

Chlorphenoxy-carbonsäuren (4-Chlor-2-Methylphenoxy- essigsäure; 2,4-Dichlor- phenoxyessigsäure; 4-Chlor-2-Methylphenoxy- propionsäure; 2,4-Dichlor- phenoxypropionsäure)

C

Methodennummer	1
Anwendbarkeit	Bestimmung in Harn
Analyt. Meßprinzip	Kapillargaschromatographie/Massenselektiver Detektor (MSD)
Abgeschlossen im	Januar 1995

Zusammenfassung

Die hier beschriebene Methode der kapillargaschromatographischen Bestimmung von Chlorphenoxy-carbonsäuren in Harn eignet sich für die Untersuchung von Personen, die an ihren Arbeitsplätzen Kontakt zu Chlorphenoxy-carbonsäuren haben.

Der Harn wird mit Salzsäure und 4-Chlor-2-Methylphenoxybutansäure als internem Standard versetzt. Das Gemisch wird dann über eine vorkonditionierte C18-Kartusche gesaugt, auf der die Chlorphenoxy-carbonsäuren angereichert werden. Nach der Elution werden diese mit Schwefelsäure/Methanol derivatisiert. Für die Kalibrierung werden wäßrige Vergleichsstandards verwendet, die wie die Harnproben aufgearbeitet und

Analytische Methoden Band 2
Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen
Forschungsgemeinschaft – Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“

gaschromatographisch mit anschließender massenselektiver Detektion bestimmt werden. Die ermittelten Peakflächen der Chlorphenoxy-carbonsäuren werden auf die Peakflächen des internen Standards bezogen. Die resultierenden Quotienten werden gegen die Konzentration der Chlorphenoxy-carbonsäuren zur Kalibrierkurve aufgetragen.

4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure (MCPA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 2,6 \%$ Streubereich $u = 6,0 \%$ bei einer Konzentration von $31,7 \mu\text{g}$ 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure pro Liter Harn und $n = 8$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s = 3,6\text{--}6,9 \%$ Streubereich $u = 8,3\text{--}15,9 \%$ bei 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure-Konzentrationen zwischen $9,9$ und $35,5 \mu\text{g}$ pro Liter Harn und $n = 8$ Tagen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 95 \%$
Nachweisgrenze:	$10 \mu\text{g}$ 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure pro Liter Harn

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 2,4 \%$ Streubereich $u = 5,5 \%$ bei einer Konzentration von $39,1 \mu\text{g}$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pro Liter Harn und $n = 8$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s = 4,8\text{--}11,3 \%$ Streubereich $u = 11,0\text{--}26,2 \%$ bei 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Konzentrationen zwischen $5,4$ und $20,7 \mu\text{g}$ pro Liter Harn und $n = 8$ Tagen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 93 \%$
Nachweisgrenze:	$10 \mu\text{g}$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pro Liter Harn

4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 3,4 \%$ Streubereich $u = 7,8 \%$
-------------------------	---

bei einer Konzentration von 40,6 µg 4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure pro Liter Harn und $n = 8$ Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s = 4,5-9,9 \%$ Streubereich $u = 10,4-22,8 \%$ bei 4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure-Konzentrationen zwischen 10 und 35,7 µg pro Liter Harn und $n = 8$ Tagen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 91 \%$
Nachweisgrenze:	10 µg 4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure pro Liter Harn

C

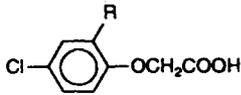
2,4-Dichlorphenoxypropionsäure

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 4,2 \%$ Streubereich $u = 9,7 \%$ bei einer Konzentration von 33,5 µg 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure pro Liter Harn und $n = 8$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s = 7,3-9,9 \%$ Streubereich $u = 16,8-22,8 \%$ bei 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure-Konzentrationen zwischen 17,4 und 63,3 µg pro Liter Harn und $n = 8$ Tagen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 90 \%$
Nachweisgrenze:	10 µg 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure pro Liter Harn

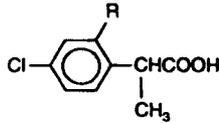
Chlorphenoxycarbonsäuren

Chlorphenoxycarbonsäuren finden im breiten Rahmen Anwendung als selektives Herbizid im Bereich des Getreideanbaus. Darüber hinaus werden die Chlorphenoxycarbonsäuren häufig in Kombination mit Amitrol und Triazinen auf Wegen und Plätzen als Totalherbizide eingesetzt.

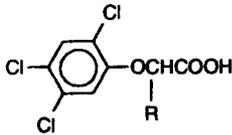
Obwohl die Chlorphenoxycarbonsäuren insgesamt weit verbreitet sind und der Gebrauch der einzelnen Derivate wie z. B. MCPA, Dichlorprop und Mecoprop immer weiter zunimmt, stellt die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) immer noch das am häufigsten verwendete Derivat der Chlorphenoxycarbonsäuren dar. Abbildung 1 zeigt die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe.



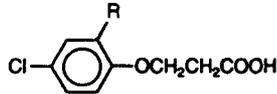
- (a) R = CH₃; MCPA
(b) R = Cl; 2,4-D



- (c) R = CH₃; Mecoprop
(d) R = Cl; Dichlorprop



- (e) R = H; 2,4,5-T
(f) R = CH₃; Fenoprop



- (g) R = CH₃
(h) R = Cl

Abb. 1. Chlorphenoxy-carbonsäure-Herbizide

- (a) 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure;
(b) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure;
(c) 2'-(4-Chlor-2-Methylphenoxy)propionsäure;
(d) 2'-(2,4-Dichlorphenoxy)propionsäure;
(e) 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure;
(f) 2'-(2,4,5-Trichlorphenoxy)propionsäure;
(g) 4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure;
(h) 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure

Berichten der Vereinten Nationen zufolge wurde 2,4-D im Jahre 1986 von 48 Firmen in 15 Ländern produziert und ist in 231 kommerziell erhältlichen Produkten enthalten. 2,4-D wird in der Regel durch Umsetzung von 2,4-Dichlorphenol mit Monochloressigsäure im stark alkalischen Medium synthetisiert. Wegen der sehr guten Wasserlöslichkeit von 2,4-D wird dieses selten in reiner Form verwendet, sondern häufig als Alkalisalz, Ammoniumsalz oder Ester [1]. Als Verunreinigungen dieser Herbizide findet man Mono- und Tetrachlorbiphenyle sowie Di-, Tri- und Tetrachlordibenzo-*p*-dioxine, jedoch nicht das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) [2, 3]. In älteren Proben des Dimethylammoniumsalzes konnten vereinzelt bis zu 2,8 ppm N-Nitrosodimethylamin nachgewiesen werden [4, 5].

Über die Toxizität von 2,4-D und seinen Verbindungen informieren mehrere Übersichtsartikel [6, 7].

An Ratten verabreichtes 2,4-D verursachte histologische Veränderungen an den Nieren ab einer Gabe von 5 mg pro kg Körpergewicht. Bei einer Gabe ab 15 mg pro kg Körpergewicht konnte eine vorübergehende Veränderung von Blutparametern wie z. B. verminderte Erythrocytenzahlen sowie vermindeter Hämoglobingehalt und Hämatokrit beobachtet werden [6].

2,4-D kann durch Inhalation [8], nach oraler Verabreichung [9–12] und durch Resorption der Verbindung über die intakte Haut [10, 13–15] aufgenommen werden. 2,4-D wird beim Menschen überwiegend unverändert über die Nieren im Urin ausgeschieden. Nur in wenigen Fällen konnten zu einem geringen Anteil (12,8 %) Konjugate nachgewiesen werden [12]. Fünf Personen, denen auf freiwilliger Basis je 5 mg 2,4-D pro kg Körpergewicht oral verabreicht wurden, schieden innerhalb von sechs Tagen 87 bis 100 % der aufgenommenen 2,4-D-Mengen wieder aus [12]. Nach dermalen Aufnahme von 2,4-D konnte dagegen eine Ausscheidung über einen längeren Zeitraum festgestellt werden. Dies läßt sich damit begründen, daß die Haut bis zur endgültigen Resorption von 2,4-D als Speichermedium dient.

Mehrere Arbeiten beschreiben die Belastung von Arbeitern, die mit der Produktion und der Verpackung von 2,4-D-Herbiziden beschäftigt waren. Die ermittelten Luftkonzentrationen schwankten dabei von unterhalb der Nachweisgrenze bis 93 mg/m³ [8].

Im Rahmen einer neueren Studie wurden Luftkonzentrationen von 2,4-D bis zu 0,5 mg/m³ festgestellt, wobei die Höhe der Exposition gut mit der Ausscheidung von 2,4-D im Harn korrelierte [16].

Weitere Arbeiten berichten über die Belastung von Arbeitern mit 2,4-D durch das Ausbringen dieser Substanz in der Landwirtschaft (vgl. Tab.1).

Tab. 1. Innere Belastungen von Arbeitern durch das Ausbringen von 2,4-D und seinen Derivaten

Eingesetztes Produkt	Anzahl der Personen	Art der Anwendung	Konzentration von 2,4-D im Harn [mg/l]	Literatur
2,4-D und Dicamba (3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure) in wäßriger Lösung	2	einmaliges Versprühen	1–4	[17]
	2	mehrmaliges Versprühen	3–20	
2,4-D/2,4,5-T-Butoxyethyl ester als 2proz. Emulsion in Wasser	4	Versprühen	1–14	[18, 19]
2,4-D/2,4-DP und 2,4-D/Pichloram	23	Arbeiten am Straßenrand	<0,01–8	[20]

In einer Reihe weiterer Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber 2,4-D und anderen Pflanzenschutzmitteln bei Landwirten und dem Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht. Aus den vorliegenden Studien ergibt sich auf Grund der nicht zu erfassenden Mischexposition, insbesondere gegenüber den Verunreinigungen in den Herbiziden (Dioxinen), lediglich ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber 2,4-D-Herbiziden und dem Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen [21–25].



Im Rahmen einer weiteren Studie, bei der 578 an Leukämie erkrankte Personen und 1245 Kontrollpersonen teilnahmen, zeigte sich für 98 Personen, die in der Landwirtschaft gegenüber 2,4-D exponiert waren, ein leicht, aber nicht signifikant erhöhtes Risiko, an Leukämie zu erkranken [26].

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft hat 1994 für 2,4-D einschließlich deren Salze und Ester einen MAK-Wert von 1 mg/m^3 festgelegt [6]. Wegen der Gefahr der Hautresorption werden diese Verbindungen in der MAK-Werte-Liste mit einem „H“ gekennzeichnet.

Darüber hinaus wurde 2,4-D von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe in der MAK-Werte-Liste in die Kategorie „C“ eingestuft. Das bedeutet, daß bei Einhaltung des MAK-Wertes ein Risiko einer Fruchtschädigung nicht befürchtet zu werden braucht [6].

Autoren: *W. Krämer, W. Merz, W. Ziemer*
Prüfer: *J. Angerer*

Chlorphenoxy-carbonsäuren (4-Chlor-2-Methylphenoxy- essigsäure; 2,4-Dichlor- phenoxyessigsäure; 4-Chlor-2-Methylphenoxy- propionsäure; 2,4-Dichlor- phenoxypropionsäure)

C

Methodennummer	1
Anwendbarkeit	Bestimmung in Harn
Analyt. Meßprinzip	Kapillargaschromatographie/Massenselektiver Detektor (MSD)
Abgeschlossen im	Januar 1995

Inhaltsverzeichnis

- 1 Grundlage des Verfahrens
- 2 Geräte, Chemikalien und Lösungen
 - 2.1 Geräte
 - 2.2 Chemikalien
 - 2.3 Lösungen
 - 2.4 Vergleichsstandards
 - 2.5 Vorbereitung der C18-Kartusche
- 3 Probenahme und Probenaufbereitung
- 4 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen
- 5 Analytische Bestimmung
- 6 Kalibrierung

- 7 Berechnung des Analysenergebnisses
- 8 Standardisierung der Meßergebnisse und Qualitätssicherung
- 9 Beurteilung des Verfahrens
 - 9.1 Präzision
 - 9.2 Richtigkeit
 - 9.3 Nachweisgrenze
 - 9.4 Störeinflüsse
- 10 Diskussion der Methode
- 11 Literatur

1 Grundlage des Verfahrens

Der Harn wird mit Salzsäure und 4-Chlor-2-Methylphenoxybutansäure als internem Standard versetzt. Das Gemisch wird dann über eine vorkonditionierte C18-Kartusche gesaugt, auf der die Chlorphenoxycarbonsäuren angereichert werden. Nach der Elution werden diese mit Schwefelsäure/Methanol derivatisiert. Für die Kalibrierung werden wäßrige Vergleichsstandards verwendet, die wie die Harnproben aufgearbeitet und gaschromatographisch mit anschließender massenselektiver Detektion bestimmt werden. Die ermittelten Peakflächen der Chlorphenoxycarbonsäuren werden auf die Peakflächen des internen Standards bezogen. Die resultierenden Quotienten werden gegen die Konzentration der Chlorphenoxycarbonsäuren zur Kalibrierkurve aufgetragen.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

Kapillar-Gaschromatograph mit Split/Splitless-Injektor, massenselektiver Detektor (MSD) und Kompensationsschreiber bzw. Integrator

Gaschromatographische Säule:

Länge 30 m; innerer Durchmesser 0,25 mm; stationäre Phase DB-WAX; Filmdicke 0,25 µm (z. B. J & W Scientific)

5-µl-Spritze für die Gaschromatographie, vorzugsweise automatischer Probengeber

3-ml-C18-Kartuschen (z. B. Bakerbond spc. von Baker)

Samplervials (ca. 1,5 ml) mit Verschlußdeckel und Verschlußzange

10-ml-Meßkölbchen mit Glasschliffstopfen

1-, 2-, 5- und 10-ml-Vollpipetten

Microliterpipette, variabel zwischen 100 und 1000 µl (z. B. von Eppendorf)

20-ml-Rollrandfläschchen mit PTFE-kaschierten Bördelkappen sowie Verschlusszange

100-ml-Meßkolben

Vorrichtung zum Eindampfen unter Stickstoffstrom

Arbeitsstation zur Vakuumextraktion (z. B. von Baker)

2.2 Chemikalien

96proz. Schwefelsäure (Suprapur, z. B. von Merck)

37proz. Salzsäure p. a. (z. B. von Merck)

n-Hexan p. a. (z. B. von Merck)

Methanol p. a. (z. B. von Merck)

Essigsäureethylester zur Rückstandsanalyse (z. B. von Baker)

Natriumhydroxid-Plättchen p. a. (z. B. von Merck)

4-Chlor-2-Methylphenoxybutansäure, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

4-Chlor-2-Methylphenoxybutansäuremethylester, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäuremethylester, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

2,4-Dichlorphenoxyessigsäuremethylester, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäuremethylester, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

2,4-Dichlorphenoxypropionsäure, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

2,4-Dichlorphenoxypropionsäuremethylester, 99proz. (z. B. Pestanal von Riedel-de Haën)

hochreines Wasser (entsprechend ASTM Typ 1) bzw. aqua bidest.

Helium für die GC

Nachgereinigter Stickstoff

C

2.3 Lösungen

Lösung des internen Standards:

Ca. 10 mg 4-Chlor-2-Methyl-Phenoxybutansäure werden in einen 100-ml-Meßkolben genau eingewogen, der anschließend mit hochreinem Wasser unter vorsichtigem Umschwenken aufgefüllt wird (Gehalt: 100 mg/l). 10 ml dieser Lösung werden in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, der anschließend bis zur Marke mit hochreinem Wasser aufgefüllt wird (Gehalt: 10 mg/l).

Diese Lösung ist im Kühlschrank bei 4 °C etwa 4 Wochen haltbar.

2.4 Vergleichsstandards

Ausgangslösung:

Je ca. 50 mg 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure und 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure werden in einen 100-ml-Meßkolben genau eingewogen. Anschließend wird der Meßkolben mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (0,5 g/l).

Diese Lösung ist im Kühlschrank bei 4 °C etwa 4 Wochen haltbar.

Stammlösung:

1 ml der Ausgangslösung wird in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, der mit hochreinem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt und einige Male vorsichtig umgeschwenkt wird (Gehalt: 5 mg/l).

Diese Lösung ist im Kühlschrank bei etwa 4 °C etwa 4 Wochen haltbar.

Aus dieser Stammlösung werden durch Verdünnen mit hochreinem Wasser Vergleichsstandards hergestellt, die zwischen 5 und 100 µg der jeweiligen Chlorphenoxy-carbonsäuren pro Liter enthalten (vgl. Tab. 2).

Tab. 2. Pipettierschema für die Herstellung der Vergleichsstandards

Volumen der Stammlösung [ml]	Endvolumen des Vergleichsstandards [ml]	Konzentration des Vergleichsstandards [µg/l]
0,2	100	10
0,4	100	20
0,5	100	25
1	100	50
2	100	100

Die auf diese Weise hergestellten Vergleichsstandards sind im Kühlschrank bei 4 °C 4 Wochen haltbar.

2.5 Vorbereitung der C18-Kartusche

Eine Octadecyl-Kartusche wird nacheinander mit je 3 ml Essigsäureethylester, 3 ml n-Hexan, 6 ml Methanol und 9 ml hochreinem Wasser vorkonditioniert. Die auf diese Weise vorbereitete Kartusche muß beim Aufbringen des Harns noch feucht sein.

3 Probenahme und Probenaufbereitung

Der Harn wird über 24 Stunden in verschließbaren Kunststoff-Flaschen gesammelt und das Gesamtvolumen bestimmt.

25 ml Harn werden mit 37proz. HCl auf pH 0–3 gebracht (1 ml 37proz. HCl pro 100 ml Harn) und mit 1 ml internen Standard versetzt. Der so vorbereitete Harn wird nun langsam über die noch feuchte, nach Abschnitt 2.5 vorkonditionierte, C18-Kartusche gesaugt. Zur Probenaufarbeitung mittels der Flüssig-Fest-Extraktion verwendet man zweckmäßigerweise eine Apparatur, bei der mehrere Kartuschen gleichzeitig unter Vakuum behandelt werden können (z. B. Arbeitsstation zur Vakuumextraktion).

Nach der Anreicherung der Chlorphenoxy-carbonsäuren wird die Kartusche mit 6 ml hochreinem Wasser gewaschen und anschließend trockengesaugt.

Die Elution der angereicherten Substanzen erfolgt mit 3 ml Methanol. Das Eluat wird in einem Bördelgläschen aufgefangen, in dem 1 ml 98proz. Schwefelsäure vorgelegt wurde.

Nach einer Wartezeit von etwa 5 Minuten werden 2 ml n-Hexan in das Bördelgläschen pipettiert. Nach dem Verschließen des Gläschens mit einem teflonkaschierten Butylgummistopfen wird die Lösung 10 Minuten mechanisch geschüttelt. Die organische Phase wird anschließend in ein ca. 1,5-ml-Glasgefäß (Samplervial) überführt und auf ca. 300 µl im Stickstoffstrom eingengt.

4 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Quarzglas (fused silica)
	Stationäre Phase:	DB-WAX
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	
Temperaturen:	Säule:	2 Minuten bei 35 °C; dann Anstieg 50 °C pro Minute bis 150 °C; dann Anstieg 10 °C pro Minute bis 220 °C; 9 Minuten bei Endtemperatur
	Injektor:	210 °C

Trägergas: Helium mit einem Säulenvordruck von 1300 hPa
Splitless-Zeit: 1 Minute
Probenmenge: 1 µl

5 Analytische Bestimmung

Zur gaschromatographischen Analyse werden jeweils 1 µl der aufgearbeiteten Proben in den Gaschromatographen injiziert.

Die analytische Bestimmung erfolgt mit einem massenselektiven Detektor (MSD) im SIM-Modus (selected ion monitoring). Für die Bestimmung der Chlorphenoxy-carbonsäuren wurden am MSD folgende Bedingungen gewählt (vgl. Tab. 3):

Tab. 3. Ausgewählte Bedingungen für die Bestimmung der Chlorphenoxy-carbonsäuren mit Hilfe des MSD

Verbindung	Retentionszeit [min]	Massen [g/mol]	Flächenprozent [%]
4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure-methylester	11,47	214,05	100
		215,95	33
		155,00	58
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-methylester	13,11	199,00	100
		233,95	62
		235,95	40
4-Chlor-2-Methylphenoxypropion-säuremethylester	10,26	228,05	100
		169,00	97
		230,05	34
2,4-Dichlorphenoxypropionsäure-methylester	11,41	161,90	100
		247,95	65
		249,95	44
4-Chlor-2-Methylphenoxybutan-säuremethylester (Interner Standard)	13,62	242,05	100
		211,05	91
		244,05	33

Liegen die Meßwerte außerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierkurve, so werden die Proben mit hochreinem Wasser verdünnt und erneut aufgearbeitet.

Ein Beispiel für ein Massenspektrum von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäuremethylester zeigt Abbildung 2, ein Gaschromatogramm Abbildung 3.

6 Kalibrierung

Die wäßrigen Vergleichsstandards (Abschnitt 2.4) werden wie die Harnproben (Abschnitt 3) aufbereitet und entsprechend der Abschnitte 4 und 5 gaschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert. Man erstellt die Kalibrierkurven, indem man die Quotienten der Peakflächen der einzelnen Chlorphenoxycarbonsäuren und des internen Standards gegen die eingesetzten Konzentrationen aufträgt (vgl. Abbildung 4). Es ist nicht notwendig, bei jeder Analysenserie eine vollständige Kalibrierkurve aufzunehmen. Es genügt, bei jeder Analysenserie einen wäßrigen Vergleichsstandard mitzumessen. Die Werte, die für diesen Standard ermittelt werden, setzt man dann zu demjenigen Wert in Verhältnis, der aus der vollständigen Kalibrierkurve für diesen Standard ermittelt wurde. Mit dem bzw. den Quotienten korrigiert man jedes Meßergebnis, das durch Ablesung an der Kalibrierkurve erhalten wurde. Eine neue Kalibrierkurve sollte erstellt werden, wenn die Ergebnisse der Qualitätssicherung systematische Abweichungen erkennen lassen.

Die Kalibrierkurve ist zwischen der Nachweisgrenze und 120 µg der Chlorphenoxycarbonsäuren pro Liter Harn linear.

7 Berechnung des Analyseergebnisses

Die ermittelten Peakflächen der Chlorphenoxycarbonsäuren werden durch die Peakfläche des internen Standards dividiert. Mit den so erhaltenen Quotienten geht man in die entsprechende Kalibrierkurve ein und ermittelt die dazugehörige Konzentration der Chlorphenoxycarbonsäuren in µg pro Liter Harn. Das Meßergebnis wird, wie im Abschnitt 6 beschrieben, korrigiert.

Ein Reagenzienleerwert ist ggf. zu berücksichtigen.

8 Standardisierung der Meßergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß der TRgA 410 [27] der Gefahrstoffverordnung und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren. Zur Präzisionskontrolle wird eine Kontrollprobe mit untersucht, die eine konstante Konzentration der einzelnen Chlorphenoxycarbonsäuren aufweist. Da entsprechendes Kontrollmaterial nicht gekauft werden kann, muß dies selbst hergestellt werden. Dazu versetzt man Harn mit definierten Mengen der einzelnen Chlorphenoxycarbonsäuren. Aliquote dieser Lösung können bis zu einem Jahr tiefgekühlt aufbewahrt und zur Qualitätskontrolle eingesetzt werden. Der Sollwert dieser Qualitätskontrolllösung wird im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [28].



9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde Harn einer beruflich nicht mit Chlorphenoxy-carbonsäuren belasteten Person mit verschiedenen, definierten Mengen an Chlorphenoxy-carbonsäuren versetzt. Es entstanden Lösungen, die die Chlorphenoxy-carbonsäuren in Konzentrationen zwischen 31,7 und 40,6 µg pro Liter Harn aufwiesen. Bei der 8fachen Bestimmung dieser Harnproben ergaben sich relative Standardabweichungen zwischen 2,4 und 4,2 %, entsprechend den Streubereichen zwischen 5,5 und 9,7 % (siehe Tab. 4).

Tab. 4. Präzision in der Serie für die gaschromatographische Bestimmung von Chlorphenoxy-carbonsäuren ($n = 8$)

Substanz	Sollwert [µg/l]	Standard- abweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure	31,7	2,6	6,0
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	39,1	2,4	5,5
4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure	40,6	3,4	7,8
2,4-Dichlorphenoxypropionsäure	33,5	4,2	9,7

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurde der Harn einer beruflich nicht mit Chlorphenoxy-carbonsäuren belasteten Person in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen mit definierten Mengen an Chlorphenoxy-carbonsäuren versetzt und an acht verschiedenen Tagen aufgearbeitet. Es ergaben sich relative Standardabweichungen zwischen 3,6 und 11,3 %, entsprechend den Streubereichen zwischen 8,3 und 26,2 % (siehe Tab. 5).

Tab. 5. Präzision von Tag zu Tag für die gaschromatographische Bestimmung von Chlorphenoxy-carbonsäuren ($n = 8$ Tage)

Substanz	Sollwert [$\mu\text{g/l}$]	Standard- abweichung (rel.) [%]	Strebereich [%]
4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure	9,9	6,9	15,9
	23,3	5,5	12,7
	35,5	3,6	8,3
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	5,4	11,3	26,2
	12,8	7,8	18,0
	20,7	4,8	11,0
4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure	9,9	9,9	22,8
	22,9	8,0	18,4
	35,7	4,5	10,4
2,4-Dichlorphenoxypropionsäure	17,4	9,9	22,8
	38,7	8,6	19,8
	63,3	7,3	16,8



9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der, während der Probenaufbereitung auftretenden Verluste, wurde eine Lösung der entsprechenden Chlorphenoxy-carbonsäuremethylester in n-Hexan hergestellt und ohne weitere Probenaufbereitung gaschromatographisch analysiert. Die erhaltenen Analysenergebnisse wurden mit denen von Harnproben verglichen, die dieselben Chlorphenoxy-carbonsäure-Konzentrationen aufwiesen, und die der beschriebenen Aufbereitung unterworfen wurden. Die aufbereitungsbedingten Verluste lagen zwischen 5 und 9 % (siehe Tab. 6).

Tab. 6. Aufbereitungsbedingte Verluste

Substanz	Wiederfindung [%]	Aufbereitungsbedingte Verluste [%]
4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure	95	5
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	93	7
4-Chlor-2-Methylphenoxypropionsäure	91	9

Da für 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure kein entsprechender Methylester zur Verfügung stand, wurde Harn einer beruflich nicht mit 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure belasteten Person mit einer definierten Menge an 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure versetzt und gemäß Abschnitt 3 aufgearbeitet und analysiert. Die Wiederfindung lag bei 90 %.

9.3 Nachweisgrenze

Unter den angegebenen Bedingungen der Probenaufbereitung und der gaschromatographischen Bestimmung lag die Nachweisgrenze bei 10 µg der einzelnen Chlorphenoxy-carbonsäuren pro Liter Harn. Da Reagenzienleerwerte nicht auftraten, wurde die Nachweisgrenze aus dem 3fachen Signal-/Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Die Bestimmungsgrenze der Methode wurde aus der 10fachen Standardabweichung des Untergrundrauschens zu 30 µg der einzelnen Chlorphenoxy-carbonsäuren pro Liter Harn bestimmt.

9.4 Störeinflüsse

Querempfindlichkeiten des Verfahrens konnten bisher nicht festgestellt werden. D. h., in keiner der bisher untersuchten Harnproben von beruflich nicht gegenüber Chlorphenoxy-carbonsäuren belasteten Personen konnte ein gaschromatographischer Peak bei oder in der Nähe der für die einzelnen Chlorphenoxy-carbonsäuren charakteristischen Retentionszeiten beobachtet werden. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß im Harn von beruflich nicht exponierten Personen diese Verbindungen üblicherweise nicht nachgewiesen werden können.

Bei dem für die Extraktion verwendeten Lösungsmittel muß unbedingt auf die Reinheit geachtet werden, da diese von Hersteller zu Hersteller stark schwanken kann. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht ausgeschlossen werden, daß es beim Transport von Harnproben in Kunststoffgefäßen zu Verlusten kommt. In diesem Zusammenhang muß mit eventuellen Adsorptionsvorgängen des Analyten an den Gefäßwandungen gerechnet werden. Um absorbierte Substanzen zu remobilisieren, könnte es sich daher als sinnvoll erweisen, den Harn kurz vor der Aufbereitung z. B. mit Natriumhydroxidplätzchen auf einen pH-Wert zwischen 12 und 14 zu bringen.

10 Diskussion der Methode

Das vorliegende Verfahren gestattet eine einfache, zuverlässige und richtige Bestimmung der Chlorphenoxy-carbonsäuren im Harn. Es zeichnet sich durch einen geringen Arbeitsaufwand und eine geringe Störanfälligkeit aus. Der Prüfer der Methode konnte daher auf Anrieb sowohl die Aufarbeitung als auch die Qualitätskriterien des Autors nachvollziehen.

Durch die unproblematische Art der Derivatisierung der Chlorphenoxy-carbonsäuren mit Schwefelsäure/Methanol läßt sich die Verwendung kanzerogener Derivatisierungsreagenzien (wie z. B. Diazomethan, Methyljodid u. a.) vermeiden.

Wie die Ergebnisse des Prüfers der Methode zeigen, läßt sich n-Hexan als Lösungsmittel problemlos durch n-Heptan ersetzen.

Die Verwendung eines massenselektiven Detektors ermöglicht eine für arbeitsmedizinische Zwecke mehr als ausreichende Nachweisgrenze. Darüber hinaus wird da-

durch ein hohes Maß an Spezifität erzielt. Prinzipiell kann auch mit einem Elektroneneinfang Detektor (ECD) gearbeitet werden. In diesem Fall muß jedoch mit erhöhten Interferenzen durch andere im Harn auftretende Substanzen gerechnet werden. Die Erfassung des ökologisch bedingten Konzentrationsbereichs der Chlorphenoxy-carbonsäuren ist anhand der vorliegenden Methode nicht möglich. Durch ein weiteres Einengen der Probelösung läßt sich die Nachweisgrenze der Methode jedoch weiter senken, so daß eventuell der ökologische Bereich mit erfaßt werden kann.

Verwendete Meßgeräte:

Gaschromatograph HP 5890, massenselektiver Detektor HP 5970B mit Unix-Workstation und Autosampler HP 7673A der Fa. Hewlett Packard

C

11 Literatur

- [1] *A. K. Hassall*: The Chemistry of Pesticides. Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1982.
- [2] *W. P. Cochran, J. Singh, W. Miles und B. Wakeford*: Determination of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin contaminants in 2,4-D products by gas chromatography-mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr.* 217, 289–299 (1981).
- [3] *Å. Norstrom, C. Rappe, R. Lindhal und H.-R. Buser*: Analysis of some older Scandinavian formulations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid for contents of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Scand. J. Work Environ. Health* 5, 375–378 (1979).
- [4] *Y. Y. Wigfield und C. C. McLenaghan*: N-Nitrosodimethylamine content of aqueous dimethylamine and phenoxy herbicide/dimethylamine formulations during storage. *Pestic. Sci.* 9, 13–18 (1987).
- [5] *Y. Y. Wigfield und C. C. McLenaghan*: Levels of N-nitrosodimethylamine in nitrogen fertilizers/herbicide mixtures containing 2,4-D present as dimethyl-amine salt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 847–852 (1990).
- [6] *H. Greim* (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 20. Lieferung (1994).
- [7] *IPCS*, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 29: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). World Health Organization, Geneva 1984.
- [8] *G. G. Bond, N. H. Wetterstroem, G. J. Roush, E. A. McLaren, T. E. Lipps und R. R. Cook*: Cause specific mortality among employees engaged in the manufacture, formulation, or packing of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and related salts. *Br. J. Ind. Med.* 43, 98–105 (1988).
- [9] *S. W. Frantz und B. E. Kropscott*: Pharmacokinetic evaluation of a single oral administration of the 2-ethylhexyl(isooctyl)ester of 2,4-D to Fischer 344 rats. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2, 75–85 (1993).
- [10] *O. Pelletier, L. Ritter, J. Caron und D. Somer*: Disposition of 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid dimethylamine salt by Fischer 344 rats dosed orally and dermally. *J. Toxicol. Environ. Health* 28, 221–234 (1989).
- [11] *S. J. Gorzinski, R. J. Kociba, R. A. Campbell, F. A. Smith, R. J. Nolan und D. L. Eisenbrandt*: Acute pharmacokinetic and subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9, 423–435 (1987).

- [12] *M. W. Sauerhoff, W. H. Braun, G. E. Blau und P. J. Gehring*: The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology* 8, 3–11 (1977).
- [13] *D. Knopp und F. Schiller*: Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salt to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. *Arch. Toxicol.* 66, 170–174 (1992).
- [14] *R. P. Moody, C. A. Franklin, L. Ritter und H. Maibach*: Dermal absorption of the phenoxy herbicides 2,4-D, 2,4-D amine, 2,4-D isooctyl and 2,4,5-T in rabbits, rats, rhesus monkeys and humans: A cross-species comparison. *J. Toxicol. Environ. Health* 29, 237–245 (1990).
- [15] *S. A. Harris und K. R. Solomon*: Percutaneous penetration of 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid and 2,4-D dimethylamine salt in human volunteers. *J. Toxicol. Environ. Health* 36, 233–240 (1992).
- [16] *D. Knopp, M. Schmidt und R. Niessner*: Accidental bystander overexposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fresenius Environ. Bull.* 2, 148–150 (1993).
- [17] *W. M. Draper und J. C. Street*: Applicator exposure to 2,4-D, dicamba and a di camba isomer. *J. Environ. Sci. Health, B17 (4)*, 321–339 (1982).
- [18] *B. Kolmodin-Hedman, K. Erne, M. Håkansson und A. Engquist*: Control of occupational exposure to phenoxyacids (2,4-D and 2,4,5-T). *Arbete och Hälsa*, 17, 3–26 (1979).
- [19] *B. Kolmodin-Hedman und K. Erne*: Estimation of occupational exposure to phenoxy acids (2,4-D and 2,4,5-T). *Arch. Toxicol.* 4, 318–321 (1980).
- [20] *S. Libich, J. C. To, K. Y. Wang und D. A. Watson*: A study to assess the occupational exposure to 2,4-D herbicides. Safety Services Department, Health and Safety Division, pp. 16 (Ontario Hydro. Report SSD-81-1), Toronto 1981.
- [21] *S. K. Hoar, A. Blair, F. F. Holmes, C. D. Boysen, R. J. Robel, R. Hoover und J. F. Fraumeni*: Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. *J. Am. Med. Assoc.* 256, 1141–1147 (1986).
- [22] *S. K. Hoar, S. Zahm, D. D. Weisenburger, P. A. Babbitt, R. C. Saal, J. B. Vaughn, K. P. Cantor und A. Blair*: A case-control study of non Hodgkin's lymphoma and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in eastern Nebraska. *Epidemiology* 1, 349–356 (1990).
- [23] *D. D. Weisenburger, S. Zahm, M. Ward, P. A. Babbitt, F. Homes, C. Boysen, R. J. Robel, R. C. Saal, J. B. Vaughn, K. P. Cantor und A. Blair*: Non-Hodgkin's lymphoma association with the agricultural use of herbicides: Analysis by histologic type. *Lab. Invest.* 62, 105A (Abstract) (1990).
- [24] *K. Cantor, A. Blair, G. Everett, R. Gibson, L. Burmeister, L. M. Brown, L. M. Schuman und F. R. Dick*: Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 52, 2447–2455 (1992).
- [25] *J. S. Woods und L. Polissar*: Non-Hodgkin's lymphoma among phenoxy herbicide-exposed farm workers in western Washington state. *Chemosphere* 18, 401–406 (1986).
- [26] *L. M. Brown, A. Blair, R. Gibson, G. D. Everett, K. P. Cantor, L. M. Schuman, L. F. Burmeister, S. F. van Lur und F. Dick*: Pesticide exposure and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 50, 6585–6591 (1990).
- [27] *Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung*: TRGA 410. Statistische Qualitätssicherung. In: Technische Regeln und Richtlinien des BMA zur Verordnung über gefährliche Stoffe. Bek. des BMA vom 9. 4. 1979, Bundesarbeitsblatt 5/1979, S. 88 ff.
- [28] *J. Angerer und K. H. Schaller*: Erfahrungen mit der statistischen Qualitätskontrolle im arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratorium. *Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed.* 1, 33–35 (1977).

Autoren: *W. Krämer, W. Merz, W. Ziemer*
Prüfer: *J. Angerer*

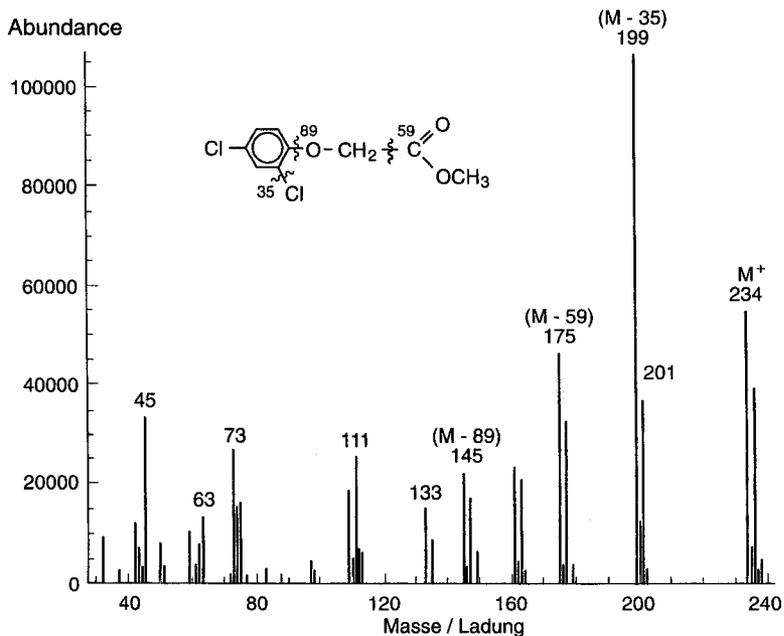


Abb. 2. Massenspektrum von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäuremethylester. (Die Schlangenlinien in der Molekülstruktur symbolisieren Bruchstücke des Moleküls)



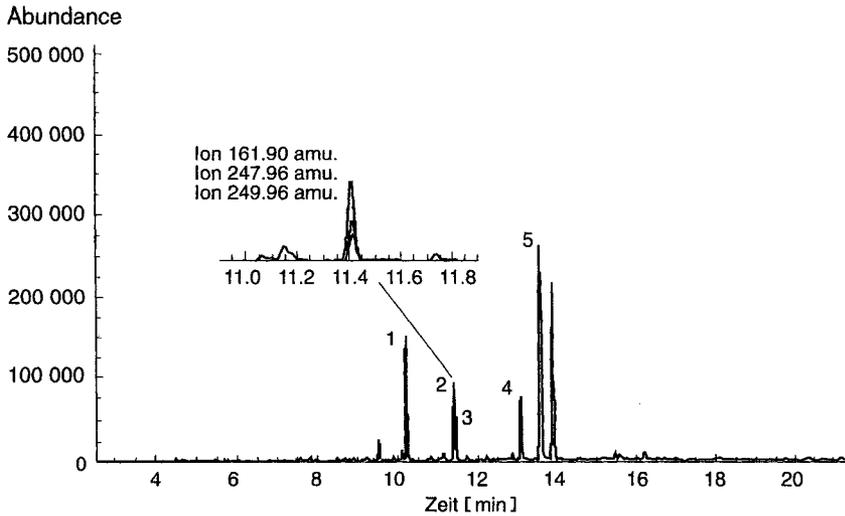


Abb. 3. Gaschromatogramm eines mit je 30–40 µg/l Chlorphenoxy-carbonsäuren dotierten Harns.

- 1 4-Chlor-2-Methyl-Phenoxypropionsäure
- 2 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure
- 3 4-Chlor-2-Methyl-Phenoxyessigsäure
- 4 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
- 5 interner Standard

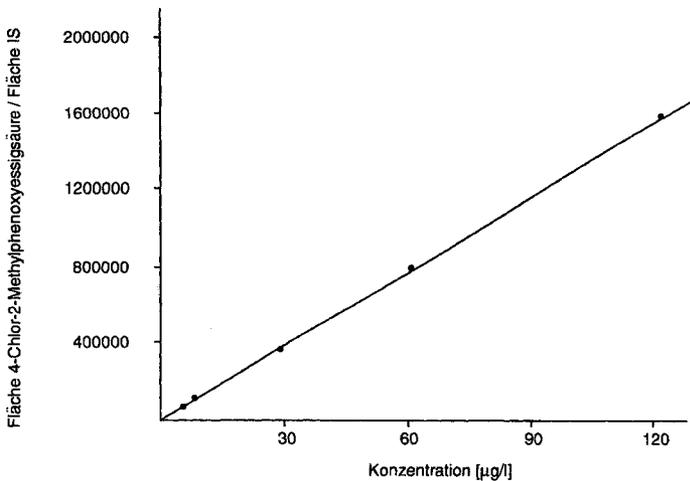


Abb. 4. Beispiel einer Kalibrierkurve zur Bestimmung von 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure