

# 2,6-Difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen – Bestimmung von 2,6-Difluorbenzoesäure in Urin mittels GC-MS

## Biomonitoring-Methode

T. Göen<sup>1,3,\*</sup>

A. Schäferhenrich<sup>1</sup>

E. Taghikhanian<sup>1</sup>

J. Hardt<sup>2</sup>

A. Hartwig<sup>4,\*</sup>

MAK Commission<sup>5,\*</sup>

### Keywords

Benzoylharnstoffverbindungen; 2,6-Difluorbenzoesäure; Biozide; Pestizide; Biomonitoring; Urin; GC-MS

<sup>1</sup> *Methodenentwicklung, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*

<sup>2</sup> *Methodenprüfung, Institut für Labormedizin und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Augsburg, Stenglinstraße 2, 86156 Augsburg*

<sup>3</sup> *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*

<sup>4</sup> *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*

<sup>5</sup> *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

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

### Citation Note:

Göen T, Schäferhenrich A, Taghikhanian E, Hardt J, Hartwig A, MAK Commission. 2,6-Difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen – Bestimmung von 2,6-Difluorbenzoesäure in Urin mittels GC-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Mrz;7(1):Doc022. [https://doi.org/10.34865/bi3850d7\\_1or](https://doi.org/10.34865/bi3850d7_1or)

Manuskript abgeschlossen:  
29 Okt 2020

Publikationsdatum:  
31 Mrz 2022

Lizenz: Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



## 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 developed and verified the presented biomonitoring method.

The analytical method described herein allows for the sensitive and specific determination of 2,6-difluorobenzoic acid (2,6-DFBA) in the urine of individuals occupationally exposed to 2,6-difluorobenzoylurea compounds. 2,6-DFBA is determined by gas chromatography with mass-spectrometric detection (GC-MS) after derivatization. To this end, urine samples are mixed with an internal standard (ISTD), acidified, and purified using solid-phase extraction (SPE). The samples are derivatised with *N*-methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA), and the analyte concentration is quantified by GC-MS. The ISTD used is 5-bromo-2-fluorobenzoic acid. Calibration is performed using standard solutions prepared in pooled urine.

## 1 Kenndaten der Methoden

<b>Matrix</b>	Urin		
<b>Analytisches Messprinzip</b>	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS)		
<b>Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe</b>			
Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Bistrifluron (N-[[2-Chlor-3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	201593-84-2		
Chlorfluazuron (N-[[3,5-Dichlor-4-[3-chlor-5-(trifluormethyl)pyridin-2-yl]oxyphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	71422-67-8		
Diflubenzuron (N-[[4-Chlorphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	35367-38-5		
Fluazuron (N-[[4-Chlor-3-[3-chlor-5-(trifluormethyl)pyridin-2-yl]oxyphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	86811-58-7		
Flucycloxuron (N-[[4-[[ <i>E</i> ]-[[4-Chlorphenyl]cyclopropylmethylidene]amino]oxymethyl]phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	113036-88-7; 94050-52-9		
Flufenoxuron (N-[[4-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-fluorphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	101463-69-8	2,6-DFBA	385-00-2
Hexaflumuron (N-[[3,5-Dichlor-4-(1,1,2,2-tetrafluorethoxy)phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	86479-06-3		
Lufenuron (N-[[2,5-Dichlor-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluorpropoxy)phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	103055-07-8		
Novaluron (N-[[3-Chlor-4-[1,1,2-trifluor-2-(trifluormethoxy)ethoxy]phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	116714-46-6		
Noviflumuron (N-[[3,5-Dichlor-2-fluor-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluorpropoxy)phenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	121451-02-3		
Penfluron (2,6-Difluor-N-[[4-(trifluormethyl)phenyl]carbamoyl]benzamid)	35367-31-8		
Teflubenzuron (N-[[3,5-Dichlor-2,4-difluorphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorbenzamid)	83121-18-0		

## Zuverlässigkeitskriterien

### 2,6-DFBA

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,74\%$ , $4,15\%$ bzw. $2,93\%$
	Streubereich bei einer dotierten Konzentration von $2,5\ \mu\text{g}$ , $20\ \mu\text{g}$ bzw. $100\ \mu\text{g}$ 2,6-DFBA pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	$u = 21,5\%$ , $11,5\%$ bzw. $8,13\%$
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 8,92\%$ , $2,06\%$ bzw. $3,75\%$
	Streubereich bei einer dotierten Konzentration von $2,5\ \mu\text{g}$ , $20\ \mu\text{g}$ bzw. $100\ \mu\text{g}$ 2,6-DFBA pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	$u = 24,8\%$ , $5,73\%$ bzw. $4,40\%$
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von $2,5\ \mu\text{g}$ , $20\ \mu\text{g}$ bzw. $100\ \mu\text{g}$ 2,6-DFBA pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	$r = 99,2\%$ , $101\%$ bzw. $101\%$
Nachweisgrenze:	$0,416\ \mu\text{g}$ 2,6-DFBA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$1,32\ \mu\text{g}$ 2,6-DFBA pro Liter Urin	

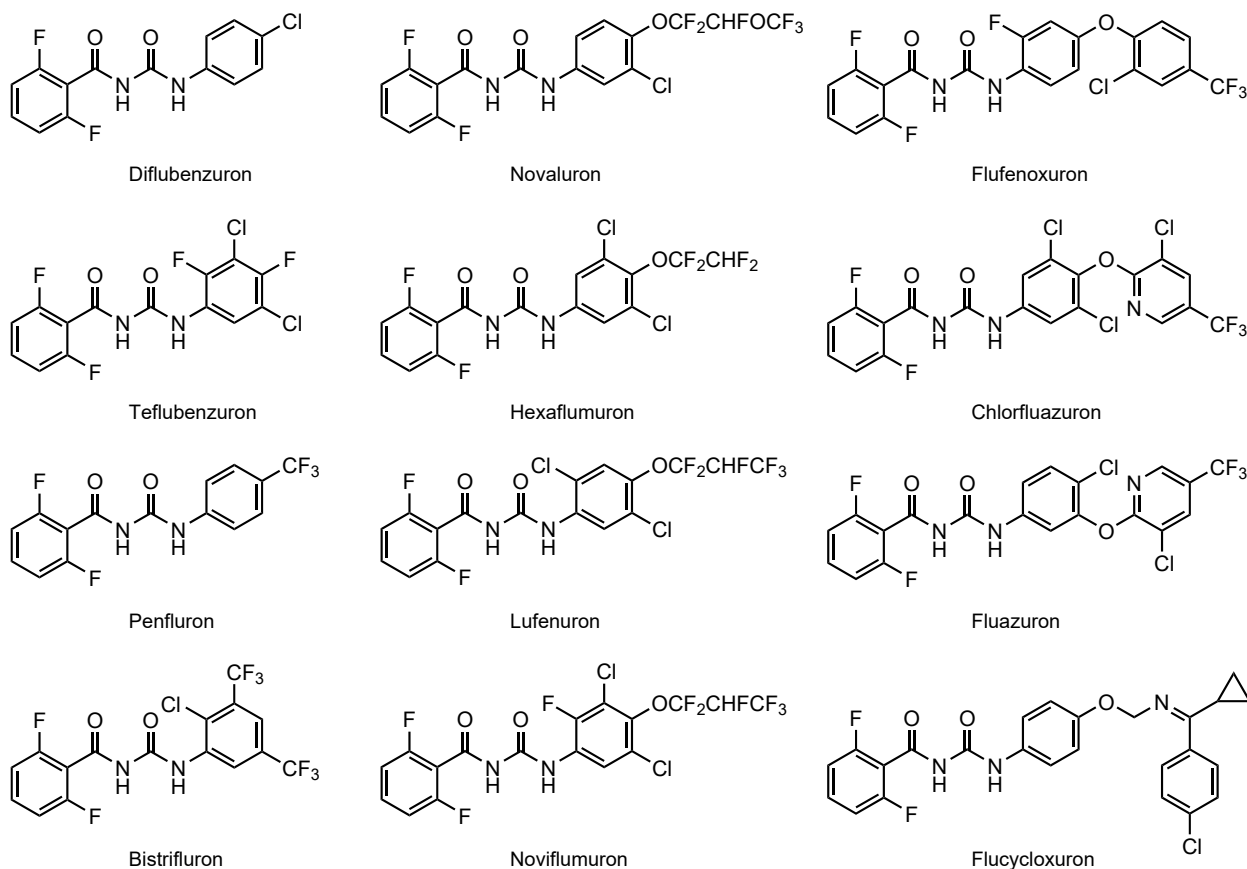
## 2 Allgemeine Informationen zu den Arbeitsstoffen

Benzoylphenylharnstoffderivate sind Chitinsyntheseinhibitoren, die aufgrund ihrer geringen Säugetiertoxizität weltweit zur Schädlingsbekämpfung im Pflanzenbau und in der Tierhaltung sowie im Holzschutz eingesetzt werden. Die Verbindungen hemmen den Transport von UDP-N-Acetylglucosamin durch die Biomembran der Zellen und so die Chitinsynthese. Die auf diesem Weg verhinderte Häutung führt zum Absterben der Larven bzw. Puppen oder zu nicht lebensfähigen Adulten. Die Wirkung der Benzoylphenylharnstoffderivate setzt damit nicht sofort ein, sondern immer erst im Übergang zum nächsten Entwicklungsstadium (Cohen 2001; Sun et al. 2015).

Als erster Vertreter dieser Wirkstoffgruppe wurde das Diflubenzuron 1975 unter dem Handelsnamen Dimilin<sup>TM</sup> auf den Markt gebracht. Seitdem sind mehr als 10 000 Benzoylphenylharnstoffderivate synthetisiert worden, wobei nur fünfzehn Verbindungen kommerzielle Bedeutung erlangt haben. Zwölf der kommerziell vermarkteten Benzoylphenylharnstoffderivate besitzen eine 2,6-Difluorsubstitution am Benzoylring, da dieses Substitutionsmuster die höchste larvizide Wirkung aufweist (Abbildung 1) (Sun et al. 2015).

Über den Metabolismus der 2,6-difluorsubstituierten Benzoylphenylharnstoffderivate beim Menschen ist nichts bekannt. Je nach Anwendungsgebiet der 2,6-difluorsubstituierten Benzoylharnstoffverbindungen wurden die Resorption, Verstoffwechslung und Elimination der Substanzen an Versuchstieren, Nutztieren oder Haustieren untersucht. Die dermal oder oral verabreichten Wirkstoffe wurden, abhängig von der Substanz, der verabreichten Substanzmenge, der Applikationsart sowie der untersuchten Spezies, in unterschiedlichem Ausmaß resorbiert, metabolisiert und ausgeschieden. Die Elimination erfolgte dabei unverstoffwechselt mit den Faeces oder metabolisiert mit dem Urin.

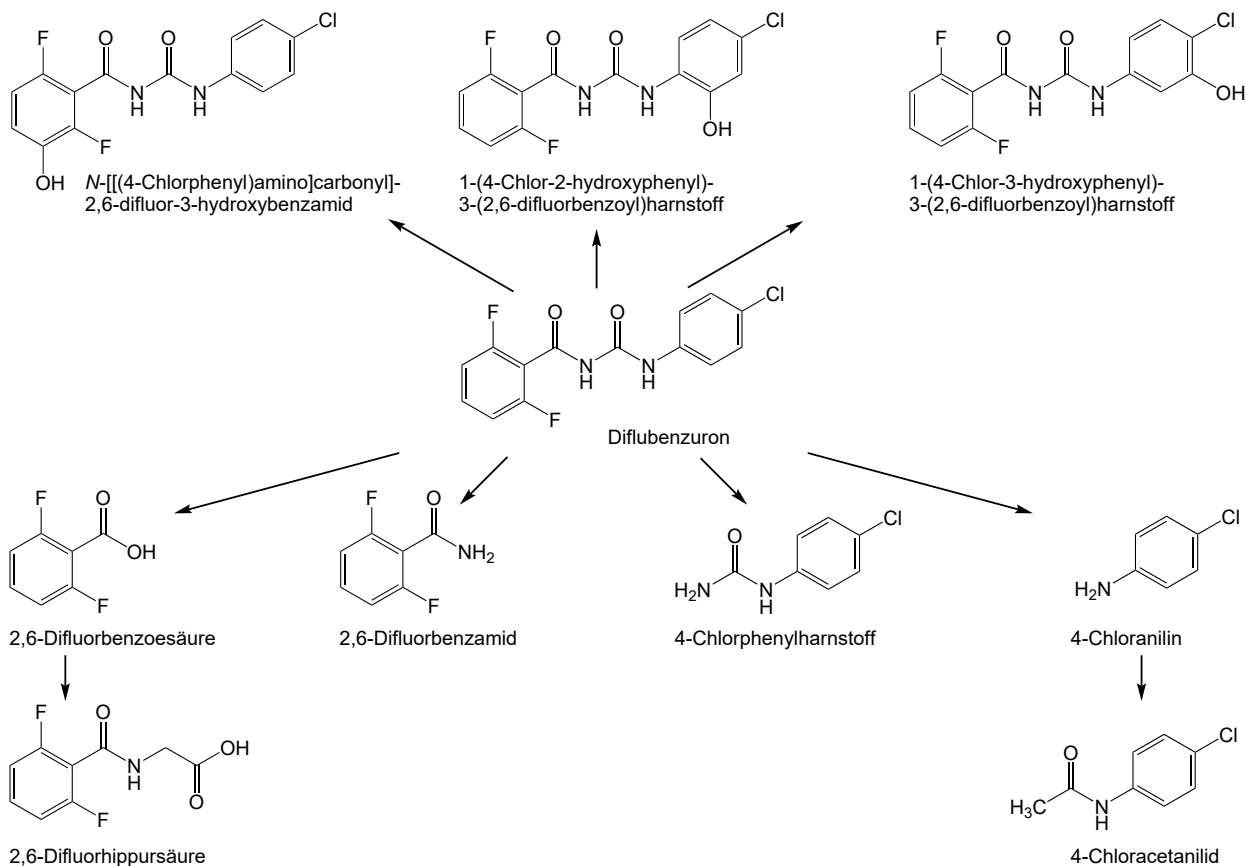
2,6-DFBA im Urin wurde als Metabolit von Fluazuron in Ratten (FAO 1998; WHO 1998), von Diflubenzuron in Ratten, Schafen, Rindern und Schweinen (FAO 2002 a, b; Willems et al. 1980), von Teflubenzuron in Ratten (Koerts et al. 1997), von Novaluron in Ratten (FSCJ 2003), von Hexaflumuron in Ratten (EMA 2015), von Flufenoxuron in Ratten (FSCJ 2007), sowie von Lufenuron in Ratten und Ziegen (FAO 2018) nachgewiesen. Für Bistrifluron, Chlorfluazuron, Flucycloxuron, Noviflumuron sowie Penfluron liegen bislang keine Daten zum Metabolismus im Säugetier vor. Es ist aber davon auszugehen, dass auch diese Substanzen teilweise zu 2,6-DFBA verstoffwechselt und mit dem Urin ausgeschieden werden.



**Abb. 1** Chemische Strukturen der 2,6-difluorsubstituierten Benzoylharnstoffverbindungen, die kommerzielle Bedeutung erlangt haben (nach Sun et al. 2015)

2,6-DFBA stellt somit einen Summenparameter für den Nachweis einer Exposition gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen dar. Sofern eine Exposition nur gegen einen der Arbeitsstoffe erfolgte, zeigt der Nachweis der 2,6-DFBA die spezifische Belastung an.

Die umfangreichste Datenlage liegt zum Metabolismus des Diflubenzurons vor. In [Abbildung 2](#) ist das Metabolismuschema des Diflubenzurons abgebildet. Neben 2,6-DFBA sind auch weitere Stoffwechselprodukte des Diflubenzurons dargestellt, die in verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen wurden (FAO 2002 a, b; Willems et al. 1980).



**Abb. 2** Der Metabolismus des Diflubenzurons im Säugetier (nach FAO 2002 b)

Was die Belastung am Arbeitsplatz anbelangt, so sind in der wissenschaftlichen Literatur bislang keine Daten publiziert und auch zur Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung liegen keine Werte vor. Da 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen zur Schädlingsbekämpfung im Pflanzenbau, in der Tierhaltung und im Bautenschutz eingesetzt werden, kann eine Exposition sowohl am Arbeitsplatz als auch in privaten Lebensbereichen, beispielsweise durch Rückstände auf Lebensmitteln, erfolgen. Bei der Anwendung von Diflubenzuron zur Bekämpfung des Eichenprozessionsspinners wurden sowohl inhalative als auch dermale Expositionen der Anwender festgestellt (Roitzsch et al. 2019).

Laut Datenbank der gemeldeten Biozidprodukte sind in Deutschland Diflubenzuron, Flufenoxuron und Hexaflumuron bis Ende 2024 verkehrsfähig (BAuA 2022) und können als Schädlingsbekämpfungsmittel (Produktart 18, Diflubenzuron und Hexaflumuron), für die Hygiene im Veterinärbereich (Produktart 3, Diflubenzuron) sowie als Holzschutzmittel (Produktart 8, Flufenoxuron) eingesetzt werden. Lufenuron wird in Deutschland als Tierarzneimittel gegen Flöhe und Würmer bei Hunden und Katzen eingesetzt (BfArM 2022).

Darüber hinaus werden Diflubenzuron und Teflubenzuron in Europa in der Fischzucht gegen Parasiten (NVI 2016) sowie Bistrifluron, Chlorfluazuron, Hexaflumuron und Novaluron in Australien gegen Termiten eingesetzt (APVMA 2022).

Erste Untersuchungen unter Verwendung der hier beschriebenen Methode zeigen, dass 2,6-DFBA ein geeigneter Parameter ist, um eine berufliche Belastung gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylphenylharnstoffderivate zu erfassen. Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen die 2,6-DFBA-Gehalte in 34 Urinproben von drei Beschäftigten nach Handhabung und Sprühausbringung von Diflubenzuron zur Bekämpfung des Eichenprozessionsspinners.

**Tab. 1** 2,6-DFBA im Urin von drei Beschäftigten nach beruflicher Exposition gegen Diflubenzuron (n = 34)

Analyt	Mittelwert ± Standardabweichung [µg/l]	Bereich [µg/l]	Median [µg/l]
2,6-DFBA	42,1 ± 47,2	0,786–151	12,8

### 3 Grundlage des Verfahrens

Das nachfolgend beschriebene Analysenverfahren erlaubt die empfindliche und spezifische Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin von berufsbedingt gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen exponierten Personen. 2,6-DFBA wird nach Derivatisierung mittels GC-MS bestimmt. Dazu werden die Urinproben mit ISTD versetzt, angesäuert und mit Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt. Es wird mit MTBSTFA derivatisiert und der Analytgehalt der Proben mit GC-MS quantifiziert. Als ISTD wird 5-Brom-2-fluorbenzoesäure verwendet. Die Kalibrierung erfolgt mit Standardlösungen, die in Poolurin angesetzt werden.

## 4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 4.1 Geräte

- Gaschromatograph Agilent 8890 GC mit Autosampler (7693A) und massenspektrometrischem Detektor (5977B MSD); Auswertesoftware (Enhanced ChemStation) (z. B. Agilent Technologies Germany & Co. KG, Waldbronn)
- Kapillargaschromatographische Säule: stationäre Phase: 5%-Phenylmethylpolysiloxan; Länge: 60 m; Innendurchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm (z. B. HP-5ms, Nr. 19091S-436, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Laborzentrifuge (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Trockenschrank (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Analysenwaage (z. B. BP 211D, Sartorius AG, Göttingen)
- Mikroliterpipetten, 10–100 µl sowie 100–1000 µl mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipette® Plus (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- pH-Meter (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Vortex-Mischer (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- SPE-Station (z. B. IST VacMaster, Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden)
- SPE-Kartuschen (z. B. ISOLUTE ENV+, 100 mg, 3 ml, Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden)
- 10-ml-, 50-ml- und 100-ml-Messkolben (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 5-ml-Probengläschen (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 1,8-ml-GC-Gläschen mit Schraubverschlüssen (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- Verschiedene Bechergläser und Messzylinder (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Urinbecher aus Polypropylen (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 10-ml-Urinröhrchen (z. B. Urin-Monovette®, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

## 4.2 Chemikalien

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

- 2,6-Difluorbenzoesäure (2,6-DFBA) 98 % (z. B. Nr. D57450, Merck KGaA, Darmstadt)
- 5-Brom-2-fluorbenzoesäure 97 % (z. B. Nr. 636452, Merck KGaA, Darmstadt)
- *N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid mit 1% *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (MTBSTFA mit 1% TBDMSCl)  $\geq 95$  % (z. B. Nr. 375934, Merck KGaA, Darmstadt)
- Salzsäure 25 % (z. B. Nr. 100316, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol MS SupraSolv® (z. B. Nr. 100837, Merck KGaA, Darmstadt)
- Acetonitril, wasserfrei (z. B. Nr. 83676.269, VWR International GmbH, Darmstadt)
- Toluol MS SupraSolv® (z. B. Nr. 100849, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q plus VE System ( $> 18$  M $\Omega$ ), Merck KGaA, Darmstadt)
- Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen, Proteine ausgefroren und abfiltriert
- Helium 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)

## 4.3 Lösungen

- Verdünnte Salzsäure (1 : 20 (V/V), 0,4 mol/l)  
In einen 100-ml-Messkolben werden 80 ml hochreines Wasser vorgelegt und 5 ml einer 25%igen Salzsäure hinzupipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Verdünnte Salzsäure (pH 1,5)  
200 ml hochreines Wasser werden in einem Becherglas vorgelegt. Durch Zugabe von 25%iger Salzsäure wird ein pH-Wert von 1,5 eingestellt.
- Verdünnte Salzsäure (pH 1,5) mit 5 % (V/V) Methanol  
In einen 100-ml-Messkolben werden 5 ml Methanol vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit verdünnter Salzsäure (pH 1,5) aufgefüllt.

## 4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung (500 mg/l)  
25 mg der 5-Brom-2-fluorbenzoesäure werden in einen 50-ml-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- ISTD-Dotierlösung (10 mg/l)  
200  $\mu$ l der ISTD-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stamm- und die Dotierlösung des internen Standards können bei  $-20$  °C mindestens sechs Monate ohne Substanzverlust gelagert werden.

## 4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (500 mg/l)  
25 mg 2,6-DFBA werden in einen 50-ml-Messkolben genau eingewogen. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Dotierlösung I (1000 µg/l)  
20 µl der Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.
- Dotierlösung II (100 µg/l)  
1000 µl der Dotierlösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösung gut durchmischt.

Die Stammlösung und die Dotierlösungen der 2,6-DFBA können bei –20 °C mindestens sechs Monate ohne Analytverlust gelagert werden.

Die Kalibrierstandards werden in Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen angesetzt, nachdem die Proteine ausgefroren und abfiltriert wurden. Dazu werden die Dotierlösungen gemäß dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema in 5-ml-Schraubgläschen pipettiert und mit Poolurin versetzt. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Urinproben gemäß [Abschnitt 5](#).

**Tab. 2** Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung	Volumen Dotierlösung [µl]	Volumen Poolurin [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
0	–	–	2000	0
1	II	50	1950	2,5
2	II	100	1900	5
3	I	40	1960	20
4	I	120	1880	60
5	I	200	1800	100

## 5 Probenahme und Probenaufbereitung

### 5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Urinbechern gesammelt und gegebenenfalls auf Urin-Monovetten® gezogen. Urinproben beruflich exponierter Arbeiter werden am Ende des Arbeitstages oder bei länger andauernder Exposition am Ende der Arbeitswoche genommen.

Die Urinproben können bis zu drei Tagen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden. Für eine langfristige Aufbewahrung empfiehlt sich eine Lagerung der Urinproben bei –20 °C.

### 5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. In 5-ml-Schraubgläschen werden jeweils 2 ml Urin mit 10 µl der ISTD-Dotierlösung und 1 ml verdünnter Salzsäure (0,4 mol/l) versetzt. Die Gläschen werden verschlossen und die Proben auf einem Vortex-Mischer durchmischt.

Die SPE-Kartuschen werden mit 1,3 ml Acetonitril und 3 ml verdünnter Salzsäure (pH 1,5) konditioniert. Anschließend werden die mit ISTD versetzten, angesäuerten Urinproben auf die SPE-Kartuschen aufgegeben. Es wird mit 1 ml der



verdünnten Salzsäure mit 5 % Methanol und anschließend mit 1 ml der verdünnten Salzsäure (pH 1,5) gewaschen. Nach Anlegen eines leichten Vakuums werden die Kartuschen für zehn Minuten bei  $2500 \times g$  zentrifugiert und eine Stunde unter Vakuum getrocknet. Anschließend wird mit zweimal 900  $\mu\text{l}$  Acetonitril in 1,8-ml-Probengläschen eluiert und die Eluate werden unter einem Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen. Die Rückstände werden jeweils mit 10  $\mu\text{l}$  MTBSTFA versetzt und die Proben für eine Stunde bei  $80^\circ\text{C}$  derivatisiert. Nach Zugabe von 1 ml Toluol werden die Proben auf dem Vortex-Mischer durchmischt und der Analytgehalt in den Proben mittels GC-MS bestimmt.

In den messfertigen Proben kann ein Bodensatz zurückbleiben, der sich im Toluol nicht löst. Dieser wird bei  $3000 \times g$  abzentrifugiert und der klare Überstand für die Messung mittels GC-MS verwendet.

## 6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

### 6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	5 %-Phenylmethylpolysiloxan
	Länge:	60 m
	Innendurchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 $\mu\text{m}$
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur $90^\circ\text{C}$ , 1 min isotherm; Anstieg mit $25^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $110^\circ\text{C}$ , 5 min isotherm; Anstieg mit $5^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $150^\circ\text{C}$ , 10 min isotherm; Anstieg mit $10^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $250^\circ\text{C}$ , 0,1 min isotherm; Anstieg mit $30^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $315^\circ\text{C}$ , 7 min bei Endtemperatur
	GC-Transferline:	$280^\circ\text{C}$
	Injektor:	$280^\circ\text{C}$
	Interface:	$280^\circ\text{C}$
	Trägergas:	Helium 5.0
Flussrate:	1,4 ml/min	
Injektion:	1,5 $\mu\text{l}$ splitlos, Split geöffnet nach 1 min	

### 6.2 Massenspektrometrie

Ionisierung:	Elektronenstoßionisierung
Ionisierungsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	$230^\circ\text{C}$
Quadrupoltemperatur:	$150^\circ\text{C}$
Dwelltime:	100 ms
Detektionsmodus:	Selected Ion Monitoring (SIM)

Sämtliche Einstellungen sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell angepasst werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

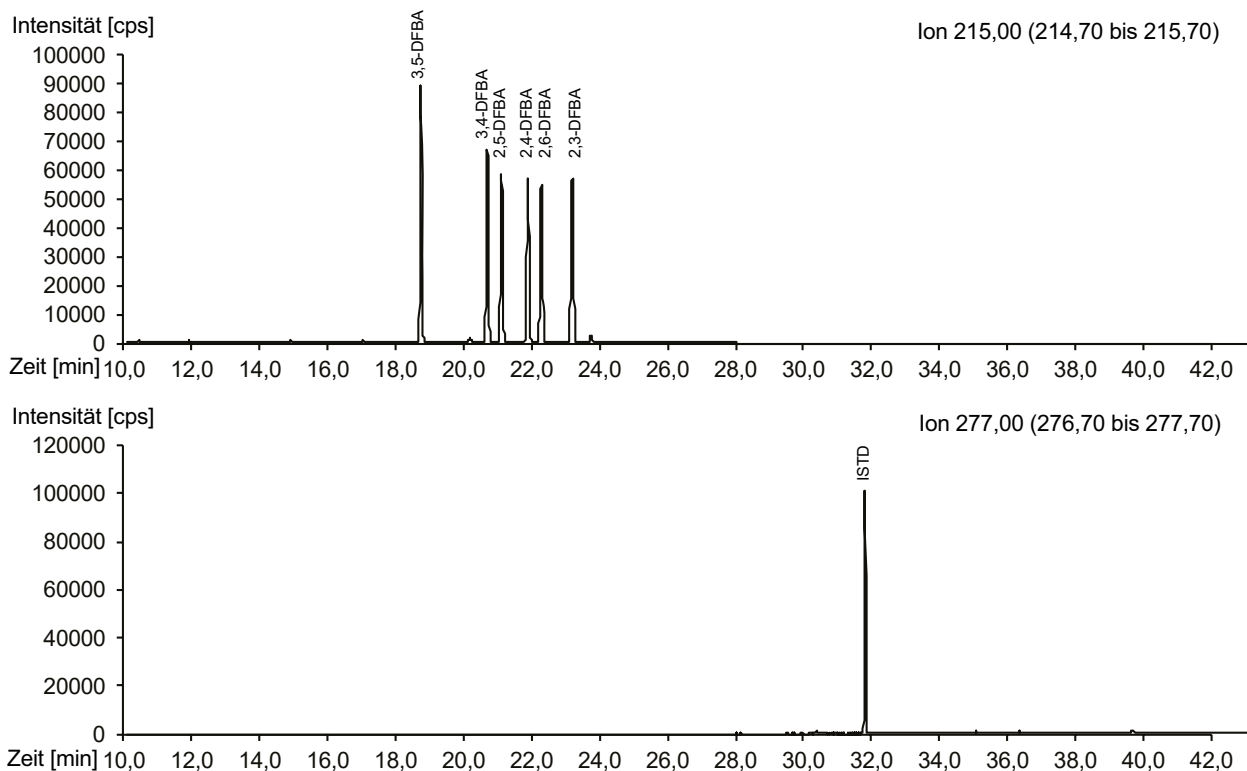
## 7 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach [Abschnitt 5](#) aufbereiteten Urinproben werden jeweils 1,5 µl der aufgearbeiteten Probe in das GC-MS-System injiziert. Es werden die zeitlichen Verläufe der in [Tabelle 3](#) aufgeführten Ionenspuren im SIM-Modus registriert.

**Tab. 3** Retentionszeiten und detektierte Ionenspuren für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Ionenspur [m/z]	
		Quantifier	Qualifier
2,6-DFBA	22,29	215	113; 141
5-Brom-2-fluorbenzoesäure	31,81	277	175; 196

Die in [Tabelle 3](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten des Analyten zu überzeugen. In den [Abbildungen 3](#) und [4](#) sind beispielhaft GC-MS-Chromatogramme einer mit 20 µg/l dotierten Wasser- bzw. Poolurinprobe abgebildet, wobei in dem Chromatogramm auch die sichere Abtrennung der 2,6-DFBA von den isomeren DFBA (2,3-DFBA; 2,4-DFBA; 2,5-DFBA; 3,4-DFBA; 3,5-DFBA) erkennbar ist. [Abbildung 5](#) zeigt das Chromatogramm einer nativen Urinprobe eines beruflich mit Diflubenzuron belasteten Beschäftigten (gemessene 2,6-DFBA-Konzentration: 27,6 µg/l Urin). Für die Vermessung der nativen Urinprobe wurde ein anderes Temperaturprogramm verwendet, das zu kürzeren Retentionszeiten für Analyt und ISTD führte.



**Abb. 3** GC-MS-Chromatogramm von hochreinem Wasser, das mit 20 µg DFBA/l dotiert wurde

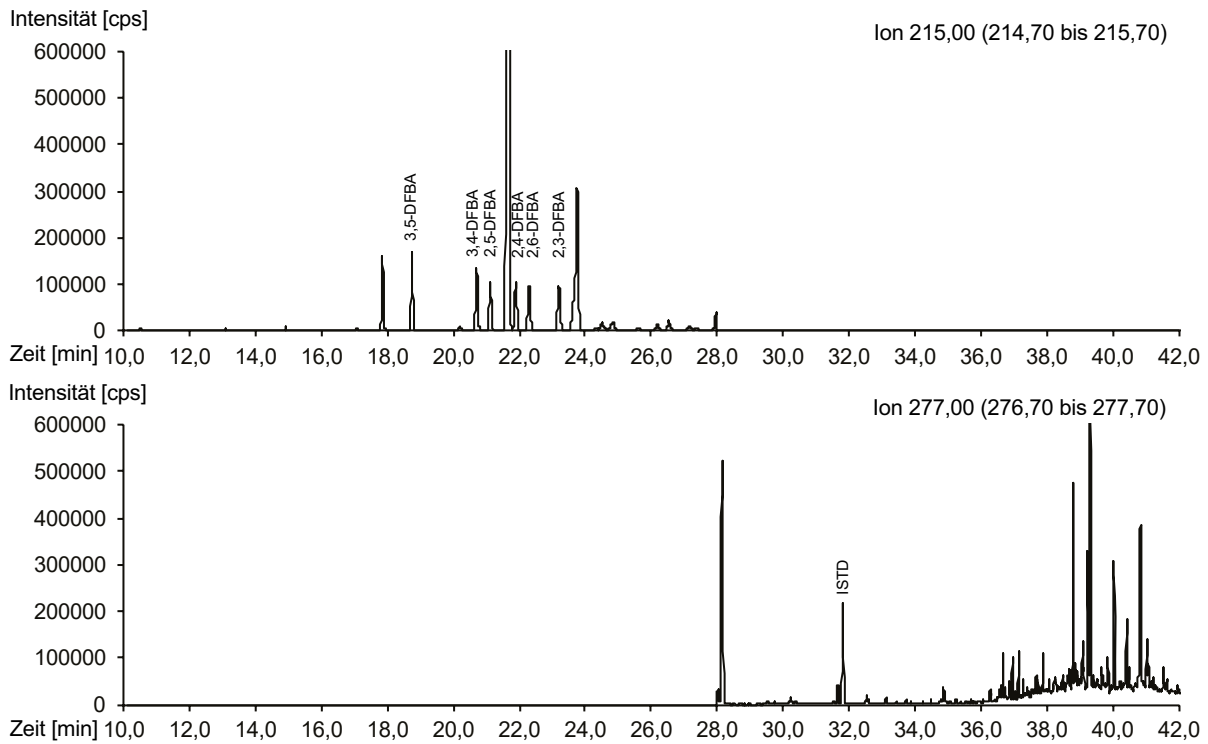


Abb. 4 GC-MS-Chromatogramm von Poolurin, der mit 20 µg DFBA/l dotiert wurde

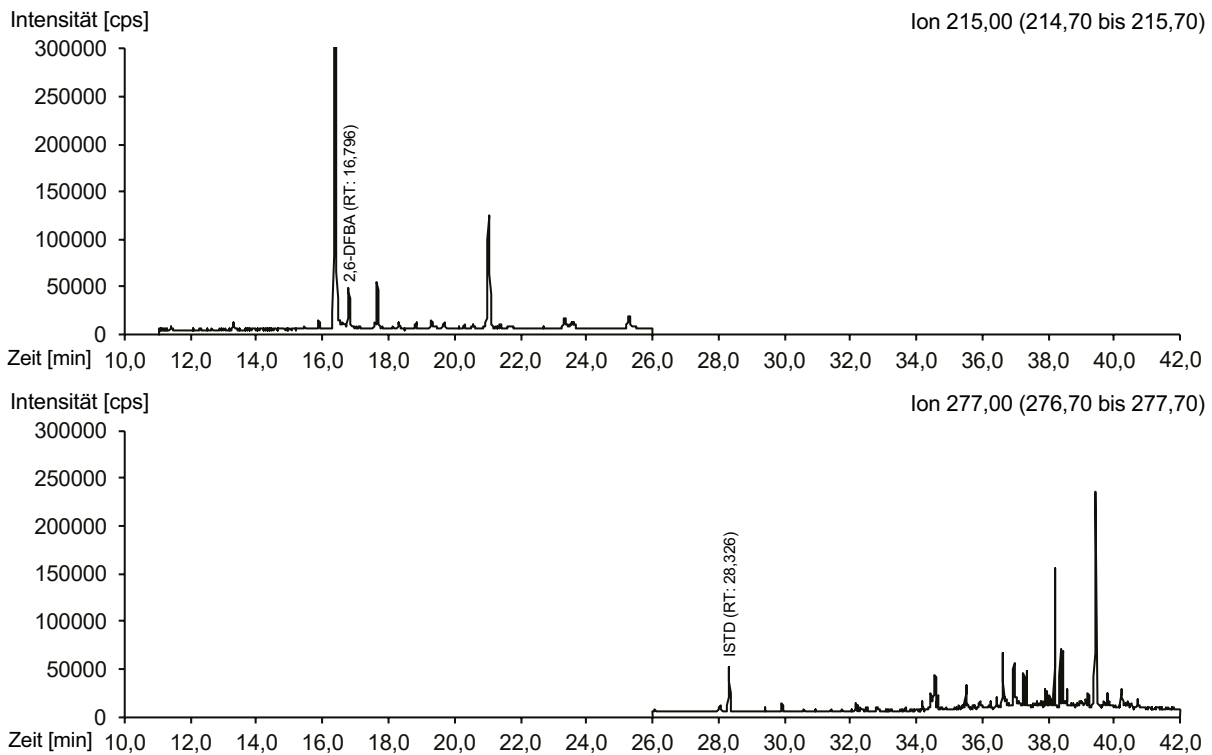
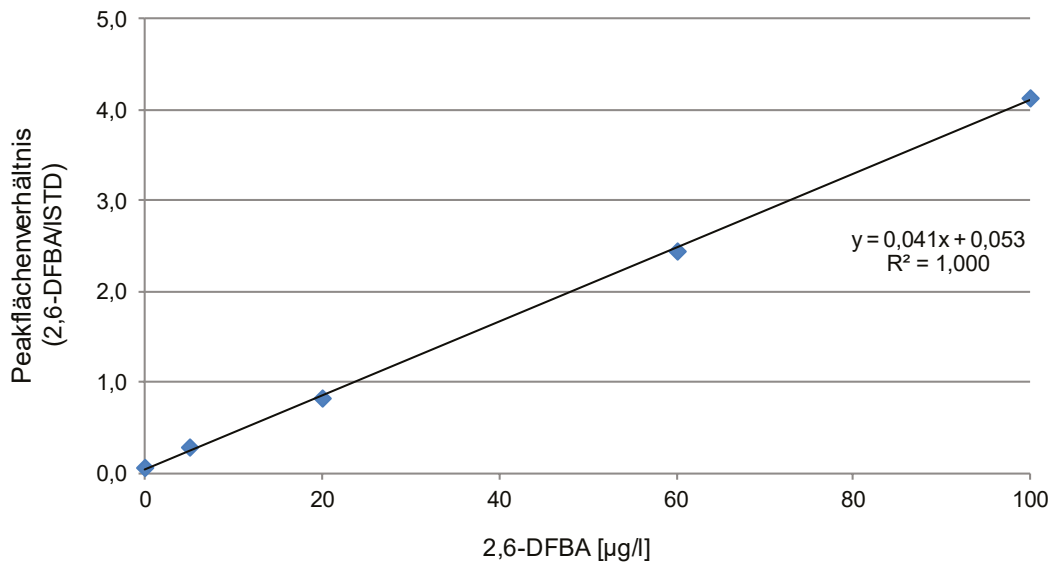


Abb. 5 GC-MS-Chromatogramm einer nativen Urinprobe nach beruflicher Exposition gegen Diflubenzuron (gemessene 2,6-DFBA-Konzentration: 27,6 µg/l Urin)

## 8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Methode werden die nach [Abschnitt 4.5](#) in Poolurin angesetzten Kalibrierstandards gemäß [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeitet und mittels GC-MS analysiert. Die Kalibriergerade wird erstellt, indem das Peakflächenverhältnis des Analyten und des ISTDs gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen wird. Die Kalibriergerade ist unter den beschriebenen Analysebedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich linear. [Abbildung 6](#) zeigt exemplarisch eine Kalibriergerade für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin.



**Abb. 6** Kalibriergerade für die Bestimmung von 2,6-DFBA im Konzentrationsbereich von 2,5 µg/l bis 100 µg/l

## 9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung des Analytgehaltes in den Urinproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion ([Abschnitt 8](#)). Das Peakflächenverhältnis von 2,6-DFBA und ISTD wird in die Kalibrierfunktion eingesetzt und der Analytgehalt in µg/l errechnet. Eventuell ermittelte Reagenzienleerwerte werden von den Analyseergebnissen der Realproben abgezogen.

Wenn der Messwert einer Probe oberhalb des Kalibrierbereiches liegt, wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und vermessen.

## 10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren ([Bader et al. 2010](#); Bundesärztekammer [2014](#)).

Zur Präzisionskontrolle werden bei jeder Analysenserie zwei Qualitätskontrollproben mit niedriger bzw. hoher Analytkonzentration mitgeführt. Ein solches Referenzmaterial ist kommerziell nicht erhältlich und muss selbst hergestellt werden, indem gepoolter Urin von Personen ohne bekannte Belastung gegen 2,6-difluorsubstituierte Benzoylharnstoffverbindungen mit 2,6-DFBA dotiert wird. Dabei muss die Dotierung im erwarteten Konzentrationsbereich liegen. Die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien werden zu je 2 ml in 5-ml-Schraubgläschen aliquotiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Der Sollwert und der Toleranzbereich (Mittelwert ± zwei Standardabweichungen) des

jeweiligen Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt (Bader et al. 2010). Die Qualitätskontrollmaterialien können bei  $-20\text{ °C}$  mindestens sechs Monate ohne Analytverlust gelagert werden.

Zusätzlich wird bei jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert, bestehend aus 2 ml hochreinem Wasser, mitanalysiert.

## 11 Beurteilung des Verfahrens

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

### 11.1 Präzision

#### Präzision in der Serie

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde Poolurin mit einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Analytkonzentration dotiert. Die Proben wurden jeweils fünfmal an einem Tag aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 4](#) zusammengefasst.

**Tab. 4** Präzision in der Serie für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin ( $n = 5$ )

Analyt	Dotierte Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
2,6-DFBA	2,5	7,74	21,5
	20	4,15	11,5
	100	2,93	8,13

#### Präzision von Tag zu Tag

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte ebenfalls bei einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Analytkonzentration. Für die Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden die dotierten Urinproben an fünf verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die errechneten Präzisionsdaten sind in [Tabelle 5](#) dargestellt.

**Tab. 5** Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin ( $n = 5$ )

Analyt	Dotierte Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
2,6-DFBA	2,5	8,92	24,8
	20	2,06	5,73
	100	1,58	4,40

### 11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde anhand der Daten, die auch zur Berechnung der Präzision von Tag zu Tag verwendet wurden, errechnet. Der für die Methodvalidierung verwendete Urin wies einen 2,6-DFBA-Hintergrundgehalt von  $1,5\ \mu\text{g/l}$  auf. Unter Berücksichtigung dieses Hintergrundgehaltes ergaben sich die in [Tabelle 6](#) zusammengestellten relativen Wiederfindungsraten.

**Tab. 6** Relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin (n = 5)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Relative Wiederfindungsrate r [%]	
			Mittelwert	Bereich
2,6-DFBA	2,5	3,97	99,2	92,7–106
	20	22,4	101	99,5–104
	100	104	101	99,6–103

Zur Prüfung der Richtigkeit des Verfahrens wurde auch die Wiederfindung in Individualurinen untersucht. Dazu wurden sechs Urinproben mit dem Analyten in einer Konzentration von 2,5 µg/l, 20 µg/l und 100 µg/l dotiert und analysiert. Die Ergebnisse zur relativen Wiederfindung in den Individualurinen sind in [Tabelle 7](#) zusammengestellt.

**Tab. 7** Relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Individualurinen

Urin	Kreatiningehalt [g/l]	Relative Wiederfindungsrate r [%]		
		2,5 µg/l	20 µg/l	100 µg/l
1	0,51	101	89,8	92,3
2	0,93	101	92,5	92,2
3	1,40	87,5	110	101
4	1,57	84,5	94,7	87,0
5	1,95	115	111	93,2
6	2,20	118	88,6	85,5

Zur Überprüfung des Verfahrens auf Matrixeffekte wurden Kalibrierstandards in hochreinem Wasser und in Poolurin hergestellt, aufgearbeitet und analysiert. Die Steigung der jeweiligen Kalibriergeraden ist [Tabelle 8](#) zu entnehmen ( $R^2 > 0,996$ ). Ein Vergleich der Kalibriergeradensteigungen deutet auf einen vernachlässigbaren Einfluss der Matrix auf die Messergebnisse hin.

**Tab. 8** Vergleich der Steigungen der in Wasser bzw. Poolurin angesetzten Kalibriergeraden für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin

Analyt	Geradengleichung (Wasser)	Geradengleichung (Poolurin)	Differenz [%]
2,6-DFBA	$y = 0,0445x$	$y = 0,0438x$	1,6

### 11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin wurden nach DIN 32645 bestimmt (DIN 2008). Dazu wurde eine 11-Punktkalibrierung im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µg/l in gepooltem Urin erstellt und analysiert. Die errechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Analyten sind in [Tabelle 9](#) aufgeführt.

**Tab. 9** Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von 2,6-DFBA in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
2,6-DFBA	0,416	1,32

### 11.4 Störeinflüsse

Bei Verwendung von Lösungsmitteln und Reagenzien des angegebenen Reinheitsgrades treten keine Störungen des 2,6-DFBA-Nachweises auf. Die Abtrennung der 2,6-DFBA von den stellungsisomeren DFBA (2,3-DFBA; 2,4-DFBA; 2,5-DFBA; 3,4-DFBA; 3,5-DFBA) wurde von den Entwicklern der Methode untersucht und ist bei der beschriebenen Methode sichergestellt (siehe [Abbildungen 3](#) und [4](#)).

In einem Ringversuch wurden sechs Urinproben von beruflich gegen Diflubenzuron exponierten Beschäftigten von den Entwicklern der Methode, den Prüfern der Methode sowie von einem dritten Labor untersucht. Dabei verwendete das dritte Labor eine andere, unabhängige Methode auf Basis der GC-MS/MS-Technik. Der Ergebnisvergleich zwischen den Laboratorien ergab eine gute Übereinstimmung der bestimmten 2,6-DFBA-Gehalte, die zwischen 5 µg/l und 150 µg/l lagen.

Der Prüfer der Methode hat die sechs Urinproben der exponierten Beschäftigten vor der Festphasenextraktion auch einer Säurehydrolyse unterzogen (Zugabe von 200 µl 37%iger Salzsäure, 1 h bei 75 °C). Dabei ergab sich kein Hinweis auf höhere 2,6-DFBA-Konzentrationen nach Hydrolyse.

## 12 Diskussion

Die hier beschriebene Methode erlaubt die selektive und sensitive Quantifizierung von 2,6-DFBA in Urin. Das Verfahren ist arbeitsmedizinisch ausgerichtet und für die zuverlässige Quantifizierung von Hintergrundgehalten bis 2 µg/l nur bedingt geeignet. Dies liegt darin begründet, dass bis zu Konzentrationen von etwa 2 µg 2,6-DFBA pro Liter Urin die Verifizierung des Analyten über die zweite Ionenspur (Qualifier,  $m/z = 141$ ) nicht möglich ist. Die Prüfer der Methode fanden im undotierten, für die Kalibrierstandards verwendeten Urin und in zwei der für Validierungszwecke vermessenen (undotierten) Individualurine geringe 2,6-DFBA-Gehalte. Diese lagen zwischen der vom Prüfer der Methode errechneten Bestimmungsgrenze von 0,6 µg/l und ca. 2 µg/l und stützten sich nur auf eine Ionenspur. Allerdings kann bei diesen niedrigen Gehalten, für die eine Verifikation durch den Qualifier nicht möglich war, nicht zweifelsfrei die Identität der Verbindung bestätigt werden, so dass auch eine unspezifische Überlagerung für die Ergebnisse verantwortlich sein kann.

Die Nachweisempfindlichkeit der Methode kann gegebenenfalls durch den Einsatz modernster Analysetechnik weiter gesteigert werden. Der lineare Arbeitsbereich erstreckt sich bis 100 µg/l und muss gegebenenfalls, je nach Belastungssituation, erweitert werden. So wurden in einem gegen Diflubenzuron exponierten Kollektiv 2,6-DFBA-Gehalte von bis zu 150 µg pro Liter Urin quantifiziert (siehe [Tabelle 1](#)).

5-Brom-2-fluorbenzoesäure hat sich als ISTD bewährt, wobei vom Prüfer der Methode neben 5-Brom-2-fluorbenzoesäure auch 2,5-DFBA als ISTD getestet wurde. Die Verwendung von 2,5-DFBA erlaubt ebenfalls eine sensitive und präzise Quantifizierung des Analyten. Gegebenenfalls ließe sich die Präzision des Verfahrens durch die Verwendung der deuterierten 2,6-DFBA als ISTD weiter verbessern.

**Verwendete Messgeräte** Gaschromatograph Agilent 8890 GC mit Autosampler (7693A) und massenspektrometrischem Detektor (5977B MSD); Auswertesoftware (Enhanced ChemStation) (z. B. Agilent Technologies Germany & Co. KG, Waldbronn)

## Anmerkungen

### Interessenkonflikte

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

## Literatur

- APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) (2022) PubCRIS database search. <https://portal.apvma.gov.au/pubcris>, abgerufen am 14 Jan 2022
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) (2022) Datenbank der zugelassenen Biozidprodukte. <https://www.baua.de/DE/Biozid-Meldeverordnung/Offen/offen.html>, abgerufen am 14 Jan 2022
- BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) (2022) Arzneimittelinformationssystem AMIce – Datenbank „AMIce-Öffentlicher Teil“. <https://portal.dimdi.de/amguifree/am/search.xhtml>, abgerufen am 18 Jan 2022
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- Cohen E (2001) Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* 57(10): 946–950. <https://doi.org/10.1002/ps.363>
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- EMA (European Medicines Agency) (2015) European public MRL assessment report (EPMAR): Hexaflumuron (fin fish). Amsterdam: EMA. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/hexaflumuron-fin-fish-european-public-mrl-assessment-report-epmar\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/hexaflumuron-fin-fish-european-public-mrl-assessment-report-epmar_en.pdf), abgerufen am 06 Dez 2021
- FAO (Food and Agriculture Organization) (1998) Fluazuron. In: Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper, No. 41/10. Rome: FAO. S. 45–57. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/41-10-fluazuron.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-10-fluazuron.pdf), abgerufen am 06 Dez 2021
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2002 a) Diflubenzuron. In: Pesticide residues in food. FAO Plant Production and Protection Paper, No. 172. Rome: FAO. S. 98–118. <https://www.fao.org/3/cb2760en/CB2760EN.pdf>, abgerufen am 14 Jan 2022
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2002 b) Diflubenzuron. In: Pesticide residues in food 2002. FAO Plant Production and Protection Paper, No. 175/1. Rome: FAO. S. 359–578. <http://www.fao.org/3/cb2682en/CB2682EN.pdf>, abgerufen am 14 Jan 2022
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2018) Lufenuron. In: Residue evaluation of certain veterinary drugs. FAO JECFA Monographs 21. Rome: FAO. S. 224–270. <https://www.fao.org/3/i9419en/I9419EN.pdf>, abgerufen am 06 Dez 2021
- FSCJ (Food Safety Commission of Japan) (2003) Novaluron. Evaluation Report. Tokyo: Food Safety Commission Pesticides Expert Committee. [https://www.fsc.go.jp/english/novaluron\\_160708.pdf](https://www.fsc.go.jp/english/novaluron_160708.pdf), abgerufen am 06 Dez 2021
- FSCJ (Food Safety Commission of Japan) (2007) Flufenoxuron. Evaluation Report. Tokyo: Food Safety Commission Pesticides Expert Committee. [https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/flufenoxuron\\_fullreport.pdf](https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/flufenoxuron_fullreport.pdf), abgerufen am 06 Dez 2021
- Koerts J, Soffers AEMF, De Kraker J-W, Cnubben NHP, Rietjens IMCM (1997) Metabolism of the insecticide teflubenzuron in rats. *Xenobiotica* 27(8): 801–817. <https://doi.org/10.1080/004982597240172>
- NVI (Norwegian Veterinary Institute) (2016) Use of therapeutic agents against salmon lice in Norwegian Aquaculture. Report 21-2016. Oslo: NVI. [https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2016/use-of-therapeutic-agents-against-salmon-lice-in-norwegian-aquaculture/\\_attachment/download/7f0e10ea-035e-4f94-b044-88e5506f0f5b:d546b406275333779410b3a931bccbf58306d3ad/2016\\_21\\_Use%20of%20therapeutic%20agents%20against%20salmon%20lice%20in%20Norwegian%20Aquaculture.pdf](https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2016/use-of-therapeutic-agents-against-salmon-lice-in-norwegian-aquaculture/_attachment/download/7f0e10ea-035e-4f94-b044-88e5506f0f5b:d546b406275333779410b3a931bccbf58306d3ad/2016_21_Use%20of%20therapeutic%20agents%20against%20salmon%20lice%20in%20Norwegian%20Aquaculture.pdf), abgerufen am 14 Jan 2022
- Roitzsch M, Schäferhenrich A, Baumgärtel A, Ludwig-Fischer K, Hebisch R, Göen T (2019) Dermal and inhalation exposure of workers during control of oak processionary moth (OPM) by spray applications. *Ann Work Expo Health* 63(3): 294–304. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxy108>
- Sun R, Liu C, Zhang H, Wang Q (2015) Benzoylurea chitin synthesis inhibitors. *J Agric Food Chem* 63(31): 6847–6865. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02460>
- WHO (World Health Organization) (1998) Fluazuron. In: Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series, No. 879. Geneva: WHO. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42127/WHO\\_TRS\\_879.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42127/WHO_TRS_879.pdf?sequence=1&isAllowed=y), abgerufen am 14 Jan 2022
- Willems AGM, Overmars H, Scherpenisse P, De Lange N, Post LC (1980) Diflubenzuron: Intestinal absorption and metabolism in the rat. *Xenobiotica* 10(2): 103–112. <https://doi.org/10.3109/00498258009033736>