin erfolgt eine Anreicherung über eine Festphasenextraktion, anschließend wird zu den entsprechenden Hexafluorisopropylestern derivatisiert und dann mittels GC-MS(NCI) analysiert, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Um eine Methode zur Bestimmung der Metabolite entwickeln zu können, ist es notwendig, dass diese als Vergleichsstandards zur Verfügung stehen. Da dies im vorliegenden Fall nicht so war, wurden die Metabolite und die entsprechenden Hexafluorisopropylester zunächst synthetisiert und nach Auftrennung mittels HPLC eine Gehaltsbestimmung mit der NMR durchgeführt, wie in den Kapiteln 3.2.5.3 bis 3.2.5.6 beschrieben.

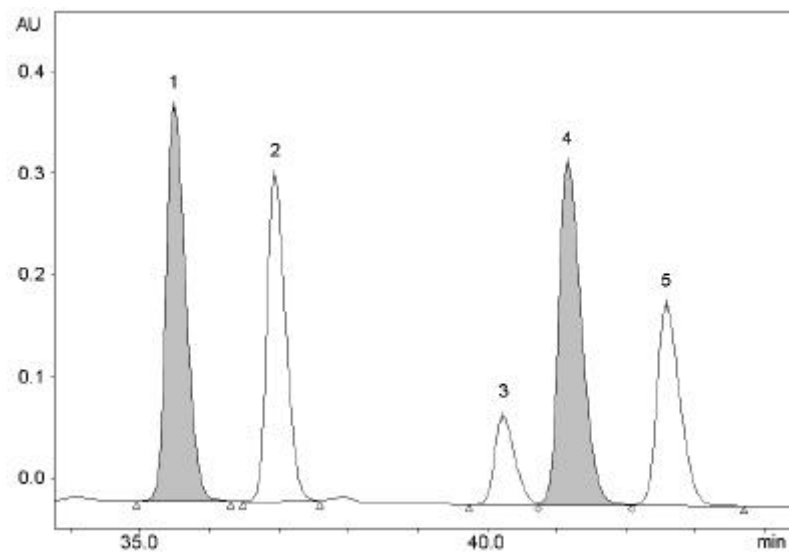
##### **4.4.1 Synthese von E-cis/trans-CDCA**

Die Synthese des Produktes wurde in Auftrag gegeben. Dabei wurde, wie in der Literatur beschrieben, vorgegangen (Crombie et al., 1957). Zunächst wurde 2,5-Dimethylsorbit durch Reformatzky-Reaktion von Ethyl-2-brompropionat und 3,3-Dimethylacrolein und anschließende Eliminierung von Wasser synthetisiert. Im zweiten Schritt erfolgte eine Kondensation von 2,5-Dimethylsorbit mit Ethyldiazoacetat zu den entsprechenden E-cis/trans-CDCA-diethylestern, welche hydrolytisch in Ethanol und die freien Säuren gespalten wurden.

##### **4.4.2 HPLC-Fraktionierung des Synthesegemisches der freien Säuren**

Um letztendlich eine Gehaltsbestimmung im Syntheseprodukt durchführen zu können, wurde zunächst eine Fraktionierung des erhaltenen Synthesegemisches mittels HPLC durchgeführt (gemäß Kapitel 3.2.5.3.). Das Gemisch konnte dabei in fünf Peaks aufgetrennt werden (**Abb. 56**). Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (Kapitel 4.4.4) wurde der erste Peak als E-trans-CDCA, der dritte Peak als Z-trans-CDCA und der vierte Peak als E-cis-CDCA identifiziert. Alle fünf Peaks besitzen die gleiche Molmasse,

weshalb es sich bei den Peaks 2 und 5 um Konstitutionsisomere handeln muss. Ihre genaue Struktur konnte aber nicht aufgeklärt werden.

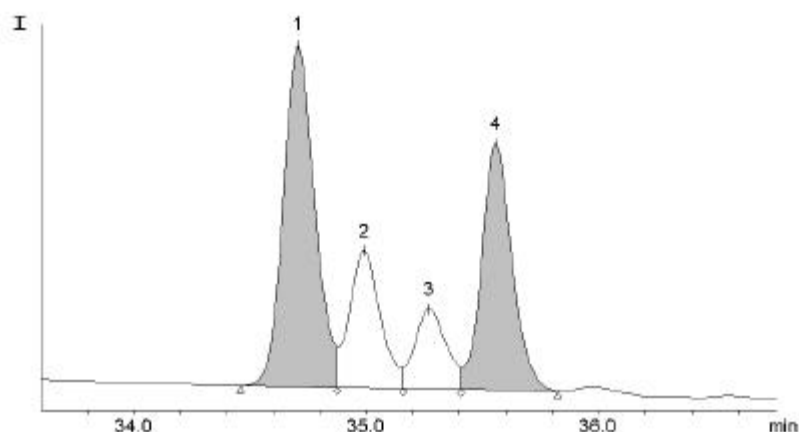


**Abb. 56:** HPLC-UV (260 nm) Chromatogramm des Synthesegemisches der freien Säuren; E-trans-CDCA (1), E-cis-CDCA (4), Z-trans-CDCA (3), unbekannte Konstitutionsisomere (2,5).

Peak 1, 3 und 4 haben UV-Absorptionsmaxima bei 239 nm, während Peak 2 und 5 aufgrund einer zusätzlichen Doppelbindung (erkennbar im NMR-Spektrum) UV-Absorptionsmaxima bei 279 nm besitzen. Bei einer Detektionswellenlänge von 260 nm werden alle Verbindungen in etwa gleich empfindlich detektiert.

#### **4.4.3 HPLC-Fraktionierung des Synthesegemisches der CDCA(HFIP)<sub>2</sub>-Ester**

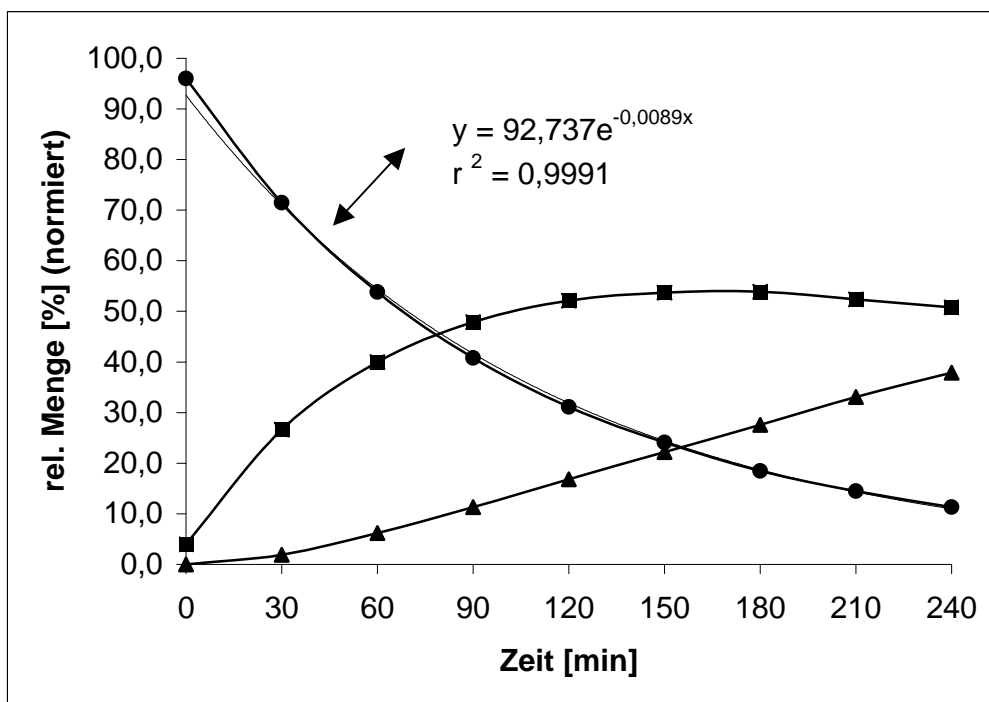
Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden weiterhin die entsprechenden Hexafluoropropylester der Chrysanthemumdicarbonsäuren als Vergleichsstandards für die GC-MS(NCI) Methode synthetisiert. Auch hier erfolgte zunächst eine Fraktionierung des Synthesegemisches mittels HPLC (gemäß Kapitel 3.2.5.4). Das Gemisch konnte in vier Peaks aufgetrennt werden (**Abb. 57**).



**Abb. 57:** HPLC-UV (260 nm) Chromatogramm des Synthesegemisches der HFIP-Ester; E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (1), E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (4), Z-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (3), HFIP-Ester eines der unbekanntes Konstitutionsisomere (2).

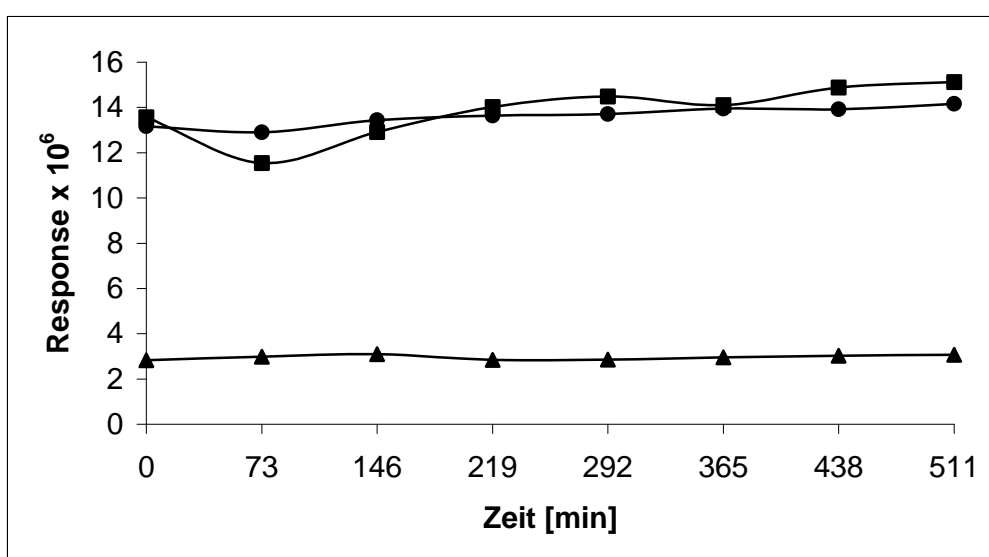
Die Elutionsreihenfolge der Ester von E-cis- und E-trans-CDCA ist, im Vergleich zu den freien Säuren, umgekehrt. Des weiteren ist zu beobachten, dass die Fläche des Peaks von E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> größer ist, als die von E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, da sich unter Peak 1 noch eine Verunreinigung eines der unbekanntes Konstitutionsisomere (i.e. Peak 5 in Abb. 56) befindet (erkennbar durch die unterschiedlichen UV-Spektren und Retentionszeiten der Einzelsubstanzen). Die beiden Substanzen konnten in der HPLC nicht voneinander getrennt werden. Das andere unbekanntes Konstitutionsisomer ist jeweils Peak 2 in den Abb. 56 und 57. Die UV-Absorptionsmaxima wurden durch die Veresterung mit HFIP nicht verändert.

Auch für PDAA(HFIP)<sub>2</sub>, das im Rahmen der zu entwickelnden Methode als interner Standard eingesetzt werden sollte, wurde eine HPLC-Fraktionierung des Synthesegemisches vorgenommen. Dabei muß erwähnt werden, dass der Ester dazu nicht in Methanol umgelöst werden darf, da ansonsten eine Umesterung erfolgt. Es wurden Messungen mit der HPLC (Methode nach Kapitel 3.2.5.4) zum Verlauf der Umesterung gemacht. Die Umesterung erfolgt in zwei Schritten über PDAA(OCH<sub>3</sub>)(HFIP) als Zwischenprodukt. Die Abbaukurve ist vergleichbar mit der eines radioaktiven Zerfalls. Die Halbwertszeit beträgt 69,4 min, d.h. nach 12,8 Stunden sind 99,9 % zum Dimethylester umgeestert (**Abb. 58**).



**Abb. 58:** Stabilität von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> in Methanol; PDAA(HFIP)<sub>2</sub> (—●—); PDAA(OCH<sub>3</sub>)(HFIP) (—■—); PDAA(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (—▲—); dünne Linie: Regressionsfunktion.

Die Isomere von CDCA(HFIP)<sub>2</sub> sind dagegen in Methanol stabil (**Abb. 59**). Es wurde keine Umesterung während des Beobachtungszeitraumes festgestellt. Die relativen Standardabweichungen der Messwerte (HPLC) liegen bei 3-8 %.



**Abb. 59:** Stabilität von CDCA(HFIP)<sub>2</sub> in Methanol; E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—●—); E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—■—); Z-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—▲—).

#### 4.4.4 Identifizierung und Quantifizierung von E-cis/trans-CDCA bzw. deren HFIP-Ester sowie des HFIP-Esters von PDAA (interner Standard)

Die nach der HPLC-Auftrennung erhaltenen Fraktionen wurden im nächsten Schritt mittels NMR untersucht. Die NMR Daten sind in **Tabelle 27** aufgeführt. Die Werte der freien Säuren stimmen gut mit bereits publizierten Ergebnissen für die Pyrethrine und E-cis/trans-CDCA überein (Patel et al., 1963; Bramwell et al., 1969; Elliot et al., 1972; Leng et al., 1999). Die Daten der HFIP Ester wurden erstmals bestimmt.

Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal zwischen E-cis- und E-trans-CDCA bzw. deren HFIP-Ester ist das Doppeldublett des olefinischen Protons (H-7, vgl. Abb. 9), dessen chemische Verschiebung sich in Abhängigkeit von der räumlichen Stellung der Substituenten am Cyclopropanring (cis oder trans) um 0,53 bzw. 0,58 ppm unterscheidet.

Die quantitative Bestimmung von E-cis-, E-trans- und Z-trans-CDCA im Synthesegemisch gemäß Kapitel 3.2.5.6 ergab die in **Tabelle 28** aufgeführten Gehalte an freien Säuren.

**Tabelle 27:** <sup>1</sup>H-NMR Daten von E-cis/trans-CDCA bzw. E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> in DMSO-d<sub>6</sub> bzw. Cyclohexan-d<sub>12</sub>; **δ** : chemische Verschiebung; **J**: Kopplungskonstante; **H-HFIP**: Proton in der Estergruppe; **d**: Dublett; **dd**: Doppeldublett; **h**: Septett; Nummerierung der Protonen gemäß Abb. 9.

Chemische Verschiebung [ppm]				
Proton	E-cis-CDCA	E-trans-CDCA	E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>	E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>
δ (H-7) dd	6.96	6.43	7.29	6.71
δ (H-1) d	1.86	1.79	2.10	1.94
δ (H-3) dd	2.03	2.01	2.16	2.43
δ (H <sub>3</sub> -9) d	1.82	1.82	2.02	2.06
δ (H-HFIP) h	-	-	5.83 + 5.77	5.84 + 5.78
δ (H <sub>3</sub> -5, H <sub>3</sub> -6)	1.238, 1.222, 1.217, 1.167		0.94	0.90
Kopplungskonstanten [Hz]				
<sup>3</sup> J (H-1, H-3)	8.4	5.4	8.4	5.4
<sup>3</sup> J (H-3, H-7)	10.2	10.2	9.3	9.6
<sup>4</sup> J (H-7, H <sub>3</sub> -9)	1.8	1.8	1.5	1.5

**Tabelle 28:** Prozentuale Gehalte von E-cis/trans-CDCA im Synthesegemisch, bestimmt mit NMR.

Analyt	Gehalt [%]
E-cis-CDCA (Peak 4, Abb. 56)	27,2 ± 0,2
E-trans-CDCA (Peak 1, Abb. 56)	26,4 ± 0,2
Z-trans-CDCA (Peak 3, Abb. 56)	8,4 ± 0,3

Des Weiteren wurden in den Cyclohexan-d12 Extrakten der gesammelten HPLC-Fractionen von E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> die genauen Konzentrationen der Analyten bestimmt. Für den Ester des internen Standards PDAA wurden dazu die Signale bei 7,28 ppm der vier aromatischen Protonen und bei 5,73 ppm der zwei Protonen in den Estergruppen herangezogen. Es ergaben sich folgende Konzentrationswerte (**Tabelle 29**):

**Tabelle 29:** Konzentrationen der HFIP Ester in den Cyclohexan-d12 Extrakten der HPLC-Fractionen, bestimmt mit NMR; Volumen der Messlösung 100 µl.

Analyt	Gehalt [µg]
E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> (Peak 1, Abb. 57)	17,4 ± 0,4
E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub> (Peak 4, Abb. 57)	16,0 ± 1,0
PDAA(HFIP) <sub>2</sub>	10,6 ± 0,4

Es wurden also Vergleichstandards in Konzentrationen von 106 bis 174 µg/ml erhalten. Diese dienten nach entsprechender Verdünnung mit n-Hexan zur Bestimmung der Derivatisierungsausbeute (s. 4.4.8) mit GC-MS(NCI).

#### **4.4.5 Messung mit GC-MS (NCI)**

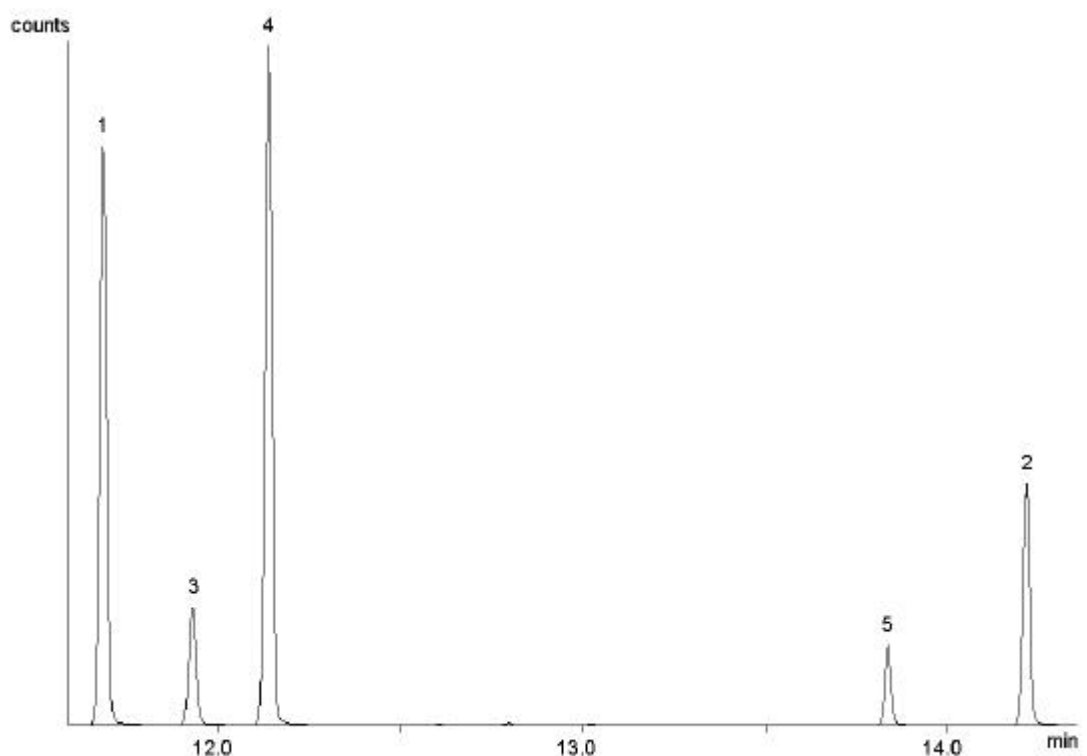
Die Ester der fünf Komponenten des Synthesegemisches konnten gaschromatographisch vollständig voneinander getrennt werden (Beispielchromatogramm in **Abb. 60**). Die Zuordnung erfolgte, indem jedes mit HPLC fraktionierte und mit NMR identifizierte Isomer der freien Säuren nach Umlösen in n-Hexan und anschließender Derivatisierung einzeln mit GC-MS(NCI) gemessen wurde.

Da die Peaks der HPLC-Trennung denen im GC-Chromatogramm eindeutig zugeordnet werden konnten, musste das Synthesegemisch für weitere Untersuchungen nicht jedes Mal fraktioniert werden. Das heißt, es

wurde eine bestimmte Menge des Synthesegemisches eingewogen, derivatisiert und mit GC-MS gemessen. Anhand der verschiedenen Retentionszeiten konnten dann die einzelnen Peaks zugeordnet werden.

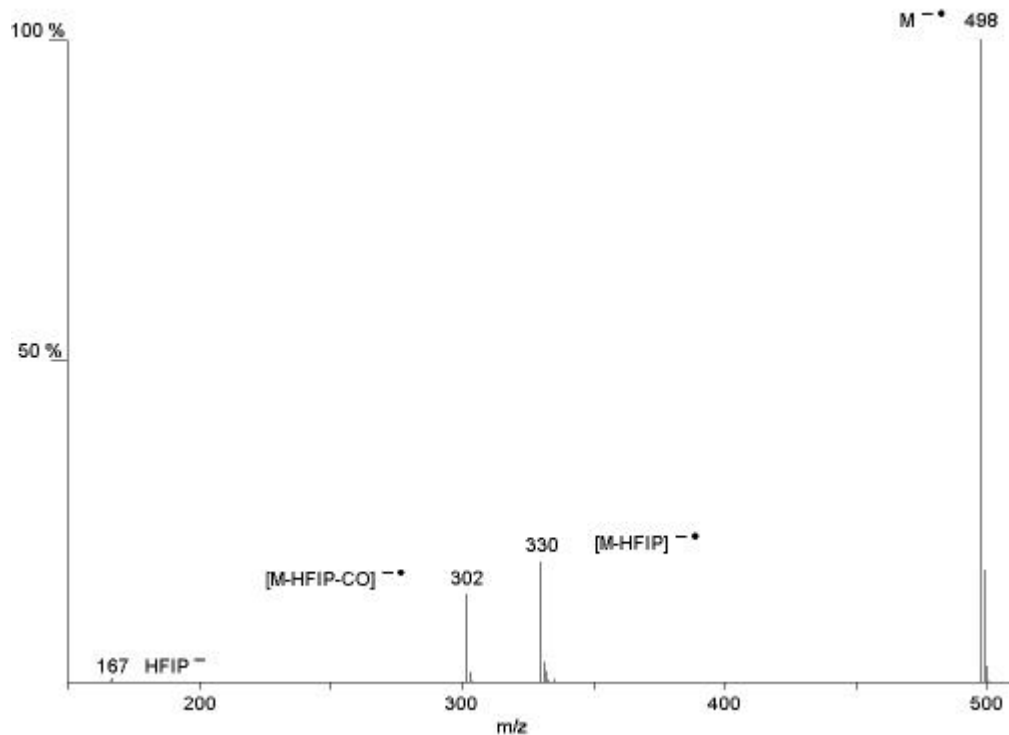
Das NCI-Massenspektrum der Ester von E-cis/trans-CDCA und Z-trans-CDCA ist in **Abb. 61** dargestellt. Neben dem Molekölion als Basispeak treten auch noch zwei Fragmentationen auf, die durch sukzessive Abspaltung eines HFIP-Restes und von Kohlenmonoxid entstehen ( $m/z = 330, 302$ ). Ein Teil des abgespaltenen HFIP-Restes ist noch ganz schwach in Form des Alkoholats zu erkennen ( $m/z = 167$ ). Das Massenspektrum der beiden unbekannt Konstitutionsisomere weist anstatt  $m/z = 302$  ein Fragmentation mit  $m/z = 209$  auf, die übrigen Massen sind gleich.

Der Ester des internen Standards PDAA eluiert im GC-Chromatogramm bei ca. 14 min (siehe Chromatogramme bei den Wiederfindungsversuchen). Das NCI-MS Spektrum von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> ist in **Abb. 62** dargestellt.



**Abb. 60:** TIC(SIM)-Chromatogramm der GC-MS(NCI) Trennung des derivatisierten Synthesegemisches; E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (1), E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (4), Z-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (3), unbekannt Konstitutionsisomere (2,5).

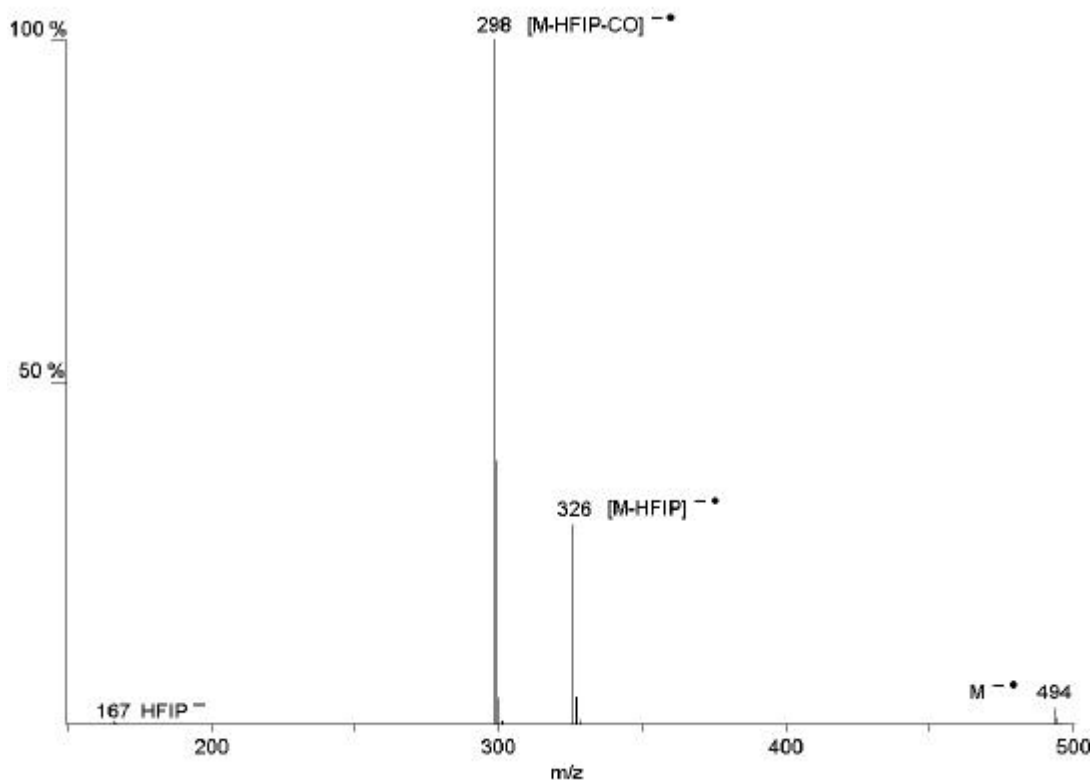




**Abb. 61:** NCI-Massenspektrum von CDCA(HFIP)<sub>2</sub>; M<sup>-•</sup>: Molekülion; [M-HFIP]<sup>-•</sup>: Fragmentation nach Elimination von HFIP; [M-HFIP-CO]<sup>-•</sup>: Fragmentation nach Elimination von HFIP und Kohlenmonoxid; HFIP<sup>-</sup>: Hexafluorisopropanolat.

Der Molekülpeak von PDAA(HFIP)<sub>2</sub> (m/z = 494) ist nur bei hohen Analytkonzentrationen sichtbar, das heißt, das Molekül zerfällt praktisch vollständig in die Fragmentionen m/z = 298 und m/z = 326. Wie bei den CDCA-Isomeren werden ein HFIP-Rest und Kohlenmonoxid abgespalten. Der Verlust des Molekülpeaks ist verbunden mit einem Verlust an Empfindlichkeit in der massenspektrometrischen Detektion (siehe Kapitel 4.4.9).

Kommerziell erhältliche Cyclopropanverbindungen, welche sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit gut als interne Standards eignen würden, gibt es kaum. Es wurde versucht, 3-Methylen-1,2-cyclopropanedicarbonsäure als internen Standard zu verwenden. Aufgrund seiner höheren Polarität sind aber die Wiederfindungen in der speziell für diese Methode entwickelten Festphasenextraktion schlecht. Der entsprechende HFIP-Ester ist sehr flüchtig, weshalb es zu Substanzverlusten kommen kann. Außerdem eluiert der Ester im GC-Chromatogramm schon sehr früh (bei ca. 7 min, nahe am Lösemittelpeak). Insgesamt erwies sich diese Verbindung also als wenig geeignet.



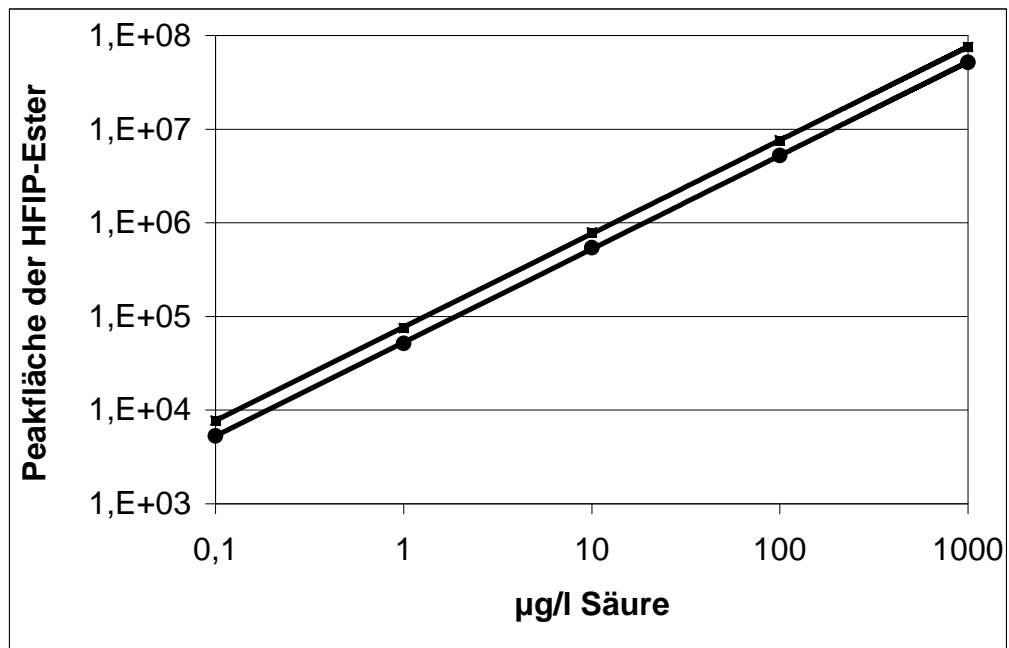
**Abb. 62:** NCI-Massenspektrum von PDAA(HFIP)<sub>2</sub>; M<sup>-•</sup>: Molekülion; [M-HFIP]<sup>-•</sup>: Fragmentation nach Elimination von HFIP; [M-HFIP-CO]<sup>-•</sup>: Fragmentation nach Elimination von HFIP und Kohlenmonoxid; HFIP<sup>-</sup>: Hexafluorisopropanolat.

#### 4.4.6 Arbeitsbereich und Linearität

Externe Kalibriergeraden mit reinen Standardlösungen sind im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/l linear (**Abb. 63**, Korrelationskoeffizienten  $r^2 > 0,9997$ ).

Da in der Praxis die Konzentrationen der Metabolite im Allgemeinen sehr klein sind, wurden für die Wiederfindungsversuche externe und interne Kalibrierfunktionen von 0,1 bis 2 µg/l Urin erstellt. Die Kalibrierung erfolgte hierbei in der Urinmatrix. Dazu wurden 15 Kalibrierpunkte generiert, bestehend aus je drei Messungen der Konzentrationen 0,1 - 0,3 - 0,7 - 1,3 - 2,0 µg CDCA/l Urin. Die Daten der linearen Kalibrierfunktionen sind in **Tabelle 30** dargestellt. Die relative Standardabweichung  $CV_x$  der Kalibriergeraden ist ein Maß für die Streuung der Kalibrierpunkte um die Regressionsgerade. Bei der internen Kalibrierung unter Verwendung von

PDAA ist diese deutlich geringer als bei der externen Kalibrierung, aber auch dort werden gute Werte von  $\leq 10\%$  erreicht.

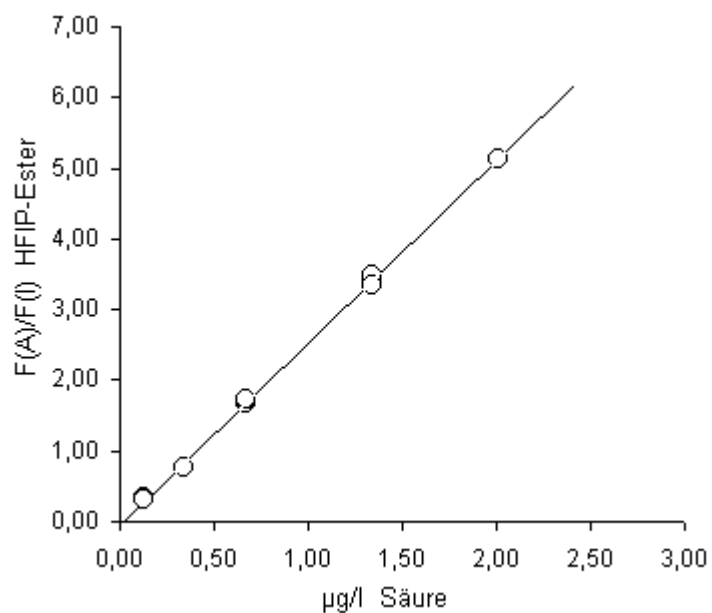


**Abb 63:** Kalibrierfunktionen von E-cis- CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—■—) und E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—●—) in n-Hexan.

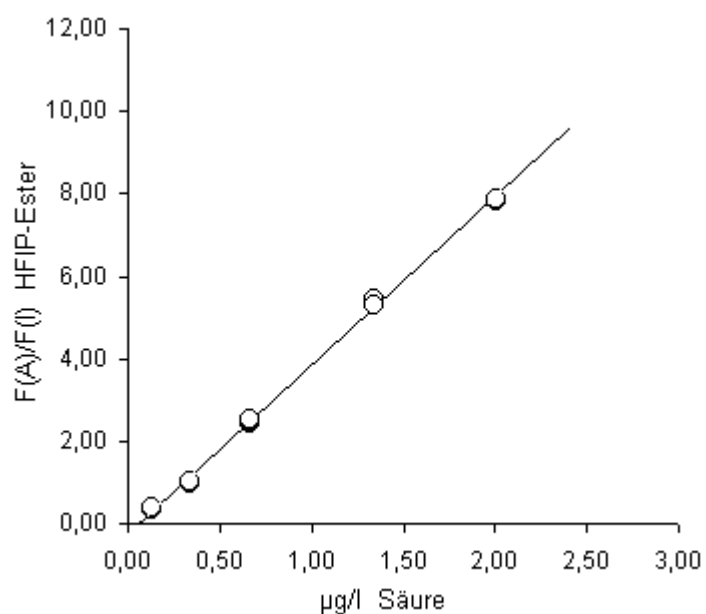
**Tabelle 30:** Daten der externen und internen Kalibrierfunktionen für E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> (0,1 bis 2 µg/l Urin);  $r^2$ : Korrelationskoeffizient der linearen Kalibrierfunktion;  $CV_X$ : relative Standardabweichung der Kalibriergeraden.

Analyt	Externe Kalibrierung	Interne Kalibrierung
E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>	$r^2$ : 0.996 ( $CV_X$ : 10.2 %)	$r^2$ : 0.999 ( $CV_X$ : 2.3 %)
E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>	$r^2$ : 0.998 ( $CV_X$ : 7.4 %)	$r^2$ : 0.999 ( $CV_X$ : 3.8 %)
PDAA(HFIP) <sub>2</sub>	$r^2$ : 0.998 ( $CV_X$ : 6.9 %)	-

Die Kalibriergeraden der internen Kalibrierung über PDAA(HFIP)<sub>2</sub> (Konzentration: 1 µg PDAA/l Urin) sind in **Abb. 64** und **65** veranschaulicht.



**Abb. 64:** Interne Kalibrierung von E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> mit PDAA(HFIP)<sub>2</sub> als internem Standard. F(A): Peakfläche des Analyten; F(I): Peakfläche des internen Standards. Kalibrierung in der Matrix (Pool-Urin). Drei Messungen pro Level.



**Abb. 65:** Interne Kalibrierung von E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> mit PDAA(HFIP)<sub>2</sub> als internem Standard. F(A): Peakfläche des Analyten; F(I): Peakfläche des internen Standards. Kalibrierung in der Matrix (Pool-Urin). Drei Messungen pro Level.

#### **4.4.7 Ermittlung der Wiederfindungsraten in der Festphasenextraktion (SPE)**

In Anlehnung an die DFG-Methode zur Bestimmung der Pyrethroidmetabolite cis/trans-Cl<sub>2</sub>CA, Br<sub>2</sub>CA, 2-PBA und F-PBA (DFG, 1999) wurde zunächst eine Festphasenextraktion mit einem unpolaren Adsorbens erprobt. Da es notwendig ist, die Analyten in die undissoziierte Form zu überführen, damit sie an einem derartigen Material retardiert werden können, eignet sich C18-Material wenig, da es bei extremen pH-Werten (in diesem Fall pH 1) nicht stabil ist. Aus diesem Grund wurden die unpolaren und pH-stabilen Polymermaterialien Oasis HLB (Copolymer aus Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon) und Strata X (Copolymer aus Divinylbenzol und Styrol) getestet.

Mit beiden Festphasenmaterialien wurden für die CDCA-Isomere bei Extraktion aus wässriger salzsaurer Lösung bzw. gepufferter Salzlösung (wie Urin, aber ohne Proteine) gute Wiederfindungsraten von 80-100 % erzielt (GC-MS Messung nach Derivatisierung). Die Wiederfindungen der CDCA-Isomere aus Urin nach Derivatisierung und GC-MS(NCI) Messung war mit diesen Festphasenmaterialien dagegen relativ gering (30-50%). Aus diesem Grunde wurden zunächst Wiederfindungsraten an dem genannten Festphasenmaterial mittels HPLC-Messung durchgeführt, da bei dieser Verfahrensweise die reinen Säuren und nicht wie bei der GC-Methode die Ester gemessen werden können. Es zeigte sich, dass sich die Wiederfindungen hierbei zwischen 90-100 % bewegten. Daraus konnte geschlossen werden, dass das schlechte Ergebnis, das bei den GC-Messungen erzielt wurde, nicht ein Problem der Festphasenextraktion war, sondern dass die mitextrahierte Matrix die anschließende Derivatisierung beeinträchtigte. Durch Einführung eines zusätzlichen Spülschritts in der Festphasenextraktion mit 35 % salzsaurem Acetonitril konnte ein Teil der zuvor mitextrahierten Matrix von den Analyten abgetrennt werden, so dass dann die Wiederfindungen für die CDCA-Isomere nach Derivatisierung und GC-MS Messung auf 75-80 % anstiegen. Allerdings lag die Wiederfindungsrate des internen Standards PDAA nur bei ca. 45 %.

Da also einerseits ein sauberer Extrakt eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Umsetzung der Dicarbonsäuren zu den entsprechenden HFIP-

Estern ist und andererseits Analyten und interner Standard ungefähr dieselbe Wiederfindungsrate haben sollten, wurde eine neue SPE-Methode mit der Oasis MAX Kartusche entwickelt. Als Adsorbens wird hier ein Copolymer aus Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon eingesetzt, wobei ein Teil der Divinylbenzolmonomere zusätzlich eine quarternäre Ammoniumgruppe besitzt ( $-\text{CH}_2\text{NR}_4^+$ ). Die Phase ist also bifunktionell und kann sowohl als Reversed-Phase Material als auch als Anionenaustauscher fungieren.

Nach Freisetzung der Analyten aus ihrer konjugierten Form (Glucuronide) durch Hydrolyse des Urins werden die Dicarbonsäuren durch Ansäuern auf pH 1 in ihre undissoziierte Form überführt und nach Aufgabe auf die MAX Kartusche zunächst durch unpolare Wechselwirkungen zurückgehalten. In einem Spülschritt mit wässriger Salzsäure werden dann die im Urin enthaltenen Salze von der Kartusche eluiert. Durch anschließendes alkalisches Waschen mit ammoniakalischer Lösung (pH 10) werden die Analyten deprotoniert, so dass sie nun an den Anionenaustauscher binden können. Diese Bindung ist so stark, dass die Kartusche ohne Analytverlust mit 100 % organischem Lösemittel (Methanol und Ethylacetat) gewaschen werden kann, um unpolare bis mittelpolare Matrixbestandteile abzutrennen. Zur Freisetzung der Säuren vom Anionenaustauscher wird anschließend die Kartusche erneut mit salzsaurer Lösung (pH 1) gewaschen, so dass die Analyten schließlich mit einem leicht verdampfenden organischen Lösemittel (Ethylacetat) eluiert werden können. Dabei ist ein fünfprozentiger Anteil von Methanol im Elutionsmittel notwendig, um Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen.

Die Wiederfindungen für die Biomarker E-cis- und E-trans-CDCA mit der MAX-SPE Kartusche wurden auf zwei Konzentrationsniveaus (25 µg/l Urin und 1 µg/l Urin) durchgeführt. Wiederfindungen von Z-trans-CDCA wurden nicht bestimmt (siehe auch Kapitel 1.3.2). Die Ergebnisse für das höhere Konzentrationsniveau sind in **Tabelle 31** dargestellt. Die erzielten Wiederfindungen sind sehr gut.

**Tabelle 31:** Wiederfindungen von E-cis/trans-CDCA und PDAA im Urin (Dotierung 25 µg/l) mit externer und interner Kalibrierung: (a) externe Kalibrierung durch Dotierung von MAX-SPE-Eluaten eines unbelasteten Pool-Urins; (b) externe Kalibrierung durch Dotierung des Pool-Urins und anschließende MAX-SPE; (c) analog (b), aber interne Kalibrierung über PDAA.

Kalibriermethode	extern (a); n = 5	extern (b); n = 6	intern (c); n = 6
Analyt	Wiederfindung und relative Standardabweichung		
E-cis-CDCA	96 ± 9 %	96 ± 5 %	96 ± 3 %
E-trans-CDCA	92 ± 5 %	95 ± 6 %	95 ± 2 %
PDAA	97 ± 6 %	100 ± 8 %	-

Bei der externen Kalibrierung hatte die Art der Standardherstellung (Dotierung der SPE-Eluate von unbelasteten Pool-Urin und Derivatisierung bzw. Dotierung von Pool-Urin und anschließende MAX-SPE-Anreicherung sowie Derivatisierung) keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindungsergebnisse. Dies kann statistisch mit dem F- und t-Test folgendermaßen geprüft werden:

F-Test der Varianzen, Vortest für den Mittelwertvergleich:

$$F = (s_1/s_2)^2 \text{ mit } s_1 \geq s_2 \text{ und } f_1 = n_1 - 1 \text{ bzw. } f_2 = n_2 - 1$$

F: Prüfgröße

s: Standardabweichung der Messreihe

f: Freiheitsgrade

n: Anzahl der Messungen je Messreihe

$$\text{E-trans-CDCA: } F = (5,5/4,9)^2 = 1,26 \quad f_1 = 5, f_2 = 4$$

$$\text{E-cis-CDCA: } F = (8,4/5,3)^2 = 2,51 \quad f_1 = 4, f_2 = 5$$

$$\text{PDAA: } F = (7,7/5,3)^2 = 2,11 \quad f_1 = 5, f_2 = 4$$

Tabellenwert  $F_{\text{tab}}$  (95 %,  $f_1 = 4$ ,  $f_2 = 5$ ) = 6,26

Tabellenwert  $F_{\text{tab}}$  (95 %,  $f_1 = 5$ ,  $f_2 = 4$ ) = 5,19

Die Bedingung  $F < F_{\text{tab}}$  (95 %,  $f_1 = 4$ ,  $f_2 = 5$ ) bzw.  $F < F_{\text{tab}}$  (95 %,  $f_1 = 5$ ,  $f_2 = 4$ ) ist für alle Analyten erfüllt, d.h. der Unterschied in den Standardabweichungen ist nur zufällig.

### Mittelwert-t-Test

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_d}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{mit} \quad s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$t$ : Prüfgröße

$\bar{x}$ : Mittelwert der Messreihe

$s$ : Standardabweichung der Messreihe (Werte siehe F-Test)

$n$ : Anzahl der Messungen je Messreihe

$f$ : Anzahl der Freiheitsgrade (s. u.)

Tabellenwert  $t_{\text{Tab}}$  (95 %,  $f = 9$ ) = 2,262

E-trans-CDCA:  $t = 0,941$

E-cis-CDCA:  $t = 0$

PDAA:  $t = 0,734$

Die Bedingung  $t < t_{\text{Tab}}$  (95 %,  $f = 9$ ) ist für alle Analyten erfüllt, d.h. der Unterschied in den Mittelwerten ist nur zufällig.

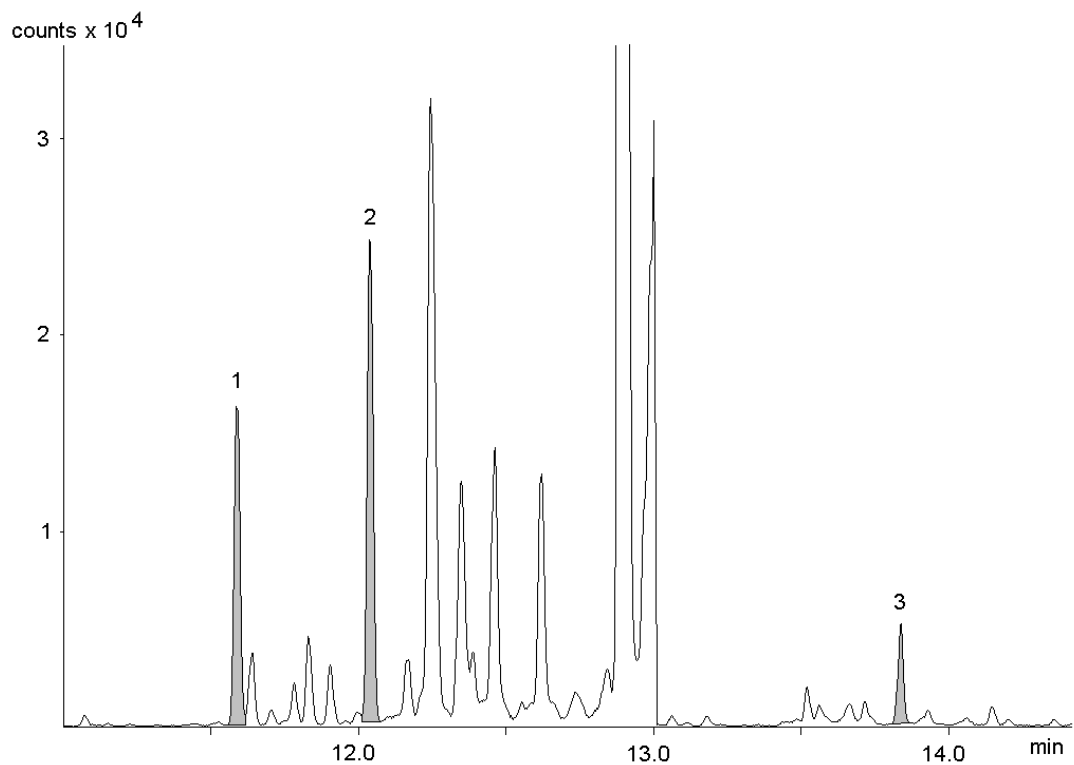
Die Wiederfindungsergebnisse, die bei einer Dotierung des Urins mit je 1  $\mu\text{g}$  E-cis bzw. E-trans-CDCA pro Liter Urin erreicht wurden, sind in **Tabelle 32** dargestellt. Beispielchromatogramme finden sich in **Abb. 66a/b**. Auch auf diesem Konzentrationsniveau werden hervorragende Wiederfindungen erzielt. Dass die Wiederfindung mit der vorgestellten Festphasenextraktion unter Verwendung der MAX-SPE-Kartuschen praktisch quantitativ ist, kann aus den Ergebnissen in den Tabellen 31 und 32 gefolgert werden, weil die Derivatisierungsausbeute nahezu 100 % beträgt (siehe nächstes Kapitel). Die relativen Standardabweichungen der Wiederfindungsergebnisse, die mit externer Kalibrierung ermittelt wurden, sind gut ( $< 10$  %). Erwartungsgemäß ergeben sich für die Wiederfindungen, die mit interner Kalibrierung ermittelt wurden, noch etwas geringere relative Standardabweichungen. Wie die Ergebnisse der Tabellen 31 und 32 weiterhin zeigen, wird für den internen Standard PDAA eine ähnliche Wiederfindungsrate wie für E-cis/trans-CDCA ermittelt. Allerdings ist es unter Umständen erforderlich, eine entsprechend größere



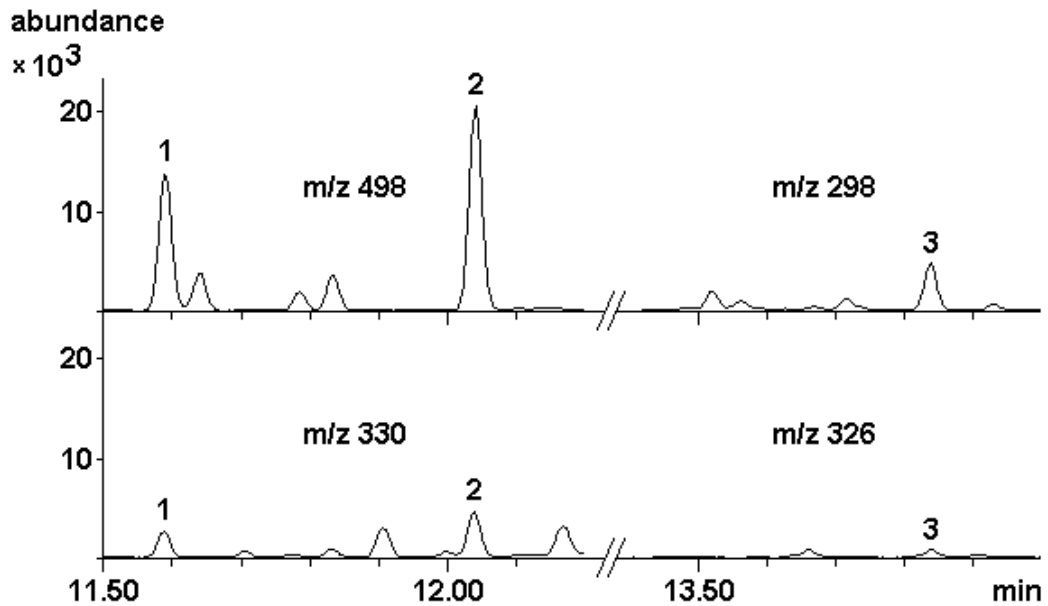
Menge des internen Standards zum Urin zuzudotieren, um eine ähnliche Signalintensität wie bei den Analyten zu erreichen, da der Ester des PDAAs nicht so empfindlich mit GC-MS(NCI) gemessen werden kann wie die Ester der CDCA-Isomere.

**Tabelle 32:** Wiederfindungen von E-cis/trans-CDCA und PDAA im Urin (Dotierung 1 µg/l) mit externer und interner Kalibrierung: externe Kalibrierung durch Dotierung des Pool-Urins und anschließende MAX-SPE; interne Kalibrierung über PDAA.

Kalibriermethode	extern; n = 15	intern; n = 15
Analyt	Wiederfindung und relative Standardabweichung	
E-cis-CDCA	104 ± 7 %	104 ± 4 %
E-trans-CDCA	101 ± 7 %	100 ± 3 %
PDAA	101 ± 8 %	-



**Abb. 66a:** TIC-Chromatogramm von leerwertfreiem Pool-Urin, dotiert mit je 1 µg/l E-cis/trans-CDCA und PDAA: (1) E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (2) E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (3) PDAA(HFIP)<sub>2</sub>.

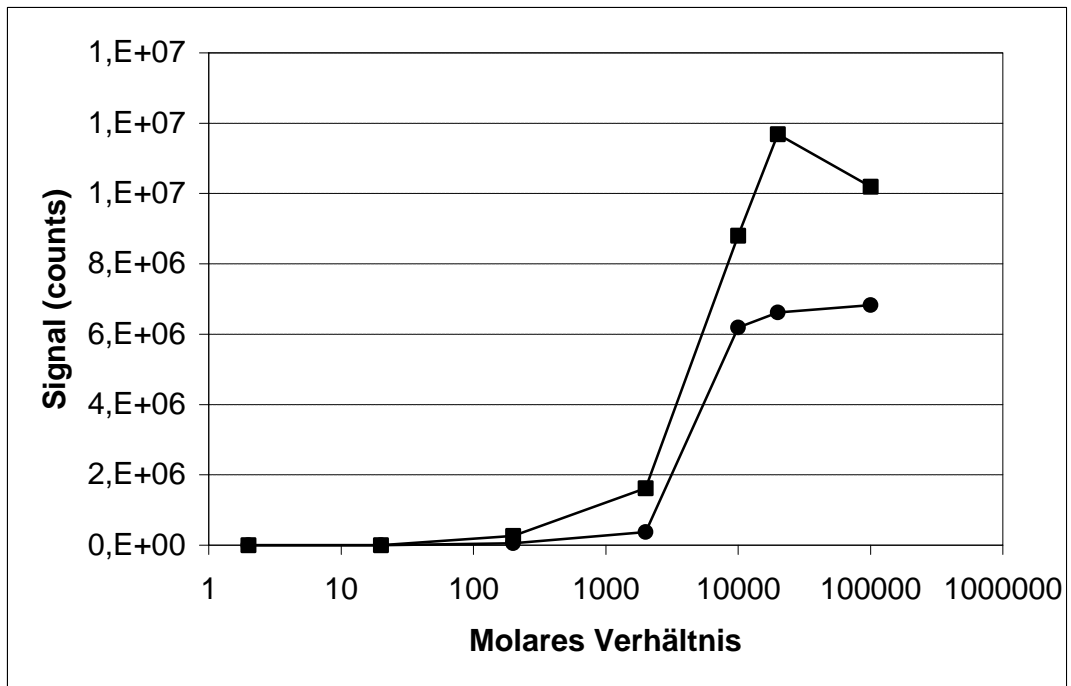


**Abb. 66b:** Extrahierte Ionenchromatogramme von leerwertfreiem Pool-Urin, dotiert mit je 1 µg/l E-cis/trans-CDCA und PDAA: (1) E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (2) E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (3) PDAA(HFIP)<sub>2</sub>.

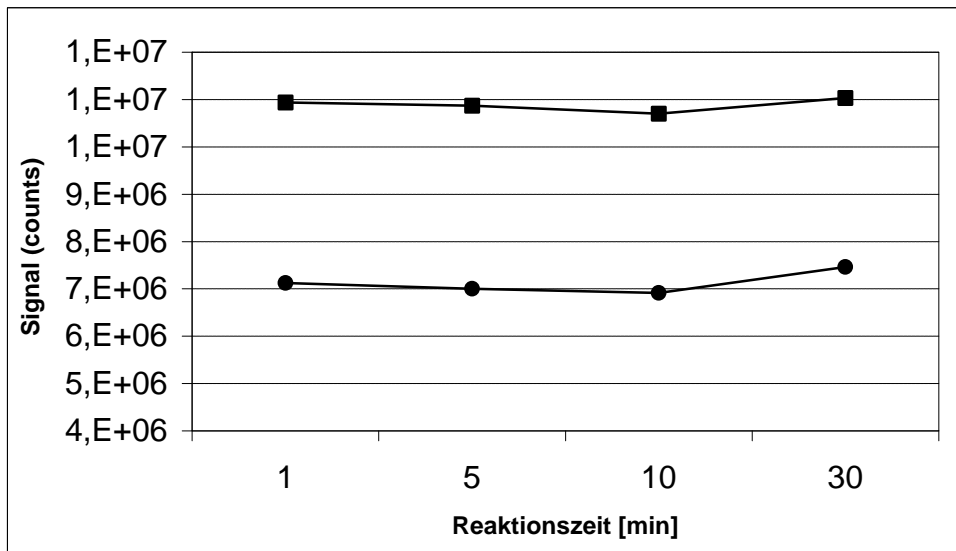
#### 4.4.8 Derivatisierungsausbeute (Grad der Umsetzung)

Die Derivatisierung der freien Säure zu den entsprechenden Hexafluorisopropylestern ist im Kapitel 3.2.5 und Abb. 11 beschrieben. Dabei wird ein hoher molarer Überschuss an Derivatisierungsreagenzien eingesetzt. Um zu prüfen, ob es möglich ist, die Synthese auch mit weniger HFIP bzw. DIC durchzuführen, wurde die Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute (ohne quantitative Aussage) vom molaren Reagenzienüberschuss durch Messung Signalintensität mit GC-MS(NCI) bestimmt (**Abb. 67**). Hierzu wurde stets dieselbe Menge E-cis/trans-CDCA mit unterschiedlichen Mengen an den Derivatisierungsreagenzien HFIP und DIC versetzt, wobei das Molverhältnis HFIP/DIC konstant 1:1 war und nur das Molverhältnis zur CDCA verändert wurde. Wie aus Abb. 67 ersichtlich, wird das Maximum bei einem 20.000 fachen molaren Reagenzienüberschuss erreicht (bzw. 10.000 fach als Äquivalentmenge ausgedrückt, wenn man berücksichtigt, dass pro CDCA-Molekül zwei COOH-Gruppen vorhanden sind). Es ist beachtlich, dass es bei geringerem Überschuss zu einem starken Abfall der Signalintensität kommt. Es muss also bei der Derivatisierung darauf geachtet werden, dass

abhängig von der Analytmenge immer genug Reagenzienüberschuss vorhanden ist.



**Abb. 67:** Abhängigkeit des Messsignals von E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—■—) und E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—●—) vom molaren Überschuss der Derivatisierungsreagenzien HFIP und DIC.



**Abb. 68:** Abhängigkeit des Messsignals von E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—■—) und E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> (—●—) von der Reaktionszeit bei konstantem Molverhältnis.

Wie **Abb. 68** zeigt, ist bei einem 20.000 fachen molaren Reagenzienüberschuss die Signalintensität kaum abhängig von der Reaktionszeit ( $\pm 6$  % Unterschied). Die Reaktion verläuft also unter diesen Bedingungen sehr schnell.

Um zu bestimmen, wie hoch die Derivatisierungsausbeute wirklich ist, wurden Messungen mit den Vergleichsstandards E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> durchgeführt, die durch HPLC-Fraktionierung und Quantifizierung mit NMR gewonnen wurden (Kapitel 4.4.3 und 4.4.4). Hierzu wurden in je drei Dotierungen der beiden Dotierungsniveaus 1 und 25 µg/l Urin durch Standardaddition mit den Vergleichsstandards die genauen Konzentrationen an E-cis/trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> und PDAA(HFIP)<sub>2</sub> mittels GC-MS(NCI) bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 33** dargestellt.

**Tabelle 33:** Derivatisierungsausbeuten für die HFIP-Ester von E-cis/trans-CDCA und PDAA und relative Standardabweichungen auf den beiden Dotierungsniveaus (1 & 25 µg/l), bestimmt durch Standardaddition (n = 3).

Analyt	Dotierung 25 µg/l Urin	Dotierung 1 µg/l Urin
E-cis-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>	82 ± 13 %	96 ± 11 %
E-trans-CDCA(HFIP) <sub>2</sub>	101 ± 15 %	102 ± 12 %
PDAA(HFIP) <sub>2</sub>	98 ± 15 %	101 ± 10 %

Die Werte zeigen, dass die Derivatisierung praktisch quantitativ ist. Der etwas niedrigere Wert für E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> bei 25 µg/l ist wahrscheinlich auf einen Dotierungsfehler zurückzuführen. Durch die zusätzliche Prozedur der Standardaddition erhöhten sich die relativen Standardabweichungen bis auf 15 %.

Für die Derivatisierung wurde zum einen ein relativ großes Lösemittelvolumen (5 ml n-Hexan) verwendet. Dies ist nötig, damit sich der Rückstand des SPE-Eluates löst. Zum anderen sind, wie bereits oben erwähnt, große Überschüsse an Derivatisierungsreagenz (je 0,5 mmol HFIP und DIC) notwendig, um eine quantitative Umsetzung der Dicarbonsäuren zu den entsprechenden HFIP Estern zu gewährleisten, selbst wenn z.B. andere mitextrahierte Säuren aus der Urinmatrix einen Teil der Derivatisierungsreagenzien umsetzen.

#### 4.4.9 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

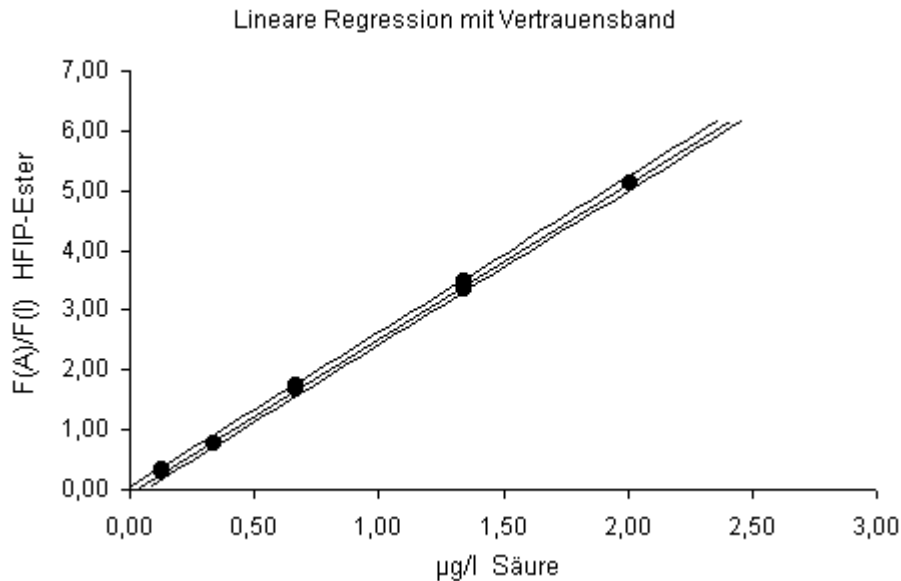
Die instrumentellen Nachweisgrenzen für E-cis/trans-CDCA und PDAA (erfasst als entsprechende HFIP-Ester) liegen bei 0,01 bzw. 0,1 µg/l oder als Absolutmenge ausgedrückt bei 10 bzw. 100 fg (Signal/Rauschverhältnis = 3, Targetmasse).

Die Nachweisgrenzen im Pool-Urin wurden nach DIN 32645 (DIN, 1994) aus den Kalibriergeraden (Kapitel 4.4.6) berechnet:

##### a) E-trans-CDCA:

**Tabelle 34:** Daten der Kalibrierfunktion von E-trans-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin nach DIN 32645; F(A)/F(I): Peakflächenverhältnis Analyt / interner Standard; C: Konzentration der freien Säure im Urin.

Kalibrator	C [µg/l]	F(A)/F(I)
1	0,13	0,31
2	0,34	0,76
3	0,67	1,66
4	1,34	3,44
5	2,01	4,94
6	0,13	0,33
7	0,34	0,77
8	0,67	1,68
9	1,34	3,48
10	2,01	5,12
11	0,13	0,31
12	0,34	0,77
13	0,67	1,73
14	1,34	3,35
15	2,01	5,13



**Abb. 69:** zu Tabelle 34: graphische Darstellung der Kalibrierfunktion von E-trans-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin; F(A)/F(I): Peakflächenverhältnis Analyt / interner Standard.

Kenndaten:

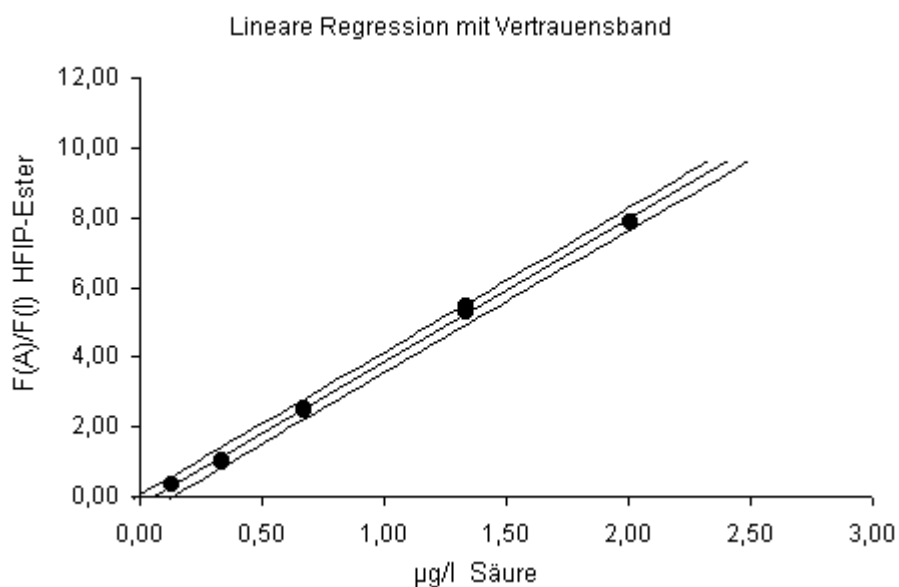
- Ausreißer (F-Test): Kalibrator 5 (Prüfgröße 13,11 > Tabellenwert 4,74)
- Kalibrierfunktion:  $F(A)/F(I) = 2,583 \times C - 0,054$
- Optimales Regressionsmodell (F-Test nach Mandel): linear (Prüfgröße 0,02 < kritischem Wert 4,84)
- Korrelationskoeffizient:  $r = 0,9997$
- Ergebnisunsicherheit: 33 %
- Irrtumswahrscheinlichkeit: 5 %
- Reststandardabweichung: 0,048
- Verfahrensstandardabweichung: 0,018
- Verfahrensvariationskoeffizient: 2,25 %
- Summe der Abweichungsquadrate: 5,83
- Normalverteilung der Residuen (R/s-Test, 95 %): ja (Prüfgröße 3,16; kritischer Wert 2,92-4,09)
- C-Mittelwert: 0,819
- Quantile (einseitig): 1,782
- Quantile (zweiseitig): 2,179
- Vertrauensbereich der Steigung: 2,540 bis 2,626
- Vertrauensbereich des Achsenabschnitts: -0,099 bis -0,010

⇒ Nachweisgrenze nach DIN 32645 für E-trans-CDCA im Urin: 0,036 µg/l

b) E-cis-CDCA:

**Tabelle 35:** Daten der Kalibrierfunktion von E-cis-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin nach DIN 32645; F(A)/F(I): Peakflächenverhältnis Analyt / interner Standard; C: Konzentration der freien Säure im Urin.

Kalibrator	C [µg/l]	F(A)/F(I)
1	0,13	0,36
2	0,34	1,00
3	0,67	2,45
4	1,34	5,40
5	2,01	7,63
6	0,13	0,37
7	0,34	0,98
8	0,67	2,49
9	1,34	5,45
10	2,01	7,84
11	0,13	0,37
12	0,34	1,01
13	0,67	2,54
14	1,34	5,31
15	2,01	7,88



**Abb. 70:** zu Tabelle 35: graphische Darstellung der Kalibrierfunktion von E-cis-CDCA (erfasst als HFIP-Ester) zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Urin; F(A)/F(I): Peakflächenverhältnis Analyt / interner Standard.

Kenndaten:

- Ausreißer (F-Test): Kalibrator 5 (Prüfgröße 5,63 > Tabellenwert 4,74)
- Kalibrierfunktion:  $F(A)/F(I) = 4,092 \times C - 0,246$
- Optimales Regressionsmodell (F-Test nach Mandel): linear (Prüfgröße 1,65 < kritischem Wert 4,84)
- Korrelationskoeffizient:  $r = 0,9990$
- Ergebnisunsicherheit: 33 %
- Irrtumswahrscheinlichkeit: 5 %
- Reststandardabweichung: 0,128
- Verfahrensstandardabweichung: 0,031
- Verfahrensvariationskoeffizient: 3,82 %
- Summe der Abweichungsquadrate: 5,83
- Normalverteilung der Residuen (R/s-Test, 95 %): ja (Prüfgröße 3,12; kritischer Wert 2,92-4,09)
- C-Mittelwert: 0,819
- Quantile (einseitig): 1,782
- Quantile (zweiseitig): 2,179
- Vertrauensbereich der Steigung: 3,976 bis 4,207
- Vertrauensbereich des Achsenabschnitts: -0,366 bis -0,125

⇒ Nachweisgrenze nach DIN 32645 für E-cis-CDCA im Urin: 0,061 µg/l

Die berechneten Nachweisgrenzen ( $P = 95 \%$ ) im dotierten Pool-Urin liegen also bei 0,04 µg/l für E-trans-CDCA und 0,06 µg/l für E-cis-CDCA. Als Nachweisgrenze wurde daher ein Wert von ca. 0,05 µg/l angegeben. Die Bestimmungsgrenze für E-cis/trans-CDCA im Urin liegt bei 0,1 µg/l, wenn, wie im vorliegenden Fall, keine Leerwerte vorliegen (Y-Achsenabschnitt der Kalibrierfunktionen  $\leq 0$ ).

Die bei der hier entwickelten Methode erreichte Nachweisgrenze ist um den Faktor 200 bis 400 niedriger als die in der bereits publizierten Methode von Leng et al. (1999), für welche Nachweisgrenzen von 10 µg/l E-trans-CDCA und 20 µg/l E-cis-CDCA angegeben wurden.

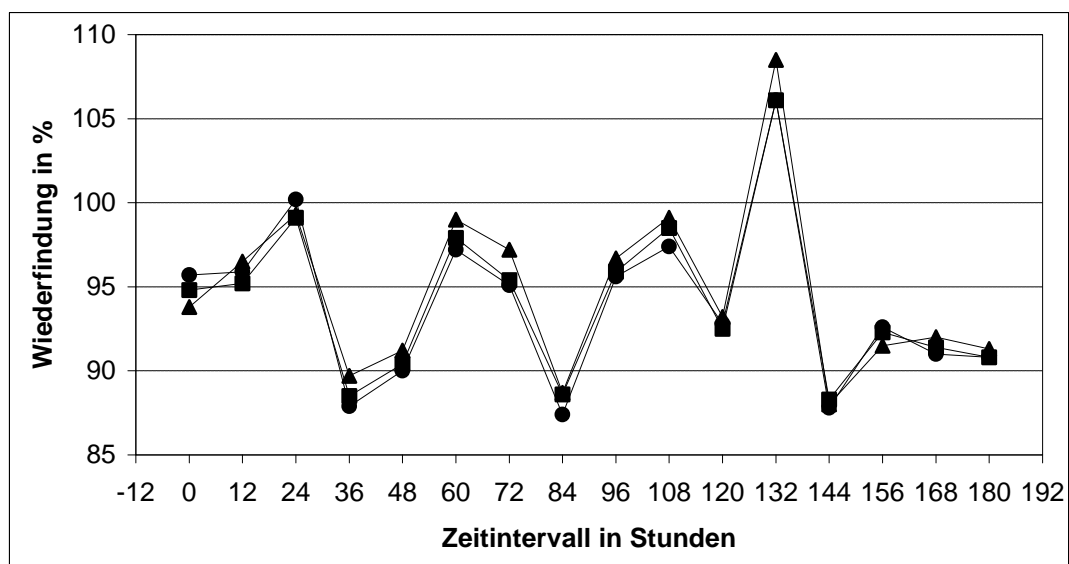


#### 4.4.10 Robustheit und Spezifität der Methode

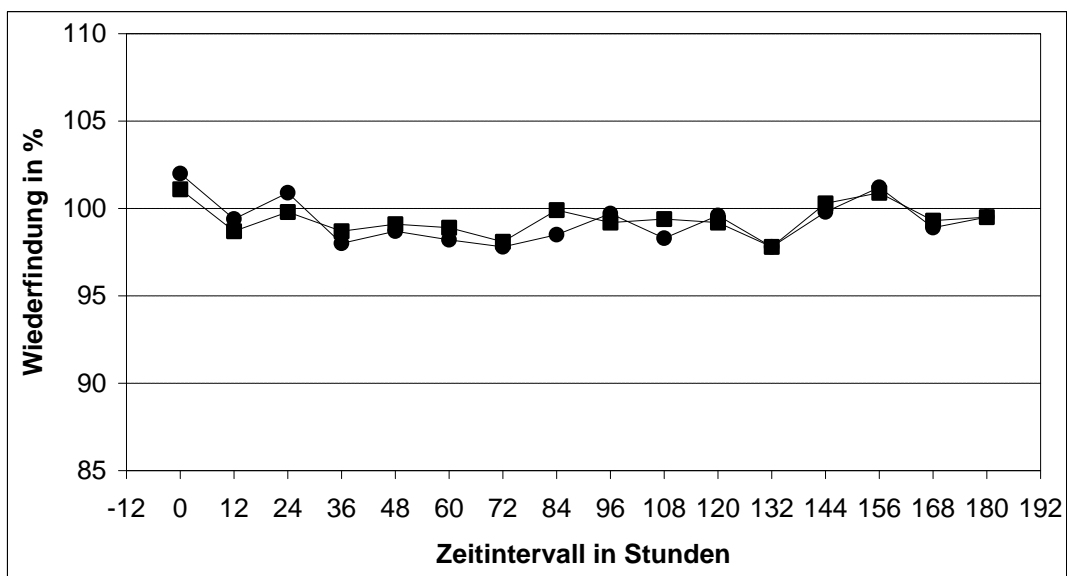
Die Robustheit der Methode wurde durch Injektion einer dotierten Urinprobe (Dotierung 25 µg/l bzw. 0,8 µg/l) in Zeitintervallen von 12 Stunden über einen Zeitraum von acht Tagen ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 36** aufgeführt. Die Ergebnisse für das höhere Konzentrationsniveau sind in **Abb. 71** und **72** graphisch dargestellt.

**Tabelle 36:** Robustheit der GC-MS(NCI) Methode, ermittelt durch wiederholte Messung einer dotierten Urinprobe (25 bzw. 0,8 µg/l): (a) gefundene Konzentrationen ausgedrückt in Prozent der Sollkonzentration ( $\pm$  relative Standardabweichungen); (b) absolute Schwankungen der Einzelwerte (maximale Differenz).

Dotierung	25 µg/l		0,8 µg/l	
Externe Kalibrierung				
	(a)	(b)	(a)	(b)
E-trans-CDCA	94 $\pm$ 5 %	19 %	95 $\pm$ 6 %	20 %
E-cis-CDCA	94 $\pm$ 5 %	18 %	95 $\pm$ 6 %	22 %
PDAA	95 $\pm$ 6 %	21 %	96 $\pm$ 6 %	24 %
Interne Kalibrierung über PDAA				
E-trans-CDCA	99 $\pm$ 1 %	3 %	99 $\pm$ 2 %	5 %
E-cis-CDCA	99 $\pm$ 1 %	4 %	99 $\pm$ 1 %	4 %



**Abb. 71:** Schwankungen der Messwerte (Normierung auf Sollkonzentration) bei externer Kalibrierung; Konzentration der Analyten in der Urinprobe: 25 µg/l. E-trans-CDCA (—●—); E-cis-CDCA (—■—); PDAA (—▲—).



**Abb. 72:** Schwankungen der Messwerte (Normierung auf Sollkonzentration) bei interner Kalibrierung; Konzentration der Analyten in der Urinprobe: 25 µg/l. E-trans-CDCA (—●—); E-cis-CDCA (—■—).

Bei externer Kalibrierung (in der Matrix) schwanken die einzelnen Messwerte der Analyten um bis zu 25 %, bei interner Kalibrierung (in der Matrix) über PDAA dagegen nur um bis zu 5 %. Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist also bei externer Kalibrierung als gut (relative Standardabweichungen von 6 %) und bei interner Kalibrierung als sehr gut (relative Standardabweichungen von 1-2 %) zu bezeichnen. Die Schwankungen auf dem niedrigeren Konzentrationsniveau waren nur unwesentlich höher.

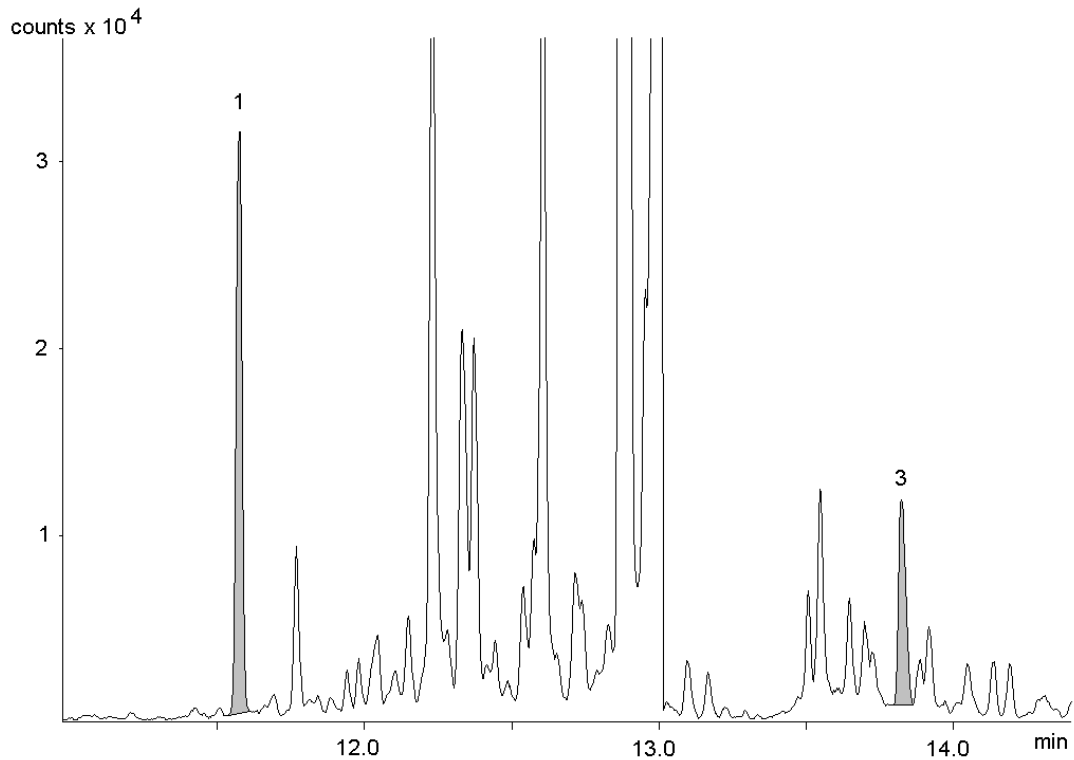
Aufgrund der selektiven Extraktion der Analyten aus der Urinmatrix, der anschließenden Derivatisierung zu elektrophilen 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-isopropyl-diestern, der gaschromatischen Auftrennung, der negativen chemischen Ionisierung (nur elektrophile Verbindungen werden erfasst) und der massenspektrometrischen Detektion im SIM-Modus (Target- und Qualifierion) konnte eine hohe Spezifität für E-cis/trans-CDCA erreicht werden. Die daraus resultierende Empfindlichkeit der Methode wird durch die niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Kapitel 4.4.9) bestätigt.

#### 4.4.11 Realproben

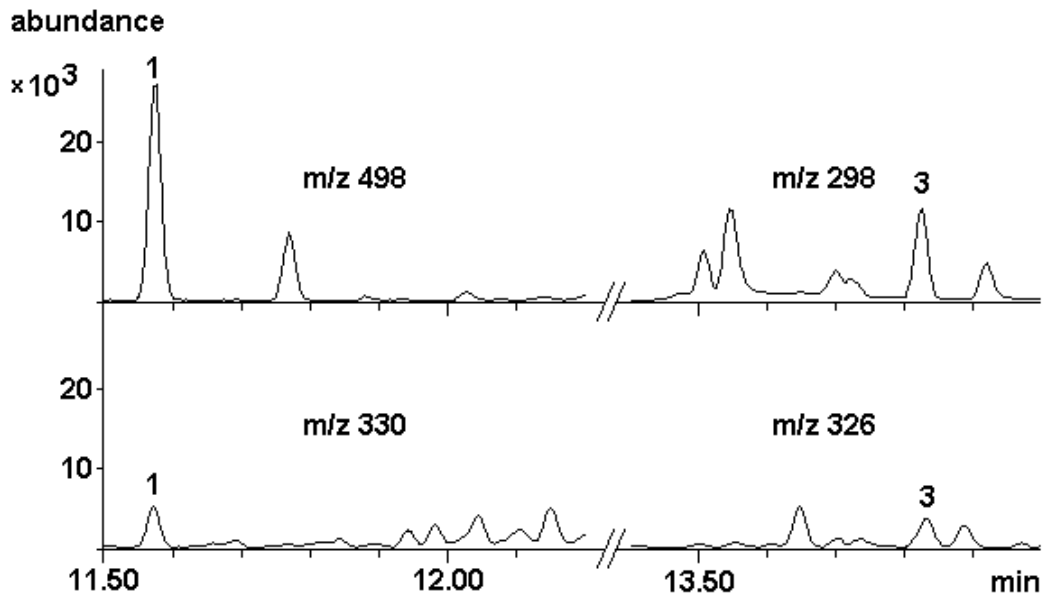
Um die Praxistauglichkeit der Methode zu testen, wurden Realproben gemäß Kapitel 3.3.3 generiert und untersucht. Die Ergebnisse der Urinuntersuchungen sind in **Tabelle 37** aufgeführt, Beispielchromatogramme finden sich in **Abb. 73 a/b**.

**Tabelle 37:** Konzentrationen von *E-trans*-CDCA in Urinproben (24 h Urin) von vier Personen nach Exposition mit *d*-Allethrin.

Probe	Urinvolumen	Konzentration	Gesamtmasse
Person A	3.2 l	2.3 µg/l	7.4 µg
Person B	1.3 l	4.1 µg/l	5.3 µg
Person C	1.1 l	6.1 µg/l	6.7 µg
Person D	1.1 l	6.2 µg/l	6.8 µg



**Abb. 73a:** TIC-Chromatogramm der Urinprobe von Person A (24 h Urin) nach Exposition mit *d*-Allethrin: (1) *E-trans*-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (3) PDAA(HFIP)<sub>2</sub>. *E-cis*-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> wurde nicht detektiert (< 0,05 µg/l).



**Abb. 73b:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Urinprobe von Person A (24 h Urin) nach Exposition mit d-Allethrin: (1) E-trans-CDCA(HFIP)<sub>2</sub>, (3) PDAA(HFIP)<sub>2</sub>. E-cis-CDCA(HFIP)<sub>2</sub> wurde nicht detektiert (< 0,05 µg/l).

Gleichzeitig wurde die Konzentration des d-Allethrins in der Raumluft bestimmt. Es wurde ein Wert von 74 µg/m<sup>3</sup> Luft ermittelt. Daraus berechnet sich eine maximal inhalierbare Dosis für d-Allethrin von 142 µg, wenn man ein Atemvolumen von 12 l/min annimmt und eine Aufenthaltsdauer im Raum von 160 Minuten berücksichtigt (eingeatmetes Luftvolumen: 1,92 m<sup>3</sup>). Bei einer vollständigen Resorption, Metabolisierung und Ausscheidung über den Harntrakt ergäben sich Metabolitkonzentrationen von 44 bis 129 µg/l. In den untersuchten Urinproben wurden, wie der Tabelle 37 zu entnehmen ist, deutlich geringere Konzentrationen (2-6 µg/l) ermittelt. Die gefundenen Werte für E-trans-CDCA stimmen bei den Einzelpersonen erstaunlich gut überein (bei Person B wurde die Urinsammlung vorzeitig abgebrochen). Es finden sich ca. 5 % des in der Raumluft vorhandenen d-Allethrins als E-trans-CDCA im Urin wieder. E-cis-CDCA dagegen konnte nicht nachgewiesen werden (< 0,05 µg/l). Dies kann mehrere Gründe haben. Der Wirkstoff d-Allethrin enthält cis- und trans-Isomere im Verhältnis 1:4, so dass die cis-Isomere von vorneherein in geringerer Konzentration vorhanden sind. Trotzdem müsste E-cis-CDCA bei den gefundenen Konzentrationen an E-trans-CDCA noch nachzuweisen sein, wenn der Metabolismus der gleiche ist. Dies ist aber,

wie bereits in Kapitel 1.3.1 geschildert, nicht der Fall. Bei cis-Isomeren erfolgt die Esterspaltung wesentlich langsamer und auf anderem Wege (oxidativ statt enzymatisch), wobei es zur cis/trans-Isomerisierung kommen kann. Die Metabolisierung der cis-Isomere ist langsamer und Metabolite mit intakter Esterbindung werden bevorzugt im Stuhl ausgeschieden. All diese Tatsachen machen es plausibel, warum E-cis-CDCA nicht gefunden werden konnte.

E-trans-CDCA hat sich in diesem Versuch als geeigneter Biomarker gegenüber einer Exposition mit Allethrin erwiesen. Die Konzentration in der Probe von Person A liegt um den Faktor 20 oberhalb der Bestimmungsgrenze der Methode. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle in den Proben der Personen A-D ermittelten Metabolitkonzentrationen deutlich unterhalb der Nachweisgrenzen der bereits publizierten Methode von Leng et al. (1999) liegen, das heißt, sie hätten mit dieser Methode nicht erfasst werden können. Damit wurde das angestrebte Ziel erreicht, eine möglichst empfindliche Methode für die Pyrethroidmetabolite E-cis/trans-CDCA zu entwickeln.

#### **4.4.12 Zusammenfassung und Ausblick zur Bestimmung von E-cis/trans-CDCA in Urin**

Es wurde eine neue, empfindliche GC-MS Methode mit negativer chemischer Ionisation zur Bestimmung von E-cis/trans-CDCA in Humanurin entwickelt. Dieser metabolische Biomarker erlaubt die Erkennung einer Exposition von Personen gegenüber Pyrethrinen, Allethrin, Resmethrin, Tetramethrin und Phenothrin, welche u. a. gängige Wirkstoffe in Formulierungen von Schädlingsbekämpfungsmitteln für Innenraumanwendungen sind. Während sich mit den in Kapiteln 4.1 bis 4.3 beschriebenen Verfahren nur die äußere Belastung des Menschen bei oder nach Innenraumanwendungen von Insektiziden und Akariziden bestimmen lässt, kann mit dieser Methode für die o.g. Wirkstoffe abgeschätzt werden, wieviel des extern vorhandenen Wirkstoffes tatsächlich vom Körper aufgenommen und metabolisiert wird. Damit erhält man ein umfassendes Bild von der tatsächlichen Belastung exponierter Personen, was eine sicherere Risikoabschätzung bzw. gesundheitliche

Bewertung erlaubt. Durch die neu entwickelte Mixed-Mode Festphasenextraktion, der Derivatisierung zu elektrophilen Hexafluorisopropylestern und der Bestimmung mit GC-MS und negativer chemischer Ionisation konnte eine niedrige Nachweisgrenze für E-cis/trans-CDCA erzielt werden. Diese hohe Empfindlichkeit ist sehr wichtig, da die Metaboliten in der Praxis nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind (unterer  $\mu\text{g/l}$  Bereich). Bereits früher publizierte Methoden konnten diese Anforderungen an die Empfindlichkeit nicht erfüllen, weshalb sie nur bedingt praxistauglich sind.

E-cis-CDCA konnte in den Realproben nicht nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob dieser Befund lediglich für diesen Fall der Exposition mit d-Allethrin zutrifft, oder ob generell nur das trans-Isomer im Urin gefunden werden kann (unterschiedliche Metabolisierungswege von E-cis- und E-trans-CDCA). Hierzu sind weitergehende Untersuchungen einer Vielzahl von Realproben notwendig. Sollte sich herausstellen, dass E-cis-CDCA in den Realproben nicht nachzuweisen ist, hätte man mit dem cis-Isomer einen idealen internen Standard.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Für die Bekämpfung von Schädlingen und Lästlingen in Innenräumen stehen dem gewerblichen und privaten Anwender eine Vielzahl an Mitteln und Präparaten zur Verfügung. Die darin als Wirkstoffe am häufigsten eingesetzten Insektizide und Akarizide gehören vorwiegend zu den Stoffklassen der Pyrethroide, Organophosphate und Carbamate. Untersuchungen haben gezeigt, dass die in Innenräumen ausgebrachten Insektizide und Akarizide auch über längere Zeiträume, z.T. über Jahre in der Luft, im Schwebstaub, im Hausstaub und auf Oberflächen (z.B. Möbel) nachzuweisen sind. Zur Beurteilung einer möglichen gesundheitlichen Belastung der Bewohner ist es notwendig, dass analytische Methoden zur Verfügung stehen, mit denen die insektiziden und akariziden Wirkstoffe in den Innenraummatrices bzw. deren Metabolite in den Körperflüssigkeiten exponierter Personen hinreichend gut bestimmt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue standardisierte Analyseverfahren zur simultanen Bestimmung häufig verwendeter Wirkstoffe (vor allem Pyrethroide, Organophosphate, Carbamate) mittels GC-MS in der Raumluft bzw. mittels HPLC-DAD und GC-MS im Hausstaub entwickelt und validiert, mit deren Hilfe eine Abschätzung der äußeren Belastung exponierter Personen möglich ist (Innenraummonitoring).

Unter Verwendung einer Kombination aus Glasfaserfilter und zwei Polyurethan (PU) -schäumen zur Luftprobenahme (Luftvolumen i.d.R. 10 m<sup>3</sup>) konnten die Insektizide und Akarizide Chlordecon, Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Diazinon, Diflubenzuron, Lindan, Fenitrothion, Fenvalerat, Fenthion, Malathion, Permethrin, Piperonylbutoxid und Propoxur nach Extraktion der Sammelmedien mittels GC-MS bis in den ng/m<sup>3</sup>-Bereich mit guten Wiederfindungsraten (85-109 %) bestimmt werden. Für die Pyrethroide Allethrin, Phenothrin, Resmethrin und Tetramethrin war eine Bestimmung der Wiederfindungsraten durch Dotierungsexperimente weniger erfolgreich. Untersuchungen mit Sprayversuchen und an Realproben zeigten aber, dass sich diese Wirkstoffe ebenfalls gut mit der Methode bestimmen lassen. Dichlorvos war aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit mit dieser Methode nicht quantifizierbar.

Diflubenzuron wurde im Injektor reproduzierbar in zwei Fragmentmoleküle gespalten, so dass eine quantitative Bestimmung zwar möglich ist, die Ergebnisse sollten jedoch mit einer nichtdestruktiven Methode (z.B. HPLC) abgesichert werden. Während Diflubenzuron, Chlordecon, Piperonylbutoxid und alle Pyrethroide bei der Luftprobenahme vollständig vom Filter zurückgehalten wurden, fanden sich Fenitrothion, Malathion und Fenthion teilweise auf dem Filter und dem ersten PU-Schaum. Lindan, Diazinon, Chlorpyrifos und Propoxur wurden ausschließlich auf dem ersten PU-Schaum wiedergefunden, Dichlorvos dagegen auf beiden PU-Schäumen.

Zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden im Hausstaub wurde sowohl eine GC-MS als auch eine HPLC-DAD Methode entwickelt und validiert. Aufgrund der geringeren Trennleistung der HPLC wurden 15 Wirkstoffe für die Untersuchungen ausgewählt. Mit beiden Methoden konnten nach Extraktion des Hausstaubs und säulenchromatographischer Aufreinigung mit Kieselgel-SPE-Kartuschen Allethrin, Chlorpyrifos, Cyfluthrin, Deltamethrin, Diazinon, Diflubenzuron, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Permethrin, Phenothrin, Piperonylbutoxid und Propoxur mit ausreichenden bis guten Wiederfindungsraten bestimmt werden (71-116 %). Die Wiederfindungsraten von Dichlorvos und Resmethrin waren dagegen bei beiden Methoden mäßig bis schlecht. Aufgrund des DAD-Detektors ist die HPLC-Methode weniger selektiv und daher relativ unempfindlich, so dass die GC-MS Methode trotz ihrer geringeren Robustheit zur Bestimmung kleiner Konzentrationen ( $\leq 1 \mu\text{g/g}$  Hausstaub) besser geeignet ist. Wird die RP-C18 Säule durch spezielle Trennsäulen (Calixarene) ersetzt, lassen sich auch chemisch ähnliche Verbindungen (z.B. Cyfluthrin und Cypermethrin) mit der HPLC nebeneinander bestimmen, was ansonsten nur mit der GC möglich ist.

Um eine ausreichende Robustheit und verlässliche quantitative Ergebnisse mit den GC-MS Methoden zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden sowohl in der Raumluft als auch im Hausstaub zu erhalten, musste in der jeweiligen Matrix kalibriert werden. Bei Kalibrierung mit Standards in reinem Lösungsmittel wurden teils erhebliche Überbefunde beobachtet. Dieser Befund beruht auf der matrixinduzierten Signalverstärkung im chromatographischen System. Das Ausmaß dieses Effektes ist sowohl abhängig von der Art der Matrix als auch von



der Art des Analyten. An Stelle der relativ aufwendigen Kalibrierung in der Matrix ist auch eine Kalibrierung über interne Standards denkbar. Als interne Standards für die Pyrethroide und Organophosphate zeigten Bifenthrin bzw. Chlorpyrifos-diethyl-d10 vielversprechende Resultate. Ob die interne Kalibrierung eine echte Alternative zur externen Kalibrierung in der Matrix darstellt, muss sich in zukünftigen Untersuchungen zeigen.

Ein kommerzieller Immunoassay (kompetitiver ELISA) für Typ II Pyrethroide wurde auf seine Tauglichkeit zur Bestimmung von Cyfluthrin und Deltamethrin in Luft- und Hausstaubproben untersucht. Die Ergebnisse wurden mit entsprechenden GC-MS Messungen verglichen. Obwohl der ELISA aufgrund seines immunologischen Prinzips etwas empfindlicher als die GC-MS Methode ist, wurden nur bei Extrakten von Luftproben vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die höhere Matrixbelastung in Hausstaubextrakten führte zu Überbefunden, die Anwesenheit von Typ I Pyrethroiden wie Permethrin zu Minderbefunden (Kreuzreaktionen). Der ELISA eignet sich wegen seiner raschen und einfachen Durchführung als Schnelltest (Screening-Verfahren) für Typ II Pyrethroide in Luft- und Hausstaubproben. Typ I Pyrethroide werden zu unempfindlich detektiert. Da der ELISA eine Summenmethode ist und die quantitativen Ergebnisse matrixabhängig variieren können, sollten die Ergebnisse mit GC-MS qualitativ und quantitativ abgesichert werden.

Des weiteren wurde eine neue, sehr empfindliche Methode zur Bestimmung von E-cis/trans-Chrysanthemumdicarbonsäure in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und negativer chemischer Ionisation entwickelt und validiert. Es handelt sich hierbei um Metabolite der Pyrethrine (insektizide Bestandteile des natürlichen Pyrethrums) und der Kurzzeitpyrethroide Allethrin, Phenothrin, Resmethrin und Tetramethrin. Die hohe Empfindlichkeit der Methode bis in den ng/l-Bereich wurde mit Hilfe einer speziell entwickelten Festphasenextraktion unter gleichzeitiger Verwendung unpolarer und ionischer Adsorbentien, der Derivatisierung der Dicarbonsäuren zu elektrophilen halogenierten Estern, der hohen Trennleistung in der Gaschromatographie und der spezifischen Detektionsart erreicht. Die Wiederfindungen der Metabolite bewegten sich zwischen 92 und 104 Prozent. Die in den Realproben (Exposition

mit d-Allethrin) gemessenen Konzentrationen an E-trans-Chrysanthemumdicarbonsäure lagen unter den Nachweisgrenzen bereits publizierter Methoden, wodurch die Praxistauglichkeit der neu entwickelten Methode auch im Spurenbereich bestätigt wird. Inwieweit E-cis-Chrysanthemumdicarbonsäure, welche in den gemessenen Realproben nicht detektiert werden konnte, überhaupt als Metabolit der genannten Wirkstoffe im Urin auftritt, müssen zukünftige Untersuchungen weiterer Realproben zeigen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analyseverfahren zur Bestimmung von Insektiziden und Akariziden in Innenräumen erlauben es, die äußere Belastung der Bewohner sicher zu erfassen. Durch die Bestimmung von Biomarkern wie Chrysanthemumdicarbonsäure ist es darüber hinaus möglich, Aussagen zur inneren Belastung exponierter Personen zu machen, d.h. Informationen darüber zu bekommen, wie viel des extern vorhandenen Wirkstoffes vom Körper aufgenommen und metabolisiert wird. Die Kombination dieser beiden Vorgehensweisen (Innenraummonitoring und Biomonitoring) macht somit die Risikoabschätzung und gesundheitliche Bewertung noch sicherer.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Ad-hoc AG** (1996), Richtwerte für die Innenraumlufte: Basisschema, BGesBl. 39, S. 422

**Ad-hoc AG** (1997), Richtwerte für die Innenraumlufte: Pentachlorphenol, BGesBl. 40, S. 234

**Angerer J.** und **Ritter A.** (1997), Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry, J. Chromatogr. B 695, S. 217

**Appel K. E.** und **Michalak H.** (1994), Zur Toxikologie der Pyrethroide, VDI Berichte 1122 : Luftverunreinigung von Innenräumen, Düsseldorf, S. 401

**Aprea C.,** **Sciarra G.,** **Sartorelli P.,** **Ceccarelli F.,** **Centi L.** (1999), Multiroute Exposure Assessment and Excretion of Urinary Metabolites of Fenitrothion During Manual Operations on Treated Ornamental Plants in Greenhouses, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, S. 490

**Aprea C.,** **Colosio C.,** **Mammone T.,** **Minoia C.,** **Maroni M.** (2002), Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods, J. Chromatogr. B 769, S. 191

**Arrebola F. J.,** **Martinez-Vidal J. L.,** **Fernandez-Gutierrez A.,** **Akhtar M. H.** (1999), Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography - tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta 401, S. 45

**ASTM** (1999), American Society for Testing and Materials, Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.03, West Conshohoken PA (USA)

**Baker S. E., Barr D. B., Driskell W. J., Beeson M. D., Needham L. L. (2000),** Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 10, S. 789

**Ball M., Herrmann T., Wildeboer B., Koss G., Sagunski H., Czaplenski U. (1993),** Indoor pollution by pyrethroids: Sampling, analysis, risk evaluation, *Indoor Air* 2, S. 201

**BAM (2000 und 2002),** Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Ergebnisberichte des 2. und 3. Ringversuchs zur quantitativen NMR, Berlin

**Barker S. A. (2000),** Matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A* 885, S. 115

**Barr D. B. und Needham L. L. (2002),** Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review, *J. Chromatogr. B* 778, S. 5

**Barr D. B., Barr J. R., Maggio V. L., Whitehead R. D. Jr., Sadowski M. A., Whyatt R. M., Needham L. L. (2002),** A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 778, S. 99

**Batey J. H. (1987),** Quadrupole gas analysers, *Vacuum* 37, S. 659

**Beeson M.D., Driskell W. J., Barr D. B. (1999),** Isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Anal. Chem.* 71, S. 3526

**Berger-Preiss E., Preiss A., Sielaff K., Raabe M., Ilgen B., Levsen K. (1997a),** The Behaviour of Pyrethroids Indoors: A Model Study, *Indoor Air* 7, S. 248

**Berger-Preiss E., Levsen K., Preiss A. (1997b),** Analysis of Individual Natural Pyrethrins in Indoor Matrices by HRGC/ECD, *J. High Res. Chromatogr.* 20, S. 284

**Berger-Preiss E., Levsen K., Leng G., Idel H., Sugiri D., Ranft U. (2002),** Indoor pyrethroid exposure in homes with woollen textile floor coverings, *Int. Hyg. Environ. Health* 205, S. 459

**BfR (2003),** Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, Herausgeber: Bundesinstitut für Risikobewertung, Beuth Verlag, Berlin, Stand 07/2003

**BgVV (2000),** Bekanntmachungen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin: Bekanntmachung der geprüften und anerkannten Mittel und Verfahren zur Bekämpfung von tierischen Schädlingen nach §10c Bundesseuchengesetz, 17. Ausgabe, BGesBl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz, 43/Suppl.2, S. 562

**BgVV (2002a),** Stellungnahme zur Gesundheitsgefährdung durch Pyrethroide - neue Ansätze zur Lösung des Problems, 05.04.2002

**BgVV (2002b),** Bekanntmachung eines Nachtrags der geprüften und anerkannten Mittel und Verfahren zur Bekämpfung von tierischen Schädlingen nach § 18 Infektionsschutzgesetz, BGesBl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 45, S. 466

**Bidleman T. F. und Olney C. E. (1974),** High-volume Collection of Atmospheric Polychlorinated Biphenyls, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11, S. 442

**Biozidgesetz (2002),** Gesetz zur Umsetzung der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Februar 1998 über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten, BGBl. I, Nr. 40, 27.06.2002, S. 2076

**Biozidverordnung (2002),** Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Februar 1998 über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten und zur Änderung chemikalienrechtlicher Verordnungen, BGBl. I, Nr. 40, 04. Juli 2002, S. 2514

**Blau K.** und King G. S. (1978), Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden & Son Ltd., London

**BMBF** (2001), Pyrethroidexposition in Innenräumen, Hrsg. BMBF und IVA, Düsseldorf

**Böcker J.** (1997), Chromatographie, 1. Auflage, Vogel Buchverlag, Würzburg

**Budde W. L.** (2001), Analytical mass spectrometry: strategies for environmental and related applications, AOAC, Washington D.C. (USA)

**Budzikiewicz H.** (1992), Massenspektrometrie, Eine Einführung, 3. Auflage, VCH, Weinheim

**Butte W.,** Walker G., Heinzow B. (1998), Referenzwerte der Konzentration von Permethrin-Metaboliten  $\text{Cl}_2\text{CA}$  [3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure] und 3-PBA [3-Phenoxybenzoesäure] im Urin, Umweltmed. Forsch. Prax. 3, S. 21

**Butte W.,** Hoffmann W., Ostrup O., Schmidt A., Walker G. (2001), Endokrin wirksame Substanzen im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings, Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 61/1-2, S. 19

**Campana J. E.** (1980), Elementary theory of the quadruple mass filter, Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 33, S.101

**Chapman J. R.** (1994), Practical Organic Mass Spectrometry, Wiley, Chichester (UK)

**Casida J. E.** (1973), Biochemistry of the Pyrethrins, in Casida J. E. (Ed.), Pyrethrum the natural insecticide, Academic Press, New York

**Casida J. E.** und Quistad G. B. (1995), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses, Oxford University Press, Oxford, UK

**Chambers** J. (1980), An introduction to the metabolism of pyrethroids, Residue Reviews 73, S. 101

**ChemG** (2002), Chemikaliengesetz - Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen, Fassung vom 20. Juni 2002, BGBl. Teil I, Nr. 40 vom 27.06.2002, S. 2090; 06.08.2002, S. 3082; Hinweise auf Änderungen vom 20.06.2002, BGBl. I, Nr. 40 vom 27.06.2002, S. 2076

**Christen** H. C. und Vögtle F. (1988), Organische Chemie Band 1, 1. Auflage, Salle und Sauerländer, Frankfurt a. M.

**Class** T. J. (1991), Determination of Pyrethroids and their Degradation Products in Indoor Air and on Surfaces by HRGC-ECD and HRGC-MS(NCI), J. High Res. Chromatogr. 14, S. 446

**Cremllyn** R. J. (1991), Agrochemicals: Preparation and Mode of Action, Wiley and Sons, New York

**Crombie** L., Harper S. H., Sleep K. C. (1957), Experiments on the Synthesis of the Pyrethrins. Part VIII. Total Synthesis of ( $\pm$ )-cis- and -trans-Chrysanthemumdicarboxylic Acid, ( $\pm$ )-cis- and -trans-Pyrethric Acid, and Rethrins II, J. Chem. Soc., Part II 531, S. 2743

**Cserhati** T. (2002), Mass spectrometric detection in chromatography. Trends and perspectives, Biomed. Chromatogr. 16, S. 303

**Darvas** B. und Polgar L. A. (1998), in Ishaaya I., Degheele D. (Eds.), Insecticides with Novel Modes of Action, Springer, Berlin, S. 186

**DFG** (1999), Deutsche Forschungsgemeinschaft, Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2, Analysen in biologischem Material, 13. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim

**DFG** (2000), Deutsche Forschungsgemeinschaft, Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 1, Luftanalysen, 14. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim, S. 104

**DFG** (2002), Deutsche Forschungsgemeinschaft, MAK- und BAT-Wert-Liste 2002, 35. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim

**DIN 32645** (1994), Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung, Beuth Verlag, Berlin

**Dressler M.** (1986), Selective gas chromatographic detectors, Journal of Chromatography Library Vol. 36, Elsevier, Amsterdam

**Driskell W. J., Groce D. F., Hill R. H. Jr.** (1991), Methomyl in the blood of a pilot who crashed during aerial spraying, J. Anal. Toxicol. 15, S. 339

**Drozd J.** (1981), Chemical Derivatization in Gas Chromatography, Elsevier, Amsterdam

**GefStoffV** (1999), Gefahrstoffverordnung – Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen, Neufassung vom 15. November 1999, BGBl. I 1999, S. 2233; 2000, S. 739, 747, 932, 1045; 04.07.2002, S. 2514; 06.08.2002, S. 3082; 13.08.2002, S. 3185; 15.08.2002, S. 3302; 27.09.2002, S. 3777; 15.10.2002, S. 4123

**EC** (2000), European Commission, Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption, Final Report, Delft

**EHC** (WHO), Environmental Health Criteria, International Programme on Chemical Safety, The World Health Organisation, Geneva: Allethrins (No. 87, 1989), Carbamate Pesticides (No. 64, 1986), Chlordecon (No. 43, 1984), Cyhalothrin (No. 99, 1990), Cypermethrin (No. 82, 1989), Deltamethrin (No. 97, 1990), Diazinon (No. 198, 1997), Dichlorvos (No. 79, 1988), Diflubenzuron (No. 184, 1996), Fenitrothion



(No. 133, 1992), Fenvalerate (No. 95, 1990), Lindan (No. 124, 1991), Organophosphorus Pesticides (No. 63, 1986), Permethrin (No. 94, 1990), d-Phenothrin (No. 96, 1990), Resmethrins (No. 92, 1989), Tetramethrin (No. 98, 1990)

**Engelhardt H.** (1977), Hochdruckflüssigkeitschromatographie, 2. Auflage, Springer, Heidelberg

**Englert N.** (1997), Richtwerte für die Innenraumluft: Kohlenmonoxid, BGesBl. 40, S. 9

**Englert N.** (1998), Richtwerte für die Innenraumluft: Stickstoffdioxid, BGesBl. 41, S. 425

**EPA** (1996), US Environmental Protection Agency, Prevention Pesticides and Toxic Substances, Occupational and Residential Exposure Test Guidelines, Biological Monitoring OPPTS 875.1500, EPA 712-C-96-264

**EPA** (2002), Environmental Protection Agency, Lindane RED Facts, EPA-738-F-02-011, September 2002

**Erney D. R.** und **Pawlowski T. M.** (1997), Matrix-Induced Peak Enhancement of Pesticides in Gas Chromatography: Is There a Solution?, J. High Resol. Chromatogr. 20, S. 375

**Fischer A. B.** und **Eikmann T.** (1996), Improper use of an insecticide at a kindergarten, Toxicol. Lett. 88, S. 359

**Foreman W. T.**, **Majewski M. S.**, **Goolsby D. A.**, **Wiebe F. W.**, **Coupe R. H.** (2000), Pesticides in the atmosphere of the Mississippi River Valley, part II - air, Sci. Total Environ. 248, S. 213

**Forth W.**, **Henschler D.**, **Rummel W.** (2001), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl., Urban und Fischer, München

**Frehse** H. und Thier H.-P. (1991), Die Ermittlung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept, GIT Fachz. Lab. 35, S. 285

**Frenzel** T., Sochor H., Speer K., Uihlein M. (2000), Rapid Multimethod for Verification and Determination of Toxic Pesticides in Whole Blood by Means of Capillary GC-MS, J. Anal. Toxicol. 24, S. 365

**Friedrich** C., Becker K., Hoffmann G., Hoffmann K., Krause C., Nöllke P., Schulz C., Schwabe R., Seiwert M. (1998), Pyrethroide im Hausstaub der deutschen Wohnbevölkerung – Ergebnisse zweier bundesweiter Querschnittsstudien, Gesundh. Wes. 60, S. 96

**Fromme** H. (1995), Pyrethroide in Innenräumen, IAS-Mitteilung Bd. 18, S. 24

**Funk** W., Dammann V., Donnevert G. (1992), Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH, Weinheim

**Godejohann** M. und Preiss A. (1998), Quantitative Measurements in Continuous-Flow HPLC/NMR, Anal. Chem. 70, S. 590

**Gordon** S. M., Callahan P. J., Nishioka M. G., Brinkman M. C., O'Rourke M. K., Lebowitz M. D., Moschandreas D. J. (1999), Residential environmental measurements in the National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS) pilot study in Arizona: preliminary results for pesticides and VOCs, J. Expos. Anal. Environ. Epidem. 9, S. 456

**Gross** M. L. und Caprioli R. M. (2003), The encyclopedia of mass spectrometry, Elsevier, Amsterdam

**Guardino** X., Obiols J., Rosell M. G., Farran A., Serra C. (1998), Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A 823, S. 91

**Günther** H. (1998), NMR spectroscopy, 2nd ed., Wiley, New York

**Gupta** H. C. L. (1999), Insecticides: Toxicology and Uses, Agrotech Publishing Academy, Udaipur, Indien

**Hajslova** J., Holadova K., Kocourek K., Poustka J., Godula M., Cuhra P., Kempny M. (1998), Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues, J. Chromatogr. A 800, S. 283

**Haraguchi** K., Kitamura E., Yamashita T., Kido A. (1994), Simultaneous Determination of Trace Pesticides in Urban Air, Atmos. Environ. 28, S. 1319

**Hardt** J. und Angerer J. (1999), Gas chromatographic method with mass-selective detection for the determination of 2-isopropoxyphenol in human urine, J. Chromatogr. B 723, S. 139

**Harper** M. (2000), Sorbent trapping of volatile organic compounds from air, J. Chromatogr. A 885, S. 129

**Harrison** A. G. (1992), Chemical Ionization Mass Spectrometry, CRC Press, Boca Raton (USA)

**Haug** G. und Hoffmann H. (1989), Chemistry of Plant Protection, Vol. 2, Degradation of Pesticides, Desiccation and Defoliation, ACh-Receptors as Targets, Springer, Berlin

**HBM** (1996a), Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, Konzept der Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte in der Umweltmedizin, BGesBl. 39/6, S. 221

**HBM** (1996b), Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, Human-Biomonitoring: Definitionen, Möglichkeiten und Voraussetzungen, BGesBl. 39/6, S. 213

**HBM** (1999): Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, Reference Values and human biological monitoring values for environmental toxins, Int. Arch. Occup. Environ. Health 72, S. 255

**Helmig D.** (1999), Air analysis by gas chromatography, J. Chromatogr. A 843, S. 129

**Hennion M.-C.** (1999), Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, J. Chromatogr. A 856, S. 3

**Herzel R.** und **Lahmann E.** (1975), Determination of insecticides in atmospheric air using filters, Gesundh.-Ing. 93, S.202

**Hesse M., Meier H., Zeeh B.** (2002), Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart

**Heudorf U.** und **Angerer J.** (2001a), Metabolites of Organophosphorous Insecticides in Urine Specimens from Inhabitants of a Residential Area, Environ. Res. A 86, S. 80

**Heudorf U.** und **Angerer J.** (2001b), Metabolites of Pyrethroid Insecticides in Urine Specimens: Current Exposure in an Urban Population in Germany, Environ. Health Pers. 109, S. 213

**Hock B., Dankwardt A., Kramer K., Marx A.** (1995), Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis, Analytica Chimica Acta 311, S. 393

**Hong S., Kim J., Lemley A. T., Obendorf S. K., Hedge A.** (2001), Analytical method development for 18 pesticides in house dust and settled residues using SEC, SPE, TMS methylation, and GC-MS, J. Chromatogr. Sci. 39, S. 101

**Hsu J. P., Wheeler H. G. Jr., Camann D. E., Schattenberg H. J.** (1988), Analytical Methods for Detection of Nonoccupational Exposure to Pesticides, J. Chromatogr. Sci. 26, S. 181

**Huber** W. und George S. A. (1993), Diode Array Detectors in HPLC, Marcel Dekker, New York

**Hübschmann** H.-J. (1996), Handbuch der GC/MS, VCH, Weinheim

**ISO** (1988), Pesticides and other agrochemicals – Principles for the selection of common names, ISO 257, Genf

**ISO** (1999), Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien, ISO 17025, Beuth Verlag, Berlin

**IVA** (2000), Industrieverband Agrar, Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, BLV, München

**IVA** (2003), Industrieverband Agrar, Jahresbericht 2002/2003, Frankfurt a.M.

**Jandera** P. und Churacek K. (1985), Gradient Elution in Column Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam

**Jatzwauk** L. und Schöne H. (2000), Aseptica, 6. Jahrgang, Heft 2, S. 3

**Jennings** K. R. (1979), Chemical ionization mass spectrometry, in Bowers M. T., Gas Phase Ionization Chemistry, Academic Press, New York

**Jennings** W. G. und Rapp A. (1983), Sample Preparation for Gas Chromatographic Analysis, Hüthig, Heidelberg

**Karasek** F. W. und Clement R. E. (1988), Basic Gas Chromatography - Principles and Techniques, Elsevier, Amsterdam, S. 41

**Kasler** F. (1973), Quantitative Analysis by NMR Spectroscopy, Academic Press, New York

**Katsura** E., Ogawa H., Kojima H., Fukushima A. (1996), Indoor Air Pollution by Chlorpyrifos and S-421 after Application for Termite Control, Jpn. J. Toxicol. Environ. Health 42, S.354

**Kientz** C. E. (1998), Chromatography and mass spectrometry of chemical warfare agents, toxins and related compounds: state of the art and future prospects, J. Chromatogr. A 814, S. 1

**Knapp** D. R. (1979), Handbook of Analytical Derivatization Reactions, Wiley, New York

**Knowles** A. (2001), Trends in Pesticide Formulations, Agrow Reports, PJB Publications, London

**Krause** C., Becker K., Bernigau W., Hoffmann K., Nöllke P., Schulz C., Schwabe R., Seiwert M. (1995), Umweltsurvey in den fünf neuen Ländern der Bundesrepublik Deutschland 1991/92 (unter Berücksichtigung der Erhebungen in den alten Ländern 1990/91 und 1985/86), Forschungsbericht 11606088/02 im Auftrag des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

**Kühn** K.-H., Leng G., Bucholski K. A., Dunemann L., Idel H. (1996), Determination of Pyrethroid Metabolites in Human Urine by Capillary Gas Chromatography - Mass Spectrometry, Chromatographia 43, S. 285

**Kuo** H.-W. und Lee H.-M. (1999), Volatility of Propoxur from Different Surface Materials Commonly Found in Homes, Chemosphere 38, S. 2695

**Leahey** J. P. (1985), The Pyrethroid Insecticides, Taylor & Francis, London

**Lee** H. J., Shan G., Watanabe T., Stoutamire D. W., Gee S. J., Hammock B. D. (2002), Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid deltamethrin, J. Agric. Food Chem. 50, S. 5526

**Leidy** R. B. und **Wright** C. G. (1991), Trapping Efficiency of Selected Adsorbents for Various Airborne Pesticides, *J. Environ. Sci. Health* 26, S. 367

**Leng** G., **Kühn** K.-H., **Dunemann** L., **Idel** H. (1996), Gaschromatographische und massenspektrometrische Methode zum Nachweis ausgewählter Pyrethroidmetabolite im Urin, *Zbl. Hyg.* 198, S. 443

**Leng** G., **Kühn** K.-H., **Leng** A., **Gries** W., **Lewalter** J., **Idel** H. (1997a), Determination of Trace Levels of Pyrethroid Metabolites in Human Urine by Capillary Gas Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry with Negative Chemical Ionization, *Chromatographia* 46, S. 265

**Leng** G., **Leng** A., **Kühn** K.-H., **Lewalter** J., **Pauluhn** J. (1997b), Human dose-excretion studies with the pyrethroid cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation, *Xenobiotica* 27, S. 1273

**Leng** G., **Kühn** K.-H., **Wieseler** B., **Idel** H. (1999), Metabolism of (S)-Bioallethrin and related compounds in humans, *Toxicol. Lett.* 107, S. 109

**Lewis** G., **Fortune** C. R., **Blanchard** F. T., **Camann** D. E. (2001), Movement and Deposition of Two Organophosphorus Pesticides within a Residence after Interior and Exterior Applications, *J. Air Waste Managmt. Assoc.* 51, S. 339

**Link** B. (1999), Richtwerte für die Innenraumluft: Quecksilber, *BGesBl.* 42, S. 168

**Lioy** P. J., **Edwards** R. D., **Freeman** N., **Gurunathan** S., **Pellizzari** E., **Adgate** J. L., **Quackenboss** J., **Sexton** K. (2000), House dust levels of selected insecticides and herbicide measured by the EL and LWW samplers and comparisons to hand rinses and urine metabolites, *J. Expos. Anal. Environ. Epidem.* 10, S. 327

**Majewski** M. S., **Foreman** W. T., **Goolsby** D. A., **Nakagaki** N. (1998), Airborne pesticide residues along the Mississippi River, *Environ. Sci. Technol.* 32, S. 3689

**Mardones** C., Rios A., Valcarcel M. (2000), Automatic on-line coupling of supercritical fluid extraction and capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 72, S.5736

**Martinez-Fernandez** J., Parrilla-Vazquez P., Martinez-Vidal J. L. (2000), Analysis of N-methylcarbamates insecticides and some of their main metabolites in urine with liquid chromatography using diode array detection and electrospray mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 412, S. 131

**Matoba** Y., Takimoto Y., Kato T. (1998), Indoor Behavior and Risk Assessment Following Space Spraying of d-Tetramethrin and d-Resmethrin, *AIHA J.* 59, S. 181

**Maurer** H. H. (2002), Role of gas chromatography - mass spectrometry with negative ion chemical ionization in clinical and forensic toxicology, doping control, and biomonitoring, *Ther. Drug Monit.* 24, S. 247

**McLafferty** F. W., Turecek F. (1993), Interpretation of Mass Spectra, University Science Books, Mill Valley, 4. Auflage, S. 283

**Message** G. A. (1984), Practical Aspects of Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Wiley, Toronto

**Meyer** V. R. (1992), Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 7. Auflage, Salle und Sauerländer, Frankfurt a. M.

**Millet** M., Wortham H., Sanusi A., Mirabel P. (1996), A Multiresidue Method for Determination of Trace Levels of Pesticides in Air and Water, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, S. 542

**Moate** T. F., Lu C., Fenske R. A., Hahne R. M. A., Kalman D. A. (1999), Improved Cleanup and Determination of Dialkyl Phosphates in the Urine of Children Exposed to Organophosphorus Insecticides, *J. Anal. Toxicol.* 23, S. 230



**Moate** T. F., Furia M., Curl C., Muniz J. F., Yu J., Fenske R. A. (2002), Size exclusion chromatographic cleanup for GC/MS determination of organophosphorus pesticide residues in household and vehicle dust, J. AOAC Int. 85, S. 36

**Moldoveanu** S. C. und David R. (2002), Sample Preparation in Chromatography, Elsevier, Amsterdam

**Mukerjee** S., Ellenson W. D., Lewis R. G., Stevens R. K., Somerville M. C., Shadwick D. S., Willis R. D. (1997), An environmental scooping study in the lower Rio Grande Valley of Texas – III. Residential microenvironmental monitoring for air, house dust, and soil, Environ. Int. 23, S. 657

**Murayama** H., Mukai H., Mitobe H., Moriyama N. (2000), Simple Method for Determining Trace Pesticides in Air Using Extraction Disks, Anal. Sci. 16, S. 257

**Nielsen** G. D., Hansen L. F., Wolkoff P. (1997), Chemical and Biological Evaluation of Building material Emissions. II. Approaches for Setting Indoor Air Standards or Guidelines for Chemicals, Indoor Air 7, S. 17

**Niessen** W. M. A. (1999), State-of-the-art in liquid chromatography – mass spectrometry, J. Chromatogr. A 856, S. 179

**Niessen** W. M. A. (2001), Current Practice of Gas Chromatography - Mass Spectrometry, Marcel Dekker, New York

**NIST** (2002), National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Program, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, Gaithersburg MD (USA)

**Oehme** M. (1994), Quantification of fg-pg amounts by electron capture negative ion mass spectrometry - Parameter optimisation and practical advices, Fresenius J. Anal. Chem 350, S. 544

**Oehme** M. (1996), Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen, Hüthig, Heidelberg

**Oepkemeier** S., Schreiber S., Breuer D., Key G., Kleiböhmer W. (1999), Determination of permethrin in indoor air by liquid chromatography with enzyme linked immunosorbent assay, *Analytica Chimica Acta* 393, S. 103

**Olsson** A., Sadowski M. A., Barr D. B. (2001), Centers of Disease Control and Prevention, unpublished work

**Otto** M. (1995), *Analytische Chemie*, VCH, Weinheim

**Parris** N. A. (1984), *Instrumental Liquid Chromatography*, 2. Auflage, Elsevier, Amsterdam

**Pawliszyn** J. (Ed.) (2002), *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, in Barcelo D. (Ed.), *Comprehensive analytical Chemistry*, Vol. 37, Elsevier, Amsterdam

**Perkow** W. und Ploss H. (2002), *Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, 7. Lieferung, Parey, Berlin

**PIP**, Pesticide Information Profiles, Extension Toxicology Network, Universities of Davis CA, Oregon State, Michigan State, Idaho and Cornell University. Homepage: <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/>

**Plimmer** J. R. (2003), *Encyclopedia of Agrochemicals*, Vol. 3, Wiley & Sons, Hoboken NJ, USA

**Pluschke** P. (1996), *Luft-Schadstoffe in Innenräumen*, Springer, Berlin

**Poole** C. F. (2003), New trends in solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 22, S. 362

**Ramesh** A. und Vijayalakshmi A. (2001), Monitoring of allethrin, deltamethrin, esbiothrin, prallethrin and transfluthrin in air during the use of household mosquito repellents, *J. Environ. Monit.* 3, S. 191

**Rehwagen** M., Rolle-Kampczyk U., Diez U., Borte M., Herbarth O. (2000), Untersuchung von Hausstaub aus Leipziger Wohnungen auf den Gehalt ausgewählter Pyrethroide, Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 60, S. 305

**Riegner** K. und Schmitz J. R. (1994), Production of a test atmosphere and separation of gaseous and particle-bound crop-protection agent residues from air in Tenax sampling tubes, Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 47, S. 157

**Roche** (1999), Lexikon der Medizin, Urban und Fischer, München

**Roinestad** K. S., Louis J. B., Rosen J. D. (1993), Determination of Pesticides in Indoor Air and Dust, J. AOAC Int. 76, S. 1121

**Rosen** J. D. (1987), Applications of New Mass Spectrometry Techniques in Pesticide Chemistry, Wiley, New York

**Sagunski** H. (1996), Richtwerte für die Innenraumluft: Toluol, BGesBl. 39, S. 416

**Sagunski** H. (1998), Richtwerte für die Innenraumluft: Styrol, BGesBl. 41, S. 392

**Sagunski** H. und Roskamp E. (2002), Richtwerte für die Innenraumluft: Tris(2-chlorethyl)phosphat, BGesBl. 45, S. 300

**Salthammer** T. (1999), Organic Indoor Air Pollutants, Wiley-VCH, Weinheim

**Sancho** J. V., Pozo O. J., Hernandez F. (2000), Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry, Rapid Communic. Mass Spectrom. 14, S. 1485

**Schenk** G., Rothweiler H., Schlatter C. (1997), Human Exposure to Airborne Pesticides in Homes Treated with Wood Preservatives, Indoor Air 7, S. 135

**Schettgen** T., Koch H. M., Drexler H., Angerer J. (2002), New gas chromatographic - mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine, J. Chromatogr. B 778, S. 121

**Schwedt** G. (1994), Chromatographische Trennmethode, Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart

**Schwedt** G. (1996), Taschenatlas der Analytik, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart

**Scott** R. P. W. (1986), Liquid Chromatography Detectors, 2. Auflage, Elsevier, Amsterdam

**Seifert** B. (1999), Richtwerte für die Innenraumluft: TVOC, BGesBl. 42, S. 270

**Shan** G., Leeman W. R., Stoutamire D. W., Gee S. J., Chang D. P. Y., Hammock B. D. (2000), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Permethrin, J. Agric. Food Chem. 48, S. 4032

**Siebers** J. und Mattusch P. (1996), Determination of airborne residues in greenhouses after application of pesticides, Chemosphere 33, S. 1597

**Simpson** N. J. K. (2000), Solid-Phase Extraction, Marcel Dekker Inc., New York

**Skoog** D. A. und Leary J. J. (1996), Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen, Springer, Heidelberg

**Sogorb** M. A. und Vilanova E. (2002), Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, Toxicol. Lett. 128, S. 215

**Sokoließ** T., Jira T., Menyes U., Roth U. (2001), Calixarenbelegte Kieselgele - neue Alternativen zur Trennung pharmazeutischer Wirkstoffe, GIT Spezial Separation 1/2001 S. 50

**Spengler** J. D. (2001), Indoor Air Quality Handbook, McGraw-Hill, New York

**SRU** (1988), Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen, Umweltgutachten 1987, Bundestagsdrucksache 11/1568

**Taylor** W. G., Vedres D. D., Hall T. W. (1997), Capillary gas chromatographic determination of permethrin insecticide by transesterification, J. Chromatogr. B 690, S. 123

**Thier** H.-P. und Frehse H. (1986), Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Thieme Verlag, Stuttgart

**Tomlin** C. D. S. (2000), The Pesticide Manual, 12<sup>th</sup> Ed., The British Crop Protection Council

**TRGS 523** (2001), Schädlingsbekämpfung mit sehr giftigen, giftigen und gesundheitsschädlichen Stoffen und Zubereitungen, Ausgabe März 1996, zuletzt geändert: BArbBl. Heft 9/2001

**TRGS 900** (2000), Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz, Ausgabe Oktober 2000, zuletzt geändert BArbBl. Heft 6/2003

**Turner** B. C. und Glotfelty D. E. (1977), Field Air Sampling of Pesticide Vapors with Polyurethane Foam, Anal. Chem. 49, S. 7

**Van der Hoff** G. R. und van Zoonen P. (1999), Trace analysis of pesticides by gas chromatography, J. Chromatogr. A 843, S. 301

**Van Dyk** L. P. und Visweswariah K. (1975), Pesticides in air: Sampling methods, Residue Rev. 55, S. 91

**VDI-Richtlinie 2100, Blatt 1 (2000, Entwurf), Messen gasförmiger Verbindungen in der Außenluft, Messen von Innenraumluftverunreinigungen, Gaschromatografische Bestimmung organischer Verbindungen, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 2463, Blatt 1 (1999a), Messen von Partikeln, Gravimetrische Bestimmung der Massenkonzentration von Partikeln in der Außenluft, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 4, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 2463, Blatt 7 (1982), Messen von Partikeln, Messen der Massenkonzentration (Immission), Filterverfahren, Kleinfiltergerät GS050, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 4, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 4300, Blatt 1 (1995), Messen von Innenraumluftverunreinigungen, Allgemeine Aspekte der Messstrategie, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 4300, Blatt 2 (1997a), Messen von Innenraumluftverunreinigungen, Messstrategie für PAH, PCDD und PCB, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 4300, Blatt 4 (1997b), Messen von Innenraumluftverunreinigungen, Messstrategie für PCP und Lindan, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, Beuth-Verlag, Berlin**

**VDI-Richtlinie 4300, Blatt 8 (1999b, Entwurf), Messen von Innenraumluftverunreinigungen, Probennahme von Hausstaub, VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, Beuth-Verlag, Berlin**

**Walker G., Hostrup O., Hoffmann W., Butte W. (1999), Biozide im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings in Innenräumen, Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 59/1-2, S. 33**

**Watanabe** T., Shan G., Stoutamire D. W., Gee S. J., Hammock B. D. (2001), Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides, *Analytica Chimica Acta* 444, S. 119

**Wegler** R. (1970), *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Band 1, Springer, Berlin

**Weller** M. G. (1997), Immunoassays für die Umweltanalytik, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 45, S. 1090

**WHO** (2000), Why aircraft disinsection?, by N. G. Gratz, R. Steffen and W. Cocksedge, *Bulletin of the World Health Organisation* 78/8, S. 995

**WHO** (2002), Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides, d-Allethrin, Evaluation Report, Geneva

**Wintersteiger** R. und Ofner B. (1994), Determination of traces of pyrethrins and piperonyl butoxide in biological material by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 660, S. 205

**Witten** J., Sagunski H., Wildeboer B. (1997), Richtwerte für die Innenraumluft: Dichlormethan, *BGesBl.* 40, S.278

**Wolf** T. und Stirn H. (2000), Richtwerte für die Innenraumluft: Diisocyanate, *BGesBl.* 43, S. 505

**Wood** A. (2003), *Compendium of Pesticide Common Names (ISO 1750)*, Context Limited, London, Stand 10. Feb. 2003, Homepage: <http://www.hclrss.demon.co.uk>

**WWF** (2002), Gefahren durch hormonell wirksame Pestizide und Biozide: Schadstoffe in Lebensmitteln, Garten und Haus, Frankfurt a.M.

**Zuccari-Bissacot** D., Vassilieff I. (1997), HPLC Determination of Flumethrin, Deltamethrin, Cypermethrin, and Cyhalothrin Residues in the Milk and Blood of Lactating Dairy Cows, *J. Anal. Toxocol.* 21, S. 397



## Veröffentlichungen

### Artikel:

L. Elflein, E. Berger-Preiss, K. Levsen, G. Wünsch, *Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of household insecticides in indoor air*, Journal of Chromatography A, 985 (2003) 147-157.

L. Elflein, E. Berger-Preiss, A. Preiss, M. Elend, K. Levsen, G. Wünsch, *Human biomonitoring of pyrethrum and pyrethroid insecticides used indoors: Determination of the metabolites E-cis/trans-chrysanthemumdicarboxylic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionisation*, Journal of Chromatography B, 795 (2003) 195-207.

### Poster:

L. Elflein, E. Berger-Preiss, K. Levsen, G. Wünsch, *Development of a GC-MS Method for the Determination of Household Insecticides in Indoor Air*, 25th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC), 13. bis 17. Mai 2002, Riva del Garda, Italien.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Elflein, Lutz Peter  
geboren am 28. Dezember 1972 in München

## Schulbildung:

08/79-07/83 Grundschule Euskirchen-Flamersheim

09/83-07/92 Asam Gymnasium München  
Leistungskurse: Chemie, Englisch

08.07.1992 Abitur

## Wehrdienst:

10/92-09/93 Gebirgsjäger Mittenwald

## Studium:

10/93-07/98 Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn  
*Studiengang:* Lebensmittelchemie  
*Wahlpflichtfach:* Produktion und Verarbeitung von Lebensmitteln

08.07.1996 Vordiplom Chemie

09.09.1996 Staatliche Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker

14.01.1999 Erste Staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

## Praktisches Jahr:

04/99-06/99 Industriepraktikum bei Langnese-Iglo, Reken,  
Abteilung Qualitätssicherung

07/99-08/99 Praktikum Lebensmittelüberwachung, Amt für Öffentliche Ordnung,  
Herne

09/99-03/00 Ausbildung am Chemischen Landes- und Staatlichen  
Veterinäruntersuchungsamt Münster/Westf.

09.05.2000 Zweite Staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

## Promotion:

08/00-10/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für Toxikologie  
und Experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover.

Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Karsten Levsen (Fraunhofer ITEM) und Prof. Dr. Gerold Wünsch (Institut für Anorganische der Universität Hannover) zum Thema: „Entwicklung von validierten Analysemethoden zur Bestimmung von Innenraumsektiziden und -akariziden“

### **Zusatzqualifikationen:**

- 08/97-09/97    Praktikum an der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA) Bonn
- 04/98-09/98    Freiwillige wissenschaftliche Arbeit an der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt in Bonn zum Thema: Methodenerweiterung der Multiwirkstoffmethode "Bestimmung von Herbiziden in Böden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (VD LUFA)" um weitere Pflanzenschutzmittel (PSM).

## Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerold Wunsch, für die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit unter seiner Leitung anzufertigen, für den Freiraum, der mir zur Durchführung der praktischen Arbeit gewährt wurde, und für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Karsten Levsen danke ich für die interessante und anspruchsvolle Aufgabenstellung, für die wertvollen und hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für die Förderung der Arbeit.

Frau Dr. Berger-Preiss danke ich für die praktische Betreuung der Arbeit, für die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes und für das kollegiale Arbeitsverhältnis.

Herrn Dr. Alfred Preiss danke ich für die Hilfestellung und Beratung, insbesondere bei den NMR-Messungen, für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes und für das kollegiale Arbeitsverhältnis.

Herrn Manfred Elend danke ich für die Unterstützung und Betreuung bei den NMR-Messungen und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Frau Susanne Gerling, Herrn Heiko Kock, Frau Mechthild Raabe und Frau Ute Säger danke ich für die Hilfsbereitschaft und für das freundschaftliche und kollegiale Arbeitsverhältnis bei der Probenahme, im Labor und an den Messgeräten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auch nach Abschluss meiner Ausbildung weiterhin unterstützt und während der Anfertigung dieser Arbeit durch Höhen und Tiefen hindurch begleitet haben.