

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Neonicotinoide mit 6-Chlorpyridinyl-Gruppe (z. B. Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid, Nitenpyram, Boscalid) – Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-MS

Biomonitoring-Methode

W. Gries¹, G. Leng², H.-W. Hoppe³, T. Göen^{4,*}, A. Hartwig^{5,*}, MAK Commission^{6,*}

¹ Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-ANT-UWA, R800, 12, 47829 Uerdingen

² Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-SER-GS-BLM, Institut für Biomonitoring, Gebäude L9, 51368 Leverkusen

³ Methodenprüfung, Medizinisches Labor Bremen, Haferwende 12, 28357 Bremen

⁴ Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

⁵ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

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

Keywords: Neonicotinoide; Imidacloprid; Acetamiprid; Thiacloprid; Nitenpyram; Boscalid; 6-Chlornikotinsäure; Biomonitoring; Urin; GC-MS

Citation Note: Gries W, Leng G, Hoppe H-W, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Neonicotinoide mit 6-Chlorpyridinyl-Gruppe (z. B. Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid, Nitenpyram, Boscalid) – Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2018 Jul;3(3):1730-1748]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2026. https://doi.org/10.34865/bi532623d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 06 Mrz 2026

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi532623d0022>

Manuskript abgeschlossen: 12 Okt 2012

Erstveröffentlichung (Online): 26 Jul 2018

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.

Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). Das Werk enthält Elemente, die von der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz ausgeschlossen sind. Mit Genehmigung von Elsevier wurde Abbildung 1 übernommen aus: Kavvalakis et al. (2013), Development and application of LC-APCI-MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid, Chemosphere 93: 2612–2620, Elsevier, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351301357X>.



Neonicotinoids with a 6-chloropyridinyl group (e.g. imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, nitenpyram, boscalid) – Determination of 6-chloronicotinic acid in urine by GC-MS

[Neonicotinoide mit 6-Chlorpyridinyl-Gruppe (z.B. Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid, Nitenpyram, Boscalid) – Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-MS]

Biomonitoring Methods in German language

W. Gries¹, G. Leng², H.-W. Hoppe³, T. Göen^{4,*}, A. Hartwig^{5,*}, MAK Commission^{6,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi532623d0022

Abstract

The working group „Analyses in Biological Materials“ of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area verified the presented biomonitoring method. Neonicotinoids with a 6-chloropyridinyl structure are metabolised in warm-blooded organisms to 6-chloronicotinic acid that is excreted in urine. This analytical method permits the specific quantification of 6-chloronicotinic acid in urine. For determination, 2 mL of a urine sample are hydrolysed using 500 µL concentrated hydrochloric acid to cleave the conjugates, which are subsequently extracted with methyl tert-butyl ether. The solvent is evaporated to dryness under a stream of nitrogen and the residue is dissolved in acetonitrile. Then 6-chloronicotinic acid is derivatised with hexafluoroisopropanol (HFIP) in the presence of diisopropylcarbodiimide. In a subsequent washing and extraction step, the formed HFIP ester is extracted using isooctane and an aliquot is injected in the GC-MS system for quantitative analysis. Calibration is performed using calibration standards that are prepared in pooled urine and processed in the same way as the samples to be analysed. The method was extensively validated and the reliability data were confirmed by an independent laboratory, which has established and cross-checked the whole procedure.

Keywords

Neonicotinoide; Imidacloprid; Acetamiprid; Thiacloprid; Nitenpyram; Boscalid; 6-Chlornikotinsäure; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; Gaschromatographie-Massenspektrometrie; GC-MS

Author Information

¹ Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-ANT-UWA, R800, 12, 47829 Uerdingen

² Entwickler der Methode, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SEL-SER-GS-BLM-Institut für Biomonitoring, Gebäude L9, 51368 Leverkusen

³ Prüfer der Methode, Medizinisches Labor Bremen, Haferwende 12, 28357 Bremen

⁴ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestr. 9–11, 91054 Erlangen

⁵ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

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

Neonicotinoide mit 6-Chlorpyridinyl-Gruppe (z. B. Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid, Nitenpyram, Boscalid) – Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-MS

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid, Nitenpyram, Boscalid und weitere Neonicotinoide mit 6-Chlorpyridinyl-Gruppe
Analyt. Messprinzip:	Kapillargaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS)
Abgeschlossen im:	Oktober 2012

Übersicht über die mit dieser Methode erfassbaren Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
Imidacloprid	105827-78-9 138261-41-3	6-Chlornikotinsäure	5326-23-8
Acetamiprid	135410-20-7 160430-64-8		
Thiacloprid	111988-49-9		
Nitenpyram	150824-47-8		
Boscalid	188425-85-6		

Zusammenfassung

Neonicotinoide, die in ihrer Struktur eine 6-Chlorpyridinyl-Gruppe enthalten, werden im Warmblüterorganismus zu 6-Chlornikotinsäure metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden. Die vorliegende Analysenmethode dient der spezifischen Quantifizierung der 6-Chlornikotinsäure im Urin. Für die Bestimmung werden

2 mL Urin mit 500 µL konzentrierter Salzsäure zur Spaltung der Konjugate hydrolysiert und anschließend mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Nach Abblasen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom und Aufnehmen des Rückstandes in Acetonitril erfolgt die Derivatisierung der 6-Chlornikotinsäure mit Hexafluorisopropanol (HFIP) in Anwesenheit von Diisopropylcarbodiimid. In einem nachgeschalteten Wasch- und Extraktionsschritt wird der gebildete HFIP-Ester mit Isooctan extrahiert. Die Quantifizierung erfolgt mittels GC-MS. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise aufgearbeitet werden wie die zu analysierenden Proben.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

6-Chlornikotinsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,4 \%$ bzw. $9,1 \%$
	Streubereich	$u = 16,7 \%$ bzw. $20,6 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ 6-Chlornikotinsäure pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,6 \%$ bzw. $8,4 \%$
	Streubereich	$u = 19,5 \%$ bzw. $21,6 \%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ 6-Chlornikotinsäure pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 112 \%$ bzw. 102%
	bei einer dotierten Konzentration von $1 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ 6-Chlornikotinsäure pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,2 \mu\text{g}$ 6-Chlornikotinsäure pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,5 \mu\text{g}$ 6-Chlornikotinsäure pro Liter Urin	

Neonicotinoide. Neonicotinoide stellen eine Gruppe von hochwirksamen Insektiziden dar. Hierbei handelt es sich um synthetische Wirkstoffe, die an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor von Nervenzellen binden und so im Insekt sehr selektiv die Weiterleitung von Nervenreizen stören [Tomizawa und Casida 2005]. In der EU sind zahlreiche Neonicotinoide als Pflanzenschutzmittel zugelassen. Eine Exposition gegenüber solchen Pflanzenschutzmitteln liegt sowohl beim gewerblichen Anwender vor, als auch beim Verbraucher durch Rückstände in den entsprechenden Lebensmitteln. Während beim Verbraucher die orale Aufnahme im Vordergrund steht, ist beim Anwender vor allem die dermale und in geringerem Umfang eine inhalative Aufnahme von Bedeutung. Aufgrund der unterschiedlichen Expositionspfade, ist eine korrekte Belastungsabschätzung für alle gegenüber Neonicotinoiden exponierten Personen am ehesten durch ein Biomonitoring zu erreichen [Kasiotis und Machera 2015; Göen 2016].

Aus Tierversuchen ist bekannt, dass Neonicotinoide, die eine 6-Chlorpyridinyl-Struktur aufweisen, im Körper vorrangig zu 6-Chlornikotinsäure metabolisiert wer-

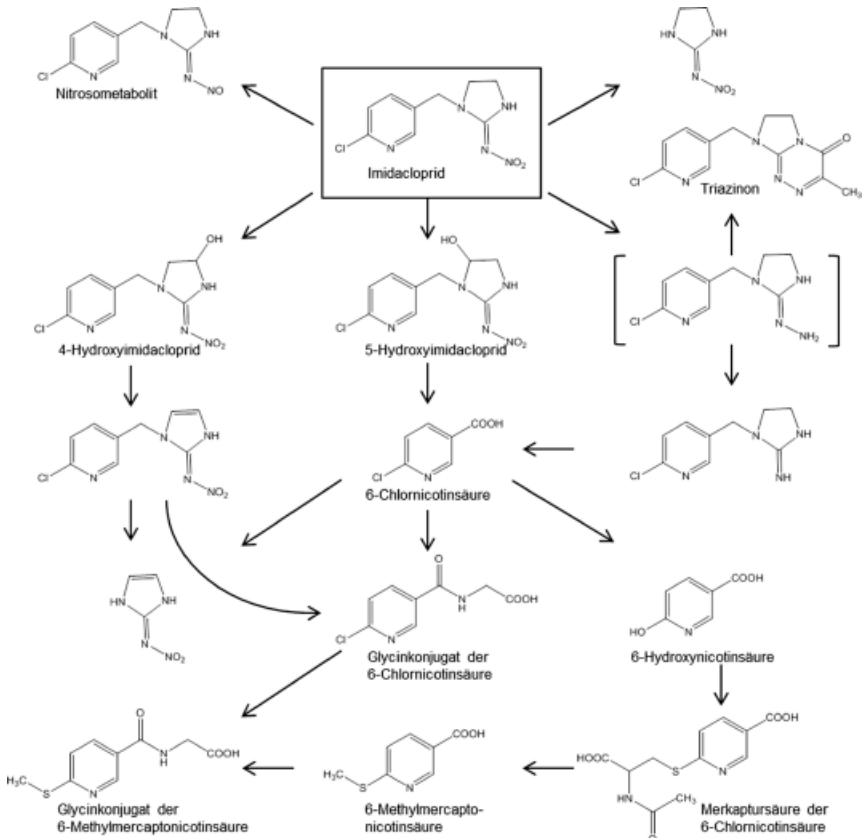


Abb. 1 Postulierter Metabolisierungsweg von Imidacloprid in Ratten nach Kavvalakis et al. [2013] und Klein [1987].

den. Neben weiteren Metaboliten ist aber auch eine unveränderte Ausscheidung des jeweiligen Insektizids mit dem Urin von Relevanz [Wang et al. 2015; Göen 2016; Kasiotis und Machera 2015]. Abbildung 1 zeigt beispielhaft ein Metabolismusschema des Neonicotinoids Imidacloprid.

Aufgrund der hohen Selektivität für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor von Insekten weisen Neonicotinoide in der Regel eine geringe akute Toxizität für Warmblüter auf. Die potentielle chronische Toxizität dieser Insektizide wird – je nach Art des konkreten Neonicotinoids – unterschiedlich beurteilt [Tomizawa und Casida 2005]. Eine Bewertung der Toxizität durch die Kommission liegt bislang nicht vor.

Berichte über gezielte Studien zur Erfassung der beruflichen Belastung mit Neonicotinoiden unter Einsatz des 6-Chlornikotinsäure-Biomonitorings sind derzeit nicht verfügbar. Allerdings berichtete eine chinesische Forschergruppe über Ergebnisse einer 6-Chlornikotinsäure-Messung im Urin von ländlich wohnenden Familien, die

1734 Biomonitoring Methods

durch die Ausbringung von Neonicotinoiden partiell exponiert waren [Wang et al. 2015]. Dabei konnte der Parameter in einem großen Teil der Urinproben nachgewiesen werden. Allerdings lagen sämtliche Konzentrationen unterhalb von 1 µg/L. Dagegen konnte im Urin von Probanden aus Europa, die während der Umstellung von konventioneller auf Bio-Ernährung untersucht wurden, 6-Chlornikotinsäure in Konzentrationen bis zu 7 µg/L bestimmt werden [Göen et al. 2017]. Somit konnte mit dem Biomonitoring der Einfluss der Ernährungsumstellung gut dokumentiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	1734
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	1735
2.1	Geräte	1735
2.2	Chemikalien	1736
2.3	Lösungen	1736
2.4	Interner Standard	1736
2.5	Vergleichsstandards	1736
3	Probenahme und Probenaufbereitung	1738
3.1	Probenahme	1738
3.2	Probenaufbereitung	1738
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	1738
4.1	Gaschromatographie	1739
4.2	Massenspektrometrie	1740
5	Analytische Bestimmung	1740
6	Kalibrierung	1741
7	Berechnung der Analysenergebnisse	1741
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung	1742
9	Beurteilung des Verfahrens	1742
9.1	Präzision	1742
9.2	Richtigkeit	1742
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	1743
9.4	Störeinflüsse	1744
10	Diskussion des Verfahrens	1744
11	Literatur	1745
12	Anhang	1746

1 Grundlage des Verfahrens

Neonicotinoide, die in ihrer Struktur eine 6-Chlorpyridinyl-Gruppe enthalten, werden im Warmblüterorganismus zu 6-Chlornikotinsäure metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden. Die vorliegende Analysenmethode dient der spezifischen Quantifizierung der 6-Chlornikotinsäure im Urin. Für die Bestimmung werden 2 mL Urin mit 500 µL konzentrierter Salzsäure zur Spaltung der Konjugate hydro-

lysiert und anschließend mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Nach Abblasen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom und Aufnehmen des Rückstandes in Acetonitril erfolgt die Derivatisierung der 6-Chlornikotinsäure mit Hexafluorisopropanol (HFIP) in Anwesenheit von Diisopropylcarbodiimid. In einem nachgeschalteten Wasch- und Extraktionsschritt wird der gebildete HFIP-Ester mit Isooctan extrahiert. Die Quantifizierung erfolgt mittels GC-MS. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise aufgearbeitet werden wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

GC-HRMS:

- Gaschromatograph mit Split/Splitless-Injektor, hochauflösendes Sektorfeld-Massenspektrometer, automatischer Probengeber und Datenverarbeitungssystem (z. B. GC Agilent HP 5890 II+ mit Waters MS AutoSpec)
- Kapillargaschromatographische Säule: stationäre Phase: 65 %-Phenyl-Methylpolysiloxan, Länge: 30 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm (z. B. Rtx 65, Restek Nr. 17023)

Alternativ: GC-Quadrupol-MS:

- Gaschromatograph mit Split/Splitless-Injektor, Quadrupol-Massenspektrometer, automatischem Probengeber und Datenverarbeitungssystem (z. B. Agilent 7000 GC-MS/MS)
- Kapillargaschromatographische Säule: stationäre Phase: 5 %-Phenyl-Methylpolysiloxan, Länge: 30 m; innerer Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm (z. B. Rtx 5, Restek Nr. 102223)
- Pasteurpipetten (z. B. Transferpipetten aus PE von Sarstedt)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius)
- Laborzentrifuge (z. B. Heraeus)
- Trockenthermostat (z. B. Diaglobal)
- verschiedene Messkolben (z. B. VWR)
- 10 mL-Schraubgläser mit Schraubverschluss und teflonkaschierten Septen (z. B. VWR)
- 10 µL- und 100 µL-Transferpipetten (z. B. Brand)
- 200 µL-Vials (z. B. Macherey-Nagel)
- Bördelkappen mit Teflonsepten (z. B. CS Chromatographie-Service)
- Laborschüttler (z. B. IKA Vibrax VXR)
- Stickstoff-Evaporator (z. B. Zymark)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt)

2.2 Chemikalien

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

- Isooctan (z. B. Merck, Nr. 115440)
- *tert*-Butylmethylether (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 306975)
- Acetonitril (z. B. Merck, Nr. 100017)
- Salzsäure, 37 % (z. B. Merck, Nr. 100317)
- Natriumhydrogencarbonat (z. B. Merck, Nr. 106329)
- gereinigtes Wasser (z. B. Milli-Q-Wasser)
- 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP, z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 52517)
- N,N'-Diisopropylcarbodiimid (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. 38370)
- 6-Chlornikotinsäure (z. B. Alfa Aesar, Nr. A15620)
- 2-Phenoxybenzoesäure (2-PBA, z. B. Merck, Nr. 841344)
- Urin von Personen ohne bekannte Exposition gegenüber Neonicotinoiden

2.3 Lösungen

- 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung
42 g Natriumhydrogencarbonat werden in einen 500 mL-Messkolben eingewogen und in gereinigtem Wasser gelöst. Die Lösung wird mit gereinigtem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung ist im Kühlschrank bei +4 °C maximal 6 Monate haltbar.

2.4 Interner Standard

- IS-Ausgangslösung (1 g/L)
10 mg 2-Phenoxybenzoesäure (2-PBA) werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und in Acetonitril gelöst. Der Kolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- IS-Dotierlösung (1 mg/L)
0,1 mL der IS-Ausgangslösung werden in einen 100 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen der internen Standards werden im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt und sind unter diesen Bedingungen mindestens 6 Monate haltbar.

2.5 Vergleichsstandards

- Ausgangslösung (1 g/L)
10 mg 6-Chlornikotinsäure werden in einem 10 mL-Messkolben eingewogen und in Acetonitril gelöst. Der Kolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

- Dotierlösung I (10 mg/L)
0,1 mL der Ausgangslösung werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung II (1 mg/L)
1 mL der Dotierlösung I wird in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung III (0,1 mg/L)
0,1 mL der Dotierlösung I werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung IV (0,01 mg/L)
0,1 mL der Dotierlösung II werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen zur Herstellung der Kalibrierstandards werden im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt und sind unter diesen Bedingungen 4 Wochen haltbar.

Zur Herstellung der Kalibrierpunkte werden jeweils 2 mL Poolurin in 10 mL-Schraubgläschen pipettiert und entsprechend dem in Tabelle 1 angegebenen Pipettierschema mit dem Standard dotiert. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Proben (siehe Abschnitt 3.2).

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen zur Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin.

Kalibrierpunkt	verwendete Dotierlösung	Volumen der Dotierlösung [µL]	Konzentration 6-Chlornikotinsäure [µg/L]
K0	–	–	–
K1	IV	20	0,1
K2	IV	40	0,2
K3	IV	100	0,5
K4	III	20	1,0
K5	III	40	2,0
K6	III	100	5,0
K7	II	20	10
K8	II	40	20
K9	II	100	50
K10	I	20	100

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Der Urin wird in, mit Methanol vorgereinigten, Kunststoffbehältern gesammelt und am besten sofort analysiert. Gegebenenfalls können die Urinproben bei Temperaturen $< -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist der Analyt im Urin für mindestens 6 Monate stabil. Längere Lagerungszeiten wurden nicht geprüft.

3.2 Probenaufbereitung

Zur Probenaufbereitung werden 2 mL Urin mit einer Pipette in ein 10 mL-Schraubgläschen überführt und mit 500 μL der 37%igen Salzsäure und 20 μL der Dotierlösung des internen Standards versetzt. Das Schraubgläschen wird verschlossen, gut durchmischt und dann zur Hydrolyse für 2 h bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Trockenthermostat oder Trockenschrank inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur werden 4 mL *tert*-Butylmethylether hinzu pipettiert. Das Schraubgläschen wird erneut verschlossen und für 10 min auf einem Laborschüttler intensiv gemischt. Anschließend wird die Probe für 5 min bei $2200 \times g$ zentrifugiert. Die organische Phase wird mit einer Pasteurpipette möglichst vollständig in ein neues 10 mL-Schraubgläschen überführt und die wässrige Phase verworfen. Nachdem die organische Phase im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt wurde, wird der Rückstand in 250 μL Acetonitril gelöst. Zur Derivatisierung werden dann 30 μL HFIP und 15 μL N,N'-Diisopropylcarbodiimid zugegeben. Nach zehnmütigem Mischen auf dem Laborschüttler wird der Probe 1 mL der Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugesetzt und kurz geschüttelt. Dann werden 250 μL Isooctan hinzu pipettiert und die Probe wird erneut für 10 min auf dem Laborschüttler intensiv durchmischt und für 5 min bei $2200 \times g$ zentrifugiert. Abschließend wird die Isooctanphase in ein 200 μL -Microvial überführt. Von dieser wird ein Aliquot von 1 μL zur Analyse in das GC-MS-Gerät injiziert.

Aufgearbeitete Proben sind bei maximal $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 14 Tage stabil. Längere Lagerungszeiten wurden nicht geprüft.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die Messung mittels GC-HRMS erfolgte an einem Messgerät bestehend aus: GC HP 5890 II+ (Agilent), Autosampler CTC A200S (CTC Analytics) und AutoSpec Ultima Sektorfeld-MS (Waters). Die analytische Bestimmung mittels GC-Quadrupol-MS erfolgte mit einem Agilent 7000 GC-MS/MS.

4.1 Gaschromatographie

4.1.1 GC-HRMS

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Rtx 65 (65 %-Phenyl-Methylpolysiloxan)
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	MSD	
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 60 °C, 1 min halten, Anstieg mit 8 °C/min auf 120 °C, dann Anstieg mit 30 °C/min auf 230 °C, dann Anstieg mit 50 °C/min auf 300 °C, 5 min bei Endtemperatur
	Injektor:	280 °C
	Transfer line:	280 °C
Trärgas:	Helium 5.0	
	Fluss:	1,0 mL/min
Injektionsvolumen: 1 µL (splitless)		

4.1.2 GC-Quadrupol-MS

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Rtx 5 (5 %-Phenyl-Methylpolysiloxan)
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	MSD	
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 80 °C, 1 min halten, Anstieg mit 3 °C/min auf 100 °C, dann Anstieg mit 40 °C/min auf 280 °C, 3 min bei Endtemperatur
	Injektor:	280 °C
	Transfer line:	280 °C
Trärgas:	Helium 5.0	
	Fluss:	1,0 mL/min
Injektionsvolumen: 1 µL (splitless)		

4.2 Massenspektrometrie

4.2.1 Hochauflösendes Sektorfeld-Massenspektrometer

Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)
Ionisationsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	230 °C
Interfacetemperatur:	250 °C
Kalibrationsgas:	Perfluorkerosin
Filament:	0,3 mA
Resolution:	5000
Detektionsmodus:	Single Ion Resolution (SIR)

4.2.2 Quadrupol-Massenspektrometer

Ionisationsart:	Negativ-chemische Ionisation (NCI)
Quellentemperatur:	150 °C
Quadrupoltemperatur:	150 °C
Ionisierungsgas:	Methan
Stoßgas:	Argon
Detektionsmodus:	Single Ion Modus (SIM) Multi Reaction Modus (MRM)

Alle Parameter sind Richtwerte und gegebenenfalls nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 3 aufbereiteten Urinproben wird jeweils 1 µL der Probenlösung in das GC-MS-System injiziert. Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 2 (GC-HRMS) bzw. Tabelle 3 (GC-Quadrupol-MS) aufgeführten Ionenspuren registriert.

Tab. 2 Retentionszeiten und detektierte Fragmentionen bei Messung am hochauflösenden Sektorfeld-Massenspektrometer.

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenspur [m/z]
6-Chlornikotinsäure	6,36	139.9903
2-Phenoxybenzoesäure (IS)	12,56	364.0534

Tab. 3 Retentionszeiten und detektierte Fragmentionen bei Messung am Quadrupol-Massenspektrometer (SIM – Single Ion Mode, MRM – Multi Reaction Mode).

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenspur [<i>m/z</i>] ^a	
		SIM	MRM
6-Chlornikotinsäure	6,9	156	156 → 112
		158	156 → 35
		307	307 → 156
2-Phenoxybenzoesäure (IS)	10,9	364	364 → 213
		213	

^a Quantifier-Spuren sind fett gedruckt

Die angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen zu überzeugen. Die Chromatogramme einer dotierten, aufgearbeiteten Urinprobe sind für beide Detektionsvarianten im Anhang abgebildet (Abbildungen 2 und 3).

6 Kalibrierung

Die Vergleichsstandards (siehe Abschnitt 2.5) werden analog zu den Urinproben aufgearbeitet und entsprechend den Abschnitten 4 und 5 analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem der Quotient aus der Peakfläche der 6-Chlornikotinsäure und des internen Standards gegen die jeweils dotierte Konzentration aufgetragen wird. Die Linearität der Analysenmethode wurde für einen Konzentrationsbereich von 0,1 µg/L bis 100 µg/L getestet, wobei die Kalibriergerade von 0,1 µg/L bis 20 µg/L linear verlief. Etwaige Leerwerte müssen durch Subtraktion berücksichtigt werden. Eine aufgearbeitete Kalibrierreihe kann mit gewissen Einschränkungen mehrfach für Messungen verwendet werden (siehe Abschnitt 9.4). Es ist jedoch zu beachten, dass die Kalibrierreihe zu jeder Analysenserie neu zu vermessen ist. Abbildung 4 (im Anhang) zeigt exemplarisch eine Kalibriergerade der Methode.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Die Berechnung des Analytgehaltes in den Urinproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion (Abschnitt 6). Zur Bestimmung des Analytgehaltes in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten 6-Chlornikotinsäure und des internen Standards ermittelt und in die nach Abschnitt 6 erstellte Kalibrierfunktion eingesetzt. Eventuelle Reagenzienleerwerte werden durch Subtraktion berücksichtigt. Man erhält den Gehalt an 6-Chlornikotinsäure in µg/L. Wenn der Messwert einer Probe außerhalb des kalibrierten Ar-

beitsbereiches liegt, wird die jeweilige Probe in geeigneter Verdünnung erneut aufgearbeitet und vermessen.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieser Publikationsreihe verfahren [Bundesärztekammer 2014; Bader et al. 2010]. Zur Präzisionskontrolle werden bei jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit bekannter und konstanter Analytkonzentration mit untersucht. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu wird Poolurin mit einer Standardlösung der 6-Chlornikotinsäure versetzt, so dass die Konzentration des Kontrollmaterials im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegt (Q_{low} : 1 µg/L, Q_{high} : 10 µg/L). Nach ausreichender Durchmischung wird das so hergestellte Qualitätskontrollmaterial zu je 2 mL aliquotiert und bei -18 °C aufbewahrt. Die Sollwerte und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt [Bader et al. 2010]. Die Messwerte der mit jeder Analysenserie untersuchten Kontrollproben sollten jeweils innerhalb der ermittelten Toleranzbereiche liegen.

9 Beurteilung des Verfahrens

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

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurde Urin mit 6-Chlornikotinsäure in zwei unterschiedlichen Konzentrationen dotiert, mehrfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte, indem Aliquote der zwei dotierten Urinproben an sechs aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und analysiert wurden. Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 5 dargestellt.

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurden dotierte Urinproben analysiert und die Wiederfindung berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 4 Präzision in Serie für die Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-Quadrupol-MS bzw. GC-HRMS.

Analysen- verfahren	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Anzahl der Messungen	Rel. Standard- abweichung s_w [%]	Streubereich u [%]
GC-MS	1	10	7,4	16,7
	10	10	9,1	20,6
GC-HRMS	1	6	5,7	14,7
	10	6	11,8	30,3

Tab. 5 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-HRMS.

Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Anzahl der Messungen	Rel. Standard- abweichung s_w [%]	Streubereich u [%]
1	6	7,6	19,5
10	6	8,4	21,6

Tab. 6 Relative Wiederfindung für die Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-Quadrupol-MS bzw. GC-HRMS.

Analysen- verfahren	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Anzahl der Messungen	Mittlere rel. Wiederfindung [%]	Bereich [%]
GC-MS	1	10	112	102–125
	10	10	102	90–115
GC-HRMS	1	6	101	92–106
	10	6	95	81–105

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für beide Methoden nach der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 ermittelt. Die Ergebnisse sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin mittels GC-MS bzw. GC-HRMS.

Analysenverfahren	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
	[µg/L]	[µg/L]
GC-MS	0,2	0,5
GC-HRMS	0,2	0,6

9.4 Störeinflüsse

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden bei beiden Methodenvarianten Störungen durch Interferenzen aus dem Urin bei Messung auf dem intensivsten Fragment m/z 307 beobachtet. Deshalb wurde zur Quantifizierung auf weniger intensive Fragmente zurückgegriffen. In undotiertem Poolurin betrug die Störung auf der Massenspur m/z 307 ca. 0,5 µg 6-Chlornikotinsäure je Liter.

Die Derivatisierung mit HFIP verläuft nur in wasserfreien Proben. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, dass das Abheben der *tert*-Butylmethyletherphase nach der Extraktion quantitativ und wasserfrei erfolgt. Eine weitergehende Trocknung der organischen Phase (z. B. über Natriumsulfat) ist dann nicht erforderlich. Bei der externen Methodenüberprüfung wurde beobachtet, dass bei einer Mehrfachinjektion aus einem Vial, welches mit teflonkaschierten Butylgummidichtungen verschlossen war, die Peakintensität der 6-Chlornikotinsäure von Injektion zu Injektion abnahm. Diese Intensitätsabnahme ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf eingetragene Septumpartikel zurückzuführen und kann nicht durch den internen Standard 2-PBA kompensiert werden. Daher sollte bei Verwendung gummierter Septen nur einmal aus jedem Vial injiziert werden. Bei Einsatz von Teflonsepten wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. In Vials mit intakten Septen sind die Messlösungen mindestens zwei Wochen stabil.

10 Diskussion des Verfahrens

Mit der vorliegenden Methode kann die 6-Chlornikotinsäure als Metabolit verschiedener Neonicotinoide erfasst werden. Zusätzlich lässt sich die Methode leicht um die Metabolite des natürlichen Pyrethrums und die der synthetischen Pyrethroide erweitern [Leng et al. 2006; Leng et al. 1997 a; Leng et al. 1997 b]. Da aber in der Regel beide Substanzgruppen nicht parallel bestimmt werden müssen, wurde die 6-Chlornikotinsäure-Methode als eigenständiges Verfahren entwickelt. Eine Bestimmung der 6-Chlornikotinsäure ist entweder mittels GC-HRMS im EI-Modus oder mittels Quadrupol-MS im NCI-Modus möglich. Die Probenaufarbeitung ist für beide Varianten identisch. Mit beiden Analysevarianten (GC-MS und GC-HRMS) kann problemlos eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/L erreicht werden. Als interner Standard wurde 2-Phenoxybenzoesäure eingesetzt. Dieser kompensiert die analysebedingten

Schwankungen ausreichend gut, was durch die erhobenen Validierungsdaten bestätigt wurde. Mittlerweile ist auch ein isotoopenmarkierter Standard käuflich verfügbar ($^{13}\text{C}_6$ -6-Chlornikotinsäure, z. B. Cambridge Isotope Laboratories, Nr. CLM-9598), der für die valide Bestimmung der 6-Chlornikotinsäure im Urin noch besser geeignet ist.

Verwendete Messgeräte:

- GC-Quadrupol-MS: Gaschromatograph Agilent 7000 GC-MS/MS (Agilent, USA)
- GC mit hochauflösendem Sektorfeld-MS: GC 5890 II+ (Agilent, USA)
- Autosampler CTC A 200 S (CTC Analytics, USA)
- AutoSpec Sektorfeld-MS (Waters, USA)

11 Literatur

- Bader M, Barr D, Göen Th, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg): Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärztebl 111: A1583-1618
- Göen Th (2016) Biomonitoring von beruflichen und außerberuflichen Pestizidbelastungen. Zbl Arbeitsmed 66: 276-285
- Göen Th, Schmidt L, Lichtensteiger W, Schlumpf M (2017) Efficiency control of dietary pesticide intake reduction by human biomonitoring. Int J Hyg Environ Health 220: 254-260
- Kasiotis KM, Machera K (2015) Neonicotinoids and their metabolites in human biomonitoring: a review. Hellenic Plant Protection Journal 8: 33-45
- Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Theodoropoulou EP, Barbounis EG, Tsakalof AK, Tsatsakis AM (2013) Development and application of LC-APCI-MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid. Chemosphere 93: 2612-2620
- Klein O (1987) (14C)-NTN 33893: Biokinetic part of the 'General metabolism study' in the rat. Unpublished report from Bayer AG, report No. PF2889, dated 9 November 1987, GLP. Submitted to WHO by Bayer AG, Monheim, Germany
- Leng G, Gries W, Selim S (2006) Biomarker of pyrethrum exposure. Toxicol Lett 162: 195-201
- Leng G, Kühn KH, Idel H (1997a) Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. Sci Total Environ 199: 173-181.
- Leng G, Kühn KH, Leng A, Gries W, Lewalter J, Idel H (1997b) Determination of trace levels of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-high resolution mass spectrometry with negative chemical ionization. Chromatographia 46: 265-274
- Tomizawa M, Casida JE (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanism of selective action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 247-268
- Wang L, Liu T, Liu F, Zhang J, Wu Y, Sun H (2015) Occurrence and profile characteristics of the pesticide imidacloprid, preservative parabens, and their metabolites in human urine from rural and urban china. Environ Sci Technol 49: 14633-14640

1746 Biomonitoring Methods

Entwickler der Methode: W. Gries, G. Leng

Prüfer der Methode: H.-W. Hoppe

Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: Th. Göen

Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft: A. Hartwig

Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft: MAK Commission

12 Anhang

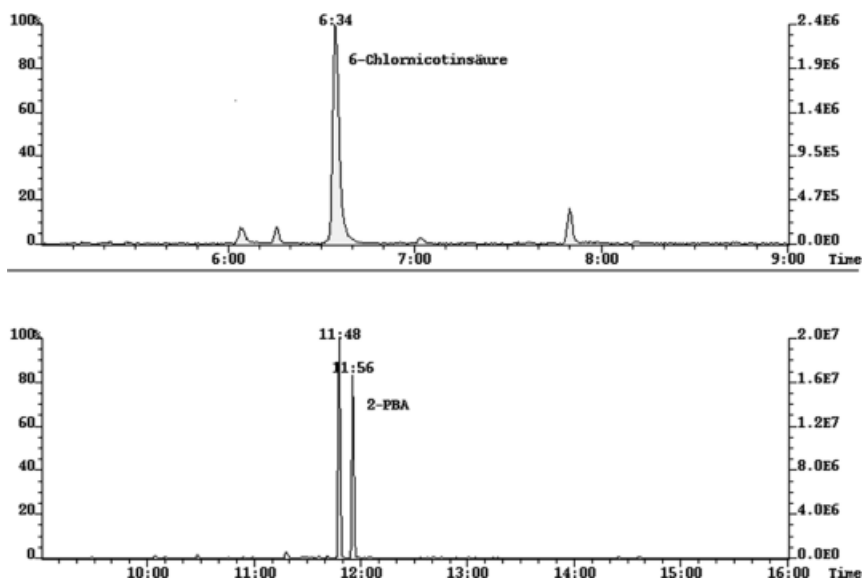


Abb. 2 GC-HRMS-Chromatogramm einer mit 10 µg 6-Chlornicotinsäure/L gespikten Urinprobe.

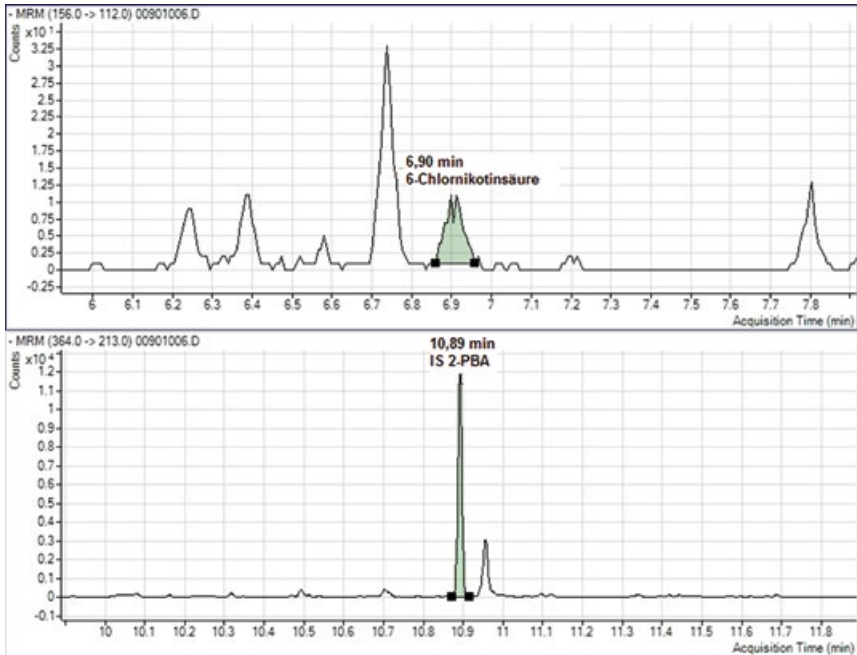


Abb. 3 GC-Quadrupol-NCI-MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten nativen Urinprobe. Ermittelter Gehalt an 6-Chlornikotinsäure: 0,06 µg/L.

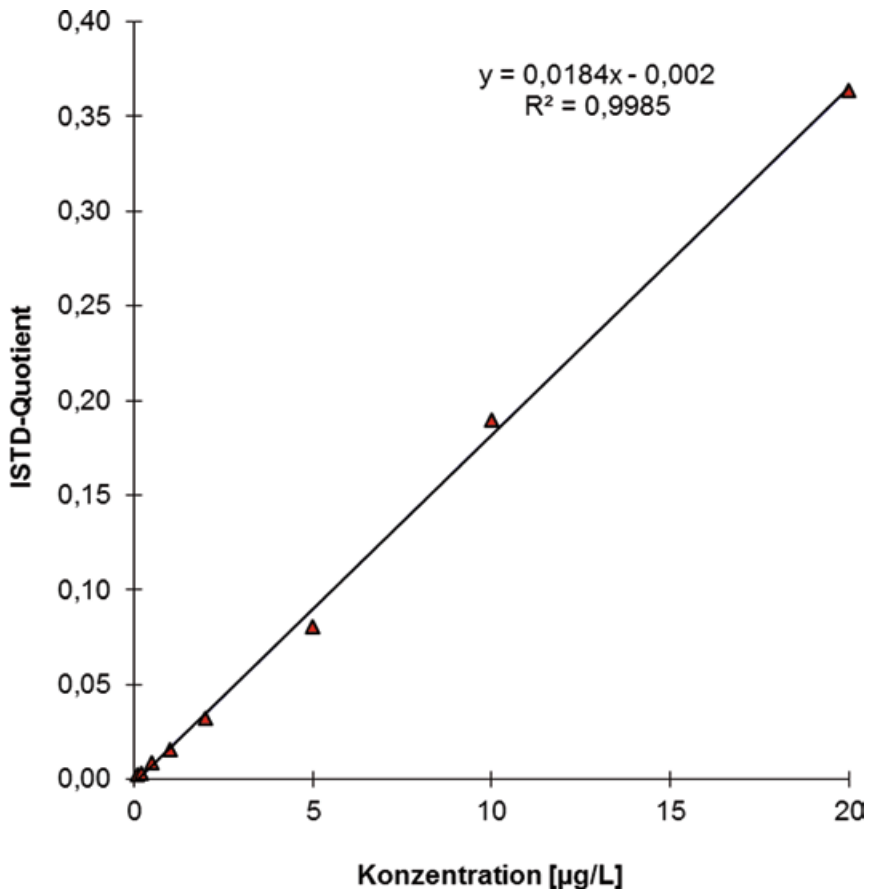


Abb. 4 Kalibriergerade in Poolurin für die Bestimmung von 6-Chlornikotinsäure in Urin.