

**Chromatographische Untersuchungen  
und Extraktion von  
Pyrethrinen und Pyrethroiden**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Ansgar Otterbach**

aus Kirchen/Sieg

eingereicht beim Fachbereich 8  
der Universität-Gesamthochschule-Siegen

**Siegen 2000**

Gutachter:

Prof. Dr. B. W. Wenclawiak

Priv. Doz. Dr. H. C. Uzar

Tag der mündlichen Prüfung:

12. 5. 2000

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Pestizide	1
1.2 Pyrethrine	2
1.2.1 Historie	2
1.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Struktur	2
1.3 Pyrethroide	4
1.3.1 Historie	4
1.3.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Struktur	4
1.4 Toxikologie	6
1.5 Stand der Forschung	9
1.6 Zielsetzung	11
<b>2 VALIDIERUNG</b>	<b>12</b>
2.1 Überblick	12
2.2 Grundvalidierung	12
2.2.1 Identitätstest	13
2.2.2 Gehaltsbestimmung	14
<b>3 ÜBERKRITISCHE FLUID CHROMATOGRAPHIE (SFC)</b>	<b>16</b>
3.1 Überblick	16
3.1.1 Überkritische Fluide	16
3.1.2 Historische Entwicklung der überkritischen Fluid Chromatographie	17
3.2 Injektor- und Detektor-Optimierung der SFC	18
3.2.1 Experimentelles	19
3.2.2 Ergebnisse	19
3.3 Reinheitsuntersuchung von Kohlendioxid	23

3.3.1	Prinzip der Messmethode	23
3.3.2	Experimentelles	24
3.3.3	Ergebnisse	24
3.3.4	Diskussion	31
<b>3.4</b>	<b>Qualitative Analyse</b>	<b>32</b>
3.4.1	GC-MS-Kopplung:	32
3.4.1.1	Experimentelles	32
3.4.1.2	Ergebnisse	33
3.4.1.3	Diskussion	40
3.4.2	SFC-MS-Kopplung	42
3.4.2.1	Experimentelles	42
3.4.2.2	Ergebnisse	43
3.4.2.3	Diskussion	55
<b>3.5</b>	<b>Einfluss des Kopfgases von Kohlendioxid auf die Chromatographie</b>	<b>56</b>
3.5.1	Experimentelles	56
3.5.2	Ergebnisse	56
3.5.3	Diskussion	61
<b>3.6</b>	<b>SF-Chromatographische Kenndaten von Pyrethrinen und Pyrethroiden</b>	<b>62</b>
<b>3.7</b>	<b>Quantitative Analyse von Pyrethroiden und Pyrethrinen</b>	<b>66</b>
3.7.1	Experimentelles	68
3.7.2	Ergebnisse	69
<b>4</b>	<b>HPLC VON PYRETHRINEN</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Reinheitsuntersuchung von Acetonitril</b>	<b>81</b>
4.1.1	Experimentelles	81
4.1.2	Ergebnisse	82
4.1.3	Diskussion	84
<b>4.2</b>	<b>Optimierung der Trennung von Pyrethrinen</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>UV-Spektrometrische Untersuchung von Pyrethrinen und Pyrethroiden</b>	<b>91</b>
4.3.1	Experimentelles	91

4.3.2	Ergebnisse	93
<b>4.4</b>	<b>Löslichkeitsbestimmung von Allethrin in Wasser</b>	<b>101</b>
4.4.1	Experimentelles	101
4.4.2	Ergebnisse	103
<b>4.5</b>	<b>SPE-Probenvorbereitung von Pyrethrinen in aquatischen Systemen</b>	<b>105</b>
4.5.1	Experimentelles	105
4.5.2	Ergebnisse	106
<b>5</b>	<b>EXTRAKTION VON PYRETHROIDEN UND PYRETHRINEN</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Besondere Extraktionsverfahren</b>	<b>109</b>
<b>5.2</b>	<b>Vergleich von Soxhlet-, Ultraschall-, überkritischer Fluid- und beschleunigter Lösemittel-Extraktion</b>	<b>111</b>
5.2.1	Experimentelles	111
5.2.2	Ergebnisse und Diskussion	113
<b>5.3</b>	<b>Subkritische Wasserextraktion</b>	<b>120</b>
5.3.1	Experimentelles	120
5.3.2	Ergebnisse und Diskussion	121
<b>6</b>	<b>FAKTORIELLE TEILVERSUCHSPLANUNG FÜR DIE SFE VON PYRETHRINEN</b>	<b>123</b>
<b>6.1</b>	<b>Faktorielle Versuchsplanung</b>	<b>123</b>
<b>6.2</b>	<b>Selektive und maximale Extraktion von Pyrethrinen</b>	<b>124</b>
6.2.1	Experimentelles	124
6.2.2	Ergebnisse	125
6.2.2.1	Selektive Extraktion von Pyrethrinen	125
6.2.2.2	Maximale Extraktion von Pyrethrinen	132
<b>6.3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>137</b>

<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>139</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>147</b>
<b>9.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>9.2</b>	<b>IUPAK-Nomenklatur</b>	<b>149</b>
<b>9.3</b>	<b>Reinheitsuntersuchung der mobilen Phase in der HPLC</b>	<b>151</b>
<b>9.4</b>	<b>Extinktionskoeffizienten der Pyrethroide</b>	<b>152</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Pestizide

Zu den Pflanzenschutzmitteln (*Pestizide*) werden Stoffe gezählt, die zur Bekämpfung von Schädlingen, Konkurrenzpflanzen und Krankheiten bei Kultur- und Nutzpflanzen eingesetzt werden. Je nach ihrer Wirkung auf bestimmte Organismengruppen unterteilt man die Pestizide in Insektizide, Akarizide, Rodentizide, Molluskizide, Fungizide und Bakterizide. Nach der Wirkungsweise werden sie u.a. in Kontakt-, Fraß-, Ätz- und Atemgifte sowie in hormonale Wirkstoffe gruppiert [1, 2].

Die weltweite Menge an Pflanzenschutzmitteln, die in die Umwelt eingebracht wird, liegt bei ca. 640.000 Tonnen pro Jahr (t/a). Der Anteil der in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzten Pflanzenschutzmitteln liegt bei ungefähr 30.000 t/a, d. h. es besteht ein Austrag von 80-100 t/Tag [3].

Die Industrie bietet heute drei weitere Wirkstoffklassen zur Schädlingsbekämpfung als Ersatz für die früher eingesetzten chlorierten Kohlenwasserstoffe (Lindan, DDT, Aldrin) an, deren Gebrauch aufgrund ihrer Anreicherung und Persistenz im Fettgewebe in vielen Ländern eingeschränkt wurde. Eine davon ist die Klasse der Phosphorsäureester (Organophosphate), deren wichtigster Vertreter Dichlorvinylphosphat (Dichlorvos, DDVP) ist. Im Handel ist es in Aerosolen und imprägnierten Cellulosestreifen zu erwerben.

Eine zweite Klasse ist die der Carbaminsäureester (Carbamate), zu der u. a. Propoxur<sup>®</sup> zählt. Propoxur<sup>®</sup> wird, mit anderen Wirkstoffen kombiniert, als Aerosolspray verwandt. Bedingt durch bedenkliche Intoxikationen und Umweltgefahren wurde der Einsatz dieser Insektizide drastisch gesenkt, was sich wiederum mit den sinkenden Pflanzenschutzmittelzulassungen der Bundesrepublik Deutschland belegen lässt [4].

Die dritte Klasse besteht aus den Pyrethroiden, aus natürlichen Pyrethrinen technisch hergestellte Abkömmlinge. Die Vorteile der Pyrethroide sind eine hohe insektizide Wirksamkeit, eine geringe Humantoxizität sowie eine gute Pflanzenverträglichkeit [5]. Bedingt durch diese Vorteile stieg die Nutzung der Pyrethrine und Pyrethroide seit den letzten 20 Jahren ständig an. Ihr Einsatz erstreckt sich auf viele Gebiete – von der Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft und Innenräumen bis zur Therapie parasitärer Hauterkrankungen [6, 7]. Vielfältige Untersuchungen weisen jedoch auf akute und chronische Intoxikationen durch den Kontakt oder die Aufnahme dieser Biozide hin [8, 9, 10, 11].

## 1.2 Pyrethrine

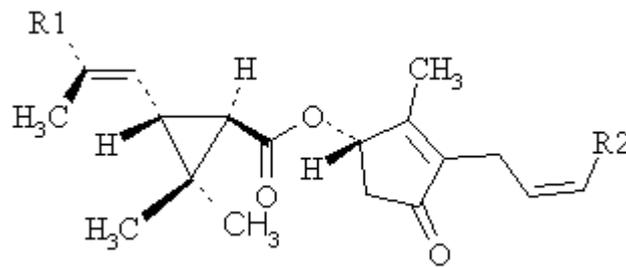
### 1.2.1 Historie

Um die Naturkräfte zu unterstützen, wurde bereits im Altertum mit diversen Mitteln versucht, das Wachstum von Pflanzen zu begünstigen und die Pflanzen vor Schädlingen zu schützen [12]. Das älteste, bekannte Insektizid, das Pyrethrum, wurde aus der Pflanze *Chrysanthemum coccineum* gewonnen. Diese aus dem Mittleren Osten stammende Pflanze wurde bereits bei den Römern in getrockneter Form gegen Läuse und Flöhe angewandt. Gezielte Versuche, Pflanzenkrankheiten mit Naturstoffen zu behandeln, sind erst seit der Aufklärung bekannt. Das „Dalmatinische Insektenpulver“ gelangte erst 1840 nach Westeuropa, im Nahen Osten war die insektizide Pyrethrum-Wirkung dieses Pulvers jedoch schon länger bekannt. Als Hauptanbaugebiet gilt heute Kenia. Gemeinsam mit Tansania werden ca. 23.000 t Trockenblüten produziert, was mehr als 90 % der Welternte ausmacht [13].

### 1.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Struktur

In Chrysanthenen (*Chrysanthemum coccineum* und *Chrysanthemum cinerariaefolium*) sind die natürlichen Pyrethrine enthalten [14]. Das Pyrethrum-Konzentrat, das aus getrockneten Blüten gewonnen wird, enthält sechs insektizide, optisch aktive Ester der (+)-trans-konfigurierten Chrysanthemumsäure und der Pyrethrinsäure mit den cyclischen Ketoalkoholen (+)-Cinerolon, (+)-Jasmolon und (+)-Pyrethrolon [7, 15, 16].

Die Substanzen Cinerin, Jasmolin und Pyrethrin leiten sich von den Keto-cyclopentylalkoholen ab. Bedingt durch verschiedene Säurereste existieren zwei unterschiedliche Gruppen. Die Chrysanthemate, die zur Gruppe I gehören, bilden Chrysanthemumsäureester. In Gruppe II werden die Ester der Pyrethrumsäure den Pyrethraten zugeordnet (Abb. 1) [17, 18, 19, 20].



Substanz	Substanzgruppe	R1	R2	Summenformel	MG (g/mol)
<b>Cinerin I</b>	<b>Chrysanthemate</b>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	316,4
<b>Jasmolin I</b>		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,5
<b>Pyrethrin I</b>		-CH <sub>3</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	328,5
<b>Cinerin II</b>	<b>Pyrethrate</b>	-COOCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360,5
<b>Jasmolin II</b>		-COOCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	374,5
<b>Pyrethrin II</b>		-COOCH <sub>3</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	372,5

Abbildung 1: Molekülstruktur, Summenformel und Molekulargewicht der Pyrethrine

Pyrethrine sind hochsiedende, farblose, viskose Öle [21] und in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich. Sie werden vor allem zum Pflanzen- und Vorratsschutz bei Getreide, Getreideprodukten und Gemüse angewandt. In manchen Haushaltssprays sind ebenfalls Pyrethrum-Extrakte enthalten, denen häufig der Synergist Piperonylbutoxid (Abb. 2) zugefügt wird [22]. Neben dem eigentlichen Insektizid bewirkt der Zusatz von Synergisten dabei eine additive oder potenzierende insektizide Wirkung des Präparates.

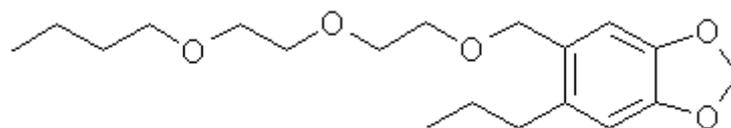


Abbildung 2: Struktur von Piperonylbutoxid

Ein Nachteil der beschriebenen natürlichen Insektizide ist die photochemische und oxidative Zersetzung. Der photochemische Abbau von Pyrethrinen wurde seit 1969 simuliert und beschrieben [23, 24]. Class und Kintrop untersuchten die Photostabilität von Pyrethrinen unter Tageslicht-Bedingungen. Als Resultat wurde festgestellt, dass innerhalb von 48 Stunden die insektiziden Wirkstoffe um 90 % abnahmen [25].

## 1.3 Pyrethroide

### 1.3.1 Historie

Bedingt durch den schnellen Zerfall der natürlichen Pyrethrine unter Licht und Sauerstoff wurden seit 1945 stabilere Derivate, die Pyrethroide, entwickelt. Im Jahr 1949 wurde das erste Pyrethroid Allethrin, das der Molekülstruktur der Pyrethrine sehr ähnelt, von Schlechter et al. synthetisiert [26]. Die Wirkung und die Photostabilität sind daher vergleichbar [27]. Das strukturell veränderte Insektizid Tetramethrin wurde 1960 hergestellt, dessen Eigenschaften denen des Allethrins gleichen. Im Jahr 1965 gelang Elliott et al. durch den Austausch der Allethrin-Alkoholkomponente gegen 5-Benzylfuryl-3-methanol die Darstellung des stark insektiziden Resmethrins [28].

Farkas et al. synthetisierten 1973 das Pyrethroid Permethrin, das erste photostabile, hochaktive Agrar-Pyrethroid. Elliott et al. gelang 1974 die Darstellung des Cypermethrins, das  $\alpha$ -Cyano-Derivat des Permethrins, sowie die Entwicklung der dem Cypermethrin analogen Dibromverbindung Deltamethrin. Bedingt durch die  $LD_{50}$  von 0,01 mg/kg zählt es zu einer der potentesten Insektizide gegen viele Insektenarten [29].

Über die vorgenannten Entwicklungen hinaus wurden im Laufe der Jahre noch über 1000 pyrethroide Wirkstoffe synthetisiert [7]. Seit 1994 ist das neue Pyrethroid (1R)-trans-Transfluthrin (Bayer AG) im Handel erhältlich. Es ist ein schnell wirkendes, selektives Insektizid gegen Mücken, für Warmblütler untoxisch.

### 1.3.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Struktur

Synthetisch hergestellte Insektizide, die der Pyrethrinstruktur nachgebaut wurden, bezeichnet man als Pyrethroide. Das Allethrin ist das der Pyrethrinstruktur ähnlichste Pyrethroid und kommt als Gemisch aus acht möglichen Isomeren vor. Das auf dem Markt erhältliche „Bioallethrin“ ist ein Gemisch, das einen S-1R-trans Isomergehalt von über 90 % aufweist und der absoluten Konfiguration der natürlichen Pyrethrine entspricht. In Abbildung 3 ist die Molekülstruktur des Allethrins dargestellt.

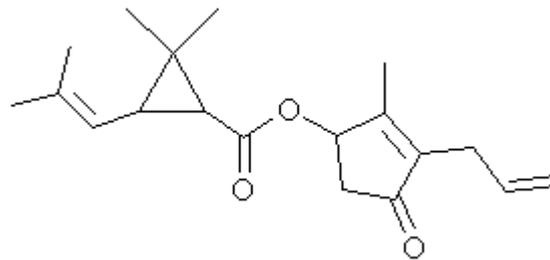
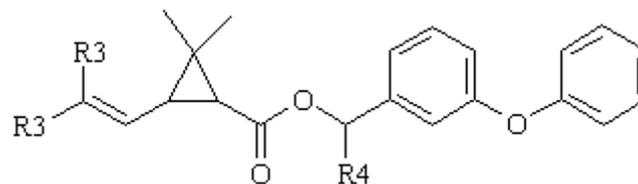


Abbildung 3: Molekülstruktur von Allethrin

Zur Gruppe der Pyrethroide gehören weiterhin u. a. Permethrin, Phenothrin, Cypermethrin, Fenvalerat und Deltamethrin [30]. Sie werden zur Bekämpfung vieler Schädlinge im Acker-, Gemüse-, Hopfen-, Obst- und Weinbau sowie im Zierpflanzenbereich als Fraß- und Kontaktinsektizide eingesetzt. Ihre höhere Sauerstoff- und Lichtstabilität (Persistenz) sowie die gesteigerte Toxizität zeichnet sie im Vergleich mit den Pyrethrinen aus [31].

In Abbildung 4 werden Struktur, Molekulargewicht, Summenformel und Isomerenanzahl der aufgeführten Pyrethroide dargestellt.



Substanz	R3	R4	Summenformel	Isomere	MG (g/mol)
<b>Phenothrin</b>	-CH <sub>3</sub>	-H	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	4	350,5
<b>Permethrin</b>	-Cl	-H	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	391,3
<b>Cypermethrin</b>	-Cl	-CN	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	8	416,3
<b>Deltamethrin</b>	-Br	-N	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	8	505,2

Abbildung 4: Molekülstruktur, Summenformel und Molekulargewicht der Pyrethroide: Phenothrin, Permethrin, Cypermethrin und Deltamethrin

Sowohl Permethrin als auch Phenothrin besitzen jeweils zwei asymmetrische Cyclopropyl-Kohlenstoffatome und bilden je vier Stereoisomere [32, 33]. Im Permethrin werden die zwei endständigen Methylgruppen des Phenothrins durch zwei Chloratome ersetzt.

Bedingt durch eine zusätzliche Cyanogruppe besitzt das Cypermethrin drei asymmetrische Kohlenstoffatome, die sich an den C1- und C3-Atomen des Cyclopropanringes und am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des 3-Phenoxybenzylesters befinden. Es sind somit acht Stereoisomere möglich [34].

Das Dibrom-Derivat des Cypermethrins, das Deltamethrin, ist das stärkste Toxikum der hier vorgestellten Pyrethroide. Die Aufwandmengen werden wegen seiner 1000-mal stärkeren insektiziden Wirkung gegenüber Stubenfliegen auf 10 – 20 g pro Hektar gesenkt. Mit 505,20 g/mol hat es ebenfalls das höchste Molekulargewicht [35].

In der Struktur des Fenvalerats (Abb. 5) findet man eine Abweichung in der Reihe der Cyclopropancarboxylate, da es ein Ester der  $\alpha$ -(4-Chlorphenyl)-isovaleriansäure ist.

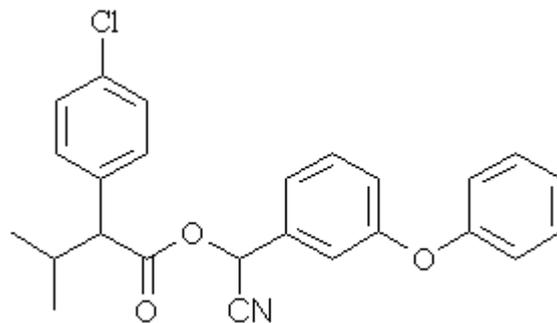


Abbildung 5: Molekülstruktur von Fenvalerat

## 1.4 Toxikologie

Pyrethroide wirken auf das Nervensystem, indem sie durch wiederholte Entladungen der Nervenzellen die normale Erregungsleitung verändern oder blockieren. Im Ruhezustand besitzt eine normale Nervenzelle ein negatives Potential von 60 - 80 mV gegen den extrazellulären Raum, das die Natrium-Kalium-Pumpe aufrecht erhält. Der Natriumionen-Austausch und der Kaliumionen-Einstrom der Zelle wird durch die Natrium-Kalium-Pumpe geregelt. Erregt man die Nervenzelle physiologisch, dann kehrt sich das

Konzentrationsgefälle kurzfristig um. Werden die Ionenkanäle in der Zellwand geöffnet, strömen Natriumionen in die Zelle ein und Kaliumionen hinaus. Das Membranpotential wird daraufhin positiv, was eine Erregung entlang der gesamten Nervenmembran zur Folge hat. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft lagern sich Pyrethroide an der Lipidmembran der Nervenzelle ab. Das führt zu einer längeren Öffnung der Natriumkanäle und bedingt dadurch wiederholte Entladungen. Die chemische Struktur des Pyrethroids beeinflusst die Dauer "künstlicher Nervenimpulse" [7, 6, 8, 35, 36]. Pyrethroide ohne  $\alpha$ -Cyanogruppe (Allethrin, Permethrin) verursachen wiederholte Nervenimpulse von kurzer Dauer, Pyrethroide mit  $\alpha$ -Cyanogruppe (Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerat) haben langanhaltende Zustände repetitiver Entladungen zur Folge.

Die Anatomie der Nervenzellen von Säugern weicht stark von der der Insekten ab. Daher wirken Pyrethroide unterschiedlich toxisch auf Warmblütler und Insekten. Der Selektivitätsfaktor beschreibt ein Maß für die Selektivität der Toxizität. Er wird aus dem Quotienten von  $LD_{50}$ -Ratte zu  $LD_{50}$ -Insekt berechnet. Im Vergleich zu chlorierten Kohlenwasserstoffen, organischen Phosphorsäureestern und Carbamaten besitzen Pyrethroide einen um ca. zwei Zehnerpotenzen höheren Selektivitätsfaktor als die übrigen Insektizidklassen (Tabelle 1).

Die  $LD_{50}$ -Werte sind Mittelwerte der synthetisierten Biozide einer Insektizidklasse.

Tabelle 1: Toxizitätsvergleich verschiedener Insektizidklassen [7]

<b>Insektizidklasse</b>	<b><math>LD_{50}</math>-Ratte (mg/kg)</b>	<b><math>LD_{50}</math>-Insekt (mg/kg)</b>	<b>Selektivitätsfaktor</b>
<b>chlorierte Kohlenwasserstoffe</b>	230	2,6	90
<b>Organophosphate</b>	67	2,0	34
<b>Carbamate</b>	45	2,8	16
<b>Pyrethroide</b>	2000	0,45	4400

Die Vergiftungserscheinungen hängen stark von der Aufnahme des Toxins ab. Symptome wie Brennen und Kribbeln der Haut, teilweise mit Parästhesien, treten bei Hautkontakt auf. Kopfschmerzen, Schwindel und Krampfanfälle der Skelettmuskulatur können bei inhalativer oder oraler Aufnahme als Folge auftreten. Es besteht bei dieser Biozidgruppe ein hohes allergisches Potential in Bezug auf das Bronchialsystem. Daher gelten diese als Haptene, die allergische Alveolitis hervorrufen. In Ausnahmefällen kann das zu Koma und Lungenödemen

---

mit Todesfolge führen. Das Beschwerdebild, das in der Umweltmedizin als „vielfache Chemikalien-Überempfindlichkeit“ (Multiple Chemical Sensitivity; MCS) bezeichnet wird, wird in den neuesten Untersuchungen diagnostiziert [37].

Die letale Dosis des Pyrethrums wird mit 1 g/kg Körpergewicht angegeben. Als MAK-Wert gilt zur Zeit 5 mg/m<sup>3</sup> [38].

Pyrethrin und Pyrethroide stehen des weiteren im Verdacht, kanzerogen zu sein. Die beim Abbau im Körper neben den Esterspaltungsprodukten entstehenden Epoxide werden dafür verantwortlich gemacht [39].

## 1.5 Stand der Forschung

Die in der Pyrethrin-Analytik hauptsächlich eingesetzte Bestimmungsmethode ist die titrimetrische Methode der Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Diese Methode wurde im Jahr 1955 veröffentlicht [40]. Das „Pyrethrum Board of Kenia“ (PBK) publizierte ein Jahr zuvor ebenfalls eine offizielle Methode zur Quantifizierung von Pyrethrinen [41].

In der Vergangenheit wurden mannigfaltige Untersuchungen zur chromatographischen Trennung von Pyrethrinen durchgeführt. Als Methoden wurden die Gaschromatographie (GC) [42, 43], die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) [44, 45, 46], die Dünnschichtchromatographie (DC) [47, 48] und die überkritische Fluid Chromatographie (SFC) [49, 50] eingesetzt.

Durch die hohen Temperaturen in der GC ( $T > 200\text{ °C}$ ) werden von Pyrethrin I und II durch Bildung von Tautomeren „sesselförmige“ Peaks hervorgerufen, die zur quantitativen Analyse nicht herangezogen werden können (vgl. Abb. 6) [51, 52].

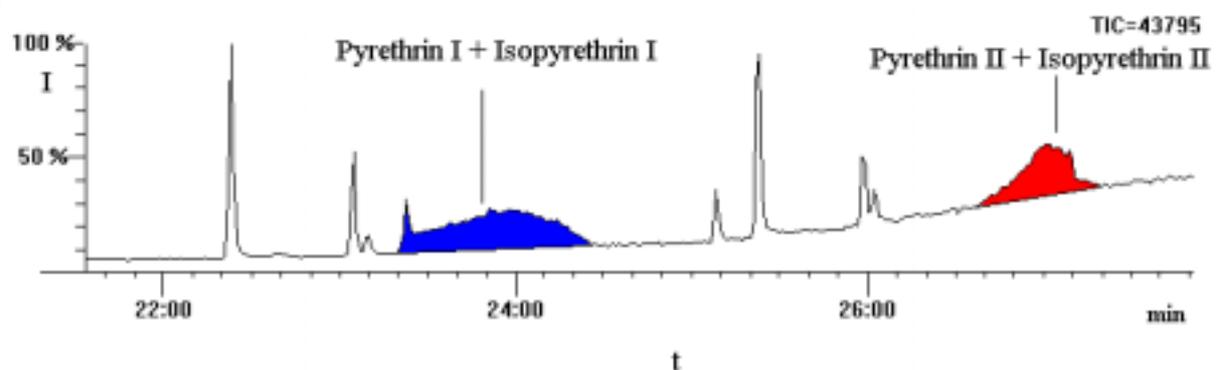


Abbildung 6: Totalionenstromchromatogramm von Pyrethrinen unter Anwendung der Gaschromatographie

Im Jahr 1995 gelang es Class und Böhner durch milde gaschromatographische Bedingungen und temperaturprogrammierter Injektion, die insektiziden Wirkstoffe in einem Pyrethrum-Extrakt zu trennen, ohne die Tautomerisierung zu beobachten [53]. 1997 separierten Wang et al. die Pyrethrine mittels HPLC unter Anwendung einer stationären RP-8 Phase und einem Acetonitril/Wasser Gradienten [54].

Die Quantifizierung der Pyrethroide bereitet im Gegensatz zu den Pyrethrinen keine Probleme. Die Pyrethroide werden überwiegend mit der Gaschromatographie separiert und

sowohl mit Elektroneneinfangdetektor (ECD) und Flammenionisationsdetektor (FID) als auch mit Massenspektrometer (MS) detektiert und bestimmt. Dabei ist das Vorhandensein einzelner zertifizierter Pyrethroid-Standards Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung. Bei der Pyrethrinbestimmung greift man auf zertifizierte Pyrethrum-Extrakte zurück. In diesen wird lediglich der Gesamt-Pyrethringehalt und das Verhältnis von Chrysanthematen zu Pyrethraten angegeben. Mit den oben beschriebenen Methoden lassen sich allerdings die Gehalte der einzelnen insektiziden Komponenten in den Extrakten nicht zufriedenstellend bestimmen. Die Synthese der einzelnen natürlichen Pyrethrine wird aus Kostengründen nicht kommerzialisiert, zumal Chrysanthemen als natürliche Ressourcen für Pyrethrine nachwachsen.

1997 beschrieben Wenclawiak et al. eine mögliche Quantifizierungsmethode, bei der die Pyrethrine durch eine in *situ* Derivatisierung in überkritischem Kohlendioxid umgeestert wurden. Die Reaktionsprodukte (Mono- und Dimethylester) konnten mit GC und massenselektiver Detektion (MSD) analysiert werden [55, 56].

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Analytik der Pyrethrine sowie deren synthetische Derivate und Synergisten unter Einsatz verschiedener Extraktionsmethoden und chromatographischer Verfahren weiter auszubauen.

Daher soll die Verwendung der überkritischen Fluid Chromatographie (SFC) für die Analytik von Pyrethrinen und Pyrethroiden unter validierenden Gesichtspunkten optimiert werden. Das in der SFC eingesetzte Kohlendioxid wird für die Eignung als mobile Phase auf Verunreinigungen untersucht. Besonderes Augenmerk gilt der qualitativen Bestimmung der insektiziden Wirkstoffe in Pyrethrum-Extrakten. Im Anschluss daran wird eine Methode erarbeitet, die die Quantifizierung der untersuchten Pestizide mit Referenzsubstanzen ermöglicht. Neben dem Einsatz der SFC soll die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) als chromatographische Vergleichsmethode getestet werden. Es werden auch hier sowohl Optimierungsschritte als auch qualitative und quantitative Gesichtspunkte erörtert. Der halbpräparative Einsatz der HPLC zur Isolierung der einzelnen insektiziden Wirkstoffe in Pyrethrum-Extrakten soll ebenfalls untersucht werden.

Nach der Aufstellung von zwei unabhängigen chromatographischen Bestimmungsmethoden für Pyrethrine und Pyrethroide werden zudem die insektiziden Inhalte in verschiedenen Matrices bestimmt. Hierbei werden fünf verschiedene Extraktionsmethoden für die Probenvorbereitung eingesetzt. Es werden Soxhlet-, Ultraschall-, überkritische Fluid, beschleunigte Lösemittel- und subkritische Wasserextraktion auf Selektivität und Extraktionsausbeute unter Anwendung statistischer Versuchsplanung miteinander verglichen. Kontaminationen im Spurenbereich in wässrigen Proben sollen durch Anreicherung an organischen Adsorbentien und anschließender Desorption bestimmt werden.

## 2 VALIDIERUNG

### 2.1 Überblick

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode. Validierungen werden in bestimmten Bereichen, wie z.B. pharmazeutischen Herstellungsprozessen, seit langem vom Gesetzgeber gefordert (Good Manufacturing Practice, GMP). In der Analytik dagegen herrschte bis Ende der 80er Jahre noch keine einheitliche Regelung [57]. Bei der „International Conference on Harmonisation“ (1993) in Orlando, Florida, wurde ein verbindliches Anforderungsschema für die Validierung von Analysenverfahren beschlossen [58]. Dazu ist es nötig, die wichtigsten Verfahrenskenngrößen festzulegen. Stets sollte eine Grundvalidierung durchgeführt werden. Sie umfasst die Überprüfung folgender Elemente:

- *Messpräzision*
- *Methodenpräzision*
- *Richtigkeit*
- *Robustheit*

### 2.2 Grundvalidierung

Je nach Art und Ziel der jeweiligen Analysenmethode sollte die Grundvalidierung um verschiedene zusätzliche Elemente erweitert werden:

*Identitätstest* (Qualitative Analytik)

*Gehaltsbestimmung* (Quantitative Analytik)

#### Präzision

Messpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Sie wird durch die Mehrfachanalyse ( $n = 6$ ) eines Standards ermittelt.

Die Methodenpräzision veranschaulicht die zufällige Streuung der Analysenergebnisse. Die gesamte Analyse wird sechsmal durchgeführt. Der ermittelte Variationskoeffizient ( $V_k$ ) gibt die Streuung der Methode wieder.

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 1})$$

Eine besondere Betrachtung gilt bei chromatographischen Analysensystemen der Reproduzierbarkeit von Injektion, Retentionszeit und Detektorresponse.

### Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt die systematische Abweichung des Ergebnisses vom wahren Wert wieder. Da der wahre Wert eine theoretische Größe darstellt, definiert man einen richtigen Wert (Sollwert), der durch Untersuchungen einer Probe mit unterschiedlichen Referenzverfahren ermittelt wird.

### Robustheit

Die Robustheit einer Methode ist ein Kriterium, bei der kleinere Schwankungen unter Ausführung des Verfahrens die Datenqualität nicht beeinträchtigen.

#### 2.2.1 Identitätstest

Für Identitätstests ist die Selektivität ( $\alpha$ ) der Methode die entscheidende Größe. Neben der Selektivität stellen chromatographische Kenngrößen wie Kapazitätsfaktor ( $k'$ ), Auflösung ( $R_S$ ) und theoretische Bodenzahl ( $N_{\text{theor}}$ ) (bzw. Bodenhöhe ( $H_{\text{theor}}$ )) die Leistungskenndaten der Chromatographie dar. In Tabelle 2 sind die chromatographischen Kenngrößen aufgeführt. In ihnen sind die experimentell ermittelten chromatographischen Daten mathematisch miteinander verknüpft. Zusätzliche Erläuterungen sind aus der Literatur zu entnehmen [59, 60, 61].

Tabelle 2: Chromatographische Kenngrößen

chromatogr. Kenngröße	Symbol	Gleichung
<b>Kapazitätsfaktor</b>	$k'$	$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ (Gl. 2)
<b>Selektivität</b>	$\alpha$	$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$ (Gl. 3)
<b>Auflösung</b>	$R_S$	$R_S = 1,177 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{0,51} + w_{0,52}}$ (Gl. 4)
<b>theoretische Bodenhöhe</b>	$H_{\text{theor}}$	$H_{\text{theor}} = \frac{L}{8 \cdot \ln 2} \cdot \left( \frac{w_{0,5}}{t_R} \right)^2$ (Gl. 5)
<b>theoretische Bodenzahl</b>	$N_{\text{theor}}$	$N_{\text{theor}} = \frac{L}{H_{\text{theor}}}$ (Gl. 6)

### 2.2.2 Gehaltsbestimmung

Für die quantitative Analyse müssen neben den Elementen der Grundvalidierung die Linearität überprüft sowie Nachweisgrenzen (NG) (engl.: limit of detection, LOD) und Bestimmungsgrenzen (BG) (engl.: limit of quantification, LOQ) ermittelt werden. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wird der lineare Bereich der Analysenmethode bestimmt. Die Regressionsanalyse stellt den analytischen Zusammenhang zwischen den Variablen (z.B. Konzentration und Peakfläche) her. Als Ergebnis erhält man eine Kalibrierfunktion, die eine lineare Abhängigkeit zwischen Messsignal und Analytkonzentration beschreibt, hier als Kalibriergerade (Gl. 7) bezeichnet. Kalibrierfunktionen 2. Grades sind ebenfalls möglich.

$$y = ax + b \quad (\text{Gl. 7})$$

Dabei ist  $y$  die Messgröße und  $x$  die Konzentration des Analyten. Der Regressionskoeffizient  $a$  entspricht der Steigung der Kalibrierfunktion. Ein Maß für die Güte der Kalibrierung ist der Korrelationskoeffizient ( $R$ ).

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, die qualitativ erfasst werden kann. Die Bestimmungsgrenze gibt die kleinste Konzentration

(Menge) des Analyten in einer Probe an, die quantitativ bestimmbar ist. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach Frehse und Thier [62] ermittelt.

### 3 Überkritische Fluid Chromatographie (SFC)

#### 3.1 Überblick

##### 3.1.1 Überkritische Fluide

Überkritische Fluide sind hochkomprimierte Gase oder Flüssigkeiten oberhalb der kritischen Temperatur ( $T_c$ ) und des kritischen Drucks ( $p_c$ ) des betreffenden Stoffes. Die maximale Temperatur, bei der ein Gas noch verflüssigt werden kann, nennt man kritische Temperatur. Oberhalb dieser Temperatur existiert kein flüssiger Aggregatzustand. Der erforderliche Druck, der eine Verflüssigung eines Gases bei kritischer Temperatur ermöglicht, wird kritischen Druck genannt. Das kritische Volumen ist das Volumen, das ein Mol einer Substanz bei dessen spezifischen kritischen Daten ( $T_c$  und  $p_c$ ) einnimmt.

Der Bereich des überkritischen Fluids ist in dem Phasendiagramm von Kohlendioxid (Abbildung 7) graphisch aufgezeigt.

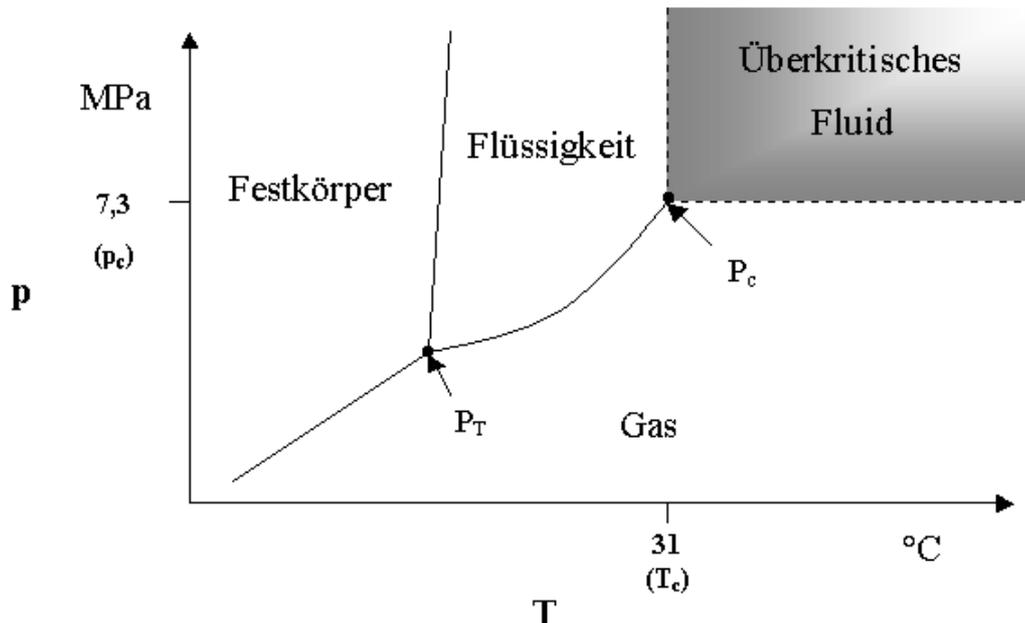


Abbildung 7: Phasendiagramm von Kohlendioxid

Der kritische Punkt wird mit  $P_c$  abgekürzt. Die kritische Temperatur von Kohlendioxid beträgt  $31,3$  °C, der kritische Druck  $7,29$  MPa. Überkritische Fluide vereinen die Vorteile von

Flüssigkeiten (hohe Dichte) und Gasen (geringe Viskosität, geringer Diffusionskoeffizient), wobei sie weder Gase noch Flüssigkeiten darstellen. Diese Fluide finden als Extraktionsmittel in der überkritischen Fluid Extraktion (SFE) und als mobile Phasen in der überkritischen Fluid Chromatographie ihre Anwendung. Weitere Informationen sind in der nachfolgenden Literatur aufgeführt [63, 64, 65, 66].

### 3.1.2 Historische Entwicklung der überkritischen Fluid Chromatographie

Der Beginn der „überkritischen Fluide“ ist mit der Entdeckung des „überkritischen Zustandes“ im Jahre 1822 datiert [67]. 1879 präsentierten Hannay und Hogarth die hervorragenden Lösemittleigenschaften überkritischer Fluide [68, 69]. Erst im Jahr 1958 trat der Gedanke auf, diese Fluide auch in der Chromatographie anwenden zu können. Die erste SFC-Apparatur wurde im Jahr 1962 von Klesper, Corwin und Turner beschrieben. Als mobile Phase wurde überkritisches 1,1-Chlor-2,2-fluormethan zur Trennung von thermolabilen Metallporphyrinen eingesetzt [70]. Eine weitere Entwicklung in theoretischer als auch in experimenteller Hinsicht erfuhr die Methode Ende der 60er Jahre vor allem von Giddings et al. [71] und von Sie et al. [72].

In den 70er Jahren stagnierte die Weiterentwicklung in der SFC. Dies war zum einen durch die schwierige Handhabung der überkritischen Fluide, zum anderen in der rasanten Entwicklung der HPLC-Technik begründet.

Ein weiterer wichtiger Fortschritt war die Anwendung von Kapillarsäulen in der SFC durch Novotny et al. im Jahr 1981 [73]. Die ersten kommerziellen SFC-Geräte wurden im Jahr 1982 von der Fa. Hewlett-Packard vertrieben. Seitdem konnte sich die SFC mit ihren Anwendungen in der Nische zwischen GC und HPLC immer weiter ausbreiten.

### 3.2 Injektor- und Detektor-Optimierung der SFC

Ein SFC-System besteht im wesentlichen aus Pumpe, Injektor, temperierter Trennsäule, Detektor und Restriktor.

Für den Transport der mobilen Phase werden sowohl Kolben- als auch Spritzenpumpen verwendet. Über den Injektor wird die Probe auf die Trennsäule gebracht. In der Literatur werden mannigfaltige Injektionstechniken in der SFC beschrieben. Man differenziert dabei zwischen Kapillarsäulen-SFC (cSFC: capillary column supercritical fluid chromatography) und Gepacktsäulen-SFC (pSFC: packed column supercritical fluid chromatography).

In der cSFC werden bevorzugt ältere Injektionssysteme wie die flow-splitting oder timed-split Injektoren mit internen Probenschleifen verwendet [74, 75, 76]. Das Injektionsvolumen dieser Systeme liegt im Nanoliter-Bereich. In der jüngsten Zeit werden große Anstrengungen durchgeführt, die Injektionsvolumina zu vergrößern. Hierzu werden verschiedene Ventiltechniken [77], Lösungsmittelinjektionen [78, 79, 80] oder Auffangen der Analyten in einem Interface [81] eingesetzt. Chester und Innis beschreiben den Einsatz einer Vorsäule, die als „retention gap“ fungiert [82].

In der pSFC sind Injektionsvolumen bis zu 100 µl möglich. Hierbei kommen Injektionssysteme aus der HPLC zum Einsatz [83, 84, 85]. Weiterhin werden Systeme mit Kühlfallen [86, 87] und das Sammeln der Substanzen auf diversen stationären Phasen beschrieben [88, 89].

Für die SFC stehen eine Vielzahl von Detektoren zur Verfügung, die sowohl in der GC als auch in der HPLC ihre Anwendung finden. Der in der SFC meist eingesetzte Detektor ist der Flammenionisationsdetektor (FID).

Durch den Restriktor wird das überkritische Fluid auf Umgebungsdruck zum Gas expandiert.

Basierend auf eigene Untersuchungen zur chromatographischen Trennung von Pyrethroiden und Pyrethrinen [90] sollen hier Injektor und Detektor auf das cSFC-System abgestimmt werden.

### 3.2.1 Experimentelles

#### Chemikalien

Als Lösemittel wurde n-Hexan (zur Rückstandsanalyse) der Firma PromoChem (Wesel, Deutschland) verwendet. Für timed-split Experimente wurden drei Lösungen (W1 – W3) von Teelicht-Kerzenwachs in n-Hexan verwendet. Lösung W1 enthielt 134,1 mg/l, Lösung W2 30,1 mg/l und W3 4,92 mg/l.

Eine Standard-Lösung (B) von vier Kohlenwasserstoffen (99,9 %, Riedel-de-Haën) wurde in n-Hexan hergestellt. Sie enthielt 6,57 mg/l n-Oktadecan, 6,43 mg/l n-Eicosan, 7,86 mg/l n-Docosan und 6,50 mg/l n-Tetracosan. n-Eicosan in n-Hexan mit einer Konzentration von 4,5 mg/l dient als Probe (C).

#### Geräte

Für die Studien wurde das MPS/225 der Fa. SUPREX (Pittsburgh, PA, USA) verwendet. Dieses SFC-System verfügte über ein pneumatisch betriebenes timed-split Injektionsventil (Valco Instruments, Houston, TX, USA), das sich unmittelbar über dem Ofen befand. Das Injektionsvolumen der internen Probenschleife (SSA CI4W.1, Fa. GAT, Bremerhaven, Deutschland) betrug 100 nl. Mit der mobilen Phase (Kohlendioxid) wurde die Probe in die chromatographische Trennsäule injiziert.

Ein linearer positiver Druckgradient (11 MPa – 0,2 MPa/min – 25 MPa) und eine Ofentemperatur von 110 °C stellten die chromatographischen Bedingungen dar. Ein selbst hergestellter Guthrie-Restriktor endete 5 mm unterhalb der Detektordüse. Als Detektor wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt, dessen Temperatur 325 °C betrug. Wasserstoff 5.0 und synthetische Luft (Kl. 2) (Messer-Griesheim, Düsseldorf, Deutschland) dienten als Brenngase. Das FID-Signal wurde mit der GC Star Software der Fa. Varian GmbH (Darmstadt, Deutschland) aufgezeichnet.

### 3.2.2 Ergebnisse

Für die Optimierung des Injektionssystems wurde eine DB1-Kapillarsäule (L: 10 m, ID: 0,05 mm, Filmdicke: 0,1 µm) verwendet.

Es wurden unterschiedliche Injektionszeiten mit drei verschiedenen Lösungen (W1 – W3) untersucht. Mit Hilfe eines n-Alkan-Standards konnten einige Einzelsubstanzen des Teelicht-Kerzenwachses durch den Vergleich der Retentionszeiten bestimmt werden. In Abbildung 8 ist ein Chromatogramm einer Wachsprobe und des Alkan-Standards aufgeführt. In der Graphik ist die homologe Reihe der n-Alkane von  $C_{20}H_{42}$  bis  $C_{37}H_{76}$  im untersuchten Kerzenwachs zu erkennen. Mit dem Vergleich der Retentionszeiten sind die Substanzpeaks eindeutig zuzuordnen.

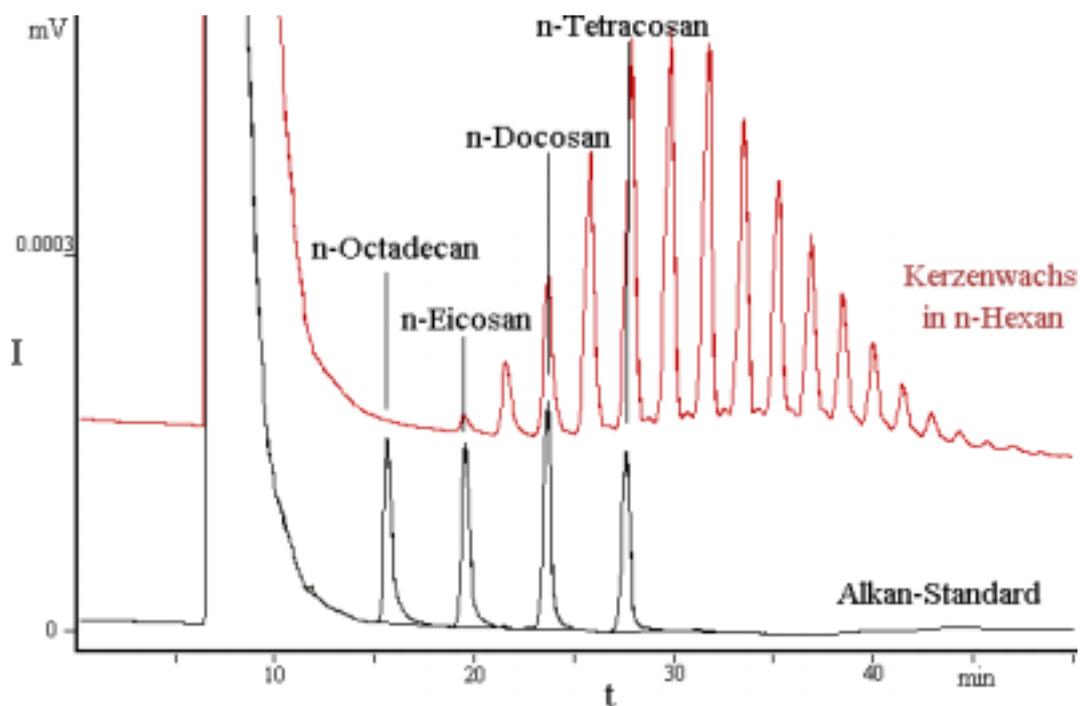


Abbildung 8: Chromatogramm einer Wachsprobe und eines Alkan-Standards

In Abbildung 9 ist auf der Ordinate die Fläche in COUNTS und auf der Abszisse die Injektionszeit in Sekunden dargestellt.

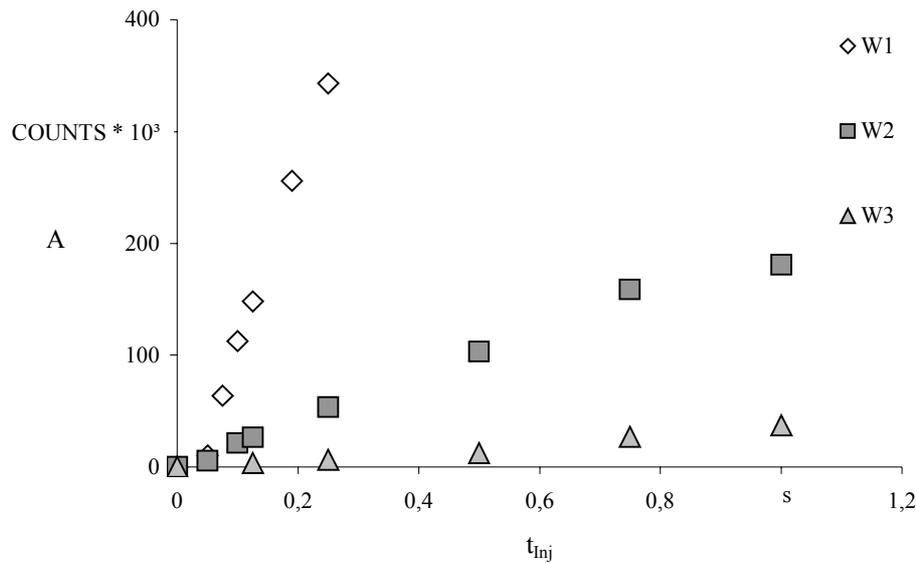


Abbildung 9: Auftragung Peakfläche gegen Injektionszeit

Die höchste Konzentration hat Probe W1, die niedrigste (Probe) W3. Allgemein ist ein Anstieg der Fläche bei zunehmender Injektionszeit zu erkennen. Die Aufzeichnung der Punkte bei Probe W1 endet nach einer Injektionszeit von 0,25 s. Dies rührt daher, dass die auf die Säule gebrachte Probenmenge zu groß ist. Sie ruft Peak tailing hervor, was ein Zeichen für eine überladene Säule darstellt. Diese Peaks sind nicht mehr quantitativ auswertbar. Bei Probe W3 befindet man sich an der unteren Grenze der Detektorempfindlichkeit. Eine mittlere Konzentration (Probe W2) zeigt, dass der Anstieg der Fläche nicht linear verläuft. Die Steigung der Geraden nimmt mit zunehmender Injektionszeit ab. Das bedeutet, dass mit zunehmender Injektionszeit die Probe immer vollständiger injiziert wird. Ein Problem entsteht bei hohen Injektionszeiten über 0,75 s. Es gelangt zu viel Lösemittel auf die Säule, indem die interne Probenschleife praktisch „ausgewaschen“ wird. Dadurch entsteht ein größerer Lösemittelpfropfen in der Säule, was ein Tailing des Lösemittelpeaks zur Folge hat. Dies hat einen negativen Effekt auf die Chromatographie, indem die Retentionszeiten der Analyten kürzer werden und die Substanzpeaks ein Fronting aufweisen. Aufgrund der Trägheit des Injektors sind zu kurze Injektionszeiten ( $< 0,25$  s) nicht reproduzierbar und die Konzentration der Probe müsste hoch gewählt werden. Daher wird eine Injektionszeit von 0,5 s als optimal angesehen.

Zudem traten praktische Probleme im Laufe eines Tages auf. Diese äußerten sich in einer enormen Peakverbreiterung des Lösemittels von 5 min auf 20 min. Hiermit war keine

Trennung der Analyten durchführbar. Es fiel auf, dass die Umgebungstemperatur des Injektors von 18 °C am Morgen auf 50 °C gegen Nachmittag anstieg. Somit bringt das CO<sub>2</sub> die Probe im überkritischen Zustand aus der Probenschleife auf die Säule. Wichtig ist allerdings, dass die mobile Phase im flüssigen Aggregatzustand die Probenschleife durchströmt, um ein Verwirbeln der Probe mit der mobilen Phase zu minimieren. Daher wurde zusätzlich die Zuleitung und der Injektor mit einer Wasserkühlung versehen (Abb. 10). Danach blieben die Retentionszeiten im Laufe des Tages gleich.

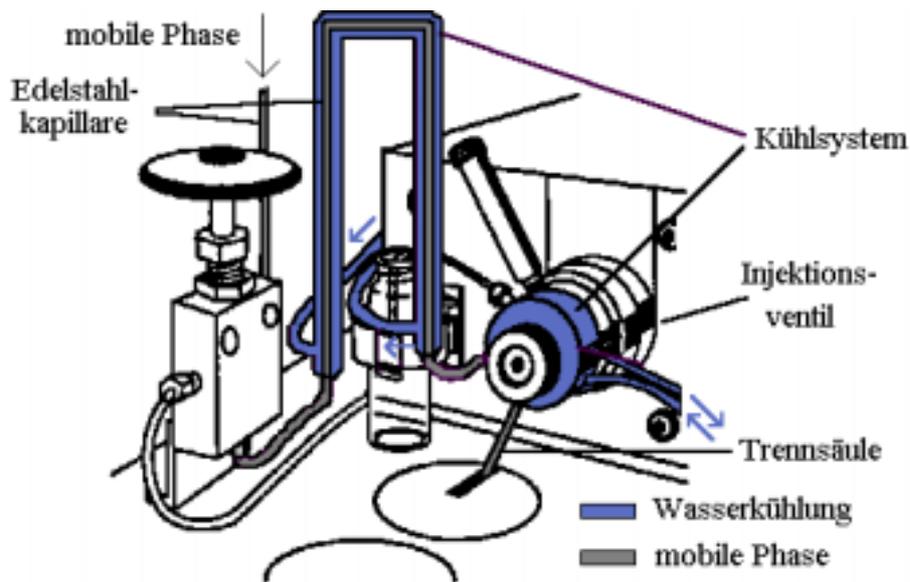


Abbildung 10: Kühlung des Injektorsystems

Bei der Optimierung des FIDs wurde der Gasfluss der Brenngase betrachtet. Dabei wurde der Wasserstoff-Fluss variiert und ein Wasserstoff-Luft-Gemisch nach Herstellerangaben von 1:10 eingestellt. Standard C diente als Testlösung. Aufgetragen wurde der Response-Faktor (Rf) in Fläche/Masse<sub>Kohlenstoff</sub> (COUNTS/ng<sub>C</sub>) gegen den H<sub>2</sub>-Fluss in Volumen/Zeit (ml/min) (Abb. 11).

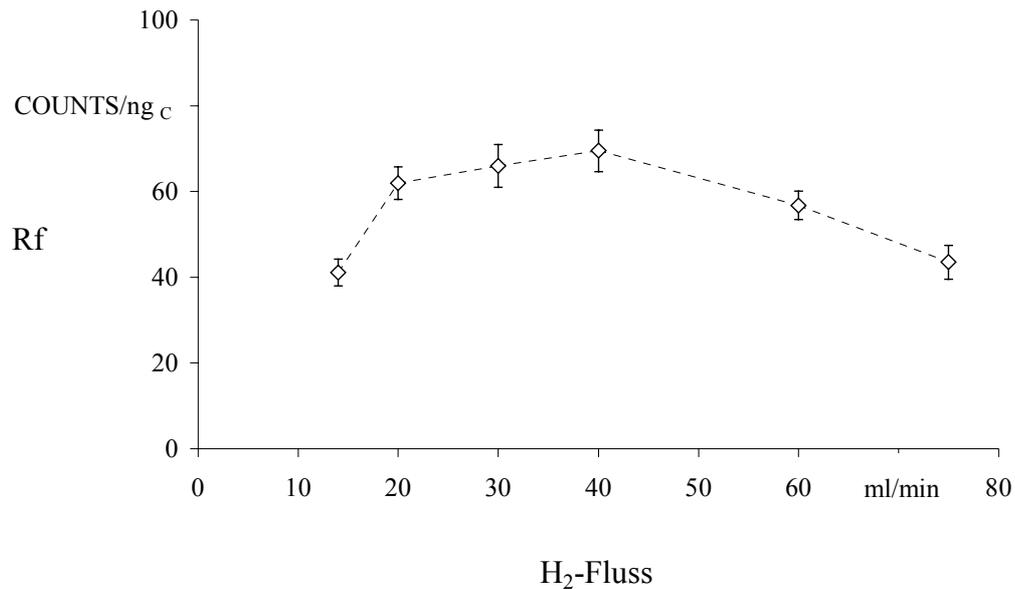


Abbildung 11: Brenngasoptimierung: Auftragung Rf gegen H<sub>2</sub>-Fluss

Es wurde bei H<sub>2</sub>-Strömen von 15, 20, 30, 40, 60 und 75 ml/min gemessen. Ein Maximum ist bei einem H<sub>2</sub>-Fluss von 40 ml/min zu erkennen. Hier wurde ein maximales Detektorsignal erzeugt. In den nachfolgenden Studien wurde ein H<sub>2</sub>-Fluss von 40 ml/min stets beibehalten.

### 3.3 Reinheitsuntersuchung von Kohlendioxid

#### 3.3.1 Prinzip der Messmethode

In diesem Kapitel wird das als mobile Phase verwendete Kohlendioxid auf Verunreinigungen hin untersucht. Verunreinigungen im Kohlendioxid schaden der SFE und SFC im Spuren- und vor allem im Ultraspurenbereich aufgrund des störenden Untergrundsignals. Die Verunreinigungen stammen zum einen von den eingesetzten Anlagen, zum anderen sind sie im Kohlendioxid selbst enthalten [91, 66]. Bei der hier verwendeten Methode werden nur FID-aktive Substanzen berücksichtigt. Als Messmethode diente die Aufnahme von Basislinien bei Verwendung eines linearen, positiven Druckgradienten in der SFC. Ein Maß für das Vorhandensein von FID-aktiven Verunreinigungen im Kohlendioxid ist die Steigung der Basislinie. Hierbei konkurrieren zwei unterschiedliche Phänomene bei der Bildung des

FID-Signals. Durch die Anwendung eines positiven Druckgradienten verringert sich zwar die Fließrate des überkritischen Fluids, die Fließrate des expandierten Gases steigt allerdings im Detektor fast linear an [92]. Somit nimmt die Fließrate des Kohlendioxid-Gases zeitlich im FID zu. Diese Änderung bewirkt eine Abnahme der Detektorempfindlichkeit, da weniger im FID gebildete Ionen auf die Sammelelektrode auftreffen. Außerdem ist es möglich, dass die Detektortemperatur durch die Abkühlung des Gases (Joule-Thomson-Effekt) geringer wird. Dies bewirkt ebenfalls eine Reduzierung der Detektorempfindlichkeit. Im Gegensatz dazu gelangen aber mit zunehmendem Gasfluss auch mehr FID-aktive Substanzen in den Detektor. Diese würden somit einen Anstieg des FID-Signals verursachen. Da der steigende Gasfluss während des Druckgradienten bei unterschiedlichen Kohlendioxid-Proben gleich ist, haben nur die verschiedenen Konzentrationen an FID-aktiven Substanzen im CO<sub>2</sub> einen Einfluss auf die Steigung der Basislinie.

### 3.3.2 Experimentelles

Als Apparatur wurde das MPS 225 (Fa. SUPREX) verwendet. An die Auslasskapillare der Pumpe wurde eine Edelstahlkapillare mit einem Innendurchmesser von 0,1 mm befestigt, die 200 mm in den Ofenraum ragte. Daran war eine 250 mm lange Quarzkapillare (ID: 0,05 mm) angeschlossen. Ein selbst hergestellter Guthrie-Restriktor endete 5 mm unterhalb der Detektordüse des Flammenionisationsdetektors. Die FID-Temperatur betrug 325 °C. Wasserstoff (5.0) und synthetische Luft (Kl. 2) (Fa. Messer-Griesheim) dienten als Brenngase.

### 3.3.3 Ergebnisse

Es wurde die Reinheit von Kohlendioxid verschiedener Hersteller untersucht. Dabei wurden zuvor einige Experimente durchgeführt, die das Messprinzip veranschaulichen. Getestet wurden Kohlendioxid der Fa. AGA (SFE-grade), technisches Kohlendioxid (Messer-Griesheim) und Helium (5.0) der Fa. Linde AG (Düsseldorf, Deutschland). In die Spritzenpumpe des SFC-Gerätes wurden jeweils 25 ml Kohlendioxid einkondensiert.

Es wurde ein Druckgradient gewählt, in dem der Druck von 11 MPa innerhalb von 15 Minuten auf 38 MPa anstieg und anschließend wieder auf 11 MPa in 15 Minuten sank. Die Fließrate des expandierten Kohlendioxids wurde mit einem digitalen Durchflussmessgerät gemessen. Sie stieg von 3 ml/min bei einem Druck von 11 MPa auf 18 ml/min bei 38 MPa an. Eine Basislinie von Helium (5.0) diente als Vergleich. Um eine gleiche Fließrate des expandierenden Heliums wie die des Kohlendioxids im Detektor zu gewährleisten, wurde für Helium ein Druckprogramm von 2,6 MPa auf 11 MPa eingesetzt. Abbildung 12 zeigt die Basislinien von SFE-grade CO<sub>2</sub>, technischem CO<sub>2</sub> und Helium.

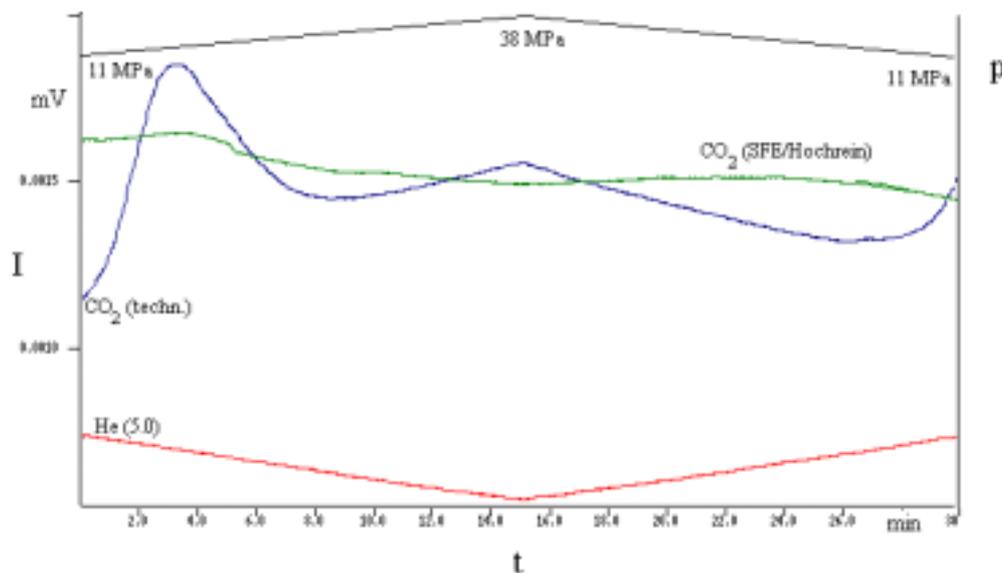


Abbildung 12: Basislinien von SFE-grade CO<sub>2</sub>, technischem CO<sub>2</sub> und He (5.0)

Innerhalb der ersten 4 Minuten ist ein steiler Anstieg der Basislinie bei technischem Kohlendioxid erkennbar, der durch die Anwesenheit von FID-aktiven Substanzen hervorgerufen wird. Die Basislinie von Kohlendioxid (SFE-grade) verläuft nahezu horizontal. Im Gegensatz dazu ist eine negative Steigung von Helium (5.0) bei linearem Anstieg des Druckes festzustellen. Im Helium sind die wenigsten FID-aktiven Stoffe, womit bei steigendem Gasfluss die Detektorempfindlichkeit abnimmt.

Weiterhin wurde Kohlendioxid 5.2 der Fa. AGA (Hamburg, Deutschland) mit Helium, Argon und Stickstoff als Kopfgase untersucht. In Abbildung 13 sind die Basislinien von CO<sub>2</sub> mit den verschiedenen Kopfgasen illustriert.

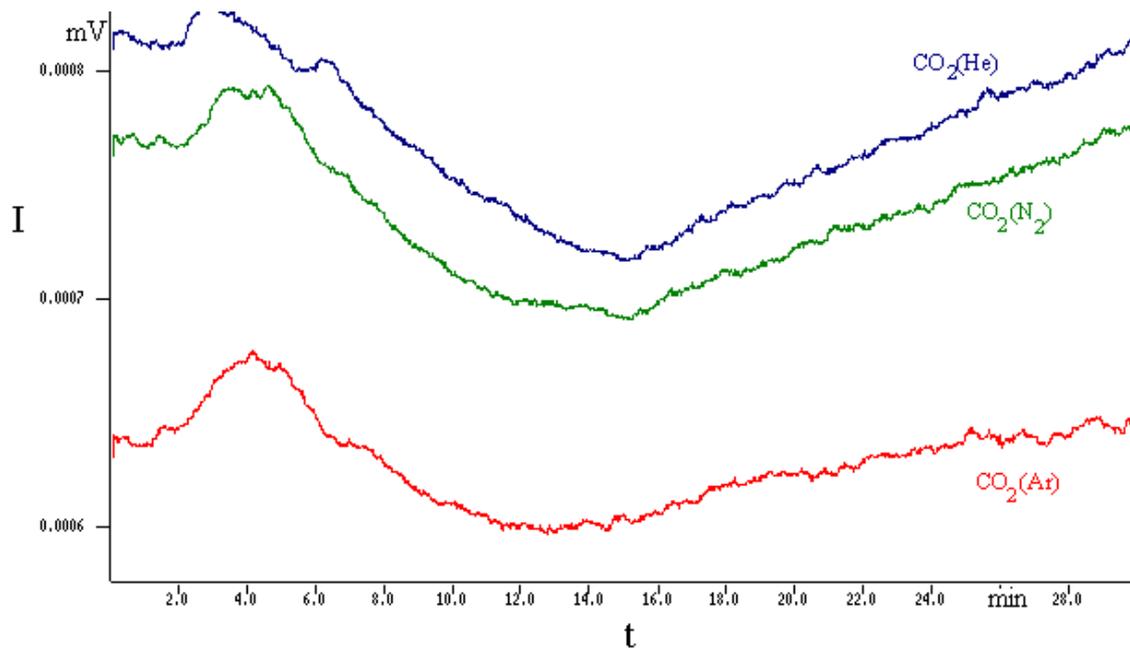


Abbildung 13: Basilinienchromatogramm von CO<sub>2</sub> mit unterschiedlichen Kopfgasen

Wie bereits in Abbildung 12 dargestellt, so ist auch im Anstieg der Basislinien innerhalb der ersten 4 Minuten die Reinheit der Gase zu erkennen (Abb. 13). Danach besitzt Kohlendioxid mit Argon als Druckpolster die meisten FID-aktiven Substanzen, gefolgt von CO<sub>2</sub> mit Stickstoff und CO<sub>2</sub> mit Helium. Der in dem Zeitintervall von 15 bis 30 Minuten unterschiedlich steile Anstieg der Basislinien lässt darauf schließen, dass verschiedene Reinheiten vorliegen.

Für die Ermittlung der Steigung wurde der Verlauf der Basislinien von 15 bis 30 Minuten verwendet. Dabei weist eine hohe Steigung bei sinkendem Druck (38 MPa – 11 MPa) auf wenige FID-aktive Substanzen hin. Die Steigung  $a$  wurde nach Gleichung 8:

$$a = \Delta y / \Delta x \quad (\text{Gl. 8})$$

berechnet. Die Einheit wird in  $\mu\text{V/s}$  angegeben.

In Abbildung 14 sind die berechneten Steigungen ( $a$  in  $10^{-3} \mu\text{V/s}$ ) gegen die Messergebnisse ( $c$  in  $\text{ng/l}$ ) von Hinz und Wenclawiak [93] aufgetragen. Mit abnehmender Steigung der Basislinie ist eine Zunahme der Konzentration an Verunreinigungen zu erkennen.

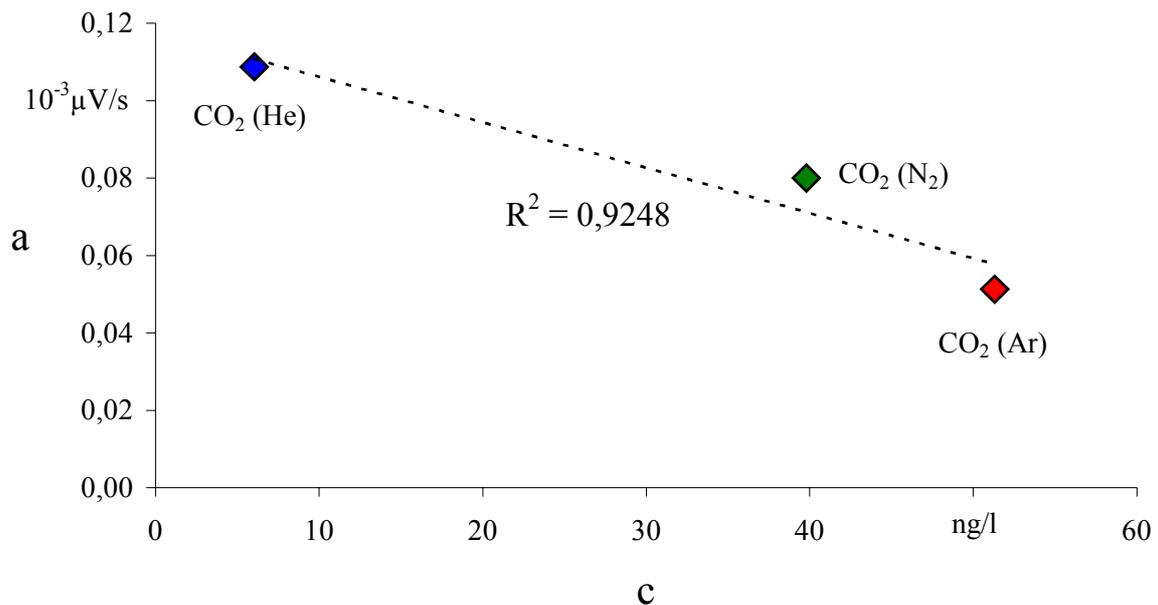


Abbildung 14: Steigung der Basislinien von CO<sub>2</sub> mit verschiedenen Kopfgasen gegen Konzentration von Verunreinigungen im CO<sub>2</sub> ermittelt durch GC-Methode

Bei einer proportionalen Abhängigkeit sollte die Verbindung der Punkte eine Gerade ergeben. Dies ist hier nicht der Fall. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten beträgt 0,924. Dieser Wert verdeutlicht, dass kein linearer Zusammenhang zwischen den Messgrößen besteht. Dies könnte daran liegen, dass bei den Experimenten von Hinz et al. leichtflüchtige Verunreinigungen im Kaltaufgabe Injektorsystem (KAS 3) des Gaschromatographen nicht zurückgehalten oder schwerflüchtige Bestandteile nach der Desorption nicht chromatographiert werden. Diese nicht detektierten Substanzen werden in der SFC-Methode im Falle des Argons registriert mit dem Resultat von abweichenden Werten im Vergleich zur GC-Methode.

In einer weiteren Studie wurde Kohlendioxid (SFE-Grade) der Firmen AGA, Air Products, Air Liquide, Linde, Messer-Griesheim, Praxair und Scott getestet. Es wurden die experimentellen Bedingungen wie oben beschrieben angewandt. Auffällig ist die M-Form des Chromatogramms (Abb. 15). Bis zu einem Maximum bei einer Zeit von 4 Minuten steigt die Basislinie steil an. Dies entspricht einem Druck von 17,4 MPa. Danach fällt die Basislinie stark ab bis zu einem Minimum bei 15 Minuten. Der Druck beträgt hier 35 MPa. Das bedeutet, dass das FID-Signal schwächer wird, obwohl die Menge der FID-aktiven

Substanzen im Zuge des Druckanstiegs und dem daraus resultierenden höheren Massenfluss des CO<sub>2</sub> zunimmt. Die abnehmende Detektorempfindlichkeit ist mit einem zu hohen Fluss des expandierten CO<sub>2</sub> zu erklären. Nach dem Druckmaximum (35 MPa) sinkt der Druck innerhalb von 15 min auf 11 MPa ab. Hierbei steigt die Basislinie bis zu einer Zeit von ca. 25 min stark an, durchläuft ein Maximum und sinkt danach bis zum Ende der Aufnahmezeit wieder.

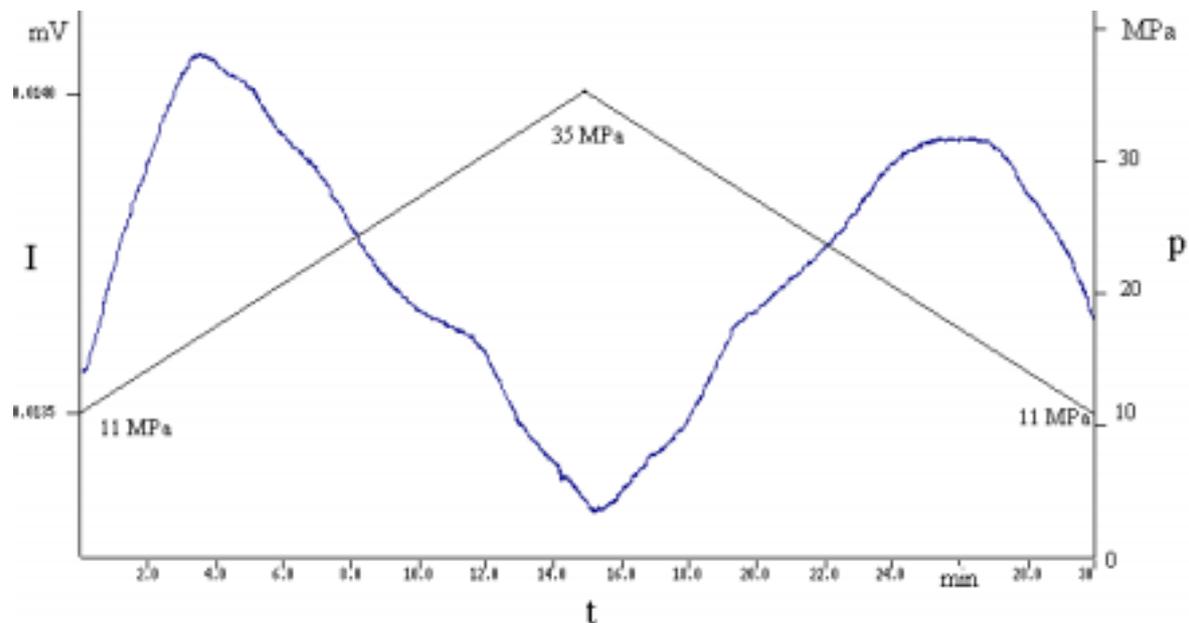


Abbildung 15: Darstellung der Basislinie unter der Anwendung eines Druckprogramms: (11 MPa - 35 MPa in 15 min, innerhalb 15 min von 35 MPa - 11 MPa) bei T = 100°C

Da diese Steigungen schlecht auszuwerten sind, wählte man ein modifiziertes Druckprogramm. Dabei wurde der konstante Anstieg der Basislinie in Abbildung 15 bis zu einem Druck von ca. 18 MPa berücksichtigt. Das verwendete modifizierte Druckprogramm begann bei einem Druck von 10 MPa und stieg linear bis zu einem Druck von 18 MPa nach 10 min an. Danach sank der Druck innerhalb 10 min bis zum Ausgangsdruck. In Abbildung 16 sind die Basislinie eines Kohlendioxids der Fa. AGA und das verwendete Druckprogramm dargestellt.

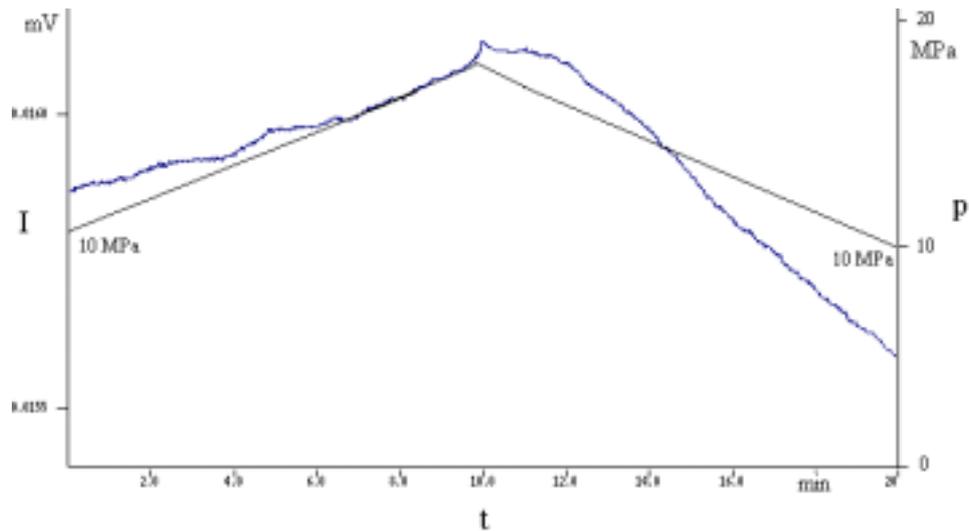


Abbildung 16: Chromatogramm von CO<sub>2</sub> der Fa. AGA unter der Anwendung eines Druckprogramms (10 MPa - 18 MPa in 10 min, innerhalb 10 min von 18 MPa - 10 MPa) bei T = 100°C

Es wurde die Steigung der Basislinie von 0 bis 10 min graphisch ausgewertet. In Abbildung 17 sind die Steigungen der sechs untersuchten Gase der verschiedenen Hersteller illustriert.

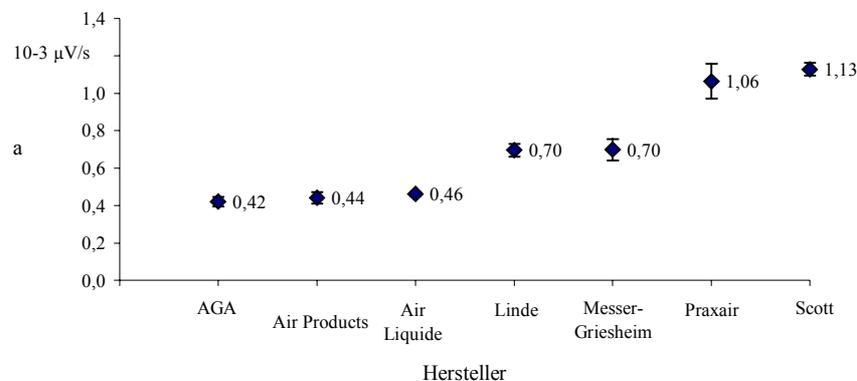


Abbildung 17: Steigung der Basislinie der untersuchten Gase

Aus Abbildung 17 ist eine Teilung der Geradensteigung in 3 Kategorien zu erkennen. Da hier die Steigungen bei zunehmendem Druck berechnet wurden, besitzt das Kohlendioxid der Fa. AGA mit  $0,42 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$  die geringste Steigung und somit die geringsten FID-aktiven Substanzen. Danach folgt das CO<sub>2</sub> der Fa. Air Products mit  $0,44 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$  und das der Fa. Air Liquide mit  $0,46 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$ . Zur mittleren Kategorie zählen die Kohlendioxide der Fa. Linde ( $0,695 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$ ) und der Fa. Messer-Griesheim ( $0,70 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$ ). Das Kohlendioxid

der Fa. Praxair und das der Fa. Scott besitzen mit  $1,06$  und  $1,13 \cdot 10^{-3} \mu\text{V/s}$  die höchsten Steigungen. Die höchsten Belastungen an FID-aktiven Substanzen besitzen die beiden zuletzt Genannten.

Abbildung 18 stellt den Zusammenhang der ermittelten Steigungen ( $a$  in  $10^{-3} \mu\text{V/s}$ ) mit den von Hinz [94] ermittelten Werten ( $c$  in  $\text{ng/l}$ ) dar. Im Gegensatz zu den Messungen von Hinz, in denen Absolut-Messungen durchgeführt wurden, sind mit der SFC-Methode nur Relativ-Messungen möglich, da kein Referenzgas (z.B. dotiertes  $\text{CO}_2$ ) zur Verfügung stand. Prinzipiell werden die Ergebnisse der SFC-Methode durch die GC-Methode bestätigt. Wären die Ergebnisse gleich, so müsste aus der Verbindung der Punkte eine Gerade resultieren.

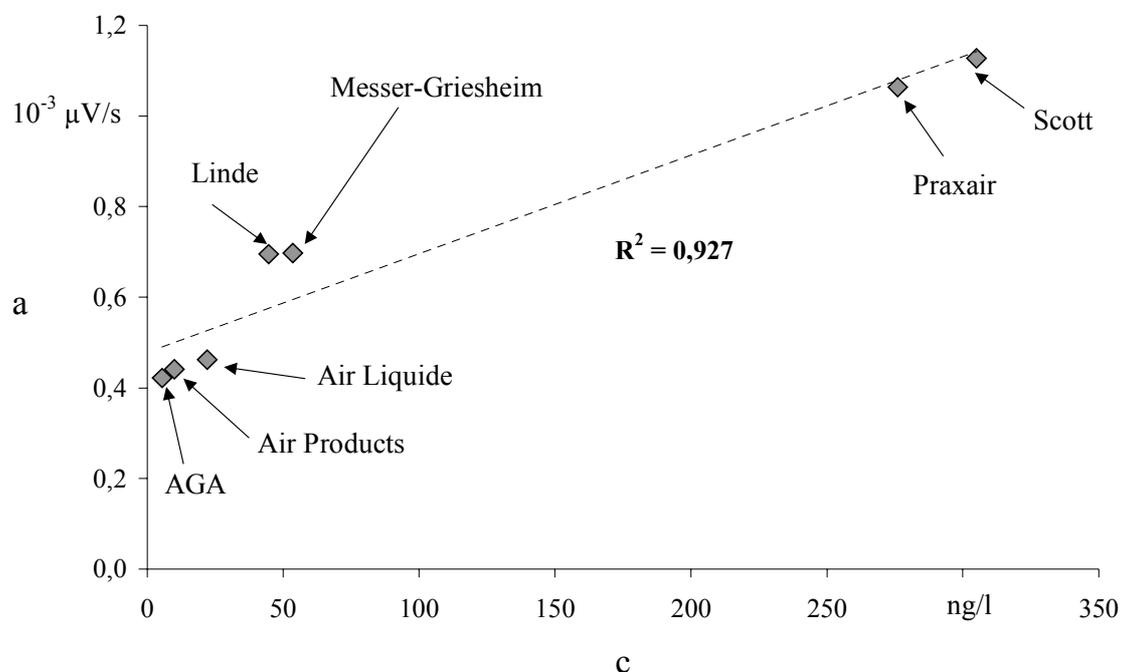


Abbildung 18: Vergleich der ermittelten Werte durch Anwendung der SFC- und der GC-Methode

Es ist allerdings deutlich zu erkennen, dass die Steigung des Kohlendioxids von Linde und Messer-Griesheim zu hoch liegen oder möglicherweise die Steigungen von Scott und Praxair zu niedrig sind. Daraus ergibt sich ein Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von  $0,927$ . Aus diesem Wert kann kein linearer Zusammenhang abgeleitet werden. Dass diese Abweichungen dennoch plausible Werte darstellen, liegt daran, dass mit der SFC-Methode alle FID-aktiven Substanzen registriert werden. Durch die Anwendung des KAS bei der GC-Methode werden Substanzen erst ab Hexan quantitativ adsorbiert. Leichtflüchtige Stoffe wie Methan, Ethan,

etc. werden nicht im KAS zurückgehalten. Diese Stoffe können allerdings in nicht unerheblichem Maße im Kohlendioxid enthalten sein. Durch die Anwesenheit dieser Stoffe kann eine erhöhte Steigung bei Linde und Messer-Griesheim (vgl. Abb. 18) in der SFC-Methode hervorgerufen werden.

### 3.3.4 Diskussion

Die beschriebene Methode stellt eine einfache und schnelle Messmethode zur Bestimmung von FID-aktiven Substanzen in Kohlendioxid dar. Dabei wurde der in der SFC hauptsächlich eingesetzte Druckgradient verwendet. Es konnte verdeutlicht werden, dass die zwei unterschiedlichen Methoden (SFC- und GC-Methode) zur Bestimmung von Verunreinigungen in Kohlendioxid annähernd die gleichen Ergebnisse liefern. Die Qualität der Reinheit konnte in den untersuchten Gasen eingestuft werden. Daraus resultierend wird das Kohlendioxid der Firmen AGA, Air Products und Air Liquid als gering belastet eingeordnet. Das Kohlendioxid dieser drei Hersteller wurde deshalb in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

### 3.4 Qualitative Analyse

Um Analysen durchführen zu können, ist es in der Chromatographie unerlässlich, die Elutionsreihenfolge der Analyten zu bestimmen und Koelutionen auszuschließen. Betrachtet man die untersuchten Pyrethroide und Paraffine, so kann man aufgrund von Einzelstandards leicht die Elutionsreihenfolge bestimmen. Da Einzelstandards von Pyrethrinen nicht erhältlich sind, ist es notwendig, die Peaks im Chromatogramm den Substanzen auf andere Art zuzuordnen. Die aus der Literatur entnommene Elutionsreihenfolge in der SFC [95, 96, 97] und die in der Gaschromatographie [98, 99, 100, 101, 102] dienen lediglich als Anhaltspunkte. Zudem beeinflusst die stationäre Phase der Trennsäule die Elution der Substanzen. Daher muss ein Detektor in der SFC eingesetzt werden, der strukturaufklärende Eigenschaften besitzt. So ist der Einsatz von FTIR-Spektrometer [103, 104, 105], UV-Detektor [106], NMR-Spektrometer [107, 108] und Massenspektrometer [109, 110] in der SFC beschrieben.

#### 3.4.1 GC-MS-Kopplung:

##### 3.4.1.1 Experimentelles

Um eine online Kopplung der SFC mit einem Massenspektrometer zu ermöglichen, muss eine optimale Ionisationsart für die Analyten bestimmt werden. Daher wurden zuvor Experimente mit einem GC-MS-System durchgeführt. Es wurde ein Gaschromatograph (HP 5890 Series II) der Fa. HEWLETT-PACKARD (Böblingen, Deutschland) eingesetzt. Helium (6.0) der Fa. Messer-Griesheim (Siegen, Deutschland) wurde als Trägergas verwendet. Als chromatographische Trennsäule diente eine 30 m lange fused silica Säule (DB5) mit einer Schichtdicke von 0,25  $\mu\text{m}$  und einem Innendurchmesser von 0,32 mm. Das verwendete Temperaturprogramm begann bei einer Starttemperatur von 40 °C, die für eine Minute gehalten wurde. Mit einer Aufheizrate von 10 °C/min erreichte man eine Endtemperatur von 300 °C, die für 5 Minuten konstant gehalten wurde. Die Kapillare endete im beheizbaren Quarzliner vor der Ionenquelle des Massenspektrometers (Automass 150, Delsi-Nermag, Argenteuil, Frankreich). In diesem System ist sowohl der Einsatz einer Elektronenstoß-

Ionisation (EI: electron impact) als auch der Einsatz positiver (PCI) und negativer chemischer Ionisation (NCI) möglich. Bei der chemischen Ionisation wird ein Reaktandgas (Methan) bei Drücken von ca. 70 Pa in großem Überschuss zur Probe ( $\sim 10^4 : 1$ ) in die Ionenquelle eingeleitet. Dort geht das Reaktandgas unter Ionenbeschuss eine Primärreaktion ein. Das entstandene  $\text{CH}_5^+$ -Ion ionisiert in einer Sekundärreaktion die Probe. Zur Steuerung des Massenspektrometers und zur Datenverarbeitung diente die Software LUCY der Fa. Delsi-Nermag (Version 2.31). In Tabelle 3 sind die massenspektrometrischen Bedingungen aufgelistet.

Tabelle 3: Geräteeinstellung bei den verwendeten Ionisationsarten

Parameter	Einheit	EI	NCI	PCI
IP	eV	70	- 190	+ 170; +150
I <sub>Strom</sub>	μA	300	300	300
T <sub>Interface</sub>	°C	300	300	200
T <sub>Source</sub>	°C	250	250	110
Scan	amu	40 - 500	50 - 500	50 - 500
Reaktandgas		-----	Methan (6.0)	Methan (6.0)

### 3.4.1.2 Ergebnisse

Ein Totalionenstrom-Gaschromatogramm (TIC: total ion current) von Pyrethrinen unter Anwendung der Elektronenstoß-Ionisation (EI) ist in Abbildung 19 zu erkennen.

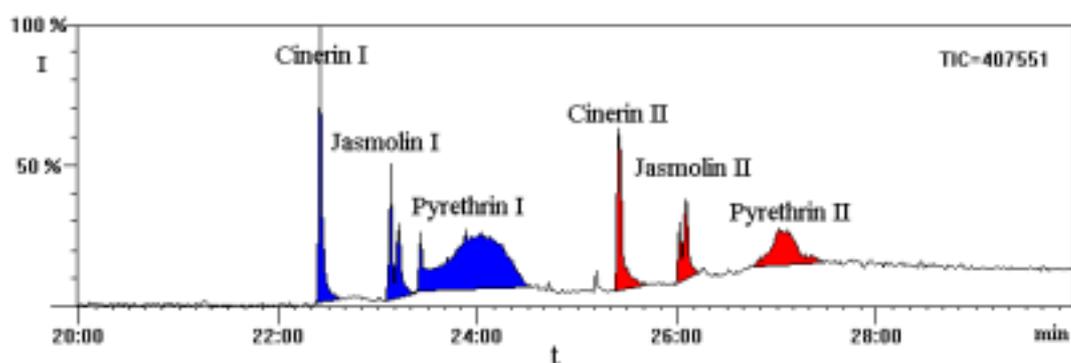


Abbildung 19: Totalionenstrom-Gaschromatogramm der Pyrethrine

Cinerin I und II eluieren mit einer Retentionszeit von 22,25 min bzw. 25,50 min. Jasmolin I und II werden als Doppelpeaks nach 23,08 bzw. 26,00 min detektiert. Pyrethrin I und II verursachen verbreiterte Peaks, die innerhalb eines Zeitintervalls von 23,10 bis 24,40 min bzw. 26,40 bis 27,20 min eluieren. Das in Kapitel 1.5 aufgeführte Problem der gaschromatographischen Bestimmung von Pyrethrinen wird hier deutlich.

In Abbildung 20 sind die Massenspektren der sechs Pyrethrine mit den Hauptfragmenten dargestellt. Es wurde ein Massenbereich von 50 amu (atomic mass units) bis 500 amu gescannt. Die Spektren sind mit den in der Literatur beschriebenen vergleichbar [111, 112].

Die sechs Ester zeigen in ihren Spektren schwache Intensitäten (1 - 10 %) der Molekülionen ( $[M]^+$ ). Die Chrysanthemate besitzen einen Basispeak bei  $m/z$  123, der durch Abspaltung der Estergruppe vom Chrysanthemumester hervorgerufen wird. Die 3 Esterverbindungen rufen in ihren Spektren ein Ion mit ähnlicher Intensität bei  $m/z$  168 hervor. Dieses Fragment wird durch die Esterspaltung unter Bildung der Chrysanthemumsäure kombiniert mit einem Wasserstoff-Transfer (McLafferty-Umlagerung) dargestellt. Die Spaltung der O-Cyclopentenon-Bindung und H-Transfer verursacht ein Triplett von Fragmentionen, das charakteristisch für die Alkoholkomponente der jeweiligen Verbindung ist. Die Massenspektren der Pyrethrate werden von den Fragmentionen der Alkoholkomponenten dominiert. Diese sind vergleichbar mit denen der Chrysanthemate. Alle Pyrethrate zeigen ein  $[M - OCH_3]^+$ -Ion mit geringer Intensität. Zusätzlich sind Ionen mit  $m/z$  211, 212 und 167 zu erkennen, die durch die charakteristische Fragmentierung der Pyrethrum säure hervorgerufen werden.

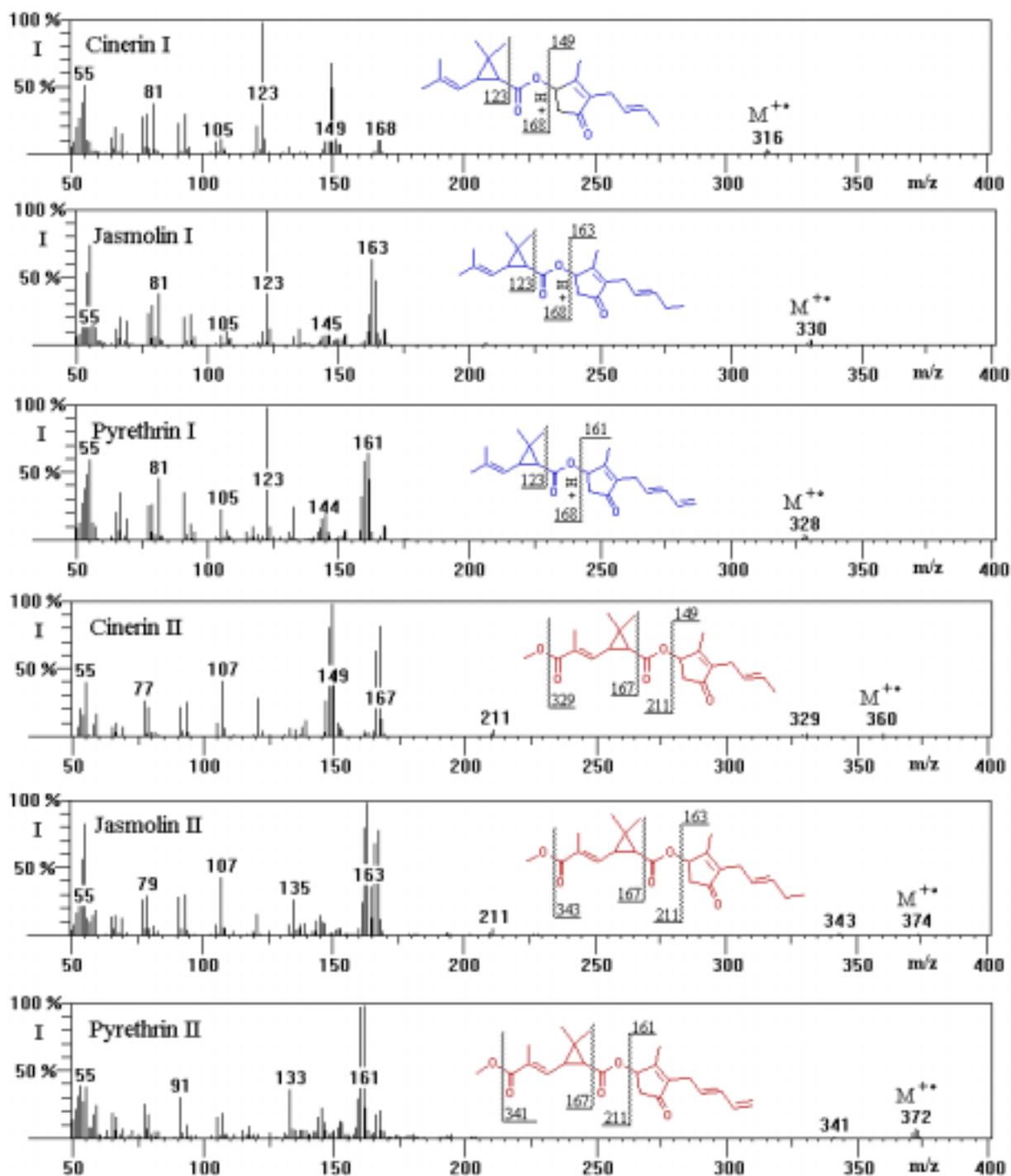


Abbildung 20: Massenspektren der Chrysanthemate und Pyrethrate unter Anwendung von (GC-MS(EI))

In Bezug auf die Fragmentierung der Pyrethrine bei Elektronenstoß-Ionisation verursacht die negative chemische Ionisation (NCI) (siehe Tabelle 3) ein deutlich differenziertes Fragmentierungsmuster.

Als Basispeak ist bei den Chrysanthematen das Fragment  $m/z$  167 zu verzeichnen (Abbildung 21). Dies ist das Fragment des Chrysanthemumsäureanions (Abbildung 22). Die Fragmente  $m/z$  148, 160 und 162 werden von der Alkoholkomponente der jeweiligen Verbindung hervorgerufen. Ein Molekülpeak  $[M]^-$  wird nicht detektiert.

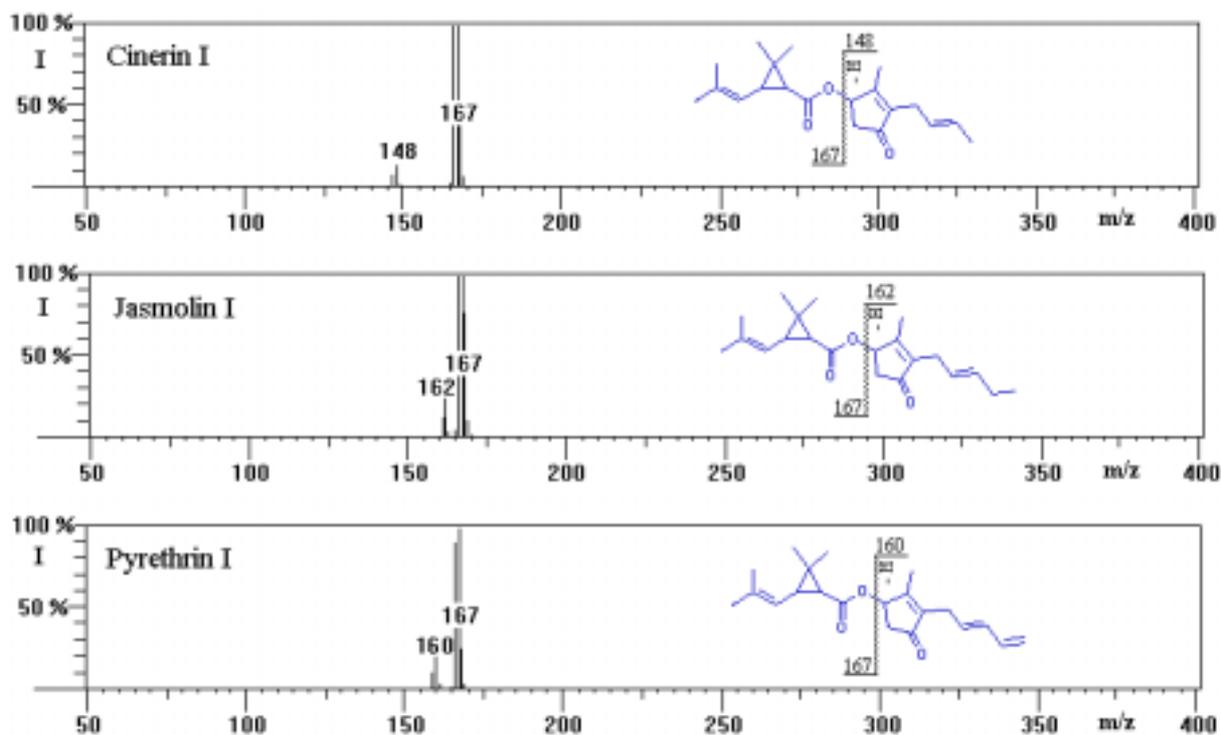


Abbildung 21: Massenspektren der Chrysanthemate unter Anwendung von (GC-MS(NCI))

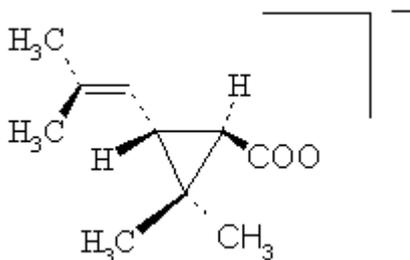


Abbildung 22: Anion der (+)-trans-Chrysanthemumsäure ( $m/z$  167)

In Abbildung 23 sind die Massenspektren der Pyrethrate illustriert. Das Fragment  $m/z$  211 wird von dem Pyrethrumsäureanion (Abbildung 24) hervorgerufen. Ebenso wie bei den Chrysanthematen sind die Massen der Alkohole der verschiedenen Substanzen zu erkennen.

Aus der Addition der Massen des vom Alkohol gebildeten Ions und des Säureanions innerhalb eines Spektrums würde das Molekulanion ( $[M]^-$ ) resultieren. Ein Molekulanion wird bei den Pyrethrinen nicht registriert.

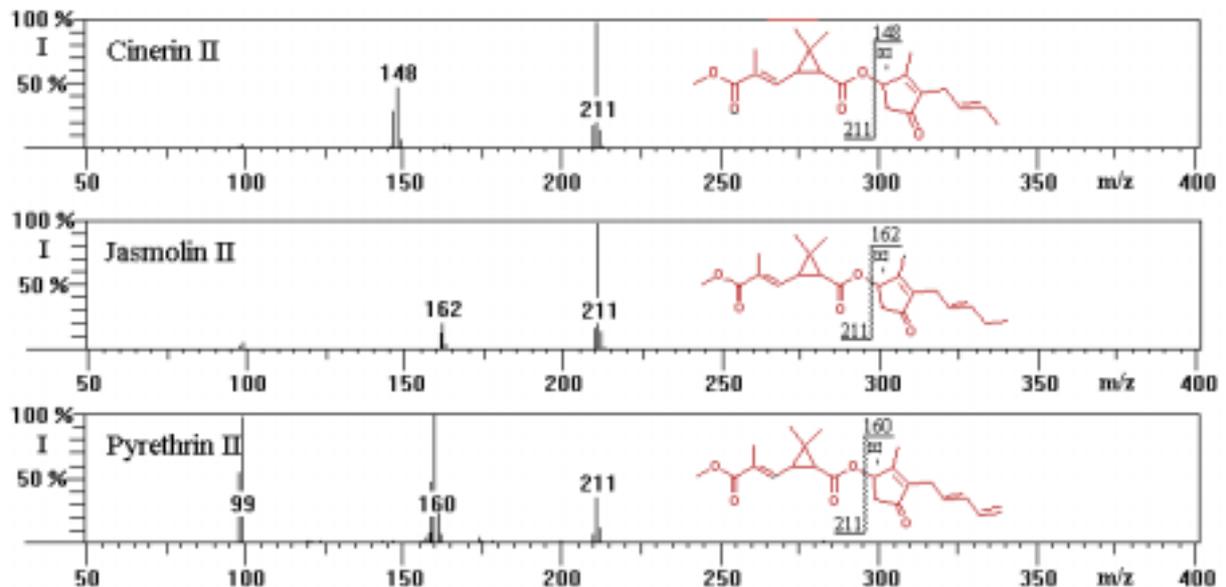


Abbildung 23: Massenspektren der Pyrethrate unter Anwendung von (GC-MS(NCI))

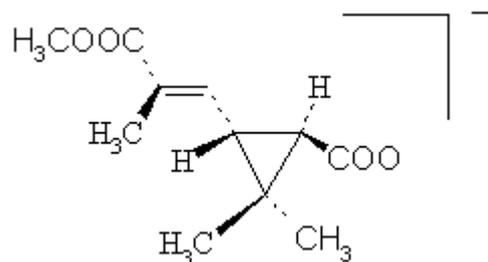


Abbildung 24: Anion der (+)-trans-Pyrethrumsäure ( $m/z$  211)

Unter Anwendung der positiven chemischen Ionisation (PCI) (vgl. Tabelle 3) erhält man ein deutlich abweichendes Fragmentierungsmuster bezüglich der beiden zuvor genannten Ionisationsarten. Abbildung 25 zeigt die Fragmentierung innerhalb eines Massenbereiches von 100 – 400 amu der Chrysanthemate durch PCI. Die positive chemische Ionisation ist bevorzugt durch die milde Protonierung durch  $CH_5^+$  und Anlagerung von Reaktandionen an den Carbonyl-Sauerstoff der Substanzen. Daraus resultiert ein quasi Molekulanion  $[MH]^+$  und mögliche zusätzliche Ionen mit  $[M + C_2H_5]^+$  und  $[M + C_3H_5]^+$ .

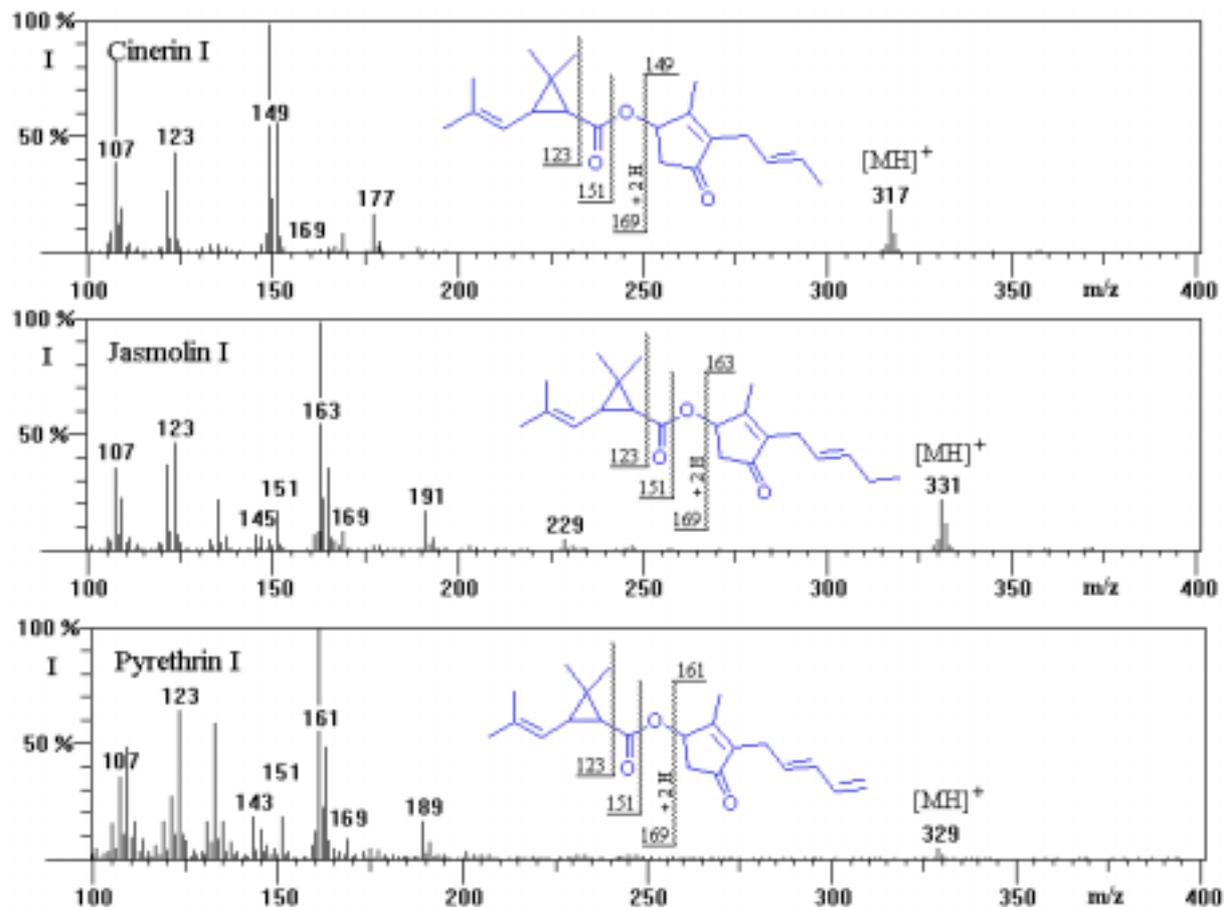


Abbildung 25: Massenspektren der Chrysanthemate unter Anwendung von (GC-MS(PCI))

Die Intensität der Molekülionen  $[MH]^+$  variiert zwischen 5 und 22 %. Ionen der Spezies  $[M + C_2H_5]^+$  sind nicht zu erkennen. Die höchste Intensität besitzen die Fragmente der Alkoholkomponenten ( $m/z$  149, 163 und 161). Die Ionen  $m/z$  177, 191 und 189 werden durch Addition von  $C_2H_4^+$  an die Alkohole hervorgerufen [113]. Durch die Spaltung der Esterbindung, Wasserstoff-Umlagerung und Protonierung der zuvor entstandenen Chrysanthemumsäure erhält man das Fragment  $m/z$  169, dessen Intensität 2 – 10 % beträgt. Nach Abspaltung einer Hydroxylgruppe wird das Ion  $m/z$  151 (I: 5 – 20 %) gebildet. Wird von diesem die verbliebene Carbonylgruppe abgespalten, erhält man ein Ion der Masse  $m/z$  123 mit einer Intensität von 45 – 65 %.

Abbildung 26 zeigt die Massenspektren der Pyrethrate unter Anwendung positiver chemischer Ionisation.

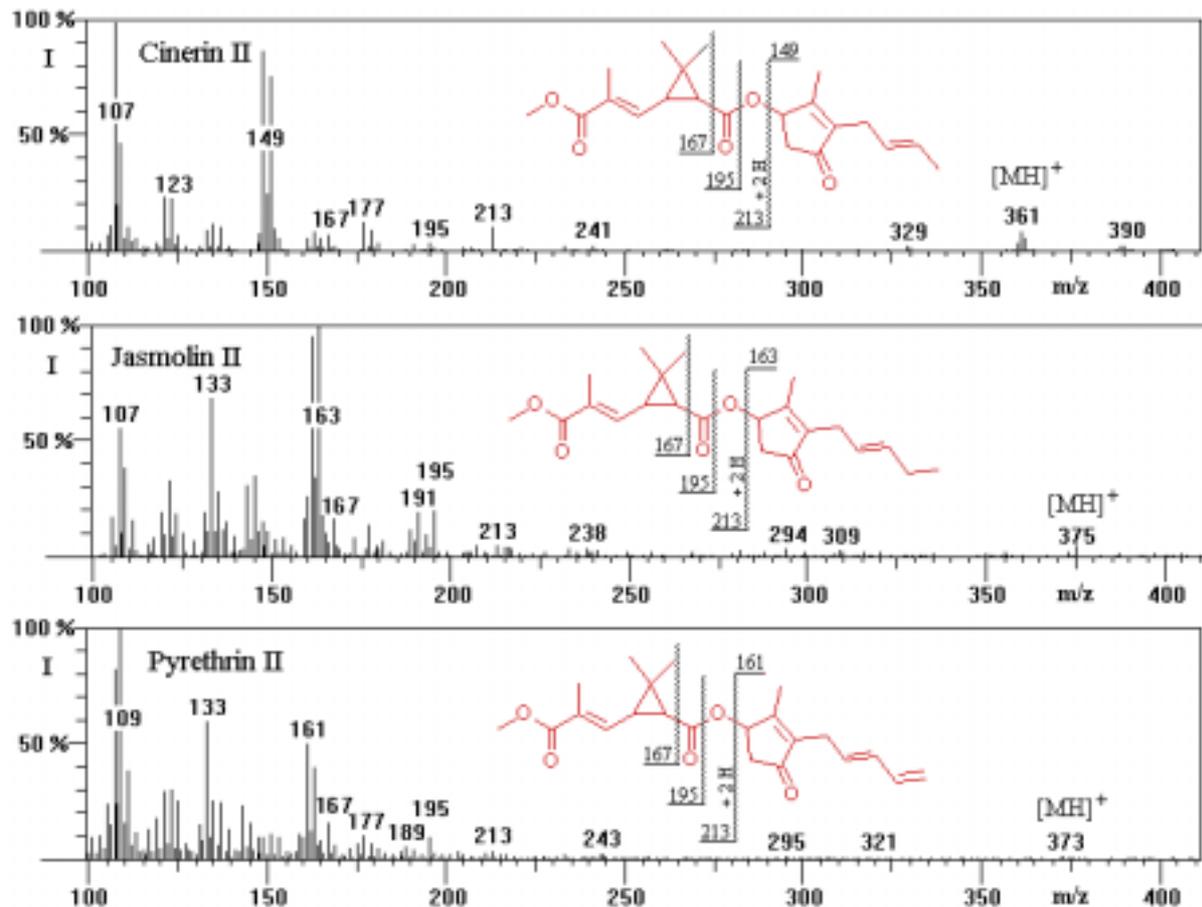


Abbildung 26: Massenspektren der Pyrethrate unter Anwendung von (GC-MS(PCI))

Die  $[MH]^+$  Ionen der Pyrethrate besitzen eine Intensität von 2 – 9 %. Dies entspricht etwa der Hälfte der Chrysanthemate. Ein Ion  $[M + C_2H_5]^+$  ( $m/z$  390) ist bei Cinerin II deutlich zu erkennen, wobei Jasmolin II und Pyrethrin II dieses Fragment nicht aufweisen. Cinerin II zeigt ein Ion von  $m/z$  329. Dies wird durch die Abspaltung einer  $CH_3OH$ -Gruppe von der Pyrethrumsäure des Diesters verursacht. Die durch die Esterspaltung gebildete Pyrethrumsäure ruft, analog zur Chrysanthemumsäure, ebenfalls drei charakteristische Fragmente ( $m/z$  213, 195, 167) hervor. Die zwei Ionen, die der Alkoholkomponente und dem  $C_2H_4$ -Addukt der jeweiligen Substanz zugeordnet werden, sind im Massenspektrum deutlich zu erkennen.

### 3.4.1.3 Diskussion

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurden die Analyten mit einem GC-MS-System mittels unterschiedlicher Ionisationsarten untersucht. Es stellte sich heraus, dass die verschiedenen Ionisationsarten zu differenzierten Massenspektren führten. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 4) sind die durch unterschiedliche Ionisationsarten hervorgerufenen Molekülpeaks von Pyrethrinen sowie deren charakteristische Ionen mit relativen Intensitäten zusammengefasst.

Tabelle 4: Molekülpeak und charakteristische Ionen der Pyrethrine bei EI, NCI und PCI in m/z (%)

Substanz	EI			NCI			PCI		
	[M] <sup>+•</sup>			[M] <sup>-</sup>			[MH] <sup>+</sup>		
<b>Cinerin I</b>	316 (< 5)	123 (100)	149 (65)	—	167 (100)	148 (13)	317 (20)	149 (100)	123 (43)
<b>Jasmolin I</b>	330 (5)	123 (100)	163 (65)	—	167 (100)	162 (25)	331 (23)	163 (100)	123 (45)
<b>Pyrethrin I</b>	328 (< 5)	123 (100)	161 (65)	—	167 (100)	160 (20)	329 (5)	161 (100)	123 (65)
<b>Cinerin II</b>	360 (< 5)	149 (100)	167 (80)	—	211 (100)	148 (45)	361 (10)	107 (100)	149 (85)
<b>Jasmolin II</b>	374 (< 5)	163 (100)	167 (78)	—	211 (100)	162 (20)	375 (5)	163 (100)	133 (70)
<b>Pyrethrin II</b>	372 (8)	161 (100)	167 (20)	—	160 (100)	211 (35)	373 (< 5)	109 (100)	161 (50)

Elektronenstoß-Ionisation und positive chemische Ionisation zeigen sowohl Molekülpeaks als auch charakteristische Fragmentationen von Pyrethrinen. Eine zweifelsfreie Identifizierung der Substanzen ist somit gewährleistet. Auffällig ist, dass in der EI-Methode der Basispeak bei den Chrysanthematen von der Säurekomponente und bei den Pyrethraten von der Alkoholseite gebildet wird. Der Grund dafür ist die leichtere Fragmentierung der Pyrethrumssäure, indem die Methylestergruppe oder eine Methoxy-Gruppe leicht abgespalten wird. Dies führt zu einer geringen relativen Intensität des Pyrethrumssäure-Fragmentes. Der

---

Basispeak bei der positiven chemischen Ionisation wird, anders als bei der Elektronenstoß-Ionisation, von der Alkoholkomponente hervorgerufen. Bei negativer chemischer Ionisation werden lediglich die Fragmente des Säureanions (Basispeak) und des dazugehörenden Alkohols detektiert. Ein Molekulanion, das zur exakten Substanzbestimmung herangezogen werden muss, wurde nicht registriert. Hieraus lässt sich keine eindeutige Identifizierung der untersuchten Stoffe durchführen. Als Schlussfolgerung daraus eignen sich Elektronenstoß-Ionisation (EI) und positive chemische Ionisation (PCI) mit Methan zur Charakterisierung. Diese beiden Ionisationsarten sollen Einsatz in den SFC-MS-Experimenten finden.

### 3.4.2 SFC-MS-Kopplung

#### 3.4.2.1 Experimentelles

Die in Kapitel 3.2.2 beschriebene SFC-Apparatur wurde mit einem GC-MS-System der Fa. Delsi-Nermag (Frankreich) gekoppelt. Dabei wurde das SFC-Gerät mit der Ofenseite unmittelbar vor den GC-Ofen positioniert und die Ofentüren der beiden Geräte entfernt. Der zwischen den beiden Öfen entstandene Spalt (200 mm) wurde mit Steinwolle abgedichtet, um die Temperatur in den Ofenräumen gegen die Umgebungstemperatur abzuschirmen. Aus dem Ofenraum des MPS/225 wurde die Trennsäule in den GC-Ofen geleitet. Von dort aus wurde die Kapillare durch das 30 cm lange heizbare GC-MS-Interface in das Massenspektrometer geführt. Der sich am Ende der Säule befindliche Guthrie-Restriktor wurde danach - gemäß den Herstellerangaben des Massenspektrometers - im beheizbaren Glasliner vor der Ionenquelle (Source) positioniert. Im Scan-Modus wurde ein Massenbereich von 50 amu bis 550 amu detektiert. Als Ionisationsarten wurden sowohl Elektronenstoß-Ionisation (EI) als auch positive chemische Ionisation angewandt. Die Parametereinstellungen der getesteten Ionisationsarten sind unten aufgeführt.

#### Parameter bei Elektronenstoß-Ionisation (EI):

Interfacetemperatur: 250 °C  
Source-Temperatur: 200 °C  
Ionisationsstrom: 300 µA  
Ionisationspotential: 70 eV  
Druck (Vorpumpe):  $2,5 \cdot 10^{-2}$  Pa  
PM-Spannung: 700 V

#### Parameter bei positiver chemischer Ionisation (PCI):

Interfacetemperatur: variiert (110 °C, 150 °C, 250 °C)  
Source-Temperatur: variiert (80 °C, 120 °C, 150 °C, 200 °C)  
Ionisationsstrom: variiert (300 µA, 500 µA, 800 µA)  
Ionisationspotential: variiert (30 eV, 70eV, 110 eV, 150 eV,170 eV)  
Reaktandgas: Methan 5.6 (Messer-Griesheim, Düsseldorf, Deutschland)  
Druck (Reaktandgas):8,66 Pa  
PM-Spannung: 700 V

### 3.4.2.2 Ergebnisse

Bei einem Ionisationspotential von 70 eV im EI-Modus wurden keine Peaks der injizierten Analyten im Totalionenstrom-SF-Chromatogramm (TIC) aufgezeichnet. Dies kann zum einen an der Unreinheit des benutzten Kohlendioxids liegen (vgl. Kap. 3.3), was ein enormes Rauschen zur Folge hat. Zum anderen vermag das im Überschuss vorliegende CO<sub>2</sub>, den Elektronenstrahl, der zur Fragmentierung der Analyten führt, abzufangen. Eine mögliche Fragmentierung wird unterdrückt und die Detektion der Substanzen verhindert.

Bei den ersten Experimenten mit positiver chemischer Ionisation wurden folgende Einstellungen am Massenspektrometer gewählt:

Interfacetemperatur: 110 °C

Source-Temperatur: 120 °C

Ionisationsstrom: 300 µA

Ionisationspotential: 120 eV

Bei diesen Parametern konnte das erste Chromatogramm von Pyrethrinen aufgenommen werden. Allerdings wurde ein hohes Untergrundrauschen und geringe [MH]<sup>+</sup>-Peaks aufgezeichnet. Stellenweise wurden [MH]<sup>+</sup>-Peaks gar nicht registriert. Abbildung 27 zeigt ein Massenspektrum von Pyrethrin I. Es wurde ein Massenbereich von 50 bis 550 amu gescannt. Als charakteristische Fragmente sind hier lediglich die Ionen *m/z* 123 und 161 mit einer Intensität < 10 % zu verzeichnen.

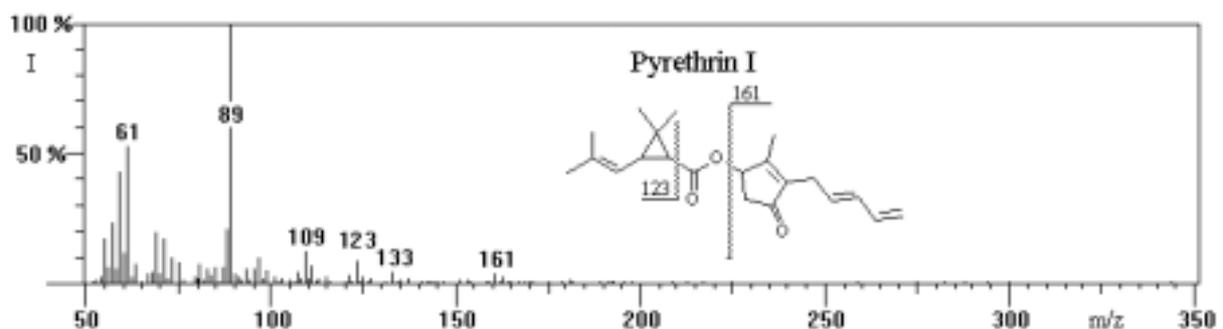


Abbildung 27: Massenspektrum von Pyrethrin I unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Das Basision ( $m/z$  89) wird von einem Kohlendioxid-Clusterion ( $\text{CO}_2$ -Dimeres +  $\text{H}^+$ ) gebildet. Zusätzliche Clusterionen werden in der Literatur bei  $m/z$  44 (45) und 132 (133) beschrieben [114]. Diese Clusterionen entstehen durch die plötzliche Expansion des Kohlendioxids vom Hochdruckbereich in den Hochvakuumbereich. Durch diese explosionsartige Ausdehnung des Kohlendioxids bilden sich  $\text{CO}_2$ -Di- und Trimere, die nicht weiter fragmentiert werden. Sie erscheinen als störende Ionen mit hoher Intensität in den Massenspektren. In der Vergangenheit versuchte man, durch Prallplatten dieses Problem zu lösen. In dieser Arbeit wurde auf eine solche aufwendige Umrüstung des Massenspektrometers verzichtet. An Stelle dessen wurde der aufgezeichnete Massenbereich von 50 – 550 amu auf 100 - 550 amu geändert, da die substanzspezifischen Fragmente größer als 100 amu sind. Zudem wird das Interpretieren der Massenspektren erleichtert, da der Basispeak von  $m/z$  89 nicht auftritt und so die relativen Intensitäten der molekülrelevanten Signale erhöht werden.

Zusätzlich wurden verschiedene Parametereinstellungen getestet. Es stellte sich heraus, dass ein Zurückziehen der Säule aus dem Glasliner um 10 mm, ein hoher Ionisationsstrom von 800  $\mu\text{A}$ , ein hohes Ionisationspotential (170 eV) und Temperaturen von 200 °C (Source und Interface) schlechte Ergebnisse lieferten. Diese äußerten sich im enormen Untergrundrauschen, in Molekülpeaks mit geringer Intensität und im Rauschen der Basislinie. Hohe Temperaturen und geringe Ionisationspotentiale (30 und 70 eV) ergaben Chromatogramme mit glatter Basislinie. Das Untergrundrauschen war gering, aber die Intensität der Molekülpeaks betrug lediglich 10 %. Die aussagekräftigsten Chromatogramme und Spektren wurden bei folgenden Einstellungen registriert:

Optimale Parametereinstellung bei der positiven chemischen Ionisation:

Interfacetemperatur: 110 °C

Source-Temperatur: 80 °C

Ionisationsstrom: 500  $\mu\text{A}$

Ionisationspotential: 30 eV

Massenbereich: 100 – 550 amu

Deutlich ist zu erkennen, dass die optimale Einstellung die mildesten Ionisationsparameter beinhaltet.

Abbildung 28 zeigt ein Totalionenstrom-SF-Chromatogramm von Pyrethrinen unter optimierten SFC-MS(PCI)-Bedingungen.

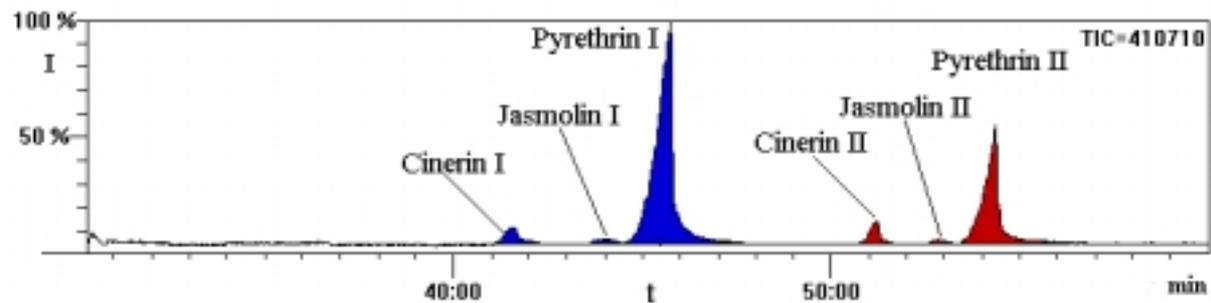


Abbildung 28: Totalionenstromchromatogramm von Pyrethrinen unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Die Elutionsreihenfolge der Analyten entspricht der in der Gaschromatographie. Mit dem Einsatz der mobilen Phase Kohlendioxid in der SFC anstelle Helium (GC) erfolgt ein erhöhter Eintrag von Unreinheiten in die Ionenquelle. Dies hat eine Empfindlichkeitseinbuße des MS-Detektionssystems zur Folge. Daher wurde eine Pyrethrin-Lösung mit hoher Konzentration (3900 mg(Pyrethrine)/l) injiziert. Bei einem Injektionsvolumen von 100 nl werden absolut 390 ng Pyrethrine injiziert. Aus der hohen Konzentration der Lösung resultiert eine Überladung der Säule. Dies schlägt sich in dem Fronting und der großen Breite der Peaks nieder. Dennoch ist eine ausreichende Trennung der Substanzen gewährleistet. Ein Auftreten der „verschmierten“ Isomerenpeaks von Pyrethrin I und II, wie in der GC (vgl. Abb. 19, S. 33), wird nicht beobachtet.

In den Abbildungen 29 bis 34 sind die Massenspektren der Pyrethrine aufgezeigt.

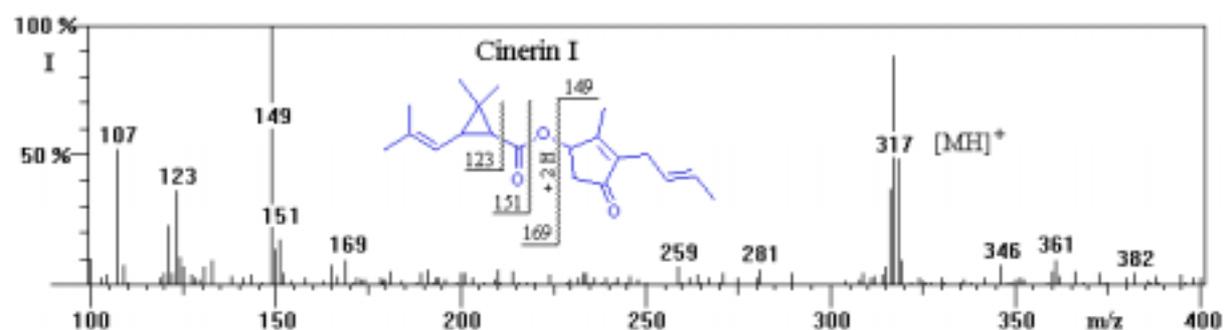


Abbildung 29: Massenspektrum von Cinerin I unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

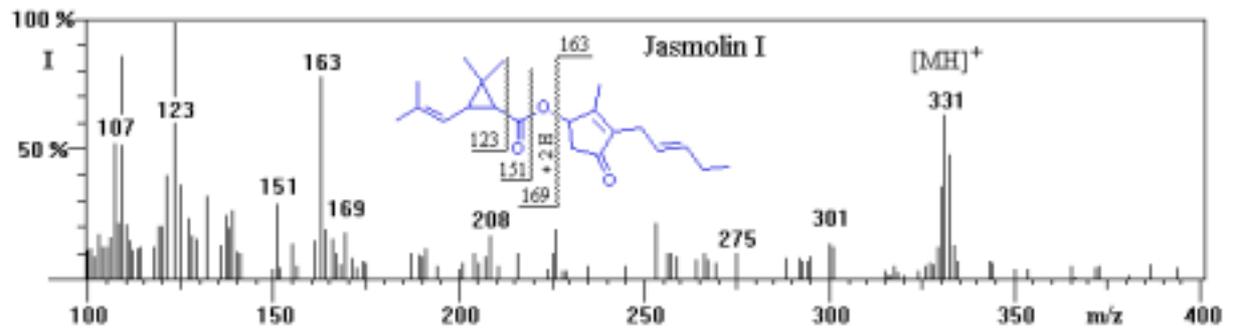


Abbildung 30: Massenspektrum von Jasmolin I unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

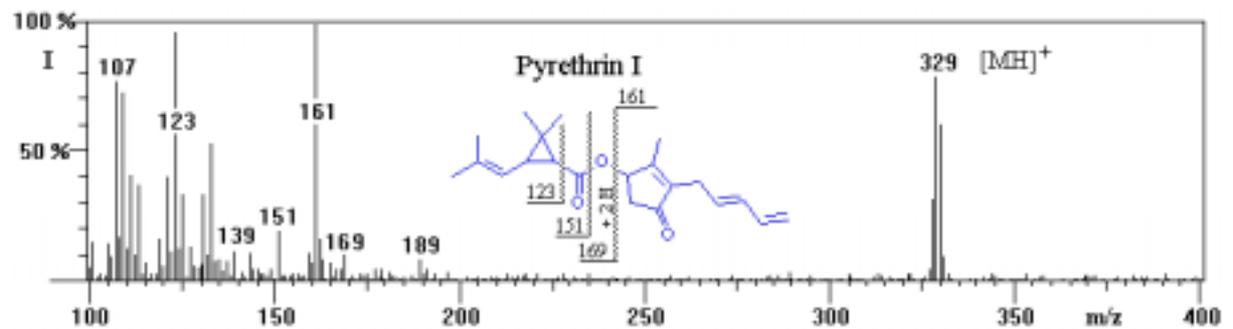


Abbildung 31: Massenspektrum von Pyrethrin I unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

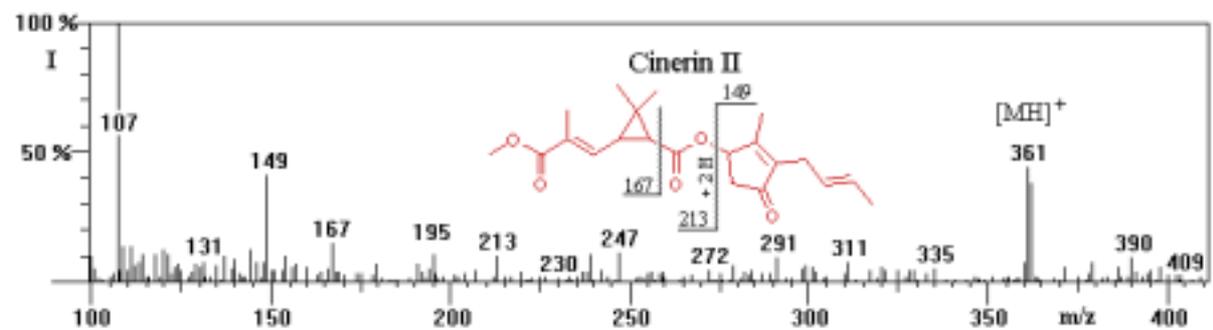


Abbildung 32: Massenspektrum von Cinerin II unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

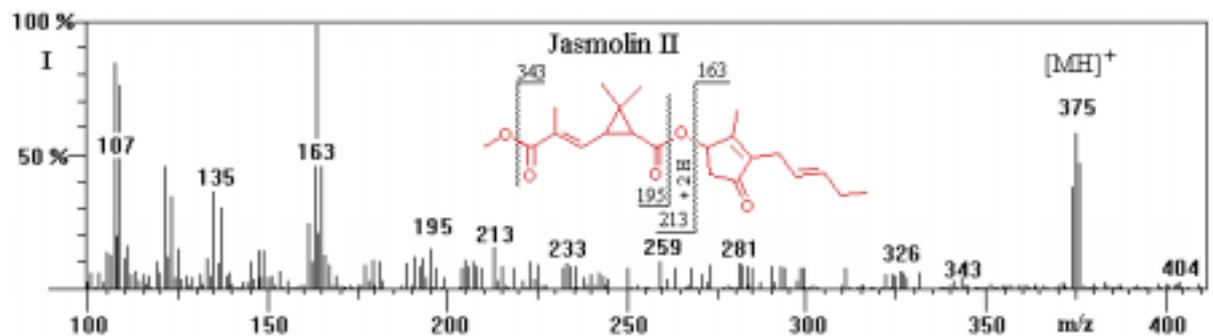


Abbildung 33: Massenspektrum von Jasmolin II unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

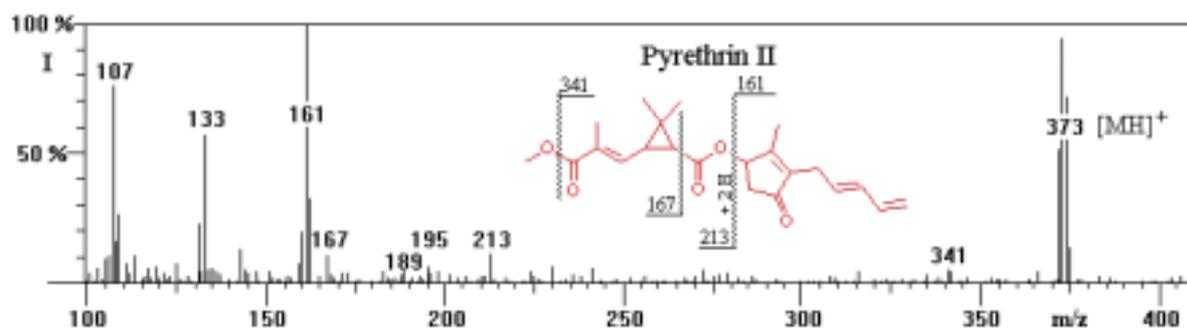


Abbildung 34: Massenspektrum von Pyrethrin II unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Die Spektren unter SFC-MS(PCI)-Bedingungen stimmen mit den unter GC-MS(PCI)-Bedingungen (vgl. Abb. 25, S. 38 und Abb. 26, S. 39) aufgenommenen in weiten Teilen gut überein. Die Säurekomponente der Chrysanthemate zerfällt in die drei charakteristischen Bruchstücke mit den Ionen  $m/z$  123, 151 und 169. Das Ion  $m/z$  169 stellt die protonierte Chrysanthemumsäure dar (Abb. 35).

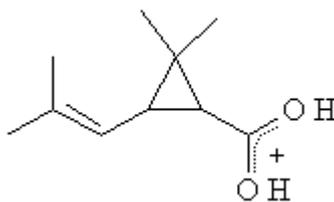


Abbildung 35: protonierte Chrysanthemumsäure ( $m/z$  169)

Die Protonierung einer Säure aus einem Ester führt durch doppelte McLafferty-Umlagerung zu einem Ion mit  $m/z$  60 [115]. Dieses Ion wurde bei GC-MS(EI) Messungen (Abb. 20, S. 35) nicht gefunden. Durch einmalige H-Umlagerung wird das Chrysanthemumäure-Kation  $m/z$  168 registriert. Somit ist die Entstehung des in Abbildung 35 aufgeführten Ions mit dem Mechanismus einer doppelten McLafferty-Umlagerung nicht zu erklären. Wahrscheinlich wird dieses Ion durch McLafferty-Umlagerung zur Säure und nachfolgender Protonierung durch  $\text{CH}_5^+$ -Ionen gebildet.

Auffällig sind die  $[\text{MH}]^+$ -Ionen mit hoher Intensität (50 – 95 %), die durch die milden Ionisationsbedingungen in der SFC verstärkt gebildet werden. Generell ist aber in der SFC ein höheres Untergrundrauschen zu verzeichnen, das auf Unreinheiten im  $\text{CO}_2$  und auf den hohen  $\text{CO}_2$ -Fluss zurückzuführen ist. Zudem sind neben Reaktionen mit Methan-Cluster auch solche

mit Kohlendioxid möglich, die zusätzliche Ionenbildungen ermöglichen. Denn als Reaktandgas wird neben Benzol, Stickstoff oder Argon auch Kohlendioxid eingesetzt. Bei diesen Stoffen erhält man Fragmentierungen durch Ladungs-Austauschreaktionen (charge exchange), die der Qualität eines EI-Spektrums vergleichbar sind [116]. Das Ionisierungspotential des Kohlendioxids beträgt 13,8 eV. Durch das angelegte Potential von 30 eV wird Kohlendioxid ionisiert, und es kann zu den genannten Ladungs-Austauschreaktionen kommen.

Abbildung 36 zeigt die untersuchten Pyrethroide im Totalionenstrom-SF-Chromatogramm. Hier kommt es ebenfalls wie bei den Pyrethrinen (Abb. 28, S. 45) durch die hohe Konzentration der Lösung (~ 1000 mg/l) zu Peakfronting. Zusätzlich ist die Substanztrennung zwischen Permethrin, Cypermethrin, Fenvalerat und Deltamethrin unzureichend. Bei Cypermethrin und Fenvalerat sind zwei Peaks zu erkennen, die durch Isomere hervorgerufen werden. Als erstes eluiert Allethrin ( $t_R = 34,35$  min) gefolgt von Phenothrin ( $t_R = 52,06$  min) und Permethrin ( $t_R = 57,58$  min). Die Retentionszeiten der beiden Cypermethrinpeaks betragen 59,05 min und 59,44 min. Fenvalerat besitzt einen Hauptpeak bei 61,15 min und einen kleineren bei 61,50 min. Als letztes wird Deltamethrin ( $t_R = 65,34$  min) detektiert.

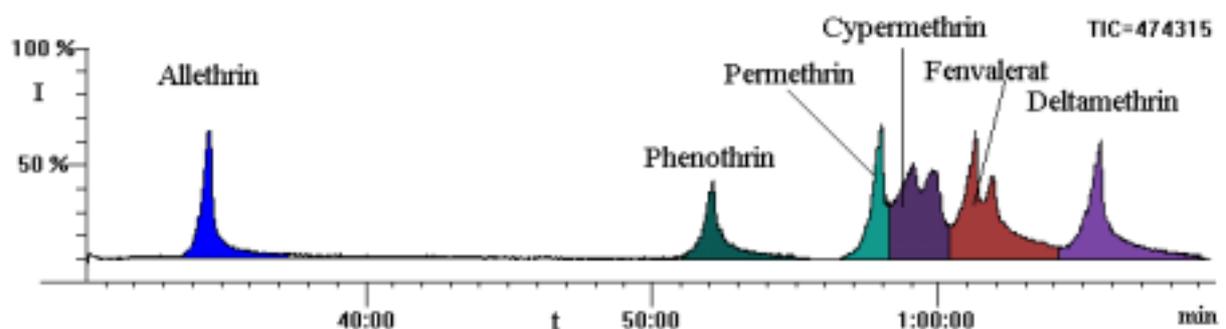


Abbildung 36: Totalionenstromchromatogramm von Pyrethroiden unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Allethrin (Abb. 37), ein synthetischer Chrysanthemumsäureester, fragmentiert gemäß dem beschriebenen Muster der Chrysanthemate. Der Alkoholteil bildet ein Ion  $m/z$  135 mit einer relativen Intensität von 100 %. Das  $[MH]^+$ -Ion ( $m/z$  303) besitzt eine Intensität von 30 %.

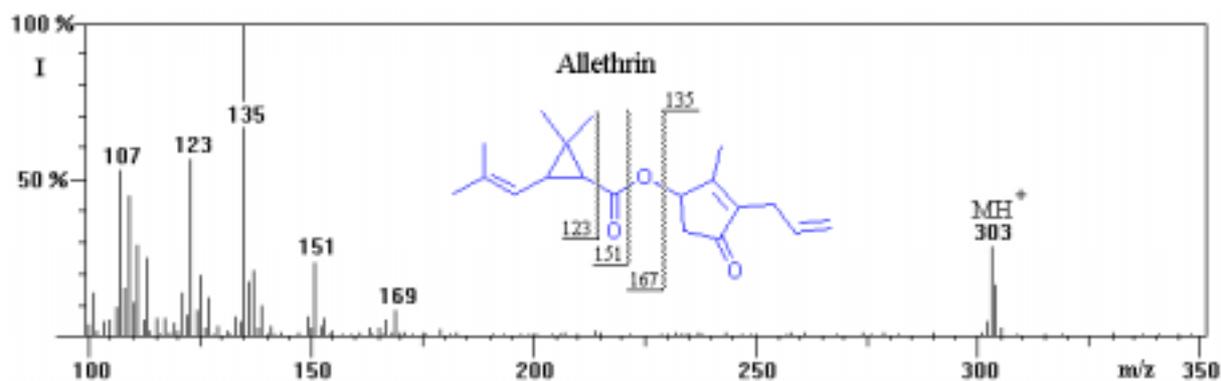


Abbildung 37: Massenspektrum von Allethrin unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Phenothrin, ebenfalls ein Ester der Chrysanthemumsäure, zeigt das der Chrysanthemumsäure typische Fragmentierungsmuster (Abb. 38).

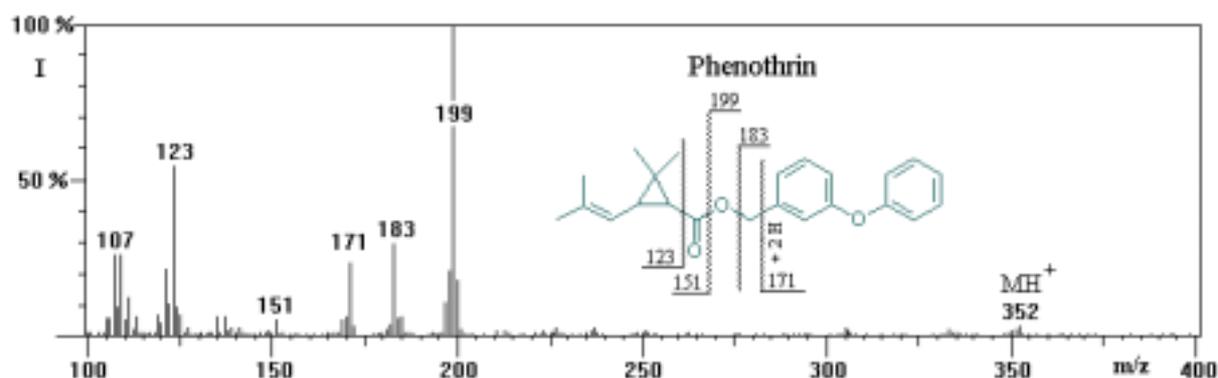


Abbildung 38: Massenspektrum von Phenothrin unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Auffallend ist die um den Faktor 4 geringere Intensität der Ionen  $m/z$  151 und 169 im Gegensatz zu Allethrin. Der Grund hierfür liegt in der geänderten Alkoholkomponente (Phenoxybenzylalkohol) des Esters. Dieser Arylalkohol unterdrückt die McLafferty-Umlagerung zur Säure und hemmt die Spaltung der OC-OR-Bindung. Die komplette Abspaltung der COOR-Gruppe vom Ester wird allerdings nicht beeinträchtigt ( $m/z$  123). Als Basision ist ein Ion mit  $m/z$  199 zu erkennen. Es wird von dem Phenoxybenzylalkohol gebildet. Unter Abspaltung des Sauerstoffs entsteht das Ion  $m/z$  183. Eliminiert man hiervon die  $CH_2$ -Gruppe, resultiert ein Ion mit  $m/z$  169. Dieses Ion besitzt im Massenspektrum lediglich eine rel. Intensität von 8 %. Durch Wasserstoffwanderung kann sich der energetisch günstigere Diphenylether ( $m/z$  170) bilden. Eine Intensität von 30 % besitzt allerdings ein Ion

$m/z$  171. Budzikiewicz postuliert eine Phenylwanderung beim Diphenylether zum 2-Phenylcyclohexandienon [117]. An dieses lagert sich wahrscheinlich ein Proton des Reaktantgases an, woraus das Ion  $m/z$  171 resultiert.

Permethrin (Abb. 39), ein Dichlor-Derivat des Phenothrins, besitzt als Basision das Fragment  $m/z$  183. Dies entspricht der Phenoxybenzyl-Komponente. Spaltet man von dieser eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe ab, resultiert daraus das oben beschriebene Ion  $m/z$  171. Die Esterspaltung führt zum Ion  $m/z$  199. Das Säureion ( $m/z$  191) besitzt eine rel. Intensität von nur 3 %.

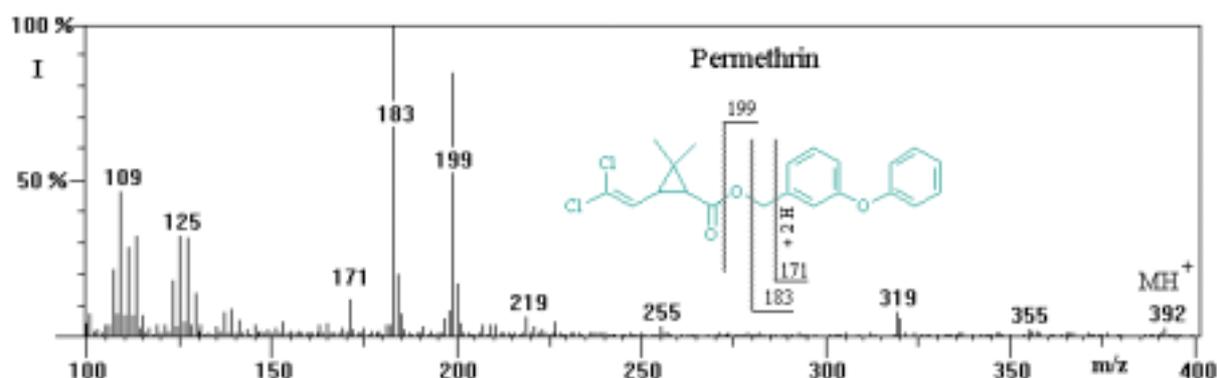


Abbildung 39: Massenspektrum von Permethrin unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Der  $[\text{MH}]^+$ -Peak wird bei  $m/z$  392 angezeigt. Deutlich sind Bruchstücke  $m/z$  319 und 355 zu erkennen. Diese sind mit der Abspaltung der einzelnen Chloratome vom Molekül zu erklären.

Cypermethrin ist ein Cyano-Derivat des Permethrins. In Abbildung 40 wird das Ion  $m/z$  224 von der Alkoholkomponente hervorgerufen.

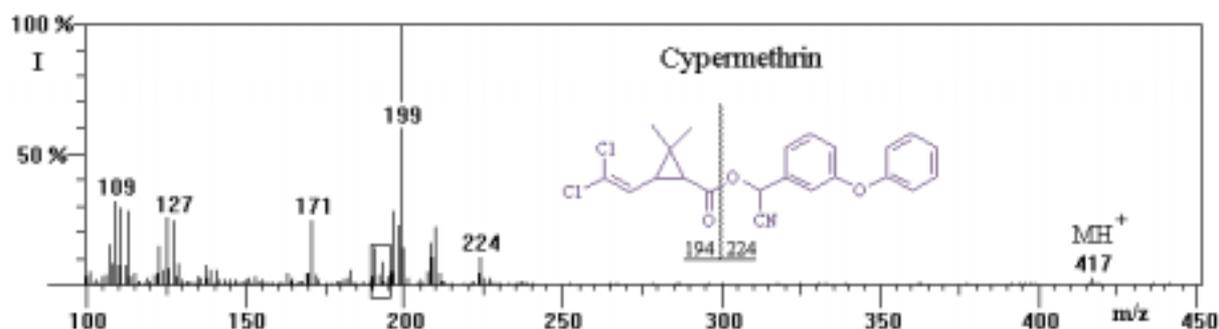


Abbildung 40: Massenspektrum von Cypermethrin unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Im Spektrum ist der Basispeak bei  $m/z$  199 zu erkennen. Dieser wird unter Abspaltung der Cyano-Gruppe von der Alkoholkomponente gebildet. Wird von dieser anstelle der Cyano-Gruppe ein Sauerstoffatom eliminiert, resultieren daraus Fragmente mit  $m/z$  208 – 210. Das  $[MH]^+$ -Ion befindet sich bei  $m/z$  417. Durch die Esterspaltung entsteht das Fragment  $m/z$  191. Abbildung 41 beinhaltet eine Ausschnittsvergrößerung des Cypermethrin-Massenspektrums von  $m/z$  190 bis 196.

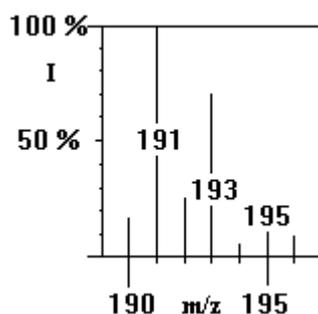


Abbildung 41: Massenspektrum von Cypermethrin ( $m/z$  190 – 196)

Das Fragmenttriolett  $m/z$  191, 193 und 193 stellt das Isotopenmuster der zwei Chloratome am Bruchstück  $m/z$  191 dar. Chlor kommt in der Natur als  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$  mit einer Häufigkeit von 75,77 % ( $^{35}\text{Cl}$ ) zu 24,23 % ( $^{37}\text{Cl}$ ) vor. Die Peakintensität ( $I_p$ ) lässt sich nach Gleichung 9 berechnen:

$$I_p = (i_{x_A} + i_{y_A})^n \quad (\text{Gl. 9})$$

mit  $i_{x_A}$ : relative Häufigkeit (%) des Halogenisotops ( $^{35}\text{Cl}$ )

$i_{y_A}$ : relative Häufigkeit (%) des Halogenisotops ( $^{37}\text{Cl}$ )

n: Anzahl der Halogenionen im Molekül.

Mit der natürlichen Häufigkeit der Chlorisotope von ca. 3:1 erhält man relative Intensitäten von 100 % bei  $m/z$  191, 66 % bei  $m/z$  193 und 11 % bei  $m/z$  195. Diese Intensitätsverteilung ist in Abbildung 41 zu erkennen. Das Isotopenmuster ist ebenfalls beim Permethrin (Abb. 39) zu beobachten.

Abbildung 42 zeigt das Massenspektrum von Fenvalerat. Dieses Pyrethroid weicht in seiner Struktur von der Reihe der Cyclopropancarboxylate ab. Fenvalerat ist ein Ester der  $\alpha$ -(4-

Chlorphenyl)-isovaleriansäure. Der  $[MH]^+$ -Peak ist bei  $m/z$  420 zu erkennen. Deutlich sind die Fragmente des Phenoxybenzylalkohols ( $m/z$  171, 183, 199, 208 und 224) aufgezeigt. Das Ion  $m/z$  167 besitzt eine Intensität von 67 %. Es wird durch die Abspaltung der COOR-Gruppe von der Säurekomponente gebildet.

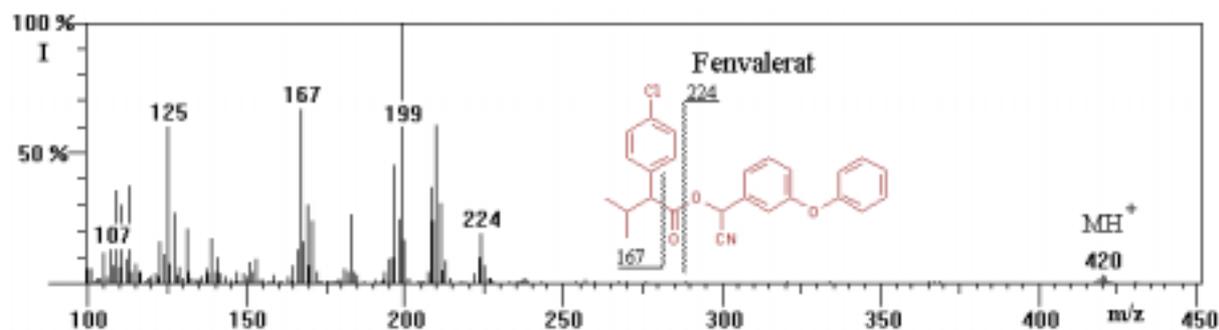


Abbildung 42: Massenspektrum von Fenvalerat unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

In Abbildung 43 ist das Massenspektrum von Deltamethrin illustriert. Der  $[MH]^+$ -Peak befindet sich bei  $m/z$  506. Das Fragmentquintett des Phenoxybenzylalkohols ( $m/z$  171, 183, 199, 208 und 224) wird, wie in den Abbildungen 38 und 39, mit ähnlichen Intensitäten bestätigt.

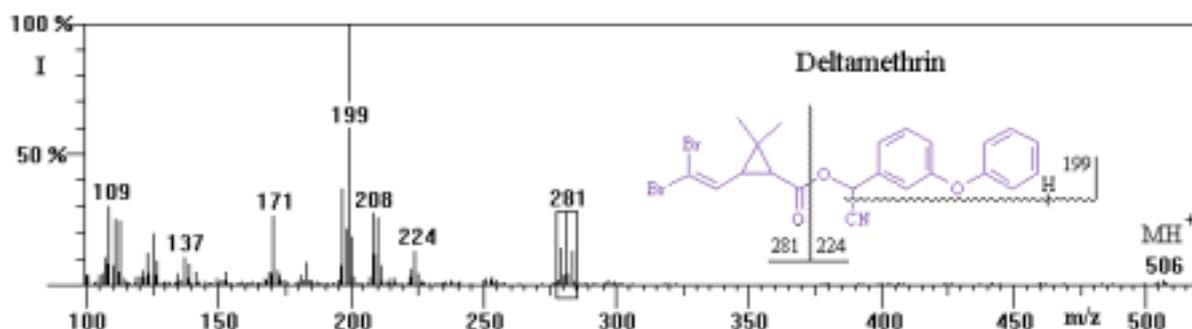


Abbildung 43: Massenspektrum von Deltamethrin unter Anwendung von SFC-MS(PCI)

Die Säurekomponente ruft ein Peak-Triplett ( $m/z$  179, 181 und 183) hervor. Dieses Triplett ist das Fragmentierungsmuster eines Ions mit zwei Bromatomen. Die natürliche Isotopenhäufigkeit von  $^{79}\text{Br}$  beträgt 50,5 % und die von  $^{81}\text{Br}$  49,5 %. Durch Einsetzen in Gleichung 9 erhält man ein Isotopenmuster des halogenierten Säurefragments mit Intensitäten

$m/z$  279 von 51 %,  $m/z$  281 von 100 % und  $m/z$  283 mit 49 %. Diese Berechnungen werden in Abbildung 44 belegt.

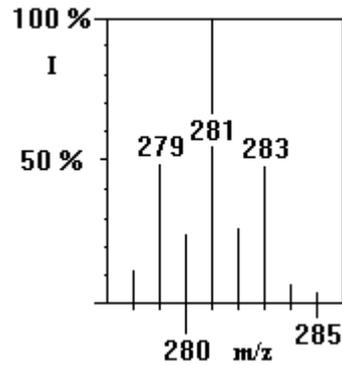


Abbildung 44: Massenspektrum von Deltamethrin ( $m/z$  278 – 285)

Da in Kapitel 3.2 die Trennung von Paraffinen durchgeführt wurde, sollte die Fragmentierung einiger Alkane mittels SFC-MS(PCI) untersucht werden.

Abbildung 45 zeigt ein Totalionenstrom-SF-Chromatogramm von n-Eicosan, n-Docosan und n-Tetracosan unter den optimierten PCI-Bedingungen.

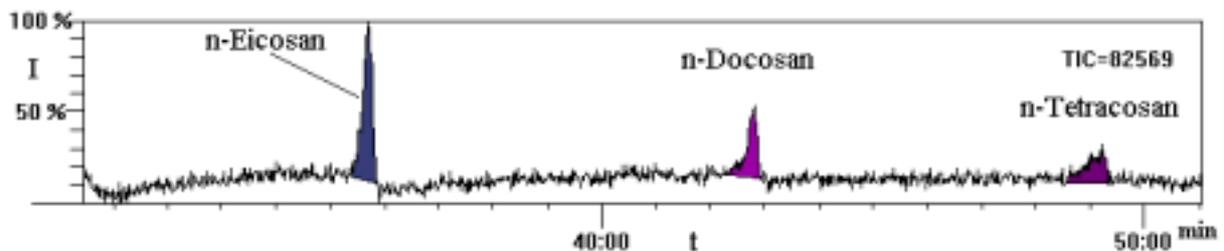


Abbildung 45: Totalionenstromchromatogramm von Alkanen unter Anwendung von (SFC-MS(PCI))

In Abbildung 46 sind die Massenspektren der in Abbildung 45 chromatographierten Alkane illustriert.

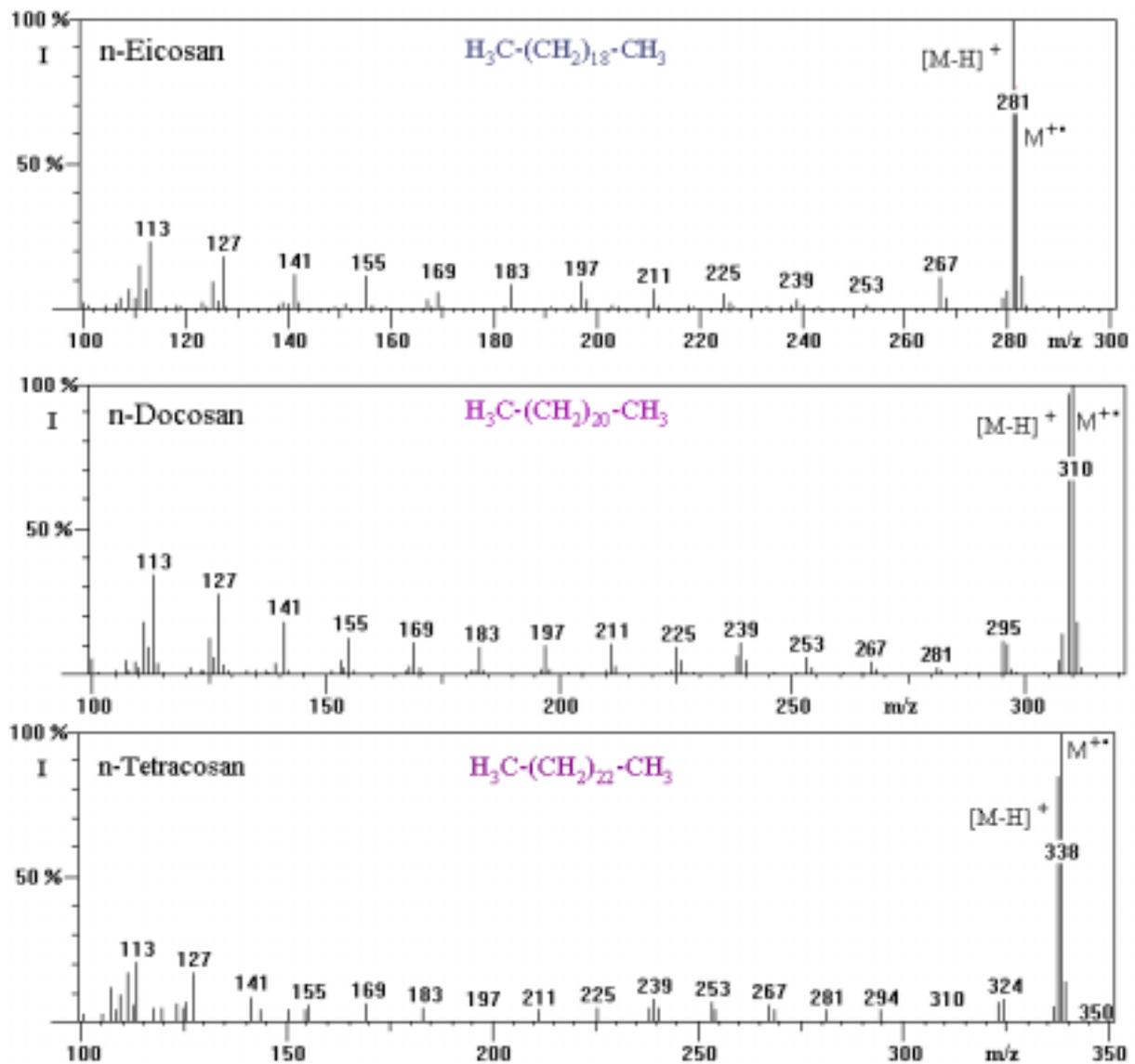


Abbildung 46: Massenspektren einiger Alkane unter Anwendung von (SFC-MS(PCI))

Aufgrund der geringen Protonenaffinität der Alkane werden diese nicht protoniert. Es wird kein  $[\text{MH}]^+$ -Ion gebildet. An Stelle dessen tritt eine Hydrid-Abstraktion unter Bildung eines  $[\text{M}-\text{H}]^+$ -Ions ein. Neben der Hydrid-Abstraktion ist eine Ladungsaustausch-Reaktion unter Bildung eines  $\text{M}^{+\bullet}$ -Ions zu beobachten. Diese Massen besitzen eine Intensität von 80 – 100 %. Deutlich sind Bruchstücke der Reihe von  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$ -Ionen zu erkennen, die charakteristisch für unverzweigte Alkane sind. Weniger ausgeprägt sind  $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$ -Ionen, die bei n-Eicosan und n-Docosan in einem Intervall von  $m/z$  113 bis 169 auftreten.

### 3.4.2.3 Diskussion

Die Experimente zeigen, dass eine SFC-MS(PCI)-Kopplung möglich ist. Die untersuchten Pyrethrine, Pyrethroide und Paraffine konnten anhand der Massenspektren eindeutig zugeordnet werden. Der  $[MH]^+$ -Peak ist bei den Pyrethrinen, Alkanen und Allethrin mit über 30 - 90 % Intensität sehr hoch. Im Gegensatz dazu besitzen die Molekülpeaks der übrigen Pyrethroide eine Intensität  $< 5$  %. Allgemein ist festzustellen, dass der Basispeak der Insektizide von einem Fragment der Alkoholkomponente hervorgerufen wird. Dabei wird das Basision der Pyrethrine, des Allethrins und des Permethrins von einem Bruchstück hervorgerufen, das auf der COO-R-Spaltung der Alkoholkomponente basiert. Der Basispeak der übrigen Pyrethroiden ( $m/z$  199) rührt vom Fragment der Esterspaltung her. Die Pyrethroide mit Cyano-Gruppe verursachen durch die Fragmentierung des Alkohols ein charakteristisches Peakquintett ( $m/z$  171, 183, 199, 208 und 224). Die beiden anderen Insektizide mit Phenoxybenzylalkoholkomponente besitzen ein Peaktriolett ( $m/z$  171, 183 und 199).

Die Möglichkeit der qualitativen Analyse ist somit gewährleistet. Der Geräteaufwand ist enorm hoch, wobei die Empfindlichkeit allerdings gering ist. Eine quantitative Bestimmung der Analyten ist aufgrund der hohen Konzentrationen und der daraus resultierenden Säulenüberladung mit einhergehender Peakasymmetrie oder unzureichender Substanztrennung nicht durchführbar.

### 3.5 Einfluss des Kopfgases von Kohlendioxid auf die Chromatographie

Bei den meisten auf dem Markt befindlichen Geräten ist über der zu entnehmenden Flüssigphase des Kohlendioxids in der Gasflasche ein Heliumstützdruck notwendig, damit die in den Geräten verwendeten Pumpen ohne Zusatzkühlung der Pumpenköpfe das flüssige Kohlendioxid optimal fördern. Helium wird zum Aufbau des Stützdrucks deshalb verwendet, weil man davon ausgeht, dass damit die Extraktion bzw. Chromatographie mit überkritischem Kohlendioxid am wenigsten beeinflusst wird. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde jedoch auf einen erheblichen Einfluss des abnehmenden Füllstandes der Flüssigphase und des damit sinkenden Helium-Stützdrucks auf die Lösemitteleigenschaft von Kohlendioxid hingewiesen. Daraus resultierten geringere Ausbeuten in der Extraktion bzw. Verschiebungen in der Retentionszeit der Analyten in der Chromatographie [118, 119].

#### 3.5.1 Experimentelles

Es wurde untersucht, ob Kohlendioxid (SFE-Qualität) der Fa. AGA mit verschiedenen Kopfgasen eine Auswirkung auf die SFC hat. Die Spritzenpumpe des MPS/225 wurde mit 30 ml Kohlendioxid, welches Helium, Argon oder Stickstoff als Kopfgase beinhaltete, befüllt. Der Flaschendruck mit He-Druckbeaufschlagung betrug 15,0 MPa, der mit Ar 11,8 MPa und der mit N<sub>2</sub> 12,0 MPa. Eine Probe von Allethrin in n-Hexan diene als Testlösung.

#### 3.5.2 Ergebnisse

In Abbildung 47 sind drei Chromatogramme des Pyrethroids Allethrin illustriert, die mit überkritischem Kohlendioxid verschiedener Kopfgase aufgenommen wurden. In der Literatur [120] wird beschrieben, dass sich Helium besser als Argon oder Stickstoff in flüssigem Kohlendioxid löst.

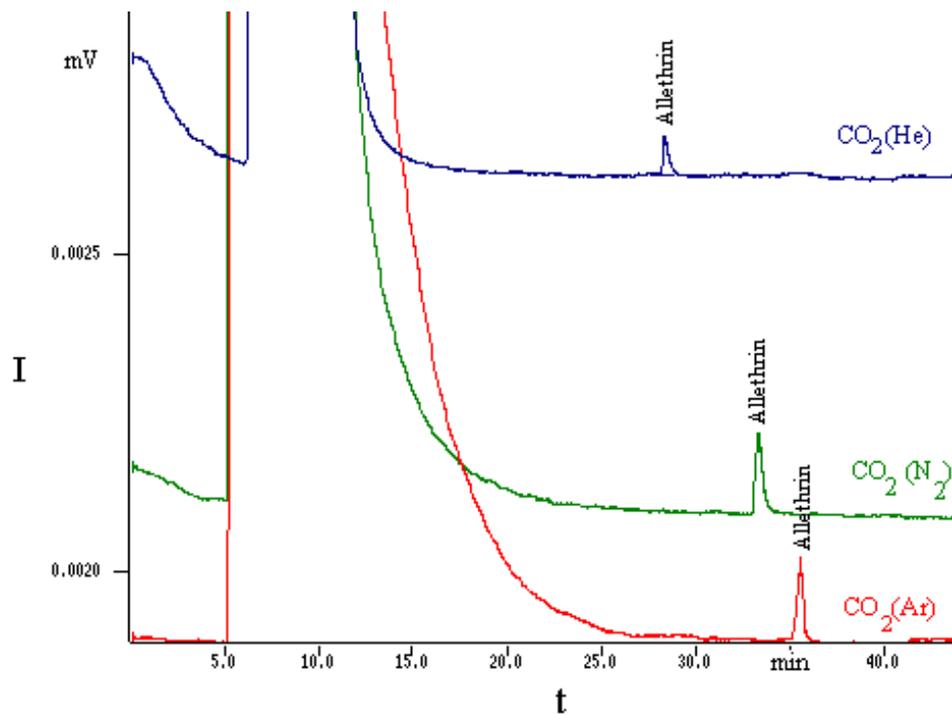


Abbildung 47 : Unterschied der Retentionszeiten unter Verwendung von  $\text{CO}_2$  mit verschiedenen Kopfgasen

Es zeigt sich, dass die Retentionszeit des Allethrins bei der He-Druckbeaufschlagung am kürzesten ist. Der Mittelwert beträgt 28,33 min mit einer relativen Abweichung von 1,8 %. Der Mittelwert der Retentionszeit mit  $\text{N}_2$ -Kopfgas beträgt 33,37 min (1,0 %) und der mit Ar-Kopfgas 35,70 min (3,8 %).

Ein Grund für diese Tatsache könnte sein, dass die Löslichkeit des Allethrins in Kohlendioxid geringer wird, obwohl sich weniger Argon oder Stickstoff in der mobilen Phase befindet. Ein Maß für die Löslichkeit eines Stoffes in der mobilen Phase ist der Kapazitätsfaktor ( $k'$ ). In ihr wird die Verteilung eines Stoffes in stationärer und mobiler Phase berücksichtigt. Eine Änderung der Löslichkeit bei unterschiedlichen Kopfgasen könnte die größeren Retentionszeiten erklären. Trägt man das Molekulargewicht der Kopfgase gegen die Retentionszeiten auf (Abb. 48), so resultiert bei der Verknüpfung der Datenpunkte eine Gerade. Dies mag zum einen Zufall sein, zum anderen könnte es aber auch auf eine Gesetzmäßigkeit hinweisen, bei der das Molekulargewicht der Kopfgase in linearer Abhängigkeit zu den Retentionszeiten steht. Hierbei könnte die Molekülgröße der Gase ein entscheidendes Kriterium für die Linearität darstellen.

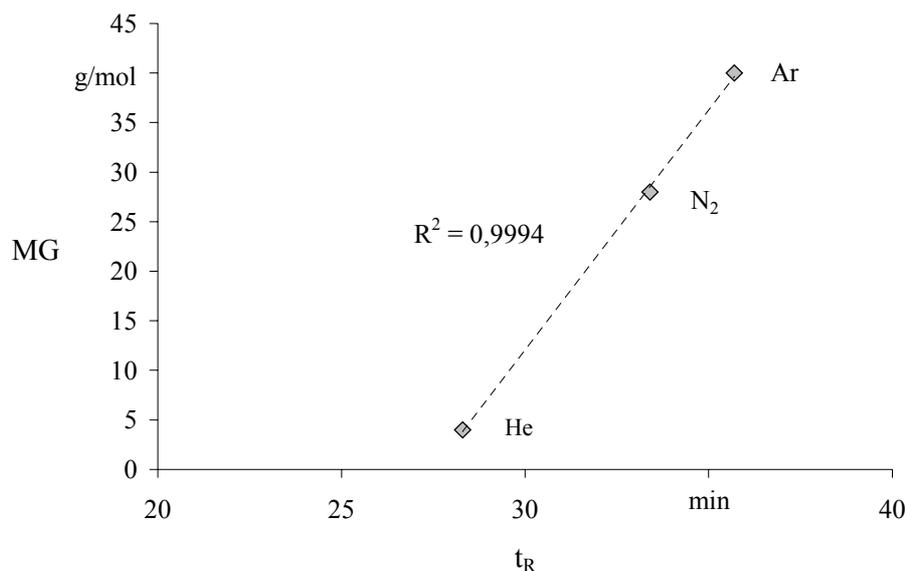


Abbildung 48: Auftragung von Molekulargewicht (MG) der Kopfgase vs. Retentionszeit ( $t_R$ )

In den Untersuchungen von Hinz und Wenclawiak [93] konnten mehr FID-aktive Substanzen im Kohlendioxid mit Argon und Stickstoff-Druckbeaufschlagung analysiert werden als im CO<sub>2</sub> mit Helium. Evtl. hat dies ebenfalls eine Auswirkung auf die Retentionszeiten. Möglicherweise beeinträchtigen diese Verunreinigungen die Löslichkeit des Allethrins in Kohlendioxid. Auffällig sind aber auch die unterschiedlichen Retentionszeiten und Peakformen der Lösemittelpeaks. Die Durchbruchzeit im Chromatogramm mit Kohlendioxid und Helium-Kopfgas beträgt 6,0 Minuten und ist ca. eine Minute später als in den beiden übrigen Chromatogrammen. Im Chromatogramm, in dem Kohlendioxid mit Helium-Druckpolster verwendet wurde, endet das Tailing des Lösemittelpeaks nach ca. 16 Minuten. Die Basisbreite des Lösemittelpeaks wird mit 10 Minuten angegeben. Die Basisbreite mit Stickstoff-Druckpolster beträgt ca. 15 Minuten und die mit Argon-Druckpolster 20 Minuten. Hier könnten ebenfalls Verunreinigungen oder die verwendeten Kopfgase im Kohlendioxid der Grund für diese Beobachtungen sein.

In den hier beschriebenen Experimenten wurde das Retentionsverhalten einer Substanz mit überkritischem Kohlendioxid und unterschiedlichen Kopfgasen getestet.

Wilson untersuchte in seinen Arbeiten u.a. das Retentionsverhalten von Benzol in n-Pentan unter Anwendung verschiedener überkritischer Fluide [121]. Er verwendete Kohlendioxid und den als Kopfgas eingesetzten Stickstoff. Die kritischen Daten von Stickstoff befinden sich bei einem Druck ( $p_c$ ) von 3,4 MPa und einer Temperatur ( $T_c$ ) von  $-147$  °C. Die Dichte am

kritischen Punkt beträgt 0,133 kg/l. Es zeigte sich, dass die Retentionszeiten bei gleichen chromatographischen Bedingungen (p: 10 MPa, T: 105 °C, Säule: gepackte Säule: ID 4 mm, L: 120 mm, Phase: RP 18) stark differierten. Abbildung 49 zeigt zwei Chromatogramme von Benzol in n-Pentan (2000 ppm) bei unterschiedlichen überkritischen Fluiden.

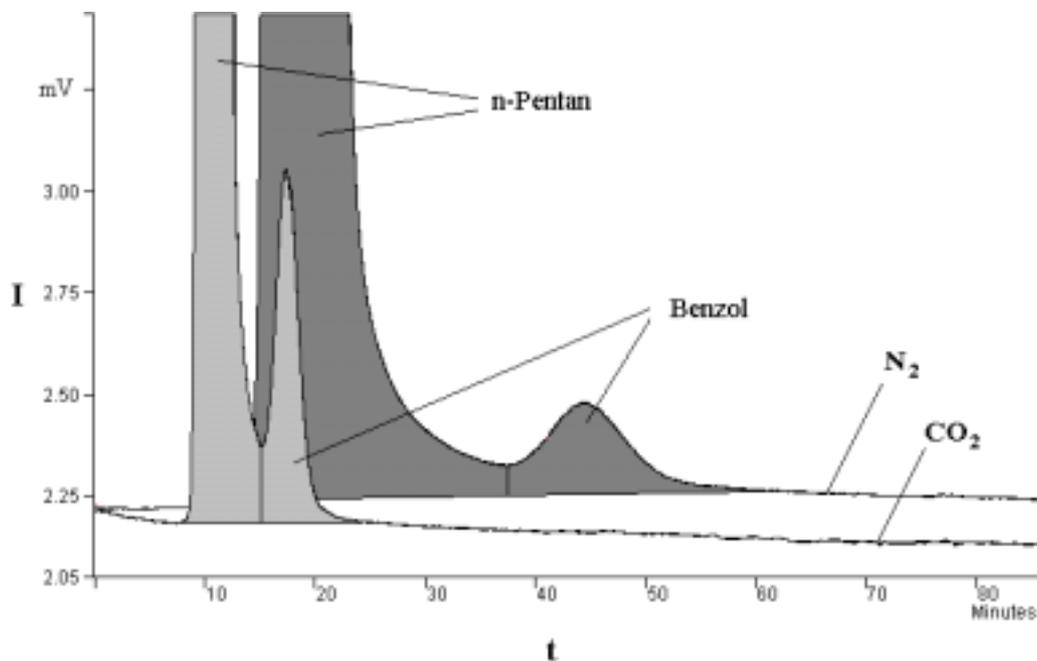


Abbildung 49: Chromatogramme von Benzol in n-Pentan (2000 ppm) unter Anwendung von überkritischem CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> als mobile Phase; p: 10 MPa, T: 105 °C

Die Peaks in den Chromatogrammen weisen aufgrund der hohen Konzentration ein ausgeprägtes Tailing auf. Der Benzol-Peak befindet sich in beiden Chromatogrammen in der Schulter des Lösemittel-Peaks. Die Durchbruchzeit im CO<sub>2</sub>-Chromatogramm beträgt 10,50 Minuten und die Retentionszeit des Benzols 17,39 Minuten. Der Kapazitätsfaktor ( $k'$ ) beträgt 0,66. Im Gegensatz dazu ist die Durchbruchzeit im N<sub>2</sub>-Chromatogramm um 7,9 Minuten länger. Das Benzol eluiert nach 44,33 Minuten. Daraus wurde ein Kapazitätsfaktor von 1,41 errechnet. Ein  $k'$ -Wert größer als 1 deutet auf eine stärkere Interaktion des Analyten mit der stationären als mit der mobilen Phase hin. Die Löslichkeit der Substanz ist demnach in der stationären Phase höher als in der mobilen. Das geschilderte Experiment zeigt, dass sich der untersuchte Stoff bei den genannten Bedingungen gut in reinem überkritischem Kohlendioxid löst ( $k' = 0,66$ ). Die Löslichkeit von Benzol in überkritischem Stickstoff kann allerdings als gering eingeschätzt werden. Durch die Anwendung des Kopf-gases entsteht ein Gemisch von

z.B. Stickstoff in Kohlendioxid. Dies könnte die Löslichkeit der Analyten herabsetzen und so die Retentionszeiten (vgl. S. 58) verlängern.

Ein Indiz für das Vorhandensein von Helium in Kohlendioxid wurde durch die Veränderung der Retentionszeiten ( $t_R$ ) verschiedener Analyten bereits beschrieben [122]. Die Verwendung des von der Fa. Linde entwickelten Flaschenventils soll einen konstanten Flaschendruck (bis 15 MPa) gewährleisten und die Diffusion des Heliums in das Kohlendioxid minimieren. Dabei wurde eine Gasflasche mit flüssigem Kohlendioxid über das Linde-Flaschenventil mit einer Gasflasche, die Helium beinhaltet, verbunden.

Um den Einfluss des Kohlendioxids mit verschiedenen Helium-Stützdrücken auf die Chromatographie mit überkritischen Gasen unter Anwendung eines Druckprogramms zu untersuchen, wurden Messungen mit 7, 8 und 10 MPa Druckbeaufschlagung durchgeführt. Das MPS/225 diente als SFC-System. In die Spritzenpumpe wurden 30 ml Kohlendioxid mit den unterschiedlichen Helium-Vordrücken gefüllt. Die Equilibrierungszeit betrug 2 Stunden. Es wurden jeweils 5 Chromatogramme eines Allethrin-Pyrethrin-Standards unter Anwendung eines Druckprogramms aufgezeichnet (Abb. 50).

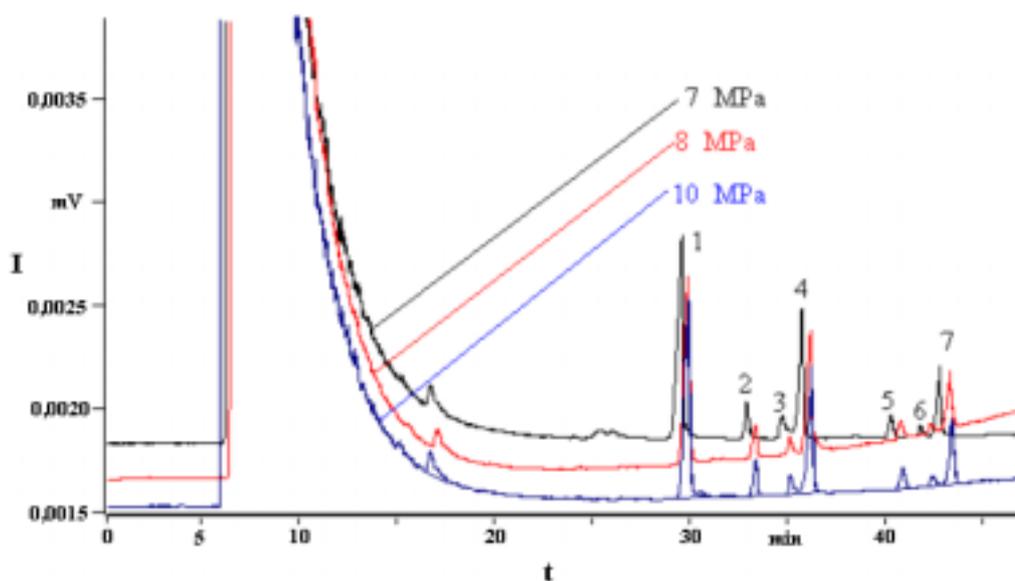


Abbildung 50: Vergleich von SF-Chromatogrammen bei unterschiedlichen He-Vordrücken von 7, 8 und 10 MPa unter Anwendung eines Druckprogramms

Die Druckprogrammierung erfolgte von 11 MPa mit einer Rate von 0,2 MPa/min auf 22 MPa. In Abbildung 50 sind Chromatogramme von Substanzen unter Verwendung der drei verschiedenen Helium-Vordrucke illustriert. Im Vergleich der Retentionszeiten ist eine

geringfügig kürzere Elutionszeit der Analyten bei einem Vordruck von 7 MPa erkennbar. Aus den Ergebnissen resultiert, dass die Retentionszeiten der Substanzen bei gleichem Vordruck um maximal 0,90 min differieren. Dies bedeutet eine relative Standardabweichung von 0,85 %. Die Mittelwerte der drei Drucke weichen nicht mehr als 0,5 % voneinander ab. Vergleicht man in den drei Chromatogrammen die Retentionszeiten des Peaks Nr. 7, so wird eine Retentionszeit bei einem Vordruck von 7 MPa von 42,50 min, bei 8 MPa von 43,20 min und bei 10 MPa von 43,40 min gemessen. Hieraus kann abgeleitet werden, dass bei höherem Vordruck mehr Kopfgas (Helium) im Kohlendioxid gelöst wird. Dies hat eine Verlängerung der Retentionszeit zur Folge, wie in der Literatur [121] postuliert wurde.

### 3.5.3 Diskussion

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Kopfgase (Helium, Stickstoff und Argon) einen Einfluss auf die Chromatographie ausüben, indem sie die Retentionszeiten der Substanzen variieren. Dabei werden sowohl das gelöste Gas im Kohlendioxid wie auch Verunreinigungen als Grund für die unterschiedlichen Retentionszeiten angenommen. Aufgrund dessen wurde in den nachfolgenden Experimenten Kohlendioxid mit Helium-Druckbeaufschlagung eingesetzt. Ein steigender Helium-Stützdruck in der Kohlendioxid-Flasche hat eine Verlängerung der Retentionszeit zur Folge. Da über einen längeren Zeitraum der Vordruck in den Kohlendioxid-Flaschen durch stetige Entnahme sank, sind die Retentionszeiten der untersuchten Pestizide nur innerhalb eines Monats konstant. Eine ständige Kontrolle der Retentionszeiten und der Einsatz eines internen Standards ist daher unerlässlich.

### 3.6 SF-Chromatographische Kenndaten von Pyrethrinen und Pyrethroiden

Unter validierenden Gesichtspunkten werden in diesem Abschnitt chromatographische Kenndaten für die untersuchten Pestizide ermittelt.

In Abbildung 51 ist ein SF-Chromatogramm von Allethrin und Pyrethrinen dargestellt.

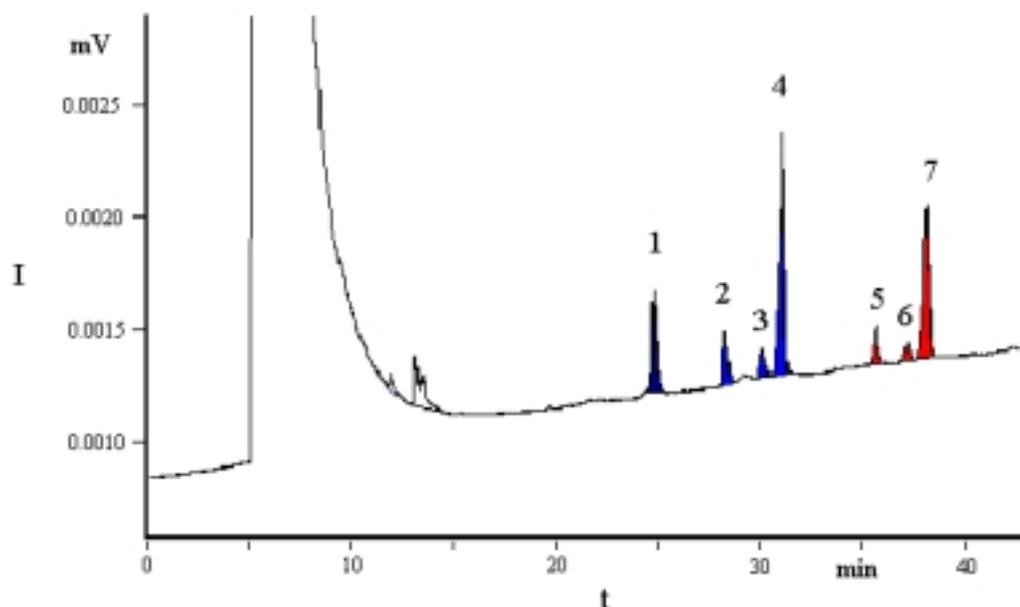


Abbildung 51: SF-Chromatogramm von Pyrethrinen und Allethrin unter Anwendung eines positiven Druckgradienten: von 11 MPa mit 0,2 MPa/min bis 24 MPa; Ofentemperatur: 110 °C; FID-Temperatur: 325 °C

Die Analyten sind basisliniengetrennt. Die Elutionsreihenfolge in der SFC wird von der Löslichkeit und dem binären Diffusionskoeffizient ( $D_{12}$ ) der Analyten bestimmt [123, 124]. Neben Temperatur und Polarität beeinflussen Molekulargewicht und die Molekülgröße den Diffusionskoeffizient. Daher eluiert Allethrin (1) mit dem niedrigsten Molekulargewicht als erstes, gefolgt von den Chrysanthematen (2, 3, 4) und Pyrethraten (5, 6, 7). In beiden Gruppen wird Cinerin (2 und 5) als erstes detektiert. Eine Umkehr der Elutionsreihenfolge tritt bei Jasmolin I (3) und Pyrethrin I (4) wie auch bei Jasmolin II (6) und Pyrethrin II (7) auf. Aufgrund des Molekulargewichtes von Pyrethrin I (328 g/mol) und II (372 g/mol) ist von diesen ein Eluieren vor Jasmolin I (330 g/mol) und II (374 g/mol) zu erwarten. Dies wird allerdings nicht beobachtet. Der Grund lässt sich mit der zusätzlichen konjugierten Doppelbindung in Pyrethrin I und II erklären (Abb. 1), die eine stärkere Wechselwirkung mit

der stationären Phase (DB5) zur Folge haben. Daher werden Pyrethrin I und II länger auf der Trennsäule retadiert als Jasmolin I und II.

Tabelle 5 illustriert die chromatographischen Kenndaten der in Abbildung 50 aufgeführten Analyten.

Tabelle 5: Chromatographische Kenndaten von Allethrin und den Pyrethrinen in der SFC

Ziffer	Substanz	$k'$	$N_{\text{theor}}$	$H_{\text{theor}}$ (mm)	$\alpha$	$R_S$
1	<b>Allethrin</b>	3,07	67100	0,134	1,19	8,44
2	<b>Cinerin I</b>	3,64	66200	0,136		
3	<b>Jasmolin I</b>	3,94	71200	0,126	1,08	4,05
4	<b>Pyrethrin I</b>	4,11	73900	0,122	1,04	2,24
5	<b>Cinerin II</b>	4,85	122100	0,074	1,18	10,46
6	<b>Jasmolin II</b>	5,10	134300	0,067	1,05	3,78
7	<b>Pyrethrin II</b>	5,27	101900	0,088	1,02	2,23

Die im Chromatogramm aufgeführten Ziffern werden in der Tabelle den Substanzen zugeordnet. Die theoretischen Bodenzahlen befinden sich in einem Bereich von 66000 (Cinerin I) bis 134000 (Jasmolin II). Dabei lassen sich Chrysanthemate und Pyrethrate in zwei Gruppen aufteilen. Während die Chrysanthemate einschließlich Allethrin Bodenzahlen zwischen 66000 und 73000 besitzen, liegen die Bodenzahlen für die Pyrethrate in einem Bereich von 102000 bis 134000.

Die quantitative Analyse fordert für die Auflösung ( $R_S$ ) einen Minimalwert von 1,5 [125]. Dieser Wert wird, wie aus der Tabelle ersichtlich, stets übertroffen.

Abbildung 52 zeigt ein SF-Chromatogramm der in Kapitel 1.3 vorgestellten Pyrethroide. Die Elutionsreihenfolge entspricht dem Anstieg des Molekulargewichtes. Erwähnenswert ist die Existenz von Doppelpeaks bei Cypermethrin und Fenvalerat. Diese Peaks werden von cis/trans-Isomeren der entsprechenden Substanzen hervorgerufen [96].

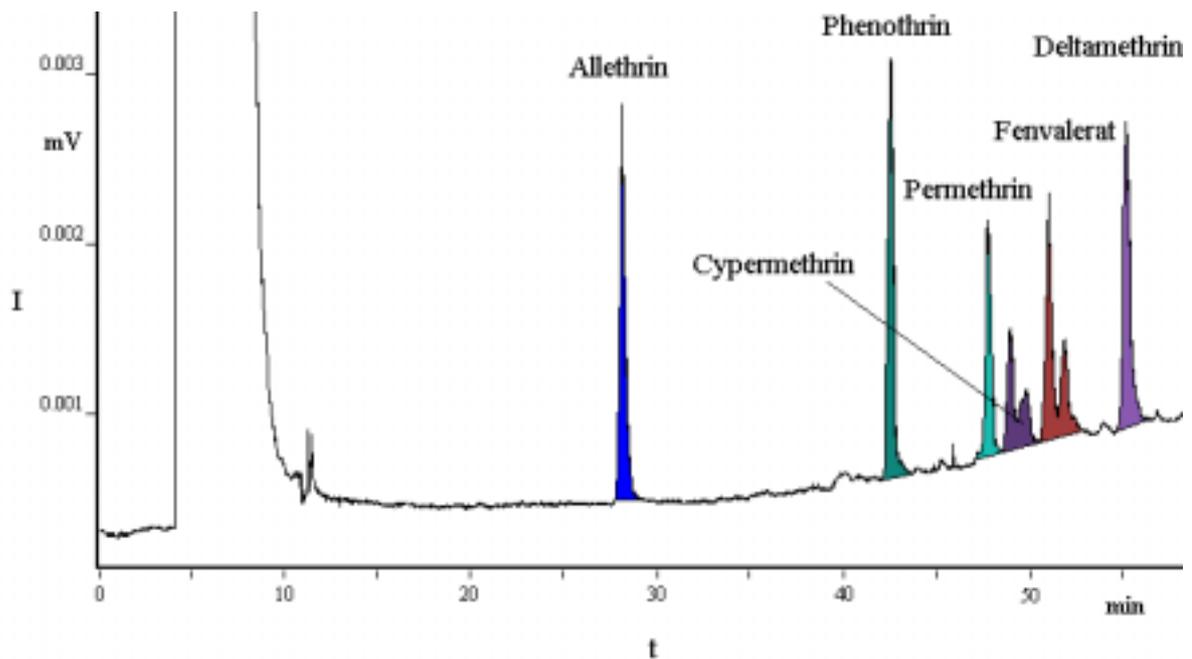


Abbildung 52: SF-Chromatogramm von Pyrethroiden unter Anwendung eines positiven Druckgradienten: von 11,1 MPa mit 0,2 MPa/min bis 24,3 MPa; Ofentemperatur: 110 °C; FID-Temperatur: 325 °C

In Tabelle 6 sind die chromatographischen Kenndaten der Pyrethroide unter Anwendung der SFC aufgelistet.

Tabelle 6: Chromatographische Kenndaten von 6 Pyrethroiden in der SFC

Substanz	$k'$	$N_{\text{theor}}$	$H_{\text{theor}}$ (mm)	$\alpha$	$R_S$
Allethrin	4,99	47500	0,190	1,56	25,61
Phenothrin	7,78	106400	0,085	1,14	9,83
Permethrin	8,87	119500	0,075	1,03	2,00
Cypermethrin 1	9,10	112900	0,080	1,02	0,92
Cypermethrin 2	9,27	27400	0,328	1,03	1,39
Fenvalerat 1	9,53	118000	0,076	1,02	1,25
Fenvalerat 2	9,70	79200	0,114	1,07	4,71
Deltamethrin	10,39	106700	0,084		

---

Die theoretischen Bodenzahlen der einzelnen Substanzen befinden sich innerhalb eines Bereiches von 48000 (Allethrin) bis 118000 (Fenvalerat 1). Für den zweiten Cypermethrinpeak wird eine Bodenzahl von 27000 berechnet. Dieser Peak zeigt ein starkes Fronting. Genauere Betrachtungen zeigen, dass dieser Peak einen zusätzlichen Isomerenpeak beinhaltet, der durch die Varian-Software nicht separat integriert wird.

Eine quantitative Bestimmung ist unter Berücksichtigung der Auflösung durchführbar. Eine Einschränkung besteht in der gleichzeitigen Quantifizierung von Cypermethrin und Fenvalerat.

### 3.7 Quantitative Analyse von Pyrethroiden und Pyrethrinen

Wie in der Literatur beschrieben [126, 127], wird der Gehalt von Pyrethrinen in Pyrethrum-Extrakten mit verschiedenen Methoden bestimmt. Wenclawiak et al. beschrieben eine Quantifizierungsmethode, indem eine Umesterungsreaktion an den Pyrethrinen in überkritischem Kohlendioxid durchgeführt wurde. Die entstandenen Produkte wurden mittels GC-MSD analysiert [55]. Gewöhnlich wird der Gesamtpyrethringehalt und das Verhältnis zwischen Chrysanthematen zu Pyrethraten ermittelt. Die Bestimmung der Einzelgehalte aller sechs insektizid wirksamen Substanzen in Chrysanthematen ist schwierig. Ein Grund dafür ist die Nichtexistenz einzelner Pestizidstandards, da sie durch UV-Strahlung, Sauerstoff und Wasser schnell zerstört werden [25]. Zudem ist eine aufwendige Synthese der Einzelsubstanzen unwirtschaftlich.

In der Chromatographie werden Gehaltsbestimmungen in der Regel durch Kalibrierung mit externem Standard, internem Standard und Additionsverfahren durchgeführt [128, 129]. Der Einsatz eines internen Standards besitzt den Vorteil, dass Probenverluste während der Analyse unberücksichtigt bleiben. In allen drei Verfahren muss die zu analysierende Einzelkomponente als Reinsubstanz vorhanden sein.

Bei der Quantifizierung verschiedener Substanzen umgeht man das Problem der Einzelbestimmung mit unterschiedlichen Methoden.

In der PCB-Analytik mit GC-ECD werden die sechs wichtigsten der 209 PCB-Kongener qualitativ und quantitativ bestimmt. Multipliziert man diesen Gehalt mit dem Faktor 5, so erhält man die Summe der PCB-Kongener [130]. Jorgensen, Picel und Stamoudis publizierten die Vorhersage von Responsefaktoren ( $R_f$ ) strukturverschiedener Moleküle unter Anwendung eines Flammenionisationsdetektors. Sie beschrieben, dass mit ihrem Verfahren die Quantifizierung von Komponenten in komplexen organischen Mischungen möglich ist, wenn eine strukturelle Identifizierung der Substanzen durchgeführt wurde [131]. Scanlon und Willis zeigten, dass die berechneten Responsefaktoren vergleichbar bei ähnlichen Molekülstrukturen waren [132]. Ein anderes Beispiel ist die Analyse von Dieselabgasen mit GC-FID-MS. Die erhaltenen Chromatogramme weisen mehr als 200 verschiedene Einzelsubstanzen auf. Dabei können nicht alle Einzelsubstanzen individuell bestimmt werden. Hier bezieht man die Gesamtfläche auf einen zertifizierten Dieselstandard mit bekanntem Kohlenstoffgehalt. Die Quantifizierung wird mittels Kohlenstoff-Kalibrierung durchgeführt [133, 134]. Der Einsatz eines Flammenionisationsdetektors (FID) ermöglicht die Detektion von Verbindungen, die oxidierbare Atome (C, H, S etc.) enthalten. Existiert zu einer Substanz

kein Einzelstandard, so kann man mit Hilfe einer Referenzsubstanz über die Kohlenstoff-Kalibrierung den Responsefaktor ermitteln. Voraussetzung ist, dass die Referenzsubstanz die gleiche Molekülstruktur wie die zu untersuchenden Substanzen besitzt. Dieser Ansprechfaktor ist sowohl von der Struktur des Analyten als auch von der Anzahl der Kohlenstoffatome, Wasserstoffatome und Heteroatome im Molekül abhängig. Das Prinzip des FIDs beruht darauf, dass Kohlenstoffatome durch thermische Zersetzung (CH $\cdot$ )-Radikale bilden, die durch Reaktion mit Sauerstoff und Ionisation zu Formaldehydionen weiter reagieren. Diese werden an einer Sammelelektrode aufgefangen, wodurch ein elektrisches Signal verursacht wird. Die Anwesenheit von Heteroatomen, wie z. B. Sauerstoff, hat ein geringeres Signal zur Folge, da die Fähigkeit des benachbarten Kohlenstoffatoms, (CH $\cdot$ )-Radikale zu bilden, vermindert wird. Eine exakte Identifizierung der Analyten im Chromatogramm ist Voraussetzung für die Kohlenstoff-Kalibrierung. Dies kann mit zwei unterschiedlich polaren Säulen mit Vergleichen von Standards erfolgen. Ist dies nicht möglich, so kann die Kopplung der chromatographischen Trennmethode mit einem strukturaufklärenden Detektor (vgl. Kap. 3.4) Aufschluss über die eluierenden Substanzen geben.

Über das Injektionsvolumen ( $V_I$ ), den Kohlenstoffgehalt im Molekül ( $x_{CR}$ ) und der Konzentration ( $c_R$ ) der Referenzsubstanz ( $R$ ) lässt sich die injizierte Kohlenstoffmasse ( $m_{CR}$ ) der Referenzsubstanz ermitteln:

$$m_{CR} = x_{CR} \cdot c_R \cdot V_I \quad (\text{Gl. 10})$$

Diese Kohlenstoffmasse verursacht ein FID-Signal und wird als Peak im Chromatogramm sichtbar. Die Fläche ( $A_R$ ) unter dem Peak entspricht der injizierten Kohlenstoffmenge der Referenz.

Der Responsefaktor ( $Rf$ ) wird aus dem Verhältnis von Fläche zur Kohlenstoffmasse berechnet:

$$Rf = \frac{A_R}{m_{CR}} \quad (\text{Gl. 11})$$

Der Quotient aus Fläche des zu bestimmenden Analyten ( $A$ ) und des Responsefaktors ( $Rf$ ) beschreibt die injizierte Kohlenstoffmasse ( $m_{CA}$ ) des Analyten:

$$m_{CA} = \frac{A}{Rf} \quad (\text{Gl. 12})$$

Über den Kohlenstoffgehalt ( $x_{CA}$ ) des Analyten wird die Konzentration ( $c_A$ ) des Analyten bestimmt.

$$c_A = \frac{m_{CA}}{x_{CA} \cdot V_I} \quad (\text{Gl. 13})$$

Auf diese Art ist es möglich, den Gehalt der Einzelkomponenten zu bestimmen. Zu erwähnen ist der Fehler, der bei der Ermittlung der Kohlenstoffmasse des Analyten entsteht. Hierbei werden die geringen strukturellen Abweichungen der Substanzen von der Referenz vernachlässigt.

Die nächsten Experimente sollen Aufschluss über eine mögliche Anwendung der Kohlenstoff-Kalibrierung und die Eignung von unterschiedlichen Substanzen als Referenz geben.

### 3.7.1 Experimentelles

#### Chemikalien

Eine Standardlösung (A) mit verschiedenen Kohlenwasserstoffen (n-Octadecan (6,57, mg/l), n-Eicosan (6,43 mg/l), n-Docosan (7,86 mg/l) und n-Tetracosan (6,50 mg/l)) (99,9%, Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland) in n-Hexan wurde hergestellt.

Eine Lösung (B) von 58 mg/l n-Octadecan, 58 mg/l n-Docosan, 55 mg/l n-Tetracosan und 54 mg/l Allethrin (93,5 %, Riedel-de-Haën) in Isopropanol wurden ebenfalls getestet.

Die analysierten Pyrethrum-Extrakte wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland) und BAYER (Leverkusen, Deutschland) bezogen. Diese Extrakte wurden in Isopropanol gelöst.

Eine Lösung von 240,3 mg Pyrethrum-Extrakt (Fluka) und 17,6 mg Allethrin in 1000 ml Isopropanol diente als Standard C.

Die eingesetzten Pyrethroide (Phenothrin (91,7 %), Permethrin (97,0 %), Cypermethrin (95 %), Fenvalerat (99,1 %) und Deltamethrin (99,3 %)) waren vom Labor Dr. Ehrensdorfer (Augsburg, Deutschland).

#### Geräte

Es wurde das unter Kapitel 3.2 beschriebene SFC-System verwendet.

### 3.7.2 Ergebnisse

Die Kohlenstoff-Kalibrierung wird anhand der Lösung A beschrieben. Als Referenzsubstanz und interner Standard wurde n-Eicosan verwendet. Mit der internen Probenschleife wurde ein definiertes Probenvolumen auf die Chromatographiesäule injiziert. Hieraus lässt sich mit den beschriebenen Gleichungen 10 - 13 der Gehalt der übrigen n-Alkane bestimmen. Die theoretischen und experimentell bestimmten Konzentrationen sind in Abbildung 53 graphisch aufgeführt.

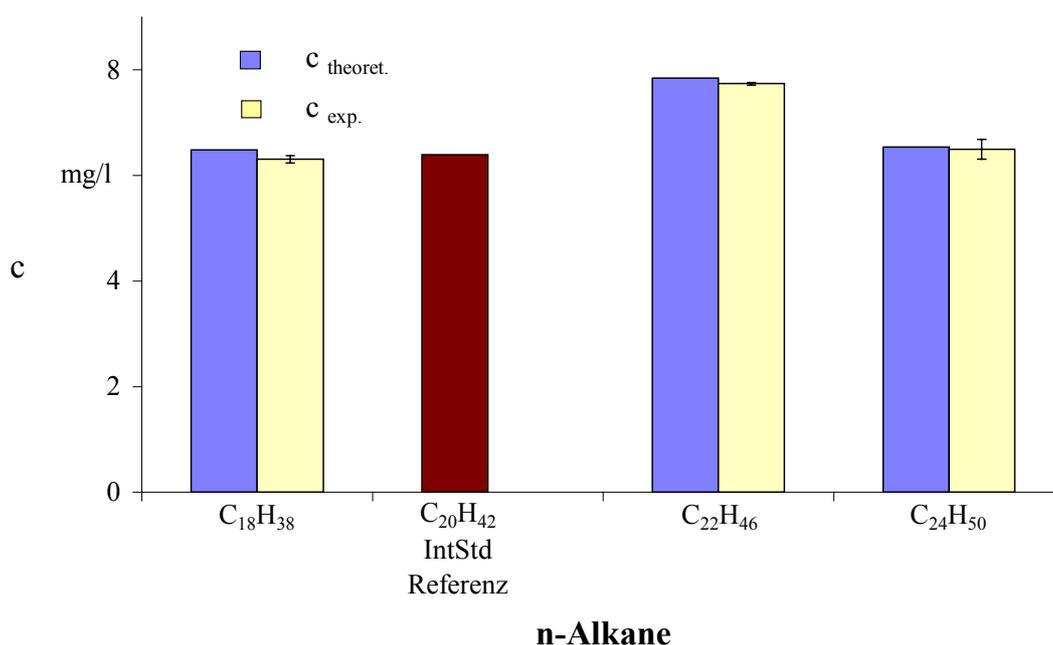


Abbildung 53: Kohlenstoff-Kalibrierung von Paraffinen mit n-Eicosan als Referenz

Alle Messungen wurden mindestens 5-mal durchgeführt. Die relativen Standardabweichungen sind kleiner als 5 %. Eine sehr gute Übereinstimmung der theoretischen mit den experimentell ermittelten Konzentrationen ist deutlich zu erkennen. Tabelle 7 beinhaltet eine statistische Auswertung bezüglich der Signifikanz der Abweichung (t-Test) [135] vom experimentellen Wert zum berechneten. Zusätzlich sind absolute Abweichungen (%) und Korrekturfaktoren ( $F_{\text{korrt}}$ ) zwischen experimenteller und berechneter Konzentration aufgeführt.

Tabelle 7: Kohlenstoff-Kalibrierung von n-Alkanen unter Anwendung von n-Docosan als Referenz

Substanz	Konzentration (mg/l)		Abweichung %	F <sub>korrr</sub>	t-Test	Konzentration (mg/l) korrigiert
	berechnet	experimentell				
C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	6,48	6,31 ± 0,07	- 2,64	1,03	2,02	6,48
C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	Referenz	6,39 ± 0,09	0,0	1,00	0	6,39
C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	7,85	7,74 ± 0,02	- 1,42	1,01	1,00	7,85
C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	6,54	6,50 ± 0,19	- 0,65	1,01	0,19	6,54

Kritischer Wert:  $t(0,95;8) = 2,34$  [135]

Die Abweichung zwischen berechneter und experimentell bestimmter Konzentration ist kleiner als 2,64 Prozent. Die Werte für den Korrekturfaktor befinden sich zwischen 1,01 und 1,03. Der t-Test wurde zwischen den F<sub>korrr</sub>-Werten der Analyten und der Referenz durchgeführt. Der tabellarisierte kritische Wert von  $t(0,95;8)$  beträgt 2,34. Es kann gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den F<sub>korrr</sub>-Werten besteht. Als Ergebnis lässt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen berechneter und experimenteller Konzentration ableiten.

Wie oben erwähnt, ist es notwendig, dass die Referenz die gleiche Struktur wie die zu bestimmenden Analyten aufweist.

So ist es nicht möglich Pyrethroide mit einem n-Alkan als Referenz zu bestimmen. Tabelle 8 verdeutlicht die mögliche Quantifizierung von n-Oktadekan und n-Tetracosan mit n-Docosan als Referenz. Dies wird durch die niedrigen t-Werte bestätigt. Die Abweichung der experimentellen zu den theoretischen Gehalten liegt im Bereich der relativen Standardabweichung.

Im Gegensatz dazu ist der experimentelle Gehalt von Allethrin verglichen mit dem theoretischen Gehalt um 22 % geringer. Der t-Wert beträgt 17,54 und ist somit größer als der kritische t-Wert von  $t(0,95;8)$  mit 2,34. Somit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen experimenteller und berechneter Konzentration. Vergleichbare Ergebnisse, Phenothrin ausgenommen, werden bei den übrigen Pyrethroiden beobachtet. Unter den gewählten Bedingungen ist eine quantitative Analyse der Pyrethroide daher nicht möglich.

Tabelle 8: Kohlenstoff-Kalibrierung von Alkanen und Pyrethroiden unter Anwendung von n-Docosan als Referenz

Substanz	Konzentration (mg/l)		Abweichung %	F <sub>korr</sub>	t-Test	Konzentration (mg/l) korrigiert
	berechnet	experimentell				
<b>n-Octadekan</b>	57,5	58,0 ± 0,7	1,3	0,99	0,55	57,5
<b>n-Docosan</b>	Referenz	57,5 ± 1,2	0,0	1,0	0	57,5
<b>n-Tetracosan</b>	54,8	54,2 ± 1,5	-2,7	1,01	1,22	54,8
<b>Allethrin</b>	146,5	113,8 ± 2,51	-22,3	1,29	17,54	146,5
<b>Phenothrin</b>	112,9	109,6 ± 3,7	-2,8	1,03	1,87	112,9
<b>Permethrin</b>	92,5	83,5 ± 2,5	-9,8	1,11	6,30	92,5
<b>Cypermethrin</b>	85,5	77,3 ± 1,4	-9,6	1,11	7,89	85,5
<b>Fenvalerat</b>	126,5	119,2 ± 3,3	-5,8	1,06	3,94	126,5
<b>Deltamethrin</b>	185,6	169,0 ± 2,7	-8,9	1,10	7,87	185,6

Kritischer Wert:  $t(0,95;8) = 2,34$  [135]

Das Ergebnis der Pyrethroid-Bestimmung mit der Kohlenstoff-Kalibrierung ist in Tabelle 9 illustriert, wobei Deltamethrin, das dibromierte Cyclopropancarboxylat (vgl. Abb. 4), als Referenzsubstanz verwendet wurde.

Tabelle 9: Kohlenstoff-Kalibrierung der Pyrethroide mit Deltamethrin als Referenz

Substanz	Konzentration (mg/l)		Abweichung %	F <sub>korr</sub>	t-Test	Konzentration (mg/l) korrigiert
	berechnet	experimentell				
<b>Allethrin</b>	146,5	126,7 ± 2,8	- 13,5	1,16	10,61	146,5
<b>Phenothrin</b>	112,9	122,2 ± 4,1	8,3	0,92	4,59	112,9
<b>Permethrin</b>	92,5	93,0 ± 2,7	0,5	0,99	0,30	92,5
<b>Cypermethrin</b>	85,5	86,1 ± 1,5	0,7	0,99	0,57	85,5
<b>Fenvalerat</b>	126,5	131,9 ± 3,7	4,9	0,95	3,09	162,5
<b>Deltamethrin</b>	Referenz	185,6 ± 3,0	0,0	1,0	0	185,6

Kritischer Wert:  $t(0,95;8) = 2,34$  [134]

Die theoretischen Gehalte von Permethrin und Cypermethrin werden aufgrund ihrer ebenfalls doppelt halogenierten Struktur bestätigt (vgl. Abb. 4). Dabei werden Chlor- und Bromatome nicht unterschieden. Permethrin besitzt im Gegensatz zu Cypermethrin und Deltamethrin keine Cyanogruppe. Daraus ist zu schließen, dass die CN-Gruppe einen zu vernachlässigenden Beitrag im FID-Signal liefert. Die berechneten t-Werte von Permethrin und Cypermethrin befinden sich unterhalb des kritischen t-Wertes. Es besteht kein signifikanter Unterschied bei den Korrekturfaktoren.

Phenothrin und Fenvalerat (vgl. Abb. 4, 5) verursachen eine signifikante höhere experimentelle Konzentration. Die t-Werte sind größer als der kritische Wert von 2,34. Phenothrin besitzt an Stelle der endständigen Halogene zwei Methylgruppen, die ein höheres FID-Signal hervorrufen. Die Säurekomponente im Fenvalerat besteht aus einer  $\alpha$ -(4-Chlorphenyl)-isovaleriansäure an Stelle der Chrysanthemumsäure. Aufgrund des Benzolrings und der Isopropylgruppe wird ebenfalls ein erhöhtes FID-Signal verursacht. Allethrin zeigt eine um 13,5 % geringere experimentelle Konzentration verglichen mit dem theoretischen Gehalt. Der signifikante Unterschied wird durch den hohen t-Wert von 13,5 bestätigt. Starke Unterschiede in der Molekülstruktur des Allethrins (vgl. Abb. 3) verglichen mit der des Deltamethrins haben ein geringeres Detektorsignal zur Folge. Dies zeigt ein weiteres Mal, dass die Kohlenstoff-Kalibrierung nur dann anwendbar ist, wenn die Analyten die gleiche Struktur wie die Referenzsubstanz besitzen.

Aus den verschiedenen Experimenten resultiert, dass die Quantifizierung unter Anwendung der Kohlenstoff-Kalibrierung nur möglich ist, wenn

1. Paraffine und Phenothrin mit einem n-Alkan als Referenz bestimmt werden,
2. Permethrin- und Cypermethrin-Gehalte mit einem halogenierten Pyrethroid (Deltamethrin) als Referenz berechnet werden, wobei die Quantifizierung bei den Pyrethroiden wie Fenvalerat, Phenothrin und Allethrin versagt.

Die Quantifizierung der Pyrethrine benötigt daher eine Substanz mit ähnlicher Molekülstruktur. Die einzig mögliche Referenzsubstanz ist Allethrin.

Nachfolgend wurden die aufgeführten Pyrethrum-Extrakte auf ihren Pyrethrin-Gesamtgehalt analysiert. Allethrin wurde als Referenz eingesetzt, da es ein synthetisches Derivat der Pyrethrine darstellt (vgl. Abb. 1, 3) und somit die gleiche Molekülstruktur besitzt. Die von den Herstellern angegebenen Gehalte wurden überprüft. Das Ergebnis des Fluka- und des Riedel-de-Haën-Extraktes ist in Abbildung 54 graphisch dargelegt.

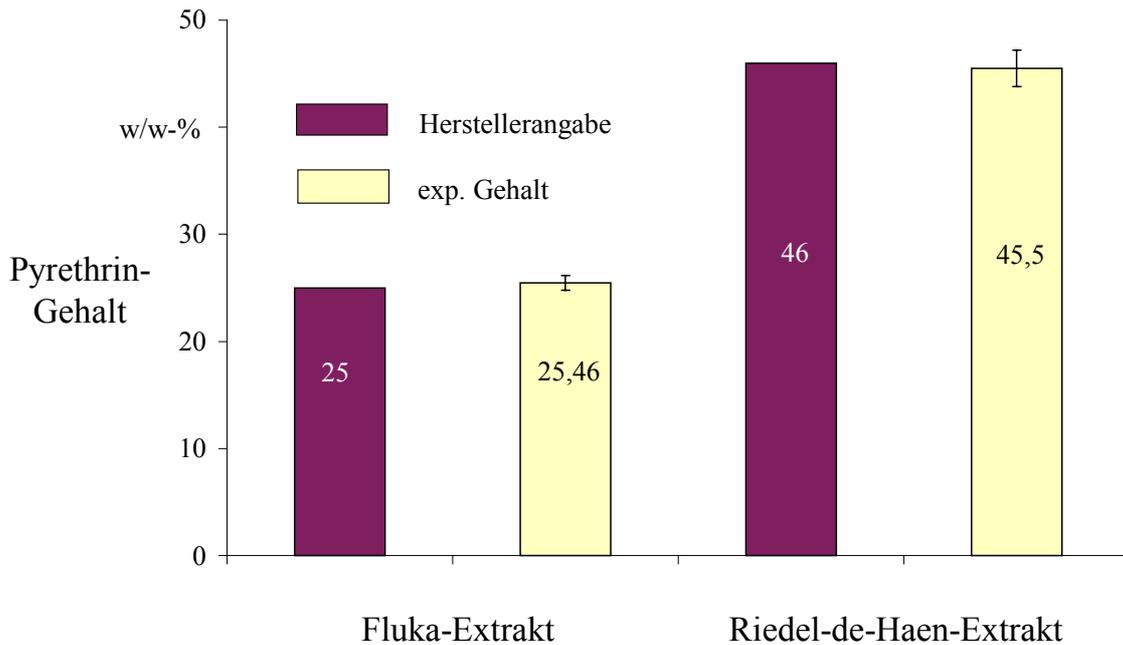


Abbildung 54: Vergleich der theoretischen und der experimentell ermittelten Pyrethrin-Gehalte in verschiedenen Pyrethrum-Extrakten

Der deklarierten Gehalte in Gewichtsprozent (w/w-%) im Fluka-Extrakt (~ 25 w/w-%) und im Extrakt von Riedel-de-Haën (46 w/w-%) wurden mit der Kohlenstoff-Kalibrierung bestätigt. Die Gehalte im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt aller zertifizierten Analysenmethoden [136] sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Vergleich der zertifizierten und des experimentellen Pyrethrin-Gehaltes im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt unter Anwendung der Kohlenstoff-Kalibrierung and Allethrin als Referenzsubstanz.

Probe	Methode	w/w-%	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{Lit}}$
World-Standard-Pyrethrum-Extrakt	AOAC <sup>1</sup>	19.56 ± 0.23	4.61	t (0.95;30) = 2.04
	PBK <sup>1</sup>	20.86 ± 0.24	1.03	t (0.95;21) = 2.08
	HPLC <sup>1</sup>	20.28 ± 0.33	6.62	t (0.95;26) = 2.06
	UV <sup>1</sup>	20.88 ± 0.03	0.47	t (0.95;19) = 2.09
	SFC	18.78 ± 0.15		

<sup>1</sup> Gehalte im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt bestimmt durch AOAC-, PBK-, HPLC- und UV-Methode in 1992 [136]

Die Abkürzungen in der Spalte „Methoden“ beschreiben die konventionellen Analysemethoden in der Pyrethrin-Analytik. Der Mittelwert des Gesamtgehaltes dieser 4 Methoden beträgt  $20,40 (\pm 0,6)$  w/w-%. Der experimentelle Gehalt, berechnet mit der SFC-Methode, ist mit 18,78 um  $\sim 2$  % geringer. Die t-Werte wurden mit den Mittelwerten des Pyrethin-Gehaltes der vier offiziellen Methoden berechnet. Der t-Test gibt allerdings keine klare Antwort auf signifikante Unterschiede zwischen dem mit der SFC-Methode bestimmten Gehalt und dem der offiziellen Methoden. Zur Zeit der SFC-Analyse betrug das Alter des World-Standard-Pyrethrum-Extraktes 6 Jahre. Es ist möglich, dass ein Teil der Pyrethrine in dieser Lagerzeit durch Sauerstoff oder Licht abgebaut wurde. Der ermittelte Gehalt von 18,78 Gewichtsprozent Gesamt-Pyrethrine bestätigt somit den theoretischen Gehalt.

Nach den Untersuchungen der Gesamt-Pyrethringehalte in diversen Pyrethrum-Extrakten lässt diese Methode eine Einzelbestimmung der Pyrethrine ebenfalls zu. Als Beispiel wird die Kalibrierung von Cinerin I und II in Abbildung 55 illustriert.

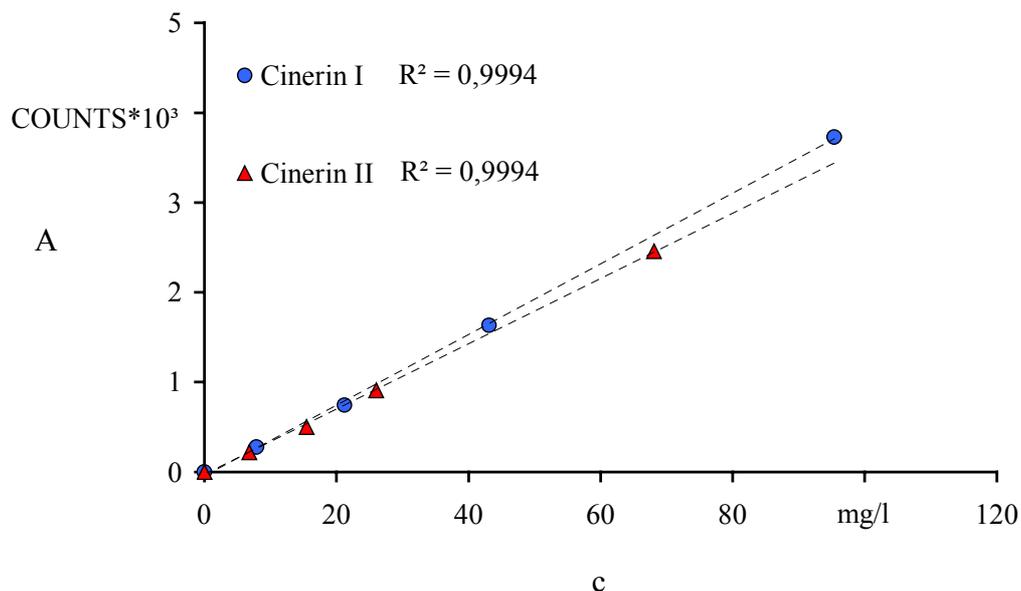


Abbildung 55: Kalibrierung von Cinerin I und II

Der lineare Bereich erstreckt sich über fast  $10^2$  Einheiten. Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) wurden nach DIN [62] berechnet. Sie sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) von Allethrin und der Pyrethrine nach DIN

<b>Substanz</b>	<b>DIN</b>	
	<b>LOD (mg/l)</b>	<b>LOQ (mg/l)</b>
<b>Allethrin</b>	13,0	38,9
<b>Cinerin I</b>	2,9	8,7
<b>Jasmolin I</b>	1,8	5,4
<b>Pyrethrin I</b>	11,8	35,3
<b>Cinerin II</b>	2,1	6,1
<b>Jasmolin II</b>	1,2	3,7
<b>Pyrethrin II</b>	8,9	26,6

Die Nachweisgrenzen befinden sich im unteren ppm Bereich. Die Bestimmungsgrenzen sind um etwa den Faktor 3 höher als die Nachweisgrenzen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Pyrethroide sind in Tabelle 12 aufgezeigt. Die Nachweisgrenzen befinden sich im unteren ppm-Bereich (10 – 20 mg/l).

Tabelle 12: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Pyrethroide nach DIN

<b>Substanz</b>	<b>DIN</b>	
	<b>LOD (mg/l)</b>	<b>LOQ (mg/l)</b>
<b>Phenothrin</b>	10,8	36,4
<b>Permethrin</b>	10,8	36,5
<b>Cypermethrin</b>	19,1	64,7
<b>Fenvalerat</b>	16,7	56,6
<b>Deltamethrin</b>	20,3	68,4

In der nachfolgenden Präsentation (Abb. 56) sind die Gehalte der einzelnen Pyrethrine im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt aufgezeigt.

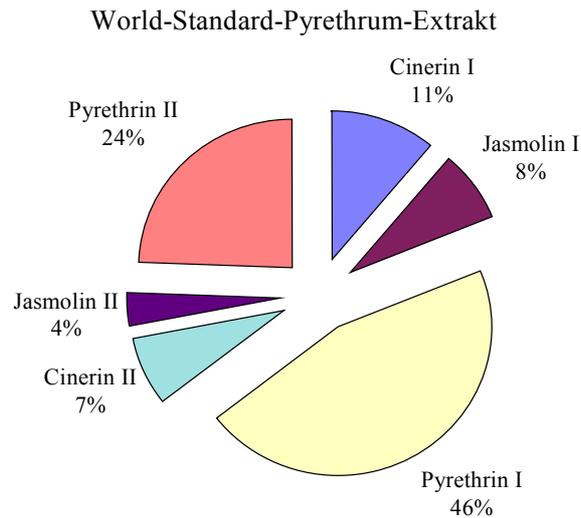


Abbildung 56: Gehalte der einzelnen insektizid wirksamen Substanzen im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt

Pyrethrin I besitzt mit 46 % (8,6 w/w -%) den Hauptanteil der sechs insektizid wirksamen Inhaltsstoffe. Danach folgt Pyrethrin II mit 24 % (4,5 w/w-%). Die Anteile von Jasmolin I sowie von Cinerin I und II werden mit 7 bis 11 % (1,3 – 2,1 w/w-%) beziffert. Den geringsten Anteil besitzt Jasmolin II mit ca. 4 %.

Abbildung 57 zeigt die Einzelgehälter der Pyrethrine in den beiden anderen Pyrethrum-Extrakten.

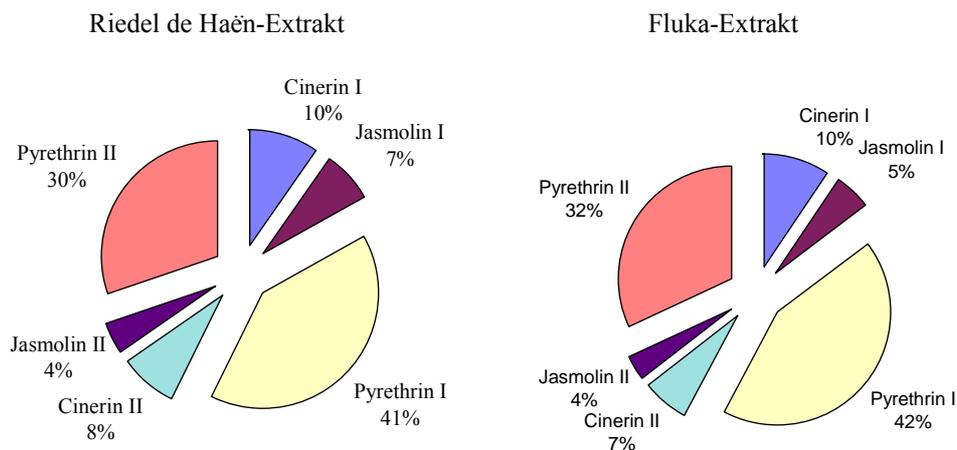


Abbildung 57: Gehalte der einzelnen insektizid wirksamen Substanzen im Riedel-de-Haën- und Fluka-Extrakt

Die Zusammensetzung der abgebildeten Pyrethrum-Extrakte ist ähnlich. Diese beiden Extrakte weisen einen 4 – 5 % geringeren Pyrethrin I Gehalt im Vergleich zum World-Standard-Pyrethrum-Extrakt auf. Im Gegensatz dazu ist der Pyrethrin II Gehalt um ca. 6 % höher.

Tabelle 13 zeigt die Quotienten von Chrysanthematen zu Pyrethraten in den untersuchten Pyrethrum-Extrakten.

Tabelle 13: Quotient (Chr : Pyr) im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt, im Fluka- und Riedel-de-Haën-Extrakt

Probe	Methode	Chr : Pyr	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{lit}}$
<b>World-Standard-Pyrethrum-Extrakt</b>	AOAC <sup>1</sup>	1,22 ± 0,04	17,89	T (0,95;30) = 2,04
	PBK <sup>1</sup>	1,56 ± 0,02	7,38	T (0,95;21) = 2,08
	HPLC <sup>1</sup>	1,28 ± 0,07	19,68	T (0,95;26) = 2,06
	SFC	1,82 ± 0,09	1,00	0,00
<b>Fluka-Extrakt</b>	SFC	1,36 ± 0,19	-	-
<b>Riedel-de-Haën-Extrakt</b>	SFC	1,34 ± 0,07	-	-

<sup>1</sup>Quotient (Chr : Pyr) im World-Standard-Pyrethrum-Extrakt wurden berechnet unter Anwendung der AOAC-, PBK- and HPLC-Methoden in 1992 [136].

Das Verhältnis zwischen Chrysanthematen und Pyrethraten beträgt 1,86. In der Literatur [136] wird das Verhältnis (Chrysanthemate : Pyrethrate) unter Anwendung der verschiedenen Bestimmungsmethoden mit 1,22 (AOAC-Methode), mit 1,56 (PBK-Methode) und mit 1,28 (HPLC-Methode) beziffert. Insofern ist das mit der SFC-Methode errechnete Verhältnis um 0,3 – 0,64 zu hoch. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass vermutlich nur geringe Mengen der Pyrethrate durch Licht und Sauerstoff zersetzt wurden.

Das Chrysanthemat-Pyrethrat-Verhältnis beträgt beim Fluka-Extrakt 1,33 und beim Riedel-de-Haën-Extrakt 1,38. Dies liegt im Rahmen der in der Literatur aufgeführten Werte. Die hier vorgestellte Analysenmethode zur Bestimmung von Pyrethrinen wurde von der Fachzeitschrift: „Journal of biochemical and biophysical methods“ bereits angenommen [137].

Die entwickelte Quantifizierungsmethode für Pyrethrine wurde ebenfalls bei diversen technischen Produkten getestet. Hierbei wurde der insektizide Gehalt in Insektensprays für Innenräume und Schampon gegen parasitäre Hauterkrankungen überprüft. In Abbildung 58 ist ein Chromatogramm eines Standards dargestellt, der Allethrin (1), Piperonylbutoxid (5) und die sechs Pyrethrine (Chrysanthemate: 2, 3, 4; Pyrethrate: 6, 7, 8) enthält.

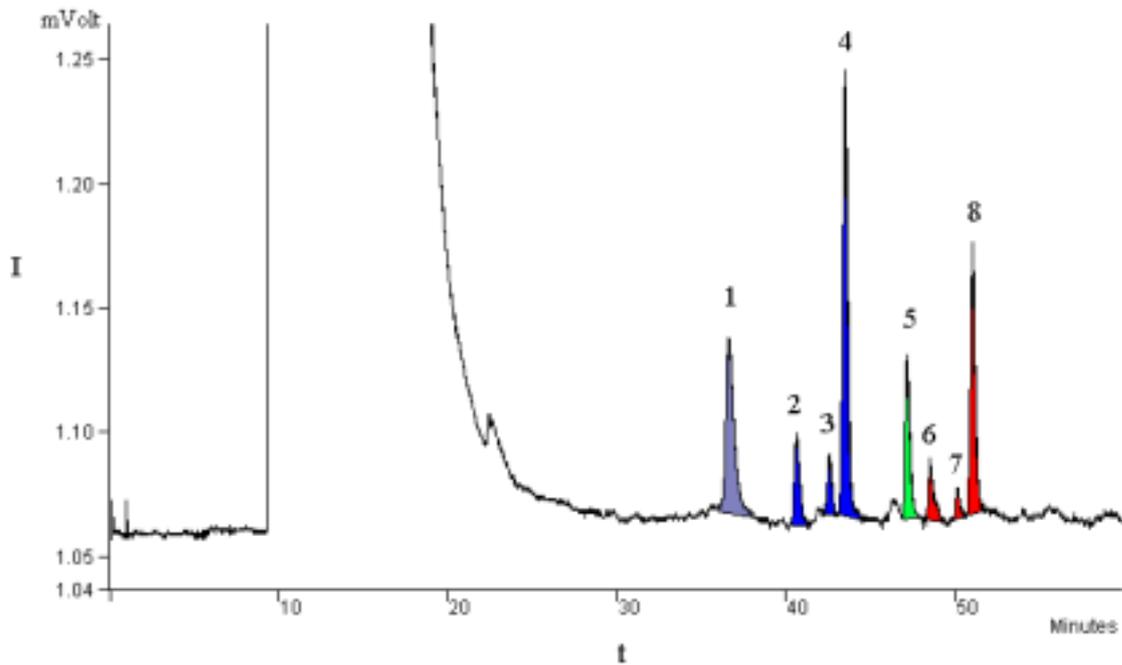


Abbildung 58: SF-Chromatogramm eines Pestizidstandards (Allethrin, PBO und Pyrethrine)

In Tabelle 14 sind die technischen Produkte, deren insektizide Wirkstoffe und Gehalte sowie die experimentell bestimmten Gehalte aufgeführt.

Tabelle 14: Gehaltsbestimmung von insektiziden Wirkstoffen in technischen Produkten

Technisches Produkt	Wirkstoff	Gehalt (w/w-%)	
		Herstellerangabe	SFC-Methode
„Insektenspray Konzentrat Global“	Tetramethrin <sup>1</sup>	0,4	0,55 ± 0,06
	d-Phenothrin	0,2	0,18 ± 0,02
	Piperonylbutoxid	1,0	0,84 ± 0,05
“Raid Paral”	Pyrethrum	1,0	0,9 ± 0,1
	Piperonylbutoxid	1,0	1,28 ± 0,04
“Compo Fliegenspray”	Pyrethrum	0,4	0,38 ± 0,02
	Piperonylbutoxid	0,5	0,45 ± 0,02
“Spruzit® Gartenspray”	Pyrethrum	0,04	0,041 ± 0,003
	Piperonylbutoxid	0,032	0,035 ± 0,002
„Goldgeist“	Pyrethrum	0,3	0,27 ± 0,02
	Piperonylbutoxid	0,7	0,73 ± 0,04
Vapona Insektentift	Allethrin	5,6	5,9 ± 0,2

Die Molekülstruktur des in der Tabelle 14 gekennzeichneten Pyrethroids<sup>1</sup> Tetramethrin ist in Abbildung 59 dargestellt.

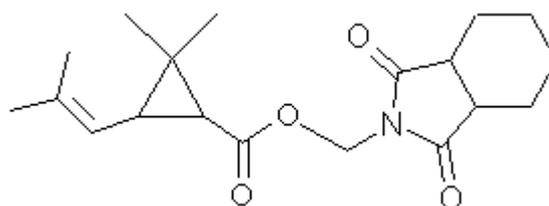


Abbildung 59: Molekülstruktur von Tetramethrin

Die vom Hersteller angegebenen Gehalte der natürlichen und synthetischen Insektizide sowie die des Synergisten Piperonylbutoxid konnten mit der SFC-Methode bestätigt werden.

Die erarbeitete Bestimmungsmethode von Pyrethrinen und Pyrethroiden mit überkritischer Fluid Chromatographie und Kohlenstoff-Kalibrierung eignet sich sowohl für die Gehaltsbestimmung von pyrethroiden Wirkstoffen in Extrakten als auch für die Überprüfung der Inhaltstoffe in Industrieprodukten aus unterschiedlichen Matrices.

## 4 HPLC von Pyrethrinen

Die heute verwendeten flüssigchromatographischen Verfahren sind relativ neu in der Analytik, in der sie sich äußerst schnell etabliert haben. Runge beschrieb die ersten chromatographischen Experimente, die den Einsatz in der analytischen Chemie allerdings noch nicht erahnen ließen [138]. Die Auftrennung pflanzlicher Farbstoffe durch ein chromatographisches Verfahren gelang Tswett im Jahr 1906. Dieses Experiment prägte den Namen dieser Methode (Chromatographie) [139]. Seither haben viele Wissenschaftler durch mannigfaltige Versuche und Experimente den weitgefächerten Einsatz dieser Methode in der Analytik vorgetrieben.

In der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) durchströmt die mobile Phase (Eluens) mit konstanter Flussrate das Füllmaterial der gepackten Säule. Dieses Füllmaterial trägt oder enthält die stationäre Phase. Dabei füllt das Eluens den Raum zwischen den Füllmaterialteilchen und das Porenvolumen in diesen aus. Zu einem Zeitpunkt  $t = 0$  wird die Probe unmittelbar am Säulenanfang in die mobile Phase injiziert und von dieser durch die Säule transportiert. In der Säule wechseln die Probenmoleküle viele Male von der mobilen in die stationäre Phase und zurück. Dabei ist die Verweildauer in oder an der stationären Phase für unterschiedliche Moleküle verschieden groß. Hierdurch werden die einzelnen Komponenten voneinander getrennt, so dass sie räumlich und zeitlich separiert nacheinander die Säule verlassen [140].

In der HPLC unterscheidet man zwischen Normalphasen-(NP)- und Reversed-Phase-(RP)-Chromatographie. Bei der NP-HPLC ist die stationäre Phase polar. Die typischen stationären Phasen sind Kieselgele bzw. mit polaren Resten modifizierte Kieselgele. Als mobile Phasen dienen unpolare Eluenten wie z.B. Heptan. In der Pyrethrumanalytik wurde neben den in Kapitel 3.4 erwähnten Methoden auch die HPLC eingesetzt. Modifizierte Kieselgele dienten dabei als stationäre Phase. Mischungen wie z. B. 4 % Tetrahydrofuran in n-Hexan oder Aceton in n-Hexan (2,5 : 97,5) [141] wurden als mobile Phase eingesetzt. Da die Trennleistung dieser Systeme nicht besonders groß war, wurden nur die Hauptbestandteile (Pyrethrin I + II) im Pyrethrumextrakt erfasst [142, 46].

Bei der RP-Chromatographie ist die stationäre Phase apolar, während die mobile Phase polar ist. Basismaterial für die stationäre Phase sind meistens Kieselgele, die durch Alkylgruppen „hydrophobisiert“ werden. Am häufigsten werden Phasen mit Octadecyl-(C18)- oder Octyl-(C8)-Resten eingesetzt. Neben diesen sind aber auch kürzere Alkylketten sowie Cyclohexan- und Phenylgruppen im Gebrauch. An RP-Phasen kann man sowohl polare als auch unpolare

Stoffe trennen. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase erfolgt schnell, so dass eine Gradientenelution eingesetzt werden kann. Die RP-Chromatographie hat sich unter anderem deshalb durchgesetzt, da wässrige Fließmittelsysteme verwendet werden können [143]. Wässrige Proben sind in der Analytik weitaus häufiger als in organischen Lösemitteln gelöste Stoffe. Wang et al. publizierten 1997 die Trennung von Pyrethrinen mit RP-HPLC unter Anwendung eines 2-stufigen Eluensgradienten und dem Einsatz eines RP8-Materials [54]. Eine Mischung aus 50 % Acetonitril und 50 % Wasser wurde 10 Minuten lang konstant gehalten. Danach wurde der Acetonitril-Gehalt innerhalb 5 Minuten auf 60 % erhöht, der dann 10 Minuten gehalten wurde. Zwischen 25 und 30 Minuten stieg der Acetonitril-Gehalt um weitere 5 % an. Das Gemisch aus 65 % Acetonitril und 35 % Wasser wurde bis zum Ende der Chromatographie konstant gehalten. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Basierend auf diese Studie wurde die chromatographische Trennung der Pyrethrine mittels RP-HPLC in der vorliegenden Arbeit untersucht.

#### **4.1 Reinheitsuntersuchung von Acetonitril**

In diesem Kapitel wird der Aufbau des HPLC Systems beschrieben. Das verwendete Eluens (Acetonitril) soll auf UV-aktive Verunreinigungen getestet werden.

##### 4.1.1 Experimentelles

###### Geräte

Als Pumpe und Gradientensystem wurde eine MERCK HITACHI L-6200 A Intelligent Pumpe und als HPLC-Säule eine LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Vorsäule bestand aus einer RP-8 (10 µm) Kartusche. Die Trennsäule besaß eine Länge von 125 mm und einen Innendurchmesser von 4,0 mm. Thermostatisiert wurde die Säule mit dem MERCK L-5025 Thermostat. Für die Aufnahmen der Van-Deemter-Kurven wurde eine 250 mm lange LiChrospher® 100 RP-18 Säule (5µm) der Firma Merck KGaA eingesetzt, deren Innendurchmesser 4 mm betrug. Über eine externe Probenschleife (20 µl) wurde die Probe mit einem Rheodyne-Injektionsventil manuell injiziert. Als Detektor wurde ein APPLIED BIOSYSTEM 783A Programmable

Absorbance UV-Detektor eingesetzt. Die Detektionswellenlänge betrug 235 nm. Die Datenerfassung erfolgte über ein PE NELSON 900 Series Interface (Fa. Perkin Elmer), das mit einem Personal Computer verbunden war. Das erhaltene Signal wurde mit der PE NELSON Model 2600 Single Chromatography Software (Copyright© 1988-1990 Perkin Elmer Corp. Rev. 5.1.4) aufgezeichnet und bearbeitet. In einem späteren Stadium wurde die PE NELSON Datenerfassung durch die in Kapitel 3.2 aufgeführte Varian Star Software ersetzt.

### Chemikalien

Als Probe wurde ein Pyrethrum-Extrakt der Fa. Fluka untersucht. Der Pyrethringehalt ist von den Ergebnissen aus Kapitel 3.7 entnommen. Es wurde eine Stammlösung (Pyr-Std1) hergestellt, die 860 mg/l Gesamt-Pyrethrine in Isopropanol enthielt. Durch Verdünnung der Stammlösung erhielt man Kalibrierlösungen.

Eine Lösung (AFP-Std1) von Allethrin (10,3 mg/l), Fenvalerat (8,3 mg/l) und Phenothrin (15,6 mg/l) wurde für die Aufzeichnung von Van-Deemter-Kurven eingesetzt.

Als Elutionsmittel diente ein Acetonitril/Wasser-Gemisch. Es wurde Acetonitril verschiedener Qualitäten untersucht. Das Wasser war bidestilliert. Die Eluenten wurden zusätzlich mikrofiltriert (0,4 µm) und anschließend 15 min im Ultraschallbad entgast.

## 4.1.2 Ergebnisse

### Reinheitsuntersuchung von Acetonitril

Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Reinheit des verwendeten Acetonitrils gerichtet. In organischen Lösemitteln ist die Konzentration UV-aktiver Substanzen oft höher als im Wasser, da UV-aktive Stoffe meist organische Moleküle und somit allgemein besser in organischen Lösmitteln löslich sind. Bei dem Einsatz der Gradientenelution verändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase mit der Zeit. Sind UV-aktive Substanzen im Acetonitril, so wird dies durch den Anstieg der Basislinie angezeigt. In Tabelle 15 sind neben den Herstellern auch die angegebenen Qualitäten des untersuchten Acetonitrils aufgeführt.

Tabelle 15: Untersuchtetes Acetonitril verschiedener Qualität

<b>Hersteller</b>	<b>Güte</b>
PromoChem	Gradient grade
T.J. Baker	Gradient grade
Merck	z.A.
Riedel de Haën	HSL

Zur Reinheitsuntersuchung wurden Basislinien einer Gradientenelution bei einer Detektionswellenlänge von 235 nm aufgezeichnet. Es wurde ein Gradient eingesetzt, in dem der Acetonitrilgehalt von 50 % auf 70% innerhalb 40 min anstieg. Die Chromatogramme der Basislinien sind in Abbildung 87 (Anhang) dargestellt.

Ein starker Anstieg der Grundlinie, bei gleichzeitigem Anstieg des Acetonitrilanteils im Elutionsmittelgemisch, weist auf gelöste, UV-aktive Substanzen im Acetonitril hin. Der steilste Anstieg der Basislinien ist bei dem Acetonitril der Qualität HSL (destilliert) zu verzeichnen. Acetonitril z.A. folgt danach. Basislinien mit negativer Steigung sind bei den Qualitäten „gradient grade“ zu erkennen.

Eine zusätzliche Methode zur Qualitätsprüfung bestand in der Aufnahme von UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 – 400 nm. Diese Messungen wurden am UV/VIS-Spektrometer CARY 50 (Fa. Varian, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dabei verwendet man Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke, in denen die verschiedenen Elutionsmittel unverdünnt vermessen wurden. Als Referenz diente bidestilliertes Wasser. Die aufgezeichneten Spektren sind in Abbildung 88 (Anhang) illustriert.

Deutlich erkennt man die unterschiedlich starken Extinktionen der untersuchten Elutionsmittel.

Verknüpft man die Ergebnisse der beiden Methoden, so erhält man einen linearen Zusammenhang der beiden Größen. Dies ist in Abbildung 60 graphisch dargestellt.

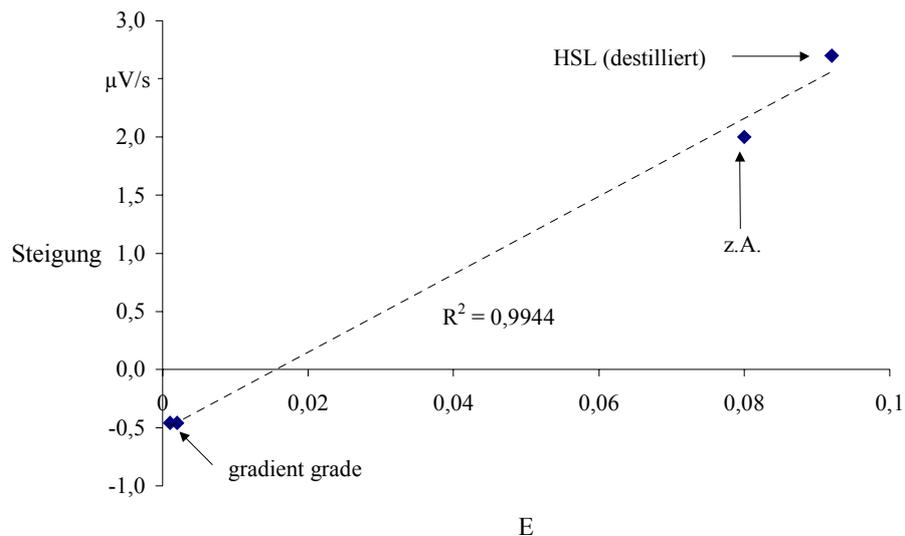


Abbildung 60: Steigung der Basislinien vs. Extinktion ( $\lambda = 235 \text{ nm}$ ) unterschiedlicher Acetonitril-Proben

In dieser Abbildung sind auf der Ordinate die Extinktionen ( $\lambda = 235 \text{ nm}$ ) und auf der Abszisse die Steigungen der unterschiedlichen Acetonitril-Proben aufgetragen. Die Darstellung zeigt die höchste Extinktion und größte Steigung bei der destillierten HSL-Probe. Durch Destillation konnten die UV-aktiven Substanzen nicht entfernt werden. Acetonitril z.A. weist ebenfalls eine hohe Extinktion und eine hohe Steigung auf. Dies spricht für UV-aktive Verunreinigungen. Das Acetonitril der Qualität gradient grade hat die niedrigste Extinktion bei 235 nm und besitzt eine negative Steigung. Normalerweise hätte man eine geringe Steigung mit positivem Vorzeichen erwartet. Eine Ursache für den negativen Wert könnte am Druckabfall während der Gradientenelution sein.

#### 4.1.3 Diskussion

Mit den oben beschriebenen Messmethoden ist eine schnelle Einschätzung über die relative Qualität der verwendeten mobilen Phasen in der HPLC möglich. Wie in der SFC-Methode (Kap. 3.3) geben die Steigungen der Basislinien unter Anwendung eines Gradienten zuverlässig die Reinheit der Proben wieder.

## 4.2 Optimierung der Trennung von Pyrethrinen

In diesem Kapitel werden Säulentemperatur und Eluenszusammensetzung getestet. Aus Chromatogrammen mit unterschiedlichen Fließraten werden Van-Deemter-Kurven berechnet. Hieraus sollen optimale chromatographische Parameter für die Trennung der Pyrethrine ermittelt werden.

Die in der Literatur [54] angegebene Eluenszusammensetzung und Fließrate führte bei dem in dieser Studie verwendeten HPLC-System zu unzureichender Substanztrennung. Daher wurde ein linearer Anstieg des Acetonitrils in der mobilen Phase bei einer konstanten Flussrate von 0,6 ml/min untersucht. Es zeigte sich, dass eine gute Trennung bei einem Anstieg des Acetonitrilgehaltes von 40 % bis 65 % innerhalb 60 min erzielt wurde. Säulentemperaturen von 20 °C, 30 °C und 35 °C hatten keinen Einfluss auf die Chromatographie. Allerdings war der gemessene, maximale Säulenvordruck von 0,8 MPa bei 35 °C am geringsten. Durch die höhere Temperatur des Eluenten verringerte sich die Viskosität. Die Säule wurde mit geringerem Widerstand von der mobilen Phase bei gleichbleibender Fließrate durchströmt. Dies hatte einen geringeren Druck zur Folge. Da ein geringer Druck die Säule schont, wurde die Säulentemperatur auf 35 °C gehalten.

Um eine optimale Fließrate zu bestimmen, wurden sowohl der Pyrethrin-Standard (PyrStd1) als auch der Pyrethroid-Standard (AFP-Std1) eingesetzt. Die Variation der Fließrate wurde für den Pyrethroid-Standard innerhalb 0,4 und 2,0 ml/min durchgeführt. Aus der Durchflusszeit ( $t_0$ ) einer Inertsubstanz (Wasser) und der Säulenlänge ( $L$ ) kann die mittlere Lineargeschwindigkeit ( $u$ ) berechnet werden.

$$u = L / t_0 \quad (\text{Gl. 14})$$

Abbildung 61 zeigt ein Chromatogramm des Pyrethroid-Standards. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Dies entspricht einer Lineargeschwindigkeit ( $u$ ) von 3,3 mm/s.

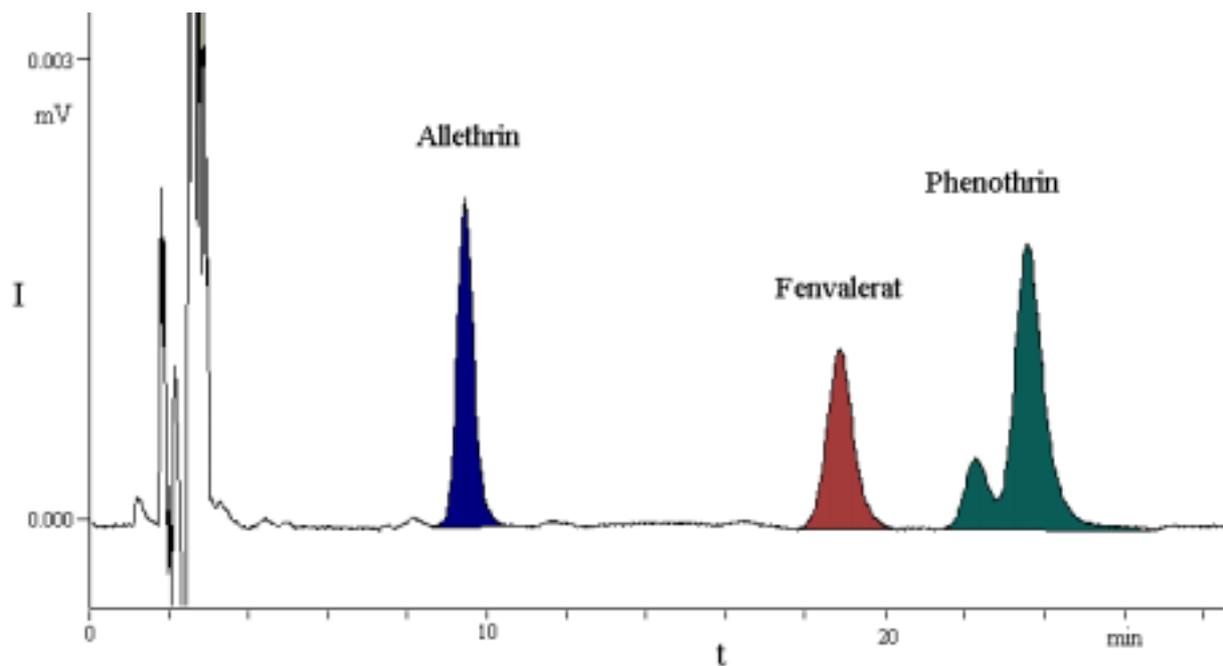


Abbildung 61: HPLC-Chromatogramm eines Pyrethroid-Standards; Säule: RP-18, L: 250 mm, ID: 4mm; Eluent: Acetonitril/ Wasser (60 % / 40 %); Temperatur: 35 °C; Detektionswellenlänge: 235 nm

Allethrin eluiert nach einer Retentionszeit ( $t_R$ ) von 9,39 min. Fenvalerat wird nach 18,81 min detektiert. Phenothrin besitzt einen Doppelpack, der durch Isomere hervorgerufen wird. Für die Auswertung wird die Retentionszeit (23,52 min) des Hauptpeaks verwendet.

Die Retentionszeiten werden in der RP-HPLC mit abnehmender Polarität der Analyte länger und somit die Kapazitätsfaktoren ( $k'$ ) größer. Aus Abbildung 61 ist eine solche Reihenfolge mit abnehmender Polarität von Allethrin über Fenvalerat bis zum Phenothrin zu entnehmen. Insofern ist aufgrund der größeren Polarität die Löslichkeit von Allethrin in Wasser größer als die von Fenvalerat bzw. Phenothrin. Dies wird durch die in der Literatur angegebenen Löslichkeiten von Allethrin mit 4,6 mg/l (20 °C), Fenvalerat mit 1,0 mg/l (20 °C) und Phenothrin mit 2,0 mg/l (30 °C) bestätigt [144].

Durch die Aufnahme von Van-Deemter-Kurven lässt sich eine geeignete Fließrate für das chromatographische System ableiten.

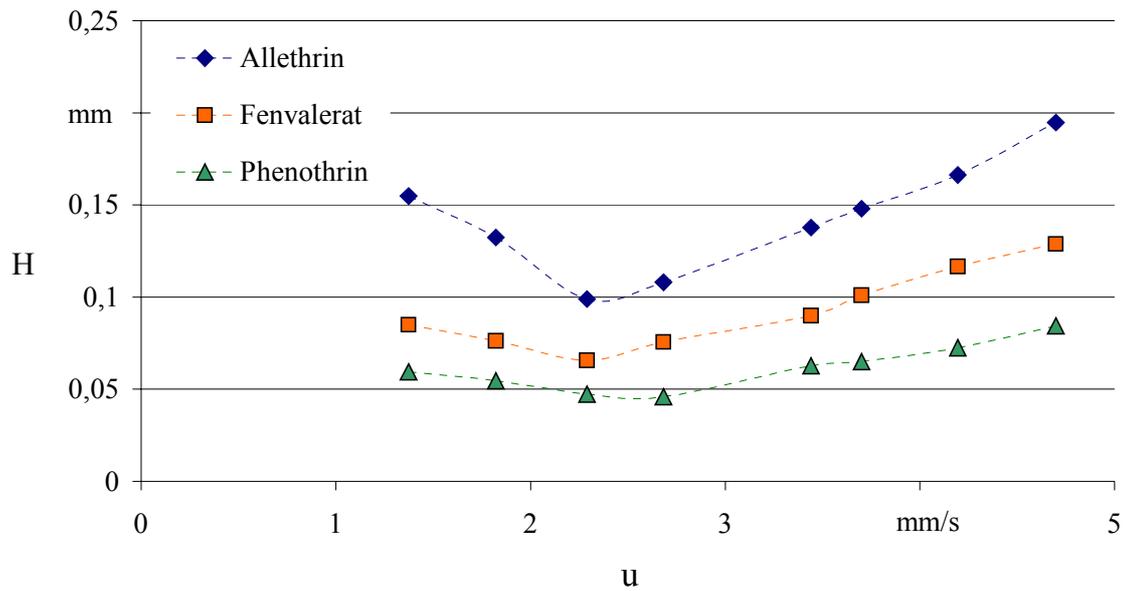


Abbildung 62: Van-Deemter-Kurve: Allethrin, Fenvalerat und Phenothrin;

Eluent: Acetonitril/ Wasser (60 % / 40 %); Temperatur: 35 °C; Detektionswellenlänge: 235 nm

In dieser Graphik (Abb. 62) ist die theoretische Bodenhöhe ( $H_{\text{theor}}$ ) der drei Insektizide gegen die Lineargeschwindigkeit ( $u$ ) aufgetragen. In den Graphen ist ein Minimum bei einer Lineargeschwindigkeit von 2,3 – 2,6 mm/s zu erkennen. Dies entspricht einer Fließrate von 1,0 – 1,2 ml/min.

Die Variation der Fließrate zur Trennung der Pyrethrine wurde in einem Bereich von 0,6 ml/min bis 1,0 ml/min getestet. Die beste Trennung wurde bei einer Fließrate von 0,9 ml/min erzielt. Im Anschluss daran wurden Experimente zur Separierung der Pyrethrine mit unterschiedlichen Acetonitril/Wasser-Gradienten durchgeführt. In Tabelle 15 sind die Parameter der optimierten Trennung aufgelistet.

Tabelle 16: Parameter zur Trennung von Pyrethrinen in der HPLC

Vorsäule	LiChrospher® 100 RP-8 (10µm)		
Säule	LiChrospher® 100 RP-8 (5µm)		
Fließrate	0,9 ml/min		
Temperatur	35 °C		
Gradient	t	H <sub>2</sub> O	Acetonitril
	[min]	[%]	[%]
	0	60	40
	60	35	65

Ein Chromatogramm von Pyrethrinen ist in Abbildung 63 aufgezeigt.

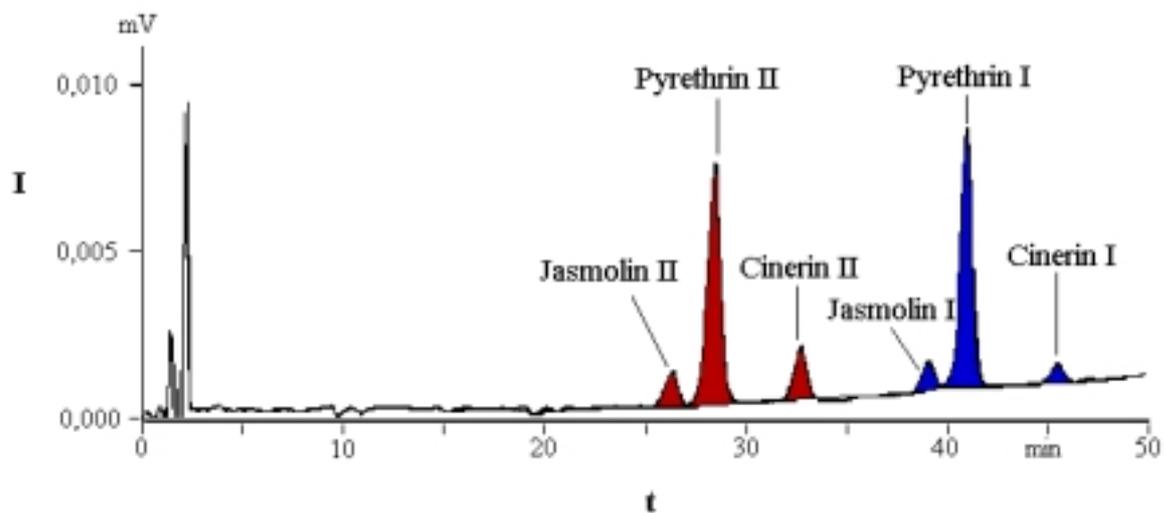


Abbildung 63: HPLC-Chromatogramm von Pyrethrinen

Die zu untersuchenden Pestizide sind basisliniengetrennt. Aus dem Chromatogramm wurden chromatographische Kenngrößen berechnet, um die Leistungsmerkmale dieser Methode zu beschreiben. Sie sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Chromatographische Kenngrößen von Pyrethrinen in der HPLC

Substanz	$k'$	$N_{\text{theor}}$	$H_{\text{theor}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\alpha$	$R_s$
Jasmolin II	15,47	8480	14,7	1,09	4,47
Pyrethrin II	16,79	9889	12,6	1,16	8,35
Cinerin II	19,42	8340	15,0	1,20	9,72
Jasmolin I	23,37	14662	8,5	1,05	3,67
Pyrethrin I	24,53	20362	6,1	1,12	8,74
Cinerin I	27,37	25148	5,0		

Die theoretischen Bodenhöhen sind in einem Bereich zwischen 5,0  $\mu\text{m}$  (Cinerin I) und 14,7  $\mu\text{m}$  (Jasmolin II) angesiedelt. Es wurden theoretische Bodenzahlen zwischen 8340 (Cinerin II) und 25148 (Cinerin I) berechnet. Die Auflösung  $R_s$  zwischen den Substanzen ist in allen Fällen größer als der geforderte Mindestwert von 1,5.

Die HPLC ermöglicht ein einfaches Sammeln einzelner Fraktionen während des chromatographischen Trennvorganges. Durch manuelles Fraktionensammeln konnten Lösungen mit einzelnen Pyrethrinen gewonnen werden.

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurde die Probe viermal injiziert und die Retentionszeiten und die Peakflächen der sechs Insektizide verglichen. Die relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten sind kleiner als 0,5 %. Die relativen Standardabweichungen der Flächen für Pyrethrin I und II werden mit 0,9 % beziffert. Eine größere Abweichung von maximal 8,6 % wird für die übrigen Pestizide angegeben. Hieraus wird deutlich, dass die Abweichungen bei den Flächen von Pyrethrin I und II innerhalb der Messungen am geringsten sind. Im Vergleich zu den übrigen Peaks besitzen sie eine weitaus größere Peakfläche, so dass sich Abweichungen bei der Integration prozentual nur wenig äußern. Die Konzentration dieser beiden Substanzen liegt in einem für die Detektion optimalen Messbereich. Ein anderes Bild zeigt sich bei den übrigen Verbindungen. Die Konzentration liegt hier nahe an der Nachweisgrenze. Durch die Integration können auf diese Art hohe prozentuale Abweichungen entstehen.

Für quantitative Analysen ist es erforderlich, Linearität und Kalibrierfunktionen zu bestimmen. Diese wurden mit einer 7-Punkt-Kalibrierung ermittelt. Tabelle 18 beinhaltet neben Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Insektizide auch die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten (R).

Tabelle 18: Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Allethrin und der Einzelpyrethrine in der HPLC ( $\lambda = 235 \text{ nm}$ )

<b>Substanzen</b>	<b>R</b>	<b>LOD (mg/l)</b>	<b>LOQ (mg/l)</b>
<b>Allethrin</b>	0,997	0,267	0,800
<b>Jasmolin II</b>	0,997	0,435	1,446
<b>Pyrethrin II</b>	0,998	0,305	1,008
<b>Cinerin II</b>	0,999	0,022	0,074
<b>Jasmolin I</b>	0,998	0,299	0,967
<b>Pyrethrin I</b>	0,999	0,297	0,980
<b>Cinerin I</b>	0,997	0,264	0,852

Aus Tabelle 18 geht hervor, dass die Nachweisgrenzen im oberen ppb-Bereich liegen. Die niedrigste Nachweisgrenze besitzt Cinerin II mit  $22 \mu\text{g/l}$ . Die übrigen Werte befinden sich in einem Bereich zwischen 260 und  $440 \mu\text{g/l}$ . Im direkten Vergleich mit der SFC-Methode (Kapitel 3.7) ist die HPLC-Methode um eine Zehnerpotenz, im Falle des Allethrins und Pyrethrin I und II um fast zwei Zehnerpotenzen empfindlicher. Bedenkt man jedoch, dass in der SFC-Methode das Injektionsvolumen  $0,1 \mu\text{l}$  beträgt und in der HPLC-Methode  $20 \mu\text{l}$  injiziert werden, so ist die absolut detektierte Substanzmenge in der SFC-Methode um das 2- bis 10-fache geringer.

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurden die Flächen einer Lösung von Bioallethrin in Isopropanol mehrmals innerhalb von acht Tagen vermessen. Die relative Standardabweichung betrug  $1,27 \%$ .

### 4.3 UV-Spektrometrische Untersuchung von Pyrethrinen und Pyrethroiden

Das Ziel der folgenden Experimente ist, UV-Spektren der Insektizide während des chromatographischen Trennprozesses aufzunehmen. Die erhaltenen Spektren der Substanzen in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch und in überkritischem Kohlendioxid werden miteinander verglichen. Zusätzlich sollen die Ergebnisse Aufschluss über mögliche solvatochrome Effekte liefern. Weiterhin soll die Identifizierung der untersuchten Pestizide an Hand von UV-Spektren durchgeführt werden. Ebenfalls werden aus den erhaltenen Daten die molaren Extinktionskoeffizienten der untersuchten Insektizide bei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelt.

#### 4.3.1 Experimentelles

##### Chemikalien

Für die UV-Messungen wurden Stammlösungen von einzelnen Pyrethroiden, vom Fluka Pyrethrum Extrakt und von Piperonylbutoxid in Acetonitril (ACN) hergestellt. Von diesen Lösungen ausgehend wurden unterschiedliche Verdünnungsreihen hergestellt.

##### Geräte

##### UV-Spektrometer

Als UV-Spektrometer kam das CARY 50 der Fa. Varian (Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Die Lösungen wurden mit 10 mm Quarzküvetten vermessen. Im Scan-Modus wurde die Extinktion (engl.: absorption) der Lösungen innerhalb eines Wellenlängenbereiches von 200 bis 360 nm gemessen. Die Daten wurden mit der Cary Varian Software (Version 01.00 (6)) aufgenommen. Die spektrale Auflösung wird vom Hersteller mit 1 nm angegeben.

##### HPLC-UV-Messungen

In die in Kapitel 4.2.1 beschriebene HPLC-Apparatur wurde hinter dem ABI-UV-Detektor ein weiterer UV-Detektor (Spectra Focus UV/VIS-Detektor) in Verbindung mit der Software PC 1000 (Fa. Thermo Separation Products) eingebaut. Bei diesem Detektor besteht die

Möglichkeit, Daten im single wavelength-modus, im triple wavelength-modus oder im scan-modus aufzuzeichnen. Die spektrale Auflösung des Detektors wird vom Hersteller mit 6 nm beziffert. Die verwendete HPLC-Detektorzelle besaß eine durchstrahlte Weglänge ( $d$ ) von 6 mm und einem Volumen von  $9 \text{ mm}^3$ .

### SFC-UV-Messungen

Für diese Studien wurde das MPS/225 der Fa. SUPREX (Pittsburgh, PA, USA), wie schon in Kapitel 3.2 beschrieben, verwendet. Als zusätzlicher Detektor wurde ein UV-Detektor (Spectra Focus) vor den FID positioniert. Das Zellenvolumen der druckstabilen SFC-Detektorzelle beträgt laut Herstellerangaben  $0,25 \text{ mm}^3$ , das  $1/70$  des Säulenvolumens entspricht. Peaden und Lee [145] berechneten bei einer 20 m langen Kapillarsäule (ID: 0,05 mm) ein Volumen der Detektorzelle von  $0,05 \text{ }\mu\text{l}$  bei einem Verlust an Auflösung von einem Prozent. Das Volumen der Detektorzelle entspricht bei der oben genannten Säulendimension ca.  $1/780$ . Vergleicht man die Quotienten ( $1/70$  und  $1/780$ ), so wird eine 11-fache Überdimensionierung der zur Verfügung stehenden Detektorzelle ersichtlich. Diese Zelle konnte daher nicht eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit der UV-Messung in der SFC bestand in der „on-column“ Messung. Hierbei wurde die schützende Polyimidschicht der eingesetzten Kapillar-Trennsäule (ca. 1 cm) vorsichtig mit einer Flamme entfernt und das offen liegende Quarzmaterial mit Aceton gereinigt. Mit einer speziellen Halterung (CE-Halterung) wurde die Kapillare vor dem Detektorfenster justiert. Da die UV-Messungen aufgrund der hohen Temperatur von  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  und aus baulichen Gründen nicht im Ofenraum des SFC-Gerätes durchgeführt werden konnten, musste ein Teil der Trennsäule aus dem Ofenraum des SFC-Gerätes herausgeleitet werden. Nach dem Passieren des Detektors führte man die Kapillare in den Ofenraum zurück, wo sie im FID endete. Die Länge der sich außerhalb des Ofens befindlichen Kapillare betrug 20 cm. Innerhalb dieser Strecke kühlte das Fluid von  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  auf Raumtemperatur ab. Durch auftretende Opaleszenz erhielt man Chromatogramme mit enorm hohem Rauschsignal.

Wie bei den SFC-MS-Experimenten (Kapitel 3.4.2) wurde auch hier der Zwischenraum (ca. 70 mm) zwischen Ofentür des SFC-Gerätes und UV-Detektor mit Steinwolle gegen die Außentemperatur abgeschirmt. Durch die Eigentemperatur des Detektors und des Ofens konnte eine Temperatur an der UV-Messzelle von  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  aufrecht gehalten werden. Durch die konstante Temperatur wurde das hohe Signalrauschen unterbunden. Zudem konnte

gewährleistet werden, dass das Kohlendioxid im überkritischen Zustand blieb. Die UV-Messungen wurden somit mit überkritischem Kohlendioxid durchgeführt.

#### 4.3.2 Ergebnisse

Um die Eignung der verschiedenen UV-Detektorsysteme mit den unterschiedlichen chromatographischen Verfahren zu überprüfen, wurden Allethrin und Piperonylbutoxid als Testsubstanzen verwendet. Zudem wurden Spektren der untersuchten Substanzen bei verschiedenen Konzentrationen mit dem UV-Photometer Cary 50 aufgenommen. Abbildung 64 zeigt die UV-Spektren von Allethrin bei unterschiedlichen Konzentrationen.

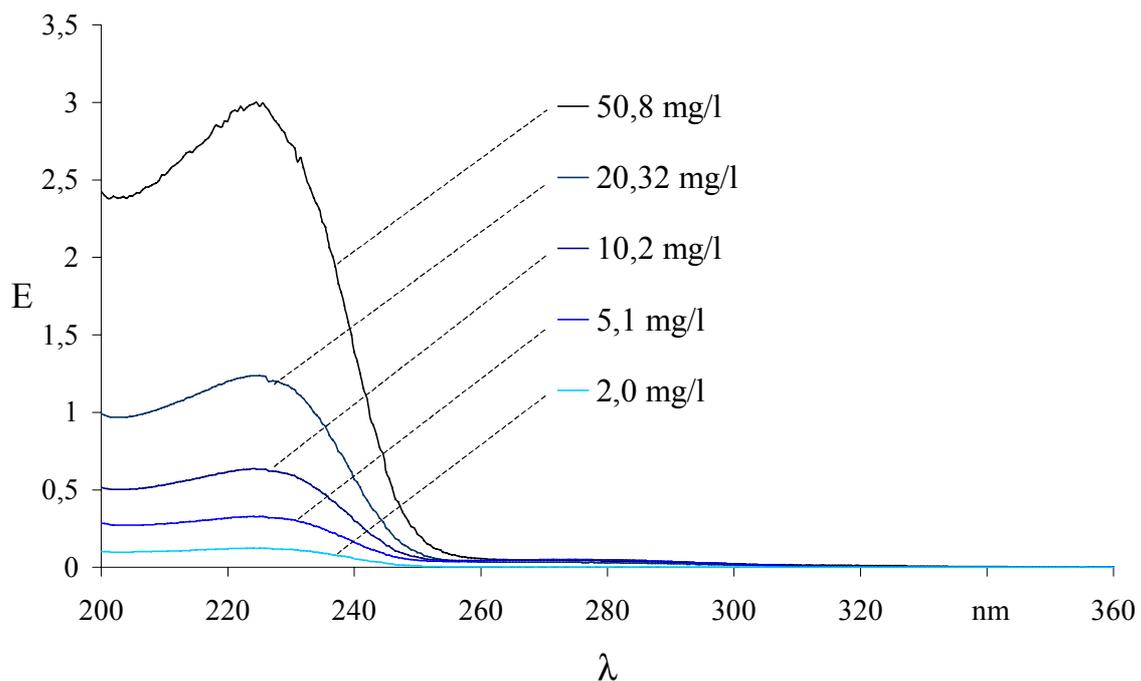


Abbildung 64: UV-Spektren von Allethrin bei unterschiedlichen Konzentrationen

Das Absorptionsmaximum befindet sich bei einer Wellenlänge von 225 nm. Eine Kalibrierung der Extinktion bezüglich der Konzentration bei drei unterschiedlichen Wellenlängen gibt Abbildung 65 wieder.

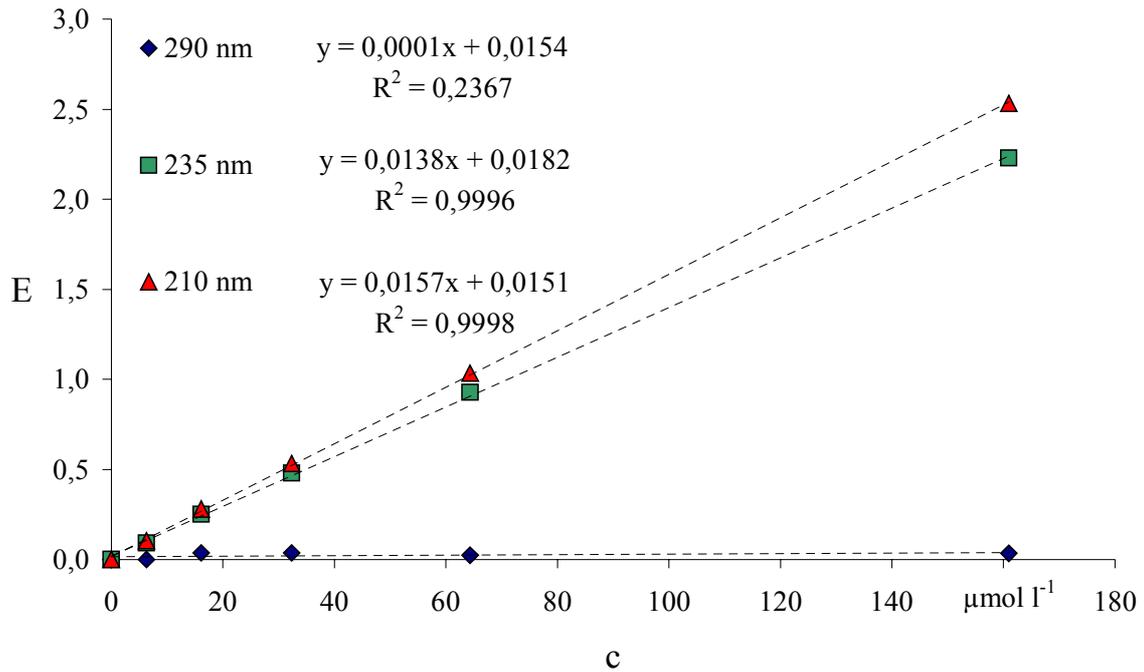


Abbildung 65: Auftragung der Extinktion von Allethrin gegen die Konzentration bei Wellenlängen von 210, 235 und 290 nm

Die Kalibrierung wurde bei den Wellenlängen von 210 nm, 235 nm und 290 nm durchgeführt. Eine Linearität ist bei den Wellenlängen 210 nm und 235 nm gegeben, was sich in den Korrelationskoeffizienten widerspiegelt. Bei einer Wellenlänge (290 nm) mit geringer Extinktion ist ein linearer Zusammenhang nicht mehr gewährleistet.

In Abbildung 66 ist die Kalibrierung von Piperonylbutoxid bezüglich der Extinktion und Konzentration bei den oben erwähnten Wellenlängen angezeigt.

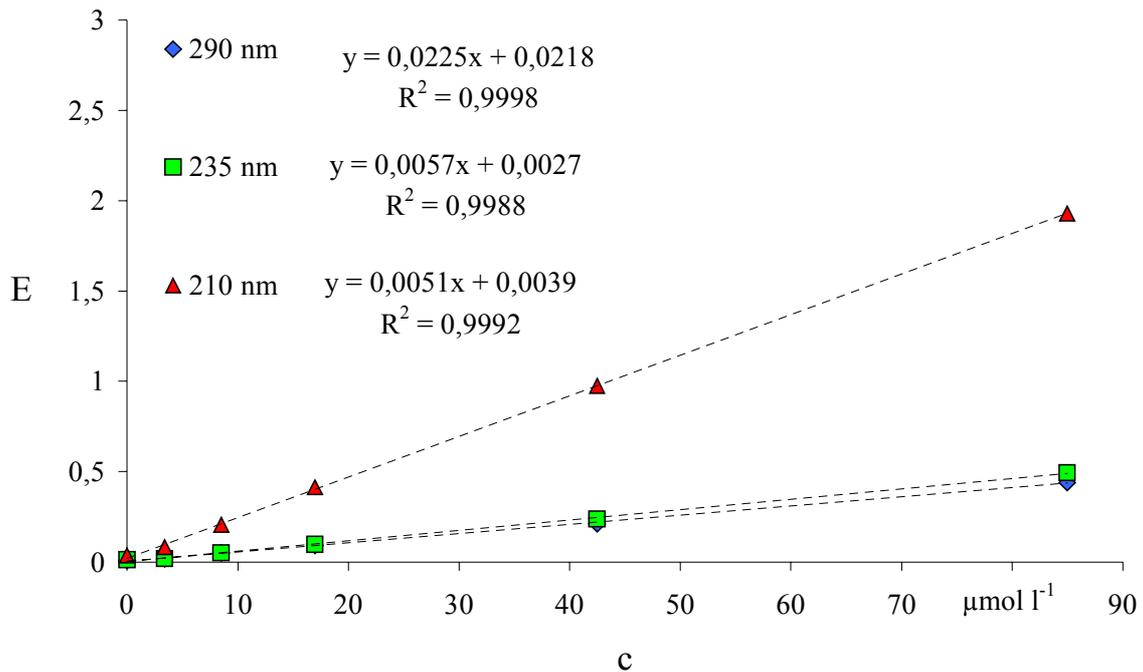


Abbildung 66: Auftragung der Extinktion von Piperonylbutoxid gegen die Konzentration bei Wellenlängen von 210, 235 und 290 nm

Bei allen drei Wellenlängen ist die Linearität deutlich zu erkennen.

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz wird die Extinktion (E) nach folgender Gleichung berechnet:

$$E = c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (\text{Gl. 15})$$

wobei:

- c: Konzentration ( $\text{mol l}^{-1}$ )
- $\varepsilon$ : molarer Absorptions- oder Extinktionskoeffizient ( $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
- d: durchstrahlte Weglänge (cm)

ist.

Dividiert man die Steigung (a) der Kalibriergeraden durch die durchstrahlte Weglänge (d), so erhält man den molaren Extinktionskoeffizient der entsprechenden Substanz bei gegebener Wellenlänge.

Abbildung 67 illustriert die molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon$  von Allethrin und Piperonylbutoxid innerhalb eines Bereiches von 200 bis 300 nm.

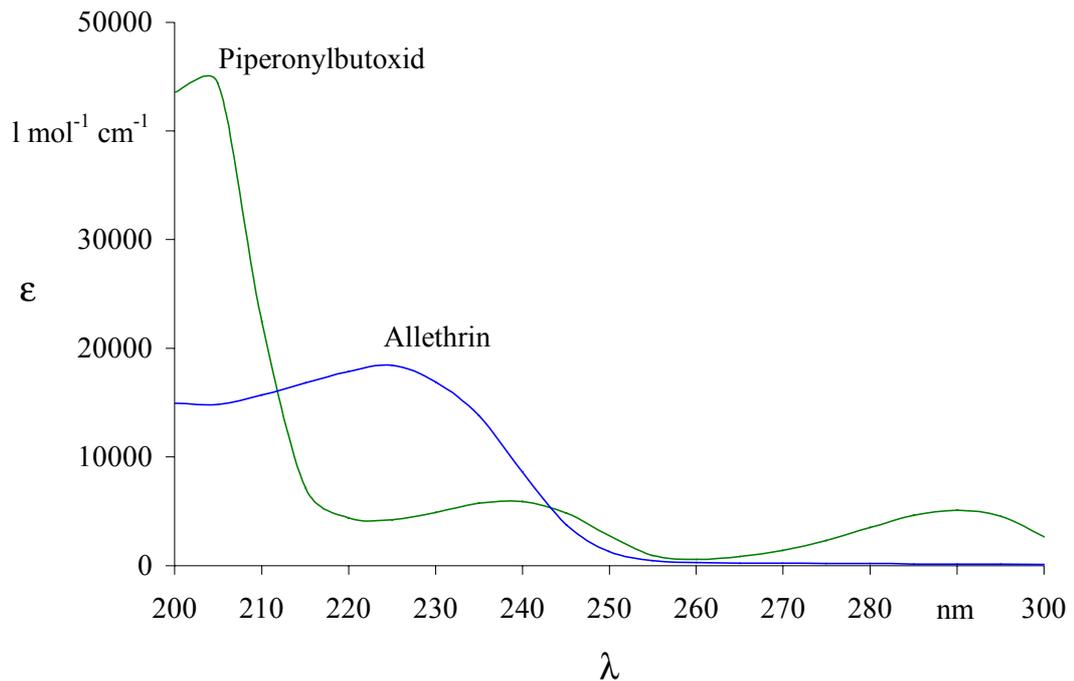


Abbildung 67: Molare Extinktionskoeffizienten von Allethrin und Piperonylbutoxid in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Piperonylbutoxid besitzt 3 Extinktionsmaxima. Sie befinden sich bei Wellenlängen von 205 nm, 238 nm und 290 nm. Extinktionsminima sind bei 222 nm und 260 nm zu verzeichnen. Allethrin besitzt ein Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 225 nm von  $18400 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Von 250 bis 300 nm wird eine geringe Extinktion registriert. In den Abbildungen 86 bis 89 (siehe Anhang 8.4) erkennt man, dass die dort abgebildeten übrigen Pyrethroide untereinander ähnliche Spektren aufweisen. Sie besitzen einen hohen Extinktionskoeffizient von ca.  $50000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 200 nm. Dieser sinkt kontinuierlich bis zu einer Wellenlänge von 250 nm auf ca.  $1000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Tabelle 19 illustriert die molaren Extinktionskoeffizienten der Pyrethroide und Piperonylbutoxid bei der Detektionswellenlänge von 235 nm und 290 nm.

Tabelle 19: Molare Extinktionskoeffizienten der Pyrethroide und Piperonylbutoxid bei 235 und 290 nm

Substanz	$\epsilon$ ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	
	$\lambda = 235 \text{ nm}$	$\lambda = 290 \text{ nm}$
Allethrin	13804	110
Phenothrin	8913	100
Permethrin	12882	200
Cypermethrin	13804	537
Fenvalerat	12023	501
Deltamethrin	16218	832
Piperonylbutoxid	5754	5129

Die Pyrethroide besitzen bei einer Wellenlänge von 235 nm einen um 2-3fach größeren Extinktionskoeffizienten als Piperonylbutoxid. Bei einer Wellenlänge von 290 nm beträgt der Extinktionskoeffizient von Piperonylbutoxid  $5129 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . In der Literatur wird der Extinktionskoeffizient mit  $4,6 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ m}^{-1}$  angegeben [146].

Vergleicht man den Extinktionskoeffizient von PBO mit dem der Pyrethroide, so ist der Extinktionskoeffizient von Piperonylbutoxid 6 bis 50 mal größer als der der Pyrethroide. In weiteren Experimenten wurden die mit dem Cary 50 erhaltenen Ergebnisse mit dem UV-Detektor Spectra Physics überprüft. Dabei wurde während der chromatographischen Trennung abschnittsweise ein Wellenlängenbereich von 200 bis 360 nm gescannt.

Abbildung 68 zeigt 3 Piperonylbutoxid-Spektren, die mit dem UV-Spektrometer Cary 50 und mit dem UV-Detektor Spectra Focus in der HPLC und SFC aufgenommen wurden.

Die Aufzeichnung des Spektrums durch das UV-Spektrometer bestätigen die Extinktionsmaxima bei 239 nm und 290 nm. In der SFC- und HPLC-Methode ist eine Verschiebung der Extinktionsmaxima zu kurzen Wellenlängen zu verzeichnen. Bei dem Maximum von 239 nm ist eine Verschiebung um 9 nm und bei 290 nm um 7 nm erkennbar. Die Proben wurden in der UV-photometrischen Bestimmung in Acetonitril gelöst. In der HPLC-Methode wird ein Wasser/Acetonitril-Gemisch als Lösemittel verwendet. Die Analyten sind in der SFC-Methode in überkritischem Kohlendioxid gelöst. Eine mögliche Wellenlängenverschiebung ist mit solvatochromen Effekten zu erklären [147]. Ein Grund könnte in den verschiedenen Polaritäten von Acetonitril und Kohlendioxid sein. Allerdings ist

die Verschiebung in der HPLC-Methode, in der ein Acetonitril/Wasser-Gemisch eingesetzt wurde, nicht zu erklären. Bei einer spektralen Auflösung des UV-Detektors (Spectra Focus) von 6 nm sind die Abweichungen signifikant groß. Daher kann man zu dem Schluss gelangen, dass der UV-Detektor um 7 – 8 nm zu niedrigeren Wellenlängen dejustiert ist.

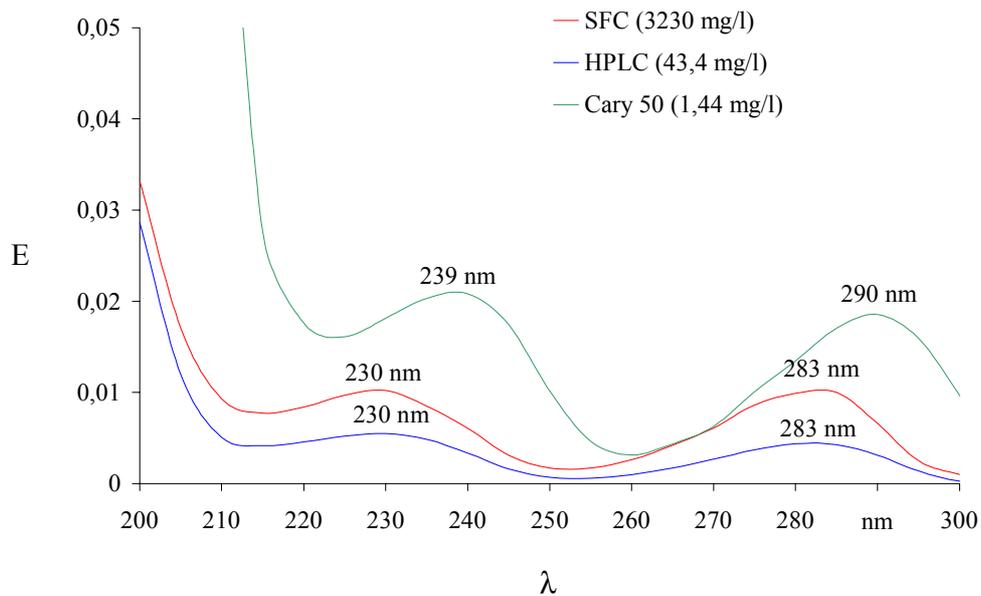


Abbildung 68: UV-Spektren von Piperonylbutoxid bei unterschiedlichen Messmethoden

Das gleiche Resultat ist in Abbildung 69 zu sehen, in der Allethrin-Spektren unterschiedlicher Messmethoden dargestellt sind.

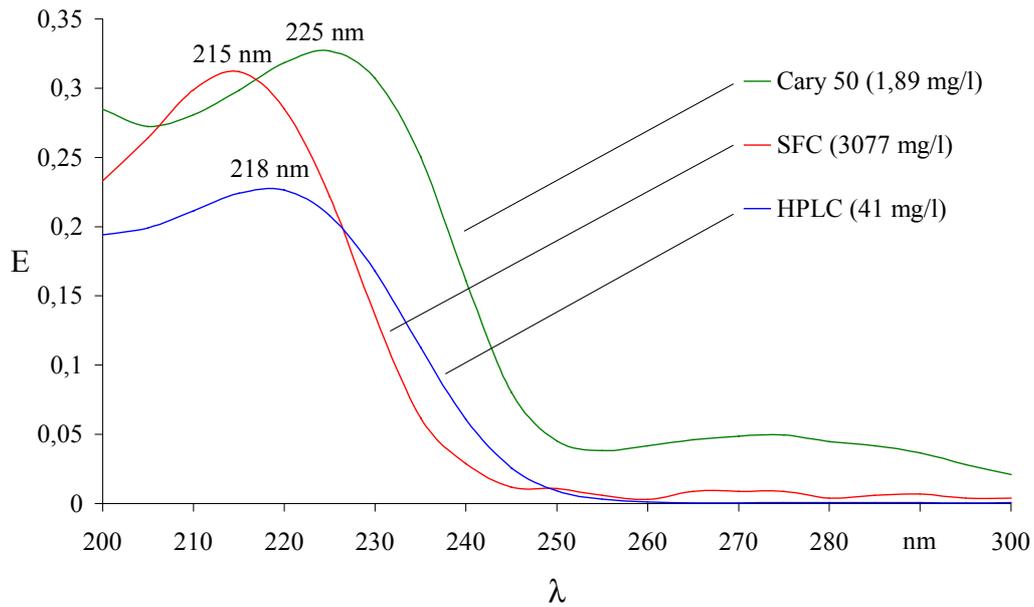


Abbildung 69: UV-Spektren von Allethrin bei unterschiedlichen Messmethoden

Abbildung 70 zeigt die UV-Spektren der sechs Pyrethrine und des Eluenten, aufgezeichnet mit dem UV-Photometer Cary 50. Die Pyrethrine wurden durch halbpräparatives, fraktioniertes Sammeln der Substanzen in der HPLC (vgl. S. 84) erhalten.

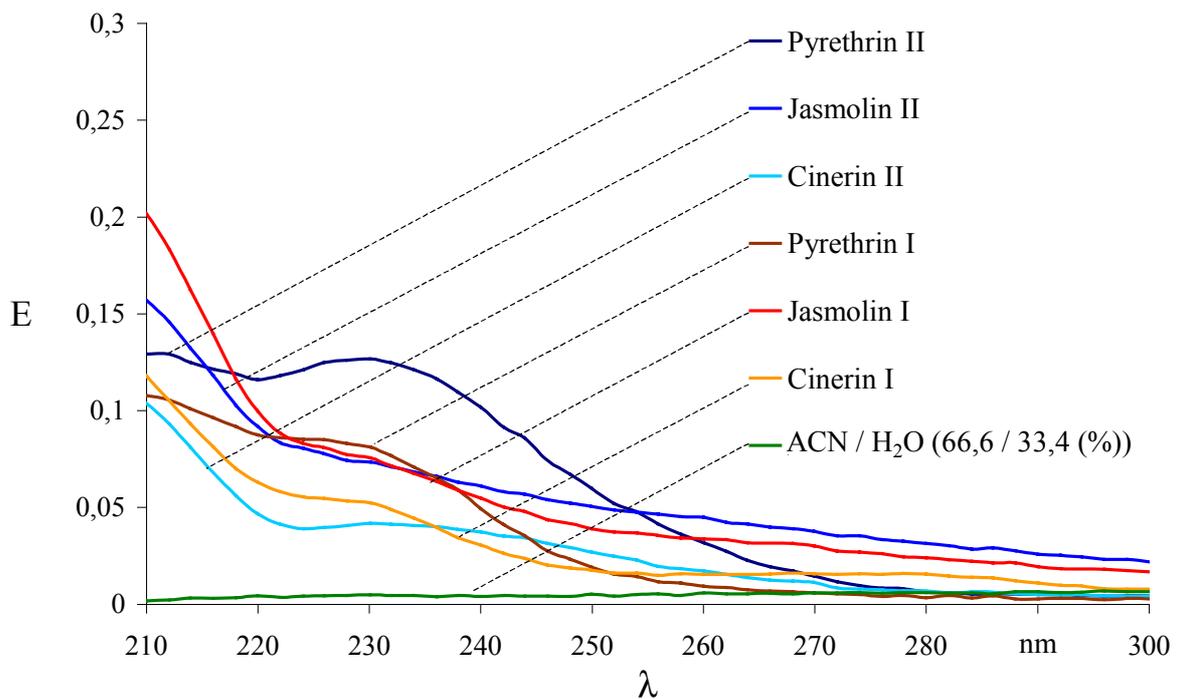


Abbildung 70: UV-Spektren der Pyrethrine

Tabelle 20 beinhaltet die Extinktionsmaxima der Pyrethrin, die durch die unterschiedlichen Messmethoden erhalten wurden.

Tabelle 20: Vergleich von UV-Maxima der Pyrethrine bei den verschiedenen spektrometrischen Verfahren

Substanz	Lit.[148]	Spektrometrisches Verfahren		
		Cary 50	Spectra Focus	
			HPLC	SFC
<b>Cinerin I</b>	221 nm	222 ± 0,5 nm	218 ± 3 nm	225 ± 3 nm
<b>Jasmolin I</b>	219 nm	—	—	220 ± 3 nm
<b>Pyrethrin I</b>	223 nm	224 ± 0,5 nm	218 ± 3 nm	220 ± 3 nm
<b>Cinerin II</b>	229 nm	230 ± 0,5 nm	228 ± 3 nm	222 ± 3 nm
<b>Jasmolin II</b>	229 nm	—	226 ± 3 nm	220 ± 3 nm
<b>Pyrethrin II</b>	228 nm	229 ± 0,5 nm	222 ± 3 nm	220 ± 3 nm

Die aufgelisteten Maxima weisen differenzierte Werte auf. Dabei sind die erhaltenen Extinktionsmaxima der Pyrethrine von der UV-potometrischen Methode mit den Literaturwerten identisch. Die Daten des UV-Detektors liegen um 3 – 9 nm zu niedrig.

Dies zeigt, dass der UV-Detektor Spectra Focus für qualitative Messungen im Scan-Modus nur bedingt einsetzbar war. Quantitative Bestimmungen sind allerdings nicht beeinträchtigt.

#### 4.4 Löslichkeitsbestimmung von Allethrin in Wasser

Die HPLC birgt den Vorteil, Pyrethrine und Pyrethroide in wässrigen Medien direkt zu messen. Eine zeitaufwendige Derivatisierung und Extraktion wie bei der GC ist nicht notwendig. In diesem Kapitel soll die Analyse von Allethrin und der Pyrethrine in aquatischen Systemen untersucht werden. Neben dem Einsatz der Produktkontrolle oder Steuerung technischer Prozesse sollen auch Gehalte in Oberflächenwasser bestimmt werden. Dabei ist die Löslichkeit der Analyte in Wasser bei verschiedenen Temperaturen von großer Bedeutung. Sie weist auf den einzustellenden Kalibrierbereich hin. Wie oben erwähnt, beträgt die Löslichkeit des Allethrins in Wasser bei 20 °C 4,6 mg/l. Die der Pyrethrine wird mit „sehr gering“ angegeben [136]. Die Löslichkeitsbestimmung von Pyrethrinen in Wasser erwies sich als äußerst problematisch. Da es keine Einzelstandards der Pyrethrin gibt, ist es nicht möglich, die Löslichkeit eines einzelnen Pyrethrins zu bestimmen. Da man auf Blütenextrakte zurückgreifen muss, wird durch die Anwesenheit zusätzlich extrahierter Pflanzeninhaltsstoffe unterschiedlicher Polarität (Kohlenwasserstoffe, Terpene, Ester) die Löslichkeit der Pyrethrine in Wasser erhöht. Daher ist eine zuverlässige Aussage über die Löslichkeit der Pyrethrine nicht möglich.

Im folgenden soll die Wasserlöslichkeit an Hand der Modellsubstanz Allethrin untersucht werden. Die strukturelle Ähnlichkeit des Allethrins zu den Pyrethrinen lässt eine nahezu gleiche Löslichkeit vermuten.

##### 4.4.1 Experimentelles

###### Chemikalien

Allethrin (93,5 %) und entmineralisiertes Wasser wurden für diese Experimente verwendet.

In den ersten Versuchen wurden Lösungen bei 20 °C hergestellt, die eine 10- bis 100-fach höhere theoretische Konzentration bezüglich der maximalen Löslichkeit enthielten. Diese Lösungen wurden sowohl geschüttelt als auch mit Ultraschall behandelt. Durch die Emulgation mit Hilfe des Ultraschalls kam es zu einer unnatürlichen feinen Verteilung der Pyrethroidtröpfchen in der wässrigen Probe. Die gemessenen Konzentrationen der entstandenen Emulsionen überstieg die Löslichkeit um das 20-fache. Zentrifugieren (5000

U/min für 1h) oder Filtrieren der Emulsionen führten ebenfalls nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Zum einen kann man die Allethrintröpfchen in der Emulsion durch Zentrifugieren nicht trennen, da Allethrin mit 0,997 mg/l eine ähnliche Dichte wie Wasser besitzt. Zum anderen treten beim Filtrieren Adsorptionsphänomene an der Zellulose des Filterpapiers auf, die das Ergebnis verfälschen.

Diese Vorversuche lassen darauf schließen, dass die Durchmischung der Proben zu stark war. Dies hat zur Folge, dass eine Emulsionsbildung unterbunden werden muss. Im folgenden wurde die Apparatur, wie in Abbildung 71 dargestellt, verwendet. Sie bestand aus einem 100 ml Erlenmeyerkolben, der in eine thermostatisierte Flüssigkeit aus Glykol und Wasser (1 : 1) tauchte, und einem KPG-Rührer mit Glasrührstab. Auf den Boden des Kolbens wurde ein Tropfen (40 mg) des zu bestimmenden Pyrethroids aufgebracht. Danach wurde dieser vorsichtig mit 50 ml Wasser überschichtet. Ein Glasstab, der 10 mm über dem Tropfen im Wasser endete, diente als Rührstab. Die Umdrehungszahl des Rührers betrug 20 U/min. Die Löslichkeiten wurden bei 5, 10, 15 und 20 °C bestimmt. Die Temperatur des Glykol-Wasser-Gemisches wurde mit einem Kryostat eingestellt.

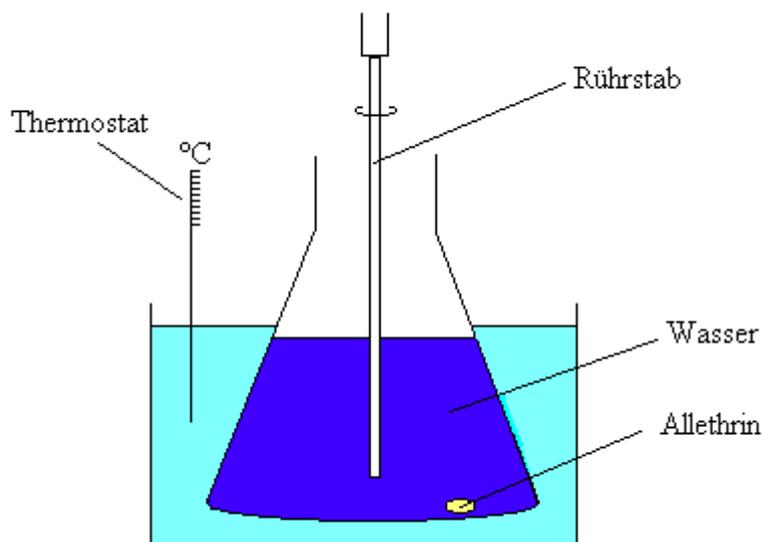


Abbildung 71: Apparatur zur Messung von Löslichkeiten

Aus dem Kolben wurden innerhalb einer Woche verschiedene Proben (500 µl) entnommen. Um die Abnahme der Wassermenge durch die Probennahme und Verdunsten auszugleichen, gab man täglich 1 ml Wasser zu der Testlösung.

#### 4.4.2 Ergebnisse

Als Beispiel ist die Löslichkeit von Allethrin bei einer Temperatur von 20 °C in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet (Abb. 72).

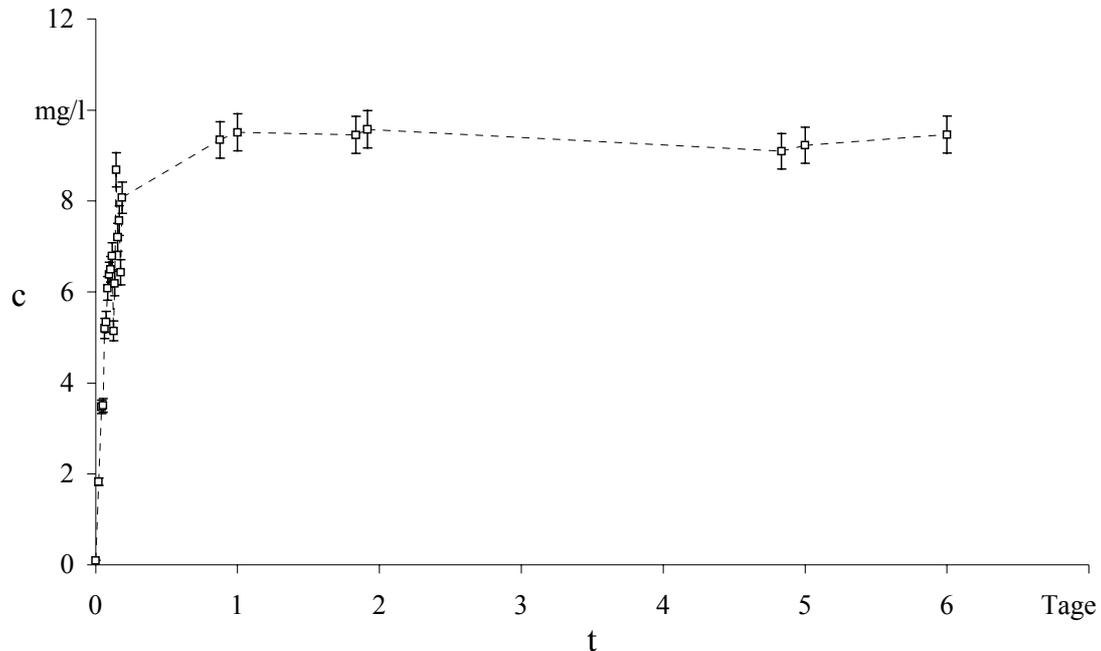


Abbildung 72: Löslichkeit von Allethrin in Wasser bei 20 °C

Die Konzentration steigt innerhalb eines Tages kontinuierlich auf einen Wert von 9,1 mg/l an. Danach bleibt der Wert in den darauffolgenden 5 Tagen konstant.

Abbildung 73 zeigt die Löslichkeit von Allethrin in Wasser in Abhängigkeit von der Wassertemperatur.

Die geringste Löslichkeit von 2,2 mg/l wird bei einer Temperatur von 5 °C gemessen. Die Löslichkeit steigt von 4,3 mg/l bei 10 °C über 5,6 mg/l bei 15 °C bis hin zu 9,4 mg/l bei 20 °C. Die in dieser Studie gemessene Löslichkeit bei einer Wassertemperatur von 20 °C ist um den Faktor 2 größer als die in der Literatur angegebene. Dies kann durch Verunreinigungen in der Allethrinprobe (95 % Reinheit) oder im Deionat hervorgerufen werden, die eine erhöhte Löslichkeit vorgeben.

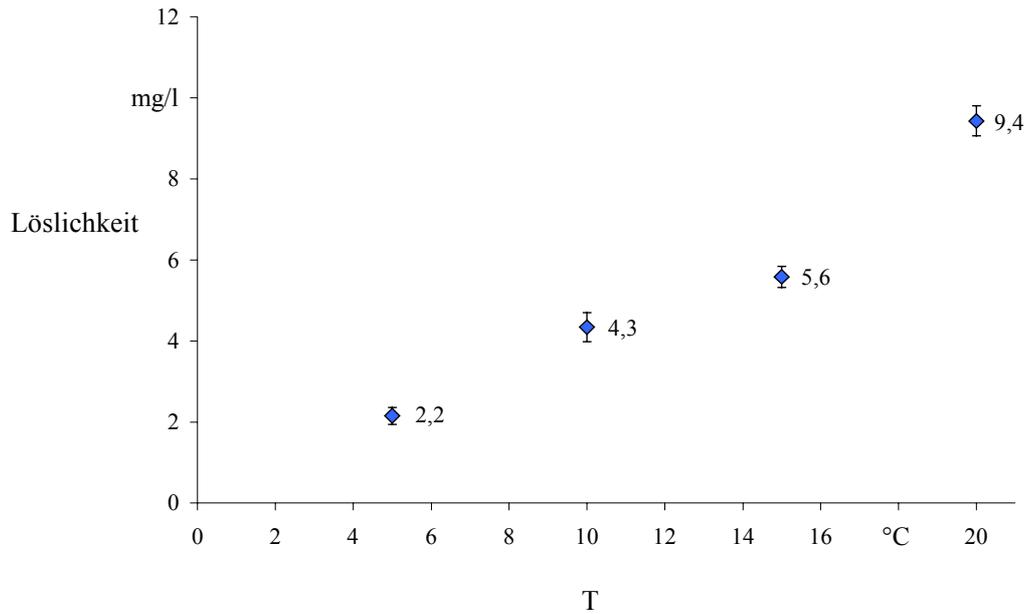


Abbildung 73: Löslichkeit von Allethrin in Wasser bei 5, 10, 15 und 20 °C

Das Ergebnis dieser Experimente zeigt, dass die Löslichkeit durch Temperatur und von Verunreinigungen im Wasser beeinflusst wird. Daher ist die maximale Löslichkeit von Allethrin in Oberflächenwasser, in denen sich Huminstoffe und andere organische Substanzen befinden, höher als der Literaturwert anzusehen. Aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur der natürlichen Wirkstoffe sind die erworbenen Erkenntnisse der Allethrin-Löslichkeit auf Pyrethrine übertragbar. Dies lässt einen Konzentrationsbereich von Spuren der Pyrethrine (ppt) bis zu 100 ppm in Wasser vermuten.

## 4.5 SPE-Probenvorbereitung von Pyrethrinen in aquatischen Systemen

In Oberflächenwässern werden meistens nur Spuren von Insektiziden eingetragen. Die Konzentration der Pestizide befindet sich weit unterhalb der Nachweisgrenze. Daher ist ein Anreicherungsverfahren notwendig, so dass die Substanzkonzentration im Kalibrierbereich der Messmethode liegt. Die Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraktion, SPE) ist heute die Extraktionsmethode der Wahl für flüssige Proben. Sie dient zum einen zur Abtrennung von störenden Matrixkomponenten in einer Probe (clean up). Zum anderen ermöglicht sie die Anreicherung der Analyte aus wässrigen Systemen [149, 150]. Im allgemeinen birgt die im off-line betriebene SPE viele, z.T. zeitaufwendige Einzelschritte in sich. Daher wurde in die HPLC-Methode eine on-line Methode der Fa. Merck integriert.

### 4.5.1 Experimentelles

Ein OSP-2A-Festphasenextraktor (Fa. Merck) wurde in die HPLC-Apparatur integriert. Die Anreicherung erfolgt dabei über Kartuschen, die säulenähnliche RP-Materialien als Adsorbens beinhalten. In diesen Experimenten wurden RP-8- und RP-18-Phasen getestet (OSP-2 Kartusche LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-8 (5 µm) und LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (10 µm)). Der Aufbau des Festphasenextraktors gestattet es, die wässrige Probe durch eine Kartusche zu pumpen, in der sich aufgrund der schlechten Elutionswirkung des Wassers die organischen Analyte am Adsorbens anreichern. Da das System vollständig abgeschlossen ist, wird die angereicherte Probe im on-line Betrieb ohne Verluste durch die mobile Phase der HPLC auf die Säule transferiert.

Die zur Anreicherung eingesetzten Kartuschen wurden zuvor mit je 10 ml Essigsäure-ethylester (z.A.), 10 ml Methanol (destilliert), 10 ml Acetonitril (gradient grade) und 10 ml Wasser konditioniert.

Allethrin und Pyrethrin gespiktes, entmineralisiertes Wasser dienten als Probe. Dabei wurden 50 ml des Wassers mit einer definierten Pestizidmenge dotiert und mit einer Fließrate von 2 ml/min über die Kartusche gepumpt.

#### 4.5.2 Ergebnisse

Zunächst wurde die Wiederfindung der Substanzen untersucht. Dabei wurde die Fläche einer über das Injektionsventil (20 µl) direkt injizierten wässrigen Probe (P1) mit der einer mit 20 µl aus P1 dotierten 50 ml Probe verglichen. Es stellte sich heraus, dass das RP-8-Material aufgrund geringer Kapazität und schlechter Wiederfindung (< 40 %) ungeeignet war. Mit dem in Kapitel 4.3 aufgeführten Startgemisch der Eluenten konnten Wiederfindungen bei dem RP-18 Material bis 60 Prozent erzielt werden. Eine Modifizierung des Eluentengradienten, bei dem zu Beginn 10 Sekunden lang mit reinem Acetonitril die Kartusche durchspült wurde, erzielte Wiederfindungen zwischen 90 und 100 Prozent. Abbildung 74 zeigt Chromatogramme einer mit 20 µl aus P1 dotierten Wasserprobe und einer direkt injizierten Probe (P1).

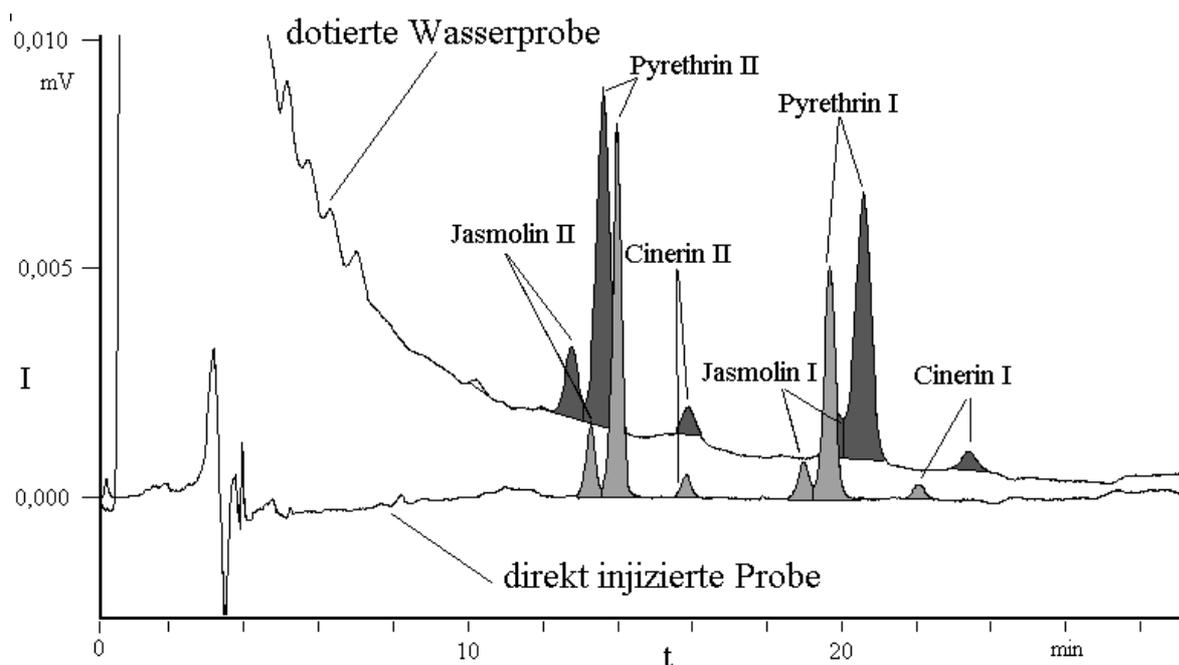


Abbildung 74: Chromatogramme einer mit 20 µl dotierten Wasserprobe und einer direkt injizierten Probe

Die dotierte Wasserprobe verursacht sehr starke UV-Absorptionen innerhalb der ersten 10 Minuten, wie aus dem Chromatogramm zu entnehmen ist. Diese Absorptionen werden von UV-aktiven Inhaltsstoffen im Deionat hervorgerufen, die aus den Harzen der Ionenaustauscher stammen. Die direkt injizierte Probe lässt neben dem Lösemittelpeak nur die Insektizidpeaks erkennen. Mit dieser Anreicherungs-methode lassen sich Wasserproben mit einem Insektizidgehalt (Allethrin und Pyrethrine) von 150 ng/l (150 ppt) analysieren. Dies

entspricht einer Konzentration, die drei Zehnerpotenzen unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Methode liegt.

Da die Anwendung von pyrethrum-haltigen Pflanzensprays gleichzeitig den Austrag des Synergisten Piperonylbutoxid mit sich führt, ist es notwendig, den Synergisten neben den Pyrethrinen ebenfalls zu bestimmen. Allerdings tritt dabei ein Problem auf. Bei der Detektionswellenlänge von 235 nm erkennt man (Abb. 75), dass Piperonylbutoxid (Peak 3) und Pyrethrin II (Peak 2) nicht separiert werden. Eine sichere Quantifizierung ist daher nicht möglich. Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.3 konnte eine starke Absorption bei 235 nm sowohl von den Pyrethrinen als auch von Piperonylbutoxid nachgewiesen werden. Allerdings besitzt Piperonylbutoxid ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 283 nm, das die Pyrethrine nicht aufweisen. Der UV-Detektor der Fa. Spectra Focus ermöglicht eine Aufzeichnung von Chromatogrammen bei unterschiedlichen Wellenlängen. Daher wurden Chromatogramme bei 235 nm und 283 nm aufgenommen (Abb. 75).

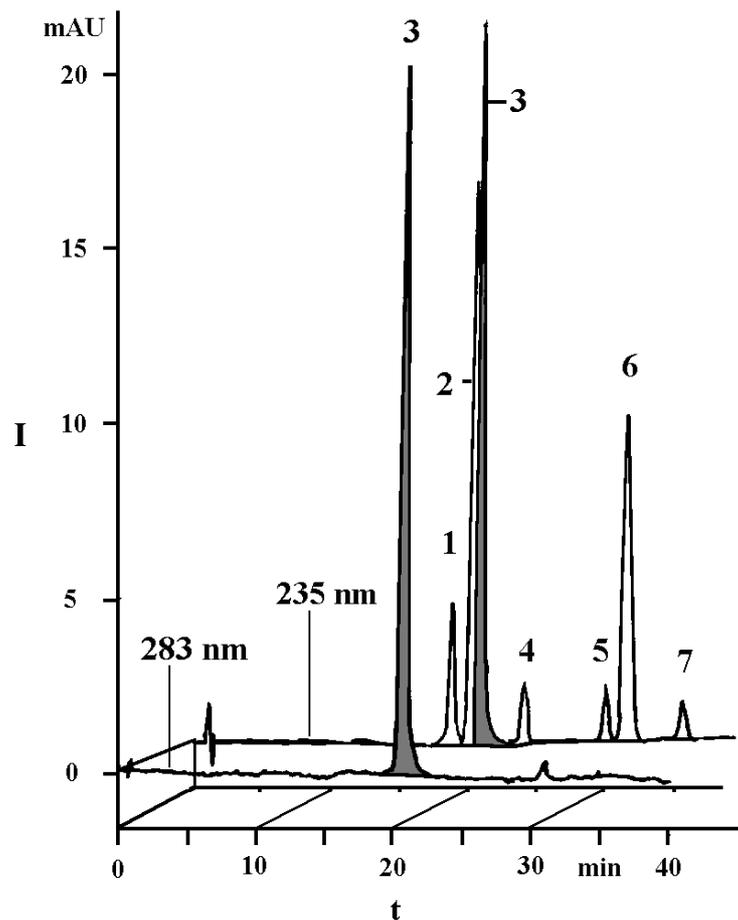


Abbildung 75: Chromatogramme einer pyrethrin- und PBO-haltigen Probe; Detektionswellenlängen: 235 nm und 283 nm

Im Chromatogramm mit der Detektionswellenlänge 283 nm ist lediglich der Piperonylbutoxid-Peak zu erkennen. Der störende Pyrethrin II-Peak fehlt gänzlich. Dies ermöglicht die Bestimmung der unterschiedlichen Stoffe. Eine separate Kalibrierung der Pyrethrine und des Piperonylbutoxids erfolgt bei 235 und 283 nm. In der zu untersuchenden Probe wird zuerst der PBO-Gehalt bei der Detektionswellenlänge von 283 nm bestimmt. Im Anschluss daran berechnet man die theoretische Fläche, die der Synergist bei  $\lambda = 235$  nm verursachen würde. Diesen Wert subtrahiert man von der Fläche des Doppelpeaks (Peak 2 und 3) bei 235 nm. Man erhält so die Fläche von Pyrethrin II, aus der man mit den übrigen Flächen den Pyrethrin-Gehalt errechnen kann. Der insektizide Gehalt und der des Synergisten konnten im Pflanzenspray der Fa. Spruzit mit 0,01 % Pyrethrine und 0,03 % PBO bestätigt werden.

## 5 Extraktion von Pyrethroiden und Pyrethrinen

Allgemein versteht man unter Extraktion einen Auslaugungsprozess, bei dem mit Hilfe eines meist leicht flüchtigen Lösungsmittels (Extraktionsmittel) ein oder mehrere Bestandteile eines Stoffgemisches (Extraktionsgut) herausgelöst werden. Voraussetzung ist die Selektivität des Extraktionsmittels, um lediglich die zu extrahierende Substanz zu lösen. Bei der Extraktion findet keine chemische Reaktion zwischen Lösungsmittel und extrahiertem Stoff statt. Man unterscheidet zwischen kontinuierlicher Extraktion (z. B. Soxhlet-Extraktion, Perkolation) und diskontinuierlicher Extraktion (z.B. Ausschütteln, Auslaugen).

### 5.1 Besondere Extraktionsverfahren

#### Soxhlet-Extraktion (SOX)

Die Soxhlet-Extraktion ist eine Festflüssig-Extraktion unter kontinuierlichem Rückfluss mit hohem Zeitaufwand.

#### Ultraschall-Extraktion (USE)

Eine weitere einfache, traditionelle Extraktionsmethode stellt die Ultraschall-Extraktion dar. Dabei wird in der Festflüssig-Extraktion, die dem Ausschütteln vergleichbar ist, durch Ultraschall-Anwendung die Extraktion aufgrund effizienter Durchmischung stark beschleunigt. Allerdings benötigen Soxhlet- und Ultraschall-Extraktion oft kostspielige und toxische Lösemittel.

#### Überkritische Fluid Extraktion (SFE: supercritical fluid extraction)

Im Jahr 1963 veröffentlichte Zosel eine Extraktionsmethode, die als Extraktionsmedium überkritisches Kohlendioxid benötigte (SFE). Der eigentliche SFE-Boom begann allerdings erst im Jahr 1980 und stieg dann sprunghaft bis in die 90er Jahre an. Die überkritischen Fluide besitzen ein ähnliches Löslichkeitsvermögen wie flüssige Lösemittel. Dennoch bietet die SFE einige Vorteile, um eine optimale Extraktion zu erreichen. Aufgrund des schnellen Massentransfers bedingt durch höhere Diffusionskoeffizienten und niedrige Viskosität der überkritischen Fluide ist die SFE schneller als die Flüssigextraktion [151]. Dabei kann die Lösemittelstärke des Fluids leicht variiert werden, da die Löslichkeit von der Temperatur und

dem Druck abhängig ist. Weiterhin sind die gewöhnlich verwendeten überkritischen Fluide bei Normaldruck und Raumtemperatur gasförmig. Dies ermöglicht eine leichte Separierung der Analyten nach der Extraktion. Eine direkte Kopplung der SFE mit einem chromatographischen Verfahren ist ebenfalls möglich. Das am häufigsten verwendete überkritische Fluid Kohlendioxid ist inert, ungiftig und kostengünstig in hoher Reinheit erhältlich. Allgemein wird eine höhere Löslichkeit von Stoffen in Kohlendioxid durch Druck- und Temperaturerhöhung erzielt [152]. Schipke konnte in seinen Arbeiten eine Steigerung der Extraktionsausbeute von Pyrethroiden bei zunehmendem Druck und Temperatur belegen [95]. Durch Zugabe von Modifier (z.B. Methanol, Aceton, Ethanol) kann die Polarität des unpolaren Kohlendioxids gesteigert werden, wodurch die Lösemittleigenschaft des Fluids verbessert wird [153, 154, 155].

#### Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE: accelerated solvent extraction)

Die beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE, engl.: Accelerated Solvent Extraction oder ESE, engl.: Enhanced Solvent Extraction) ist eine neue Extraktionstechnik für feste Probenmatrices. Wie die klassischen Extraktionsverfahren setzt auch die ASE gebräuchliche Lösemittel ein. Sie zeichnet sich allerdings durch sehr kurze Extraktionszeiten und geringen Lösemittelverbrauch aus. Die ASE nutzt Lösemittel zur Extraktion, die unter Druck und bei Temperaturen bis 200 °C eingesetzt werden. Drücke von 0,3 bis 20 MPa sind notwendig, um ein Sieden der Lösemittel bei diesen Temperaturen zu vermeiden. Die Extraktionstemperatur bewirkt, dass die Extraktionskinetik stark beschleunigt wird. Dadurch wird im Vergleich zu konventionellen Flüssigextraktionen wie Soxhlet oder der Extraktion mit Ultraschallbehandlung die Extraktionszeit verkürzt und der Lösemittelverbrauch drastisch verringert. Da für ASE und Soxhlet-Extraktion die gleichen Lösemittel eingesetzt werden, können die Extraktionsbedingungen leicht auf die beschleunigte Lösemittlextraktion übertragen werden [156, 157]. Größtes Anwendungsgebiet der ASE ist zur Zeit die Extraktion organischer umweltrelevanter Verbindungen aus festen Proben. Dabei erfüllt sie die Anforderungen der U.S. EPA SW-846 Methode 3545.

#### Subkritische Wasser Extraktion (Hot water extraction, HWE)

Die subkritische Wasser Extraktion verzichtet gänzlich auf organische Lösemittel. Statt dessen wird hierbei Wasser eingesetzt. Bei dieser Extraktionsmethode wird die zu extrahierende Substanz mit Wasser bei erhöhter Temperatur ( $T > 100\text{ °C}$ ) und hohem Druck behandelt. Man nutzt die Eigenschaft, dass im flüssigen Zustand die Dielektrizitätskonstante

des Wassers mit zunehmender Temperatur sinkt [158]. Somit ist es möglich, durch Variation der Temperatur und somit auch der Polarität polare bis unpolare Substanzen zu extrahieren. Man arbeitet in Bereichen zwischen 150 °C und 250 °C und damit unterhalb des kritischen Punktes, da überkritisches Wasser zu reaktiv ist. Auf diese Weise wurden bereits unpolare und mittelpolare Stoffe aus unterschiedlichen Matrices quantitativ extrahiert [159, 160, 161, 162,163].

## **5.2 Vergleich von Soxhlet-, Ultraschall-, überkritischer Fluid- und beschleunigter Lösemittel-Extraktion**

Im nachfolgenden sollen unterschiedliche Extraktionsmethoden auf ihre Extraktionsausbeute hin untersucht werden, wobei der Extraktionsverlauf ebenfalls aufgezeichnet wird.

### 5.2.1 Experimentelles

#### Chemikalien

Die in diesem Kapitel untersuchten Proben wurden keiner einleitenden Probenvorbereitung wie z.B. Trocknung oder Homogenisierung unterzogen. Allethrin wurde von dotierten Papierstreifen (46,5 g/kg) (Jeyes Deutschland GmbH, Deutschland) extrahiert, deren Wirkstoff durch Erwärmen in Elektroverdampfern auf ~ 80 °C an die Umgebung freigegeben wird. Diese kommerziell erhältlichen Plättchen (35 x 20 mm<sup>2</sup>, ~ 1g) finden in Innenräumen ihre Anwendung. Bei allen Extraktionsmethoden wurde jeweils ein zerkleinertes Plättchen extrahiert.

Für die Extraktion von Pyrethrinen wurde jeweils 1 g Chrysanthemenblütenpulver („Insektenblüten“, Caesar & Lorenz, Hilden, Deutschland) aus den Jahren 1992 und 1996 eingesetzt. Zur Zeit der Untersuchungen betrug die Lagerzeit der verschiedenen Blütenpulver 7 bzw. 3 Jahre. Eine weitere Probe bestand aus einem kommerziellen Insektizid-Pulver (Spruzit<sup>®</sup> Staub, W. Neudorf GmbH, Emmerthal, Deutschland). Die Lagerzeit dieses Produktes von 1998 betrug 1 Jahr. Das Pulver wird gegen Erdflöhe, Blattläuse, Käfer und deren Larven eingesetzt. Es enthält 12 g/kg natürliches Pyrethrum, was einem Gehalt von 3 g/kg Pyrethrinen entspricht.

Als Lösemittel bei der Ultraschall- und Soxhlet-Extraktion wurde sowohl n-Hexan (zur Rückstandsanalytik, Merck, Darmstadt, Deutschland) als auch Isopropanol (z. A., Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) eingesetzt. Kohlendioxid (SFE-Grade) der Fa. AGA (Düsseldorf, Deutschland) wurde in den SFE-Experimenten eingesetzt. Isopropanol (z.A.) diente als Vorlage in der SFE und als Lösemittel in den ASE-Versuchen.

#### Geräte:

##### Soxhlet Extraktion

Für die Soxhlet-Extraktionen wurde eine micro-Soxhlet-Apparatur mit 100 ml 2-Hals-Rundkolben und Magnetrührer verwendet, die mit ca. 50 ml Lösemittel beschickt wurde. Der Soxhlet-Einsatz hatte ein Volumen von 8 ml. Die verwendeten Extraktionshülsen der Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland) besaßen einen Durchmesser von 10 mm und eine Länge von 30 mm. Die Dauer eines Extraktionszyklus betrug 4,5 Minuten. Für die Darstellung der Extraktionskinetik wurde ein Aliquot von 1 ml zu Beginn und dann nach 10, 30, 40, 60 und 120 min entnommen.

##### Ultraschall-Extraktion

Die Ultraschall-Extraktionen wurden mit einem Ultraschallbad der Marke Branson Typ 2200 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) durchgeführt. Die Proben wurden sechsmal mit je 10 ml Lösemittel 20 min lang extrahiert.

Die mit Ultraschall und Soxhlet erhaltenen Extrakte wurden vor der Injektion mikrofiltriert (0,4µm).

##### Überkritische Fluid-Extraktion

Die Extraktionen mit überkritischem Kohlendioxid wurden mit einem Extraktor der Fa. Isco (Axel Semrau, Sprockhövel, Deutschland) durchgeführt. Dieser bestand aus einer Langhubkolbenpumpe des Typs 260D zur Förderung des flüssigen Kohlendioxids und einer Extraktionseinheit des Typs SFX 2-10. Es wurde eine Extraktionszelle (10 ml) aus PEEK-Material verwendet, in dessen Ein- und Auslassverschraubungen Edelstahlfritten (5 µm) eingelassen waren. Bezugnehmend auf die Erläuterungen in Kapitel 5.1 (S. 107) wurden hohe Extraktionsbedingungen gewählt, die jedoch nicht als optimale Parameter angesehen werden können. Die Extraktion wurde bei einem Druck von 30 MPa, einer Temperatur von 100 °C und einer Fließrate von 1,0 – 1,5 ml/min durchgeführt. Die Restriktion des überkritischen

Fluids erfolgte mit einem beheizten (60 °C) regelbaren Restriktor (Vari Flow, ISCO, Axel Semrau). Das expandierte Kohlendioxid wurde in einen 100 ml 3-Hals-Rundkolben und Kühler geleitet [164]. Der Kolben enthielt als Vorlage 50 ml Isopropanol, um die extrahierten Substanzen aufzufangen. An den Restriktor war zusätzlich ein 2-Wege-Ventil mit Spritzenanschluss montiert. Dies war bei der Aufnahme von Extraktionskinetiken notwendig. Es erlaubte, die im Restriktor ausgefallenen Stoffe bei geschlossener Stellung mit einem Lösemittel herauszulösen und in den 3-Hals-Rundkolben einzuleiten. Zusätzlich wurde der gewonnene Extrakt mit einem Magnetrührstab (20 mm) durchmischt. Dadurch wurde die Homogenität der Probe bei einer kontinuierlichen Probennahme gewährleistet.

#### Beschleunigte Lösemittlextraktion

Die oben beschriebene SFE-Apparatur von ISCO wurde für die ASE-Experimente modifiziert. Ein weiterer Pumpenstand des Typs 260D erweiterte die Apparatur, um das Lösemittel (Isopropanol) zu fördern. Die Auslassleitung der beiden Pumpen wurden in ein 3-Wege-Schaltventil geleitet, das die Extraktion mit Lösemittel oder das Spülen mit CO<sub>2</sub> steuerte. Für die Extraktion wurde die Zelle mit Extraktionsgut gefüllt und in den Heizblock der Anlage positioniert. Durch Öffnen des Ventils konnte das System mit Lösemittel geflutet werden, bis am Ende des Restriktors Lösemitteltropfen heraustraten. Nach dem Schließen des Ventils wurde der Ofen auf Extraktionstemperatur (150 °C) aufgeheizt und das Lösemittel auf 20 MPa verdichtet. Nach einer Equilibrierungszeit von 2 Minuten wurde das Ventil vor der Extraktionszelle geöffnet. Es fand ein Druckausgleich (20 MPa) zwischen Pumpe und Extraktionszelle statt. Danach schloss man das Ventil. Nach einer statischen Extraktion von 5 Minuten wurde zuerst der Restriktor und dann das Ventil vor der Zelle geöffnet. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min wurde 3 Minuten mit Isopropanol gespült. Ein 2-Hals-Spitzkolben diente zum Auffangen des Extraktes. Durch das Umschalten des 3-Wege-Ventils wurde nun CO<sub>2</sub> durch das System geleitet, um das Lösemittel aus Kapillaren und Extraktionszelle zu entfernen und die Probe zu trocknen.

### 5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 76 sind die Wiederfindungen bezüglich des Allethrins unter Anwendung von Ultraschall-, Soxhlet-, AS- und SF-Extraktion dargestellt. Zusätzlich ist der Extraktionsverlauf in Abhängigkeit von der Extraktionszeit illustriert. Der vom Hersteller

angegebene Gehalt von 46,5 mg pro Plättchen wurde als 100 % festgelegt. Auf der Ordinate ist die Wiederfindung in Prozent und auf der Abszisse die Extraktionszeit in Minuten aufgetragen. Die Wiederfindung des Allethrins ist größer als 95 % für die SFE und 98 – 100 % für die Soxhlet-Extraktion bzw. Ultraschall-Extraktion. Nach 60 Minuten ist die Extraktion für die USE und SOX beendet. Die SFE benötigt 40 Minuten für die vollständige Extraktion. Für die ASE wurde keine Kinetik aufgezeichnet, da die Extraktion nach 10 Minuten Extraktionszeit bei einer Wiederfindung von 100 % quantitativ verlief.

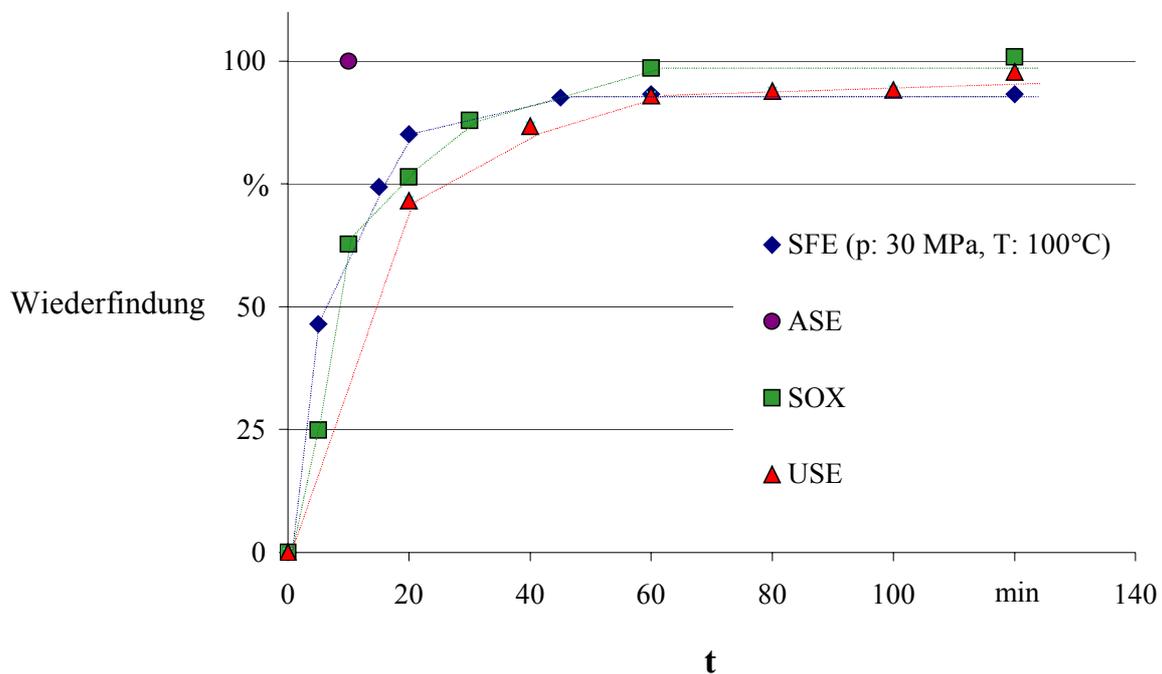


Abbildung 76: Extraktionskinetik und Wiederfindung von Allethrin unter Anwendung von USE, SOX, ASE und SFE

Pulverisierte Chrysanthemenblüten wurden verwendet, um die Extraktionskinetik der Pyrethrine aufzuzeichnen. Abbildung 77 zeigt ein SF-Chromatogramm eines SF-Extraktes von Blütenpulver nach einer Extraktionszeit von 20 Minuten.

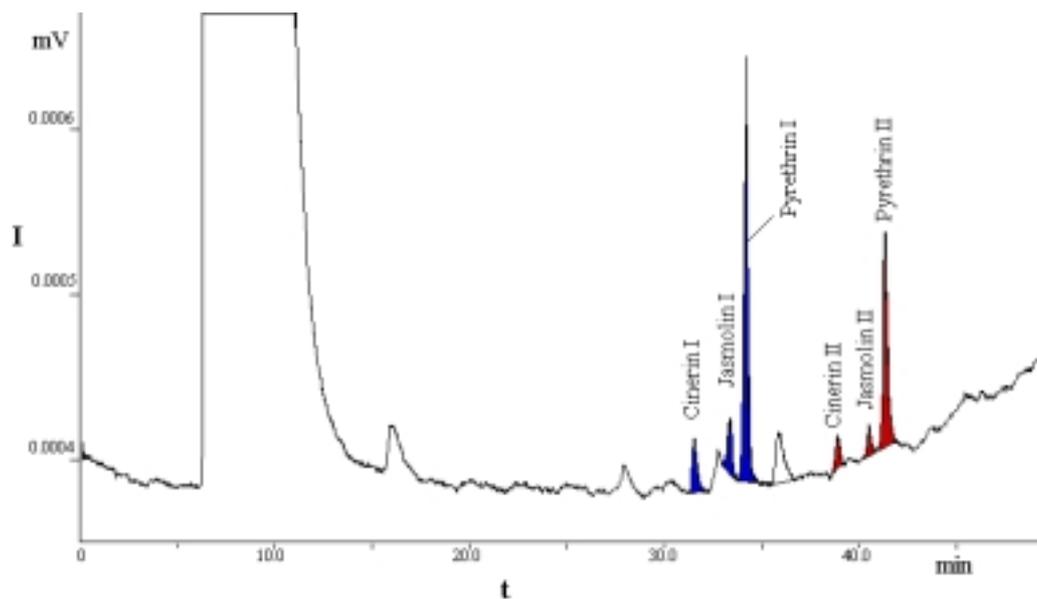


Abbildung 77: Chromatogramm eines Pyrethrum-SF-Extraktes unter Anwendung der SFC

Der Gesamtgehalt an Pyrethrinen beträgt 0,9 % (w/w) unter Anwendung der Soxhlet- und Ultraschall-Extraktion (Abb. 78). Der Gehalt bei der überkritischen Fluidextraktion wird mit 0,8 % (w/w) beziffert. Die SF-Extraktion ist schnell und endet nach 20 Minuten. Die Extraktionszeit für die SOX und USE beträgt 60 Minuten.

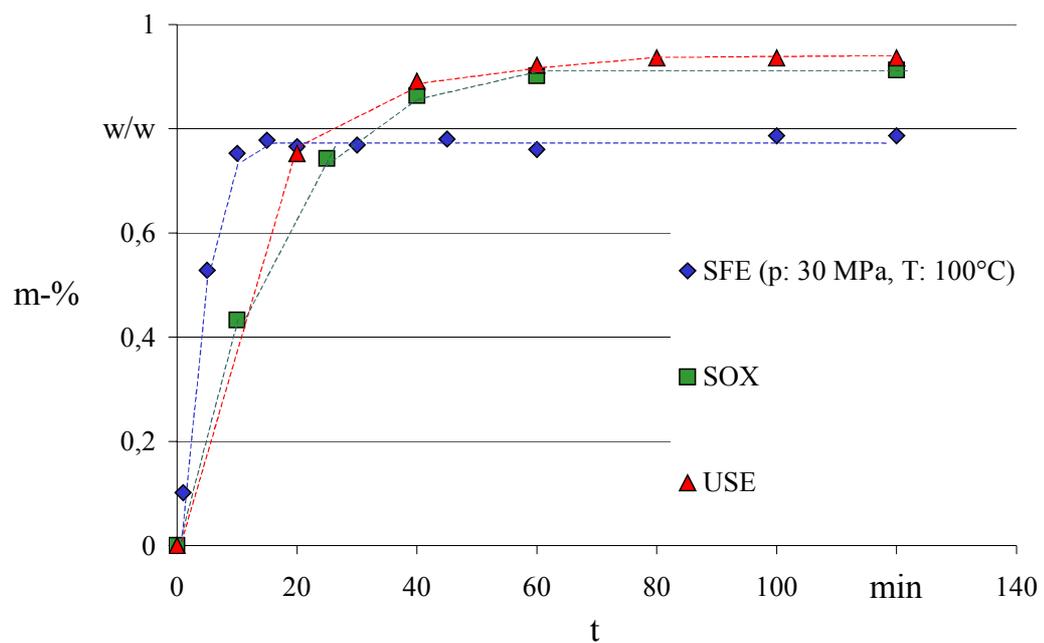


Abbildung 78: Extraktionskinetik und Gesamtpyrethringehalt unter Anwendung von USE, SOX und SFE

Pulverisierte Blüten aus den Jahren 1992 und 1996 wurden auf den Gesamtgehalt hin verglichen. Als Referenz diente das Industrieprodukt „Spruzit® Insektenpulver“. Der theoretische Gehalt in diesem Produkt wird vom Hersteller mit 0,3 mg/kg beziffert. In dem Säulendiagramm (Abb. 79) sind die experimentellen Daten der getesteten Proben bei Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden illustriert.

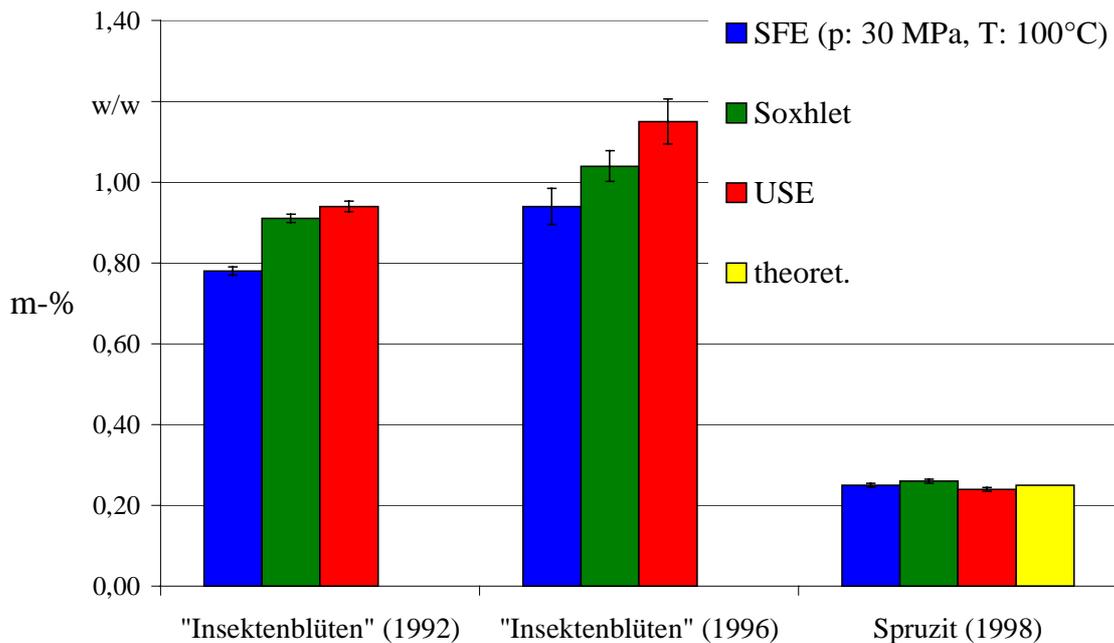


Abbildung 79: Pyrethringehalte in diversen Proben bei Anwendung von SFE, SOX und USE

Aus dem Säulendiagramm geht hervor, dass der Pyrethringehalt in dem Insektenblüten-Pulver (1992) nach 7-jähriger Lagerung bei der SFE 0,79, bei der Soxhlet-Extraktion 0,9 und bei der Ultraschall-Extraktion 0,92 Gewichtsprozent beträgt. Generell ist dieser Gehalt geringer als der des Pulvers von 1996. Hier werden Gehalte von 0,93 bei der SFE, 1,04 bei der Soxhlet-Extraktion und 1,14 bei der Ultraschall-Extraktion berechnet. Die geringste Extraktionsausbeute erhält man bei der Anwendung der SFE. Sie ist ca. 10 Prozent geringer als die der Ultraschall-Extraktion. Die Durchführung des t-Tests zeigt, dass signifikante Unterschiede in den Extraktionsausbeuten zwischen SFE und den beiden anderen Extraktionsmethoden bei dem Insektenblütenpulver von 1992 bestehen. Bei dem Vergleich von SFE und Soxhlet-Extraktion wird ein t-Wert von 13,3 und von SFE und Ultraschall-Extraktion von 16,04 errechnet. Der Schwellenwert  $P(0,95;8)$  wird mit 2,31 beziffert. Zwischen der Soxhlet- und Ultraschall-Extraktion wird ein t-Wert von 2,13 ermittelt.

Zwischen diesen beiden Methoden besteht kein signifikanter Unterschied. Die Standardabweichung bei den 3 Jahre alten Insektenblüten von 1996 ist um das 3- bis 4-fache größer als bei den oben beschriebenen Insektenblüten. Die relative Standardabweichung (RSD) ist aber kleiner als 5 Prozent. Der berechnete t-Wert zwischen SFE und Soxhlet-Extraktion beträgt 2,21. Hier besteht kein signifikanter Unterschied, ebenso wie bei Soxhlet- und Ultraschall-Extraktion, zwischen denen ein t-Wert von 1,82 ermittelt wurde. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen SFE und Ultraschall-Extraktion. Der t-Wert beträgt 5,06.

Vergleicht man die verschiedenen Extraktionsmethoden bei dem Spruzit-Insektenpulver (1-jährige Lagerung), so erkennt man keinen signifikanten Unterschied (t-Werte > 2,31) in den Extraktionsausbeuten. Die insektiziden Inhaltsstoffe werden von allen drei Extraktionsmethoden vollständig extrahiert. Bei diesem Insektenpulver handelt es sich um ein Pulver, das mit Pyrethrinen dotiert wurde. Die Wirkstoffe werden an der Partikeloberfläche adsorbiert. Diese werden leicht durch die eingesetzten Lösemittel extrahiert.

Bei dem Blütenpulver handelt es sich um eine biologische Matrix, die aus Zellen besteht. Die Wirkstoffe werden in den Blüten der Pflanze gebildet [165]. Die Pyrethrine befinden sich in den verschiedenen Zellschichten der Blütenteile. Während des Trocknungsprozesses der Blüten und der nachfolgenden Pulverisierung werden die Pflanzenzellen zum Teil zerstört. Der molekulare Aufbau der Pflanzenzellen birgt allerdings viele Zentren, an denen die insektiziden Wirkstoffe adsorbiert werden. Die Desorption dieser Stoffe wird dadurch gehemmt. Zudem muss das Lösemittel in das Pflanzenmaterial eindringen, den Stoff lösen und ihn heraustransportieren. Somit ist die Extraktion diffusionskontrolliert. Im Fall der Papierstreifen, an denen sich an der Oberfläche die Wirkstoffe befinden, wird die Kinetik von der Löslichkeit des Analyten im Lösemittel bestimmt. Daher findet man in Abbildung 76 keine signifikanten Unterschiede im Extraktionsverlauf. Die Wiederfindung ist, wie auch bei dem Insektenpulver, bei allen Extraktionsmethoden nahezu 100 Prozent. Signifikante Unterschiede werden allerdings bei der Extraktion einer Realprobe sichtbar. Dabei ist die SF-Extraktion am schnellsten (Abb. 78), wobei die Extraktionsausbeute kleiner als 90 Prozent ist. Durch den geringen Diffusionskoeffizient ( $D_{12}$ ) in der SFE wird die Extraktion beschleunigt. Allerdings ist die Löslichkeit von Substanzen in überkritischem Kohlendioxid geringer als in organischen Lösemitteln. Da Pflanzen unpolare Moleküle wie Wachse, Glyceride etc. besitzen, lagern sich daran auch die Pyrethrine an. Von diesen unpolaren Molekülen sind die Pyrethrine nur schwer bei den gewählten Extraktionsbedingungen mit überkritischem

Kohlendioxid zu lösen. Als Resultat werden Minderbefunde gemessen. Eine Druck- und Temperaturoptimierung in der SFE würde die Extraktionsausbeute deutlich vergrößern. Die Pyrethrine werden durch Luftsauerstoff, Wärme und UV-Strahlung zersetzt. Da sich das Blütenpulver (1996) in einem Probengefäß bei Raumtemperatur und in lichtgeschützter Umgebung befand, wurde der Zersetzungsprozess der Pyrethrine nur durch den Luftsauerstoff gesteuert. Die oben beschriebenen Proben stammten aus dem oberen Drittel des Behältnisses. Pulver aus dem unteren Drittel wurde mit den drei oben beschriebenen und mit der beschleunigten Lösemittelextraktion untersucht. Das Resultat ist in Abbildung 80 aufgeführt.

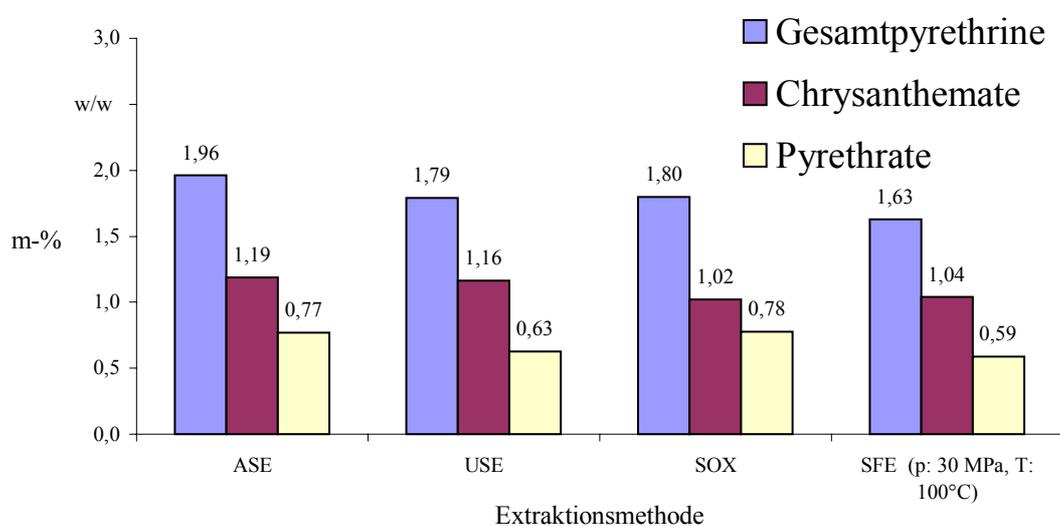


Abbildung 80: Vergleich der Extraktionsausbeuten bei ASE, USE, SOX und SFE

In diesem Diagramm ist der Pyrethringehalt in Gewichtsprozent bezüglich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden aufgetragen. Neben dem Gesamtgehalt sind die Gehalte der unterschiedlichen Estergruppen dargestellt. Die höchste Extraktionsausbeute mit 1,96 Gewichtsprozent wird bei der ASE erreicht. Mit der USE und SOX werden 1,8 Massenprozent extrahiert. Die Extraktionsausbeute unter Anwendung der SFE beträgt 1,63 Prozent. Dieser Minderbefund in der SFE kann auch hier leicht fehlinterpretiert werden. Es bedeutet nicht, dass die Extraktionsmethode mit überkritischem Kohlendioxid für die Extraktion von Pyrethrinen ungeeignet ist, sondern dass die gewählten Extraktionsbedingungen ungünstig sind. Eine Optimierung der Extraktionsmethode wurde in diesem Kapitel jedoch nicht durchgeführt.

Für die ASE wurde dabei der Extraktionsverlauf aufgezeichnet. Proben wurden nach Extraktionszeiten von 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Die Extraktionskinetik des

Gesamtgehaltes sowie der Chrysanthemate und der Pyrethrate ist in dem Diagramm (Abb. 81) illustriert.

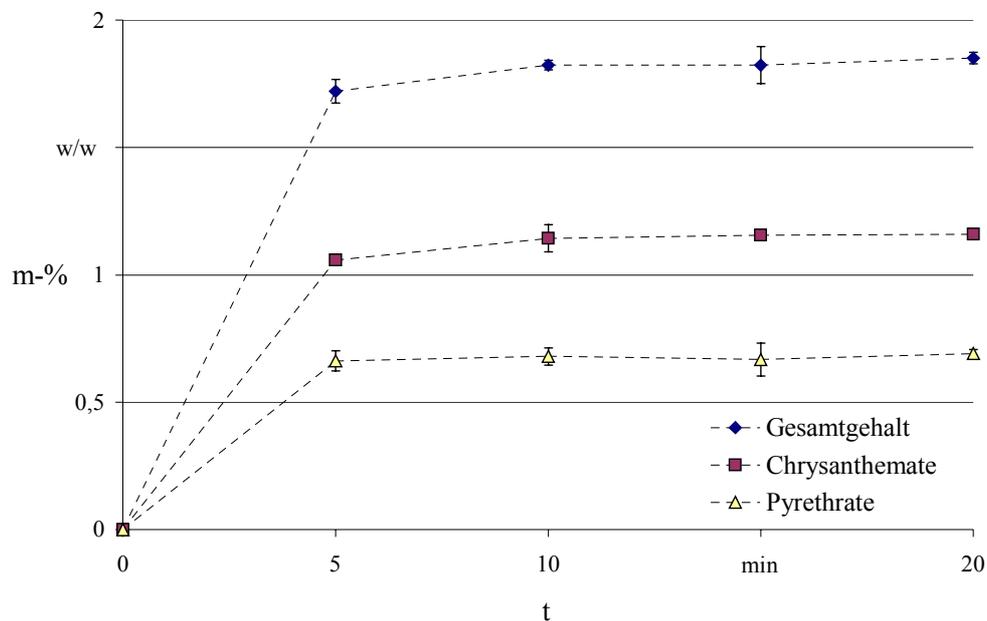


Abbildung 81: Extraktionskinetik bei der Extraktion von Chrysanthemenblüten unter Anwendung der ASE

Die Summe aus Chrysanthematen und Pyrethraten ergeben den Gesamtgehalt. Nach einer Extraktionszeit von 5 Minuten wird ein Gehalt von 1,77 Gewichtsprozent Gesamtpyrethrine berechnet, was einer Ausbeute von 93 Prozent entspricht. Nach 10-minütiger Extraktion sind über 98 Prozent der insektiziden Wirkstoffe extrahiert. Beim Vergleich des Extraktionsverlaufs der beiden Estergruppen wird deutlich, dass sie bei der Extraktion nicht diskriminiert werden. Das bedeutet: Es erfolgt keine zeitlich verzögerte Extraktion eines Wirkstoffes. Eine selektive Extraktion ist nicht möglich. Das gleiche Resultat zeigt sich bei den übrigen Extraktionsmethoden, was nicht explizit aufgeführt wird.

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde anlässlich des 3. Internationalen Symposiums für Probenvorbereitung – SFE- (X)SE – SPME (Siegen 1998) in der Fachzeitschrift: „Fresenius Journal of Analytical Chemistry“ publiziert [166].

### 5.3 Subkritische Wasserextraktion

Eine zunehmend interessante Extraktionsmethode für polare und unpolare organische Substanzen, die subkritische Wasserextraktion, soll in dieser Arbeit auf die Anwendung zur Extraktion von Pyrethrinen getestet werden.

#### 5.3.1 Experimentelles

##### Chemikalien

Bei der subkritischen Wasserextraktion wurde eine Verdünnungsreihe einer Lösung von Pyrethrumextrakt (Fluka) in Hexan hergestellt. Die Stammlösung enthielt eine Pyrethrin-Konzentration von 20,97 mg/ml. Von dieser wurden vier Standards mit einem Verdünnungsfaktor von je 1:10 hergestellt. 100 µl des jeweiligen Standards wurden auf ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes Zellstofffließ (Verbandmull, Fa. Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) aufgetragen. Dieses Fließ wurde in einem Ofen bei 60 °C eine halbe Stunde lang getrocknet. Das für die Extraktion verwendete Wasser war bidestilliert und 2 Stunden mit Stickstoff entgast worden, um eine Oxidation der Proben während der Extraktion durch Sauerstoff auszuschließen.

Pulverisierte Chrysanthemenblüten wurden ebenfalls untersucht.

##### Geräte

###### Apparatur A

Die mit Pyrethrin dotierten Celluloseplättchen gab man in eine 64 mm lange Edelstahlzelle (Minnesota Valve and Fitting, Eden Prairie, MN, USA) mit 7 mm Innendurchmesser. Die Zelle wurde dann mit 3 ml Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde sie 30 Minuten bei 200 °C im Ofen erhitzt. Der gewonnene wässrige Extrakt wurde über einen 0,4 µm Filter filtriert. Danach konnte er für HPLC-Untersuchungen benutzt werden.

###### Apparatur B

Die oben beschriebene ASE-Apparatur wurde auch für Extraktionen mit subkritischem Wasser verwendet. Anstelle des organischen Lösemittels wurde bidestilliertes, entgastes Wasser eingesetzt. Chrysanthemenblütenpulver (1 g) diente als Probe. Die Ofentemperatur

betrug 150 °C und der Druck 30 MPa. Einer 30 minütigen statischen Extraktion folgte eine 15 minütige dynamische Extraktion. Danach wurde 5 Minuten mit CO<sub>2</sub> gespült. Bei den ersten Experimenten verstopften die Auslassfritten der Extraktionszellen und der erhaltene Extrakt war trüb. Danach positionierte man 3 g Quarzsand (z.A.) als Partikelfilter vor den Auslass, und verhinderte so das Verstopfen der Fritten.

### 5.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden die aus Apparatur A erhaltenen Extrakte in die HPLC-Apparatur (vgl. Kap. 4.2) injiziert. Die Analyse erfolgte mit den in Kapitel 4.2 beschriebenen HPLC-Bedingungen. Abbildung 82 zeigt ein Chromatogramm der Verdünnungsreihe.

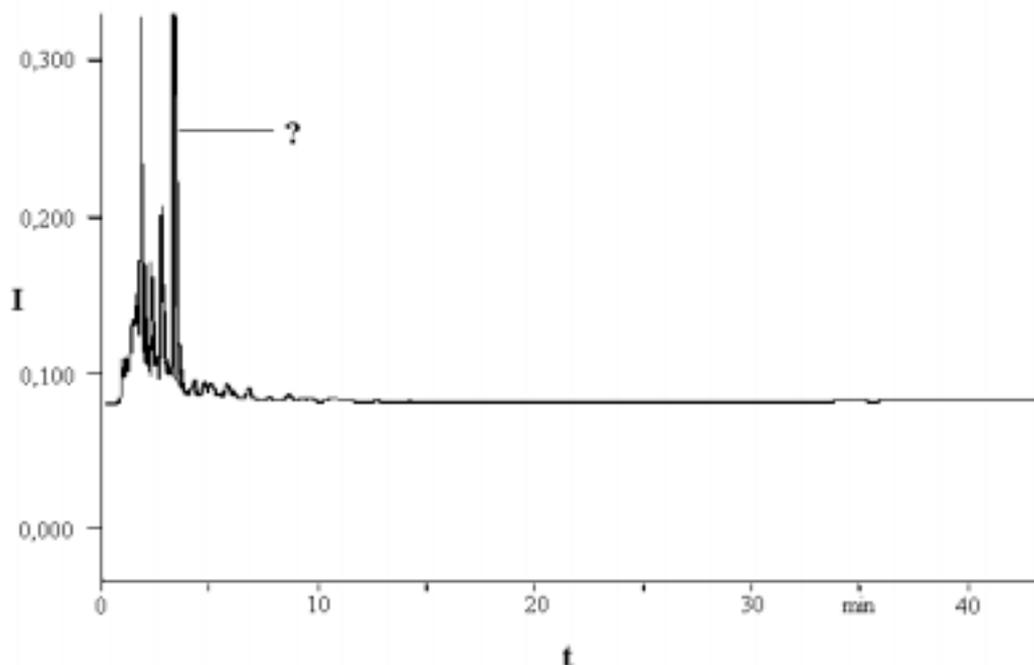


Abbildung 82: HPLC-Chromatogramm von Pyrethrinen gewonnenen durch HWE

In diesen Chromatogrammen ist das Fehlen der Pyrethrin-Peaks (vgl. Abb. 63, S. 87) festzustellen. Das bedeutet, dass der Extrakt keine Pyrethrine enthält, obwohl die theoretische Pyrethrin-Konzentration des Extraktes über der Bestimmungsgrenze liegen müsste. Ein Grund für das Fehlen der Pyrethrine liegt darin, dass sich die Pyrethrine während der statischen HWE im unterkritischen Wasser zwar lösen, aber nach dem Abkühlen von der Zellulose

readsorbiert werden. Das Nichtvorhandensein kann aber auch damit begründet werden, dass sich die Pyrethrine bei 200 °C zersetzen oder hydrolysiert werden. Eine zusätzliche SPME-GC-MS-Analyse ergab, dass die Pyrethrine nicht extrahiert wurden. Allerdings konnte ein Peak mit Hilfe eines Massenscans und Vergleichsdaten als freie Chrysanthemumsäure identifiziert werden. Die in dem Chromatogramm innerhalb der ersten fünf Minuten detektierten Substanzen stammen vom Lösemittel und den eingesetzten Cellulosestreifen. Eine Flächenzunahme des Peaks bei 3,24 Minuten wird mit wachsender Konzentration der Dotierlösung registriert. Hierbei handelt es sich um eine polare Substanz, da sie kaum von der stationären Phase retadiert wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um die oben erwähnte Chrysanthemumsäure. Eine eindeutige Identifizierung wurde nicht durchgeführt.

Mit Hilfe der subkritischen Wasserextraktion ist es nicht möglich, die Pyrethrine aus einer Matrix zu extrahieren und zu bestimmen. Die gewählten Extraktionsbedingungen führten zur Zersetzung der Pyrethrine, und als chromatographierbare Substanzen erhielt man deren Abbauprodukte.

Bei der dynamischen subkritischen Wasserextraktion mit Apparatur B betrug die Extraktionstemperatur 150 °C und der Druck 20 MPa.

Die Wiederfindung bezüglich des Pyrethrin-Gesamtgehaltes betrug bei den gewählten Bedingungen lediglich 20%.

Die subkritische Wasserextraktion eignet sich unter den gegebenen Bedingungen nicht, Pyrethrine aus einer Matrix quantitativ herauszulösen. Wie in der Literatur erwähnt, sind jedoch Umesterungsreaktionen an den Pyrethrinen möglich. Die Reaktionsprodukte können dann quantitativ extrahiert werden.

## 6 Faktorielle Teilversuchsplanung für die SFE von Pyrethrinen

### 6.1 Faktorielle Versuchsplanung

Die Optimierung einer Methode auf eine Zielgröße hin erfordert meist die Variation verschiedener Parameter. Zur Untersuchung dieses funktionellen Zusammenhangs bieten sich mehrere Modelle an:

- Ein-Faktor-Methode
- Faktorielle Versuchsplanung
- Faktorielle Teilversuchsplanung.

Bei der Ein-Faktor-Methode (engl.: One-factor-at-a-time-Method) wird jeweils nur ein Parameter verändert, während die übrigen konstant gehalten werden. Dies entspricht der klassischen Form der Experimentiertechnik. Die faktorielle Versuchsplanung (engl.: Factorial Design) erlaubt die gleichzeitige Variation mehrerer Einflussgrößen zwischen zwei oder mehreren Niveaus. Zur Berechnung der Effekte der Variablen werden alle Versuche herangezogen. Es gibt keine einzelnen Bezugspunkte wie bei der Ein-Faktor-Methode. Zudem besteht die Möglichkeit, die Effekte, welche Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehr Variablen auf die Zielgröße ausüben, quantitativ zu bestimmen. Die Signifikanz der Effekte und Wechselwirkungen wird mit Hilfe der Varianzanalyse bestimmt. Je größer die Zahl der in einem Verfahren zu berücksichtigenden Faktoren wird, um so umfangreicher wird die zur Ermittlung der Effekte und Wechselwirkungen erforderliche Varianzanalyse. So sind bei vier Faktoren auf zwei Niveaus  $2^4 = 16$  Versuche notwendig. Wenn auf Wechselwirkungen höherer Ordnung verzichtet werden kann, so ist es möglich, über die faktorielle Teilversuchsplanung (engl.: Fractional factorial Design) die wichtigsten Effekte und Wechselwirkungen der Faktoren zu erfassen. Der Vorteil liegt darin, dass man eine geringere Anzahl von Versuchen benötigt, als es für ein komplettes Design notwendig wäre. Erläuterungen und Beispiele zur faktoriellen Versuchsplanung sind in der aufgeführten Literatur [167, 168, 169] einzusehen.

## 6.2 Selektive und maximale Extraktion von Pyrethrinen

Das Ziel der Versuchsreihe ist, Aufschluss über eine mögliche Selektivität der Extraktion zu erhalten. Ein Maß für eine selektive Extraktion bei den Pyrethrinen kann mit dem Verhältnis von Chrysanthematen zu Pyrethraten beschrieben werden. Das natürliche Verhältnis wird mit 1,3 bis 1,5 angegeben [170]. Die Effekte und Durchschnittsquadrate der Verhältniswerte (Chrysanthemate : Pyrethrate) und der Pyrethrinausbeuten werden nach der Methode von Yates berechnet. Über die zu ermittelnden Varianzen der vermengten Effekte und Versuchsfehlervarianzen werden F-Teste durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit des F-Tests wird auf 5 Prozent festgelegt. Als Ergebnis erhält man Aufschluss über die Signifikanz der Effekte und der Wechselwirkungen. In einer weiteren Studie sollen Ergebnisse auf optimale Extraktionsparameter für die maximale Pyrethrinausbeute hinweisen.

Die Faktorielle Teilversuchsplanung ermöglicht ebenfalls, die Extraktionsbedingungen für eine optimale Extraktionsausbeute von Gesamt-Pyrethrinen einzugrenzen.

### 6.2.1 Experimentelles

Die in Kapitel 5.1.2 beschriebene SFE-Apparatur wurde in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Pulverisierte Chrysanthemenblüten dienen als Extraktionsgut. Es wurden Versuche bei unterschiedlichen Extraktionsbedingungen durchgeführt. In diesem  $2^4$ -Design wurden vier Einflussgrößen ausgewählt, die auf zwei Niveaus variiert wurden. In Tabelle 21 sind die zwei unterschiedlichen Niveaus der untersuchten Faktoren aufgelistet. Die Experimente wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Tabelle 21: Einflussgrößen und Niveaus der faktoriellen Teilversuchsplanung

Variable	Einflussgröße	Niveau	
		niedrig	hoch
A	Extraktionsdruck	15 MPa	30 MPa
B	Extraktionstemperatur	50 °C	100 °C
C	Fließrate	1,5 ml/min	3,0 ml/min
D	Extraktionszeit	20 min	60 min

Die Gruppe der Chrysanthemate (Cinerin I, Jasmolin I und Pyrethrin I) wird in der SFC nach ca. 35 Minuten detektiert. Dies entspricht einem Druckverlauf von 11 MPa zu Beginn der Chromatographie bis hin zu einem Druck von 18 MPa nach 35 Minuten. Da die Trennung in der SFC hauptsächlich von der Löslichkeit der Analyten im überkritischem Kohlendioxid abhängig ist, stellt sich die Frage, ob bei niedrigen Drücken (15 MPa) und unterschiedlichen Temperaturen eine selektive Extraktion der Pyrethrine möglich ist.

Die Druckniveaus wurden mit 15 und 30 MPa festgelegt. Als Extraktionstemperatur wurde 100 °C in Anlehnung an die Ofentemperatur von 110 °C bei der SFC und 50 °C gewählt. Die Dichte des Kohlendioxids bei den unterschiedlichen Drücken und Temperaturen ist in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Dichte von Kohlendioxid bei den gewählten Druck- und Temperaturniveaus

Dichte (kg/l)		Druck (MPa)	
		15	30
Temperatur	50	0,707	0,875
(°C)	100	0,341	0,667

## 6.2.2 Ergebnisse

### 6.2.2.1 Selektive Extraktion von Pyrethrinen

In Tabelle 23 sind die Einzelwerte der Quotienten bei den verschiedenen Versuchskombinationen aufgeführt.

Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen Niveaus der durchgeführten Experimente. Ebenfalls wird die Struktur der faktoriellen Teilversuchsplanung ersichtlich (engl.: half replicate). Für eine vollständige Versuchsplanung hätten die Experimente aus den leeren Feldern zusätzlich durchgeführt werden müssen.

Tabelle 23: Quotient von Chrysanthematen zu Pyrethrinen bei den verschiedenen Versuchskombinationen

		D (hoch)		D (niedrig)	
		C (hoch)	C (niedrig)	C (hoch)	C (niedrig)
A (hoch)	B (hoch)	(abcd)			(ab)
		1,52	1,50		1,56
	B (niedrig)		(ad)	(ac)	
			1,89	1,49	1,53
A (niedrig)	B (hoch)		(bd)	(bc)	
			4,91	5,20	7,06
	B (niedrig)	(cd)			(I)
		1,62	1,63		3,50

Für ein half-replicate eines  $2^4$ -Designs wird das gleiche Auswerteschema wie für das zugrundeliegende  $2^3$ -Design herangezogen. Als erstes werden die Quadratsummen der vermengten Effekte ermittelt, wobei die Versuchsfehler nicht berücksichtigt werden. Dabei werden die einzelnen Werte der jeweiligen Versuchskombination summiert. Die Summen sind in Spalte 2 (Tabelle 24) aufgeführt. Die Werte in den Kolonnen (1), (2) und (3) wurden nach der Yates-Methode (vgl. [168]) berechnet.

Tabelle 24: Berechnung der Effekte und Quadratsummen für den Quotient (Chr : Pyr)

Versuchs- Kombination	Quotient Chr : Pyr	Kolonnen			Quadratsumme (3) <sup>2</sup> /16	Vermengte Effekte
		(1)	(2)	(3)		
(1)	5,12	8,50	21,76	44,76	-----	
Ad	3,38	13,26	23,00	-18,72	21,90	A, BCD
Bd	10,11	6,72	-8,70	14,32	12,82	B, ACD
Ab	3,15	16,28	-10,02	-15,68	15,37	AB, CD
Cd	3,25	-1,74	4,76	1,24	0,10	C, ABD
Ac	3,47	-6,96	9,56	-1,32	0,11	AC, BD
Bc	13,26	0,22	-5,22	4,80	1,44	BC, AD
Abcd	3,02	-10,24	-10,46	-5,24	1,72	D, ABC
<b>Summe</b>	<b>44,76</b>				<b>53,45</b>	

Die Quadratsummen ergeben sich durch die Quadrierung der entsprechenden Werte in Kolonne (3) und Division durch die Anzahl der Versuchskombinationen ( $m$ ) (hier:  $m = 8$ ) sowie der Anzahl der Experimente pro Versuchskombination ( $n$ ) (hier:  $n = 2$ ). Bei richtig durchgeführter Rechnung stimmt die Gesamtsumme der Zahlen von Spalte 2 mit der Zahl in der ersten Zeile von Kolonne (3) überein. Zudem muss die Summe der Quadratsummen in Kolonne (3) identisch mit der Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) der gesamten Stichprobe sein. Die Summe der Abweichungsquadrate wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$SAQ = \frac{\sum_{i=1}^n z_i^2}{m} - \frac{\left( \sum_{i=1}^n z_i \right)^2}{nm} \quad (\text{Gl. 16})$$

mit  $z$ : Summe der Quotienten je Versuchskombination  
 $m$ : Anzahl der Versuchskombinationen  
 $n$ : Anzahl der Experimente pro Versuchskombination.

Die Berechnung der SAQ beträgt 53,45. Dies ist konform zu der Summe der Quadratsummen in Tabelle 24. Die Richtigkeit der Ergebnisse in Tabelle 24 ist somit bestätigt.

Als weiteres wird die Quadratsumme des Versuchsfehlers ( $Q_v$ ) bestimmt. Sie wird aus der Differenz der Summe der Quadrate aller Einzelexperimente und der Summe der Quadratsummen der Effekte und Wechselwirkungen gebildet. Diese berechnet sich nach Gleichung 17:

$$Q_v = \left( \sum_{i=1}^{mn} x_i^2 - \frac{\left( \sum_{i=1}^{mn} x_i \right)^2}{mn} \right) - \left( \frac{\sum_{i=1}^n z_i^2}{m} - \frac{\left( \sum_{i=1}^n z_i \right)^2}{mn} \right) \quad (\text{Gl. 17})$$

mit  $Q_v$ : Quadratsumme Versuchsfehler  
 $x_i$ : einzelne Quotienten-Werte  
 $z_i$ : aufsummierte Quotienten-Werte je Versuchskombination  
 $n$ : Anzahl der Versuchskombinationen  
 $m$ : Anzahl der Experimente pro Versuchskombination.

Danach ergibt sich für die Quadratsumme des Versuchsfehlers ( $Q_v$ ):

$$Q_v = 55,79 - 53,45 = 2,34$$

Für die Varianzanalyse eines  $2^n$ -Designs mit Wiederholung wird jede Summe auf die entsprechende Zahl von Freiheitsgraden bezogen. Die Gesamtheit der Freiheitsgrade ( $FG_g$ ) wird nach folgender Formel berechnet:

$$FG_g = mn - 1 = 2 \cdot 8 - 1 = 15 \quad (\text{Gl. 18})$$

Die Summe der Freiheitsgrade aller Effekte und Wechselwirkungen ( $FG_{ew}$ ) erhält man gemäß:

$$FG_{ew} = n - 1 = 8 - 1 = 7 \quad (\text{Gl. 19})$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade des Versuchsfehlers ( $FG_v$ ) wird nach folgender Gleichung ermittelt:

$$FG_v = n(m - 1) = 8(2 - 1) = 8 \quad (\text{Gl. 20})$$

Tabelle 25 zeigt die Varianzen der Effekte und Wechselwirkungen ( $s_e^2$ ), die Varianz des Versuchsfehlers ( $s_f^2$ ) und die berechneten F-Werte.

Tabelle 25: Varianzen und F-Werte für die selektive Extraktion von Chrysanthematen und Pyrethrat

Vermengte Effekte	Quadratsumme (QS)	FG	$s^2 = QS/FG$	F(1; 8)-Wert $s_e^2/s_f^2$	Parameter
A, BCD	21,90	1	21,90	<b>74,76</b>	P
B, ACD	12,82	1	12,82	<b>43,75</b>	T
AB, CD	15,37	1	15,37	<b>52,45</b>	
C, ABD	0,10	1	0,10	<b>0,33</b>	FR
AC, BD	0,11	1	0,11	<b>0,37</b>	
BC, AD	1,44	1	1,44	<b>4,92</b>	
D, ABC	1,72	1	1,72	<b>5,86</b>	t
Rest (=Fehler)	2,34	8	0,29	-----	
Insgesamt	53,45	15			

Die Schranke für  $F(1;8)$  bei 5 Prozent Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 5,32 [168]. Liegen die errechneten F-Werte über dem kritischen Wert (5,32), so kann von einem signifikanten Einfluss der entsprechenden vermengten Effekte und den sich dahinter verbergenden Einflussgrößen ausgegangen werden.

Aus Tabelle 24 ergibt sich ein signifikanter Einfluss für folgende Faktoren:

A	Extraktionsdruck	F-Wert: 74,76
B	Extraktionstemperatur	F-Wert: 43,75
D	Extraktionszeit	F-Wert: 5,86

Aus diesen Werten lässt sich allerdings noch keine Prognose stellen, bei welchem Niveau der Faktoren eine höhere Selektivität erzielt wird. Aufschluss darüber geben die Werte in Kolonne (3) (Tabelle 24). Dabei deuten negative Werte darauf hin, dass der Anteil der Effekte überwiegt, bei dem sich der Parameter auf niedrigem Niveau befindet. Positive Werte beschreiben den Überhang der Effekte, bei dem der Parameter ein hohes Niveau besitzt. Als Resultat der Varianzanalyse erhöht sich die Selektivität der Extraktion von Chrysanthematen und Pyrethraten bei einem geringen Extraktionsdruck (15 MPa), einer hohen Extraktionstemperatur (100 °C) und einer Extraktionszeit von 20 Minuten.

Die Fließrate (F-Wert: 0,33) hat keinen signifikanten Einfluss auf die selektive Extraktion der Pyrethrine.

Um die oben beschriebene Prognose zu bestätigen, wurden Extraktionen bei 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten Extraktionszeit durchgeführt. In Abbildung 83 ist der Quotient (Chrysanthemate : Pyrethrate) gegen die Extraktionszeit dargestellt.

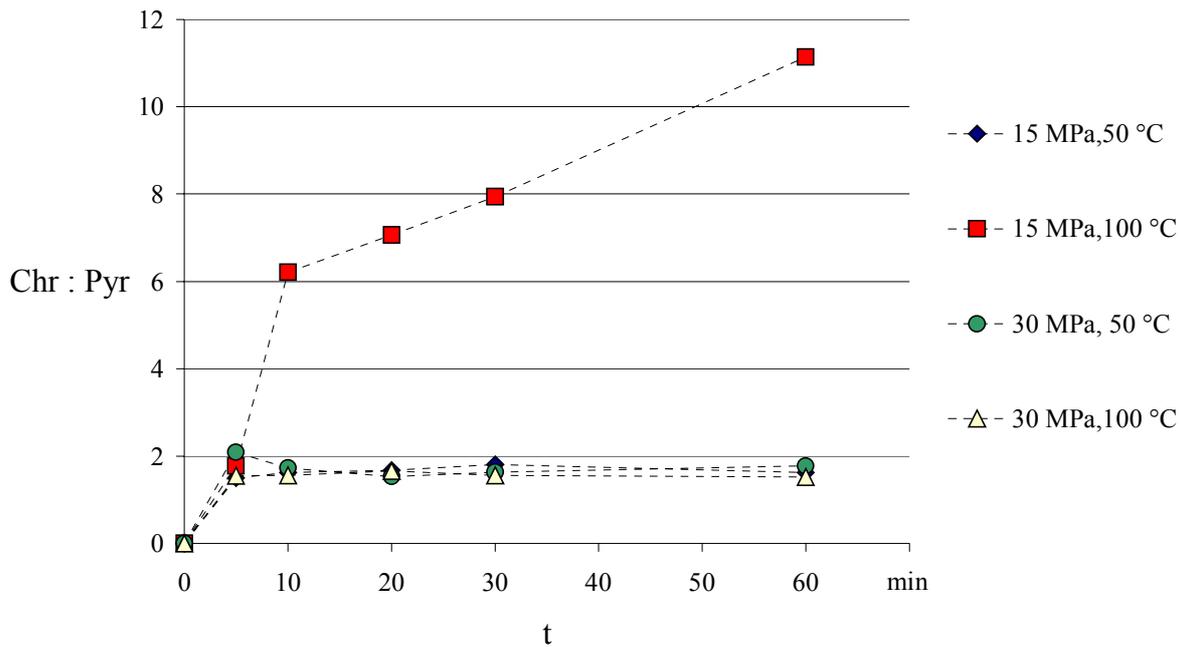


Abbildung 83: Auftragung von Quotient (Chr : Pyr) gegen die Extraktionszeit

In dieser Abbildung wird der Einfluss der Temperatur und des Druckes auf die Selektivität deutlich. Während man nach 60 minütiger Extraktion bei einem Druck von 30 MPa und Temperaturen von 50 °C und 100 °C sowie 15 MPa und 50 °C einen mittleren Wert von 1,6 erhält, wird bei einer Extraktionstemperatur von 100 °C und einem Extraktionsdruck von 15 MPa ein Wert von 11,1 ermittelt. Dies entspricht einem 7-fach höheren Wert als bei den anderen Experimenten. Der Extrakt besteht aus 92 Prozent Chrysanthematen und nur aus 8 Prozent Pyrethraten bezogen auf den gesamten Pyrethrumgehalt. Stellt man dies in absoluten Zahlen dar, so wurden 0,35 Gewichtsprozent Chrysanthemate und nur 0,03 Gewichtsprozent Pyrethrate extrahiert. Nach einer weiteren Extraktion von 60 Minuten bei gleichen Extraktionsbedingungen wurde der Extraktionsdruck auf 30 MPa erhöht und die Sammelvorlage gewechselt. In einer nachfolgenden 30 minütigen Extraktion wurde ebenfalls das Verhältnis von Chrysanthematen zu Pyrethraten im erhaltenen Extrakt bestimmt (vgl. Abb. 84).

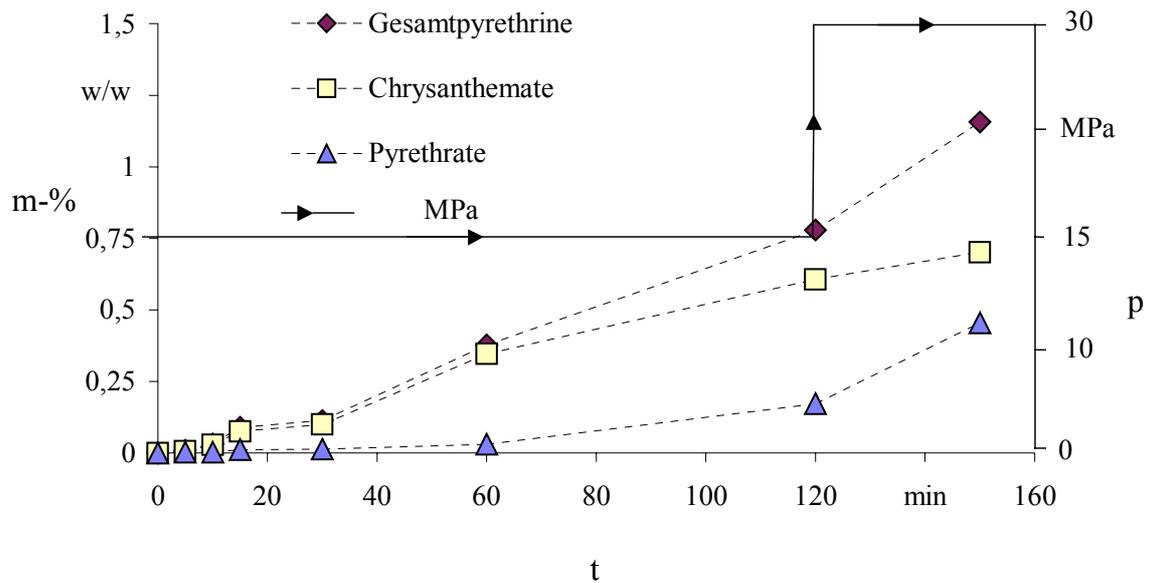


Abbildung 84: Extraktionsverlauf von Gesamt Pyrethrinen, Chrysanthematen und Pyrethraten bei  $T = 100\text{ °C}$  und  $p = 15$  und  $30\text{ MPa}$

Es wurde ein Wert von 0,3 ermittelt. Der Extrakt enthielt lediglich 23 Prozent Chrysanthemate aber 77 Prozent Pyrethrate bezogen auf den Gesamtpyrethringehalt. Veranschaulicht wird die unterschiedliche Zusammensetzung der Pyrethrine in Abbildung 85.

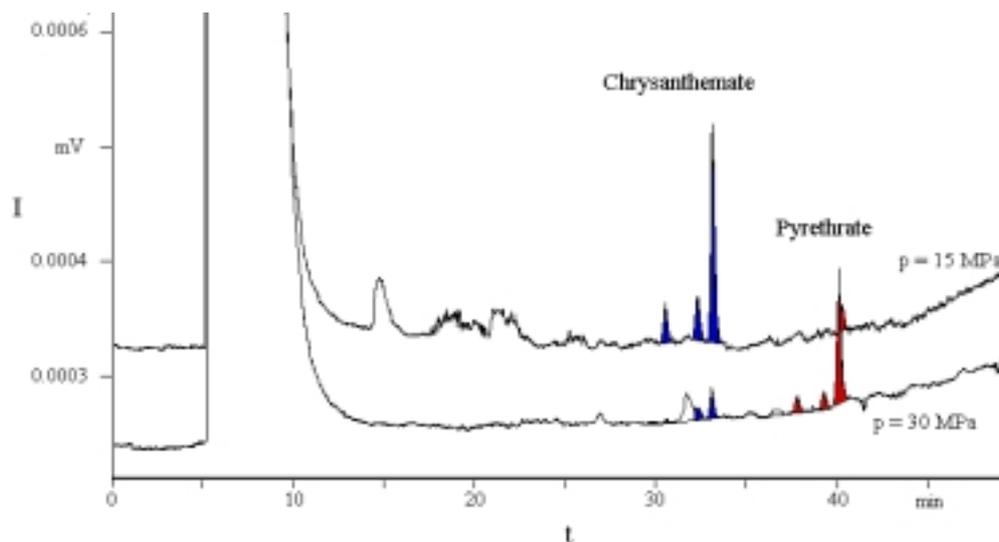


Abbildung 85: Chromatogramme von Pyrethrin-Extrakten bei unterschiedlichen SFE-Bedingungen

Abbildung 85 zeigt Chromatogramme von zwei Extrakten, die bei einer Extraktionstemperatur von  $100\text{ °C}$  aber unterschiedlichen Extraktionsdrücken erhalten wurden. Das obere

Chromatogramm zeigt Inhaltsstoffe eines Extraktes, die bei einem Druck von 15 MPa und nach einer Extraktionszeit von 60 Minuten aufgefangen wurden. Man erkennt, dass hauptsächlich die Gruppe der Chrysanthemate, bestehend aus Cinerin I, Jasmolin I und Pyrethrin I, extrahiert wurde. Daneben ist Pyrethrin II zu einem geringen Prozentsatz aus dem Blütenpulver ebenfalls herausgelöst worden. In dem unteren Chromatogramm (vgl. Abb. 84) sind die Bestandteile eines Extraktes zu sehen, die zwischen 120 und 150 Minuten Extraktionszeit und einem Druck von 30 MPa erhalten wurden. Hier sind überwiegend Pyrethrate extrahiert worden.

Diese Studie verdeutlicht, dass durch Variation des Druckes bei gleichbleibender Extraktionstemperatur eine selektive Extraktion von Chrysanthematene und Pyrethraten durchführbar ist.

#### 6.2.2.2 Maximale Extraktion von Pyrethrinen

Um die optimalen Versuchbedingungen zur maximalen Extraktion von Pyrethrinen zu erhalten, wurden die Extraktionsausbeuten von Gesamtpyrethrinen in Massenprozent (m-%) verwendet. Dabei multiplizierte man diese mit dem Faktor 100. Die Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit von den verschiedenen Niveaus sind in Tabelle 26 aufgezeigt.

Tabelle 26: Extraktionsausbeuten (m-% · 100) von Gesamtpyrethrinen bei den verschiedenen Versuchskombinationen

		D (hoch)		D (niedrig)	
		C (hoch)	C (niedrig)	C (hoch)	C (niedrig)
A (hoch)	B (hoch)	(abcd) 89 75			(ab) 76 77
	B (niedrig)		(ad) 110 102	(ac) 99 71	
A (niedrig)	B (hoch)		(bd) 50 40	(bc) 38 52	
	B (niedrig)	(cd) 86 87			(I) 68 82

Analog zu den Berechnungen für den Quotient (Chr : Pyr) werden auch hier die Effekte und Quadratsummen bestimmt. Die Überprüfung der Richtigkeit der Berechnungen in Tabelle 27 wird durch die Übereinstimmung des Summenwertes und der ersten Zahl in Kolonne (3) bestätigt.

Tabelle 27: Berechnung der Effekte und Quadratsummen für die maximale Extraktionsausbeute

Versuchs- kombination	Mittelwert Ausbeute	Kolonne			Mittleres Quadrat (3) <sup>2</sup> /16	Vermengte Effekte
		(1)	(2)	(3)		
(1)	75	181	303	601		
Ad	106	122	299	98	600	A, BCD
Bd	45	172	63	-104	676	B, ACD
Ab	77	127	36	39	95	AB, CD
Cd	87	31	-60	-4	1	C, ABD
Ac	85	32	-45	-27	46	AC, BD
Bc	45	-2	1	15	14	BC, AD
Abcd	82	37	39	38	90	D, ABC
<b>Summe</b>	<b>601</b>				1522	

Die Berechnung der Summe der Abweichungsquadrate SAQ unter Anwendung der Gleichung 16 ergibt den Wert 1522. Dieser ist mit dem Wert der Quadratsummen identisch. Nach Gleichung 17 beträgt die Quadratsumme des Versuchsfehlers  $Q_v = 769$ . Die Verteilung der Freiheitsgrade entspricht derselben wie in Kapitel 6.2.2.1. Die Varianzen berechnen sich durch Division der einzelnen Quadratsummen durch die Freiheitsgrade. Für den F-Test werden die entsprechenden Varianzen der Effekte und Wechselwirkungen durch die Varianz des Versuchsfehlers dividiert. Die Resultate sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Varianzen und F-Werte für die optimale Extraktionsausbeute von Pyrethrinen

Vermengte Effekte	Quadratsumme (QS)	FG	$s^2 = QS/FG$	F(1; 8)-Wert $s_e^2/s_f^2$	Parameter
A, BCD	600	1	600	6,2	P
B, ACD	676	1	676	7,0	T
AB, CD	95	1	95	1,0	
C, ABD	1	1	1	0,0	FR
AC, BD	46	1	46	0,5	
BC, AD	14	1	14	0,1	
D, ABC	90	1	90	0,9	T
Rest (=Fehler)	769	8	96	-----	
Insgesamt	1522	15			

Aus der Tabelle ist ein signifikanter Einfluss bei folgenden Parametern zu erkennen:

- A Extraktionsdruck F-Wert: 6,2
- B Extraktionstemperatur F-Wert: 7,0

Die vermengten Wechselwirkungen mit den Effekten der einzelnen Parameter wurden dabei vernachlässigt.

Aus den Vorzeichen der Effekte in Tabelle 27 Kolonne (3) erhält man die Information, dass ein hoher Extraktionsdruck (30 MPa) aber eine niedrige Extraktionstemperatur (50 °C) die Ausbeute signifikant erhöht.

Die gewählten Extraktionszeiten (20 und 60 min) und Fließraten (1,5 ml/min und 3,0 ml/min) beeinflussen die Extraktionsausbeute nicht. Dies wird in der Graphik (Abb. 86) deutlich.

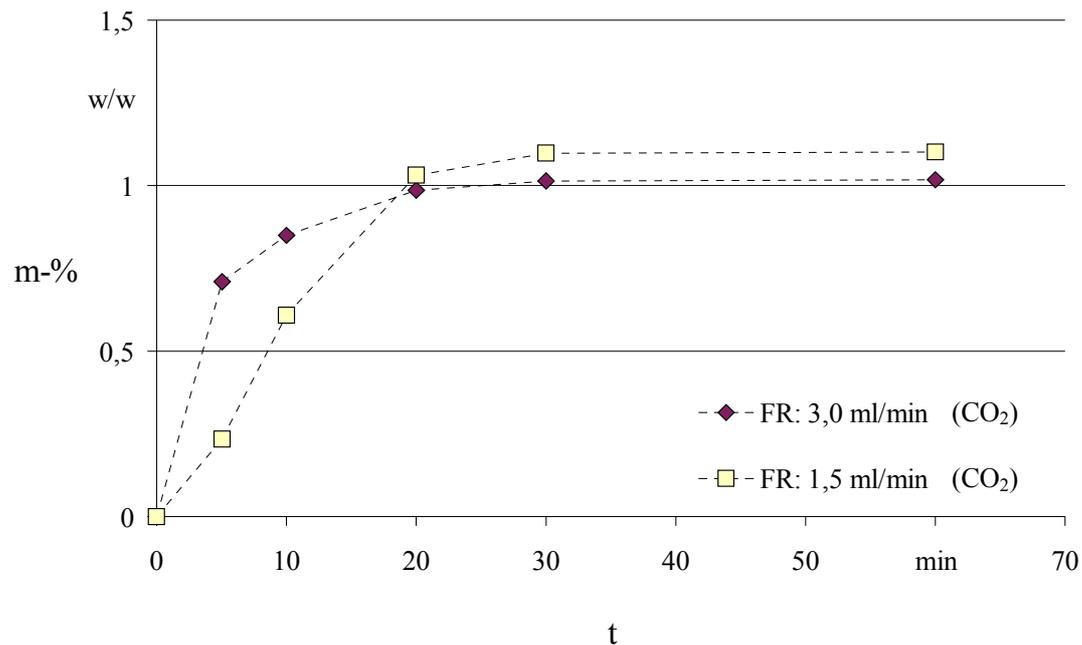


Abbildung 86: Vergleich der Extraktionskinetik bei unterschiedlichen Fließraten des überkritischen Fluids

Bei einer Fließrate von 1,5 ml/min Kohlendioxid ist die maximale Extraktionsausbeute nach 20 Minuten erreicht. Die extrahierte Pyrethrinmenge bei einer Fließrate von 3,0 ml/min ist in den ersten 10 Minuten größer als bei einem Fluss von 1,5 ml/min. Die Ausbeute wird aber ebenfalls erst nach 20 Minuten Extraktionszeit maximal. Der Gesamtgehalt ist bei einem Fluss von 1,5 ml/min um 10 Prozent höher als bei 3,0 ml/min.

### 6.3 Diskussion

Aus der hier beschriebenen Optimierungsmethode der Faktoriellen Teilversuchsplanung konnten Rückschlüsse auf die Extraktionsparameter für die selektive und die maximale Extraktion von Pyrethrinen aus Chrysanthemenblüten gezogen werden. Für die selektive Extraktion erwies sich eine hohe Temperatur (100 °C) und ein niedriger Druck ( $p = 15$  MPa) als signifikant gut. Um eine maximale Gesamtausbeute zu erzielen, sind ein hoher Druck ( $p = 30$  MPa) und eine niedrige Temperatur ( $T = 50$  °C) ausgezeichnet. In der präparativen Anwendung der Extraktion von Pyrethrinen mit überkritischem Kohlendioxid werden ebenfalls niedrige Temperaturen bevorzugt. Allerdings werden die Pyrethrine bei niedrigem

---

Extraktionsdruck (8 – 10 MPa) schon ausreichend extrahiert [171, 172]. Dies wird auf die geringe Dichte und hohe Diffusion des überkritischen Kohlendioxids zurückgeführt. Zum anderen ist es kostengünstiger, niedrige Extraktionsbedingungen zu wählen. In der vorliegenden Arbeit wurde die SFE als analytische Extraktionsmethode eingesetzt. Dabei wurden Probenmengen extrahiert, die um das 1000fache kleiner waren als die, die in der präparativen SFE bearbeitet werden. Die Diffusion in der analytischen SFE spielt aufgrund der geringen Transportwege eine geringere Rolle. Wichtig ist die Löslichkeit der Analyten im überkritischen Fluid. Diese nimmt mit zunehmendem Druck zu.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden chromatographische Methoden für die Analytik von Pyrethrinen und deren synthetische Derivate entwickelt sowie der Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmethoden zur Probenvorbereitung erörtert.

Die Trennung der insektiziden Wirkstoffe wurde in der überkritischen Fluid Chromatographie mit einem isothermen, positiven Druckgradienten ermöglicht. Mit einer SFC-MS-Kopplung und positiver chemischer Ionisation (PCI) konnten die Substanzen den Chromatogrammpeaks eindeutig zugeordnet werden. Durch den Einsatz eines internen Standards wurden unter Berücksichtigung der Kohlenstoff-Kalibrierung mittels Flammenionisationsdetektor (FID) und der daraus ermittelten Responsefaktoren die Gehalte der Analyten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kohlenstoff-Kalibrierung nur bei strukturgleichen Stoffen anwendbar ist. Es gelang, neben dem Gesamtgehalt der insektiziden Wirkstoffe in pyrethrinhaltigen Matrices auch die Gehalte der Einzelkomponenten zu bestimmen. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die untersuchten Substanzen konnten im unteren ppm-Bereich festgelegt werden. Die Gehalte von Pyrethrinen und Pyrethroiden in den überprüften technischen Produkten konnten mit der SFC-Methode bestätigt werden.

Mit einer mobilen Phase aus Acetonitril und Wasser und einem linearen Eluentengradient konnten die sechs natürlichen Insektizide in der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion erfolgreich separiert werden. Durch die Aufnahme der Chromatogramme bei verschiedenen Wellenlängen konnten koeluiierende Substanzen wie Pyrethrin II und der Synergist Piperonylbutoxid quantitativ analysiert werden. Es wurde eine Nachweisgrenze für Pyrethrine von 50 µg/l (ppb) ermittelt. Mit einer on-line Methode von Festphasenextraktion und HPLC konnten Pyrethrine in wässrigen Proben bis zu einer Konzentration von 100 ng/l (ppt) bestimmt werden.

Die hier vorgestellten Analysenmethoden eignen sich für den Einsatz in der Routineanalytik zur Gehaltsbestimmung von belasteten, pyrethrinhaltigen Umweltproben und in technischen Überwachungsprozessen. Zudem können Analysen im Spurenbereich in aquatischen Systemen durch die on-line Kopplung der Festphasenextraktion mit der HPLC durchgeführt werden.

Durch Aufnahmen von Basislinien mobiler Phasen unterschiedlicher Qualität in der SFC und HPLC konnten schnelle Aussagen über die relative Reinheit der Elutionsmittel getroffen werden.

Mit einem UV-Spektrometer wurden die molaren Absorptionskoeffizienten der Pyrethroide in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 300 nm berechnet. Es wurden UV-Spektren der Pestizide während der chromatographischen Trennung sowohl in der HPLC als auch in der SFC mit einem scannenden UV-Detektor aufgenommen. Dabei fand in der SFC die Methode der on-column-Messung ihren Einsatz. Die Absorptionsmaxima der in der HPLC und SFC aufgenommenen Spektren waren gerätebedingt um 10 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben verglichen mit Literaturspektren und den mit dem UV-Spektrometer erhaltenen Spektren. Durch fraktioniertes Sammeln in der HPLC konnten die einzelnen Pyrethrine separiert werden.

Zur Probenvorbereitung wurden verschiedene Extraktionsmethoden für Feststoffe untersucht. Die im Routineeinsatz verwendete Soxhlet- und Ultraschall Extraktion sind in den Punkten Extraktionsausbeute, Wiederfindung und Selektivität vergleichbar gut. Die beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE) erreicht ebenso gute Ergebnisse, ist jedoch um ein vielfaches schneller als die beiden zuvor erwähnten Extraktionsmethoden. Eine selektive Extraktion bei Soxhlet-, Ultraschall- und beschleunigter Lösemittlextraktion ist nicht durchführbar. Die ASE stellt somit eine Alternative zu den gebräuchlichen Kaltextraktionsverfahren mit Hexan oder Petrolether dar.

Mit der subkritischen Wasserextraktion konnten keine Pyrethrine extrahiert werden. Unter den gewählten Bedingungen wurden die natürlichen Insektizide zum Teil durch den Bruch der Esterbindung gespalten. Die freiwerdenden Säuren konnten im Extrakt nachgewiesen werden. Daher eignet sich die HWE nicht zur Extraktion von Pyrethrinen.

Die faktorielle Teilversuchsplanung ermöglicht es, geeignete Extraktionsbedingungen für die selektive und maximale Extraktion von Pyrethrinen unter Anwendung der SFE zuzuweisen. Niedriger Druck (~ 15 MPa) und hohe Temperatur (~ 100 °C) ermöglichen eine selektive Extraktion. Mit einer exakten Optimierung könnten Präparate mit einer insektiziden Spezies (Chrysanthemate bzw. Pyrethrate) für pharmazeutische oder medizinische Zwecke gewonnen werden.

## 8 Literaturverzeichnis

---

- [1] dtv-Lexikon (1995) FA Brockhaus GmbH Mannheim und Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG, München.
- [2] Römpp Lexikon Chemie -Version 1.5 (1998) Thieme Verlag, Stuttgart.
- [3] Streit B (1994) Lexikon Ökotoxikologie, “. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, p 611-613.
- [4] Holdgate MW (1983) Umwelt – Weltweit – Bericht des Umweltprogramms der Vereinten Nationen (UNEP) 1972 – 1982, Schmidt Verlag, Berlin, p. 296-199.
- [5] Schlenger R (1993) DAZ, 30: 29-35.
- [6] <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extocnet/pyrethrins-ziram/pyrethrins-ext.html>.
- [7] Schulz J, Schmoldt A, Schulz M (1993) PZ,15: 9-24.
- [8] Roth L (1996) Pyrethroide: Eigenschaften, Verwendung Arbeitsschutz, Umwelt, Lagerung, Entsorgung, Sanierung, Toxizität, Diagnostik, Therapie, Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG, Lansberg, p. 8-13.
- [9] Pfitzenmeier G (1989) Natur, 3: 83-91.
- [10] Appel KE, Gericke S (1993) Bundesgesundheitsbl. 6/93: 219-228.
- [11] Lukassowitz I (1995) Pressediendt des BgVV 08/95.
- [12] Perkow W (1968) Die Insektizide, Hüthig Verlag, Heidelberg, p. 512-514.
- [13] Jäger-Mischke I, Wollny V (1988) Öko-Mitteilung 4/88: 40-43.
- [14] Gnadinger CB (1936) in: Pyrethrum Flowers, 2<sup>nd</sup> Ed., p. 1-4.
- [15] Head SW (1970) Pyrethrum Post (Nakuru), 10 (4): 17-21.
- [16] Pattenden G (1970) Pyrethrum Post (Nakuru), 10 (4): 2-5.
- [17] Staudinger H, Ruzika W (1924) Helv Chim Acta, 7: 177-458.
- [18] LaForge FB, Barthel WF (1944) J Org Chem, 9: 242-249.
- [19] Crombie L, Pattenden G, Simmonds DJ (1976) Pestic Sci, 7: 225-230.
- [20] Stahl E, Schütz E (1980) Planta Medica, 40: 12-21.
- [21] Sharp GJ, Brayon JG, Dilli S, Haddad RP (1988) Analyst, 113: 1493-1507.
- [22] Scheidl I, Pfannhauser W, Woidich H (1980) Dt Lebensmittel-Rundschau, 9: 309-311.
- [23] Chen YL, Casida JE (1969) J Agric Food Chem, 17: 208-215.
- [24] Kawano Y, Yanagahara K, Miyamoto T Yamamoto I (1980) J Chrom, 198: 317-328.
- [25] Class TJ, Kintrup J(1991) Fresenius J Anal Chem, 340: 446-453.
- [26] Schlechter MS, Green N, LaForge FB (1949) J Amer Chem Soc, 71: 3165-3173.

- 
- [27] Perkow W (1968) Die Insektizide, Hüthig Verlag, Heidelberg, p. 512-514.
- [28] Hassal KA (1982) The Chemistry of Pesticides, VCH, Weinheim: p. 157.
- [29] Elliott M, Farnham AW, Janes NF, Needham PH, Pulman DA (1947) Nature, 284: 710-711.
- [30] Jäger-Mischke I (1989) Artikel zu: Natur 3/1989.
- [31] Kutter JP, Class TJ (1992) Chromatographia, 33: 103-112.
- [32] Ôi N, Katihara H, Kira R (1990) J Chromatogr, 515: 441-450.
- [33] Class TJ (1992) GIT Fachz Lab, 8: 809-810.
- [34] König KH (1990) ChiuZ, 6: 292-302.
- [35] Link W (1993) Bundesgesundheitsblatt, 6: 217.
- [36] Perger G, Szadkowski D (1994) Dt Ärzteblatt, 1, Heft 15: C-701.
- [37] Konieczko D (1995) "Erste Ergebnisse der Pyrethroid-Studie" Handbuch der Arbeitsmedizin.
- [38] Jähne R (1992) Dissertation, Universität Oldenburg.
- [39] De le Tour C (1994) Ann Chim Phys, 21: 127.
- [40] Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (1955) Washington D.C., 8<sup>th</sup> Edition, p. 68-70.
- [41] PBK Determination of Pyrethrins (1954) Official Method of Analysis of Pyrethrum Extract, Pyrethrum Board of Kenia.
- [42] Bevenue A, Kawano Y, Delano F (1971) Pyrethrum Post, 11: 41-47.
- [43] Rickett FE, Chadwick PR (1972) Pestic Sci, 3: 263-269.
- [44] Baker DR, Henry RA, Williams RC, Hudson DR, Parris NA (1973) J Chromatogr, 83: 233-243.
- [45] McEldowney AM, Menary RC (1988) J Chromatogr, 447: 239-243.
- [46] Debon A, Segalen JL (1989) Pyrethrum Post, 17: 43-46.
- [47] Olive BM (1973) J Assoc Off Anal Chem, 56: 915-918.
- [48] Jork H, Reh E, Wimmer H (1981) GIT Fachz Lab, 25: 566-570.
- [49] Wieboldt RC, Kempfert KD, Later DW, Campbell ER (1989) J High Resolut Chromatogr, 12: 106-111.
- [50] Nashikawa Y (1992) Analytical Science, 8: 817-822.
- [51] Stevenson DS (1971) Pyrethrum Post, 11: 90-93.
- [52] Gronemann AF, Posthumus M, Tuinstra LGMT, Traag WA (1984) Anal Cmhim Acta, 163: 43-54.

- 
- [53] Class TJ, Böhner W (1995) GIT Fachz Lab, 1: 21-22.
- [54] Wang I, Subramanian V, Moormann R, Burleson J, Ko J (1997) J Chromatogr A, 766: 277-281.
- [55] Wenclawiak BW, Krappe M, Otterbach A (1997) J Chromatogr A, 785: 263-267.
- [56] Krappe M (1999) Dissertation, Universität-GH Siegen.
- [57] Kromidas S, Klinker R, Mertens R (1995) Nachr Chem Tech Lab 43 (6): 669-676.
- [58] Renger B (1994) Merck Spektrum 1: 1.
- [59] Schwedt G (1986) Chromatographische Trennmethode, 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, p. 9-15.
- [60] Engelhart E, Rohrschneider L (1996) Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur, Universität Saarbrücken.
- [61] Bartle KD (1988) in: Supercritical Fluid Chromatography, ed. Smith RM, RCS Chromatography Monographs, London, p. 6-20.
- [62] Frehse H, Thier HP (1991) GIT Fachz Lab, 35: 258-291.
- [63] Penninger JML, Radosz M, McHugh MA, Krukonić VJ (1995) Supercritical Fluid Technology, Elsevier, Amsterdam.
- [64] Paschke T (1994) Dissertation Universität-GH Siegen.
- [65] Kraß M (1995) Dissertation, Universität-GH Siegen.
- [66] Sterzenbach D (1997) Entwicklung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung von chlorierten Kohlenwasserstoffen in marinen Sedimenten und Schwebstoffen unter besonderer Berücksichtigung der überkritischen Fluidextraktion, Berichte des BSH, No. 10, Hamburg.
- [67] de la Tour C (1822) Ann Chim Phys, 21: 127.
- [68] Hannay JB, Hogarth J (1879) Proc Roy Soc (London), 29: 324.
- [69] Hannay JB, Hogarth J (1880) Proc Roy Soc (London), 30: 178.
- [70] Klesper E, Corwin AH, Turner DA (1962) J Org Chem, 27: 700.
- [71] Giddings JC, Myers MN, King JW (1969) J Chromatogr Sci, 7: 276.
- [72] Sie ST, Rijnders GW (1967) Sep Sci, 2: 699.
- [73] Novotny M, Springston SR, Peadar PA, Fjellsted JC, Lee ML (1981) Anal Chem, 53: 407.
- [74] Lee ML, Xu B, Huang EC, Djordjević NM, Chang H-CK, Markides KE (1989) J Microcol Sep, 1: 7.
- [75] Farbrøt Buskhe A, Berg BE, Gyllenhaal O, Greibrokk T (1988)

- 
- J High Resolut Chromatogr / Chromatogr Commun, 11: 16.
- [76] Richter BE, Knowles DE, Andersen MR, Porter NL, Campbell ER, Later DW (1988) HRC & CC, 11: 29.
- [77] Cortes HJ, Campbell RM, Himes RP, Pfeiffer CD (1993) US Patent 5234599.
- [78] Greibrokk T, Berg BE (1993) Trends Anal Chem, 12: 303-308.
- [79] Berg BE, Hansen EM, Flaaten AM, Greibrokk T (1993) J Microcolumn Sep, 5: 505-510.
- [80] Berg BE, Greibrokk T (1994) J High Resolut Chromatogr, 17: 49-50.
- [81] Daimo H, Hirata Y J (1994) Microcolumn Sep, 5: 531-535.
- [82] Chester TL, Innis DP (1995) Anal Chem, 67: 3057-3063.
- [83] Berg BE, Greibrokk T (1989) J High Resolut Chromatogr, 12: 322.
- [84] Kirschner CH, Taylor LT (1993) J High Resolut Chromatogr, 16: 73-84.
- [85] Hirata Y, Kawaguchi Y, Kitono K (1995) Chromatographia, 40: 42-46.
- [86] Bruno TJ (1993) Am Lab (Shelton, Conn.), 25: 16-24.
- [87] Bruno TJ (1994) J Chromatogr Sci, 32: 112-115.
- [88] Arnold M, Kleibohmer W (1994) Chromatographia, 39: 612-618.
- [89] Zegers BN, de Geus HJ, Wildenburg SHJ, Lingemann H, Brinkmann UAT (1994) J Chromatogr, 677: 141-150.
- [90] Wenclawiak BW, Otterbach A, Krappe M (1998) J Chromatogr A, 799: 265-273.
- [91] Luque de Castro MD, Valcarcel M, Tena MT (1994) Analytical Supercritical Fluid Extraction, Springer Verlag, Heidelberg.
- [92] Gere DR, Houck RK, Pacholec F, Rosselli ACP (1988) Fresenius J Anal Chem, 330: 222.
- [93] Hinz DC, Wenclawiak BW (1999) Fresenius J Anal Chem, 365: 355-360.
- [94] Hinz DC (1996) Diplomarbeit, Universität-GH Siegen.
- [95] Schipke J (1995) Dissertation, Universität-GH Siegen.
- [96] Nashikawa Y (1992) Anal Sci, 8(6): 817-822.
- [97] Nashikawa Y (1993) Anal Sci, 1(1): 39-42.
- [98] Specht W, Tillkes M (1985) Fresenius J Anal Chem, 322: 443-455.
- [99] Croll BT (1969) Water Treatment and Examination, 18: 220-227.
- [100] Latif S, Haken JK, Wainwright MS (1984) J Chromatogr, 287: 77-84.
- [101] Stringham RW, Schulz RP (1985) J Assoc Off Anal Chem, 68 (6): 1137-1139.
- [102] Ryan JJ, Pilon JC, Leduc R (1982) J Assoc Off Anal Chem, 65 (4): 904-908.

- 
- [103] Raynor MW, Clifford AA, Bartle KD, Reyner C, Williams A (1989) *J Microcolumn Sep*, 11: 697.
- [104] Taylor LT, Calvey EM (1989) *Chem Rev*, 89: 321.
- [105] Taylor LT, Calvey EM (1992) in: *Analysis with supercritical fluids: Extraction and chromatography*, ed. Wenclawiak BW, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 178-189.
- [106] Saito M, Yamauchi Y (1994) in: *Fractionation by packed-Column SFC and SFE: principles and application*, ed. Saito M, Yamauchi Y, Okuyama T, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 123-127.
- [107] Allen LA, Class TE, Dorn HC (1988) *Anal Chem*, 60: 390-394.
- [108] Korhammer SA, Bernreuther A (1996) *Fresenius J Anal Chem*, 354: 131-135.
- [109] Arpino PJ (1992) in: *Mass Spectrometry in Biological Science*, ed. Gross ML, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 269-280.
- [110] Pinkston JD (1992) in: *Analysis with supercritical fluids: Extraction and chromatography*, ed. Wenclawiak BW, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 151-177.
- [111] Chen Z, Wang Y (1996) *J Chromatogr*, 754: 367-395.
- [112] Pattenden G, Crombie L, Hemesley P (1973) *Organic Mass Spectrometry* (7): 719-735.
- [113] Casida JE, Quistad GB (1995) in: *Pyrethrum Flowers*, ed. Casida JE, Quistad GB, Oxford University Press, New York, p. 261.
- [114] Holzer G, Deluca S, Voorhees (1985) *J high Resolut Chromatogr*, 8: 528.
- [115] McLafferty FW, Turecek F (1995) *Interpretation von Massenspektren Spektrum*, Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford, p. 261-66.
- [116] Hübschmann HJ (1996) *Handbuch der GC/MS; Grundlagen und Anwendungen*, VCH, Weinheim, p. 152.
- [117] Budzikiewicz H (1992) *Massenspektrometrie: eine Einführung*, VCH, Weinheim, p. 102.
- [118] Leichter E, Strode JTB, Taylor LT, Schwieghardt (1996) *Anal Chem*, 68: 894-898.
- [119] King JW, Johnson JH, Eller TJ (1995) *Anal Chem*, 67: 2288-2291.
- [120] Linde AG (1996) *Werksgruppe Technische Gase AER/ 9-96*.
- [121] Wilson J (1996) *Diplomarbeit*, University of Aberdeen.
- [122] Porter NL, Richter BE, Bornhop DJ, Later DW, Beyerlein FH (1987) *J High Resolut Chromatogr*, 10: 477-478.
- [123] Schneider GM (1992) in: *Analysis with supercritical fluids: Extraction and*

- 
- chromatography, ed. Wenclawiak BW, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 9-31.
- [124] Liong KK, Wells PA, Foster NR (1991) *J Supercrit Fluids*, 4(2): 91-107.
- [125] Naumer H, Heller W (1986) *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, p. 25.
- [126] Head SW, Rebello C (1971) *Pyrethrum Post (nakuro)*, 11(1): 24-28
- [127] Carlson DJ (1995) in: *Pyrethrum Flowers*, ed. Casida JE, Quistad GB, Oxford University Press, Oxford, p. 99-107.
- [128] Guiochon G, Guillemin CL (1988) *Quantitative Gas Chromatography*, Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, p. 650-656.
- [129] Oehme M (1982) *Gas-Chromatographische Detektoren*, Hüthig Verlag, Heidelberg, p. 29.
- [130] Beck H, Mathar M (1985) *Bundesgesundheitsbl.* 28: 1-12.
- [131] Jorgensen A, Picel KC, Stamoudis VC (1990) *Anal Chem*, 62: 683-689.
- [132] Scanlon JT, Willis DE (1985) *J Chromatogr Science*, 23: 333-340.
- [133] Hammerle RH, Siegl WO, Herrmann HM, Wenclawiak BW (1995) *SEA Technical Paper 952353*: 62.
- [134] Siegl WO, Hammerle RH, Herrmann HM, Wenclawiak BW, Luers-Jongen B (1999) *Atmospheric Environment*, 33: 797-805.
- [135] Doerffel K (1982) *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB deutscher Verlag, Leipzig, p. 121-131.
- [136] Odinga WA (1992) *Pyrethrum Post*, 18(4): 121-125.
- [137] Wenclawiak BW, Otterbach A (2000) *J Biochemical and biophysical methods (im Druck)*.
- [138] Runge FF (1985) *Merck Kontakte*, 1: 49.
- [139] Tswett MS (1906) *Ber Dtsch Bot Ges*, 24: 316.
- [140] Aced G, Möckel HJ (1991) *Liquidchromatographie*, VCH Weinheim, 2-3.
- [141] Casida JE (1973) in: *Pyrethrum: The natural insecticide*, Academic Press, New York, p. 25-48.
- [142] Wagner-Löffler M (1985) *GIT Fachz Lab*, 10: 982-984.
- [143] Galensa R, Engelhardt U, Bahadir M, Böhm H (1995) *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC*, VCH Weinheim: 29-30.
- [144] *The Pestizide Manual*, 9<sup>th</sup> ed (1991) Worthing CR, Hance RJ (Eds.), British Crop Protection Council, Farnham, UK.

- 
- [145] Peaden PA, Lee ML (1983) *J Chromatogr*, 259: 1.
- [146] Gore RC, Hannah RW, Pattachini SC, Porro TJ (1971)  
*J Assoc Off Anal Chem*, 54: 1040-1082.
- [147] Maiwald M (1997) Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- [148] Head SW (1973) in: *Pyrethrum - The Natural Insecticide*, ed.: Casida JE,  
Academic Press, London, p. 37.
- [149] Kabus HP (1996) *Handbuch OSP-II A Sample Preparator*. Merck, Darmstadt.
- [150] Hees T (1998) Dissertation, Universität-GH Siegen.
- [151] Saito M, Yamauchi Y, Okuyama T (1995) in: *Fractionation by Packed-Column SFC and SFE Principles and Applikation*, ed. Saito M, Yamauchi Y, Okuyama T,  
VCH, Weinheim, p. 16.
- [152] Riekkola ML, Manninen P (1993) *Trends in Analytical Chemistry*, 12(3): 108-114.
- [153] Heemken OP, Theobald N, Wenclawiak BW (1997) *Anal Chem*, 69: 2171-2180.
- [154] Paschke T, Hawthorne SB, Miller DJ, Wenclawiak BW (1992) *J Chromatogr*,  
609: 333-340.
- [155] Ammann A, Hinz DC, Addleman RS, Wai CH, Wenclawiak BW (1999)  
*Fresenius J Anal Chem*, 364: 650-653.
- [156] Höfler F, Ezzel J, Richter B (1995) *Labor Praxis*, 3: 39-43.
- [157] Höfler F, Jensen D, Ezzel J, Richter B (1995) *GIT Spezial*, 1/95: 68-71.
- [158] Yang Y, Belgazi M, Lagadec A, Miller DJ, Hawthorne SB (1998) *J Chromatogr (A)*,  
810: 149-159.
- [159] Yang Y, Beowardt S, Hawthorne SB, Miller DJ (1995) *Anal. Chem.*, 67: 4571-4576.
- [160] Daimon H, Pwaliszyn J (1996) *Analytical Communications*, 33: 421-424.
- [161] Hageman KJ, Mazeas L, Grabanski CB, Miller DJ, Hawthorne SB (1998)  
*Anal. Chem.*, 68: 3892-3898.
- [162] Yang Y, Hawthorne SB, Miller DJ (1997) *Environ. Sci. Technol.*, 31: 430-437.
- [163] Hawthorne SB, Krappe M, Wenclawiak BW (1999) *Fresenius J Anal  
Chem*, 364(4): 625-630.
- [164] Wenclawiak B W, Heemken OP, Sterzenbach D, Schipke J, Theobald N, Weigelt V  
(1995) *Anal Chem*, 67: 4577-80.
- [165] Jovetic S, de Gooijer CD (1995) *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(2): 125-138.
- [166] Wenclawiak BW, Otterbach A (1999) *Fresenius J Anal Chem*, 356: 472-474.
- [167] Maio G (1994) Dissertation, Universität-GH Siegen: 50-68.

- 
- [168] Bandermann F (1972) Statistische Methoden beim Planen und Auswerten von Versuchen, in: Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 4. Aufl., Band 1, Verlag Chemie, Weinheim: 347-360.
- [169] Maio G, von Holst C, Wenclawiak BW, Darskus R (1997) *Anal Chem*, 69: 601-606.
- [170] Maciver DR (1995) in: *Pyrethrum Flowers*, ed. Casida JE, Quistad GB, Oxford University Press, New York, p. 108-122.
- [171] Wynn HTP, Cheng-Chin C, Tien-Tsu S, Fong L, Ming-Ren SF (1995) *Talanta*, 42: 1745-1749.
- [172] Bunzenberger G, Lack E, Marr R (1985) *Chem.-Ing.-Tech*, 55(4): 320-321.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

ASE	beschleunigte Lösemittelextraktion
Chr	Chrysanthemate
DC	Dünnschichtchromatographie
E	Extinktion
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EI	Elektronenstoß Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
$H_{\text{theor}}$	theoretische Bodenhöhe
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HWE	subkritische Wasserextraktion
$I_p$	Peakintensität
$k'$	Kapazität
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
MSD	Massenselektiver Detektor
$N_{\text{theor}}$	theoretische Bodenzahl
NCI	negative chemische Ionisation
p	Druck
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCI	positive chemische Ionisation
PBO	Piperonylbutoxid
Pyr	Pyrethrate
R	Korrelationskoeffizient
Rf	Responsefaktor
$R_s$	Auflösung
RP	Umkehrphase

---

SFC	überkritische Fluid Chromatographie
SFE	überkritische Fluid Extraktion
SOX	Soxhlet-Extraktion
T	Temperatur
USE	Ultraschall-Extraktion

$\alpha$	Selektivität
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge

## 9.2 IUPAC-Nomenklatur [144]:

### Pyrethrine:

Cinerin I:	(Z)-(S)-3-(But-2-enyl)-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl(1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropanlcarboxylat
Jasmolin I:	(Z)-(S)-2-Methyl-4-oxo-3-(penta-2-enyl)cyclopent-2-enyl(1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropanlcarboxylat
Pyrethrin I:	(Z)-(S)-2-Methyl-4-oxo-3-(penta-2,4-dienyl)cyclopent-2-enyl(1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropanlcarboxylat
Cinerin II:	(Z)-(S)-3-(But-2-enyl)-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl(E)-(1R,3R)-3-(2-methoxycarbonylprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanlcarboxylat
Jasmolin II:	(Z)-(S)-2-Methyl-4-oxo-3-(penta-2-enyl)cyclopent-2-enyl(E)-(1R,3R)-3-(2-methoxycarbonylprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanlcarboxylat
Pyrethrin II:	(Z)-(S)-2-Methyl-4-oxo-3-(penta-2,4-dienyl)cyclopent-2-enyl(E)-(1R,3R)-3-(2-methoxycarbonylprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanlcarboxylat

### Pyrethroide:

Allethrin:	(RS)-3-Allyl-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)-cyclopropanlcarboxylat
Phenothrin:	3-Phenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)-cyclopropanlcarboxylat
Permethrin:	3-Phenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropanlcarboxylat

- Cypermethrin: (RS)- $\alpha$ -Cyano-3-phenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropanocarboxylat
- Deltamethrin: (S)- $\alpha$ -Cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-(2,2-dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropanocarboxylat
- Fenvalerat: (RS)- $\alpha$ -Cyano-3-phenoxybenzyl(RS)-2-(4-chlorphenyl)-3-methylbutansäureester

Synergist:

- Piperonylbutoxid: 5-[2-(2-Butoxyethoxy)ethoxymethyl]-1,3-methylenedioxy-6-propylbenzol

### 9.3 Reinheitsuntersuchung der mobilen Phase in der HPLC

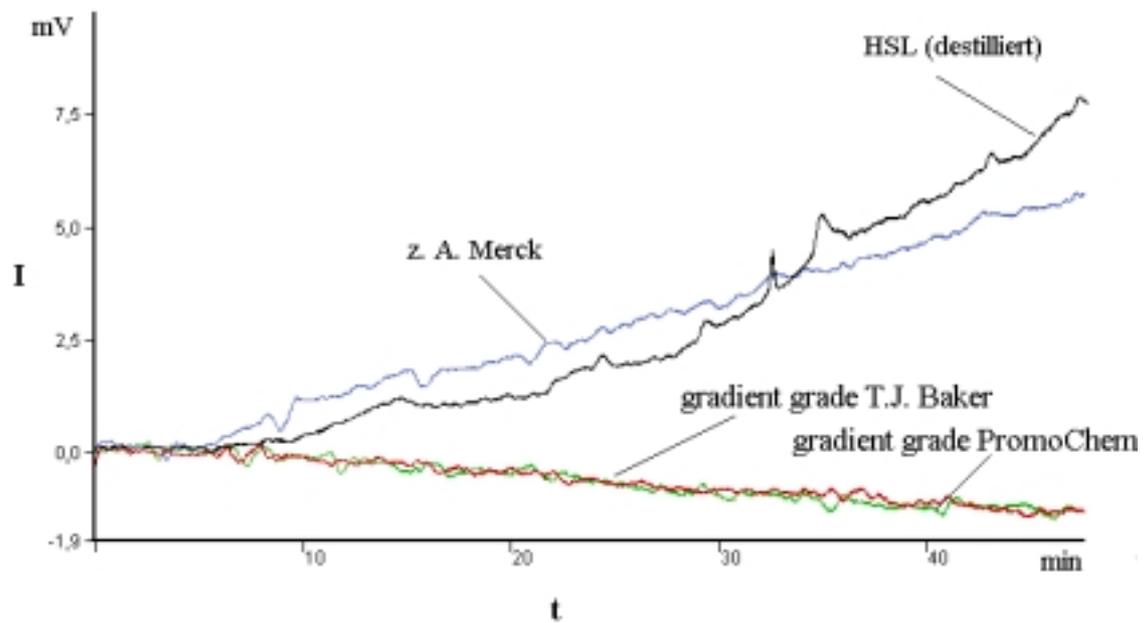


Abbildung 87: Basislinienchromatogramme der mobilen Phasen in der HPLC unter Anwendung eines Eluentengradienten

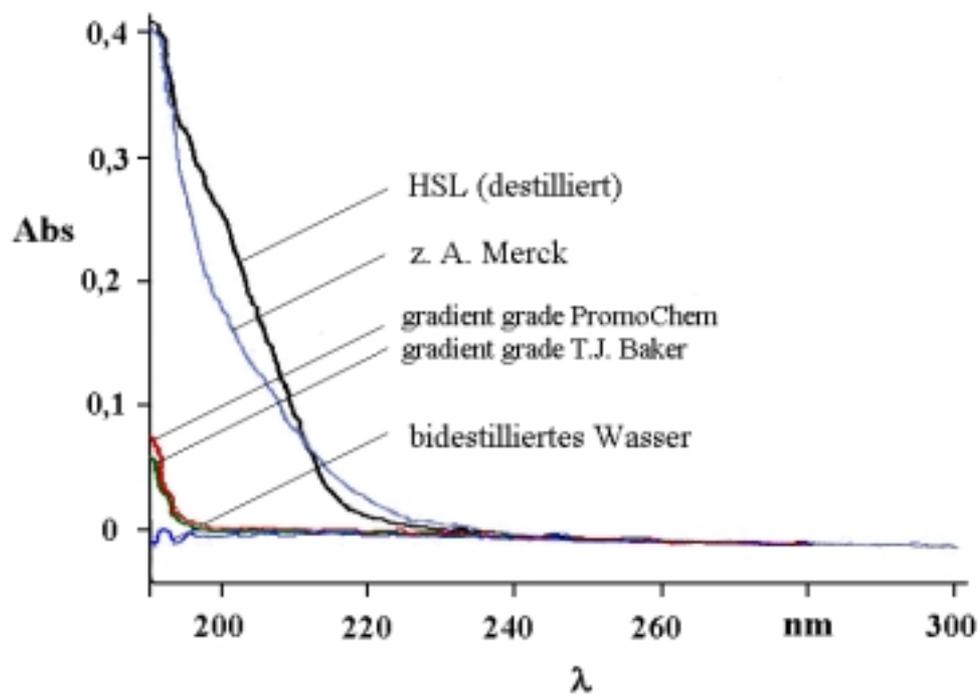


Abbildung 88: UV-Spektren von unterschiedlichen Acetonitrilproben

## 9.4 Extinktionskoeffizienten der Pyrethroide

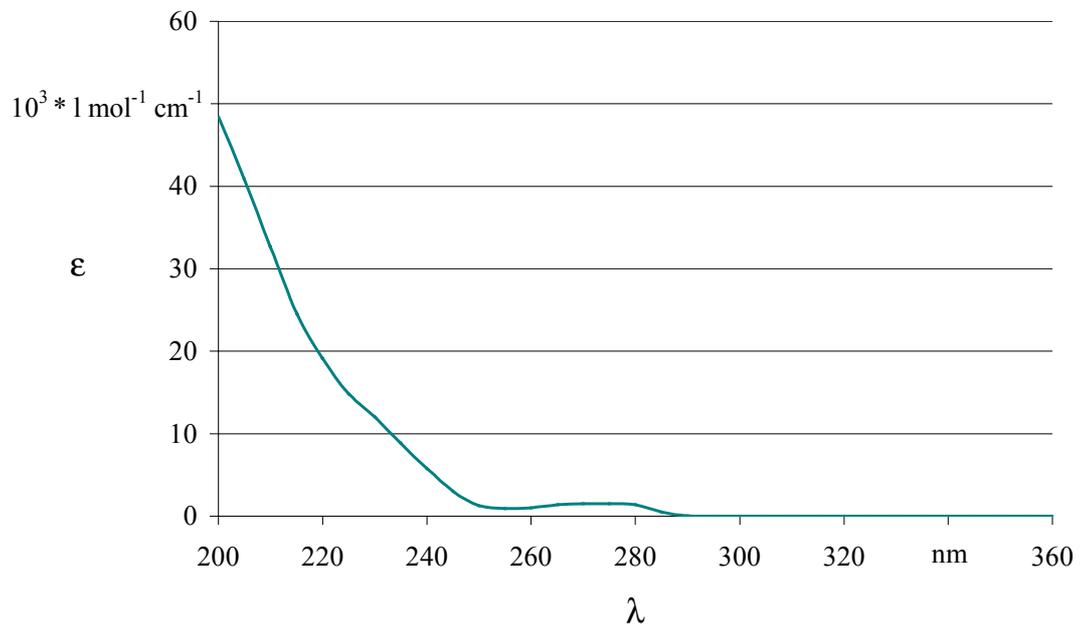


Abbildung 89: molarer Extinktionskoeffizient von Phenothrin vs. Wellenlänge

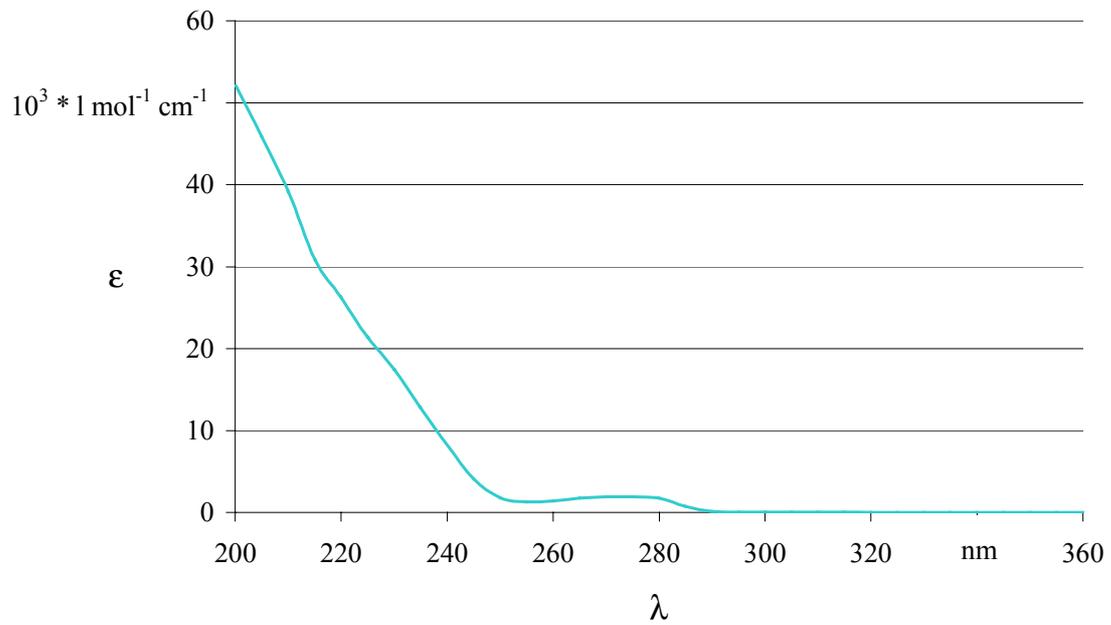


Abbildung 90: molarer Extinktionskoeffizient von Permethrin vs. Wellenlänge

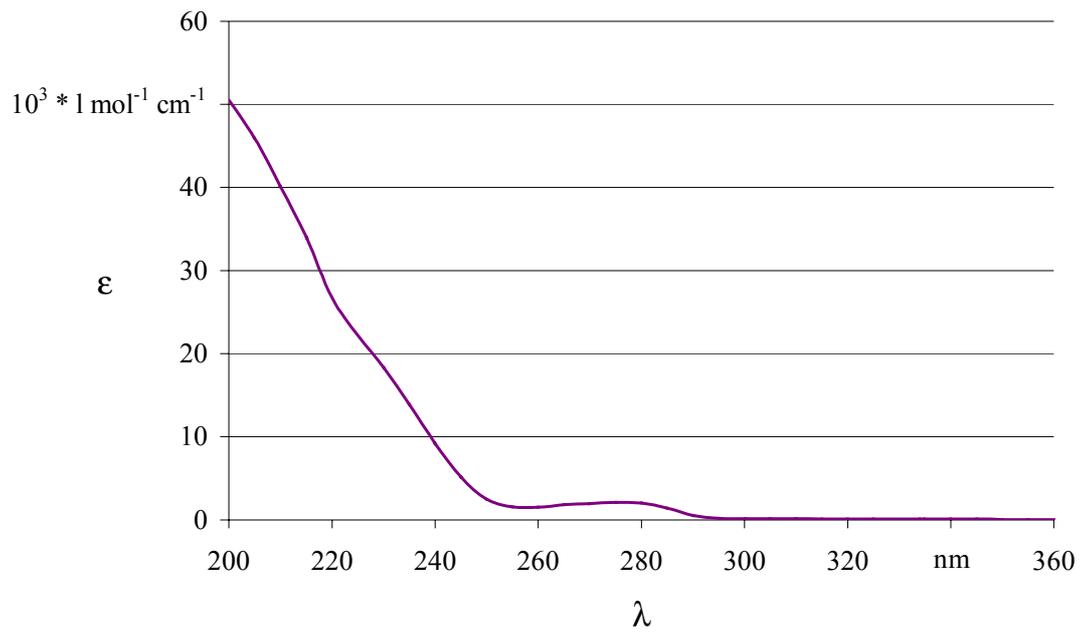


Abbildung 91: molarer Extinktionskoeffizient von Cypermethrin vs. Wellenlänge

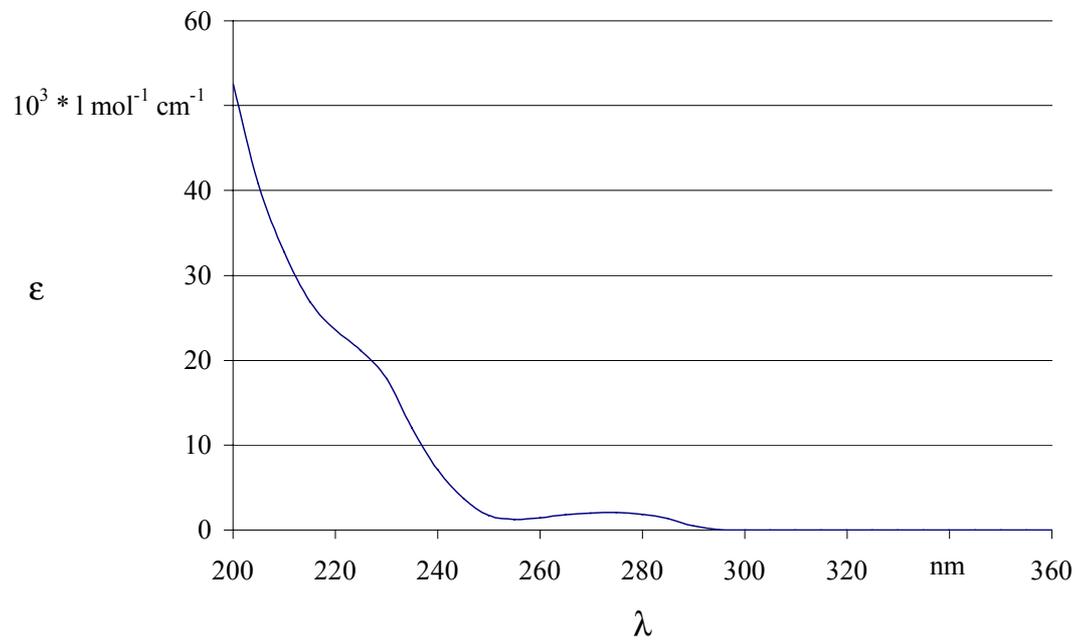


Abbildung 92: molarer Extinktionskoeffizient von Fenvalerat vs. Wellenlänge

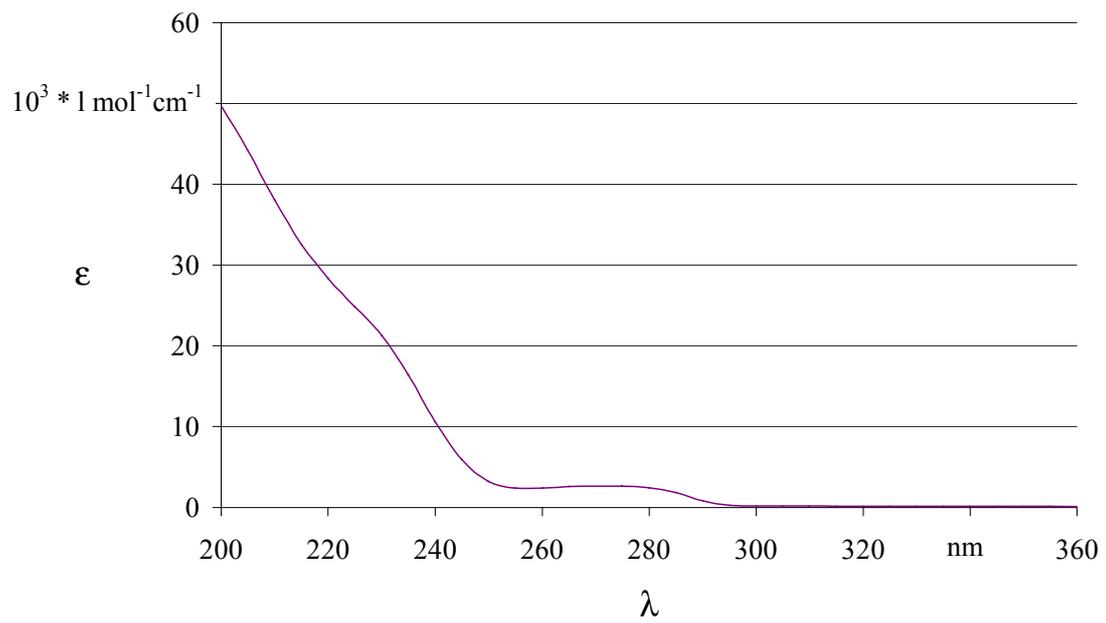


Abbildung 93: molarer Extinktionskoeffizient von Deltamethrin vs. Wellenlänge

Die vorliegende Arbeit wurde im Fach Analytische Chemie des Fachbereiches 8 Chemie/Biologie der Universität Siegen in der Zeit von Mai 1995 bis März 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. W. Wenclawiak durchgeführt.

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. B. W. Wenclawiak möchte ich mich für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas bedanken, im besonderen aber für die ausgezeichnete Betreuung und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. M. Krappe und Herrn Dipl.-Chem. D. Hinz danke ich für die GC-MS-Messungen und die Zusammenarbeit bei den Arbeiten zur Kopplung von SFC mit dem Massenspektrometer.

Allen im Arbeitskreis möchte ich für das freundliche Arbeitsklima und die vielen fruchtbaren Diskussionen danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Susanne, Stephan, Torsten, André, Martin, Andreas, Dirk und Henning für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit gebührt Dirk, Susanne und Andrea.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Eltern und Schwiegereltern, ohne sie wäre das Chemie-Studium nicht möglich gewesen.

Meiner Frau Angela möchte ich besonders für ihre Geduld und hilfreiche Unterstützung während der Zeit, in der diese Arbeit wuchs, herzlich danken.

Bei meiner Tochter Anna entschuldige ich mich für die versäumte Zeit, in der ich nicht für sie zur Verfügung stand.