Arbeit aus dem Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan

Bestimmung von thermolabilen und nichtflüchtigen Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln

Anwendung der Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung und ihrer Online-Kopplung mit der Hochleistungsflüssigchromatographie

> vorgelegt von Lebensmittelchemikerin Ursula Wippo

Von der Fakultät III –Prozesswissenschaftender Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften -Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. sc. nat. H. Kunzek

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan Prof. Dr. rer. nat. W. D. Rotard

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 25. September 2003

Berlin 2003

D 83

Abstract

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, mit denen Rückstände thermolabiler und nichtflüchtiger Pflanzenschutzmittel in pflanzlichen Lebensmitteln identifiziert und quantifiziert werden können.

Für die Aufarbeitung der Lebensmittelproben wurde die DFG-Methode S19 und die Methode S19-Online eingesetzt. Diese Methoden wurden für die ausgewählten Pestizide, die Benzoylharnstoffe, Iprodion und basische Fungizide, optimiert. Zur Aufreinigung der pflanzlichen Lebensmittelextrakte wurden die Festphasenextraktion an Kieselgel und an Umkehrphasen eingesetzt.

Zur weiteren Aufreinigung der Probenextrakte diente die analytische und die präparative GPC. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (HPTLC / AMD) teilweise mit der Online-Kopplung zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Mit diesen Verfahren ist eine Trennung von Matrixkomponenten und Analyten ohne Hitzeeinwirkung möglich. Zunächst wurde die Eignung dieser chromatographischen Analysentechniken erfolgreich geprüft. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurden Analysenmethoden für ausgewählte Pestizide, die Benzoylharnstoffe, Iprodion und basische Fungizide, entwickelt.

Zusätzlich wurden als Alternativmethoden die GC nach Pentafluorbenzylierung und LC / MS für die Analytik der ausgewählten Pestizide entwickelt. Für die Benzoylharnstoffe erwies sich die LC / MS und für Carbendazim und Thiabendazol erwies sich die GC / MS nach Pentafluorbenzylierung als geeignet. Aufgrund von Matrixeffekten wird eine Quantifizierung mittels Standardadditionskalibrierung empfohlen.

Aus der Summe der Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD die Bestimmung von Pestizid-Rückständen oberhalb einer Konzentration von 0,1 mg/kg ohne aufwendige Aufreinigung erlaubt. Durch die Verbesserung der Empfindlichkeit bzw. der Spezifität der Rückstandsbestimmung, wie sie durch Bioautographie mit Schimmelpilzen oder eine chemischen Derivatisierung erzielt werden kann, konnte eine aufwendige Aufreinigung auch unterhalb dieser Konzentration unterbleiben. Bei optimaler Aufreinigung konnten die untersuchten Pestizide bei einer Konzentration von 0,01 mg/kg bestimmt werden.

Anhand der Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen mittels der HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der HPLC konnte der große Anwendungsbereich dieser chromatographischen Verfahren gezeigt werden.

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von Oktober 1994 bis September 1999 am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stan, der mir die Untersuchung eines interessanten, anspruchsvollen Themas in seinem Arbeitskreis ermöglichte. Er unterstützte die Arbeit stets mit wertvollen Anregungen, durch sein Interesse an meiner Dissertation und seine Diskussionsbereitschaft, sowie seine großzügige Unterstützung bei der Sachmittelbereitstellung.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises möchte ich mich für ihre praktische Hilfe und fachliche Kooperation bedanken.

Die Zusammenarbeit mit meinen zahlreichen Praktikanten und Diplomanden hat mir besondere Freude bereitet, für den wissenschaftlichen Beitrag von Azam Ghadamgahi, Wali Qari, Kristina Thron, Sylvia Kliebes und Elena Gostomekskij zu dieser Arbeit bedanke ich mich.

Dr. Fred Schwarzer, mit dem ich viele Stunden bei der Entwicklung und Optimierung der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD verbrachte und Dr. Andreas Zapf, mit dem ich mein Büro teilte, danke ich besonders für die Hilfe bei technischen Problemen. Die Zusammenarbeit mit ihnen bereitete mir immer besondere Freude.

Dr. Friederike Dethlefs war mir besonders in der letzten Phase der Arbeit eine Stütze und Korrektiv, danke.

Meinen beiden Männern, meinem Sohn und meinem Ehemann, danke ich ganz besonders. Sie haben mir das Studium der Lebensmittelchemie ermöglicht, weil sie mir auch in schwierigen Zeitabschnitten der Arbeit zur Seite standen und immer an mich geglaubt haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Alle Freunde, die zuhörten und nachfragten und mich dadurch unterstützten, habe ich nicht vergessen und bedanke mich auch bei ihnen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

A. Veröffentlichungen

Stan H.-J., Wippo U.

Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln mittels Dünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung GIT Labor-Fachzeitschrift 9 (1996) 854 - 858

Wippo U., Stan H.-J.

Bestimmung von Iprodionrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels Online-Kopplung von RP-HPLC mit AMD-TLC Deutsche Lebensmittelrundschau 5 (1997) 144 - 148

B. Veröffentlichungen in Verbindung mit Posterpräsentationen

Wippo U., Stan H.-J.

Bestimmung von Benzoylharnstoffen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels AMD-TLC und anschließender Farbdetektion mit Chlor/o-Toluidin Lebensmittelchemie 52 2 (1998) 55

Thron K., Wippo U., Stan H.-J. Bioautographische Detektion von Fungiziden auf HPTLC-Platten Lebensmittelchemie 53 3 (1999) 63

Vigelahn L., Wippo U., Kalnowski G., Stan H.-J.
Bioautographische Detektion toxischer Komponenten in der
Dünnschichtchromatographie
im Tagungsband der Jahrestagung 1999 der Gesellschaft Deutscher Chemiker,
Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jena, 24.-26.10.1999

C. Vorträge

Wippo U., Stan H.-J.

Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln mittels AMD-HPTLC und Online-Kopplung von HPLC mit HPTLC (AMD) International Symposium on Instrumentalized Analytical Chemistry and Computer Technology (INCOM), Düsseldorf, 17.-21. März 1997

Wippo U., Stan H.-J.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in Lebensmitteln mittels Online-Kopplung von RP-HPLC und AMD-TLC

Vortrag auf der Regionalverbandstagung der Regionalverbände Nord und Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Lüneburg, 20.-21.04.1998

<u>Inhalt</u>

Abkürzu	AbkürzungsverzeichnisXI		
Abbildur	AbbildungsverzeichnisXV		
Tabellen	verzeichnis	XXI	
Gleichun	gsverzeichnis	XXV	
1	Problemstellung und Zielsetzung	1	
2	Grundlagen	5	
2.1	Auswahl der untersuchten Pestizide	5	
2.1.1	Iprodion	6	
2.1.2	Benzoylharnstoffe	7	
2.1.3	Basische Pestizide	12	
2.1.3.1	Benzimidazol-Verbindungen	12	
2.1.3.2	Triazol-Verbindungen	19	
2.1.3.3	Imidazol-Verbindungen	20	
2.1.3.4	Dicarboximid-Verbindungen	21	
2.1.3.5	Phenylamid-Verbindungen	21	
2.1.4	Methyl-Carbamate und Tribenuron-Methyl	22	
2.2	Auswahl der untersuchten pflanzlichen Lebensmittel	25	
2.3	Probenvorbereitung	28	
2.3.1	Flüssig / Flüssig-Extraktion (LLE)	29	
2.3.2	Prinzip der Festphasenextraktion (SPE)		
2.3.3	Gelpermeationschromatographie (GPC)		
2.3.3.1	Prinzip der Gelpermeationschromatographie	32	
2.3.3.2	Auswahl des Eluenten für nicht-wässrige GPC-Säulen		
2.3.3.3	Anwendung der GPC in der Pestizidanalytik	35	

2.4	Derivatisierung	
2.4.1	Prinzipien der Derivatisierung	
2.4.2	Derivatisierung in der Gaschromatographie	
	Benzoylharnstoffe	37
	Basische Pestizide	39
2.4.3	Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie	40
2.5	Angewandte chromatographische Bestimmungsverfahren	
2.5.1	Dünnschichtchromatographie (TLC)	
2.5.1.1	Prinzip der Dünnschichtchromatographie	
2.5.1.2	Trennleistung in der TLC-Analyse	
2.5.1.3	Prinzip der AMD-Technik	
2.5.1.4	Vergleich des AMD1-Systems mit dem AMD2-System	
2.5.1.5	Detektion in der Dünnschichtchromatographie	49
2.5.1.6	Prinzip der UV-VIS-Detektion	51
2.5.1.7	Prinzip der biologischen Detektion in der Dünnschichtchromatographie	
2.5.2	Gaschromatographie (GC)	56
2.5.2.1	Prinzip der GC	56
2.5.2.2	Elektroneneinfangdetektor (ECD)	57
2.5.2.3	Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD)	57
2.5.2.4	Massenselektiver Detektor (MSD)	
2.5.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	61
2.5.3.1	Prinzip der HPLC	61
2.5.3.2	Probenaufgabe in der HPLC	
2.5.3.3	Detektion in der HPLC	64
2.5.4	Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD	66
2.6	Analytik biologisch aktiver Naturstoffe	69
	Definition Whisky	70
	Prinzip der Whisky-Herstellung	70
	Qualität von Whiskys	70
2.7	Absicherung der analytischen Ergebnisse - Statistik - Fehlerabschätzur	ng72

3	Experimenteller Teil – Analysenmethoden	75
3.1	Probenaufarbeitung	75
3.1.1	Probennahme	75
3.1.2	Extraktion	75
	Benzoylharnstoffe und Iprodion	75
	Basische Fungizide und Carbamate	77
3.1.3	Aufreinigung (Clean-up)	79
3.1.3.1	Präparative Gelpermeationschromatographie	79
3.1.3.2	Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule (MKGF)	80
	Herstellung der Minikieselgel-Säule	80
	Aufreinigung / Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule ohne	
	Derivatisierung	80
	Aufreinigung / Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule nach	
	Pentafluorbenzylierung	80
3.1.3.3	Festphasenextraktion an RP-Phasen	81
	Benzoylharnstoffe	81
	Basische Fungizide	81
3.2	Derivatisierung	82
3.2.1	Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie	82
3.2.1.1	Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / Kaliumiodid / Stärke-	
	Reagenz	82
	Durchführung	82
	Herstellung der Tauchlösung a und der Chlorgasatmosphäre	82
3.2.1.2	Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid-	
	Reagenz	83
	Durchführung	83
	Herstellung der Tauchlösung b	83
3.2.1.3	Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Toluidin-Reagenz	83
	Durchführung	83
	Herstellung der Tauchlösung c	83
3.2.2	Derivatisierung in der Gaschromatographie	84

3.2.2.1	Pyrolytische Methylierung der Benzoylharnstoffe mit	
	Trimethylsulfoniumhydroxid	
	Durchführung	
	Herstellung der TMSH-Reagenzlösung	
3.2.2.2	Pentafluorbenzylierung der basischen Fungizide und der Carbamate	
	Durchführung	85
	Herstellung der PFB-Br-Lösung und der Kaliumcarbonat-Lösung	85
3.3	Endpunktbestimmung	
3.3.1	HPTLC / AMD und ihre Kopplung mit der HPLC	
3.3.2	Remissionsspektrometrische Detektion in der TLC	
3.3.3	Biologische Detektion mit Pilzen in der TLC	
3.3.3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	
	Steriles und keimfreies Arbeiten	
	Überimpfen der Pilze aus der Stammkultur in Petrischalen	88
	Herstellung der Konidiensuspension	
	Auszählen der Konidien	
3.3.3.2	Inokulierte Medien für die HPTLC-Platten	
	Herstellung der Medien	89
	Gießen des Agars in Petrischalen	
	Herstellung inokulierter Medien	
	Aufbringen der inokulierten Medien auf die HPTLC-Platten	
	Bebrüten	
	Anfärben des Myzels	
3.3.4	Biologische Detektion mit Leuchtbakterien	
	Vorbehandlung der HPTLC-Platten	
	Auftragung und chromatographische Entwicklung	
	Anzucht und Verarbeitung der Testorganismen	
	Auftragung der Leuchtbakterien	
	Messung der Lumineszenz	
	Auswertung	
3.3.5	GC / MS bzw. ECD / NPD	95
3.3.6	HPLC / MS	95

3.3.7	Parameter für die AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC und der	
	GPC-HPLC	.96
3.3.7.1	AMD-TLC	.96
3.3.7.2	RP-HPLC	.97
3.3.7.3	GPC-HPLC	.98
3.3.7.4	Bestimmung der Verzögerungszeit in der Online-Kopplung HPLC mit der	
	HPTLC / AMD	.98
3.3.7.5	AMD-Gradienten	.99
3.3.7.6	Fließmittel für die biologische Detektion mit Pilzen	111
3.3.7.7	Schnitt-Tabellen in der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD	111
	Iprodion (RP-HPLC)	111
	Benzoylharnstoffe (RP-HPLC)	111
	Benzoylharnstoffe (GPC-HPLC)	112
	Basische Fungizide (RP-HPLC)	112
3.3.8	Parameter für die GC / MS	112
	Parameter für die Gaschromatographie von Methylderivaten, gewonnen	
	durch pyrolytische Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid	112
	Parameter für die Gaschromatographie von Pentafluorbenzylderivaten	113
3.3.9	Parameter für die GC mit paralleler ECD- und NPD-Detektion	115
3.3.10	Parameter für die HPLC / MS	115
	FIA-MS-System zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen	115
	HPLC-MS-System zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen	116
3.4	Analytik biologisch aktiver Naturstoffe	118
3.5	Materialien und Chemikalien	120
3.5.1	Standardsubstanzen und Standardlösungen	120
	Standardmixe zur Bestimmung der Benzoylharnstoffe mittels AMD-TLC und	
	ihrer Kopplung mit der RP- und der GPC-HPLC	121
	Standardmixe zur Bestimmung der basischen Fungizide mittels AMD-TLC	
	und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC	121
	Standardmixe zur gemeinsamen Bestimmung von Diflubenzuron, Iprodion	
	und den basischen Fungiziden mittels AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der	
	RP- und der GPC-HPLC	121

	Standardmix zur Bestimmung von Carbendazim, Thiabendazol und der	
	Carbamate mittels GC nach Derivatisierung mit PFB-Br	122
3.5.2	Pilze und Chemikalien für die biologische Detektion	123
3.5.3	Allgemeine Materialien	124
3.5.4	Allgemeine Lösungsmittel / Chemikalien	125
4	Ergebnisse und Diskussion	127
4.1	Probenaufarbeitung	127
4.1.1	Probenextraktion	127
4.1.1.1	Benzoylharnstoffe und Iprodion	127
4.1.1.2	Basische Pestizide	129
	Flüssig / Flüssig-Verteilung	129
	RP-Festphasenextraktion - Optimierung der Festphasenextraktion	130
	RP-Festphasenextraktion - Anwendung der Festphasenextraktion	132
4.1.2	Aufreinigung	135
4.1.2.1	Gelpermeationschromatographie (GPC)	135
	Benzoylharnstoffe und Iprodion	135
	Basische Pestizide	138
4.1.2.2	Minikieselgel-Fraktionierung (MKGF) nach der DFG-Multimethode S19	138
4.1.2.3	Minikieselgel-Fraktionierung (MKGF) nach Pentafluorbenzylierung	140
4.1.2.4	Vergleich der Reinigungsleistung von der GPC und der MKGF	144
4.1.2.5	Reverse-Phase-Festphasenextraktion als Clean-up-Schritt (RP-SPE)	145
4.2	Derivatisierung	147
4.2.1	Derivatisierung in der Gaschromatographie	147
4.2.1.1	Basische Fungizide und Carbamate	147
	Optimierung der Derivatisierung	147
	Anwendung der Derivatisierungsmethode auf die Rückstandsanalytik in	
	pflanzlichen Lebensmitteln	149
	Vergleich der Analysenzeit der GC / MS nach Pentafluorbenzylierung mit de	er
	HPTLC / AMD	150
4.2.1.2	Benzoylharnstoffe	151
	Derivat 1	154

	Derivat 2	155
	Derivat 3	157
	Derivat 4	158
	Derivat 5	161
4.2.2	Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie	163
4.2.2.1	Entwicklung einer postchromatischen Derivatisierungsmethode für die	
	Benzoylharnstoffe	163
4.2.2.2	Anwendung der postchromatischen Derivatisierung mit	
	Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin Reagenz	165
4.3	Endpunktbestimmung	168
4.3.1	HPTLC / AMD	168
4.3.1.1	Screening von Pestiziden mittels HPTLC / AMD	168
4.3.1.2	Entwicklung eines AMD-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodie	on172
4.3.1.3	Entwicklung eines AMD-Gradienten für die basischen Fungizide	179
4.3.1.4	Konvertierung der Gradienten vom AMD1- zum AMD2-System	181
4.3.1.5	Praktische Umsetzung der Konvertierung	185
	Übertragbarkeit der AMD-Gradienten vom AMD1- zum AMD2-System	185
	Einfluss der Trocknung auf die chromatographische Entwicklung	188
	Einfluss der Konditionierung auf die chromatographische Entwicklung	191
4.3.1.6	Vergleich des AMD1- mit dem AMD2-System	194
	Handhabung	194
	Laufstreckengenauigkeit	194
	Lösungsmittelverbrauch	195
	Randeffekte bei der dünnschichtchromatographischer Entwicklung im AM	D2-
	System	196
4.3.2	Bioautographische Detektion von Fungiziden mit Pilzen auf HPTLC-Platte	n198
	Auswahl des bioautographischen Verfahrens	198
	Auswahl eines Schimmelpilzes	199
	Hemmhofformen	200
	Bestimmung der Nachweisgrenzen und des Arbeitsbereichs	201
	Dünnschichtchromatographische Trennung der Fungizide	203
	Verbesserung der Nachweisgrenzen durch Anfärben des Pilzmyzels	204
	Anwendung	205

 4.3.3 Biologische Detektion von Pestiziden mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten 4.3.4 Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD 4.3.4.1 Optimierung der Auftrageparameter der HPLC-Kopplung mit der HPTLC / AMD Bestimmung der optimalen Fließgeschwindigkeit Bestimmung der Verzögerungszeit Optimierung der Auftragefläche 4.3.4.2 Optimierung der RP-HPLC Grund eines RP-HPLC-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 	
 4.3.4 Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD	200
 4.3.4 Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD	. 209
 4.3.4.1 Optimierung der Auftrageparameter der HPLC-Kopplung mit der HPTLC / AMD Bestimmung der optimalen Fließgeschwindigkeit Bestimmung der Verzögerungszeit Optimierung der Auftragefläche	.214
 HPTLC / AMD	
 Bestimmung der optimalen Fließgeschwindigkeit Bestimmung der Verzögerungszeit Optimierung der Auftragefläche 4.3.4.2 Optimierung der RP-HPLC Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC	.214
 Bestimmung der Verzögerungszeit	. 214
 <i>Optimierung der Auftragefläche.</i> 4.3.4.2 Optimierung der RP-HPLC <i>Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion</i> <i>Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide</i> 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 	. 217
 4.3.4.2 Optimierung der RP-HPLC	. 217
 Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 4.3.5 1 GC / ECD / NPD 	. 221
 <i>Iprodion</i> <i>Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide</i> 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 4.3.5 1 GC / ECD / NPD 	
 <i>Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide</i> 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 4.3.5 1 GC / ECD / NPD 	. 223
 4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC 4.3.5 Direkte Gaschromatographie 4.3.5 1 GC / ECD / NPD 	. 225
4.3.5 Direkte Gaschromatographie	. 227
A = 351 GC / ECD / NPD	. 234
+.5.5.1 GC / ECD / NLD	. 234
4.3.5.2 GC / MS	. 239
4.3.6 LC / MS	. 245
Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck im negativen Modus (APCI-)	. 245
Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck im positiven Modus (APCI+)	. 246
Elektrospray-Ionisierung im negativen Modus (ESI-)	. 246
Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus (ESI+)	. 246
Entwicklung der LC / MS-Methode	. 247
Vergleich der Analysenzeit der LC / MS mit der HPTLC / AMD	. 252
Zusammenfassung	. 252
4.4 Anwendung der HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC	.254
4.4.1 Trennung eines Pestizidgemisches mittels Online-Kopplung der RP-HPLC	
mit der HPTLC / AMD	. 254
4.4.2 Bestimmung von Iprodion-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels	•
HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC	. 259
Screening mit Gaschromatographie	. 259
Bestimmung mittels HPTLC / AMD	. 260

	Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC-AMD	261
	Quantitative Bestimmung und Nachweisgrenze	264
	Identifizierung mittels Remmissionsspektren	265
	Zusammenfassung	266
4.4.3	Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen	
	Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC	266
	Screening mit Gaschromatographie	266
	Bestimmung mittels HPTLC / AMD	267
	Quantitative Bestimmung und Nachweisgrenze	269
	Kontrolle der zulässigen Höchstmenge in Birnen	269
	Identifizierung mittels Remmissionsspektren	272
	Verbesserung der Nachweisgrenzen durch eine verbesserte Aufreinigung	274
	Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC / AMD	276
	Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffen mittels Online-Kopplung der	
	GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD	278
	Zusammenfassung	280
	Vergleich der HPTLC / AMD-Analytik für Benzoylharnstoffe und Iprodion	282
4.4.4	Bestimmung von ausgewählten Fungizidrückständen in pflanzlichen	
	Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC	283
	Screening mit Gaschromatographie	283
	Bestimmung mittels Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC-AMD	283
	Bestimmung mittels HPTLC / AMD	286
	Zusammenfassung	289
4.4.5	Analytik biologisch aktiver Naturstoffe	291
	Nachweis von Whiskyinhaltsstoffen mittels HPTLC / AMD	291
	Charakterisierung von Whiskyinhaltsstoffen mittels Online-Kopplung der K	?P-
	HPLC mit der HPTLC / AMD	295
	Vergleich der chromatographischen Systeme	298
	Vergleich der physikalischen, chemischen und biologischen Detektion	298
	Zusammenfassung	299

5	Zusammenfassung	301
6	Literatur	307

X

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz
ng	Nanogramm
μg	Mikrogramm
AFID	Alkali-Flammenionisationsdetektor
AMD	Automatische Mehrfachentwicklung (automated multiple development)
APCI-	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck, negativer Modus
APCI+	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck, positiver Modus
API	Atmosphärendruckionisation
AREA	integrierte Fläche eines Peaks
CCD-Element	elektronischer Bilddetektor (charge coupled device)
CCD-Kamera	elektronische Bildkamera / Videokamera (charge coupled device)
CID	Fragmentbildung (collision induced decay)
ECD	Elektroneneinfangdetektor (electron capture detector)
EI	Elektronenstoß-Ionisierung (electron impact)
ESI-	Elektrospray-Ionisierung, negativer Modus
ESI+	Elektrospray-Ionisierung, positiver Modus
FIA	Fließinjektionsanalyse
FIA-MS	Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion
GC	Kapillargaschromatographie
GC / ECD	Kopplung der Gaschromatographie mit dem Elektroneneinfangdetektor
GC / MS	Kopplung der Gaschromatographie mit dem Massenspektrometer
GC / MSD	Kopplung der Gaschromatographie mit dem massenselektiven Detektor
GC / NPD	Kopplung der Gaschromatographie mit dem Stickstoff-Phosphor-spezifi- schen Detektor
GPC	Gelpermeationschromatographie
HCl	Salzsäure
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
IEA	Immunoaffinitäts-Extraktion (immunoaffinity extraction)
ISTD	interner Standard
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KNO ₃	Kaliumnitrat
L _f	Laufstrecke

L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
LLE	Flüssig / Flüssig-Extraktion
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
MCA	Multi Channel Acquisition
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MKGF	Minikieselgel-Fraktionierung
MLLE	Mikro-Flüssig / Flüssig-Extraktion
MS (ESI)	Elektronenspray-Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
MSPD	matrix solid phase dispersion
MW	Mittelwert
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na_2SO_4	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenposphat
NP	Normalphase (normal phase)
NPD	Stickstoff-Phosphor-spezifischer Detektor
PFB-Br	Pentafluorbenzylbromid
ppm	parts per million (mg/l oder mg/kg)
PRS	Festphasenextraktion mit einem Kationen-Austauscher (Propylsulfonsäure)
rel. V _r	relatives Retentionsvolumen
rel. STABW	relative Standardabweichung
REMPI	Resonance Enhanced Multiphoton Ionisation
R _f -Wert	relative Laufstrecke bezogen auf die Front des Fließmittels (relate to front)
RHmV	Rückstandshöchstmengen-Verordnung
RP	Umkehrphase (reversed phase)
Vr	Retentionsvolumen
rel. V _r	relatives Retentionsvolumen
S19	DFG Sammelmethode S19
SCAN	zyklische Vermessung eines festgelegten Massenbereiches (full scan modus)
SCX	Festphasenextraktion mit einem Kationen-Austauscher (Benzylsulfonsäure)

Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid
Massendetektion ausgewählter Ionen in der GC / MS (selected ion monitoring)
Festphasen-Extraktion
Festphasen-Mikroextraktion
Standardabweichung
Total-Ionen-Chromatogramm
Thermoionischer Detektor
Dünnschichtchromatographie
Bioautographische Detektion nach dünnschichtchromatographischer Trennung
Trimethylsulfoniumhydroxid
Variationskoeffizient

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Strukturformel und Molmasse des Iprodions	6
Abbildung 2-2:	Strukturformeln und Molmassen der Benzoylharnstoffe	8
Abbildung 2-3:	Thermodegradation und Hydrolyse der Harnstoffe nach Fishbein	8
Abbildung 2-4:	Strukturformeln und Molmassen der Benzimidazole	.13
Abbildung 2-5:	Strukturformeln und Molmassen der Triazole	20
Abbildung 2-6:	Strukturformeln und Molmassen der Imidazol-Verbindungen	21
Abbildung 2-7:	Strukturformel und Molmasse des Procymidons	21
Abbildung 2-8:	Strukturformel und Molmasse des Oxadixyls	.22
Abbildung 2-9:	Strukturformeln und Molmassen der Carbamate	.23
Abbildung 2-10:	Reaktion von Trimethylsulfoniumhydroxid mit Aminen	.38
Abbildung 2-11:	Derivatisierungsschema der Carbendazim mit PFB-Br	.39
Abbildung 2-12:	Prinzip der postchromatographischen Derivatisierung der	
	Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid-Reagenz	.40
Abbildung 2-13:	Prinzip der AMD-Entwicklung	.45
Abbildung 2-14:	Schematischer Ablauf der Entwicklung einer HPTLC-Platte mittels	
	AMD	.46
Abbildung 2-15:	Schema des AMD2-Systems	.48
Abbildung 2-16:	Schema des AMD1-Systems	.48
Abbildung 2-17:	Prinzip der Identifizierung biologisch wirksamer Fraktionen nach	
	dünnschichtchromatographischer Trennung nach UV- und	
	biologischer Detektion	.54
Abbildung 2-18:	Bestimmung von Carbamaten und Organophosphorinsektizide	
	mittels Cholinesterasehemmung	.55
Abbildung 2-19:	Schema der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD	.67
Abbildung 4-1:	HPTLC / AMD-Chromatogramme, Orangen nach SPE und MKGF 1	.33
Abbildung 4-2:	Abhängigkeit der relativen Retentionsvolumina (rel. V _r) der	
	Pestizide und der verschiedenen Kalibrierstandards von ihren	
	Molekülgrößen1	.37
Abbildung 4-3:	GC / MS-Chromatogramme (TIC-Modus) der mit 1 ppm Pestizid-	
	Mix GC dotierten Apfelprobe1	.42
Abbildung 4-4:	EI-MS-Spektren der Ethiofencarb-Derivate 1 und 21	.43
Abbildung 4-5:	GC / ECD-Chromatogramme der Zitronenprobe1	.43

Abbildung 4-6:	GC / MS-Chromatogramm (SIM-Modus) eines derivatisierten
	Pestizid-Mix GC148
Abbildung 4-7:	GC / MS-Chromatogramm (SCAN-Modus) von Flufenoxuron nach
	Online-Derivatisierung mit TMSH153
Abbildung 4-8:	Reaktionsschema der pyrolytischen Methylierung von Flufenoxuron
	mit TMSH 154
Abbildung 4-9:	EI-MS-Spektrum von Derivat 1 155
Abbildung 4-10:	EI-MS-Spektrum von Derivat 2 156
Abbildung 4-11:	EI-MS-Spektrum von Derivat 3 157
Abbildung 4-12:	EI-MS-Spektrum von Derivat 4159
Abbildung 4-13:	Vermutetes Reaktionsschema des Derivat 4 161
Abbildung 4-14:	EI-MS-Spektrum von Derivat 5
Abbildung 4-15:	Aus den Benzoylharnstoffen gebildete Farbstoffe nach
	Derivatisierung mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin Reagenz 165
Abbildung 4-16:	Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Brokoli mittels
	HPTLC / AMD, vor und nach Derivatisierung mit Chlor / o-Tolidin 166
Abbildung 4-17:	Zusammensetzung der AMD2-Gradienten 6 und 7 (optimiert für die
	Trennung von Benzoylharnstoffen)
Abbildung 4-18:	Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Blumenkohl
	mittels RP-HPLC-HPTLC / AMD-Kopplung178
Abbildung 4-19:	Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nach
	Entwicklung mit Gradient 1 im AMD1- und AMD2-System
Abbildung 4-20:	Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nach
	Entwicklung mit Gradient 2 im AMD1- und AMD2-System 187
Abbildung 4-21:	Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nach
	Entwicklung mit Gradient 3 im AMD1- und AMD2-System
	(Trockenzeit 1 min)
Abbildung 4-22:	Einfluss der Trockenzeiten auf die Laufstrecken in der AMD2
	(Gradient 2b)
Abbildung 4-23:	Vergleich der AMD1- und AMD2-Gradienten 2b bei einer
	Trockenzeit von drei und fünf Minuten191
Abbildung 4-24:	Unterschiedliche Konditionierung für den Gradienten 3b 192
Abbildung 4-25:	Vergleich AMD1 und AMD2 Laufstreckengenauigkeit, n=3 195

Abbildung 4-26:	Laufstreckengenauigkeit des AMD2-Gradienten 2b (a) und des	
	AMD2-Gradienten 1 (b)	.197
Abbildung 4-27:	Vergleich von Penicillium roqueforti, Cladosporium herbarum und	
	Aspergillus oryzae (von links nach rechts) auf HPTLC-Platten	.200
Abbildung 4-28	Hemmhofformen der Benzimidazol-, Imidazol- und der Triazol-	
	Fungizide von rechts nach links	.201
Abbildung 4-29:	Bioautographische Detektion von Fungizidrückständen in	
	Lebensmittelextrakten mit Penicillium roqueforti	.205
Abbildung 4-30:	Dünnschichtchromatographische Trennung verschiedener Fungizide	
	mittels HPTLC / AMD mit anschließender lumigraphischer	
	Detektion	.211
Abbildung 4-31:	Entwicklung der Hemmkinetik unterschiedlicher Fungizide bei einer	
	Auftragsmenge von 60 ng	.212
Abbildung 4-32:	Vergleich der Lumineszenzhemmungen durch unterschiedliche	
	Fungizide im Leuchtbakterientest und der Lumigraphie nach	
	dreißigminütiger Inkubationszeit	.213
Abbildung 4-33:	Optimierung der Flussrate des Elutionsmittels bei einem	
	Wasser / Methanol-Gradient	.216
Abbildung 4-34:	Verschiedene Auftrageformen bei der Online-Kopplung der RP-	
	HPLC mit der HPTLC / AMD	.219
Abbildung 4-35:	Optimierung der Auftragefläche bei der Online-Kopplung der RP-	
	HPLC mit der HPTLC / AMD	.220
Abbildung 4-36:	RP-HPLC-Chromatogramm einer	
	Benzoylharnstoffstandardmischung	.225
Abbildung 4-37:	RP-HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung der basischen	
	Fungizide mit darrübergelegtem HPLC-Gradient 2	.226
Abbildung 4-38:	Optimierung der GPC-Parameter: Vergleich 100 und 50 Å-Säulen,	
	mobile Phase Tetrahydrofuran, 350 µl/min	.229
Abbildung 4-39:	Optimierung der GPC-Parameter: verschiedene Flussraten in µl/min,	
	mobile Phase Ethylacetat / Cyclohexan, 50 Å-Säule	.230
Abbildung 4-40:	Optimierung der GPC-Parameter: bei verschiedenen Temperaturen	
	und 50 µl/min Ethylacetat/Cyclohexan, Polystyrole	.231
Abbildung 4-41:	Optimierung der GPC-HPTLC / AMD-Kopplung	.232

GPC-HPLC-Chromatogramm einer	
Benzoylharnstoffstandardmischung und Iprodion	. 233
GC / ECD / NPD-Chromatogramme eines Flufenoxuron- und eines	
Diflubenzuron-Standards, 100 ng abs	. 237
GC / ECD-Chromatogramm eines Iprodion-Standards 10 ng abs	. 238
EI-MS-Spektrum von Bruchstück 1	. 241
EI-MS-Spektrum von Bruchstück 2	. 242
EI-MS-Spektrum von Bruchstück 4	. 242
EI-MS-Spektrum von Bruchstück 3	. 244
Ausschnitt von 220 bis 340 u des EI-MS-Spektrums von	
Bruchstück 3	. 244
Vergleich der HPLC / Dioden-Array-Chromatogramme mit den	
Totalionen-Chromatogrammen der Ionenspuren im negativen ESI-	
Modus	. 250
SIM der Benzoylharnstoffe in einem mit 0,01 mg/kg dotierten	
Pflaumenextrakt, je 0,5 ng absolut (TIC in Abbildung 4-50)	. 251
Auftrageschema der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der	
HPTLC / AMD, HPLC-Chromatogramm bei 230 nm	. 255
Untersuchung eines Pestizid-Mixes (74 Pestizide) mittels Online-	
Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD	. 256
Untersuchung eines Pestizid-Mixes (74 Pestizide) mittels Online-	
Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD	. 256
HPTLC / AMD-Chromatogramme von mit der S19-Methode	
aufgearbeiteten Lebensmittelproben, Fraktionen 3-4,	
Remissionsmessung bei 200 nm	. 261
RP-HPLC-Chromatogramme	. 262
HPTLC / AMD-Chromatogramme, Remissionsmessung bei 200 nm.	. 262
Vergleich der Remissionsspektren der Kopfsalatprobe (ohne / mit	
Kopplung) mit einem Iprodion-Spektrum	. 263
Vergleich der HPTLC-Kalibrierung für Iprodion im Bereich von 30	
bis 400 ng, Remissionsmessung bei 200 nm	. 265
Abhängigkeit der Remissionsspektren von der applizierten Menge	
von Iprodion	. 266
	 GPC-HPLC-Chromatogramm einer Benzoylharnstoffstandardmischung und Iprodion

Abbildung 4-61:	HPTLC / AMD-Trennung von sechs Lebensmittelproben und	
	Benzoylharnstoff-Standardgemischen	268
Abbildung 4-62:	Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Birnen mittels	
	HPTLC / AMD (0,5 mg/kg)	270
Abbildung 4-63:	Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Birnen mittels	
	HPTLC / AMD (0,1 mg/kg)	272
Abbildung 4-64:	Vergleich von dotierten und undotierten Pfifferlingsproben	273
Abbildung 4-65:	Vergleich der Remissionsspektren von dotierten Pfifferlingsproben	
	mit einem Diflubenzuron-Standard; HPTLC / AMD	274
Abbildung 4-66:	Bestimmung von Benzoylharnstoffen in Pfifferlingen mittels Online	-
	Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD	277
Abbildung 4-67:	Bestimmung von Benzoylharnstoffen in Blumenkohl mittels Online-	-
	Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD	279
Abbildung 4-68:	Vergleich von Remissionsspektren von Benzoylharnstoffstandards	
	und Benzoylharnstoffe in Blumenkohl nach Online-Kopplung der	
	GCP-HPLC mit der HPTLC /AMD	281
Abbildung 4-69:	HPTLC / AMD-Chromatogramme einer Apfelprobe	285
Abbildung 4-70:	Vergleich von Remissionsspektren von Fungizidstandards und	
	Fungiziden in Lebensmitteln	287
Abbildung 4-71:	Vergleich von Remissionsspektren von Fungizidstandards und	
	Fungiziden in Zitronen, HPTLC / AMD und Online-Kopplung der	
	RP-HPLC mit HPTLC / AMD	288
Abbildung 4-72:	HPTLC-Chromatogramm des Kevin's-Extraktes	293
Abbildung 4-73:	Zucker-TLC der untersuchten Whiskysorten	295
Abbildung 4-74:	HPLC-Chromatogramm des Kevin's-Extraktes (20 µl) mit	
	Fraktionen für die Online-Kopplung	297

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Übersicht über die Analytik von Benzoylharnstoffe	10
Tabelle 2-2:	Übersicht über die Analytik von Carbendazim	15
Tabelle 2-3:	Übersicht über die Analytik von Thiabendazol	18
Tabelle 2-4:	Übersicht über die Analytik von Carbamaten	23
Tabelle 2-5:	Höchstmengen für die Benzoylharnstoffe	25
Tabelle 2-6:	Höchstmengen für Carbendazim und Thiabendazol	26
Tabelle 2-7:	Hauptinhaltsstoffe von Äpfeln (in %)	28
Tabelle 2-8:	Sorbentien in der Festphasenextraktion	31
Tabelle 2-9:	Vorteile und Nachteile der Festphasenextraktion gegenüber der	
	Flüssig / Flüssig-Extraktion	31
Tabelle 2-10:	Ausgewählte Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel	33
Tabelle 2-11:	Vor- und Nachteile einer prä- bzw. postchromatographischen	
	Derivatisierung in der TLC	36
Tabelle 2-12:	Nachweisgrenzen für Triazine	40
Tabelle 2-13:	Ausgewählte Detektionsmöglichkeiten in der TLC	50
Tabelle 2-14:	Gebräuchliche Geräteparameter für RP-C18-Säulen	63
Tabelle 3-1:	Elutionsbereiche der GPC-Fraktionen	79
Tabelle 3-2:	AMD1-Gradient 1 - Gradient für Oberflächenbehandlungsmittel1	00
Tabelle 3-3:	AMD1-Gradient 2a - DIN-Gradient1	00
Tabelle 3-4:	AMD1-Gradient 2b – modifizierter DIN-Gradient1	01
Tabelle 3-5:	AMD1-Gradient 3a - modifizierter Konfirmationsgradient nach	
	Burger et. al1	01
Tabelle 3-6:	AMD1-Gradient 3b - modifizierter Konfirmationsgradient nach	
	Burger et. al1	02
Tabelle 3-7:	AMD1-Gradient 4 - optimierter Gradient für mittelpolare Analyten 1	02
Tabelle 3-8:	AMD1-Gradient 5 – optimierter Gradient für polare Pestizide für die	
	Online-Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC 1	03
Tabelle 3-9:	AMD1-Gradient 6 – optimierter Gradient für Benzoylharnstoffe für	
	die Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC1	03
Tabelle 3-10:	AMD1-Gradient 7 – optimierter Gradient für Benzoylharnstoffe für	
	die Kopplung der GPC mit der AMD-TLC1	.04

AMD1-Gradient 8 - optimierter Gradient für die basischen Pestizide
nach bioautographischer Detektion mit Pilzen104
AMD2-Gradient 1 – Gradient nach AMD1-Gradient 1 optimiert für
polare, basische Pestizide105
AMD2-Gradient 2 – Gradient nach AMD1-Gradient 2b
(modifizierter DIN-Gradient)106
AMD2-Gradient 3 – Gradient nach AMD1-Gradient 3b
(modifizierter Burger Konfirmationsgradient)107
AMD2-Gradient 6 – Gradient für Benzoylharnstoffe, optimiert für
die Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC nach AMD1-
Gradient 6
AMD2-Gradient 7 – Gradient für Benzoylharnstoffe, optimiert für
die Kopplung der GPC mit der AMD-TLC nach AMD1-Gradient 7 109
AMD2-Gradient 7 – Gradient optimiert für Whiskyinhaltsstoffe 110
SIM-Parameter zur Bestimmung von Pentafluorbenzylderivaten 114
SIR-Programmierung zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen 117
Festphasenextraktion der basischen Fungizide im basischen
Aceton/Wasser-Gemisch
Wiederfindungen dotierter Orangenproben nach
Festphasenextraktion und anschließender MKGF 134
Fraktionen der Minikieselgel-Fraktionierung / Wiederfindungsraten
der Pestizide
Minikieselgel-Fraktionierung der Pentafluorbenzylderivate
Reinigungsleistung der GPC und der Minikieselgel-Fraktionierung
(MKGF) in Äpfeln 145
Benzimidazol als Derivatisierungsstandard148
Einfluss der Lagerungszeit auf den Response des Carbendazims 149
Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen von mit
5 ppm dotierte Apfel- und Zitronenproben nach
Pentafluorbenzylierung und anschließender MKGF, nach GC / MS
(SIM)
Analysenzeit der Bestimmung von Carbendazim in pflanzlichen
Lebensmitteln für zwölf Proben und 6 Standards 151

Tabelle 4-10:	Nachweisgrenzen der Benzoylharnstoffe ohne und nach
	HPTLC / AMD-Entwicklung mit AMD2-Gradient 6164
Tabelle 4-11:	Screening und Konfirmation von 81 Pestiziden mittels AMD1-
	Gradient 2a (DIN) und AMD1-Gradient 3a (BCG)169
Tabelle 4-12:	Screening und Konfirmation von 19 Pestiziden* mittels AMD1-
	Gradient 2a (DIN) und AMD1-Gradient 3a (BCG)170
Tabelle 4-13:	Laufstrecken der Benzoylharnstoffe in der HPTLC / AMD, nach
	Entwicklung mit den AMD1-Gradienten 6 und 7 und verschiedenen
	Kieselgel-HPTLC-Platten176
Tabelle 4-14:	Laufstrecken LS und Absorptionsmaxima λ der basischen Pestizide,
	entwickelt mit dem AMD2-Gradienten 1, HPTLC-Platten Kieselgel
	60 F 254
Tabelle 4-15:	AMD1-Gradient 1 (für Oberflächenbehandlungsmittel)
Tabelle 4-16:	Exceltabelle zur Berechnung des AMD2-Gradienten (Teil 1)183
Tabelle 4-17:	Exceltabelle zur Berechnung des AMD2-Gradienten (Teil 2)183
Tabelle 4-18:	Konvertierter Gradient für das AMD2-System184
Tabelle 4-19:	Lösungsmittelverbrauch Vergleich AMD 1 und AMD2195
Tabelle 4-20:	Nachweisgrenzen (NG) der untersuchten Fungizide für die Detektion
	mittels UV-Detektion, bei bioautographischer Detektion (BA) mit
	Penicillium roqueforti und bei Luminizenz mit Leuchtbakterien
	(LUMI)
Tabelle 4-21:	R _f -Werte der Fungizide in den Trennsystemen auf der Basis von
	Ethylacetat und Dichlormethan204
Tabelle 4-22:	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von
	Lebensmittelextrakten mittels bioautographischer Detektion nach
	dünnschichtchromatographischer Trennung (TLC-BA) und
	GC / ECD / NPD
Tabelle 4-23:	Mit der GPC untersuchte Standards
Tabelle 4-24:	Retentionszeiten tr der untersuchten Standardsubstanzen
Tabelle 4-25:	Vergleich eines Zersetzungsproduktes der Benzoylharnstoffe nach
	gaschromatographischer Trennung239
Tabelle 4-26:	Bruchstücke der Benzoylharnstoffe nach Thermodegradation im
	GC / MS-System bei Toluol und Methanol / Toluol als
	Lösungsmittel

Tabelle 4-27:	Wiederfindungsraten der Benzoylharnstoffe nach RP-HPLC / MS
	(ESI-) im SIM-Modus
Tabelle 4-28:	Analysenzeit der Bestimmung von Diflubenzuron in pflanzlichen
	Lebensmitteln für zwölf Proben und sechs Standards
Tabelle 4-29:	HPLC-Gradient
Tabelle 4-30:	Nachgewiesene Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der
	HPTLC / AMD, mit Platte 1 257
Tabelle 4-31:	Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der HPTLC / AMD,
	Platte 2
Tabelle 4-32:	Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der HPTLC / AMD,
	Platte 3
Tabelle 4-33:	Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach HPTLC / AMD 271
Tabelle 4-34:	Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach HPTLC / AMD 272
Tabelle 4-35:	Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach verbesserter
	Aufreinigung der Lebensmittelextrakte, am Beispiel von
	Blumenkohl
Tabelle 4-36:	Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach Online-
	Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD
Tabelle 4-37:	Wiederfindungen für die Benzoylharnstoffe nach Online-Kopplung
	der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD
Tabelle 4-38:	Wiederfindungsraten für die Fungizide nach Online-Kopplung der
	RP-HPLC mit der HPTLC / AMD
Tabelle 4-39:	Wiederfindungsraten für Thiabendazol, Carbendazim und Bitertanol
	nach HPTLC / AMD
Tabelle 4-40:	Postchromatischer Nachweis von Whiskyinhaltsstoffen nach
	HPTLC / AMD
Tabelle 4-41:	Whiskyinhaltsstoffe nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der
	HPTLC / AMD

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 2-1:	Nernstscher Verteilungssatz	30
Gleichung 2-2:	Berechnung der theoretischen Bodenzahl N	44
Gleichung 2-3:	Kubelka-Munk-Funktion	52
Gleichung 2-4:	Abhängigkeit der Spotfläche von der aufgetragenen Menge bei	
	visueller Detektion	52
Gleichung 2-5:	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach dem	
	Blindwertverfahren	73
Gleichung 3-1:	Berechnung der Konidienanzahl pro ml	89
Gleichung 3-2:	Berechnung der Verzögerungszeit in min	99

1 Problemstellung und Zielsetzung

Die Bestimmung von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln ist ein aktueller Auftrag des Verbraucherschutzes. Die Aufgabe des Rückstandsanalytikers besteht darin, vorhandene Pestizid-Rückstände sicher nachzuweisen, um im Rahmen der vom Gesetzgeber festgelegten Toleranzen die untersuchten Lebensmittel auf ihre Verkehrsfähigkeit zu überprüfen.

Die Analytik von Pflanzenschutzmittel-Rückständen ist problematisch, weil nicht alle Pestizide in einem Analysenlauf parallel bestimmt werden können. Die Analysierbarkeit der Pestizide ist neben dem Einfluss der Lebensmittelmatrix hauptsächlich von der chemischen Beschaffenheit, der chromatographischen Trennbarkeit und der Detektierbarkeit der Pestizide abhängig.

Es existieren sogenannte Multimethoden zur Erfassung von mehreren hundert Pflanzenschutzmitteln, die die Pestizide nach Extraktion und Aufreinigung (Clean-up) der Probe mittels Kapillar-Gaschromatographie mit paralleler Elektroneneinfangdetektion und Stickstoffselektiver Detektion nachweisen und quantifizieren können.

Die in Deutschland am häufigsten angewendete Multimethode ist die DFG-Methode S19 [1]. Rückstände von Organochlor- und Organophosphorverbindungen, Triazin-Herbiziden und vielen sonstigen Substanzen können mit dieser Methode aufgearbeitet, gaschromatographisch getrennt und mit selektiven Detektoren erfasst werden. Andere Wirkstoffe, zum Teil auch Verbindungen aus chemisch ähnlichen Gruppen wie die bereits genannten Substanzen, lassen sich mit dieser Methode nicht bestimmen, da sie zu wenig flüchtig, zu stark polar, thermisch instabil oder durch selektive Detektoren nicht empfindlich genug nachweisbar sind. Häufig treten auch mehrere dieser Eigenschaften zusammen auf.

In vielen Fällen können solche Substanzen zu thermisch stabilen und flüchtigen Derivaten umgewandelt werden, die sich dann mittels Gaschromatographie analysieren lassen. Beispielsweise können die sehr polaren, nicht flüchtigen Phenoxycarbonsäuren nach Derivatisierung mit Chloroformaten [2] oder mit Pentafluorbenzylbromid [3] gut gaschromatographiert und mittels massenselektiver Detektion erfasst werden.

Von anderen Substanzen lässt sich jedoch kein stabiles und aussagekräftiges Derivat herstellen. Beispielsweise werden die thermolabilen Phenylharnstoff- und Carbamat-Herbizide bei einer Derivatisierung mit einem Methylierungsreagenz zu Anilin gespalten. Als Folge lässt sich eine Gruppe von Wirkstoffen, die dasselbe Abbauprodukt bilden, nur gemeinsam bestimmen. Dieser Effekt ist aber nur dann erwünscht, wenn eine bestimmte Gruppe von Wirkstoffen oder Abbauprodukten gemeinsam analysiert werden soll.

Wieder andere Substanzen wie die Benzoylharnstoffe sind thermolabil und sie zersetzen sich im Injektor des Gaschromatographen, so dass sie nicht gaschromatographisch erfasst werden können.

Ein sehr wichtiger Schritt für die Bestimmbarkeit von Pestiziden stellt die Extrahierbarkeit der verschiedenen Substanzen aus der Probe dar. Die DFG-Methode S19 [1] verfügt über eine vergleichsweise einfache Aufarbeitung. Die Pestizide werden aus dem pflanzlichen Lebensmittel mit einem Aceton / Wasser-Gemisch ohne zusätzliche pH-Einstellung extrahiert und danach ebenfalls ohne pH-Einstellung mittels Flüssig / Flüssig-Extraktion in eine organische Phase überführt.

Da Extrakte pflanzlicher Lebensmittel in der Regel einen sauren pH-Wert zwischen 2,5 und 6,0 besitzen (Zitrone: ~ 2,5; Orange ~ 3,3; Gurke ~ 5,5; Radieschen ~ 6,0), sind nur mittelpolare bis unpolare Pestizide extrahierbar. Saure und basische Pestizide lassen sich unter diesen Bedingungen nicht extrahieren. Ihr Verteilungskoeffizient ist so klein, dass die Wiederfindungsraten bei Einfachextraktion wesentlich kleiner als 70 % und damit unbefriedigend sind.

Aus diesen Gründen sind die Extraktions- und Aufreinigungsschritte von sauren und basischen Pestizid-Rückständen oft sehr komplex und arbeitsaufwendig. Ein Beispiel ist die Aufarbeitung von Carbendazimrückständen in Getreide nach der DFG-Methode 378 [4]. Die Probe wird hierbei mehrfach bei unterschiedlichen pH-Werten extrahiert.

Ziel dieser Arbeit war es, möglichst einfache Methoden zu entwickeln, mit denen Rückstände thermolabiler und nichtflüchtiger Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln bestimmt und quantifiziert werden können. Die Methodenentwicklung konzentrierte sich besonders auf Lebensmittel, bei denen häufig Rückstände erwartet werden.

Für die chromatographische Trennung sollte die Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (HPTLC / AMD) mit und ohne Online-Kopplung zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt werden, da mit diesen Verfahren eine Trennung von Matrixkomponenten und Analyten ohne Hitzeeinwirkung möglich ist. Zunächst sollte die Eignung dieser chromatographischen Verfahren geprüft werden und auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse sollten Analysenmethoden für ausgewählte Pestizide entwickelt werden. Zusätzlich sollten Alternativmethoden für die Analytik der ausgewählten Pestizide entwickelt werden.
Der große Anwendungsbereich dieser chromatographischen Verfahren sollte zusätzlich zur Pestizidrückstandanalytik mittels der HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der HPLC am Beispiel einer Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen gezeigt werden. Biologisch aktive Inhaltsstoffe sollten durch unterschiedliche Detektionsverfahren (physikalische, chemische und biologische) identifiziert werden.

Die HPTLC / AMD-Technik wird inzwischen vielfältig in der Rückstandsanalytik eingesetzt. Sie ist geeignet, Pestizide verschiedenster Polarität zu erfassen, und wird als Screeningmethode für den Nachweis von Pestiziden in matrixarmen Proben wie Trinkwasser [5–14] benutzt.

Ein besonderer Vorteil der HPTLC / AMD-Technik ist die Möglichkeit, auf der für die chromatographische Trennung verwendeten Platte mehrere Proben gleichzeitig analysieren zu können; es lassen sich bis zu achtzehn Proben und Standards parallel auf die Platte auftragen. Darüber hinaus können für spezielle Substanzgruppen oder Trennprobleme geeignete Lösungsmittelgradienten entwickelt werden. Als besonders effektiv in der Optimierung der verwendeten Lösungsmittelgradienten erwiesen sich computergestützte Optimierungen von AMD-Gradienten [15–17].

Bei matrixreichen Proben kann es vorkommen, dass die Trennleistung der HPTLC / AMD nicht ausreicht, um die interessierenden Komponenten hinreichend von der Matrix abzutrennen. Als Beispiel seien hier Huminstoffe in Grund- und Trinkwasser genannt. Die durch diese Substanzen hervorgerufenen Überlagerungen können so stark sein, dass eine Auswertung der entwickelten Platte nicht möglich ist. Im alkalischen Milieu lässt sich die Extraktion der Huminstoffe aus der Wasserprobe zwar vermeiden, was aber einen vollständigen Verlust der sauren Pestizide zur Folge hat [7].

Die Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD ist aufgrund der hohen Matrixbelastung ebenfalls sehr problematisch. Erste Erfahrungen mit dieser Analytik sind von Stan und Butz beschrieben worden [8]. Sie zeigten, dass die Identifizierung von Pflanzenschutzmitteln mittels HPTLC / AMD prinzipiell möglich ist, aber die Quantifizierung meist durch die pflanzliche Matrix gestört wird. Eine mögliche Problemlösung wurde am Beispiel von Iprodion gezeigt (siehe Abschnitt 2.1.1).

Die Schlussfolgerung aus diesen Untersuchungen war, dass für die HPTLC / AMD-Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln in pflanzlichen Lebensmitteln in den meisten Fällen ein weiterer Reinigungsschritt zur Abtrennung von Matrixkomponenten erforderlich ist. Dieser sollte möglichst für alle Lebensmittel gleichermaßen effektiv sein. Die von Burger entwickelte Online-Kopplung von Reversed Phase (RP)-HPLC und HPTLC / AMD ist als sogenannter Online-Reinigungsschritt in der Lage matrixreiche Proben ohne aufwendiges Clean-up zu analysieren.

Dieses zweidimensionale Analysenverfahren erreicht durch die Kombination der Umkehrphasen-HPLC mit der Normalphasen-HPTLC eine Trennleistung, die der HPLC überlegen ist. Durch die damit verbundene verbesserte Trennung von Analyt und Matrix wird eine bessere Analysierbarkeit matrixreicher Proben erzielt [18, 19].

2 Grundlagen

2.1 Auswahl der untersuchten Pestizide

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, mit denen thermolabile und nichtflüchtige Pestizid-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der RP-HPLC bestimmt und quantifiziert werden können. Es sollte die Frage geklärt werden, ob diese chromatographischen Systeme in Multimethoden integriert werden können.

Zunächst sollte die Kapazität der chromatographischen Systeme getestet werden, d. h., es sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen ein Pestizid-Mix mittels HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der RP-HPLC getrennt werden kann.

Um die Grenzen des Systems untersuchen zu können, wurden in einem Pestizid-Mix Pestizide mit sehr unterschiedlichem chromatographischen Verhalten eingesetzt. Das unterschiedliche Verhalten der Pestizide war aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Gruppen wie zu den Phenoxycarbonsäuren, den Organophosphorsäuren, den Triazinen, den Anilidherbiziden oder den chlororganischen Pestiziden gegeben. Besonderen Wert wurde auf thermolabile und nichtflüchtige Pestizide gelegt. Die Pestizide sind im Ergebnisteil der Arbeit in Abschnitt 4.5.1 (Screening von Pestiziden mittels AMD-Technik) aufgeführt.

In den weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob eine Einzelstoffanalytik oder eine Gruppenanalytik von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der RP-HPLC möglich ist. Diese Pestizide werden im folgenden vorgestellt.

Als ein allein zu untersuchendes Pestizid wurde Iprodion ausgewählt, da vorausgegangene Arbeiten [8] sehr erfolgsversprechend waren.

Die Benzoylharnstoffe und eine Gruppe von sogenannten basischen Pestiziden sollten mittels HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der RP-HPLC untersucht werden, um zu zeigen, dass die gemeinsame Analytik strukturell sehr ähnlicher Pestizide durch die HPTLC /-AMD oder die Hintereinanderschaltung beider Trennmethoden möglich ist. Problem der Analytik und gemeinsames Merkmal der beiden Pestizidgruppen ist ihr sehr ähnliches chromatographisches Gruppenverhalten in der Dünnschichtchromatographie.

2.1.1 Iprodion

Das in Abbildung 2-1 dargestellte Iprodion ist ein häufig eingesetztes Kontaktfungizid, das hauptsächlich gegen Botrytis im Weinbau sowie gegen Monilia, Scerotinia, Alternaria, Helmintosporium und Rizoctonia in verschiedenen Kulturen angewendet wird [20].



Abbildung 2-1: Strukturformel und Molmasse des Iprodions

Zur Bestimmung von Iprodion sind verschiedene chromatographische Nachweismethoden bekannt. Die Extraktion aus den meist festen Proben findet mit einem polaren Lösungsmittel wie Methanol, Aceton oder Acetonitril mit anschließender Filtration statt. Im zweiten Schritt wird sowohl die Flüssig / Flüssig-Extraktion als auch neuerdings die Festphasenextraktion [21, 22, 23] eingesetzt. Bei der Flüssig / Flüssig-Extraktion wird der Extrakt in ein unpolareres Lösungsmittel überführt, häufig wird Dichlormethan eingesetzt [1, 24, 25], aber auch 2-Propanol / Petrolether [26] und Ethylacetat / Cyclohexan [27] sind geeignet. Bei allen Methoden wurde die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektion (GC / ECD) oder mit massenselektiver Detektion [22, 23] zum Nachweis von Iprodion eingesetzt, obwohl Iprodion eine schwerflüchtige Verbindung ist, die zur thermischen Zersetzung neigt.

Aufgrund der drei Stickstoffatome und der beiden Chloratome wird Iprodion selektiv im ECD bzw. im NPD detektiert. Üblicherweise wird Iprodion neben anderen Pflanzenschutzmitteln nach Aufarbeitung durch die DFG-Multimethode S19 [1] durch Kapillargaschromatographie mit Eluentsplitting mit den beiden unterschiedlich selektiven Detektoren ECD und NPD nachgewiesen. Da Iprodion thermolabil ist, zerfällt es im gaschromatographischen System. Die Zerfallsprodukte bilden mit Iprodion drei ineinander-fließende Peaks aus. Während der Nachweis von Iprodion keine Schwierigkeiten bereitet, ist die Quantifizierung manchmal problematisch. Ein Ringversuch zur Qualitätssicherung von Rückstandslaboratorien hat gezeigt [28], dass dieses Problem in vielen Laboratorien auftritt. So konnten zwar 59 von 68 Laboratorien 0,2 mg/kg Iprodion in Apfelmus richtig nachweisen, aber nur 49 % der quantitativen Analysenergebnisse lagen innerhalb des 1974 vom Bundesgesundheitsamt angegebenen Streubereiches [29]. Meist wurden für Iprodion zu hohe Gehalte angegeben, die zum Teil ganz erheblich waren.

Iprodion lässt sich auch mittels Flüssigchromatographie (HPLC) und Dünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (HPTLC / AMD) nachweisen [8]. Aufgrund seines konjugierten Elektronensystems ist es UV-aktiv, und kann mittels UV-Detektion nachgewiesen werden. Die hierbei auftretenden Überlagerungen des Analyten mit Matrixkomponenten wurden durch eine spezielle Untergrundkompensation korrigiert [30]. Diese Untergrundkompensation gestattete, Iprodion auch neben starken Matrixsignalen zu erkennen. Dazu wurde das Untergrundspektrum direkt neben dem Iprodion-Peak aufgezeichnet und von diesem abgezogen. Für jede Probe musste hier jedoch ein spezieller Untergrundabzug erfolgen, wodurch die Identifizierung sehr zeitaufwendig wurde. Außerdem blieb die Quantifizierung problematisch.

2.1.2 <u>Benzoylharnstoffe</u>

Die Benzoylharnstoffe sind eine relativ neue Insektizidgruppe, die in den Chitinstoffwechsel von Insekten eingreifen [20]. Die in Abbildung 2-2 dargestellten Benzoylharnstoffe ähneln sich stark in ihrer Struktur. Alle bis auf das Triflumuron, das eine 2-Chlorbenzoyl-Gruppe aufweist, besitzen eine 2,6-Difluorbenzoyl-Gruppe. Sie sind aufgrund ihrer Harnstoffgruppe thermolabil und damit gaschromatographisch nicht unzersetzt erfassbar. Die nicht dargestellten Benzoylharnstoffe Fluazuron und Flucylcoxuron konnten nicht untersucht werden, da die Standardsubstanzen nicht zur Verfügung standen.

Das Verhalten der den Benzoylharnstoffen verwandten Harnstoffherbizide in der Gaschromatographie wurde von Fishbein [31] schon 1969 untersucht. Im Gegensatz zur Hydrolyse, bei der das Anilin und das Amin entstehen, werden bei der Thermodegradation das aromatische Isocyanat und das Amin gebildet. Die Schemata der Thermodegradation und der Hydrolyse sind in Abbildung 2-3 dargestellt.

Ähnliches wurde für den Benzoylharnstoff Diflubenzuron von Müller beschrieben [32]. Er beobachtete, dass Diflubenzuron im Spurenbereich mit Hilfe der direkten Gaschromatographie mit einem konventionellen Hot-Splitless-System am NPD identifiziert und quantifiziert werden kann. Die Bestimmung erfolgte als 4-Chlor-Phenylisocyanat.



Abbildung 2-2: Strukturformeln und Molmassen der Benzoylharnstoffe



Abbildung 2-3: Thermodegradation und Hydrolyse der Harnstoffe nach Fishbein

Der Thermodegradationsmechanismus entspricht in den Grundzügen der Umkehrung der Synthese der Benzoylharnstoffe. Der Mechanismus der Isocyanatbildung ist der einzig mögliche thermische Zerfallsweg der Benzoylharnstoffe bei der chromatographischen Untersuchung, da in inerten Gasphasen nur intramolekulare Umlagerungen denkbar sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, ob auch andere Benzoylharnstoffe mittels direkter gaschromatographischer Bestimmung nach Thermodegradation identifiziert und quantifiziert werden können.

Da Benzoylharnstoffe wegen ihres konjugierten Elektronensystems UV-aktiv sind, eignen sich die Flüssigchromatographie wie auch die Dünnschichtchromatographie mit UV-Detektion als Verfahren für ihren Nachweis.

Zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen sind bisher keine Analysenmethoden bekannt, die alle bekannten Benzoylharnstoffe gemeinsam erfassen. Für den am häufigsten in der Landund Forstwirtschaft eingesetzten Benzoylharnstoff Diflubenzuron gibt es die meisten Analysenmethoden. Entsprechend der beiden Einsatzgebiete werden Blätter verschiedener Bäume, Wasser und pflanzliche Lebensmittel untersucht.

Die in Tabelle 2-1 beschriebene mögliche Aufarbeitung (Extraktion und Clean-up) der Benzoylharnstoffe ist auch für eine Bestimmung von Iprodionrückständen (vergleiche Abschnitt 2.1.1) oder auch für ein Screening von Organochlorpestiziden geeignet. Deshalb wurden 1994 Chlorfluazuronrückstände in Rindfleischfett beim Screening auf Organochlorinsektizide gefunden. Als Quelle für die Rückstände wurden Futtermittel (Baumwollabfall) ermittelt [43].

Mit Ausnahme einer Bestimmung von Diflubenzuronrückständen mittels Immunoassay [33] ist für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe eine Extraktion und meist auch ein Clean-up notwendig. Die Extraktion aus den meist festen Proben findet mit einem polaren Lösungsmittel wie Aceton, Ethanol, Ethylacetat oder Dichlormethan mit anschließender Filtration statt. Im zweiten Schritt wird sowohl die Flüssig / Flüssig-Extraktion als auch die Festphasenextraktion [41] eingesetzt. Bei der Flüssig / Flüssig-Extraktion wird der Extrakt in ein unpolareres Lösungsmittel überführt. Häufig wird Dichlormethan eingesetzt [38, 39, 44] aber auch Hexan [37], Ethylacetat [40, 45], Ethylacetat / Hexan [42] und Dichlormethan / Cyclohexan [46] sind geeignet.

Abhängig von der Matrix, der Aufarbeitung und der Endpunktbestimmung sind unterschiedliche Clean-up-Schritte notwendig. Weit verbreitet sind säulenchromatographische Aufreinigungen wie Festphasenextraktion an Umkehrphasen oder Normalphasen [41, 40, 42] und die Gelpermeationschromatographie [43-46]. Zur Untersuchung von Flufenoxuronrückständen in Wein wurde die Solid-Phase-Micro-Extraction (SPME) eingesetzt. Interessanterweise wurde dabei Flufenoxuron unzersetzt gaschromatographiert und mittels ECD detektiert. [47]

Bei einigen Methoden wurde die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektion (GC / ECD) oder massenselektiver Detektion (GC / MS) auch nach Derivatisierung zum Nachweis von Benzoylharnstoffen einsetzt [39, 42, 36].

Besonders häufig wurde die HPLC an Umkehrphasen zur Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen verwendet [35, 37, 40, 41, 43, 44, 46]. Jeweils einmal wurde die HPLC an Normalphasen und die Dünnschichtchromatographie mit einer mit Silbernitrat imprägnierten Aluminium-Platte zur Endpunktbestimmung eingesetzt.

Anhand der vorliegenden Aufarbeitungsvorschriften kann postuliert werden, dass die Aufarbeitung der Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmittel in die DFG-Methode S19 [1] integriert werden kann und die Endpunktbestimmung mittels HPLC und TLC möglich ist.

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Diflubenzuron (und BAY SIR 8514)	Wasser und Milch	ohne	ohne	Immunoassay	[33]
Diflubenzuron	Fichte, Kiefer	Ethanol	ohne	NP-HPTLC / UV	[34]
	Esche	Aceton	_		
Diflubenzuron, Triflumuron, Flucylcoxuron und 10 Harn- stoffpestizide	Trinkwasser	Dichlormethan	ohne	RP-HPLC Zorbax 5 μm SB-C18	[35]
Diflubenzuron	Äpfel	Aceton, Ethyl- acetat oder Di- chlormethan	ohne	GC / MS (scan) oder GC / ECD, nach Derivatisie- rung mit HFBA	[36]
Flufenoxuron	Früchte wie Äpfel, Kiwi	Methanol und LLE mit He- xan	ohne	RP-HPLC (Zorbax ODS) / UV	[37]
Diflubenzuron	Wasser	LLE mit Di- chlormethan	ohne	TLC mit Silbernitrat imprägnierter Alu- miniumoxid-Platte	[38]

Tabelle 2-1:Übersicht über die Analytik von Benzoylharnstoffe

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Diflubenzuron	verschiedene Laubbäume	Aceton und LLE mit Di- chlormethan	ohne	GC / MS, Quantifi- zierung mit deute- rierten Diflubenzu- ron	[39]
Diflubenzuron,	Wein	RP-SPE (C18)	ohne	RP-HPLC (C18) /-	[40]
Triflumuron, Teflubenzuron, Lufenuron, Flufenoxuron	Weinbeeren	LLE mit Ethylacetat /- Natriumsulfat	NP-SPE (Kieselgel)	UV-DAD	
Diflubenzuron, Triflumuron, Teflubenzuron, Ethiofencarb, Triforin	Babynahrung (Apfel- und Birnenpulpe)	Aceton / Di- chlormethan	RP-SPE (C18)	RP-HPLC (Hyper- sil ODS) / UV	[41]
Diflubenzuron, Permethrin	Boden und Wasser	LLE mit He- xan / Ethyl- acetat	NP-SPE (Florisil) nach Deri- vatisierung	GC / ECD nach Derivatisierung mit Trifluoracet- anhydrid	[42]
Chlorfluazuron, Fluazuron	Rindfleischfett	Hexan und LLE mit Ace- tonitril	GPC	RP-C18-HPLC (ODS) / UV	[43]
Diflubenzuron, Flufenoxuron, Flucylcoxuron, Chlorfluazuron, Triflumuron	Äpfel	Aceton und LLE mit Dichlormethan	GPC	RP-C8-HPLC	[44]
Diflubenzuron, Triflumuron, Flufenoxuron, Clofentezin, Hexythiazox	Äpfel, Tomaten	Ethylacetat und Natriumsulfat	GPC	RP-C18- HPLC / UV	[45]
Diflubenzuron	Champignons	Aceton und LLE mit Di- chlormethan /- Cyclohexan	GPC	RP-HPLC (ODS) /- MS (APCI-)	[46]
Flufenoxuron und 22 Organo- phosphor- und Organochlor- Insektizide	Weiß- und Rotwein	SPME		GC / ECD, GC / MS (Absicherung)	[47]

2.1.3 Basische Pestizide

Die beiden Hauptvertreter der Gruppe der sogenannten basischen Pestizide, die thermolabilen Fungizide Carbendazim und Thiabendazol, können nicht mit Multimethoden wie der DFG-Methode S19 aufgearbeitet werden. Ursächlich dafür sind die schon in Abschnitt 1 beschriebenen Ursachen, die ungünstigen P_k -Werte und die Verteilungskoeffizienten der Fungizide.

Die Rückstandsanalytik von Carbendazim und Thiabendazol mittels AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC soll gemeinsam mit Imazalil, Bitertanol, Tebuconazol, Myclobutanil, Triadimefon, Prochloraz, Triadimenol, Oxadixyl und Procymidon durchgeführt werden, weil erste Untersuchungen zeigten, dass sie alle mit Ausnahme von Procymidon ein sehr ähnliches chromatographisches Verhalten in der NP-HPTLC aufweisen. Dadurch soll die hohe Selektivität der Analysenmethoden gezeigt werden.

Für die Rückstandanalytik mittels GC/MS nach Pentafluorbenzylierung wurde ein Mix benutzt, welcher neben Carbendazim und Thiabendazol verschiedene in Abschnitt 2.1.3.5 kurz vorgestellte Carbamate und das Harnstoffherbizid Tribenuron-Methyl enthält.

Da Fungizide das Wachstum von Pilzen hemmen (Fungistatika) oder bereits wachsende Populationen abtöten (Fungizide im eigentlichen Sinne), können sie prinzipiell aufgrund ihrer fungiziden Wirkung nach dünnschichtchromatographischer Trennung mit einer bioautographischen Methode (siehe Abschnitt 2.5.1.7) nachgewiesen werden.

Im folgenden werden die Substanzgruppen der Fungizide vorgestellt, die in der Arbeit hinsichtlich ihrer Detektierbarkeit mit einer bioautographischen Methode untersucht wurden. Es wird auf das Wirkprinzip der Fungizide und besonders für Carbendazim und Thiabendazol auf ihre Analysierbarkeit eingegangen.

2.1.3.1 Benzimidazol-Verbindungen

Die in Abbildung 2-4 dargestellten Fungizide Benomyl, Thiophanat-Methyl, Carbendazim und Thiabendazol sind Benzimidazol-Verbindungen [20].

Carbendazim stellt das Wirkprinzip von Benomyl und Thiophanat-Methyl dar [48, 49].

Benomyl ist eine instabile Verbindung und wird schon auf oder in der Frucht und während der Probenvorbereitung weitgehend unter Abspaltung von n-Butylisocyanat zu Carbendazim umgewandelt. In organischen Lösungsmitteln wird Benomyl schnell und in Wasser bei pH 7 relativ langsam zu Carbendazim abgebaut [50]. Der Abbau im sauren Milieu wird ebenfalls beschrieben [51].

Die Umwandlung des Thiophanat-Methyl zu Carbendazim erfolgt unter alkalischer Katalyse wie z. B. während der Derivatisierung mit PFB-Br [75].



Abbildung 2-4: Strukturformeln und Molmassen der Benzimidazole

In dieser Arbeit wird aufgrund der bekannten Abbauwege von Benomyl und Thiophanat-Methyl zu Carbendazim sowie ihrer Bestimmung entsprechend der Rückstands-Höchstmengen-Verordnung als Summenparameter [107] nur Carbendazim untersucht.

Die Benzimidazol-Fungizide sind in den Pilzen während der Kern- bzw. Zellteilung wirksam. Bei der Mitose bilden sie Komplexe mit Untereinheiten plasmatischer und mitochondrialer Mikrotubuli, wobei die Organisation der Mikrotubuli gehemmt wird. Es erfolgt eine Bindung der Wirkstoffe mit dem pilzlichen β -Tubulin. Der sehr spezifische Wirkmechanismus und die Tatsache, dass die Wirkung mit der Bindung an ein Protein verknüpft ist, können zur Resistenzbildung von Pilzstämmen führen [52].

Mögliche Aufarbeitungsmethoden für Carbendazim- und Thiabendazolrückstände sind in Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 zusammengefasst. Oft werden beide Analyten zusammen erfasst.

Meist ist die Aufarbeitung der Carbendazim- und Thiabendazolrückstände komplizierter als die Aufarbeitung von Benzoylharnstoff-Rückständen. Nur aus Wasser oder aus flüssigen Lebensmitteln wie Säften und verdünnten Pulpen lassen sich beide Benzimidazole leicht mittels Online- oder Offline-SPE extrahieren [53-56, 67, 69-72, 77]. Üblich ist die mehrfache Flüssig / Flüssig-Extraktion bei verschiedenen pH-Werten ohne Clean-up [4, 59-64, 79, 80, 82] und die mehrfache Flüssig / Flüssig-Extraktion mit anschließendem Clean-up an

Festphasen [61, 65-68, 73, 84-87]. Eine sehr erfolgreiche Methode ist die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (SFE) [75, 76], die selektiv und sehr schnell ist, aber den Nachteil hat, dass eine SFE-Apparatur nur selten zur Verfügung steht.

Für die Bestimmung von Carbendazim- und Thiabendazol-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln sollte in dieser Arbeit eine weniger zeitaufwendige Aufarbeitung entwickelt werden. Da es sich bei Carbendazim und Thiabendazol um sehr polare Fungizide handelt, sollte der erste Extraktionsschritt mit polaren Lösungsmitteln erfolgen, obwohl dabei die Gefahr einer starken Emulsionsbildung besteht [63]. Die Analyten sollen mit einem Aceton / Wasser-Gemisch extrahiert werden, da nach Anastassiades und Scherbaum die Wiederfindungsraten für beide Analyten nach einer Aceton / Wasser-Extraktion über 70 % lagen [62].

Bei einigen Lebensmitteln wie den Zitrusfrüchten wurde eine Störung der Aufarbeitung durch den hohen Pektingehalt der Früchte beobachtet, die lediglich bei der Aufarbeitung mittels SFE vermieden werden konnte [75].

Es soll möglichst nur eine einfache Flüssig / Flüssig-Extraktion durchgeführt werden, um die Analyten in eine wasserfreie Phase zu überführen. Alternativ zur Flüssig / Flüssig-Extraktion oder als anschließendes Clean-up soll eine Festphasen-Extraktion stattfinden, da eine Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie nicht erfolgreich ist. Ein Clean-up mit der GPC ist nicht möglich, weil Carbendazim und Thiabendazol Wechselwirkungen mit dem GPC-Material eingehen und deshalb nicht kontrolliert die Säule verlassen [68].

Zur Endpunktbestimmung sind in der Literatur die GC, HPLC und die TLC beschrieben worden. Bei einigen Methoden wurde die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektion (GC / ECD) oder massenselektiver Detektion (GC / MS) auch nach Derivatisierung zum Nachweis von Carbendazim und Thiabendazol verwendet [4, 62, 70]. Nach Anastassiades und Scherbaum ist eine Quantifizierung nur nach dem Standardadditionsverfahren möglich, weil Matrixeinflüsse die Umsetzungsrate der Derivatisierung beeinflussen [62]. Thiabendazol ist ähnlich wie Iprodion (siehe Abschnitt 2.1.1) auch ohne Derivatisierung nach gaschromatographischer Trennung detektierbar [81], obwohl es sich um eine schwerflüchtige und thermolabile Verbindung handelt.

Besonders häufig wurde die HPLC an Umkehrphasen (C1 bis C18 und Diol) zur Bestimmung von beiden Benzimidazolen verwendet (siehe Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3).

Nach Tharsis et al. hat die verwendete RP-C18-Säule einen großen Einfluss auf die Chromatographie. Mit einem Wasser / Methanol-Gradienten wurden die beiden Benzimidazole mit C18-Säulen der Firma Picotag schlecht und mit einer RP-C18-Säule der Firma Kromasil sehr gut chromatographiert [66]. Meist wurden als mobile Phasen Puffersysteme verwendet, lediglich Di Muccio et al. benutzten mit Erfolg einen Aceton / Wasser-Gradienten ohne Puffer [68].

Neben der RP-HPLC wird auch die Ionenchromatographie eingesetzt [74, 86, 87].

Die beiden Benzimidazole sind aufgrund ihrer konjugierten Elektronensysteme UV-aktiv, so dass sie mittels UV-Detektion nachgewiesen werden können. Üblicherweise wurden die Analyten vor der UV-Detektion mittels HPLC oder TLC [61, 69, 78] getrennt. Eine einfache UV-Detektion ohne vorhergehende chromatographische Trennung war mit einem großen Aufarbeitungsaufwand für ein besseres Clean-up ebenfalls möglich [63].

Da Thiabendazol Fluoreszenzverhalten zeigt, kann zur Detektion auch die Fluoreszenzmessung herangezogen werden [82, 87].

In dieser Arbeit sollen zur Bestimmung von Carbendazim und Thiabendazol die AMD-TLC und die GC / MS nach Pentafluorbenzylierung eingesetzt werden und die Wiederfindungsraten der beiden Methoden miteinander verglichen werden.

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Carbendazim, Benomyl, Aminocarb, Carbofuran, Carbaryl, Propoxur, u. a.	Wasser	ohne	ohne	online-SPE (RP-C8 und RP-C18) RP- HPLC(C18) / UV	[53]
Carbendazim, Benomyl, Aldicarb, Aldicarbsulfoxid, Aldicarbsulfon	Wasser	ohne	ohne	online SPE-RP- HPLC (C18) / UV	[54]
Carbendazim	Wasser	ohne	ohne	Online-Immuno- assay und online- SPE(C18) RP- HPLC (C18) / DAD oder APCI+-MS	[55]
Carbendazim, Benomyl, Ab- bauprodukte	Wasser	ohne	ohne	online SPE-HPLC- DAD oder APCI- MS	[56]

Tabelle 2-2:Übersicht über die Analytik von Carbendazim

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Carbendazim	Wasser	im Vakuum einengen	ohne	LC-LC (C1-ODS) / UV	[57]
Carbendazim, Benomyl	Wasser, Boden	ammoniaka- lisches Metha- nol	ohne	Online Immuno- assay–LC (G 8 An- tibody) / LC (C18) / MS–MS	[58]
Carbendazim, Matalaxyl, Folpet, Propiconazol	Most, Wein	Zweifache LLE mit Ben- zol	ohne	RP-HPLC (C18) / - UV	[59]
Carbendazim, Benomyl, Thiophanat- Methyl,	Getreide, Erde	NaHCO ₃ , Wasser und Ethylacetat	Dreimalige LLE mit H ₂ SO ₄ , wa- schen mit DCM, LLE mit NaH ₂ CO ₃ und DCM	GC / ECD nach Pentafluorbenzy- lierung	[4]
Carbendazim, Benomyl	Honig, Bienenwachs, Larven, Bienen, Pollen	Dreifache LLE, Ethyl- acetat, sauer, basisch	LLE mit Hexan (Wachs und Pollen)	RP-HPLC (C18) / PB-MS	[60]
Carbendazim, Benomyl, Azin- phos-methyl, Dimethoat,	Wasser	Dreifache LLE mit Dichlor- methan und Na ₂ SO ₄	ohne	TLC (Carbamate, Fungizide), GC / NPD-ECD (Organophosphorin- sektizide, Py- retroide)	[61]
Methidathion, Fosmet, Ciper- methrin, Carba- ryl, Propoxur, Carbofuran,	Boden (nur Azinphos- methyl	Vierfache Ex- traktion mit Aceton und Natriumsulfat	NP-SPE (Kieselgel)		
Carbendazim, Benomyl, Thio- phanat-Methyl, Thiabendazol, Carbaryl, Ortho- phenylphenol	Zitrusfrüchte	Aceton, vier- fache LLE mit Cyclohexan / - Ethylacetat bei natürl. pH; pH ~ 2; 8-8,5; ~ 9,5	ohne	GC / MS nach Deri- vatisierung mit PFB-Br	[62]
Carbendazim	Äpfel, Tomaten, Champignons	Fünffache LLE, Ethyl- acetat, basisch, sauer	ohne	UV-Spektroskopie	[63]

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Carbendazim, Imazalil	pflanzliche Lebensmittel	Neunfache LLE Ethyl- acetat, sauer, basisch	ohne	RP-HPLC (C18) / UV, GC / NPD für Imazalil	[64]
Carbendazim, Carbaryl, Carbofuran, Dimethoat, Malathion, Parathion- methyl,	Boden	Methanol / - Wasser, dreifache LLE mit DCM	SPE (Sep- Pak)	RP-HPLC (C18) / UV	[65]
Carbendazim, Thiabendazol	Orangen, Weinbeeren	Aceton LLE mit DCM / Petrol- ether	RP-SPE- (Diol)	RP-HPLC (C18) / UV	[66]
Carbendazim, Carbofuran, Oxamyl, Metho- myl, Aldicarb, Propoxur, Ami- nocarb, Pirimi- carb, Promecarb, Barban	Fluss- Sediment	Soxhlet mit Aceton / Di- chlormethan	SPE mit Florisil, neutrales Aluminium- oxid und SPE- Amino- propyl	RP-HPLC (RP select B)-ICP-MS und TSP-MS und UV-DAD	[67]
	Wasser,	SPE- C18-Disk			
Carbendazim, Benomyl, Thiabendazol	Erdbeeren, Salat, Äpfel, Zitronen, Grapefruit	Wasser / Ace- ton-Extrakt, SPE-Extrelut 20	Phenyl-SCX	RP-HPLC (ODS) / UV	[68]
Carbendazim, Thiophanat- Methyl and Thiabendazol	Fruchtproduk- te wie Nektar, Pulpe, Konzentrat und Konfitüre	SPE-Extrelut 20		RP-HPLC (Ionenpaar) / UV und Fluoreszenz Absicherung mit NP-HPLC (Diol)	[69]
Carbendazim und 12 Carbamate	Wasser	RP-SPE (C18)		Online-Methylie- rung mit TMSH GC / MS ^a	[70]

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Carbendazim, Butocarboxim, Aldicarb, 2,4-D (u. a. insgesamt 39 Pestizide)	Wasser	SPE (Carbograph 4)		HPLC (Hypersil 25) /MS (ES)	[71]
Carbendazim	Wasser	SPE mixed RP (C18) / SCX (EN)	ohne	RP-HPLC (C18) / DAD	[72]
Carbendazim, Benomyl, Thiophanat- Methyl, Thiabendazol	Weinbeeren, Birnen, Äpfel, Orangen, Kiwi, Tomaten, Salat, Zucchini	ammoniaka- lisches Ethylacetat, Na ₂ SO ₄	SCX	RP-HPLC (ODP-50) / UV und Fluoreszenz	73
Carbendazim, Thiabendazol	Bananen- Pulpe, Zitronen, Orangen- Pulpe, Pilze, Reis	Extraktion mit heißem Wasser bei 75 °C und 50 atm	LLE mit Ethylacetat	RP-Ionenpaar- HPLC / UV und Fluoreszenz	74
Carbendazim, Benomyl, Thiophanat- Methyl, 2,4-D	pflanzliche Lebensmittel	SFE	ohne	HPLC / DAD und GC / MS nach Derivatisierung mit PFB-Br	75
Carbendazim	Pfeffer	SFE	ohne	Laser Desorption und REMPI Time- of-Flight MS	76

Tabelle 2-3:Übersicht über die Analytik von Thiabendazol

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Thiabendazol	Säfte und Konzentrate	gegebenenfalls verdünnen		Online Immuno- assay RP-HPLC (C-18) / UV	[77]
Thiabendazol, Imazalil, o- Phenylphenol	Zitronen	in Aceton + 0,5 % Essigsäure tauchen	ohne	NP-TLC (G 60) / UV Absicherung mit Dragendorff- Reagenz und Fast Blue B Reagenz	[78]

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
Thiabendazol	Ananas- Konserven	zweimal mit Ethylacetat	ohne	Micelle-stabilized room temperature phosphorescence	[79]
Thiabendazol, Chlorpropham, Propham	Kartoffeln	gesättigte NaCl-Lösung, dreifache LLE mit DCM	ohne	RP-HPTLC (C8) und RP-HPLC (C18) / UV	[80]
Thiabendazol	Zitrusfrüchte, Apfelsaft	Hexan / Ethyl- acetat	ohne	GC / NPD	[81]
Thiabendazol, Biphenyl, o- Phenylphenol	Zitronen	Ethylacetat + NaH2PO4 + Na2SO4	LLE mit mobiler Phase oder 0,1 N HCl	RP-HPLC (C8) /- Fluoreszenz	[82] [83]
Thiabendazol, Imazalil	Zitronen	DCM	RP-SPE (DIOL)	RP-HPLC (DIOL) / UV	[84]
Thiabendazol, Abbauprodukte	Tiergewebe	bei pH 7 mit Ethylacetat	RP-SPE (CN)	HPLC (ODS 3) / MS APCI	[85]
Thiabendazol, Imazalil	Zitronen, Bananen	Natriumsulfat, (Dinatrium- hydro- genphosphat nur Zitronen) + Ethylacetat	SPE mit (Sep-Pak Vac Si- lica / BondE lutPRS)	Ionenpaar-HPLC (TSKgel) / UV	[86]
Thiabendazol	Zitrusfrüchte	Puffer pH 8, LLE mit Ethylacetat + Na ₂ SO ₄	SPE mit PRS	Ionenpaar-HPLC (SCX) / Fluoreszenz	[87]

2.1.3.2 Triazol-Verbindungen

Die in Abbildung 2-5 dargestellten Fungizide Bitertanol, Myclobutanil, Triadimenol, Triadimefon und Tebuconazol sind Vertreter der Gruppe der Triazol-Verbindungen [20].

Die Substanzen wirken auf vielfältige Weise. Ihr wichtigster Angriffspunkt im Stoffwechsel der Pilze ist die Biosynthese von Ergosterol. Ergosterol ist ein wichtiger Membranbaustein in der Pilzzelle mit stabilisierender Funktion. Eine Blockade der Ergosterol-Biosynthese führt zu veränderten Strukturen der Membranen bei Neusynthese und damit zur Hemmung der Pilzentwicklung.

Die vom Lanosterol ausgehende Biosynthese des Ergosterols wird vor allem bei der C-14-Demethylierung durch die Hemmung von einem oder mehreren Enzymen in den Mikrosomen blockiert, so dass es zur Anreicherung der Vorstufen z. B. von C-14-Methylsterolen und C-4-Methylsterolen kommt [88]. Wegen der Hemmung der C-14-Demethylierung werden die Fungizide auch Demethylierungs-Inhibitoren genannt.

Die Analytik der Triazol-Verbindungen entspricht der Rückstandsanalytik von Iprodion. Oft wurden in Multimethoden Triazol-Verbindungen, Methyl-Carbamate und Iprodion gleichzeitig erfasst [z. B. 21, 23].



Abbildung 2-5: Strukturformeln und Molmassen der Triazole

2.1.3.3 Imidazol-Verbindungen

Zur Gruppe der Imidazol-Verbindungen gehören die in Abbildung 2-6 dargestellten Fungizide Imazalil und Prochloraz [20].

Ihr entscheidender Wirkmechanismus ist, wie bei den Triazol-Verbindungen, die Hemmung der Ergosterol-Biosynthese. Sie sind ebenfalls Demethylierungsinhibitoren. Sie haben jedoch auch Einfluss auf andere Stoffwechselwege. Imazalil stört z. B. die Funktion des Plasmalemmas. [88]

Imazalil und Prochloraz sind relativ stabile Verbindungen, die gaschromatographisch getrennt und mit einem stickstoffselektiven Detektor erfasst werden können. Sie werden üblicherweise mit der S19-Methode nachgewiesen [1].



Abbildung 2-6: Strukturformeln und Molmassen der Imidazol-Verbindungen

2.1.3.4 Dicarboximid-Verbindungen

Die Substanzklasse der Dicarboximid-Verbindungen wird durch das in Abbildung 2-7 dargestellte Procymidon vertreten [20]. Es hemmt ebenfalls wie die Triazol- und Imidazol-Verbindungen die Ergosterol-Biosynthese.

Procymidon, das oft im Weinbau eingesetzt wird, kann z. B. in Weinprodukten wie Weintrauben, Most und Wein mittels Online-MLLE-GC / ECD-NPD nachgewiesen werden. Die Absicherung erfolgt mit GC-MS [89].



Abbildung 2-7: Strukturformel und Molmasse des Procymidons

2.1.3.5 Phenylamid-Verbindungen

Phenylamid-Fungizide sind systemische Fungizide und werden z. B. in Mischungen mit Ergosterol-Biosynthesehemmer angewendet. Sie hemmen die RNA-Biosynthese der Klasse der Oomyceten wie Phytophthora infestans [90]. Ein Vertreter der Phenylamid-Fungizide ist das in Abbildung 2-8 dargestellte Oxadixyl. Es ist eine relativ stabile Verbindung, die gaschromatographierbar ist, mit einem stickstoffselektiven Detektor erfasst werden kann und üblicherweise mit der S19-Methode nachgewiesen wird [1].



Abbildung 2-8: Strukturformel und Molmasse des Oxadixyls

2.1.4 <u>Methyl-Carbamate und Tribenuron-Methyl</u>

Carbamatinsektizide sind Cholinesterase-Hemmer. Für die Rückstandanalytik mittels GC / MS nach Pentafluorbenzylierung wurde ein Mix benutzt, welcher neben Carbendazim und Thiabendazol verschiedene in Abbildung 2-9 dargestellte Carbamate und das Harnstoffherbizid Tribenuron-Methyl enthält.

Einen guten Überblick über die Analytik von Carbamatrückständen in Wasser, Böden und pflanzlichen Lebensmitteln bietet Yang et al. [91], weitere Literatur wird in Tabelle 2-4 vorgestellt.

Carbamate sind abhängig von ihrer Struktur stabile oder instabile Verbindungen. Die in der Arbeit untersuchten Methyl-Carbamate können lediglich mittels Dünnschichtchromatographie, Flüssigchromatographie oder gaschromatographisch nach Derivatisierung zu einem stabilen Derivat nachgewiesen werden [105]. Auch in der Dünnschichtchromatographie und der Flüssigchromatographie ist es üblich, Carbamate zu derivatisieren. Diese postchromatographischen Derivatisierungen dienen der Empfindlichkeitssteigerung und der Steigerung der Selektivität des Verfahrens [92, 96, 102, 103, 104].



Abbildung 2-9: Strukturformeln und Molmassen der Carbamate

Tabelle 2-4:	Übersicht über	die Analytik	x von Carba	maten
		ult Analytik	VUII Carba	matth

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
3 Carbamate, 6 Metabolite, 3 Herbizide	Wasser	ohne	ohne	online-SPE (RP- C18) RP-HPLC(RP- C8) / postchroma- tographische Deri- vatisierung (Fluo- reszenz) oder UV	[92]
33 Carbamate und 14 Metabo- lite	Wasser	ohne	ohne	FIA-Particle Beam MS	[93]
9 Carbamate, 11 Harnstoff- pestizide u. a.	Wasser	ohne	ohne	online-SPE (C18) /- RP-HPLC (C8) / Thermospray-MS	[94]
Carbamate und Triazine	Boden	Wasser	ohne	SPME / RP- HPLC / MS (ESI)	[95]

Analyt	Matrix	Extraktion	Clean-up	Endpunkt- bestimmung	Lit.
4 Carbamate	Wasser	RP-SPE (C18)		HPTLC / postchro- matographische De- rivatisierung / VIS	[96]
Thiobencarb	Wasser	SPE-Disk (C8)		GC / NPD	[97]
	Boden	Wasser	SPE-Disk (C8)	-	
4 Carbamate und 2 Triazine	Wasser	SPE (C18)	ohne	RP-HPLC (C18) / MS (ESI)	[98]
13 Carbamate	pflanzliche Lebensmittel	MSPD (C18, C8, cyano, Amin- und Phenyl, Mate- rial vermischt)	ohne	RP-HPLC (C8) / MS (ESI)	[99]
12 Carbamate	pflanzliche Lebensmittel	Methanol	RP-SPE (Carbon)	RP-HPLC (C18) / MS (ESI)	[100]
5 Carbamate	pflanzliche Lebensmittel	Gefriertrock- nen Petrolether und DCM / NaCl	NP und RP- SPE	RP-HPLC (C18) / UV	[101]
Carbosulfan	Orangen	DCM und Na ₂ SO ₄	RP-SPE (Amino- propyl)	RP-HPLC (ODS) / postchromatogra- phische Derivatisie- rung (Fluoreszenz)	[102]
7 Carbamate und 3 Metabolite	grüner Pfeffer	Acetonitril / - Toluol und NaCl	SPE-Disk (Carbon) offline und online	RP-HPLC (C18) / postchromatogra- phische Fluoreszenz- Derivatisierung	[103]
Carbaryl	tierisches Material	Wasser und Diethylether	ohne	TLC postchroma- tographische Deri- vatisierung / VIS	[104]
10 Carbamate und 6 Harnstoff- pestizide	pflanzliche Lebensmittel	wie S19-N	Aethode	GC / MS nach Deri- vatisierung mit Acetanhydrid	[105]
3 Carbamate	Boden	SFE	ohne	RP-HPLC (C18) / postchromatogra- phische Fluoreszenz Derivatisierung	[106]

2.2 Auswahl der untersuchten pflanzlichen Lebensmittel

In die Methodenentwicklung wurden pflanzliche Lebensmittel einbezogen, in denen besonders häufig und relativ hohe Rückstände der ausgewählten Pestizide erwartet wurden. Sie wurden anhand der in der Rückstandshöchstmengen-Verordnung (RHmV) [107] für diese Stoffe festgelegten Grenzwerte ausgewählt.

Für die Bestimmung von Iprodionrückständen wurden unter anderen Kopfsalat und Erdbeeren ausgewählt, da Iprodionrückstände häufig in pflanzlichen Lebensmitteln wie Erdbeeren, Kopfsalat, Weinbeeren, Gurken, Kiwifrüchten, Pflaumen, Chicorée, Ölsaat, Feldsalat und Friséesalat nachgewiesen wurden [20].

Die RHmV erlaubt für Iprodion abhängig vom pflanzlichen Lebensmittel eine Höchstmenge von 0,1 mg/kg bei Kohlrabi, bis 5,0 mg/kg für Kiwis, Knoblauch, Kopfkohl, Schalotten, Solanaceen, Speisezwiebeln, Steinobst, Strauchbeerenobst und sogar 10 mg/kg für Erdbeeren, Heidelbeeren, Johannisbeeren, Kernobst, frische Kräuter, Trauben, Salatarten, Stachelbeeren. Für andere pflanzliche Lebensmittel legt die RHmV eine zulässige Höchstmenge von nur 0,02 mg/kg fest.

Pestizid	Höchstmenge mg/kg	in oder auf folgenden Lebensmitteln
Diflubenzuron	2,0	Wildfrüchte
	1,0	Kernobst, Kohlgemüse
	0,2	Pilze
	0,05	andere pflanzliche LM
Teflubenzuron	1,0	Kernobst
	0,5	Orangen
	0,2	wildwachsende Pilze, Wildfrüchte
	0,05	andere pflanzliche LM
Triflumuron	1,0	Kernobst
	0,2	wildwachsende Pilze, Wildfrüchte
	0,05	andere pflanzliche LM

Tabelle 2-5:Höchstmengen für die Benzoylharnstoffe

Die RHmV erlaubt für die zugelassenen Benzoylharnstoffe Diflubenzuron, Teflubenzuron und Triflumuron abhängig vom pflanzlichen Lebensmittel und Pestizid eine Höchstmenge von 0,2 mg/kg für Pilze und 1 mg/kg für Kernobst. Diflubenzuron ist auf Wildfrüchten bis zu

2 mg/kg zugelassen. Für alle anderen pflanzlichen Lebensmittel wurde die Höchstmenge bei allen drei zugelassenen Benzoylharnstoffen auf 0,05 mg/kg festgelegt (Tabelle 2-5).

Die Benzoylharnstoffe, Chlorfluazuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron und Lufenuron sind in Deutschland als Pflanzenschutzmittel nicht zugelassen. Für sie sind entsprechend der RHmV maximale Rückstände von 0,01 mg/kg auf allen pflanzlichen Lebensmittel erlaubt.

Da auf Kohlgemüse, Kernobst und Pilzen relativ hohe Rückstände von Benzoylharnstoffen erlaubt sind, sollen vor allem diese Lebensmittel in die Untersuchungen einbezogen werden.

Für Carbendazim und Thiabendazol sind für die verschiedenen pflanzlichen Lebensmittel stark unterschiedliche Höchstmengen festgelegt. Ein Auszug der RHmV ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Die Höchstmengen liegen für Zitrusfrüchte bei 5 (Carbendazim) bzw. 6 mg/kg (Thiabendazol). Für sehr viele andere pflanzliche Lebensmittel liegen sie bei 1 bis 2 mg/kg. Für nicht in der RHmV erwähnte Lebensmittel, den sogenannten "anderen pflanzlichen Lebensmitteln", wurden für Carbendazim 0,1 mg/kg und für Thiabendazol 0,05 mg/kg als maximale Rückstandsmengen festgelegt.

Tabelle 2-6:	Höchstmengen	für	Carbendaz	im und	Thiabendazo)

Pflanzliche Lebensmittel	Carbendazim [*] in mg/kg	Thiabendazol in mg/kg	Pflanzliche Lebensmittel	Carbendazim in mg/kg	Thiabendazol in mg/kg
Andere pflanzl. Lebensmittel	0,1	0,05	Kohl- und Speiserüben	1	
Zitrusfrüchte	5	6	Bananen	1	3
Trauben	3		Blumenkohl	1	
Kernobst	2	5	Hülsengemüse	1	
Rhabarber	2		Karotten	1	
Johannisbeeren	1,5		Knollensellerie	1	
Erdbeeren	1,5	5	Salatarten	1	
Stachelbeeren	1,5		Paprika	1	

Auszug aus der RHmV

Benomyl, Carbendazim und Thiophanat-Methyl haben eine gemeinsame Höchstmenge und werden summarisch als Carbendazim erfasst.

Bei Routineuntersuchungen im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart wurden 1996 bis 1998 über 320 Proben u. a. auf Carbendazim und Thiabendazol untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte im ersten Untersuchungszeitraum mit der klassischen Flüssig / Flüssig-Mehrfachextraktion. Es wurden ausschließlich Zitrusfrüchte untersucht. Höchstmengenüberschreitungen wurden bei vier von 72 Proben festgestellt. In keiner Probe wurde eine Höchstmengenüberschreitung von Carbendazim oder Thiabendazol festgestellt, es wurden lediglich in 38 % der Proben geringe Carbendazimrückstände und in 60 % der Proben Thiabendazol nachgewiesen [62].

Im zweiten Untersuchungszeitraum wurden Obst und Gemüse mit überkritischen Kohlendioxid extrahiert. Es wurde auf Carbendazim, Benomyl, Thiophanat-Methyl und 2,4-D untersucht. Bei Steinobst, Mango, Champignons, Zitrusfrüchten und Erdbeeren wurden in 40 bis 50 % der untersuchten Proben Carbendazimrückstände nachgewiesen. Bei Salat, Mango, Papaya und Steinobst wurden Höchstmengenüberschreitungen festgestellt. [75]

Aufgrund der relevanten Höchstmengen für Zitrusfrüchte, Kernobst und Beerenfrüchte und des häufigen Nachweises von Carbendazim und Thiabendazol auf ihnen sollen vor allem diese Lebensmittel untersucht werden.

2.3 Probenvorbereitung

Hauptinhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel sind neben 80 bis 90 % Wasser Proteine, Fettund Fettbegleitstoffe, Kohlenhydrate und Salze. In Tabelle 2-7 sind stellvertretend für pflanzliche Lebensmittel die Hauptinhaltsstoffe von Äpfeln [108] aufgeführt.

Inhaltsstoff	Mittelwert	Variation
Wasser	85,30	80,40 - 90,00
Proteine	0,34	0,20 - 0,45
Fett- und Fettbegleitstoffe	0,58	-
lösliche Kohlenhydrate	11,43	
unlösliche Kohlenhydrate	2,02	
Salze	0,32	0,26 - 0,36

Tabelle 2-7:Hauptinhaltsstoffe von Äpfeln (in %)

Diese Matrixinhaltsstoffe haben sehr unterschiedliche chemo-physikalische Eigenschaften. Einerseits liegen wasserlösliche Inhaltsstoffe wie Salze und (ein Teil der) Kohlenhydrate und Proteine vor. Es gibt Bestandteile, die in Wasser und organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich sind wie Oligosaccharide und ein Teil der Proteine. Andererseits sind die Fett- und Fettbegleitstoffe gut in unpolaren Lösungsmitteln löslich.

Aufgabe des Analytikers ist es, diese sehr unterschiedlichen Matrixinhaltstoffe möglichst vollständig und ohne Verluste der Pflanzenschutzmittel vor der Endpunktbestimmung durch Extraktion und Aufreinigung der Extrakte (Clean-up) abzutrennen. Dabei kann das unterschiedliche Lösungsverhalten der Lebensmittelinhaltsstoffe ausgenutzt werden.

Am Beispiel der weitverbreiteten DFG-Methode S19 [1] kann eine prinzipielle Probenvorbereitung veranschaulicht werden.

Im ersten Schritt wird das pflanzliche Lebensmittel zerkleinert und mit Aceton extrahiert.

Das Aceton / Wasser-Verhältnis wird auf zwei zu eins eingestellt. Die Standardisierung der Extraktionsbedingungen erfolgt, um reproduzierbare Wiederfindungsraten für die Pestizide unabhängig vom Wassergehalt des zu untersuchenden Lebensmittels zu erhalten. Aceton dient hier als Lösungsvermittler; aufgrund des osmotischen Drucks werden die Pflanzenzellen aufgebrochen und die in den Zellen möglicherweise enthaltenden Pestizide werden so der Extraktion zugänglich.

Das so aufgeschlossene Pflanzenmaterial wird mit einer Filtrierhilfe (Celite) filtriert (verbesserte Porenbildung). Die im Aceton / Wasser-Gemisch unlöslichen Bestandteile wie Hemicellulosen, Cellulosen, Oligosaccharide, einige Proteine und andere Zellwandbestandteile werden abgetrennt.

Nach Zugabe von Natriumchlorid trennt sich das Aceton / Wasser-Gemisch aufgrund des sogenannten "Aussalzeffektes" in zwei Phasen. Die Mehrheit der Pestizide wird in die organische Phase überführt. Das anschließende Einengen der organischen Phase könnte zu einer azeotropen Dampfdestillation und damit zum Verlust der Pestizide führen, da die Acetonphase noch einen großen Anteil des Wassers enthält.

Aus diesem Grund erfolgt eine zusätzliche Flüssig / Flüssig-Extraktion (vergleiche Abschnitt 2.3.1) mit Dichlormethan oder einem Ethylacetat / Cylcohexan-Gemisch. Diese Lösungsmittel können wesentlich weniger Wasser als Aceton lösen. Deshalb entsteht eine wässrige Phase, die die wässrige Natriumchloridlösung und ein Teil des Acetons enthält. Die organische Phase enthält jetzt neben Aceton das Dichlormethan oder das Ethylacetat / Cylcohexan-Gemisch. Die sehr stark polaren Pflanzeninhaltsstoffe wie Proteine, Mono- und Disaccaride und Salze befinden sich in der wässrigen Phase. Hauptsächlich die Fette und Fettbegleitstoffe und die mittelpolaren bis unpolaren Pestizide verbleiben in der organischen Phase (vergleiche Abschnitt 1). Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt.

Zur Abtrennung der Fette und Fettbegleitstoffe ist ein weiteres Clean-up notwendig. In Abschnitt 2.3.3 wird die hier zu eingesetzte Gelpermeationschromatographie (GPC) näher beschrieben. Sie dient zur Abtrennung der höhermolekularen Probeninhaltsstoffe wie den Fetten von den niedermolekularen Pestiziden.

Abschließend findet eine Festphasenextraktion an einer Normalphase (Kieselgel) statt (Abschnitt 2.3.2). Sie dient zur Fraktionierung nach Polarität in bis zu 6 Fraktionen und einer weiteren Aufreinigung der Extrakte.

2.3.1 Flüssig / Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, liquid liquid extraction) ist ein Trennprozess, der auf der unterschiedlichen Verteilung des Analyten in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, einer wässerigen und einer organischen, basiert. Er hängt vom Stoffübergang des zu extrahierenden Bestandteils von der ersten Phase in die zweite Phase ab. Die Verteilung erfolgt dabei nach dem Nernstschen Verteilungssatz (Gleichung 2-1), der besagt, dass das Verhältnis der Konzentrationen des gelösten Stoffes in beiden Phasen konstant ist.

Die Konzentration des Analyten in der organischen Phase c₁ wird um so höher, je größer der Verteilungskoeffizient K ist. Für Analyten mit kleinen Verteilungskoeffizienten, die mittels eines Verteilungsschrittes nicht vollständig extrahiert werden, lässt sich die Extraktionsausbeute durch mehrfache Extraktion steigern (multiplikative Verteilung). Der Verteilungskoeffizient K kann durch Einstellung eines bestimmten pH-Wertes und einer bestimmten Ionenstärke beeinflusst werden.

$K = \frac{C_1}{C_1}$	c _{1/2}	- Konzentration des Analyten in Phase 1 bzw. Phase 2
\mathbf{C}_2	Κ	- Nernstscher Verteilungskoeffizient

Gleichung 2-1: Nernstscher Verteilungssatz

2.3.2 <u>Prinzip der Festphasenextraktion (SPE)</u>

Die Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) ist eine der leistungsfähigsten Techniken für die schnelle und selektive Probenvorbereitung. Die Vielseitigkeit der Festphasenextraktion erlaubt den Einsatz dieser Technik zur Aufreinigung, Anreicherung, Vorfraktionierung sowie zum Wechsel des Lösungsmittels, Entsalzen und Derivatisieren der Probe.

Die Festphasenextraktion ist eine Aufarbeitungstechnik für flüssige Proben. Feste Proben müssen daher aufgelöst oder extrahiert, homogenisiert und filtriert werden. Dabei muss das gewählte Lösungsmittel die Analyten aus der Probe herauslösen. Des weiteren muss die Probe gegebenenfalls zur Herabsetzung der Viskosität verdünnt und durch Zugabe eines Puffers der pH-Wert eingestellt werden.

Das Grundprinzip der Festphasenextraktion kann in Analogie zur Flüssig / Flüssig-Extraktion gesehen werden. Die in der "mobilen Phase" gelösten Analyten treten bei der Festphasenextraktion in reversible physikalische Wechselwirkung mit dem Festphasenmaterial (Sorbens / stationäre Phase) und werden auf diesem angereichert. Die Matrix sollte idealerweise keine Wechselwirkungen mit dem Sorbens zeigen. Die Wechselwirkungen der Analyten, die apolarer (Van-der-Waals-Kräfte), polarer (Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Kräfte) oder ionischer Natur (elektrostatische Kräfte) sein können, sollten reversibel sein, damit die Analyten mit einem geeigneten Lösungsmittel wieder eluiert (desorbiert) werden können. Da die verwendeten Sorbentien sehr unterschiedlicher Natur sind, erlauben sie eine selektive Anreicherung der Analyten. Es gibt unpolare wie die C2- bis C18- (Ethyl- bis n-Octadecyl-) Materialien, die polaren Cyanopropyl-, Diol- und Silica-Phasen und Sorbentien, die Ionenaustauscherfunktionen besitzen wie z. B. die SCX-(Benzylsulfonsäure), und PRS (Propylsulfonsäure)-Materialien. Die Aminopropyl-Phasen haben sowohl unpolare als auch Ionenaustauscher-Eigenschaften. Eine ausführliche Aufzählung der Sorbentien beinhaltet Tabelle 2-8.

Unpolar	Polar	Ionenaustauscher
C-18	Cyanopropyl- (CN)	Carbonsäure
C-8	Diol-	Propylsulfonsäure
C-2	Silicagel	Benzylsulfonsäure
Phenyl-	Aminopropyl-	Diethylaminopropyl-
Cyclohexyl-	Propyl-	quartäre oder sekundäre Amine

Tabelle 2-8:Sorbentien in der Festphasenextraktion

Die Auswahl der stationären Phase ist von den Eigenschaften der Analyten und der Probenmatrix inklusive der mobilen Phase (wässriges oder organisches Lösungsmittel), dem notwendigen Grad der Aufreinigung und der Art der anschließenden Analyse abhängig.

In Tabelle 2-9 sind die Vor- und Nachteile der Festphasenextraktion gegenüber der Flüssig / Flüssig-Extraktion aufgezählt. Sie ist im allgemeinen selektiver und hat dadurch eine bessere Reinigungswirkung. Der Lösungsmittelverbrauch ist erheblich reduziert und durch eine gute Automatisierbarkeit der SPE wird Geld und Zeit gespart.

Tabelle 2-9:Vorteile und Nachteile der Festphasenextraktion gegenüber derFlüssig / Flüssig-Extraktion

Vorteile	Nachteile	
selektive Anreicherung	leicht verstopfte Poren bei matrixreichen Proben	
hohe Aufreinigung		
leichte Automatisierbarkeit / Zeitersparnis	Kapazität der Säulen ist von der Matrix abhängig	
Reduktion des Lösungsmittelverbrauches		
keine Emulsionsbildungen	Verluste durch irreversible Adsorption	

Der wesentliche Nachteil der SPE ist, dass bei einer hohen Matrixbelastung die Kapazität der Säule schnell erschöpft ist und außerdem die Poren der Fritten sehr schnell verstopfen. Dadurch ist eine reproduzierbare Aufarbeitung nicht möglich. Deshalb ist es wichtig, bei einer Methodenentwicklung die Matrixmenge der SPE-Analytik anzupassen.

In der Rückstandsanalytik von Pestiziden ist die Festphasenextraktion schon häufig eingesetzt worden. Die Festphasenextraktion wird bei den in dieser Arbeit betrachteten Pestiziden als Extraktionsschritt in der Wasseranalytik [53-55, 67, 70-72] und als Clean-up-Schritt in der Pestizidanalytik von pflanzlichen Lebensmitteln angewendet [21-23, 40, 61, 65, 66, 68, 73, 84-87].

Neben der SPE an einer Normalphase, wie sie bei der DFG-Methode S19 angewandt wird (siehe Abschnitt 2.3), wird immer häufiger auch bei pflanzlichen Lebensmitteln die SPE an Umkehrphasen eingesetzt.

Eine gute Zusammenfassung über das Gebiet der Festphasenextraktion geben der 1999 erschienene Review und das Sonderheft des Journal of Chromatography A [109, 110].

2.3.3 <u>Gelpermeationschromatographie (GPC)</u>

2.3.3.1 Prinzip der Gelpermeationschromatographie

Seit ihrer Einführung im Jahre 1959 durch Porath ist die Technik des Größenausschlusses von Molekülen unter anderem als Gelfiltration, Gelpermeationschromatographie, Molekularsieb-filtration, Molekularsiebchromatographie, Ausschlusschromatographie, Größenausschluss-chromatographie und ihren englischen Entsprechungen beschrieben worden [111].

Die GPC ist seit Jahrzehnten in der Polymeranalytik zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung sowie zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren ein weit verbreitetes analytisches und präparatives Chromatographieverfahren [112].

Der Trennmechanismus der Gelpermeationschromatographie basiert im Gegensatz zur Wechselwirkungschromatographie nicht auf enthalpischen, sondern auf entropischen Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und gelöstem Molekül. Trennkriterium für die GPC ist das hydrodynamische Volumen, d. h., die effektive Molekülgröße der in Lösung befindlichen Moleküle. Dabei werden Moleküle mit großem hydrodynamischen Volumen früher eluiert als solche mit kleinem hydrodynamischen Volumen. Die Molekülgröße bei der keine Retention beobachtet wird, wird als Ausschlussgrenze bezeichnet.

Da bei Homopolymeren das hydrodynamische Volumen gut mit dem Molekulargewicht korreliert, ist eine Kalibrierung der GPC möglich. Eine Kalibrierung der GPC mit molekulargewichtsbekannten Polymerstandards ermöglicht die Bestimmung von Molekulargewichten und deren Verteilung durch Registrierung des eluierten Konzentrationsprofils. Gültig ist eine Kalibrierung jedoch nur für ein ausgewähltes Homopolymeres, da chemisch unterschiedliche Homopolymere bei gleichem Molekulargewicht nicht das gleiche hydrodynamische Volumen besitzen müssen. Noch komplizierter ist die Situation für Copolymere, die eine chemische und eine Kettenlängenungleichheit aufweisen. Für diese Systeme lässt sich das hydrodynamische Volumen nicht ohne weiteres mit dem Molekulargewicht korrelieren [113]. Ähnlich verhält es sich bei Pestiziden. Zudem retardieren einige Pestizide so stark und unreproduzierbar am Gel, dass bei der Rückstandsanalytik dieser Pestizide die GPC als Clean-up-Schritt nicht eingesetzt werden kann [z. B. 62].

Wichtige Parameter in der GPC sind die stationäre und mobile Phase, aber auch das Volumen der GPC-Säule. Die Trennung ist unabhängig von der Menge der injizierten Probe, der Elutionsgeschwindigkeit und der Temperatur.

Trägermaterialien in der GPC sind hydrophile und lipophile Gele unterschiedlichster Struktur und Matrix, die zur Trennung wasserlöslicher und wasserunlöslicher Komponenten eingesetzt werden.

2.3.3.2 Auswahl des Eluenten für nicht-wässrige GPC-Säulen

Die Wahl der mobilen Phase richtet sich nach der Art der stationären Phase. Zur GPC-HPLC-Kopplung mit der AMD-TLC standen analytische GPC-Säulen der Firma Phenomenex zur Verfügung, deren Matrix aus Polystyroldivinylbenzol mit einer Porengröße von 50 und 100 Å besteht. Phenomenex-GPC-Säulen können nach Angabe des Herstellers theoretisch mit unterschiedlichsten Lösungsmitteln (mobile Phase) betrieben werden. Bei der Auswahl der mobilen Phase war zu beachten, dass diese Säulen **kein** Wasser vertragen und dass die einzelnen Lösungsmittel ein unterschiedliches Quellvermögen besitzen und damit unterschiedliche Drücke in der Säule verursachen. In Tabelle 2-10 sind wichtige Eigenschaften der für die Untersuchung ausgewählten Lösungsmittel zusammengestellt.

Tabelle 2-10: Ausgewählte Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel

^[114]

Lösungsmittel	Viskosität	Quellfaktor	UV Cut-Off	Siedepunkt	Wasserlöslichkeit
Tetrahydrofuran	0,55 cPoise	70 - 80 %	230 nm	66 °C	100 %
Ethylacetat / Cyclo- hexan (50 + 50)	0,45 / 1,00 cPoise	60 / 30 %	255 / 210 nm	77 / 81 °C	8,7 / 0,01 %
Methanol	0,60 cPoise	30 %	205 nm	65 °C	100 %

Da die GPC-Säulen sehr druckempfindlich sind, sollten sie mit einem Lösungsmittel mit einem hohen Quellfaktor gefüllt werden, um bei Bedarf auf ein Lösungsmittel mit niedrigerem Quellfaktor wechseln zu können.^a Außerdem war zu beachten, dass der Quellfaktor und die Viskosität der mobilen Phase die Größe der Poren und damit die Chromatographie beeinflusst [115].

Tetrahydrofuran wurde als Lösungsmittel für die analytische GPC ausgewählt, weil es ein Standardlösungsmittel für die präparative GPC ist und dadurch vielseitige Erfahrungen des Herstellers im Umgang mit den Säulen bestehen. Nachteilig ist, dass Tetrahydrofuran unbegrenzt mit Wasser mischbar ist und es dadurch zu Schädigungen der Säule kommen kann. Außerdem sind die Tetrahydrofurandämpfe, die beim Auftragen des GPC-Eluates auf die HPTLC-Platten entstehen, gesundheitsschädlich, leichtentzündlich (Explosionsgefahr im Labor!), und sie stellen eine starke Geruchsbelästigung dar. Da die GPC-Säulen mit verschiedenen Lösungsmitteln betrieben werden sollte, wurde als Erstlösungsmittel Tetrahydrofuran auf Grund seines sehr hohen Quellfaktors (70-80%) gewählt.

Ein Ethylacetat / Cylcohexan-Gemisch (50 + 50 / v + v) wurde ebenfalls als Lösungsmittel für die analytische GPC ausgewählt, weil hier sehr große Erfahrungen mit der präparativen GPC durch die S19-Methode [1] bestehen und das Lösungsmittel-Gemisch als quasi universelles Lösungsmittel für Pestizide dienen kann. Außerdem ist dieses Gemisch praktisch nicht mit Wasser mischbar und seine Dämpfe sind nicht gesundheitsschädlich. Allerdings bestehen keine Erfahrungen mit dem Lösungsmittel-Gemisch als mobile Phase in der analytischen GPC und das Gemisch ist leicht entzündlich.

Eine weitere mögliche mobile Phase, das Methanol als Vertreter der Alkohole, wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen. Es überwiegen die negativen Eigenschaften des Methanols (unbegrenzt mit Wasser mischbar, leichtentzündlich und giftig), obwohl Methanol als Lösungsmittel für polare Pestizide sehr gut geeignet wäre und einen ausgezeichneten Cut-Off besitzt (hohe Empfindlichkeit der UV-Detektion). Die Eigenschaften des Methanols sind ebenfalls in Tabelle 2-10 beschrieben.

^a Die stationäre Phase wird vor dem Befüllen der Säule im Lösungsmittel dispergiert und quillt dabei. Wird eine Säule mit einem Lösungsmittel mit niedrigem Quellfaktor equilibriert und danach die Säule mit einem Lösungsmittel mit hohem Quellfaktor gespült, würde die stationäre Phase nachträglich quellen. Das Säulenmaterial hätte nicht mehr genug Platz in der Säule und die Gelstruktur würde kollabieren.

2.3.3.3 Anwendung der GPC in der Pestizidanalytik

In der Pestizidanalytik wird die GPC häufig als sehr effektiver Clean-up-Schritt verwendet. Erstmalig setzten Specht und Tillkes 1979 [116] eine mit Bio Beads S-X3 gefüllte Säule zur präparativen Trennung der höhermolekularen Fette und Wachse von den niedrigmolekularen Stoffen ein. Diese Analysenvorschrift für über 70 Wirkstoffe wurde in die DFG-Methoden-sammlung als "Methode S19" aufgenommen [1]. Als mobile Phase dient hier ein Ethylacetat / Cylcohexan-Gemisch. Möglich ist aber auch die Verwendung von reinem Ethylacetat wie bei Roos et al. [117] beschrieben. Diese Clean-up-Technik wurde durch Automatisierung optimiert [25, 118] und konnte auf über 400 Stoffe (Wirkstoffe, Abbauprodukte, Metaboliten und Umweltprodukte) aus unterschiedlichen Verbindungsklassen ausgedehnt werden [25].

2.4 Derivatisierung

2.4.1 <u>Prinzipien der Derivatisierung</u>

In der instrumentellen Analytik gibt es die Möglichkeit einer spezifischen, chemischen Derivatisierung der interessierenden organischen Stoffe. Mitunter werden über eine Derivatisierung die Zielanalyten erst detektierbar (z. B. bei farblosen UV-inaktiven Stoffen).

Für dünnschichtchromatographische Screeningverfahren ist die Derivatisierung azider Protonen weit verbreitet, insbesondere für Carbonsäuren [119], aber auch für Hydroxy- oder Aminogruppen [120]. Im Gegensatz zu in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Derivatisierungen vor einer gaschromatographischen Trennung, bei der die Analyten oftmals erst für die GC zugänglich gemacht werden, dient die Derivatisierung in der HPLC und der Dünnschichtchromatographie neben einer möglichen Verbesserung der chromatographischen Trennung in der Hauptsache der selektiven Detektion von Verbindungsklassen.

Prinzipiell können hierbei zwei Arten von Derivatisierungen unterschieden werden: Reaktionen, die <u>vor</u> dem eigentlichen chromatographischen Prozess stattfinden und Derivatisierungen <u>nach</u> Trennung der Analyten vor der Detektion oder nach Remissionsspektroskopie [121]. Vor- und Nachteile dieser Methoden sind in Tabelle 2-11 dargestellt.

Tabelle 2-11:Vor- und Nachteile einer prä- bzw. postchromatographischen Derivatisierung in der TLC

prächromatographische Derivatisierung	postchromatographische Derivatisierung
überschüssiges Reagenz kann entfernt wer- den, sauberer Untergrund	überschüssiges Reagenz kann durch Eigenab- sorption stören
genaue Kontrolle der Reaktionsbedingungen möglich	automatisiertes Tauchen für homogenen Un- tergrund notwendig
hoher Zeitaufwand durch Umsetzung jeder einzelnen Probe	Umsetzung getrennter Proben erfolgt gleich- zeitig
Veränderung der chromatographischen Eigenschaften	Trennung der Analyten wird nicht beeinflusst
	Detektion vor und nach der Derivatisierung möglich
	Diffusion durch wasserhaltige Reagenzlösung

Ein wesentlicher Vorteil der postchromatographischen Derivatisierung gegenüber der prächromatographischen Derivatisierung ist, dass UV-aktive Substanzen auch vor der Derivatisierung detektiert werden können. Dadurch kommt es zu einem Informationszuwachs, da zur Identifizierung der Analyten nun Laufstrecke, UV-Spektrum des Analyten vor der Derivatisierung und UV-VIS-Spektrum des Derivats herangezogen werden können.

Während in der HPLC und der TLC eine prä- und auch eine postchromatographische Derivatisierung möglich ist, wird in der GC fast ausschließlich vor der Chromatographie derivatisiert.

Eine Derivatisierung, die für die Rückstandsanalytik geeignet sein soll, muss folgende Bedingungen erfüllen:

- Die chemische Reaktion muss reproduzierbar verlaufen.
- Die verwendete Reagenzmenge muss für einen größeren Konzentrationsbereich des Wirkstoffs geeignet sein, da die vorliegende Rückstandsmenge unbekannt ist.
- Aus einem Wirkstoff oder einem Spaltprodukt sollte nur ein einziges, chemisch definiertes Derivat entstehen.
- Das Derivat soll möglichst in hoher, am besten quantitativer Ausbeute gebildet werden.
- Der Überschuss an Derivatisierungsreagenz muss sich relativ leicht entfernen lassen.
- Begleitstoffe aus dem Probenmaterial dürfen den Verlauf der Reaktion nicht beeinträchtigen (Matrixeffekte).
- Begleitstoffe, die ebenfalls derivatisiert werden, dürfen später im Chromatogramm nicht stören.

2.4.2 Derivatisierung in der Gaschromatographie

Über die Grundlagen und Anwendungen der Derivatisierung in der GC sind zahlreiche Bücher und Übersichtsartikel erschienen [122, 123], ihre Aufzählung und nähere Beschreibung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Im folgenden soll nur auf die Prinzipien der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Derivatisierungsmethoden eingegangen werden. Zu den gebräuchlichen Derivatisierungsverfahren für die GC zählt neben der Acylierung, Silylierung und Veresterung die hier angewandete Alkylierung, die mit unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt werden kann [123].

Benzoylharnstoffe

Für die Gruppe, der unter Abschnitt 2.1.2 vorgestellten Benzoylharnstoffe, sollte die Gaschromatographie nach Methylierung als Alternativmethode zur AMD/TLC untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob die thermolabilen Benzoylharnstoffe ohne Zerfall methyliert und mit einer hohen Empfindlichkeit mittels GC / MS detektiert werden können. Dabei sollte die Derivatisierung ohne erhöhten analytischen Aufwand durchzuführen sein, deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Methylierung mit Trimethylsulfonium-hydroxid (TMSH), eine pyrolytische Methylierung, ausgewählt.

Bisher wurde Trimethylsulfoniumhydroxid in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln bei der Analyse von Phenoxycarbonsäuren eingesetzt [124]. Die Derivatisierung von basischen Analyten wurde von Amijee et al. [125] beispielhaft an den Benzimidazolen Albendazol und Oxibendazol und den Sulfonamiden Sulfamethiazol und Sulfadimidin durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass bei multifunktionalen Substanzen die Derivatisierung wenig selektiv ist und mehrere Reaktionsprodukte, die Mono- bis Trimethyl-Derivate entstehen.

Ein wichtiger Vorteil dieser Methylierung ist ihre einfache Durchführung. Erfolgt in der Regel die Derivatisierung vor der GC-Analyse in einem separaten Arbeitsgang (Offline) findet sie hier Online im Injektorsystem statt. Vor der Gaschromatographie wird lediglich zur Proben- oder Standardlösung das Reagenz zugegeben. Damit entfallen Verluste durch Reinigungs- und Konzentrierungsschritte.

Das Prinzip der pyrolytischen Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Die Derivatisierung erfolgt zweistufig. In einem ersten Schritt werden schon bei Raumtemperatur die Amide durch das im hohen Überschuss eingesetzte TMSH deprotoniert und unter Wasserabspaltung das Trimethylsulfoniumsalz gebildet. Die eigentliche Derivatisierungsreaktion ist die Pyrolyse des Trimethylsulfoniumsalzes im heißen Injektorsystem des GC. Dabei entstehen die Methylderivate und Dimethylsulfid. Aus dem Reagenzüberschuss wird bei der Pyrolyse als weiteres Nebenprodukt Methanol gebildet.

Abbildung 2-10: Reaktion von Trimethylsulfoniumhydroxid mit Aminen
Basische Pestizide

Für die Gruppe, der unter Abschnitt 2.1.3.1 vorgestellten Benzimidazole sollte die Gaschromatographie nach Pentafluorbenzylierung, ebenfalls eine Alkylierung, als Alternativmethode zur AMD / TLC untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob Vertreter der thermolabilen Methyl-Carbamate parallel derivatisiert und mit einer hohen Empfindlichkeit mittels GC / MS detektiert werden können.

Die Pentafluorbenzylierung von Carbendazim in Getreide und Erde ist in der DFG-Methode 378 [4] beschrieben und wurde von Anastassiades zur Untersuchung von Carbendazim- und Thiabendazol-Rückständen in Zitronen und anderen pflanzlichen Lebensmitteln angewandt [62, 75].

Einer der Vorteile des Derivatisierungsreagenzes Pentafluorbenzylbromid (PFB-Br) besteht darin, dass dessen chemische Reaktion nur die einfache Substitution eines aciden Wasserstoffprotons am Zielmolekül erfordert.

Als Beispiel wurde das Reaktionsschema der Derivatisierung von Carbendazim mittels PFB-Br in Abbildung 2-11 dargestellt. Die Pentafluorbenzylierung erfolgt im basischen Medium in der Hitze. Interessant ist das bei der Elektronenstoß-Ionisierung im Massenspektrometer entstehende derivat-typische Fragment m/z 181. Es kann bei der massenspektrometrischen Bestimmung als "Übersichts-Ion" zur Erkennung aller Substanzen benutzt werden, die mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert wurden [126].



Abbildung 2-11: Derivatisierungsschema der Carbendazim mit PFB-Br

2.4.3 Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie

Für die Gruppe, der in Abschnitt 2.1.2 vorgestellten Benzoylharnstoffe, sollte untersucht werden, ob durch postchromatographische Derivatisierung die Detektion der Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln und die Empfindlichkeit der Detektion nach einer Farbreaktion verbessert werden kann.

Es werden drei Farbreagenzien Chlor / Kaliumiodid / Stärke, Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid und Chlor / o-Toluidin zum Nachweis von Verbindungen, die sich in Chloramine überführen lassen, beschrieben. In Tabelle 2-12 sind die Nachweisgrenzen für Triazine dargestellt [127].

In der Arbeit soll die empfindlichste und robusteste Methode des Farbnachweises für Benzoylharnstoffe gefunden werden. Diese Methode soll zur Absicherung von positiven Befunden von Benzoylharnstoffen nach dünnschichtchromatographischer Trennung dienen.

Tabelle 2-12:Nachweisgrenzen für Triazine

Reagenz	Nachweisgrenzen für Triazine
Chlor / Kaliumiodid / Stärke	10 - 20 ng
Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid	12 - 100 ng
Chlor / o-Toluidin	300 ng

Das Prinzip der Farbdetektion ist in Abbildung 2-12 am Beispiel des Chlor/o-Tolidin/Kaliumiodid dargestellt.



Abbildung 2-12: Prinzip der postchromatographischen Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid-Reagenz

Durch Einwirkung von Chlorgas entstehen z. B. aus Herbiziden, Aminosäuren, Peptiden und Proteinen Chloraminderivate. Deren aktives Chlor oxidiert o-Tolidin oder o-Toluidin in Gegenwart von Essigsäure und Kaliumiodid zu einem tiefblauen Farbstoff, dem Diphenochinondiimin-Radikal, das semichinoiden Charakter aufweist. Möglicherweise setzt das aktive Chlor aus Kaliumiodid zusätzlich Iod frei, das mit dem semichinoiden Reaktionsprodukt unter Farbvertiefung zur Komplexbildung befähigt ist.

2.5 Angewandte chromatographische Bestimmungsverfahren

2.5.1 <u>Dünnschichtchromatographie (TLC)</u>

2.5.1.1 Prinzip der Dünnschichtchromatographie

Die TLC ist ein einfach durchzuführendes Verfahren, mit dem rasche Übersichtsanalysen (screening) durchgeführt werden können. Neben der HPLC ist sie ein wichtiges Verfahren, polare und thermolabile Komponenten zu analysieren.

Grundlage der TLC (Thin Layer Chromatography - Dünnschicht-Chromatographie DC) und der HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography - Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie) ist wie bei allen chromatographischen Verfahren ein mehrstufiger Verteilungsprozess.

An diesem Prozess sind ein geeignetes Sorptionsmittel (die stationäre Phase), ein Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische (die mobile Phase, in der TLC/HPTLC häufig auch Fließmittel genannt), die Kammeratmosphäre und die Probenmoleküle beteiligt. Dabei wird das Sorbens als dünne Schicht auf einen geeigneten Träger wie eine Glasplatte oder eine Polyester- bzw. einer Aluminiumfolie aufgebracht. An dieser Schicht wird das Substanzgemisch durch Elution mit einem Fließmittel getrennt.

Die Kammeratmosphäre konditioniert^a die stationäre Phase. Die Dünnschichtchromatographie ist in einer ungesättigten oder einer gesättigten Atmosphäre möglich. Bei der ungesättigten Kammer wird sowohl aus dem Fließmittelvorrat als auch von der TLC-Platte Fließmittel abgedampft, bis die Kammer gesättigt ist. Dadurch bildet sich bei Fließmittelgemischen ein Fließmittelprofil heraus, da die Fließmittelkomponente, die eine geringere Wechselwirkung mit der stationären Phase hat, beim Einströmen in die trockene Schicht besser abdampfen kann als die Komponente, die eine größere Wechselwirkung mit der stationären Phase hat. Bei nicht optimalen Bedingungen der Kammersättigung kann es zu einer Verzerrung der äußeren Trennspuren kommen, die durch einen verstärkten Fließmittelaustausch der Schichtränder mit der Kammeratmosphäre hervorgerufen werden.

^a Die Konditionierung der TLC-Platte ist die Gleichgewichtseinstellung einer bestimmten Feuchte, eines pH-Wertes oder eines beliebigen Lösungsmittels zwischen stationärer Phase und der Kammeratmosphäre.

Vom Prinzip seit über 100 Jahren bekannt [128] gelang der TLC der eigentliche Durchbruch als analytische Methode erst vor etwa 35 Jahren. In diesem Zusammenhang sind in erster Linie die Arbeiten von Egon Stahl [129] zu nennen.

Bei der besonders häufig angewendeten Adsorptions-Chromatographie^a erfolgt die chromatographische Trennung in einem Fest-Flüssig-Phasensystem durch konkurrierende Wechselwirkung zwischen Adsorption an der Sorbensoberfläche und Lösen in der sich vorwärts bewegenden mobilen Phase. Das Ergebnis der Chromatographie ist eine Auftrennung des Substanzgemisches nach Polaritätsgruppen der Einzelverbindungen.

Beispielweise liegen auf Kieselgel- oder Aluminiumoxid-Schichten (stationäre Phase) und Dichlormethan als Fließmittel (mobile Phase) Ether und Ester im oberen Teil, Ketone und Aldehyde etwa in der Mitte, die Alkohole darunter und die Säuren am Start des Chromatogrammes [130].

Sollen zwei Substanzen chromatographisch getrennt werden, so muss das Trennphasensystem einen Retentionsunterschied für beide Substanzen hervorbringen; das heißt, es muß eine Selektivität besitzen. So werden z. B. Phenole an Polyamiden getrennt, weil die Säureamid-Gruppierungen des Polyamids als molekulare Sensoren, die zur "Wasserstoffbrückenbindung" befähigt sind, dienen. Die Selektivität ist zwar eine notwendige, aber noch nicht ausreichende Trennbedingung. Die "makroskopische" Trennung wird erst dadurch erreicht, dass sich die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen den Trennphasen unter dem Zwang der mobilen Phase vieltausendfach wiederholt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die <u>Selektivität</u> des TLC-Systems abhängig von der Auflösung ist und die <u>Trennleistung</u> des TLC-Systems abhängig von der theoretischen Bodenzahl ist.

Besonders vorteilhaft ist bei der Dünnschichtchromatographie ihr geringer apparativer Aufwand und die Möglichkeit der Parallelentwicklung von bis zu dreißig Standardsubstanzen und Proben bei qualitativer Bestimmung, während bei quantitativer Bestimmung maximal achtzehn Bahnen auf einer 20 cm breiten DC-Platte aufgetragen werden können. Durch die Entwicklung der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie am Anfang der siebziger Jahre wurde die Reproduzierbarkeit wesentlich verbessert, so dass heute ein preisgünstiges und reproduzierbares chromatographisches System zur Verfügung steht.

^a 90 % der dünnschichtchromatographischen Trennungen werden an Kieselgel einer Normalphase ausgeführt [121].

2.5.1.2 Trennleistung in der TLC-Analyse

Die Trennleistung des TLC-Systems ist von der Zonenverbreiterung abhängig, die der aufgetragene Substanzfleck entlang der chromatographischen Trennstrecke erfährt. Eine Maßzahl für die Trennleistung ist z. B. die theoretische Bodenzahl N. Je größer die Bodenzahl ist, desto höher ist die Trennleistung (Trennleistung HPTLC > Trennleistung TLC).

$N = 16 (X / W)^2$	mit	X = Abstand eines Substanzfleckes vom Ursprung und W = Fleckdurchmesser
Gleichung 2-2:		Berechnung der theoretischen Bodenzahl N

Auch in der Dünnschichtchromatographie lässt sich die theoretische Bodenzahl N berechnen. Für eine Laufstrecke von 10 cm erreicht die Bodenzahl N bei HPTLC-Platten Werte bis zu 5000. Das entspricht dem N-Wert einer gepackten GC-Säule von 2 m Länge. Eine HPLC-Säule mit 4,6 mm Durchmesser und 25 cm Länge erreicht 10.000 bis 15.000 theoretische Böden.

In der HPTLC können maximal 25 Substanzen, in der HPLC können dagegen 40 Substanzen getrennt werden. Der geringeren Trennleistung steht aber ein wesentlicher Vorteil gegenüber. In der Dünnschichtchromatographie müssen nur die interessierenden Analyten im chromatographischen System wandern, d. h., die Matrix kann am Startfleck liegen bleiben, weil das dünnschichtchromatographische System nur einmal verwendet wird. Im Gegensatz dazu muss in der GC oder HPLC die Matrix die Säule wieder verlassen, um eine Verschmutzung der Säule zu vermeiden.

2.5.1.3 Prinzip der AMD-Technik

Die automatische Mehrfachentwicklung (Automated Multiple Development, AMD) von Hochleistungsdünnschichtplatten (HPTLC-Platten) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Dünnschichtchromatographie. Sie wurde von Burger 1984 eingeführt [131].

Die AMD ist die einzige Methode, mit der eine reproduzierbare Gradientenelution an Kieselgel (Normalphase) möglich ist. Das Prinzip der AMD ist in Abbildung 2-13 dargestellt.

Üblicherweise wird die Platte hintereinander zehn- bis vierzigmal entwickelt, wobei die Entwicklungsstrecke bei jedem Lauf um 1-3 mm zunimmt. Der erste Entwicklungsschritt beträgt nur wenige Millimeter. Neben der Verwendung von HPTLC-Platten ist besonders der Fokussierungseffekt für die außerordentliche Trennschärfe der AMD-Technik verantwortlich. Bei jedem Entwicklungsschritt wird die Unterkante des Probenspots mit Lösungsmittel überstrichen, während die Oberkante des Probenspots noch auf der trockenen Platte liegt, d. h., die Laufstrecke der Unterkante ist größer als die Laufstrecke der Oberkante des Spots. Dies führt zu einer starken Fokussierung des Probenspots. Da bei jedem neuen Lauf die Analyten auf der Platte erneut fokussiert werden, ergeben sich trotz der langen Laufstrecke sehr scharfe Banden. Die Gesamtstrecke der Lösungsmittelfront liegt für die Summe der Einzelläufe im Meterbereich, ohne dass die Diffusion zunimmt. Daneben erlaubt der Fokussierungseffekt auch die Auftragung großer Probenmengen, da die anfangs breite Startbande nach wenigen Entwicklungsschritten wieder zu einem schmalen Band fokussiert wird.



Abbildung 2-13: Prinzip der AMD-Entwicklung

Bei jedem Entwicklungsschritt werden die Laufstrecken um einen bestimmten Beitrag erhöht. Dabei erfolgt bei jedem Entwicklungsschritt eine Fokussierung der Banden.

Der in Abbildung 2-14 dargestellte vollautomatische Entwicklungsprozess beginnt mit der Evakuierung der Entwicklungskammer und der darauffolgenden Konditionierung^a der TLC-Platte.

Anschließend wird die Entwicklungskammer mit dem Eluenten befüllt und die Platte einige Millimeter entwickelt. Danach wird der Eluent abgesaugt und die Platte im Vakuum getrocknet. Nach der erneuten Konditionierung wird wieder Eluent in die Entwicklungskammer

^a Die Konditionierung kann in der AMD-Technik durch das sogenannte Vorkonditionieren über die Gasphase erreicht werden. Es können außer pH-Wert auch die Aktivität und Selektivität der Schicht beeinflusst werden. Die Gaswaschflasche wird mit unterschiedlichen Lösungen gefüllt, dadurch ist das Gas zum Belüften der Entwicklungskammer nach Durchströmen der Lösung mit ihr gesättigt. Bei leerer Gaswaschflasche wird die Aktivität der Schicht von den polareren Komponenten des Fließmittels bestimmt. Da das Fließmittel bei gegebenen Trocknungsbedingungen nicht vollständig aus der Schicht entfernt wird und die Wechselwirkungen zwischen stationären und mobiler Phase bei polaren Komponenten stärker als bei weniger polaren Komponenten sind, ist der Anteil der polareren Komponenten nach dem Trocknungsschritt auf der Platte größer als der Anteil der unpolareren Komponenten.

eingebracht und die Platte entwickelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die gewünschte Zahl an Entwicklungsschritten erreicht ist.

Um eine reproduzierbare Gradientenelution an Kieselgel zu ermöglichen, muss die Entwicklung mit einem absteigenden Polaritätsgradienten durchgeführt werden und die Platte nach der Trocknung mit dem zuletzt verwendeten Eluenten konditioniert werden. Bei Verwendung eines aufsteigenden Polaritätsgradienten würde in einem darauffolgenden Entwicklungsschritt der stärkere Eluent selektiv an der stationären Phase adsorbiert, was zu einer Entmischung des Eluenten und der Ausbildung von mehreren Lösungsmittelfronten führen würde [19]. Daher startet eine AMD-Entwicklung immer mit dem polarsten Lösungsmittel.



Abbildung 2-14: Schematischer Ablauf der Entwicklung einer HPTLC-Platte mittels AMD

Üblicherweise ist ein AMD-Gradient aus drei Grundlösungsmitteln aufgebaut; wie zum Beispiel in dem DIN-Gradienten: Acetonitril, Dichlormethan und n-Hexan [132]. Diese Komponenten werden nach ihrer Funktion als Verstärker, Basisfließmittel und Abschwächer im AMD-Gradienten bezeichnet. Das Basisfließmittel bestimmt die Selektivität des Gradienten, dass heißt, es bestimmt die Auflösung der Analyten. Der Verstärker und der Abschwächer dienen zur Polaritätsänderung des Gradienten. Durch den Verstärker wird der AMD-Gradient so polar, dass alle Analyten und die Matrix vollständig retardiert werden und damit eine ausgezeichnete Fokussierung zu Beginn der Chromatographie stattfindet. Neben den drei Grundlösungsmitteln zur Bildung eines Polaritätsgradienten können bei Vorliegen von sauren oder basischen Komponenten in der Probe geringe Mengen Säuren oder Basen zur Bildung eines pH-Gradienten zugesetzt werden. Üblicherweise werden Ameisensäure oder Ammoniak zugesetzt, da sie flüchtig sind und deshalb im Trocknungsschritt zum größten Teil von der TLC-Platte entfernt werden können. Zu beachten ist, dass bei der AMD auch Säuren im alkalischen Medium und Basen im sauren Medium chromatographiert werden können, wenn der Gradient so polar beginnt, dass auch Salze in ihm wandern.

Bei der Entwicklung von HPTLC-Platten in der AMD-Kammer können vom Benutzer folgende Parameter variiert werden:

- Lösungsmittelzusammensetzung,
- Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe,
- Konditionierung der Platte und
- Trockenzeiten.

2.5.1.4 Vergleich des AMD1-Systems mit dem AMD2-System

Für die Entwicklung von HPTLC-Platten mit der AMD-Technik wird von der Firma Camag ein spezielles Entwicklungssystem kommerziell vertrieben. Es besteht aus einer Vertikalkammer, einem Lösungsmittelmischer und einem Steuerungssystem. Bei der Weiterentwicklung des AMD1-Systems zum AMD2-System wurde im wesentlichen der Lösungsmittelmischer und die Art der Fließmittellaufstreckenmessung verändert.

Im Unterschied zum AMD1-Gerät, bei dem die Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe durch Messung der Entwicklungszeit bestimmt werden, erfolgt beim AMD2-Gerät die Fließmittellaufstrecken-Überwachung optisch durch ein CCD-Element. Das bedeutet, dass es bei der AMD2-Entwicklung nicht mehr zu Schwankungen der Fließmittellaufstrecken z. B. durch Temperaturunterschiede kommen kann. Die Unterschiede bei der Herstellung der Laufmittel und damit des Laufmittelgradienten sind noch größer.

Die in Abbildung 2-15 dargestellte AMD2-Kammer verfügt über eine Kolbenpumpe, die nacheinander über ein Achtfach-Ventil (Abbildung 2-15, Nr. 4) die einzelnen Lösungsmittel aus den möglichen fünf Vorratsflaschen aufzieht und danach vermischt. Dabei kann die Fliessmittelzusammensetzung frei gewählt werden. Deshalb ist eine Entwicklung mit einem linearen, einem konvexen oder auch einem konkaven Gradienten und eine isokratische Entwicklung möglich, wobei der Gradient beliebig zusammengesetzt werden kann.



Abbildung 2-15: Schema des AMD2-Systems

- 1 Entwicklungskammer, 2 fünf Vorratsflaschen, 3 Achtfach-Ventil,
- 4 Kolbenpumpe, 5 Abfallflasche, 6 Konditionierflasche, 7 Gaswaschflasche,
- 8 Vakuumpumpe, 9 Gasanschluss



Abbildung 2-16: Schema des AMD1-Systems

- 1 Mischerüberlauf, 2 sechs Vorratsflaschen, 3 Achtfach-Motorhahn,
- 4 Verwerfflasche, 5 Vakuumanschluss, 6 Mischereinheit, 7 Lichtschranke,
- 8 Entwicklungskammer, 9 Speicherblase, 10 Gaswaschflasche, 11 Gasanschluss

Die in Abbildung 2-16 gezeigte AMD1-Kammer dagegen besitzt eine Mischereinheit (Abbildung 2-16, Nr. 6) bestehend aus zwei Mischern mit Lichtschranke und sechs Vorratsflaschen. Die beiden übereinanderliegenden Mischer sind miteinander drucklos durch einen Schlauch verbunden. Während des Mischvorganges wird erst Mischer 1 kontinuierlich befüllt. Der erste Mischer mischt das Laufmittel mit einem Rührer, während Lösungsmittel zugeführt wird, solange bis der zweite Mischer ebenfalls gefüllt ist. Nur der zweite, der Nachmischer (Dosiereinheit) wird in die Entwicklungskammer entleert, er dient zum Abmessen des Laufmittels für den aktuellen Entwicklungsschritt.

Bei dieser Art des Mischens ist die Änderung der effektiven Fliessmittelzusammensetzung niemals linear sondern prozentual. Bedingt durch das Totvolumen zwischen Achtfach-Ventil und Mischer beträgt die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung nach einem Flaschen-wechsel 18,62 % der aktuellen Flasche gegenüber 35,38 % ohne Flaschenwechsel [133].

Mit dem AMD1-System kann deshalb eine HPTLC-Platte lediglich isokratisch oder mit einem konkaven Gradienten entwickelt werden. Des weiteren ist ein totaler Wechsel des Lösungsmittels lediglich einmal möglich, weil die Steuerung des AMD1-Systems nur eine einmalige vollständige Entleerung des Mischers vorsieht.

Eine weitere Verbesserung des AMD-Systems bedeutet die Trennung der Gaswaschflasche im AMD1-System zu einer sogenannten Konditionierflasche und einer Gaswaschflasche im AMD2-System. Jetzt kann im AMD-Gerät neben einer Reinigung des verwendeten Gases in der Gaswaschflasche (z. B. Trocknung durch Molekularsieb) eine Sättigung des Gases in der Konditionierflasche erfolgen.

2.5.1.5 Detektion in der Dünnschichtchromatographie

Es gibt verschiedene Detektionsmöglichkeiten in der Dünnschichtchromatographie. Üblich sind folgende Methoden:

- direkt visuelle Methoden,
- direkt visuelle Methoden unter Anwendung physikalischer oder chemischer Hilfsmittel (Derivatisierung) und
- indirekte Methoden mit Scanner.

In Tabelle 2-13 sind ausgewählte Detektionsmethoden einander gegenübergestellt [134]. Bei den direkten visuellen Methoden kann zusätzlich zu der Laufstrecke die Farbe des Spots als Information erhalten werden. Mit den indirekten Methoden mit Scanner kann darüber hinaus das UV-VIS- bzw. das Fluoreszenz-Spektrum erhalten werden, das für eine Substanz sehr charakteristisch sein kann (siehe Abschnitt 2.5.1.6).

Hilfsmittel	Art des Hilfsmittels	Detektiert werden	Zusätzliche Information
ohne		farbige Substanzen	Farbe
UV-Licht	physikalisch	fluoreszierende Substanzen	
UV-Licht, Fluores- zenzindikator	physikalisch	UV absorbierende Substanzen	
Scanner (Filtergerät)	physikalisch	lichtabsorbierende Substanzen	Peakfläche
Scanner mit einem Mo- nochromator	physikalisch	lichtabsorbierende Substanzen	Peakfläche, UV-VIS- Spektrum
Scanner mit zwei Mo- nochromatoren	physikalisch	fluoreszierende Substanzen	Peakfläche, Fluoreszenz- Spektrum
Iod	physchem. (Adsorption)	lipophile Substanzen	
Chromschwefelsäure	chemisch	oxidierbare Substanzen	
Molybdatophosphorsäure	chemisch	oxidierbare Substanzen	
2,6-Dibrombenzochinon- 4-chlorimid	chemisch	Phenole, (Aniline)	
Dragendorff's Reagenz	chemisch	stickstoffhaltige Substanzen	
Ninhydrin	chemisch	Aminosäuren	
Schweineleberextrakt / Indoxylacetat	biochemisch	Esterasehemmer	spezifische Fleckfarbe

Tabelle 2-13:	Ausgewählte	Detektionsm	öglichkeiten	in	der	TL	С
	1 use wante	Detektionsin	ognemkenten		uu	1 1	\mathbf{c}

Ein wesentlicher Vorteil der Dünnschichtchromatographie gegenüber der HPLC ist ihre einfache Mehrfachdetektion. Sie ist dadurch bedingt, dass ein inneres Chromatogramm^a entsteht, das nacheinander, mit unterschiedlichen Methoden detektiert werden kann.

Auf die Detektion unter Anwendung chemischer Hilfsmittel (Derivatisierung) wird im Abschnitt 2.4.3 näher eingegangen. An dieser Stelle sollen nur weitverbreitete Methoden aufgeführt werden. In der Dünnschichtchromatographie werden zum Beispiel Chromschwefelsäure und Molybdatophosphorsäure als universelle Reagenzien eingesetzt, die alle oxidierbaren Substanzen sichtbar machen. Sollen selektivere Reagenzien eingesetzt werden,

a	Inneres Chromatogramm:	Positionen (Laufstrecken) der zu trennenden Substanzen an einem bestimmten
		Zeitpunkt t
	Äußeres Chromatogramm:	Retentionszeiten der zu trennenden Substanzen an einem bestimmten Ort
		(Detektor)

bieten sich z. B. 2,6-Dibrombenzochinon-4-chlorimid, Dragendorff's Reagenz oder Ninhydrin zur Detektion von Phenolen oder stickstoffhaltigen Substanzen an [120].

Des weiteren sind biologische und biochemische Methoden zur Detektion dünnschichtchromatographisch getrennter Substanzen bekannt, von denen in Tabelle 2-13 die Detektion durch Esterasehemmung aufgeführt ist. Die angewandten biologischen Methoden sind in Abschnitt 2.5.1.7 ausführlich beschrieben.

2.5.1.6 Prinzip der UV-VIS-Detektion

Die UV-VIS-Detektion ist in der Flüssigchromatographie und in der Dünnschichtchromatographie weit verbreitet.

Die Absorption von ultraviolettem oder sichtbarem Licht (UV-VIS) umspannt den ganzen Bereich zwischen unspezifischer Detektion und sicherer Identifizierung. So absorbiert bei Wellenlängen um 200 nm eine sehr große Anzahl von Substanzen unspezifisch das UV-Licht, da in diesem Bereich schon die $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge einsamer Elektronenpaare der Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Atome und die $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge isolierter Doppelbindungen angeregt werden.

Hingegen bestehen bei Aufnahme kompletter UV-VIS-Spektren mit Hilfe von Dioden-Array-Detektoren nach flüssigchromatographischer Trennung in Kombination mit der Retentionszeit sehr gute Identifizierungsmöglichkeiten. In den meisten Fällen kann die Identifizierungsmöglichkeit durch die Aufnahme der Spektren nach dünnschichtchromatographischer Trennung oder Online-Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC noch verbessert werden, da bei der Aufnahme von UV-VIS-Spektren mit Hilfe der Remissionsspektroskopie auf Dünnschichtplatten der Einfluss der mobilen Phase (UV-Cut) entfällt.

Allerdings gibt es für das Screening nach unbekannten organischen Substanzen keine umfassenden Spektrenbibliotheken, wie sie für Elektronenstoß-Ionisierungs-Massenspektren (EI-MS) kommerziell erhältlich sind. Somit ist ohne externe Standards ein UV-Spektrum nur eins von mehreren Hilfsmitteln, die bei der Identifizierung unbekannter Stoffe benötigt werden. Gewisse Charakteristika können aber aus der Lage und Intensität von Absorptionsbanden abgeleitet werden [135]. So deutet ein Maximum bei 260 nm (Photometrie auf Dünnschichtplatten) bzw. bei 256 nm (Photometrie in Flüssigkeiten) auf einen Benzolring hin. Die Verschiebung des Maximums von 256 nm auf 260 nm bei der Dünnschichtchromatographie ist darauf zurückzuführen, dass die Analyten an einer Oberfläche anderen Einflüssen als in Flüssigkeiten ausgesetzt sind. Die Detektion der mit der AMD-Technik entwickelten Platten erfolgt in der Regel mit einem UV-VIS Scanner, mit dessen Hilfe die Auftragebahnen bei einer oder mehreren Wellenlängen (Multiwellenlängendetektion) vermessen werden. Danach kann sich eine Spektrenaufnahme der interessierenden Substanzen anschließen. Die Scanner werden im Reflexions-Remissionsmodus betrieben, bei dem das von der Platte zurückgeworfene Licht gemessen wird.

Zur quantitativen Auswertung werden die Messwerte der Remissions-Orts-Kurve als Peakhöhe oder Peakfläche dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass sich bei Messungen über einen größeren Konzentrationsbereich aufgrund der Kubelka-Munk-Funktion (Gleichung 2-3), welche die quantitativen Gesetzmäßigkeiten der Remissionsmessung beschreibt, nicht unbedingt eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration und Peakfläche ergeben muss [136]. Kalibrierkurven können jedoch gut über eine polynome Regression zweiter Ordnung angenähert werden.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass auch bei den direkten visuellen Methoden eine Quantifizierung möglich ist (Gleichung 2-4), da die Spotfläche von der aufgetragenen Analytmenge abhängt. Über einen größeren Konzentrationsbereich gilt eine lineare Beziehung zwischen der Quadratwurzel aus der Spotfläche F und dem Logarithmus der aufgetragenen Analytmenge M [137].

S ε R	Streukoeffizient, charakteristisch für die Platte Extinktionskoeffizient Remissionsgrad
ĸ	Remissionsgrad
	S ε R

Gleichung 2-3: Kubelka-Munk-Funktion

$\sqrt{F} = a \cdot \log M + b$	F a und b M	Spotfläche individuelle Konstanten Menge
---------------------------------	-------------------	--

Gleichung 2-4: Abhängigkeit der Spotfläche von der aufgetragenen Menge bei visueller Detektion

Bei Einsatz von Platten mit Fluoreszenzindikator kann auch die Schwächung der Fluoreszenz durch die vorliegenden Probenspots gemessen werden. Besitzen die Proben selbst Fluoreszenz, erlauben manche Geräte auch die direkte Fluoreszenzmessung nach Anregung durch eine geeignete Wellenlänge.

Wie schon erwähnt, kann zur Identifizierung der Probenspots neben der Laufstrecke auch deren Spektrum herangezogen und mit bereits gemessenen Spektren verglichen werden. Es ist allerdings zu beachten, dass sich im Spurenbereich aufgenommene Reflexionsspektren nur dann vergleichen lassen, wenn sie annähernd die gleiche Substanzmenge pro Spot aufweisen. Bei sehr geringen Substanzmengen bildet sich eine annähernd monomolekulare Probenschicht, deren Remission stark von der Reflexion des darunter liegenden Trägermaterials gestört werden kann. Dies kann zur Verschiebung des Absorptionsmaxims oder gänzlich verschiedenen Spektren führen [11, 138].

Bei der Identifizierung der Probenspots über deren UV-VIS-Spektren wirkt sich ebenfalls nachteilig aus, dass ähnliche Pestizide oft die gleichen chromophoren Gruppen besitzen und demzufolge auch recht gleichartige oder unspezifische Spektren liefern.

2.5.1.7 Prinzip der biologischen Detektion in der Dünnschichtchromatographie

Bei der biologischen Detektion in der Dünnschichtchromatographie wird die biologische Wirkung der Analyten ausgenutzt. Vorteil der biologischen Detektion sind die mögliche Empfindlichkeitssteigerung, die Spezifität der Verfahren und eine mögliche Detektion von Substanzen, die nicht UV-aktiv sind. Eine biologische Detektion ist mit Hilfe von Teilen eines Organismus (biochemische Detektion) oder mit Hilfe von Organismen (biologische Detektion) möglich.

Beispiele für die biochemische Detektion sind die Detektion von Carbamat- oder Organophosphor-Insektiziden mittels Esterasen [139] oder die Detektion von Herbiziden durch die Hillreaktion in Chloroplasten [140, 141, 142].

Die genutzten biologischen Systeme können, je nach Eigenschaften der zu bestimmenden Substanzen, Bakterien, Pilze, Hefen, Protozoen, Algen, tierische Zellen und virusinfizierte Tier- oder Bakterienzellen sein. In der vorliegenden Arbeit wird die biologische Detektion von Fungiziden mit Pilzen und mit Leuchtbakterien vorgestellt und verglichen.

In Abbildung 2-17 ist das Prinzip der biologischen Detektion nach dünnschichtchromatographischer Trennung und der Vergleich mit der UV-Detektion dargestellt.

Ein biologisches Signal wie Hemmung oder Stimulation des Wachstums von Organismen oder Hemmung von Enzymen dient der Zuordnung / Absicherung von toxischen Substanzen im TLC-Chromatogramm oder weist auf andere unbekannte toxikologisch relevante Stoffe hin. Die Dokumentation kann per Flachbettscanner, CCD-Kamera oder einem handelsüblichen TLC-Scanner erfolgen und die Hemmung in definierten Toxizitätseinheiten quantitativ angegeben werden. Die Nachweisgrenze ist hierbei abhängig von der Toxizität des entsprechenden Stoffes in dem definierten Testsystem.



Abbildung 2-17: Prinzip der Identifizierung biologisch wirksamer Fraktionen nach dünnschichtchromatographischer Trennung nach UV- und biologischer Detektion

Das Reaktionsschema der Cholinesterasehemmung durch Carbamat- und Organophosphorinsektizide ist in Abbildung 2-18 dargestellt. Nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung wird die Platte erst mit einer Esterase (z. B. Cholinesterase) besprüht. Die Esterase wird bei hoher Luftfeuchtigkeit und 37 °C aktiviert. Im zweiten Schritt wird ein Ester wie z. B. 1-Naphthylacetat und ein Farbstoffreagenz wie Fast Blue B auf die Platte gesprüht.

Normalerweise erfolgt unter dem Einfluss der Cholinesterase die Spaltung des 1-Naphthylacetats in 1-Naphthol und Essigsäure. Das entstandene 1-Naphthol reagiert anschließend mit Fast Blue B zu einem violettgefärbten Diazoniumsalz (Chromophor). Wird die Cholinesterase gehemmt, kann die Spaltung des 1-Naphthols nicht erfolgen und somit ebenfalls nicht die Bildung des Chromophors. Der Nachweis der Cholesterinesterasehemmer erfolgt durch weiße Spots (Plattenfarbe) auf dunkelvioletten Untergrund.



Abbildung 2-18: Bestimmung von Carbamaten und Organophosphorinsektizide mittels Cholinesterasehemmung

Die Detektion von Herbiziden durch die Hill-Reaktion in Chloroplasten^a nach dünnschichtchromatographischer Trennung wurde Ende der 70-iger Jahre entwickelt [140, 141, 142]. Die dünnschichtchromatographisch entwickelten Platten werden mit einer Mischung einer Chloroplasten-Suspension und einer Lösung aus 2,6-Dichlorphenolindophenol besprüht.

^a Nach Robert Hill benannte Primärreaktion der Photosynthese: Unter Einwirkung des sichtbaren Lichtes findet eine Spaltung des Wassers in Sauerstoff und Wasserstoff statt. Der Wasserstoff wird von Oxidationsmitteln der Pflanzen aufgenommen (NADP⁺). Anstelle des natürlichen NADP⁺ können in In-vitro-Versuchen andere leicht reduzierbare Substanzen wie das 2,6-Dichlorphenolindophenol als Oxidationsmittel fungieren.

Dabei wird der Redoxindikator 2,6-Dichlorphenolindophenol von photosynthetisch aktiven Chloroplasten zur farblosen Hydrochinonform reduziert. Die Hemmung der Hill-Reaktion wird durch die blaue chinoide Form des 2,6-Dichlorphenolindophenols angezeigt.

Zur bioautographischen Detektion von Fungiziden mit Pilzen werden die dünnschichtchromatographisch entwickelten Platten [143] in eine Pilzsporen-Suspension [144] getaucht (direkte Bioautographie) oder mit Agar, der Pilzsporen enthält, beschichtet (Immersions-Bioautographie). Anschließend werden die Platten in feuchter Atmosphäre bei 28 °C für 48 h bebrütet. Es wächst ein Pilzrasen auf der TLC-Platte bzw. dem Agar. Bei Anwesenheit eines fungiziden Wirkstoffes erscheint ein weißer Hemmhof, dessen Größe und Form durch die applizierte Menge und durch die Wirkungsspezifität des Fungizids bestimmt wird [145].

Bei der Detektion von biologisch aktiven Substanzen mit Leuchtbakterien werden die entwickelten TLC-Platten in eine Leuchtbakterien-Suspension getaucht. Während der Inkubation werden von der Platte in Intervallen Aufnahmen mit einer lichtempfindlichen CCD-Kamera gemacht. Durch die densitometrische Auswertung der Aufnahmen werden biologisch wirksame Substanzen (Hemmung oder Förderung der Bioluminizenz) erkannt, da sie eine geringere oder stärkere Luminizenz als der neutrale Hintergrund zeigen.

2.5.2 <u>Gaschromatographie (GC)</u>

2.5.2.1 Prinzip der GC

Die Gaschromatographie (GC) ist neben der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) das am weitesten verbreitete Trennverfahren in der Analyse von Pflanzenschutzmittel-Rückständen und Umweltkontaminaten.

Für eine gaschromatographische Trennung ist es erforderlich, dass die Analyten bei 50 bis 300 °C thermostabil und ausreichend flüchtig sind, weil die Trennung durch eine Verteilung in der gasförmigen mobilen Phase und einer stationären Phase erfolgt. Die stationäre Phase ist entweder ein poröser, polymerer Feststoff oder eine meist viskose Flüssigkeit, die in Form eines dünnen Films auf ein festes Trägermaterial gebracht wurde. In der Rückstandsanalytik von Pestiziden wird mit Dünnschicht-Kapillarsäulen gearbeitet.

Der Gasstrom (Trägergas) wird mit kontrolliertem Druck durch den Injektor in die Trennsäule und damit an der stationären Phase vorbei geleitet und verlässt das chromatographische System durch den Detektor. Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze in den Injektor eines Injektorsystems gebracht und mit dem Trägergasstrom auf die Trennsäule gespült, die sich in einem beheizten und temperaturprogrammierbaren Ofen befindet. Die Trennung der Substanzen vollzieht sich durch wiederholte Verteilung der Einzelkomponenten zwischen mobiler und stationärer Phase. Dabei erfolgt der Transport der Probe ausschließlich in der mobilen Phase und die Trennung nur in der stationären Phase. Die gaschromatographische Trennung beruht auf verschiedenen Effekten. Verbindungen mit hohem Dampfdruck und/oder niedriger Löslichkeit haben nur eine kurze Aufenthaltsdauer in der flüssigen Phase. Umgekehrt werden Verbindungen mit niedrigem Dampfdruck und/oder höherer Löslichkeit in der stationären Phase langsam eluiert.

Nach Verlassen der Trennsäule werden die Substanzen detektiert. Gebräuchliche Detektoren in der Spurenanalytik von Pestiziden sind der Elektroneneinfangdetektor (ECD), der Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) und der massenselektive Detektor (MSD).

2.5.2.2 Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Der ECD kann alle Verbindungen anzeigen, die in der Lage sind, Elektronen einzufangen. Damit ist er ein selektiver Detektor für halogenhaltige Verbindungen, Nitrile, Nitrate und Substanzen mit konjugierten Carbonylgruppen. Der ECD wird in der Pestizidanalytik hauptsächlich wegen seiner hohen Empfindlichkeit auf Halogene eingesetzt [146, 1].

In der Detektorzelle wird das Trägergas mit β-Strahlen, die aus einer radioaktiven Folie (Ni 63) stammen, beschossen und ionisiert. Bei der Kollision der Gasmoleküle entstehen eine relativ große Anzahl an Sekundärelektronen, die aufgrund ihres Energieniveaus (0,02-0,05 eV) auch als "thermische Elektronen" bezeichnet werden. Alle geladenen Spezies bilden gemeinsam den Grundstrom des Detektors. Probenmoleküle, die in der Lage sind, "thermische Elektronen" einzufangen, setzen den Grundstrom herab und erzeugen dadurch ein Detektorsignal [147].

2.5.2.3 Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD)

Der Stickstoff-Phosphor-Detektor gehört zu den elementspezifischen GC-Detektoren und ist wegen seiner hohen Spezifität gegenüber einzelnen Elementen für die Analyse von Pflanzenschutzmittel-Rückständen besonders geeignet. Es wird zwischen zwei Haupttypen unterschieden:

- dem Alkali-Flammenionisationsdetektor (AFID) und
- dem Thermoionischen Detektor (TID).

Der AFID ist im Prinzip ein modifizierter Flammenionisationsdetektor und verdankt seine Spezifität gegenüber stickstoff- und phosphorhaltigen Substanzen dem Einbau einer Alkaliquelle, die meistens ein Rubidium-Salz enthält. Die Beheizung der Alkaliquelle mit der Flamme des AFID führt dazu, dass Alkaliatome in die Gasphase übergehen und ionisiert werden; diese Alkali-Ionen bilden den Grundstrom des Detektors. Probenmoleküle, die in den AFID gelangen, werden in der Flamme verbrannt; sind stickstoff- und oder phosphorhaltige Verbrennungsprodukte zugegen, steigt der Grundstrom stark an. Dieser Stromanstieg wird als Detektorsignal registriert.

Der Reaktionsmechanismus und somit der Grund für die Spezifität des AFID gegenüber Stickstoff und Phosphor sind nicht genau bekannt; vermutet wird jedoch, dass stickstoff- und phosphorhaltige Verbrennungsprodukte, wie Cyanid- und Phosphat-Radikale die Ionisierungsrate der Alkaliatome, die sich in der Gasphase befinden, deutlich erhöhen [148].

Der TID unterscheidet sich vom AFID dadurch, dass die Alkaliquelle elektrisch beheizt und Wasserstoff nur in so geringen Mengen zugeführt wird (1-5 statt 30 ml/min) [149], sodass die Ionisierung der Alkaliatome abseits der Flamme im sogenannten "flammenlosen Modus" erfolgt.

Der Vorteil des TID gegenüber dem AFID besteht darin, dass ausschließlich stickstoff- und phosphorhaltige Komponenten angezeigt werden, während der AFID zusätzlich auch auf halogenhaltige Substanzen anspricht [150].

2.5.2.4 Massenselektiver Detektor (MSD)

Mit Hilfe der Massenspektrometrie kann jede gaschromatographierbare Substanz detektiert und gleichzeitig eine für jede Substanz charakteristische Strukturinformation erhalten werden, d. h., der MSD ist ein universeller Detektor mit einer hohen Selektivität.

In der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln werden Massenspektrometer in der Kopplung mit der Kapillar-Gaschromatographie eingesetzt.

Es werden vier Massenspektrometertypen nach ihren Massentrennsystemen unterschieden, die einfach oder doppelt fokussierenden magnetischen Sektorfeldgeräte, die Quadrupol-Geräte, Ionenfallen (Ion traps) und Time-of-Flight-Geräte. [151]

Bei allen Gerätetypen gelangen die zu bestimmenden Substanzen nach Verlassen der gaschromatographischen Trennsäule über ein Interface in die Ionenquelle des Massenspektrometers. Dort werden die Moleküle im Vakuum unter festgelegten Bedingungen ionisiert.

Die häufigste Ionisierungsart ist die Elektronenstoß-Ionisierung (electron impact ionization, EI). Hierbei werden die Probenmoleküle mit energiereichen Elektronen (70 eV) beschossen; ein Elektron wird aus dem Probenmolekül geschlagen (Primärprozess) und es entstehen positiv geladene Molekül-Ionen. Dabei handelt es sich um Radikal-Kationen, deren Stabilität von der Möglichkeit der Mesomeriestabilisierung des ungepaarten Elektrons abhängt. Zusätzlich führt die auf den Molekülen verbleibende Überschussenergie zum Bruch chemischer Bindungen in den Molekül-Ionen. Durch Spaltung und Umlagerungsprozesse zerfallen sie in für die jeweilige Substanz charakteristische Fragmente. Die positiv geladenen Bruchstücke verlassen die Ionenquelle, werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und gelangen zum Massentrennsystem ("Massenanalysator").

Die Trennung der Ionen entsprechend ihres Masse / Ladungs-Verhältnisses (m/z) beruht bei Quadrupol- und magnetischen Sektorfeldgeräten auf unterschiedlichen Prinzipien. Der Quadrupol stellt einen Massenfilter aus vier Quadrupolstäben dar, der nur Ionen mit einer stabilen Bahn passieren lässt. Durch Potentialänderungen an den Quadrupolstäben können Ionen mit einem unterschiedlichen Masse / Ladungs-Verhältnis über einen vorgegebenen Massenbereich nacheinander registriert werden: Aufnahme eines Massenspektrums.

Die Gesamtheit der positiv geladenen Ionen (Molekül-Ion und Fragment-Ionen) stellt ein für die jeweilige Substanz charakteristisches Massenspektrum dar, das häufig als "Fingerprint" der Substanz bezeichnet wird. Ein Massenspektrum ist dabei die zweidimensionale Darstellung aller auftretenden Ionen und ihrer jeweiligen Intensität, die auf das intensivste Ion, den Basepeak, normiert werden.

Im Falle der magnetischen Sektorfeldgeräte werden die Ionen in einem magnetischen Feld entsprechend ihres Masse / Ladungs-Verhältnisses abgelenkt. Nur Ionen, die eine Kreisbahn mit einem bestimmten Radius beschreiben, können den Kollektorspalt passieren. Durch Änderung der angelegten Magnetfeldstärke wird die Aufnahme eines kompletten Massenspektrums möglich. Die hochauflösenden, doppelt fokussierenden Geräte besitzen zusätzlich zum Magnet- ein elektrostatisches Sektorfeld, wodurch Ionen mit gleichem Masse / Ladungs-Verhältnis, aber unterschiedlicher Geschwindigkeit gebündelt werden (Geschwindigkeitsfokussierung) und im Magnetfeld die gleiche Ablenkung erfahren [152].

Time-of-Flight-Geräte werden nicht zur Kopplung mit der Kapillar-Gaschromatographie eingesetzt, sondern meist zur Analyse von großen Molekülen wie Proteinen in Kopplung mit der Laser-Desorption-Ionisation speziell der Matrix-assoziierten-Laser-Desorption-Ionisation verwendet.

In Time-of-Flight-Geräten kommen die Ionen in einen feldfreien Raum, nachdem sie die Ionenquelle verlassen haben und beschleunigt wurden. Auf dieser Driftstrecke werden sie nach ihren Masse/Ladungs-Quotienten aufgetrennt. Ionen mit unterschiedlichen m/z-Werten werden bei gleicher kinetischer Energie auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Der analysierbare Massenbereich in Time-of-Flight-Geräten ist theoretisch unbegrenzt, wird aber in der Praxis durch die Auflösung und die Empfindlichkeit der Detektoren begrenzt.

Das Prinzip der Ionenfalle beruht auf dem Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden. In der Mitte der Kappen befinden sich Öffnungen zum Einlass und Auswurf der Ionen. Durch die Kombination von Gleich- und Wechselspannung können in diesem Spannungsfeld Ionen gefangen werden, die sich innerhalb des Analysators auf geschlossenen Bahnen bewegen. Zur Analyse werden durch Spannungsänderungen Ionen mit aufsteigendem Molekulargewicht aus der Falle ausgestoßen. Bei der elektrischen Ionenfalle handelt es sich um einen günstigen, mit verschiedenen externen Ionenquellen kombinierbaren Analysator. Da in der Ionenfalle ein höherer Druck als in konventionellen Ionenquellen herrscht, können ähnlich wie bei der chemischen Ionisation durch Anlagerung von Wasserstoffionen Quasimolekül-Ionen $(M+1)^+$ entstehen. Dadurch sind "gemischte EI/CI-Massenspektren" unter Standard-GC / MS-Bedingungen möglich.

In der magnetischen Ionenfalle (Ionencyclotron-Resonanz-Zelle) werden die Ionen ähnlich der elektrischen Ionenfalle auf Kreisbahnen in einem homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten eingefangen. Besonders in Verbindung mit der Fourier- Transformationstechnik (FT-ICR) werden hohe Nachweisempfindlichkeiten erzielt. Vorteil der ICR ist eine enorm hohe Auflösung, die bis in den Bereich von einigen Millionen geht. Mit der ICR wird im Gegensatz zur elektrischen Ionenfalle ein hoher Massenbereich erreicht.

Ionenfallen mit elektrischem und magnetischem Feld, die zu den sogenannten doppelt fokussierenden Massenspektrometern gehören, sind zur hochauflösenden Massenspektrometrie fähig, die unterschiedlichen Ionen mit den gleichen nominalen Massen trennen kann und somit zur Strukturaufklärung von unbekannten Substanzen eingesetzt wird.

Unabhängig vom System der Massentrennung und Registrierung ergeben sich unter den gleichen Ionisierungsbedingungen im EI-MS immer vergleichbare Massenspektren von der selben Substanz, da die Qualität der Massenspektren ausschließlich von den Vorgängen in der Ionenquelle abhängig ist.

Die Messung der Ionen kann durch die Aufnahme eines kompletten Spektrums (sogenannter Full Scan Modus) oder durch eine sehr viel empfindlichere massenselektive Detektion (Selected Ion Monitoring, sogenannter SIM-Modus) erfolgen. Im Full Scan Modus wird während des GC-Laufs ein vom Anwender festgelegter Massenbereich (bei Pestiziden meist m/z 35-550) zyklisch vermessen. Die Ionenströme der einzelnen Massen werden mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung aufsummiert und als sogenanntes TIC-Chromatogramm (Total-Ionen-Chromatogramm) dargestellt, aus dem dann sowohl die jeweiligen Massenspektren (bei einer bestimmten Retentionszeit) oder die sogenannten rekonstruierten Ionen-Chromatogramme (RICs) der einzelnen Ionen (über einen bestimmten Zeitbereich) extrahiert werden können.

Im SIM-Modus werden innerhalb eines Messzyklus wenige vom Anwender individuell ausgewählte Ionen gemessen. Im Gegensatz zum Full Scan Modus, bei dem innerhalb eines Messzyklus (etwa 1 s) der gesamte Massenbereich detektiert wird, steht im SIM fast die ganze Scanzeit für diese wenigen ausgewählten Ionen zur Verfügung. Die Verlängerung der individuellen Messzeiten (dwell time) der Ionen auf 100 bis 300 ms führt im Vergleich zum Full Scan Modus zu einem deutlich verbesserten Signal / Rausch-Verhältnis. Damit kommt es zu einer erheblichen Empfindlichkeitssteigerung um bis zu einem Faktor von 100. Durch die Beschränkung auf wenige charakteristische Ionen resultiert aber auch ein Informationsverlust.

Sind die Retentionszeiten der Analyten bekannt, können mittels Selected Ion Monitoring mit einer Zeitfensterprogrammierung mehr als dreißig Verbindungen in einem GC-Lauf erfasst und sehr empfindlich nachgewiesen werden. Die Ionenströme aller Analyten werden anschließend zu einem sogenannten Multiple Ion Detection (MID)-Chromatogramm aufsummiert.

2.5.3 <u>Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)</u>

2.5.3.1 Prinzip der HPLC

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist ein etabliertes chromatographisches Trennverfahren, bei dem die mobile Phase eine Flüssigkeit ist. Mit diesem Verfahren lassen sich Substanzen bestimmen, die in der eingesetzten mobilen Phase löslich sind und reproduzierbar durch Wechselwirkung mit der stationären Phase retardiert werden.

Mit Ausnahme der Gelpermeationschromatographie (s. Abschnitt 2.3.3) beruht das Trennprinzip in der Flüssigchromatographie auf der unterschiedlichen Polarität von stationärer und mobiler Phase. Die Trennung von Substanzen basiert entweder wie in der GC auf einer Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase oder auf der Adsorption an der stationären Phase bzw. Ionenaustausch. Im Unterschied zur GC, in der bei einem Trennproblem nur die Temperatur und die stationäre Phase geändert werden kann, ist es in der HPLC möglich, beide Phasen zu variieren. Die mobile Phase wird in Abhängigkeit von der Polarität der stationären Phase gewählt. Aufgrund der verwendeten stationären Phasen können verschiedene Trennmethoden unterschieden werden

- die Normal-Phase-Chromatographie (NP-HPLC)
- die Reversed-Phase-Chromatographie (RP-HPLC)
- die Gelpermeationschromatographie GPC

In der NP-HPLC werden polare Säulenfüllungen eingesetzt. Typische Materialien sind Kieselgele, Aluminiumoxide und Kieselgele mit unterschiedlichen polaren Substituenten wie Diol- Amino- und Cyanogruppen. Über den Substitutionsgrad lassen sich die Polarität der Phasen variieren. Als mobile Phase werden unpolare Lösungsmittel wie Hexan, Dichlormethan und auch Ethylacetat eingesetzt. Die Trennung beruht auf van der Waalschen Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase oder Ionenaustauschvorgängen.

Bei der RP-HPLC bestehen die Säulenmaterialien aus chemisch modifizierten Kieselgelen. Am weitesten verbreitet sind unpolare Alkyl- und Phenyl-Modifikationen. Über den Grad der Modifizierung lässt sich die Polarität der Phase beeinflussen. Durch Einführung von anderen auch polareren Substituenten lassen sich Säulenmaterialien mit fein abgestufter Polarität herstellen. Auf diese Weise kann für das jeweilige Trennproblem das passende Säulenmaterial ausgewählt werden. Die mobile Phase in der RP-HPLC ist polar. Es kommen Wasser, polare Lösungsmittel wie Methanol und Acetonitril und Mischungen aus diesen zum Einsatz. Da die überwiegende Anzahl von Substanzen in Wasser oder polaren organischen Flüssigkeiten löslich ist, wird die Mehrzahl der HPLC-Trennungen heute auf chemisch gebundenen Phasen (RP-HPLC) durchgeführt. Die Trennung beruht auf Verteilungsvorgängen zwischen den beiden Phasen ergänzt durch van der Waalsche Wechselwirkungen.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von modifizierten Kieselgelen ist ihre Einsatzmöglichkeit in der Gradientenelution. Durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber Wasser nimmt ihre Reequilibrierung nur sehr kurze Zeit in Anspruch. Eine erwähnenswerte Tendenz ist die Miniaturisierung in der HPLC. In Tabelle 2-14 sind beispielhaft HPLC-Säulen mit den jeweiligen Innendurchmessern und den üblichen Flussraten aufgelistet [153]. Bei der Verwendung von HPLC-Säulen mit kleinerem Durchmesser kommt es zu einer wesentlichen Verringerung des Volumens der mobilen Phase und damit zu einer Kosteneinsparung.

2.5.3.2 Probenaufgabe in der HPLC

Für eine reproduzierbare Hochleistungsflüssigchromatographie ist die Probenaufgabe besonders wichtig. Ein exakt definiertes Volumen der Probenlösung soll unmittelbar und in reproduzierbarer Weise auf die Trennsäule gebracht werden, ohne dass der Eluentenfluss unterbrochen wird.

Heute kann gewöhnlich zwischen zwei Arten der Probenaufgabe unterschieden werden, die Injektion der Probe mit einer Spritze durch ein Septum in einen Spritzenblock, wie in der Gaschromatographie üblich und die Injektion in eine drucklose Dosierschleife direkt vor der Trennsäule. Dosierschleifen gibt es in den Größen von 1 bis 1000 µl. Die Schleife kann entweder partiell mit einer Spritze bis zu 50 % des Dosierschleifenvolumens oder vollständig durch Durchspülen mit dem fünf- bis siebenfachen des Dosierschleifenvolumens befüllt werden. Bei beiden Methoden liegt die Präzision der Injektion bei maximal 1 % [154].

Die für eine Untersuchung erforderliche Probenmenge ist von verschiedenen Faktoren des eingesetzten HPLC-Systems abhängig. Zum einen wird sie von der Empfindlichkeit des verwendeten Detektors für die Probenkomponenten bestimmt und zum anderen von der Verdünnung der Probe im chromatographischen System sowie von der Kapazität der stationären Phase für die zu untersuchenden Verbindungen.

Das Probenvolumen ist durch den Durchmesser der HPLC-Säulen limitiert. Übliche Volumina sind in Tabelle 2-14 aufgeführt.

Тур	Innendurchmesser in µm	Flussrate in µl/min	Injektionsvolumen in µl
Widebore	4600	1000	10-20
Narrowbore	2100	200	1-5
Microbore	1000	50	< 1

 Tabelle 2-14:
 Gebräuchliche Geräteparameter für RP-C18-Säulen

Bei Anwendung der konventionellen Injektionstechnik, bei der die Dosierschleife partiell oder vollständig gefüllt wird, lassen sich im Narrowbore- und Microbore-Bereich mit $< 1 - 5 \mu l$ nur sehr kleine Volumina injizieren.

Es gibt aber auch spezielle Injektionsmethoden, die in der RP-HPLC bei Benutzung von Microbore-Säulen die Injektion von Volumina bis zu 100 µl ermöglichen [155]. Es kann eine On-Column-Aufkonzentrierung der Probe auf der Säule stattfinden, indem entweder die Probe in einem Lösungsmittel gelöst wird, das eine kleinere Elutionskraft als die mobile Phase hat;

oder die Probe wird in Wasser (sehr kleine Elutionskraft) eingeschlossen und so auf die Säule gebracht (partial bzw. complete bracketing injection techniques). Ursache der Aufkonzentrierung ist die starke Fixierung der Probe am Säulenanfang in einer schmalen Bande bei Benutzung eines Lösungsmittels mit sehr kleiner Elutionskraft. Die Chromatographie erfolgt dann mit einem Laufmittel höherer Elutionskraft.

Die sogenannte complete bracketing injection technique ist am besten geeignet, große Volumina in eine Microbore-Säule zu injizieren. Sie benötigt kein spezielles Zubehör und ist leicht anzuwenden.

2.5.3.3 Detektion in der HPLC

Die Auswahl des Detektors richtet sich nach der verlangten Empfindlichkeit und Selektivität des analytischen Problems. Die Empfindlichkeit wird durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten, wie z. B. der Fähigkeit Licht zu absorbieren, bestimmt. In der Rückstandsanalytik von Pestiziden müssen Substanzen in einer sehr komplexen Matrix bestimmt werden. Dadurch kommt es oft zu einer Coelution von Analyten und Matrixbestandteilen. Daher sind selektive Detektionsverfahren wie die Massenspektrometrie gefragt. Die sehr weit verbreitete UV-VIS-Detektion ist hier weniger geeignet, da sie neben den Analyten auch Matrixbestandteile detektiert. Das Prinzip der UV-VIS-Detektion ist in Abschnitt 2.5.1.6 ausführlich beschrieben.

Die HPLC-MS-Kopplung wurde Anfang der 90er Jahre eingeführt. Ein besonderes Problem stellte die Unverträglichkeit der großen Lösungsmittelmengen aus der HPLC mit dem Hochvakuumbereich des Massenspektrometers und die schonende Überführung der oftmals nichtflüchtigen, polaren und thermolabilen Analyten in die Gasphase dar. Die Vielzahl an Lösungsansätzen der letzten Jahre haben zur Entwicklung leistungsfähiger Ionenquellen geführt.

Die Atmosphärendruckionisation (API) ist heute eine der verbreitesten Techniken der HPLC-MS-Kopplung, weil API-Quellen besonders für thermolabile und höher molekulare Verbindungen geeignet sind. Sie decken mit den Varianten der chemischen Ionisierung (APCI) und der Elektrospray-Ionisierung (ESI) praktisch alle Anwendungsgebiete der HPLC-MS-Kopplung ab.

Bei der <u>chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck</u> (APCI) wird das HPLC-Eluat in einem beheizten Verdampferrohr zerstäubt und fast komplett verdampft. Koaxial zugeführtes Make-up-Gas unterstützt diesen Prozess. In der API-Quelle werden in einem ersten Schritt primäre Reaktand-Ionen gebildet, die aus den Lösungsmittelmolekülen hervorgehen. Die Ionisierung erfolgt mit Hilfe einer Corona-Entladungsnadel, an der positive oder negative Spannungen von einigen tausend Volt anliegen können. In der Gasphase reagieren die Reaktand-Ionen, die aus dem Eluenten gebildet werden, unter Protonenübertragung oder Deprotonierung mit den Probemolekülen. Mit Hilfe verschiedener Linsensysteme gelangen die ionisierten Probemoleküle durch eine winzige Öffnung aus dem Normaldruckbereich ins Hochvakuum.

Die <u>Elektrospray-Ionisierung</u> (ESI) beruht auf der Einwirkung eines hohen elektrischen Potentials auf das HPLC-Eluat. Dabei werden die Ionen mit entgegengesetzter Ladung neutralisiert. Die Selbstabstoßung der elektrostatisch geladenen Oberfläche führt zur Bildung kleinerer Tröpfchen, deren Größe durch die Zuführung geheizter Trocknungsgase (Verdampfung des Lösungsmittels) ständig weiter verkleinert wird. Dabei steigt ständig das Masse-Ladungs-Verhältnis bis zur Coulomb-Explosion, die schließlich zum Eintritt der Ionen in die Gasphase führt.

ESI ist besonders für thermolabile Substanzen geeignet, die schon als Ionen in Lösung vorliegen. Nichtionische Komponenten können häufig durch den Zusatz von Säuren oder Basen dissoziiert und damit ionisiert werden, falls die Substanzen über entsprechende Gruppen im Molekül verfügen.

Im Elektrospraymodus beobachtet man häufig die Bildung von Addukt-Ionen (sogenannte Quasimolekülionen). Es handelt sich im positiven Modus um Anlagerungsprodukte von Natrium-, Kalium- oder Ammoniumkationen. Im negativen Modus werden bevorzugt Ameisensäure, Methanol oder Natriumchlorid-Cluster angelagert.

Im Gegensatz zur Elektronenstoß-Ionisierung, bei der ausreichend Fragmente zur Identifizierung unbekannter Verbindungen gebildet werden, liefern typische API-Spektren oftmals nur Informationen zum Molekülgewicht in Form von Quasimolekülionen. Eine weitere Fragmentierung erfolgt durch Zusammenstoß der Ionen mit Gasmoleküle.

In Triple-Quadrupol-Geräten lassen sich durch die Kollision der Eltern-Ionen mit Inertgasen wie Argon oder Stickstoff Tochterionen erzeugen. Hierbei stoßen die im ersten Quadrupol herausgefilterten Ionen in der Kollisionszelle (zweites Quadrupol) mit den Gasteilchen zusammen, die übertragene Energie führt zur Fragmentbildung (collision induced decay, CID). Nach der Fokussierung wird das Fragmentionengemisch im dritten Quadrupol aufgetrennt.

Einfache MS-Geräte bedienen sich der in-source CID zur Fragmentierung. Eine erhöhte Potentialdifferenz im Übergangsbereich von Normaldruck zu Hochvakuum bewirkt eine erhöhte kinetische Energie der Ionen. Beim Zusammenprall mit noch vorhandenen Restgasen bilden sich Fragmente, die zur Identifizierung herangezogen werden können. Allerdings setzt die in-source-CID eine sehr gute chromatographische Trennung der Analyten voraus, da es andernfalls zur Überlagerung der Tochterionen-Massenspektren coeluierender Substanzen kommen kann.

Eine Spezialform der LC-MS-Kopplung ist die Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion (FIA / MS). Ohne chromatographische Trennung gelangen die Analyten direkt in die Ionenquelle.

Zur Rückstandsanalyse von Komponenten in komplexer Matrix ist die FIA-MS weniger geeignet [156], da:

- in der HPLC-MS größere Volumina appliziert werden können. Dadurch gelangt eine größere Menge Analyt pro Zeiteinheit in die Ionenquelle und steht zur Bestimmung im MS zur Verfügung.
- Komponenten mit gleichen m/z-Verhältnis in der HPLC getrennt werden können und
- es bei der FIA zum gleichzeitigem Eintrag von Komponenten mit unterschiedlicher Protonenaffinität in die Ionenquelle kommt. Dabei können Signale von Komponenten mit niedriger Protonenaffinität infolge eines kompetitiven Effekts unterdrückt oder sogar ausgelöscht werden. Durch Trennung der Komponenten in der HPLC wird dieser Effekt vermieden.

Zur Optimierung des MS-Detektors mit Standardsubstanzen kann die FIA / MS aber sehr gut eingesetzt werden, da hier die Nachteile der FIA nicht zum tragen kommen. Sie ermöglicht eine Optimierung der Detektionsbedingungen innerhalb weniger Minuten.

2.5.4 Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD

Matrixreiche Proben wie Multikomponentenmischungen, Abwässer oder pflanzliche Lebensmittel können oft nicht durch eindimensionale Chromatographie-Techniken mit geringer Auflösung in alle einzelnen Komponenten getrennt werden.

So ist die quantitative Bestimmung von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln prinzipiell mit Hilfe der UV-Absorption nach Flüssigchromatographie oder Dünnschichtchromatographie möglich, wird aber häufig durch die Probenmatrix gestört. Durch die Kopplung beider Methoden, die quasi eine zweidimensionale Technik darstellt, kann eine bessere Abtrennung der Probenmatrix von den Analyten erreicht werden. Das in Abbildung 2-19 dargestellte Prinzip der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD wurde zuerst 1990 von Burger beschrieben [18]. Bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD erfolgt zuerst eine Trennung des Probenextraktes an einer RP-C18-HPLC-Säule mit einem Gradienten. Die interessierenden Fraktionen des HPLC-Eluates werden anschließend auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Für die Übertragung des HPLC-Eluates wird ein umgebauter HPTLC-Probengeber (Automatic TLC SAMPLER III, ATS III), der mit einem beweglichen und beheizbaren Sprühkopf ausgestattet ist, eingesetzt. Das HPLC-Eluat wird durch eine Transferleitung (Kapillare) vom UV-Detektor zum Sprühkopf geleitet und durch diesen kontinuierlich mit Hilfe eines Stickstoffstromes auf die HPTLC-Platten aufgesprüht. Die für den Transfer vom Detektor zum Sprühkopf benötigte Zeit, die sogenannte Verzögerungszeit, liegt abhängig von der Flussrate der mobilen Phase und der Länge der eingesetzten Transferleitung im Bereich von 5 bis 60 s. Sie muss für jede Methode experimentell ermittelt werden.



Abbildung 2-19: Schema der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Der Sprühkopf des Autosamplers wird durch einen mit einer speziellen Software (ATS-C) ausgestatteten Personal Computer gesteuert. Die von Schwarzer entwickelte ATS-C Software läuft unter MS Windows und ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben [157, 158]. Die Software gestattet es u. a. den Sprühkopf so zu steuern, dass nur einzelne frei wählbare Fraktionen des HPLC-Eluates auf vorgegebene Positionen der TLC-Platte aufgetragen werden. Nicht interessierende Fraktionen werden in das Abfallbehältnis geführt. Sprühstart und

Auftragezeitraum können über die Software gesteuert werden. Den Bezugspunkt stellt dabei die Retentionszeit dar, bei der das Eluat den HPLC-Detektor verlässt.

Parallel zu den aufgetragenen HPLC-Fraktionen können Standardmischungen mit dem Originalprobengeber auf die freien Bahnen derselben Platte aufgetragen werden.

Nach der Entwicklung der TLC-Platte erfolgt die Auswertung durch Vergleich der Laufstrecken, der UV-VIS-Spektren und zusätzlich über die HPLC-Fraktion, in der die Analyten erwartet werden.

Die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC/AMD vereint die Vorteile beider Methoden. Aufgrund der Fokussierung im dünnschichtchromatographischen System können sehr große Volumina einsetzt werden. Limitierender Faktor ist die Fließgeschwindigkeit des Eluenten, der in der RP-HPLC wasserhaltig ist. Durch das langsame Abdampfen des Eluates kann bei großen Fliessgeschwindigkeiten die Auftragestelle durch das HPLC-Eluat geflutet werden und sich zu einem breiten Fleck vergrößern.

Beim Einsatz des gekoppelten Systems wird auch eine geringe Überladung der HPLC verkraftet, weil die HPLC als erstes der beiden chromatographischen Verfahren nur zur Vortrennung eingesetzt wird und die Analyten während des zweiten chromatographischen Verfahrens fokussiert werden.

Die maximale Trennleistung der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD ist sehr groß. Da theoretisch jede HPLC-Fraktion auf der Dünnschichtplatte in 25 Analyten aufgetrennt werden kann und in der HPLC maximal 40 Analyten (= 40 Fraktionen) getrennt werden können, ergibt sich eine Gesamttrennleistung von 1000 Analyten [18].

Die Polarität der Analyten kann sehr unterschiedlich sein, weil beide Methoden zur Gradientenelution befähigt sind.

Ein wesentlicher Vorteil der Dünnschichtchromatographie gegenüber der HPLC ist ihre einfache Mehrfachdetektion; dieser Vorteil geht bei der Kopplung nicht verloren.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob zur Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD neben der RP-HPLC ein zweites Trennprinzip eingesetzt werden kann. Als Trennprinzip wurde die Trennung nach Molekülgröße an einer lipophilen GPC-Säule ausgewählt, die zum Unterschied der RP-HPLC wasserfreie Eluenten einsetzt.

2.6 Analytik biologisch aktiver Naturstoffe

Als ein weiteres Anwendungsgebiet für die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC /-AMD bietet sich die HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe an. Extrakte von Naturstoff-produzierenden Organismen (Pflanzen, Mikroorganismen oder Tiere) können mittels HPLC fraktioniert werden. Die biologische Aktivität der Fraktionen kann dann mittels eines Bioassays untersucht werden. Anschließend können sogenannte Aktivitätsprofile aufgestellt werden. Gleichzeitig mit der Fraktionierung erfolgt eine Online-Spektroskopie (UV / MS). Abschließend erfolgt eine Isolierung der biologisch aktiven Stoffe zur umfassenden strukturellen und pharmakologischen Charakterisierung und Beschreibung der Wirkprinzipien [159].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC zur Auffindung von biologisch aktiven Stoffen in Whiskyproben gezeigt werden. Für diese Charakterisierung wurden physikalische, chemische und biologische Detektionsverfahren eingesetzt. Aufgrund der Eigenheit beider chromatographischen Verfahren, mit denen flüchtige Stoffe nicht analysiert werden können, weil sie beim Auftragen auf die HPTLC-Platten verdunsten, sollten die Whiskys nicht über ihre flüchtigen sondern über ihre nichtflüchtigen Inhaltsstoffe charakterisiert werden.

Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lagerungszeit vor Abfüllung, den Verbraucherpreisen der Whiskys und der Anzahl der biologisch aktiven Stoffe in den Whiskys gibt. Da im Normalfall nicht flüchtige Stoffe nicht destillierbar sind, wird davon ausgegangen, dass die nichtflüchtigen Stoffe ausschließlich aus den Fässern stammen. Diese gelangen während der Lagerung durch Migration der Fässerinhaltsstoffe in den Whisky.

Um eine Abschätzung einer möglichen Korrelation zwischen Preis und nichtflüchtigen Inhaltsstoffe vornehmen zu können, wurden die folgenden fünf Whiskysorten unterschiedlicher Preisklassen und Qualitäten untersucht: Malt-Whiskeys Jameson 12 years old, Tullemore Dew und Paddy sowie der Scotch-Whisky Grant's. Zusätzlich wurde der Rückstand eines destillierten irischen Whiskeys (Kevin's-Extrakt) untersucht, von dem bekannt war, dass er ein hochpreisiger Malt-Whiskey einer irischen Brennerei war, der sehr lange gelagert wurde.

Definition Whisky

Whisky oder Whiskey (irische Bezeichnung) ist eine Spirituose, die durch Destillieren von Getreidemaische gewonnen wird und mindestens drei Jahre in Holzfässern mit einem Fassungsvermögen von 700 Litern oder weniger gereift ist. Der Mindestalkoholgehalt von Whisky beträgt 40 %. Eine deklarationspflichtige Färbung des Whiskys ist erlaubt [160].

Prinzip der Whisky-Herstellung

Die Herstellung von Whisky gliedert sich in folgende Arbeitsgänge [160, 161, 162]:

Mälzen:	Gerste wird angekeimt, um aus der Stärke mittels Amylasen Zucker zu
	produzieren (Zusätzlich können andere natürliche Enzyme zugesetzt
	werden.).
	Dazu wird die Gerste in Wasser eingeweicht bis der Keimvorgang beginnt.
	Die Keimung wird durch Trocknung der Keimlinge in der Hitze (Inaktivie-
	rung der Amylasen) unterbrochen. Das Produkt wird als Malz bezeichnet.
Maischen:	Das Malz wird geschrotet und anschließend mit warmem Wasser
	gemischt. Dadurch wird der Zucker gelöst. Die Mischung wird filtriert.
	Das Filtrat wird als Würze bezeichnet.
Vergären:	Während des Gärvorgangs wird der Zucker der Würze durch Hefen in
	Alkohol umgewandelt.
Destillation:	Die vergorene Würze wird zweistufig in einer Brennblase rektifiziert oder
	in einer kontinuierlichen Kolonnenapparatur mit weniger als 94,8 % vol.
	Alkohol destilliert, so dass das Destillationserzeugnis das Aroma und den
	Geschmack der verwendeten Ausgangsstoffe aufweist.
Reifung:	Abhängig von der Qualität des Whiskys reifen die Destillate üblicherweise
	zwischen drei und zwölf Jahren in Eichenfässern.

Qualität von Whiskys

Es gibt verschiedene Qualitäten von Whiskys, die sich in der Herstellung, im Verschnitt und in der Herkunft der Whiskysorten unterscheiden und durch folgende Bezeichnungen im Whiskynamen gekennzeichnet werden können [160, 161, 162]:

Grain Whisky: Getreidewhisky

Bourbon: Mindestens 51 % Maisdestillat

Single:	Whisky wurde in einer Brennerei hergestellt und nicht verschnitten.
Single / Single:	Whisky aus einem Brenndurchlauf, der in identischen Fässern gelagert wurde und nicht verschnitten wurde.
Malt:	Ausschließlich Gerste wird zur Herstellung verwendet. Die Reifung dauert mindestens drei Jahre im Eichenfass.
Straight:	Unverschnittener Whisky
Blend:	Verschnittene Whiskys, Mischung von Grain- und Maltwhisky. Auch als "vatted malt" bezeichnet, wenn die Whiskys aus verschiedenen Destillerien kommt.
Scotch Whisky:	Herkunftsbezeichnung.
Irish Whiskey:	Herkunftsbezeichnung.
Whisky español:	Herkunftsbezeichnung.
Zusätzlich kann d	ie Lagerungszeit vermerkt sein.

2.7 Absicherung der analytischen Ergebnisse - Statistik -Fehlerabschätzung

Um Analysenergebnisse beurteilen zu können, werden statistische Methoden verwendet, die eine Aussage zur Qualität eines gewonnenen Analysenergebnisses liefern können.

Die Tatsache, dass alle Messungen mit einem Fehler behaftet sind, hat als Konsequenz, dass Analysenergebnisse ebenfalls einen Fehler in sich tragen [163]. Die Ursachen der Fehler können vielfältig sein.

Bei der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln können während der Probenahme, der Probenaufarbeitung, einer eventuellen Derivatisierung, der Chromatographie und der Detektion Fehler auftreten. Diese Fehler werden als Zufallsfehler bezeichnet und lassen sich als Standardabweichung der Gesamtanalyse ausdrücken. Darüber hinaus gibt es systematische Fehler, die sich in der Wiederfindungsrate eines analytischen Verfahrens ausdrücken.

Zu den Aufgaben eines Analytikers gehört es, den Zufallsfehler zu quantifizieren und systematische Fehler weitgehend zu eliminieren.

Um den Gesamtfehler des Analysenverfahrens möglichst klein zu halten, ist es sinnvoll, die Fehlerquellen und ihren Einfluss auf den Gesamtfehler zu kennen.

Häufig kann der Fehler einer Probenahme nur unzureichend quantifiziert werden. Bei der Untersuchung von Obst und Gemüse wird er gering gehalten, wenn das vorgeschriebene Probennahmeverfahren nach §35 LMBG angewandt wird. Es entspricht den Regelungen der EG-Richtlinie vom 24.07.1979 [164].

Die Bestimmung der Fehler der Probenaufarbeitung gestaltet sich recht schwierig, da sich lediglich einzelne Parameter untersuchen lassen. Volumen- oder Gewichtsfehler sind z. B. leicht zu ermitteln. Verluste des Analyten lassen sich jedoch nicht direkt bestimmen; sie können nur aus dem Gesamtfehler der Analyse und der Kenntnis der Einzelfehler bei der Derivatisierung, der Chromatographie und der Detektion abschätzt werden.

Der Fehler als Folge der Derivatisierung wird durch die Ermittlung der Standardabweichung nach Vermessung der parallel derivatisierten Standardlösungen bestimmt.

Die auftretenden Fehler bei der Chromatographie und der Detektion sind sehr gut bestimmbar. Durch Bestimmung der Standardabweichung bei der Vermessung einer Standardlösung mittels GC / MS können die Fehler der Einspritzung, der Chromatographie und der Detektion (wie der Fehler der Ionisation) ermittelt werden. Der Einfluss der Matrix bleibt dabei unberücksichtigt.

Um die Leistungsfähigkeit einer Analysenmethode im Bereich geringster Konzentrationen abschätzen und mit anderen Analysenverfahren vergleichen zu können, werden die qualitative Nachweisgrenze und die quantitative Bestimmungsgrenze ermittelt. Es existieren mehrere Definitionen für die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze, die seit langem kontrovers diskutiert werden [165].

Das sogenannte <u>Eichkurvenverfahren</u> [166] hat den Vorteil, dass neben der Messung die Aufarbeitung der Probe und damit auch die Eigenarten der jeweiligen Probenmatrix berücksichtigt werden. Dabei wird rückstandsfreies Probenmaterial in verschiedenen Konzentrationen im Bereich der vermuteten Bestimmungsgrenze bis zur zehnfachen Bestimmungsgrenze dotiert und die Probe in einer Dreifachbestimmung aufgearbeitet und analysiert. Nach graphischer Darstellung der Soll-Werte (Standards) mit den Ist-Werten (dotierte Proben) kann die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze abgeleitet werden.

Dabei werden folgende Forderungen an die Bestimmungsgrenze gestellt: Sie muss größer als die Nachweisgrenze sein und sich von dieser signifikant unterscheiden. Die Wiederfindungsrate muss an der Bestimmungsgrenze mindestens 70 % und höchstens 120 % betragen und der Variationskoeffizient darf nicht größer als 20 % sein.

Nachteilig ist, dass strenggenommen für jede Matrix, also eigentlich für jedes pflanzliche Lebensmittel, eine Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erforderlich ist.

Beim <u>Blindwertverfahren</u> [167] werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze allein aus der Streuung der Informationswerte von mehrfach analysierten Blindproben durch Multiplikation mit den empirischen Faktoren (k_n bzw. k_b) errechnet.

$y_n = \overline{a}_0 + k_n x \sigma_b$ b. z. w. $y_b = \overline{a}_0 + k_b x \sigma_b$	y _n Nachweisgrenze y _b Bestimmungsgrenze \overline{a}_0 mittleres Blindwertsignal σ_b Standardabweichung des mittleren Blindwertsignals k_n bzw. k_b empirischer Faktor
---	--

Gleichung 2-5: Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach dem Blindwertverfahren

Г

Die Werte für den empirischen Faktor werden in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Sie schwanken für k_n und k_b und liegen bei 4,65 bzw. bei 14,1. Beim <u>Untergrundverfahren</u> [168] wird die Nachweisgrenze als die absolute Masse des Analyten angegeben, die ein Signal erzeugt, das die doppelte Höhe des Rauschsignals überschreitet.

Eine weitere statistische Größe, die sogenannte "untere Grenze des praktischen Arbeitsbereiches", die bei zahlreichen Methoden der DFG-Methodensammlung [169] angegeben wird, kennzeichnet die niedrigste Rückstandskonzentration, die bei der Ausarbeitung einer Methode verwendet wurde und die zufriedenstellende quantitative Ergebnisse lieferte. Die Angabe einer unteren Arbeitsbereichsgrenze ist nur sinnvoll, wenn sie größer als die Bestimmungsgrenze ist. Die Nachweisgrenze wird in diesem Fall lediglich abgeschätzt.

Vorteil der Angabe einer unteren Grenze des praktischen Arbeitsbereiches ist, dass als zusätzliche Bedingung die Identität von Proben- und Vergleichsspektrum eingeführt werden kann. Dabei wird der Analyt nicht nur im Absorptionsmaximum (TLC bzw. HPLC / UV) oder in der Ionenspur mit der größten Intensität (HPLC bzw. GC / MS scan) sondern auch in den Bereichen geringer Intensität nachgewiesen.
3 Experimenteller Teil – Analysenmethoden

3.1 Probenaufarbeitung

3.1.1 <u>Probennahme</u>

Vor der Extraktion von Pestizid-Rückständen aus einer zu untersuchenden Probe muss zunächst eine repräsentative Probennahme erfolgen. Diese wurde durch die Beachtung der EU-Richtlinie zur Feststellung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren für die amtliche Kontrolle der Rückstände von Schädlingsbekämpfungsmittel auf und in Obst und Gemüse (79/700/EWG) sichergestellt, die in der amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG umgesetzt wurde [170].

3.1.2 <u>Extraktion</u>

Dieser Aufarbeitungsschritt dient der Extraktion der Pestizid-Rückstände aus dem pflanzlichen Lebensmittel und ihrer Überführung aus der wässrigen in eine organische Phase. Für die Benzoylharnstoffe und das Iprodion sowie für die Gruppe der basischen Fungizide und die Carbamate mussten die Extraktionsparameter den physiko-chemischen Eigenschaften der Substanzen angepasst werden.

Zur Extraktion der basischen Fungizide und der Carbamate wurde der im ersten Extraktionsschritt gewonnenen wässrige Acetonextrakt auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt, damit auch die basischen Pestizide durch Flüssig / Flüssig-Extraktion in die organische Phase überführt werden konnten.

Die Flüssig / Flüssig-Extraktion wurde mit Dichlormethan oder einem Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch durchgeführt. Die Extraktion mit dem Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch hat den Vorteil, dass keine chlorierten Lösungsmittel verwendet werden. Außerdem wird dabei Zeit gespart, weil die Extraktion in einem Becherglas durchgeführt werden konnte (sogenannte Ein-Topf-Methode).

Benzoylharnstoffe und Iprodion

• Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan

Die Extraktion erfolgte entsprechend der DFG-Multimethode S19 [1]. Abweichend von der Originalmethode wurden die Probenmengen von 100 g auf 20 g reduziert.

Entsprechend konnte bei der Extraktion mit einem fünftel des Lösungsmittelvolumens gearbeitet werden.

Etwa 100 g der Laborprobe wurden gut zerkleinert und gemischt. Davon wurden 20,0 g als Analysenprobe in einem Becherglas (250 ml) unverzüglich mit 40 ml Aceton versetzt und 30 s lang mit einem Rührstab homogenisiert. Bei der Extraktion der Proben musste ein Aceton / Wasser-Verhältnis von 2:1 eingehalten werden, d. h., unter Einberechnung des Wassergehaltes von x/20 g Probe wurde die Probe mit (20 - x) g Wasser versetzt. Nach Zusatz von 2 bis 3 g Celite wurde die Probe nochmals 30 s homogenisiert.

Das Homogenisat wurde über einen Büchnertrichter durch ein mit Aceton angefeuchtetes Filterpapier mit leichtem Unterdruck filtriert. Der Mixstab und das Becherglas wurden mit 10 ml Aceton gespült und diese anschließend über den Filterrückstand filtriert. Das Filtrat wurde in einen mit 5 g Natriumchlorid bestückten 250 ml Scheidetrichter überführt. Die Extraktion erfolgte durch zweiminütiges, kräftiges Schütteln mit den zum Spülen der Saugflasche benutzten 25 ml Dichlormethan.

Nach circa 40 Minuten wurde die untere organische Phase in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff abgelassen und etwa 30 min über circa 5 g Natriumsulfat getrocknet. Danach wurde die organische Phase in einen 250 ml Rundkolben filtriert, wobei Erlenmeyerkolben und Filter portionsweise mit 20 ml Dichlormethan nachgespült wurden. Das Filtrat wurde bei etwa 40 °C am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingeengt. Das verbliebene Lösungsmittel wurde vorsichtig mittels eines Stickstoffstromes abgeblasen. Der Abdampfrückstand wurde in einem für den nächsten Arbeitsschritt geeigneten Lösungsmittel gelöst.

• Flüssig / Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch

Bei dieser Extraktion wurde auf das chlorierte Lösungsmittel verzichtet und stattdessen mit einem Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch gearbeitet. Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an die DFG-Methode S19-online [27]. Abweichend hiervon wurde die Extraktion als sogenannte Ein-Topf-Methode durchgeführt. Die eingesetzte Probenmenge wurde wie bereits zuvor beschrieben auf ein fünftel reduziert.

Etwa 100 g der Laborprobe wurden gut zerkleinert und gemischt. Davon wurden 20,0 g als Analysenprobe in einem Becherglas (250 ml) unverzüglich mit 40 ml Aceton versetzt und 30 s lang mit einem Rührstab homogenisiert. Bei der Extraktion der Proben musste ein Aceton / Wasser-Verhältnis von 2:1 eingehalten werden, d. h., unter Einberechnung des Wassergehaltes von x/20 g Probe wurde die Probe mit (20 - x) g Wasser versetzt.

Nach Zusatz von 2 bis 3 g Celite wurde nochmals 30 s homogenisiert.

Das Homogenisat wurde mit 20 ml eines Cyclohexan / Ethylacetat-Gemisches (1+1/w+w) im Becherglas 2 min homogenisiert (Rührstab). Nach 60 min wurden 40 ml der (oberen) organischen Phase dekantiert und mit 20 g Natriumsulfat getrocknet. Der Extrakt wurde bei 40 °C Wasserbad-Temperatur bis zum wässrigen Überstand eingeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Ethylacetat unter zu Hilfenahme eines Ultraschallbades gelöst. Danach wurden der Lösung 1 g eines Natriumsulfat / Natriumchlorid-Gemisches und 1 ml Cyclohexan zugesetzt. Die Mischung wurde kräftig vermischt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert.

Basische Fungizide und Carbamate

• Flüssig / Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan (angepasste DFG-Multimethode S19)

Um die basischen Pestizide reproduzierbar und in höherem Maß extrahieren zu können, wurde, abweichend von der DFG-Multimethode S19, der pH-Wert des acetonischen Extraktes mit Natriumcarbonat auf einen pH-Wert von etwa 8,5 eingestellt.

Etwa 100 g der Laborprobe wurden gut zerkleinert und gemischt. Davon wurden 20,0 g als Analysenprobe in einem Becherglas (250 ml) unverzüglich mit 40 ml Aceton versetzt und 30 s lang mit einem Rührstab homogenisiert. Bei der Extraktion der Proben musste ein Aceton / Wasser-Verhältnis von 2:1 eingehalten werden, d. h., unter Einberechnung des Wassergehaltes von x/20 g Probe wurde die Probe mit (20 - x) g Wasser versetzt. Nach Zusatz von 2 g Natriumcarbonat und von 2 bis 3 g Celite wurde die Probe nochmals 30 s homogenisiert. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft, da abhängig von der Probenmatrix die Homogenisate unterschiedliche pH-Werte aufweisen können (z. B. Zitronen pH 2,5 und Äpfel pH 3,5). Gegebenenfalls wurde weiteres Natriumcarbonat zugefügt bis ein pH-Wert von 8,5 erreicht wurde (basischer Probenextrakt).

Der basische Probenextrakt wurde über einen Büchnertrichter durch ein mit Aceton angefeuchtetes Filterpapier mit leichtem Unterdruck filtriert. Der Mixstab und das Becherglas wurden mit 10 ml Aceton gespült und diese anschließend über den Filterrückstand filtriert.

Das Filtrat wurde in einen mit 5 g Natriumchlorid bestückten 250 ml Scheidetrichter überführt. Die Extraktion erfolgte durch zweiminütiges, kräftiges Schütteln mit den zum Spülen der Saugflasche benutzten 25 ml Dichlormethan.

Nach circa 40 Minuten wurde die untere organische Phase in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff abgelassen und etwa 30 min über circa 5 g Natriumsulfat getrocknet. Danach wurde die organische Phase in einen 250 ml Rundkolben filtriert, wobei Erlenmeyerkolben und Filter portionsweise mit 20 ml Dichlormethan nachgespült wurden. Das Filtrat wurde bei etwa 40 °C am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingeengt. Das verbliebene Lösungsmittel wurde vorsichtig mittels eines Stickstoffstromes abgeblasen. Der Abdampfrückstand wurde in einem für den nächsten Arbeitsschritt geeigneten Lösungsmittel gelöst.

• Flüssig / Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch

Wie bei der Flüssig / Flüssig-Extraktion von Benzoylharnstoffen mit Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch wurde bei dieser Extraktion auf das chlorierte Lösungsmittel verzichtet und abweichend von DFG-Methode S19-online die eingesetzte Probenmenge auf ein fünftel reduziert. Auch hier erfolgte eine pH-Wert-Einstellung des acetonischen Extraktes wie bei der oben beschriebenen Extraktion der basischen Fungizide und der Carbamate.

Etwa 100 g der Laborprobe wurden gut zerkleinert und gemischt. Davon wurden 20,0 g als Analysenprobe in einem Becherglas (250 ml) unverzüglich mit 40 ml Aceton versetzt und 30 s lang mit einem Rührstab homogenisiert. Bei der Extraktion der Proben musste ein Aceton / Wasser-Verhältnis von 2:1 eingehalten werden, d. h., unter Einberechnung des Wassergehaltes von x/20 g Probe wurde die Probe mit (20 - x) g Wasser versetzt.

Nach Zusatz von 2 g Natriumcarbonat und von 2 bis 3 g Celite wurde die Probe nochmals 30 s homogenisiert. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft, da abhängig von der Probenmatrix die Homogenisate unterschiedliche pH-Werte aufweisen können (z. B. Zitronen pH 2,5 und Äpfel pH 3,5). Gegebenenfalls wurde weiteres Natriumcarbonat zugefügt bis ein pH-Wert von 8,5 erreicht wurde (basischer Probenextrakt).

Der basische Probenextrakt wurde mit 20 ml eines Cyclohexan / Ethylacetat-Gemisches (1+1/w+w) im Becherglas 2 min homogenisiert (Rührstab). Nach 60 min wurden 40 ml der (oberen) organischen Phase dekantiert und mit 20 g Natriumsulfat getrocknet. Der Extrakt wurde bei 40 °C Wasserbad-Temperatur bis zum wässrigen Überstand eingeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Ethylacetat unter Hilfenahme eines Ultraschallbades gelöst. Danach wurde der Lösung 1 g eines Natriumsulfat / Natriumchlorid-Gemisches und 1 ml Cyclohexan zugesetzt. Die Mischung wurde kräftig vermischt und anschließend filtriert.

3.1.3 <u>Aufreinigung (Clean-up)</u>

3.1.3.1 Präparative Gelpermeationschromatographie

Die durch Flüssig / Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte wurden mittels der präparativen GPC gereinigt. Dazu wurde der getrocknete Extrakt (DFG-Multimethode S19) in 10 ml Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisches (1+1/v+v) gelöst oder der Ethylacetat / Cyclohexan-Extrakt (DFG-Multimethode S19-online [27]) mit 8 ml eines Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch (1+1/v+v) verdünnt und in der im folgenden beschriebenen GPC-Anlage aufgereinigt.

Dazu wurden 5 ml Probe auf die GPC-Säule gegeben und mit 190 ml eines Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisches (1+1/v+v) eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen, wobei sich die Pestizide in der in Tabelle 3-1 aufgeführten zweiten GPC-Fraktion, der Pestizid-fraktion, befinden.

Die verwendete GPC-Anlage bestand aus einer GPC-Säule mit einer 5-ml-Probenschleife, einer Fraktioniereinheit und einem druckfesten Lösungsmittelvorratsbehälter. Die GPC-Säule hatte einen Innendurchmesser von 254 mm und eine Länge von 58 cm und war mit Bio Beads S-X3, 200 – 400 mesh in einer Höhe von etwa 310 mm gefüllt. Als mobile Phase diente ein Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch (1+1/v+v), das mit Hilfe eines Stickstoffstromes von etwa 4,0 ml/min durch die Säule gespült wurde. Mit Hilfe des Stickstoffstromes wurde im Lösungsmittelbehälter ein Druck von 1,4 bis 2,1 bar aufgebaut.

Die Elutionsbereiche der GPC-Fraktionen wurden routinemäßig überprüft; sie sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1:Elutionsbereiche der GPC-Fraktionen

	GPC-Fraktion	Elutionsbereich [*]
1	höhermolekulare Probenbestandteil-Fraktion	0 - 95 ml
2	Pestizidfraktion	95 - 175 ml
3	Waschfraktion	175 - 190 ml

Bei der Analytik der Benzoylharnstoffe kommt es auf Grund der Größe der Pestizide zu einer Verschiebung des Elutionsbereiches, da Chlorfluazuron und Flufenoxuron im Elutionsbereich von 90 – 175 ml eluieren.

3.1.3.2 Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule (MKGF)

Herstellung der Minikieselgel-Säule

Das zur Herstellung der Minikieselgel-Säule verwendete Kieselgel wurde im Trockenschrank mindestens 5 h bei 130 °C getrocknet. Zur Deaktivierung wurde dem abgekühlten Kieselgel tropfenweise 1,5 % Wasser zugesetzt. Das Gemisch wurde für eine gleichmäßige Deaktivierung 2 min intensiv per Hand und danach 2 h mit der Schüttelmaschine geschüttelt. Das gebrauchsfertige, deaktivierte Kieselgel musste im Exsikkator dicht verschlossen aufbewahrt werden und war zwei Monate verbrauchsfähig.

Das für die Minikieselgel-Fraktionierung verwendete Chromatographierohr wurde mit wenig fettfreier Watte oder Glaswolle verschlossen und in ein mit n-Hexan gefülltes Reagenzglas gestellt. Der Wattestopfen wurde durch Drücken mit einer Pasteurpipette von Luftblasen befreit. Dann wurden 5 mm ausgeglühter Seesand, 1,0 g deaktiviertes Kieselgel und 5 bis 10 mm Natriumsulfat nacheinander langsam über den Wattestopfen geschichtet. Beim Einstreuen der einzelnen Schichten war es besonders wichtig, die Bildung von Luftblasen zu verhindern, damit eine reproduzierbare Chromatographie erzielt werden kann.

Zur Reinigung wurden über die vorbereitete Säule 5 ml n-Hexan gegeben. Das Eluat wurde verworfen. Die einsatzfähigen Minikieselgel-Säulen konnten einen Tag in n-Hexan stehend aufbewahrt werden.

Aufreinigung / Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule ohne Derivatisierung

Die Fraktionierung erfolgte entsprechend der S19-Methode. Dabei wurden fünf Fraktionen erhalten, die durch Elution der Minikieselgel-Säule mit Lösungsmittelgemischen steigender Polarität gewonnen wurden. Gegebenenfalls wurden die Fraktionen 1 und 2 bzw. 3 und 4 der Minikieselgel-Aufreinigung zusammengefasst und die erhaltenen Fraktionen bis zur Trockne eingeengt. Für die Bestimmung mittels GC / ECD-NPD und TLC / AMD wurden die Extrakte in 1 ml Toluol aufgenommen; für die Bestimmung mittels HPLC, AMD-TLC oder der Kopplung HPLC / TLC / AMD wurden die Extrakte in 200 µl bis 2000 µl Methanol aufgenommen und anschließend membranfiltriert.

Aufreinigung / Fraktionierung an einer Minikieselgel-Säule nach Pentafluorbenzylierung

Zur Reinigung der mit PFB-Br derivatisierten Extrakte wurden die gleichen Minikieselgel-Säulen wie in der S19-Methode eingesetzt. Der derivatisierte Extrakt wurde auf die vorbereitete Säule gegeben und die Säule anschließend mit 2 ml n-Hexan gewaschen. Die Elution erfolgte mit 8 ml eines Toluol / Aceton-Gemisches (3+1/v+v). Das dabei erhaltene Eluat wurde nach Zugabe von 50 µl Dodekan (Keeper) im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml einer Aldrin-Lösung (0,01 mg/ml Toluol), aufgenommen und der GC-Analyse zugeführt; das Aldrin diente als interner Standard.

3.1.3.3 Festphasenextraktion an RP-Phasen

Benzoylharnstoffe

Zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen wurde die bei der S19 Methode erhaltene Fraktion 3 (Minikieselgel-Fraktionierung) einer weiteren Aufreinigung über eine RP-Festphase zugeführt. Für diese Extraktion wurden Festphasensäulen mit 0,1 g einer RP-Phase (NH₂ = 0,1 g Bakerbond Amino (NH₂) 7028-00, 40 μ m LC Packing) verwendet. Dieser Reinigungsschritt kann als Filtration angesehen werden, bei der nicht die Analyten sondern ein erheblicher Teil der Matrixbestandteile an der Festphase absorbieren.

Für die Extraktion wurde die Festphase zunächst mit 5 ml Toluol konditioniert. Dann wurde der Kieselgelextrakt der 3. Fraktion [Toluol / Aceton-Gemisch (95+5/v + v)] über die Festphasensäule gegeben und mit 2,5 ml eines Toluol / Aceton-Gemisches (95+5/v + v) eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol aufgenommen.

Basische Fungizide

Der zur Bestimmung von basischen Pestiziden gewonnene basische in Aceton gelöste Probenextrakt (siehe S. 77) wurde an einer RP-C18-Phase (1 g RP Kieselgel Art. Nr. Y 421 von Knauer) gereinigt. Vor der Festphasen-Extraktion wurden im basischen Probenextrakt mindestens 2 g Natriumchlorid gelöst.

Die Festphase wurde mit je 4 ml Cyclohexan, Dichlormethan, Methanol und Wasser (pH-Wert ~ 8,5) konditioniert. Der Probenextrakt wurde auf die SPE-Säule gebracht und die Säule danach mit 50 ml eines Wasser / Methanol-Gemisches (20 % Methanol, pH 8,5) gewaschen. Zur Trocknung der Säule wurden 4 ml Cyclohexan mit Unterdruck durch die Säule gesaugt (Verdrängung der wässerigen Phase durch eine mit Wasser nicht mischbare organische Phase). Die getrocknete SPE-Säule wurde mit 5 ml eines Cyclohexan / Dichlormethan-Gemisches (9 + 1/v + v) gewaschen. Die Elution erfolgte nacheinander mit 4 ml Dichlormethan und 4 ml Methanol. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und der

Rückstand in 2 ml Methanol (für AMD-TLC) oder in 2 ml n-Hexan (für Minikieselgel-Fraktionierung) aufgenommen.

3.2 Derivatisierung

3.2.1 Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie

Bei der dünnschichtchromatographischen Bestimmung von Benzoylharnstoffen wurde die postchromatographische Derivatisierung mit den drei Farbreagenzien Chlor / Kaliumiodid / Stärke, Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid und Chlor / o-Toluidin zur Detektion eingesetzt. Dabei werden die Benzoylharnstoffe in Chloramine überführt, die mit Jod, o-Tolidin oder o-Toluidin Farbstoffe bilden. Beim Tauchen wurde die HPTLC-Platte wahlweise ohne Hilfsmittel oder mit Hilfe eines automatischen Tauchgerätes (Fa. Desaga) bei maximaler Geschwindigkeit in eine 400-ml-Flachküvette mit der jeweiligen Tauchlösung abgesenkt und sofort wieder herausgezogen.

3.2.1.1 Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / Kaliumiodid / Stärke-Reagenz

Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach Jork et al. [171].

Die entwickelten Dünnschichtplatten wurden zur Vorbereitung der Derivatisierung in einem kalten Luftstrom getrocknet. Danach wurden sie 1 bis 5 min in eine Chlorgasatmosphäre gestellt. Anschließend wurden die Platten 30 min im Warmluftstrom von überschüssigem Chlor vollkommen befreit und anschließend 1 s in die Tauchlösung a getaucht.

Herstellung der Tauchlösung a und der Chlorgasatmosphäre

Chlorgasatmosphäre:	0,5 g Kaliumpermanganat und etwa 5 ml 25 %ige Salzsäure
	wurden in eine Hälfte einer Doppeltrogkammer gefüllt und
	die Kammer sofort geschlossen. Zur schnellen
	Kammersättigung wurde die Kammer vorsichtig geschwenkt;
	nach 10 min war die Kammer einsatzbereit. Bei Verwendung
	einer einfachen Trogkammer wurde das KMnO ₄ und die HCl
	in ein 20-ml-Becherglas gefüllt.
Tauchlösung a:	250 mg Kaliumiodid wurde in 25 ml Wasser gelöst, mit einer
	Lösung von 750 mg Stärke (lösliche Stärke nach Zulkowsky)

in 25 ml Wasser gemischt und mit 30 ml Ethanol (99,5 %) verdünnt.

3.2.1.2 Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid-Reagenz

Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach Jork et al. [172].

Für die Derivatisierung mit dem Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid-Reagenz wurden die im Kaltluftstrom getrockneten Dünnschichtplatten 30 s bis 1 min in eine Chlorgasatmosphäre (siehe 3.2.1.1) gestellt. Anschließend wurden die Platten 30 min im Warmluftstrom von überschüssigem Chlor vollkommen befreit und anschließend 3 s in die Tauchlösung b getaucht und 5 min im Warmluftstrom getrocknet.

Herstellung der Tauchlösung b

Tauchlösung b:	Lösung II wurde mit Lösung I vereint und mit 80 %igem				
	2-Propanol auf 500 ml aufgefüllt.				
Lösung I:	0,5 g o-Tolidin wurde in 5 ml Essigsäure (100 %) gelöst und mit 80 %igem 2-Propanol auf 250 ml aufgefüllt.				
Lösung II:	2 g Kaliumiodid wurden in 10 ml Wasser gelöst.				

3.2.1.3 Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit Chlor / o-Toluidin-Reagenz

Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach Jork et al. [173].

Die im Kaltluftstrom getrockneten Dünnschichtplatten wurden 5 min in eine Chlorgasatmosphäre (siehe 3.2.1.1) gestellt. Anschließend wurden die Platten 30 min im Warmluftstrom von überschüssigem Chlor vollkommen befreit, dann 1 s in die Tauchlösung c getaucht und anschließend einige Minuten an der Luft getrocknet.

Herstellung der Tauchlösung c

Tauchlösung c:2,5 ml o-Toluidin wurden in einer Mischung von 45 mlDiethylether und 5 ml Eisessig gelöst.

3.2.2 Derivatisierung in der Gaschromatographie

3.2.2.1 Pyrolytische Methylierung der Benzoylharnstoffe mit Trimethylsulfoniumhydroxid

Für die gaschromatographische Bestimmung der Benzoylharnstoffe wurden diese prächromatographisch mit Trimethylsulfoniumhydroxid zu Methylderivaten umgesetzt. Die Derivatisierung erfolgte durch pyrolytische Methylierung direkt im Injektorsystem des Gaschromatographen. Dies wurde durch das Zusammenführen der Probenlösung und der TMSH-Reagenzlösung im Injektor erreicht. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Zapf [174].

Durchführung

Es wurden Standardlösungen mit einer Konzentration von etwa 0,06 μ g des jeweiligen Benzoylharnstoffs pro μ l Methanol eingesetzt. Davon wurden 0,1 ml der Standardlösung mit 10 μ l der TMSH-Reagenzlösung in ein Probenfläschchen überführt und zur Online-Derivatisierung eingesetzt (129 ng abs.).

Herstellung der TMSH-Reagenzlösung

Das TMSH-Reagenz wurde nach Arens et al. [175] mit Hilfe einer Anionenaustauscher-Säule hergestellt. Dazu wurden zunächst 5 g eines stark alkalischen Anionenaustauschers (Amberlyst A-26) in einer Säule über 1 h mit 40 ml 1 N Natronlauge aktiviert. Anschließend wurde die Säule mit Wasser neutralisiert und mit 25 ml Methanol gewaschen. 1,025 \pm 0,025 g Trimethylsulfoniumiodid wurden in 15 ml auf 50 °C erwärmtem Methanol gelöst. Die auf 50 °C gehaltene Lösung wurde in kleinen Portionen über die Austauschersäule gegeben, die mit 10 ml Methanol nachgespült wurde. Das Eluat mit einem TMSH-Gehalt von 0,2 mol/l wurde portionsweise in braunen 1,5 ml-Glasprobenfläschchen mit Schraubverschluss und PTFE beschichtetem Septum abgefüllt und bei 4 °C gelagert.

3.2.2.2 Pentafluorbenzylierung der basischen Fungizide und der Carbamate

Die basischen Fungizide und Carbamate wurden für die gaschromatographische Bestimmung mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. Durch diese Derivatisierung werden die Substanzen hitzestabil und damit der Gaschromatographie zugänglich. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Anastassiades [176, 177, 178].

Durchführung

Zur Derivatisierung wurden 0,2 ml des Probenextraktes bzw. der Standardlösungen in einem 1,5 ml GC-Probenfläschchen zur Trockne eingeengt. Der Trocknungsrückstand wurde in 0,4 ml Acetonitril aufgenommen und mit 0,1 ml Benzimidazol (0,01 mg/ml Acetonitril), das als Derivatisierungsstandard diente, versetzt. Danach wurden in die GC-Probenfläschchen 0,1 ml der Kaliumcarbonat-Lösung und 0,2 ml der PFB-Br-Lösung hinzugefügt. Das Probenfläschchen wurde nach dem Verschließen kräftig geschüttelt und 2 h auf 70 °C erwärmt. Anschließend wurden die Probenfläschchen wieder geöffnet und das Lösungsmittel nach Zugabe von 50 µl Dodecan als Keeper mittels eines Stickstoffstromes abgeblasen. Der Derivatisierungsrückstand wurde für ein anschließendes Clean-up an einer Minikieselgel-Säule in circa 1 ml n-Hexan aufgenommen (siehe 3.1.3.2).

Herstellung der PFB-Br-Lösung und der Kaliumcarbonat-Lösung

Für die Derivatisierung wurden eine 15 %ige Pentafluorbenzylbromid-Lösung in Acetonitril (v/v) und eine 25 %ige Kaliumcarbonat-Lösung in Wasser (v/v) hergestellt.

3.3 Endpunktbestimmung

Für die quantitative Auswertung der Ergebnisse wurde in der Dünnschichtchromatographie (TLC) und in der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit einer externen Ein-Punkt-Kalibrierung oder einer externen Kalibrierung gearbeitet. In der Gaschromatographie erfolgte die quantitative Bestimmung über einen internen Standard, da in der Gaschromatographie die Auflösung wesentlich größer als bei der TLC und der HPLC ist und somit keine Interferenzen zwischen dem internen Standard und der Matrix oder den Analyten zu erwarten war.

3.3.1 HPTLC / AMD und ihre Kopplung mit der HPLC

Für die Untersuchung mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC wurde der durch die jeweilige Extraktion gewonnene Trockenrückstand in bis zu 2 ml Lösungsmittel gelöst. Dafür wurde bei Anwendung der TLC und der RP-HPLC Methanol verwendet und bei Anwendung der GPC-HPLC ein Gemisch von Ethylacetat und Cyclohexan (1 + 1/v + v). Der gelöste Extrakt wurde entweder direkt auf die HPTLC-Platte aufgetragen oder nach Filtration durch einen Nylon-Membranfilter (0,45 µm) in die HPLC injiziert.

3.3.2 <u>Remissionsspektrometrische Detektion in der TLC</u>

Damit die Analyten durch Spektrenvergleich identifiziert werden konnten, wurde für die remissionsspektrometrische Messung zunächst eine Spektrenbibliothek mit Hilfe der Camag-Software Cats 3 Version 3.16 erstellt. Dazu wurden 50, 200 und 500 ng jeder Substanz auf eine HPTLC-Platte appliziert. Nach Entwicklung der TLC-Platte wurde sie mit dem TLC-Scanner im Multiwellenlängenmodus vermessen. Da nur von integrierten Peaks mit der Camag-Software Spektren aufgenommen werden können, wurde das Densitometer (TLC-Chromatogramm) der Wellenlänge integriert, bei der alle Pestizide nachweisbar waren, und anschließend die Platte im Spektrenmodus vermessen.

Zur Bestimmung der Detektionsgrenzen wurden unterschiedliche Mengen der Pestizide auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und die Platte mit dem jeweiligen Lösungsmittel-Gradienten oder isokratisch entwickelt. Die Detektion erfolgte dann im Absorptionsmaximum des jeweils untersuchten Pestizids. Die kleinste Menge, die ein eindeutiges UV-Spektrum zeigt, wurde als Detektionsgrenze angesehen.

3.3.3 Biologische Detektion mit Pilzen in der TLC

Für die Detektion von Fungiziden mit biologischen Verfahren wurde als chromatographisches System die TLC eingesetzt. Dazu erfolgte die Entwicklung von 10 x 10 cm HPTLC-Platten (siehe Abschnitt 3.3.7.6) oder durch Entwicklung von 10 x 20 cm HPTLC-Platten in der AMD-Kammer mit einem Lösungsmittel-Gradienten (siehe Abschnitt 3.3.7.5).

Die HPTLC-Platten wurden nach der Entwicklung gründlich getrocknet, da Lösungsmittelreste biologische Detektionen in der Regel stören.

Abweichend von den in Abschnitt 3.3.7.1 vorgestellten Geräteparametern wurden die Bahnabstände vergrößert. Die Modifikation der Auftragepositionen diente zur Aufnahme einer Blindbahn (Plattenuntergrund). Diese wird für das Arbeiten mit der Untergrundkompensation^a benötigt, mit der bei der biologischen Detektion gearbeitet wurde.

Auftragepositionen bei der TLC und der HPTLC / AMD:

8 mm Höhe, 6 mm Bahnbreite, 16 mm Bahnabstand der Messbahnen, 8 mm Bahnabstand zwischen Messbahn und Blindbahn

Auftragepositionen bei Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD:

8-16 mm Höhe, 6 mm Bahnbreite, 16 mm Bahnabstand,8 mm Bahnabstand zwischen Messbahn und BlindbahnDie fraktionierte Auftragung des Eluates erfolgte variabel (siehe 3.3.7.7).

3.3.3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Steriles und keimfreies Arbeiten

Die für die mikrobiologische Detektion verwendeten Pilzkulturen mussten zunächst gezüchtet werden. Dafür war es notwendig, steril zu arbeiten, um die Nährmedien vor der Besiedlung mit anderen als den gewünschten Keimen zu schützen. Deshalb wurde in möglichst keimarmen Räumen gearbeitet. Jede Luftbewegung sollte vermieden werden, da sie ein Aufwirbeln von Keimen verursachen könnte (Fenster und Türen geschlossen halten, Klimaanlagen und Abzüge nicht betreiben).

^a Im Modus Zweiwellenlängen-Messung (CATS-Software) werden neben der Probenbahn jeweils eine Untergrundbahn (Blindbahn) vermessen. Die Signale beider Bahnen werden bei der Integration voneinander subtrahiert. Mit dieser Methode lassen sich Einflüsse des Plattenuntergrundes bei der Integration eliminieren.

Um das Sedimentieren von in der Luft befindlichen Keimen zu vermeiden, wurde ein Bunsenbrenner verwendet. Die von ihm ausgestrahlte Wärme verursacht einen nach oben gerichteten Luftsog, der eventuell vorkommende Keime von der Arbeitsfläche entfernt.

Hände und Arbeitsflächen wurden vor und nach der Arbeit mit einer 2 %igen Zephirol-Lösung desinfiziert.

Die Impfinstrumente wurden vor und nach der Arbeit sterilisiert. Dazu wurden die Geräte, wie Impfnadeln, -ösen oder -lanzetten, vor Benutzung in die Bunsenbrennerflamme gehalten bis sie kurz aufglühten. Massivere Geräte, wie Pinzetten oder Drigalskispatel, wurden in Ethanol getaucht und anschließend abgeflammt. Die verwendeten Glasgefäße und Nährmedien wurden bei 121 °C autoklaviert. Benutzte Geräte und verbrauchte Platten wurden ebenfalls autoklaviert.

Überimpfen der Pilze aus der Stammkultur in Petrischalen

Die Stammkulturen der Pilze wurden auf Schrägagar-Kulturen in Reagenzgläsern gehalten. Beim Überimpfen der jeweiligen Kultur von dem Reagenzglas in eine mit Nährmedium gefüllte Petrischale wurde der Deckel der Petrischale seitlich etwas angehoben. Die Öffnung des Reagenzglases, aus dem ein Teil der Stammkultur entnommen wurde, wurde mit leichter Drehung kurz durch eine Bunsenbrennerflamme bewegt (Abflammen), um eine Kontamination mit fremden Keimen zu verhindern. Aus der Stammkultur wurde mit einem in der Flamme ausgeglühten und am oberen Teil der Schrägagar-Kultur abgekühlten Impfhaken einige Kubikmillimeter Agarstück ausgestochen und auf den Agar in der Petrischale überführt. Nach wiederholtem Abflammen wurde das Reagenzglas wieder verschlossen.

Herstellung der Konidiensuspension

Zur Gewinnung der Konidien mussten diese von dem Pilzmyzel in der Petrischale abgeschwemmt werden. Hierzu wurde eine Tensidlösung verwendet, da die hydrophoben Konidien sich damit gut vom Pilzmyzel trennen lassen. Es wurden circa 5 ml einer 0,01 %igen Triton X-Lösung auf die Oberfläche des Pilzmyzels aufgebracht. Die Flüssigkeit wurde mit dem Drigalskispatel verteilt, indem der Spatel mit sanftem Druck über das Pilzmyzel bewegt wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit den suspendierten Konidien mit einer sterilen Pipette abgenommen und in einen sterilen Erlenmeyer-Kolben überführt. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen.

Auszählen der Konidien

Die Konidien-Konzentration der Suspension wurde mit der Thoma-Kammer ausgezählt. Dazu wurden die beiden Stege des Objektträgers der Thoma-Kammer mit etwas Wasser befeuchtet. Das Deckglas wurde von der Seite aufgeschoben und so angedrückt, dass Newton'sche Ringe zu sehen waren. Dann wurde ein Tropfen der Konidiensuspension mit einer Pasteur-Pipette kurz vor dem Rand des Deckplättchens aufgebracht. Die Suspension wurde dadurch unter das Deckplättchen gezogen. Anschließend wurden unter dem Mikroskop jeweils acht Großquadrate ausgezählt. Davon wurde der Mittelwert gebildet. Betrug die Zahl der Konidien pro Großquadrat mehr als 80 Konidien, wurde die Lösung 1:10 verdünnt.

Die Zahl der Konidien pro ml (N) wurde nach Gleichung 3-1 berechnet:

$$N = \frac{Zahl \ der \ Konidien \ pro \ Großquadrat \times 10^6}{4} \qquad \text{mit N - Zahl \ der \ Konidien \ pro \ ml}$$

Gleichung 3-1: Berechnung der Konidienanzahl pro ml

3.3.3.2 Inokulierte Medien^a für die HPTLC-Platten

Herstellung der Medien

Es wurden verschiedene Medien verwendet, deren Herstellung im folgenden beschrieben wird.

Kartoffel-Glucose-Agar: Es wurden 39 g des Kartoffel-Glucose-Agars in 1 L entionisiertem Wasser gelöst.

Mineralsalz-Glucose-Medium [179]:

50 g Glucose, 7 g KH_2PO_4 , 3 g Na_2HPO_4 , 4 g KNO_3 , 1 g $MgSO_4 \ge 7 H_2O$ und 1 g NaCl wurden in 1 L entionisiertem Wasser gelöst und zusammen bei 121°C 20 min autoklaviert.

Mineralsalz-Glucose-Medium nach Homans / Fuchs [180]:

7 g KH₂PO₄, 3 g Na₂HPO₄, 4 g KNO₃, 1 g MgSO₄ x 7 H₂O

^a Inokulation: Das Einbringen (Impfen) von Krankheitserregern, Gewebe, Zellmaterial in einen Organismus oder in Nährböden, hier das Beimpfen der Medien mit Konidien. und 1 g NaCl wurden in 1 L entionisiertem Wasser gelöst und bei 121 °C 20 min autoklaviert. Danach wurden zu 60 ml der Lösung 10 ml einer 30 %igen Glucoselösung gegeben. Es erfolgte keine weitere Sterilisation, um einen Abbau der Glucose zu vermeiden.

Gießen des Agars in Petrischalen

Der Kartoffel-Glucose-Agar wurde bei 121 °C 20 min autoklaviert und danach in sterile Petrischalen gefüllt. Die Petrischalen wurden bis zu einer Höhe von circa einem halben Zentimeter befüllt. Der Agar sollte dabei etwa eine Temperatur von 60 °C haben. Der Deckel der Petrischale wurde nach dem Trocknen des Agars fest verschlossen.

Herstellung inokulierter Medien

Zur Detektion der Fungizide wurde die Immersions-Bioautographie und die direkte Bioautographie eingesetzt. Für diese beiden Verfahren wurden unterschiedliche Medien benutzt, die im folgenden beschrieben sind.

Immersions-Bioautographie: Der Kartoffel-Glucose-Agar wurde eine Stunde im Wasserbad auf 50 °C temperiert. 2 ml der Konidiensuspension (c = 10⁷ Konidien/ml) wurden mit einer sterilen Pipette entnommen und mit 60 ml des 50 °C warmen Agars unter unsterilen Bedingungen vermischt. Die Öffnung des Erlenmeyer-Kolbens mit dem Nährmedium wurde vor und nach dem Entnehmen der Lösung am Bunsenbrenner abgeflammt.
 Direkte Bioautographie: 2 ml der Konidiensuspension (c = 10⁷ Konidien/ml) wurde mit einer sterilen Pipette entnommen und mit 60 ml der jeweiligen Mineral-Nährlösung vermischt. Die Öffnung des Erlenmeyer-Kolbens mit dem Nährmedium wurde vor und nach dem Entnehmen der Lösung am Bunsenbrenner abgeflammt.

Aufbringen der inokulierten Medien auf die HPTLC-Platten

Immersions-Bioautographie, Aufbringen mit einer Pipette:

20, 15 und 10 ml des inokulierten Kartoffel-Glucose-Agars wurden sofort nach dem Herstellen mit einer Pipette über eine 10 x 10 cm große HPTLC-Platte verteilt. Immersions-Bioautographie, Aufbringen durch Tauchen:

Der inokulierte Agar wurde in die Tauchkammer (400-ml-Flachküvette) gefüllt. Darin wurde eine 20 x 10 cm große HPTLC-Platte mit Hilfe eines automatischen Tauchgerätes (Fa. Desaga) bei mittlerer Geschwindigkeit in die Tauchkammer abgesenkt und sofort wieder herausgezogen.

Direkte Bioautographie, Aufbringen durch Tauchen:

Die Konidien-Nährlösung wurde sofort nach der Herstellung in die Tauchkammer gefüllt. Darin wurde eine 20 x 10 cm große HPTLC-Platte mit Hilfe eines automatischen Tauchgerätes (Fa. Desaga) bei mittlerer Geschwindigkeit in die Tauchkammer abgesenkt und sofort wieder herausgezogen.

Bebrüten

Die HPTLC-Platten mit den aufgebrachten Konidien wurden in einem Exsikkator im Brutraum bei 28 °C bebrütet. Die obere Öffnung des Exsikkators wurde mit einem Wattestopfen verschlossen. Auf den Boden des Exsikkators wurde eine Schale mit heißem Wasser gestellt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten.

Anfärben des Myzels

Das auf den HPTLC-Platten gewachsene Pilzmyzel wurde zur besseren Detektion der Fungizide angefärbt. Die Anfärbung erfolgte durch Tauchen der Platten in wässrige Farbstofflösungen. Die im folgenden genannten Lösungen wurden auf ihre Verwendbarkeit und Empfindlichkeit für die Anfärbung des Pilzmyzels auf HPTLC-Platten verglichen:

- 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) 0,5 g/100 ml,
- p-Iodonitrotetrazoliumviolett (INT) 0,2 g/100 ml und
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) 2 g/100 ml.

Die Detektion der Platten erfolgte visuell. Zur Optimierung der Detektion erfolgte sie 2, 4, 6 und 20 h nach dem Tauchen.

3.3.4 <u>Biologische Detektion mit Leuchtbakterien</u>

Vorbehandlung der HPTLC-Platten

Die Platten wurden durch eine mindestens eintägige Lagerung in einem Methanolbad mit anschließender Entwicklung mit Methanol oder Aceton gereinigt. Die gereinigten Platten wurden im Exsikkator aufbewahrt.

Auftragung und chromatographische Entwicklung

Für die biologische Detektion von Pestiziden mit Leuchtbakterien wurde als chromatographisches System die HPTLC eingesetzt. Dazu erfolgte die Entwicklung von 10 x 20 cm HPTLC-Platten in der AMD-Kammer mit einem für die zu untersuchenden Analyten selektiven Lösungsmittelgradienten (siehe Abschnitt 3.3.7.5).

Abweichend von den in Abschnitt 3.3.7.1 vorgestellten Geräteparametern wurden die Bahnabstände vergrößert. Die Modifikation der Auftrageposition diente dazu, Platz für die Aufnahme einer Blindbahn (Plattenuntergrund) zu haben. Diese wird für das Arbeiten mit der Untergrundkompensation benötigt, mit der bei der biologischen Detektion gearbeitet wurde.

Auftragepositionen der TLC und der HPTLC / AMD:

8 mm Höhe, 6 mm Bahnbreite, 16 mm Bahnabstand der Messbahnen, 8 mm Bahnabstand zwischen Messbahn und Blindbahn

Auftragepositionen bei Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD:

8-16 mm Höhe, 6 mm Bahnbreite, 16 mm Bahnabstand,8 mm Bahnabstand zwischen Messbahn und BlindbahnDie Auftragung des Eluates erfolgt variabel.

Die HPTLC-Platten wurden nach der Entwicklung gründlich getrocknet, da Lösungsmittelreste biologische Detektionen in der Regel stören.

Die Durchführung der biologischen Detektion der Pestizide erfolgte nach Vigelahn [181]. Sie wurde vom ihm im Rahmen des Sonderforschungsbereich 193 "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Anzucht und Verarbeitung der Testorganismen

Die Kultur des Testorganismus *Vibrio fischeri* erfolgte wie bei Vigelahn beschrieben [181]. Für die Lumigraphie wurden als Testsuspensionen verdünnte Kryokonserven eingesetzt, die durch Schockgefrieren der Kultursuspension mit einem Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin in Flüssigstickstoff hergestellt wurden. Für die Tauchbeschichtung in der Lumigraphie wurden für die Füllung der Tauchkammer 300 ml Testsuspension mit hoher Zelldichte benötigt. Es wurden hierfür spezielle Kryokonserven hergestellt, indem die Kultursuspension durch Zentrifugieren 50fach konzentriert wurde. Die Konzentration dieser Konserven war 1 x 10¹⁰/ml, die Testsuspensionen wurden durch Verdünnung 1:100 im Medium (2 %iger NaCl-Lösung) hergestellt.

Auftragung der Leuchtbakterien

Die Bakterien wurden durch Tauchen der TLC-Platte in die Bakteriensuspension auf die Platte aufgetragen. Als Tauchsuspension diente entweder eine 1:2 mit Nährmedium verdünnte Kultur oder eine in Nährmedium verdünnte Kryokonserve, die aus einer 50fach konzentrierten Kultursuspension hergestellt worden war. Beim Tauchen wurde die TLC-Platte mit Hilfe eines automatischen Tauchgerätes (Fa. Desaga) bei maximaler Geschwindigkeit in eine 400-ml Flachküvette mit 300 ml Bakteriensuspension abgesenkt und sofort wieder herausgezogen. Für die Qualität der luminographischen Aufnahmen war die Breite der Tauchkammer (17 mm) von Bedeutung, bei schmaleren Kammern entstand durch Wellenbildung beim Tauchvorgang ein feines Streifenmuster.

Nach dem Tauchen wurde die Platte waagerecht auf Filterpapier gelegt, die Schichtseite mit Fließpapier abgedeckt und überschüssige Testsuspension durch Überrollen mit einer weichen Schaumstoffwalze entfernt. Zum Schutz gegen Austrocknung während der Inkubation und der Iumigraphischen Detektion wurde die Schichtseite mit einer gereinigten Glasplatte abgedeckt. Die Platte wurde anschließend in die Messkammer der CCD-Kamera überführt.

Messung der Lumineszenz

Für lumigraphische Aufnahmen wurde eine gekühlte Slow Scan CCD-Kamera (Night Owl, Fa. Berthold) benutzt. Die Kamera befand sich in einem lichtdichten Probenraum; sie war auf einem vertikalen Schlitten montiert und konnte extern über eine PC-Steuerung auf die gewünschten Aufnahmeformate und Schärfenebenen eingestellt werden. Alle Parameter der Aufnahme wie Belichtungszeit, Empfindlichkeit, dynamischer Bereich, Akkumulation von Bildern, Zusammenfassung von Pixeln und die elektronische Filterung zur Rauschunterdrückung wurden durch die Software gesteuert. Die Aufnahmen wurde als Bilddateien gespeichert; diese enthielten als Information neben der Verteilung der Lichtintensität auch die geometrischen Daten des gemessenen Objekts.

Die TLC-Platten wurden unmittelbar nach der Beschichtung mit Leuchtbakterien in den Probenraum eingebracht und während einer quasi-kontinuierlichen Life-Scan-Aufnahme mit Tageslicht unter der Kamera ausgerichtet. Für häufig verwendete Aufnahmeformate wurden TLC-Platten auch in vorbereiteten Schablonen fixiert. Das Aufnahmeformat erfasste eine Fläche von 135 x 205 mm, damit konnte eine komplette TLC-Platte gemessen werden und die optisch bedingten Verzeichnungen blieben gering. Die Abweichungen der Bilder von dem idealen Rechteck (Plattenformat 100 x 200 mm) betrugen im mittleren Bereich der Platte maximal 2 mm. Vor den eigentlichen Messungen wurden teilweise Probeaufnahmen mit Belichtungsautomatik durchgeführt, um die geeignete Expositionszeit zu ermitteln. Mit zunehmender Standardisierung wurden von vornherein feste Belichtungszeiten von 1, 5 oder 10 min eingestellt. Alle Aufnahmen erfolgten ohne Zusammenfassung von Pixeln, d.h. mit höchstmöglicher Auflösung, ohne Akkumulation von Bildern und unter Einsatz elektronischer Filter zur Verminderung des Rauschpegels.

Die Zeit zwischen dem Tauchen der Platte, d.h. dem Beginn der Inkubation, und dem Start der ersten Messung wurde auf 2 min festgelegt. Weitere Aufnahmen erfolgten in der Regel nach 5 und 15 min; zwischen den Aufnahmen blieb die Platte an derselben Position im Probenraum, so dass die geometrischen Daten aller Bilder identisch waren.

Auswertung

Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das Programm WinLight (Fa. Berthold), eine reduzierte Version der verbreiteten Bildanalysesoftware Optimas (Fa. Media Cybernetics) eingesetzt. An den Bildern konnten geometrische Messungen von Längen und Flächen sowie Messungen der Grauwertverteilung über die Pixel erfolgen.

Bei sehr kontrastarmen Aufnahmen konnte die Erkennung von Details durch eine nachträgliche Bearbeitung der originalen Bilddaten verbessert werden. Dabei wurde eine Kombination von Schärfungs- und Glättungsfiltern eingesetzt.

Für Line-Plots wurden die Bilder teilweise invertiert, damit dunkle Zonen mit lumineszenzhemmenden Stoffen als positive Peaks dargestellt wurden. Weiterhin wurden unmittelbar links und rechts neben dem Line-Plot der interessierenden Bahn zwei identische Messungen in den Bahnzwischenräumen durchgeführt. Diese Messungen enthielten Informationen über den Bildhintergrund (ungleiche Lumineszenzverteilung, Störungen durch Fließmittelfronten und andere Artefakte); sie wurden arithmetisch gemittelt und von den Daten des Line-Plots der Bahn abgezogen. Damit war es möglich, auch bei dem meist unregelmäßigen Bildhintergrund die Verteilung toxischer Fraktionen zu erfassen.

Für die untersuchten TLC-Platten standen UV-Densitogramme zur Verfügung, die mit dem TLC Scanner II mit Auswertesoftware Cats 3 Version 3.16 (Fa. Camag) aufgenommen wurden. Mit einem Programm, das freundlicherweise von der Firma zur Verfügung gestellt wurde, konnten die ursprünglich rein graphischen Daten in Tabellenform ausgelesen werden. Zur Identifizierung toxischer Bereiche mit den Peaks UV-aktiver Substanzen wurden die Intensitäten des Line-Plots und die Scannerdaten auf eine gemeinsame Messstrecke skaliert.

3.3.5 <u>GC / MS bzw. ECD / NPD</u>

Alle in dieser Arbeit untersuchten Pestizide (siehe Abschnitt 2.1) wurden auf ihr gaschromatographisches Verhalten untersucht. Dazu wurden Standardlösungen mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml mittels GC / MS bzw. GC / ECD / NPD vermessen.

Außerdem wurde die Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion nach Pentafluorbenzylierung als Alternativmethode zur Bestimmung von Carbendazim und Thiabendazol mittels HPTLC / AMD in Kopplung mit der HPLC durchgeführt. Zusätzlich konnten die Carbamate Propoxur, Bendiocarb, Promecarb, Carbofuran, Aminocarb, Carbaryl, Methiocarb, Ethiofencarb und Tribenuron-Methyl bestimmt werden. Die Analyten wurden nach Pentafluorbenzylierung (Abschnitt 3.2.2) mittels Minikieselgel-Fraktionierung (Abschnitt 3.1.3.1) aufgereinigt und im Full Scan Modus 1800-2400 eV oder SIM (Selected Ion Monitoring)-Modus des GC / MS-Systems vermessen. Die wichtigsten Betriebsparameter der Gaschromatographie sind in Abschnitt 3.3.8 und Abschnitt 3.3.9 zusammengefasst.

3.3.6 <u>HPLC / MS</u>

Die Hochleistungsflüssigchromatographie mit massenselektiver Detektion wurde als Alternativmethode zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen mittels HPTLC / AMD in Kopplung mit der HPLC durchgeführt.

Zur Optimierung der Bedingungen im MS-System wurde die Fließinjektionsmethode verwendet. Dazu wurden die Lösungen der Benzoylharnstoffe mit einer Konzentration von 1 bis 100 μ g/ml in Methanol eingesetzt. Die Standardlösungen wurden mit Hilfe einer einfachen Spritzenpumpe mit einem konstanten Fluss von 0,7 ml/h über ein T-Stück in den HPLC-Eluenten Methanol / Wasser (1+1/v+v) injiziert. Der HPLC-seitige Fluss betrug

0,2 ml/min. Auf diese Weise gelangten die Analyten ohne chromatographische Trennung direkt in die Ionenquelle. Als Ionisierungsmodi wurden APCI und ESI jeweils im negativen und positiven Modus angewendet.

Über einen Zeitraum von 30 s wurden kontinuierliche Massenspektren im MCA-Modus (Multi Channel Acquisition) aufgenommen. Entsprechend des zu untersuchenden Massen-Bereiches waren Messzyklen von 1 bis 2 s pro Scan erforderlich. Die resultierenden Massen-Spektren wurden mit der MassLynxSoftware 3.2 (Micromass, Manchester, UK) ausgewertet. Die End-Betriebsparameter der FIA-MS-Bestimmung von Benzoylharnstoffen sind in Abschnitt 3.3.10 zusammengefasst.

Nach Optimierung der massenselektiven Detektion wurde für die RP-HPLC-Chromatographie an einer C8-Säule ein Wasser / Methanol-Gradient entwickelt, der ebenfalls in Abschnitt 3.3.10 beschrieben wird.

3.3.7 <u>Parameter für die AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC und</u> <u>der GPC-HPLC</u>

Im folgenden sind die Parameter für die AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC und der GPC-HPLC dargestellt.

3.3.7.1 AMD-TLC

Auftragegerät:	Linomat III wahlweise mit Sprühkopf für HPLC-HPTLC /- AMD-Kopplung (Fa. CAMAG, Berlin), 6 bar Druckluft
HPTLC-Fertigplatten:	TLC / AMD: 0,1 mm oder 0,2 mm Schichtdicke, HPLC-AMD / HPTLC-Kopplung: 0,2 mm Schichtdicke
Kopplungssoftware:	ATS3-C [182]
Auftrageposition:	TLC / AMD: 8 mm Höhe, 6 mm Bahnbreite, 10 mm Bahn- abstand, RP-HPLC-TLC / AMD-Kopplung: 8-18 mm Höhe, 4 mm Bahnbreite, 10 mm Bahnabstand, GPC-HPLC-TLC / AMD-Kopplung: 8-14 mm Höhe, 4 mm
	Bahnbreite, 10 mm Bahnabstand. Die Auftragung des Eluates erfolgte in Abhängigkeit vom flüssigchromatographischen Verhalten der untersuchten Analyten (Retentionszeit) variabel (s. Abschnitt 3.3.7.7).

Entwicklung:	AMD1-System oder AMD2-System (beide Fa. CAMAG, Berlin) mit variablen Gradienten (s. Abschnitt 3.3.7.5)
Detektion:	TLC Scanner II mit Auswertesoftware Cats 3 Version 3.16
Messbedingungen:	Geschwindigkeit 5 mm/s, Deuteriumlampe / Wolframlampe, Sens automatisch, Span 35, Spaltbreite 4 (0,3 mm), Spaltlänge 7 (5 mm), Optik Mikro, Multiwellenlängenspan (200-300 nm / 400-600 nm) mit 30 nm Auflösung, Spektrenaufnahme im Bereich von 190 bis 400 nm mit 10 nm Auflösung, Kalibriermodus in den Spek- trenmaxima (Thiabendazol 300 nm, Carbendazim 280 nm, Benzoylharnstoffe und Bitertanol 260 nm, Benzoylharnstoffe nach Derivatisierung 495 nm, alle anderen Pestizide 200 nm).
3.3.7.2 RP-HPLC	
HPLC-System:	Applied Biosystems (Pumpe: 140B, UV-Detektor: 785A, variable Wellenlänge)
HPLC-Säule 1:	Spherisorb (250 mm x 2,1 mm) ODS-2: 5 µm, mit Vorsäule aus gleichem Material (Fa. M. &. W. Chromato- graphietechnik GmbH, Berlin)
HPLC-Säule 2:	Spher-5 RP-18 5 micron (220 mm x 2,1 mm) OD-222, Serial No. 134182 (Applied Biosystems, BrownleeTM Columns), Vorsäule wie bei HPLC-Säule 1
HPLC-Säule 3:	Spherisorb (250 mm x 2,1 mm) ODS-2: 5 µm (Säule 1 neu befüllt) Säulennummer 14960331, mit Vorsäule aus gleichem Material (Fa. M. &. W. Chromatographietechnik GmbH, Berlin)
HPLC-Säule 4:	C18 5µ Microbore (250 mm x 1,0 mm) Säulennummer 96070031, mit Vorsäule wie bei HPLC-Säule 1 (Alltech, USA)
Injektionsvolumen:	variabel bis 100 µl (Standard 20 µl)
Eluent 1:	A: Wasser, B: Methanol
Gradient 1:	0-5 min 50 % B in A // bis 60 min 100 % B in A

98	Endpunktbestimmung
Eluent 2:	A: 20 % Methanol + 80 % Wasser, B: 100 % Methanol
Gradient 2:	0-5 min 39 % B in A // bis 20 min auf 65 % B // bis 32 min 65 % B halten // bis 48 min auf 100 % B // bis 60 min halten.
Eluent 3:	A: 20 % Methanol + 80 % Wasser, B: 100 % Methanol
Gradient 3:	0-5 min 37,5 % B in A // bis 30 min auf 100 % B // bis 55 min 100 % B halten.
Flussrate:	50 μl/min
3.3.7.3 GPC-HPLC	
HPLC-System:	Waters 590, UV-Detektor: 785A, Applied Biosystems, variable Wellenlänge
HPLC-Säule A:	GPC-Säule (Styrol-Divinylbenzol) 50 Å, 300 x 4,6 mm, 5 µm, Vorsäule aus gleichem Material (Phenomenex, Hösbach)
HPLC-Säule B:	GPC-Säule (Styrol-Divinylbenzol) 100 Å, 300 x 4,6 mm, 5 µm, Vorsäule aus gleichem Material (Phenomenex, Hösbach)
Säulen-Temperatur:	10, 20, 35 oder 40 °C (Standard 20 °C)
Injektionsvolumen:	variabel bis 100 µl (Standard 20 µl)
Eluent A:	isokratisch, Ethylacetat / Cyclohexan (1+1), 50 - 350 µl/min
Eluent B:	Tetrahydrofuran, 50 - 350 µl/min

3.3.7.4 Bestimmung der Verzögerungszeit in der Online-Kopplung HPLC mit der HPTLC / AMD

Zur Bestimmung der Verzögerungszeit t_{tot2} in der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD musste die Totzeit t_{tot1} zwischen Injektor und Detektor und die Gesamttotzeit t_{totges} zwischen Injektor und Sprühkopf bestimmt werden.

Dazu wurde das unter Abschnitt 2.5.4 vorgestellte HPLC-System ohne Säule verwendet. Es wurde eine Farbstofflösung (Erytrosin E 127) injiziert und mit einem Fluss von 40 μ l Methanol/min eluiert. Das HPLC-Eluat wurde in 0,1 min-Fraktionen auf drei Kieselgelplatten

aufgetragen. Dieser Versuch wurde mehrmals mit denselben Platten wiederholt, bis auf den Platten eine Fraktion mit maximaler Färbung erkannt wurde.

Die Totzeit des Farbstoffs^a (t_{tot1}) und die Fraktion mit der intensivsten Färbung F_{max} wurde praktisch ermittelt, und die Verzögerungszeit t_{tot2} entsprechend der Gleichung 3-2 berechnet.

t _{tot2}	$= (t_{totges} - t_{tot1})$	t _{tot2} - Verzögerungszeit
mit t _{totges}	$= F_{max} \times 0,1 \min$	t _{totges} - Gesamttotzeit zwischen Injektor und Sprühkopf
-		t _{tot1} - Totzeit zwischen Injektor und Detektor
		F _{max} - Fraktion mit der intensivsten Färbung

Gleichung 3-2: Berechnung der Verzögerungszeit in min

3.3.7.5 AMD-Gradienten

Im folgenden sind die für die verschiedenen Untersuchungen eingesetzten AMD-Gradienten in Form von tabellarischen Übersichten angegeben. Die Gradienten wurden zur besseren Unterscheidung nummeriert. Zuerst sind die Gradienten für das AMD1-Gerät dargestellt. Danach sind in vergleichbarer Reihenfolge die für das AMD2-Gerät optimierten Gradienten aufgelistet. Die Tabellen enthalten Angaben zur Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches in der jeweils verwendeten Vorratsflasche. Außerdem sind die Laufzeiten pro Entwicklungsschritt sowie die Trocknungszeiten zwischen den Läufen aufgeführt.

^a Die Totzeit des Farbstoffs ist die Retentionszeit, da ohne HPLC-Säule keine chromatographische Trennung stattfindet.

Schritt	1_4	5-10	11-16	17-20	21-25	26-30
	1-+	5-10	11-10	17-20	21-23	20-30
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
Methanol [*]	12	6		-	-	-
Dichlormethan [*]	88	94	100	100	50	
n-Hexan [*]	-	-	-	-	50	100
Ameisensäure*	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Laufzeit (min)	0,8	1,1	4,1	9,3	14,4	19,8
	0,8	1,4	5,1	10,3	15,4	20,8
	0,8	1,9	5,8	11,2	16,6	22,0
	0,8	2,4	6,6	13,3	17,6	23,3
		3,0	7,4		18,5	25,0
		3,6	8,3			

Tabelle 3-2: AMD1-Gradient 1 - Gradient für Oberflächenbehandlungsmittel

Mixer nicht leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-3:AMD1-Gradient 2a - DIN-Gradient

[183]

× ·		C				
Schritt	1-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-33
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
Acetonitril [*]	30	-	-	-	-	-
Dichlormethan [*]	70	100	100	100	-	-
n-Hexan [*]		-	-	-	100	100
Ameisensäure [*]	-	-	0,1	0,1	-	-
25 %iger Ammoniak [*]	0,1	-	-	-	-	-
Laufzeit (min)	je 0,8	0,8	3,0	6,6	11,2	17,6
		1,1	3,6	7,4	13,3	18,5
		1,4	4,1	8,3	14,4	22,2
		1,9	5,1	9,3	15,4	
		2,4	5,8	10,3	16,6	

(mit zehn Fokussierungsschritten [132])

nach Lauf 15 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-4: AMD1-Gradient 2b – modifizierter DIN-Gradient

Schritt	1-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-27
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
Acetonitril [*]	30	-	-	-	-	-
Dichlormethan [*]	70	100	100	100	-	-
n-Hexan [*]		-	-	-	100	100
Ameisensäure [*]	-	-	0,1	0,1	-	-
25 % iger Ammoniak *	0,1	-	-	-	-	-
Laufzeit (min)	0,8	0,8	3,0	6,6	11,2	17,6
	0,8	1,1	3,6	7,4	13,3	18,5
	0,8	1,4	4,1	8,3	14,4	22,2
	0,8	1,9	5,1	9,3	15,4	
		2,4	5,8	10,3	16,6	

(mit vier Fokussierungsschritten)

nach Lauf 15 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-5:AMD1-Gradient 3a - modifizierter Konfirmationsgradient nachBurger et. al.

Schritt	1-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
tert-Butylmethylether*	100	100	25	-	-	-
n-Hexan [*]	-	-	75	100	100	100
Ameisensäure [*]	-	0,1	0,1		-	-
Laufzeit (min)	je 0,8	0,8	3,0	6,6	11,2	17,6
		1,1	3,6	7,4	13,3	18,5
		1,4	4,1	8,3	14,4	19,7
		1,9	5,1	9,3	15,4	20,9
		2,4	5,8	10,3	16,6	22,2

(mit zehn Fokussierungsschritten) [184]

nach Lauf 4 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-6:AMD1-Gradient 3b - modifizierter Konfirmationsgradient nachBurger et. al.

Schritt	1-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
tert-Butylmethylether*	100	100	25	-	-	-
n-Hexan [*]	-	-	75	100	100	100
Ameisensäure [*]	-	0,1	0,1		-	-
Laufzeit (min)	0,8	0,8	3,0	6,6	11,2	17,6
	0,8	1,1	3,6	7,4	13,3	18,5
	0,8	1,4	4,1	8,3	14,4	19,7
	0,8	1,9	5,1	9,3	15,4	20,9
		2,4	5,8	10,3	16,6	22,2

(mit vier Fokussierungsschritten)

nach Lauf 4 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-7: AMD1-Gradient 4 - optimierter Gradient f ür mittelpolare Analyten

[185]

Schritt	1-4	5-10	11-16	17-21	22-26	27-30
Trockenzeit (min)	1	1	1	1	1	1
Flasche	1	2	3	4	5	6
Acetonitril [*]	30	-	-	-	-	-
Dichlormethan [*]	70	100	100	80	50	-
n- Hexan [*]	-	-	-	20	50	100
Ameisensäure*	-	-	0,1	0,1	-	-
25 % iger Ammoniak *	0,1	-	-	-	-	-
Laufzeit (min)	0,8	1,1	4,1	9,3	15,4	20,8
	0,8	1,4	5,1	10,3	16,6	22,0
	0,8	1,9	5,8	11,2	17,6	23,3
	0,8	2,4	6,6	13,3	18,5	25,0
		3,0	7,4	14,4	19,8	
		3,6	8,3			

nach Lauf 4 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-8:AMD1-Gradient 5 – optimierter Gradient für polare Pestizide für
die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC

Lauf	1-4	5-10	11-16	17-21
Trockenzeit (min)	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4
Ethylacetat [*]	100	40	20	10
Toluol [*]	-	60	80	90
Ameisensäure [*]	0,1	0,1	-	-
Laufzeit (min)	1,3	1,4	4,1	9,3
	1,3	1,9	5,1	10,3
	1,3	2,4	5,8	11,2
	1,3	3,0	6,6	13,3
		3,6	7,4	14,4
			8,3	

[186]

Mixer nicht leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-9:AMD1-Gradient 6 – optimierter Gradient für Benzoylharnstoffe für
die Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC

Lauf	1-4	5-10	11-16	17-21	22-26
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5
Acetonitril [*]	100				
Toluol [*]		100	90	80	70
n-Hexan [*]			10	20	30
Ameisensäure*	0,1	0,1	0,1	0,1	
Laufzeit (min)	0,6	1,1	4,1	9,3	15,4
	0,6	1,4	5,1	10,3	16,6
	0,6	1,9	5,8	11,2	17,6
	0,6	2,4	6,6	13,3	18,5
		3,0	7,4	14,4	19,8
		3,6	8,3		

nach Lauf 4 Mixer leeren, Trocknungszeit nach dem letzten Lauf 15 min

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Lauf	1-4	5-10	11-16	17-21	22-26
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5
Ethylacetat [*]	40				
Toluol [*]	60	100	90	80	70
n-Hexan [*]			10	20	30
Ameisensäure*	0,1	0,1	0,1	0,1	
Laufzeit (min)	0,6	1,1	4,1	9,3	15,4
	0,6	1,4	5,1	10,3	16,6
	0,6	1,9	5,8	11,2	17,6
	0,6	2,4	6,6	13,3	18,5
		3,0	7,4	14,4	19,8
		3,6	8,3		

Tabelle 3-10:AMD1-Gradient 7 – optimierter Gradient für Benzoylharnstoffe für
die Kopplung der GPC mit der AMD-TLC

nach Lauf 4 Mixer leeren, letzte Trocknungszeit 15 min, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-11:AMD1-Gradient 8 - optimierter Gradient für die basischen Pestizide
nach bioautographischer Detektion mit Pilzen

Lauf	1-5	6-13	14-22	23-26	27-28	29-30
Trockenzeit (min)	3	3	3	3	3	3
Flasche	1	2	3	4	5	6
Ethylacetat [*]	60	50	40	40	20	0
n-Hexan [*]	40	50	60	60	80	
25 %iger Ammoniak [*]	1	1				
Laufzeit (min)	0,9	1,2	6,5	16,2	21,8	23,9
	0,9	1,6	7,4	17,3	22,8	25,0
	0,9	2,1	8,3	18,7		
	0,9	2,7	9,3	19,8		
	0,9	3,4	10,5	20,8		
		4,1	11,6			
		4,6	12,6			
		5,7	15,0			

[143]

Mischer nach Schritt 30 leeren, * Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	100			16	3
2	100			16	3
3	100			16	3
4	100			16	3
5	100			16	3
6	95	5		19	3
7	85	15		22	3
8	75	25		25	3
9	65	35		28	3
10	55	45		31	3
11	45	55		34	3
12	35	65		37	3
13	35	65		40	3
14	35	65		43	3
15	35	65		46	3
16	35	65		49	3
17	30	70		52	3
18	25	75		55	3
19	15	85		58	3
20	10	90		61	3
21	10	90		64	3
22		99	1	67	3
23		99	1	70	15-30**

Tabelle 3-12:AMD2-Gradient 1 – Gradient nach AMD1-Gradient 1 optimiert für
polare, basische Pestizide

Flasche 1 enthält Methanol / Dichlormethan / HCOOH (12/88/0,1)*

Flasche 2 enthält Dichlormethan / HCOOH (100/0,1)*

Flasche 3 enthält n-Hexan

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

** In Abhängigkeit von der folgenden Detektion

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flasche 4	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	30	70			16	3
2	30	70			16	3
3	30	70			16	3
4	30	70			16	3
5	24	76			16	3
6	16	84			19	3
7	10	90			22	3
8	7	93			25	3
9	4	96			28	3
10			100		30	3
11			100		32	3
12			100		34	3
13			100		36	3
14			100		39	3
15			100		42	3
16			100		44	3
17			100		47	3
18			100		50	3
19			100		52	3
20			81	19	54	3
21			53	47	58	3
22			34	66	60	3
23			22	78	61	3
24			14	86	63	3
25			12	88	65	3
26			7	93	70	3
27			5	95	75	15

Tabelle 3-13:AMD2-Gradient 2 – Gradient nach AMD1-Gradient 2b
(modifizierter DIN-Gradient)

Flasche 1: Acetonitril / 25 % iger Ammoniak (100/0,33%)*

Flasche 2: Dichlormethan

Flasche 3: Dichlormethan / Ameisensäure (100+0,1)*

Flasche 4: n-Hexan

^{*} Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Tabelle 3-14:	AMD2-Gradient 3 – Gradient nach AMD1-Gradient 3b
	(modifizierter Burger Konfirmationsgradient)

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	100			16,0	3
2	100			16,0	3
3	100			16,0	3
4	100			16,0	3
5		100		16,0	3
6		100		18,0	3
7		100		19,0	3
8		100		24,0	3
9		100		26,0	3
10		86	14	29,0	3
11		64	36	32,0	3
12		50	50	34,0	3
13		41	59	37,0	3
14		36	64	39,5	3
15		29	71	42,0	3
16		19	81	44,0	3
17		12	88	47,0	3
18		8	92	49,5	3
19		5	95	51,5	3
20		4	96	54,5	3
21		3	97	57,5	3
22		2	98	61,0	3
23		1	99	62,0	3
24		1	99	65,5	3
25		1	99	67,5	3
26		0	100	69,0	3
27		0	100	71,0	3
28		0	100	73,0	3
29		0	100	75,0	15

Flasche 1: tert-Butylmethylether

Flasche 2: tert-Butylmethylether / Ameisensäure $(100+0,1)^*$

Flasche 3: n-Hexan

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	100			16	3
2	100			16	3
3	100			16	3
4	100			16	3
5		100	0	16	3
6		100	0	19	3
7		100	0	22	3
8		100	0	25	3
9		100	0	28	3
10		100	0	30	3
11		98	2	32	3
12		95	5	34	3
13		93	7	36	3
14		92	8	39	3
15		91	9	42	3
16		91	9	44	3
17		89	11	47	3
18		86	14	50	3
19		84	16	52	3
20		82	18	54	3
21		82	18	58	3
22		79	21	60	3
23		76	24	61	3
24		74	26	63	3
25		73	27	65	15-30**

Tabelle 3-15:AMD2-Gradient 6 – Gradient für Benzoylharnstoffe, optimiert für
die Kopplung der RP-HPLC mit der AMD-TLC nach AMD1-
Gradient 6

Flasche 1: Acetonitril (100)

Flasche 2: Toluol / Ameisensäure (100+0,1)*

Flasche 3: n-Hexan (100)

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

** In Abhängigkeit von der folgenden Detektion

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	100			18	3
2	100			18	3
3	100			18	3
4	100			18	3
5		100		21	3
6		100		24	3
7		100		27	3
8		100		30	3
9		100		33	3
10		100		36	3
11		94	6	39	3
12		84	16	42	3
13		78	22	45	3
14		74	26	48	3
15		71	29	51	3
16		70	30	54	3
17		63	37	57	3
18		52	48	60	3
19		46	54	63	3
20		41	59	66	3
21		39	61	69	3
22		31	69	72	3
23		20	80	75	3
24		13	87	78	3
25		8	92	80	3
26		5	95	80	15-30**

Tabelle 3-16:AMD2-Gradient 7 – Gradient für Benzoylharnstoffe, optimiert für
die Kopplung der GPC mit der AMD-TLC nach AMD1-Gradient 7

Flasche 1: Ethylacetat / Toluol / Ameisensäure (40+60+0,1)*

Flasche 2: Toluol / Ameisensäure (100+0,1)*

Flasche 3: Toluol / n-Hexan / Ameisensäure (70+30+01)*

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen

** In Abhängigkeit von der folgenden Detektion

Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Laufstrecke in mm	Trocknungszeit in min
1	100			16	3
2	100			16	3
3	100			16	3
4	100			16	3
5	100			16	3
6	90	10		19	3
7	80	20		22	3
8	70	30		25	3
9	60	40		28	3
10	50	50		31	3
11	40	60		34	3
12	30	70		37	3
13	20	80		40	3
14	10	90		43	3
15	5	95		46	3
16		100		49	3
17		100		52	3
18		100		55	3
19		100		58	3
20		100		61	3
21		100		64	3
22		95	5	67	3
23		90	10	70	30

 Tabelle 3-17:
 AMD2-Gradient 7 – Gradient optimiert für Whiskyinhaltsstoffe

Flasche 1: Methanol / Ameisensäure (100+0,1)*

Flasche 2: Dichlormethan / Ameisensäure (100+0,1)*

Flasche 3: n-Hexan

* Fließmittelkomponenten in Volumenteilen
3.3.7.6 Fließmittel für die biologische Detektion mit Pilzen

Die 10 x 10 cm HPTLC-Platten, die mit dem beschriebenen biologischen Verfahren detektiert wurden, wurden vor der biologischen Detektion mit Pilzen isokratisch in einer Trogkammer mit Kammersättigung mit folgenden isokratischen Fließmittelsystemen entwickelt:

- Ethylacetat / Acetonitril / Ammoniak (90+10+1/v+v+v)
- Dichlormethan / Methanol (95+5/v+v)

3.3.7.7 Schnitt-Tabellen in der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD

Nach Bestimmung des Elutionsverhaltens der Pestizide durch Vermessung der Pestizidstandards in der HPLC / UV wurden für die Zielanalyten Schnitt-Tabellen erstellt, mit deren Hilfe die Pestizide aus dem HPLC-Eluat fraktioniert wurden. Dennoch musste das Elutionsverhalten der Pestizide routinemäßig überprüft werden, da sich das Elutionsverhalten der Pestizide durch Beanspruchung der Säulen durch die Probenmatrix ändern kann. Die Schnitt-Tabelle muss gegebenenfalls den geänderten Retentionszeiten angepasst werden. Die HPLC-Parameter sind dem Abschnitt 3.3.7.2 für die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der AMD / HPTLC und dem Abschnitt 3.3.7.3 für die Online-Kopplung der GPC- HPLC mit der AMD / HPTLC zu entnehmen. Die Schnittbedingungen sind für jedes Trennproblem (Analyt / HPLC-Phase) einzelnen dargestellt:

Iprodion (RP-HPLC)

HPLC-Säule:	HPLC-Säule 1, HPLC-Säule 2 oder HPLC-Säule 3
Flussrate:	40 µl/min
Anzahl der Bahnen:	1
Sprühstart:	40 min
Sprühdauer:	5 min
Verzögerungzeit:	37 s
Benzoylharnstoffe (RP-HPLC)	
HPLC-Säule:	HPLC-Säule 1, HPLC-Säule 2 oder HPLC-Säule 3
Flussrate:	50 µl/min
Anzahl der Bahnen:	2

Sprühstart:	32 min
Sprühdauer:	je 6 min
Verzögerungzeit:	30 s

Benzoylharnstoffe (GPC-HPLC)

HPLC-Säule:	HPLC-Säule A
Flussrate:	200 µl/min
Anzahl der Bahnen:	2
Sprühstart:	15,72 min
Sprühdauer:	1,71 min und 3,33 min
Verzögerungzeit:	8 s

Basische Fungizide (RP-HPLC)

HPLC-Säule:	HPLC-Säule 1, HPLC-Säule 2 oder HPLC-Säule 3	
Flussrate:	50 μl/min	
Anzahl der Bahnen:	5	
Sprühstart:	17,5 min	
Sprühdauer:	8,5 - 14,0 - 4,3 - 4,1 und 5,6 min	
Verzögerungzeit:	37 s	

3.3.8 Parameter für die GC / MS

Im folgenden sind die Parameter aufgeführt, die für die Gaschromatographie von Benzoylharnstoffen nach pyrolytischer Methylierung und von Carbendazim, Thiabendazol und ausgesuchten Carbamaten nach Pentafluorbenzylierung eingesetzt wurden. In Tabelle 3-18 sind die Parameter angegeben, die für die massenselektive Detektion der Pentafluorbenzylderivate im SIM-Modus verwendet wurden.

Parameter für die Gaschromatographie von Methylderivaten, gewonnen durch pyrolytische Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid

Gaschromatograph: Hewlett Packard HP 5890 Series II

Autosampler:	Hewlett Packard HP 7673 A / Gerstel Speed Programmed Sampler SPS	
Detektor:	Hewlett Packard HP 5989 A (MS Engine)	
Ionisationsart	Elektronenstoß-Ionisierung (EI, 70 eV)	
Quellentemperatur	200 °C	
Analysatortemperatur:	100 °C	
Transferline (Temperatur):	190 °C	
Betriebsart:	Full Scan Modus m/z 19 - 500	
Datenaufnahmesystem:	HP 59944C MS ChemStation auf HP Apollo 9000 unter HP-UX	
Datenauswertesoftware:	HP 59944C MS ChemStation; HP MS ChemStation G1034C Software, Version C.01.05 (Windows Version)	
Trägergas:	Helium 5.0; 2 ml/min	
Vorsäule:	unbelegte, deaktivierte GC-Säule (retention gap); fused silica; 5 m x 0,32 mm	
Trennsäule:	J & W DB17 Kapillarsäule; 30 m x 0,32 mm x 1,0 µm	
Temperaturprogramm:	50 °C 2 min halten // mit 8 °/min bis 150 °C // mit 10 °/min bis 250 °C // 30 min halten	
Probenaufgabe:	2,5 µl; 150 °C, 12 °/s bis 260 °C 1,5 min halten, 12 °/s bis 320 °C, 10 min halten, splitlos 2 min	
Spektrenbibliothek:	Wiley Mass Spectral Library; Mc Lafferty und Stauffer 1989	
Parameter für die Gaschromatographie von Pentafluorbenzylderivaten		
Gaschromatograph:	Hewlett Packard HP 5890 A	

Gaschromatograph:	Hewlett Packard HP 5890 A
Autosampler:	Hewlett Packard HP 7673 A
Detektor:	Hewlett Packard HP 5970 B Mass Selective Detektor (MSD)
Ionisationsart:	Elektronenstoß-Ionisierung (EI, 70 eV)
Quellentemperatur:	175 °C
Analysatortemperatur:	180 °C

114	Endpunktbestimmung	
Betriebsart:	Full Scan Modus m/z 100 - 600 oder SIM (Selected Ion Monitoring) siehe Tabelle 3-18	
Datenaufnahmesystem:	MS-Chemstation HP 5970	
Datenauswertesoftware:	Hewlett Packard ChemStation Software G1034C	
Trägergas:	Helium, konstanter Fluss bei circa 1 ml/min (61 kPa, 70 °C)	
Vorsäule:	HP 5 MS crosslinked; 1 m x 0,2 mm x 0,33 µm	
Trennsäule:	HP 5 MS crosslinked; 25 m x 0,2 mm x 0,33 µm	
Temperaturprogramm:	100 °C / 1 min halten // mit 30 °/min auf 150 °C // 2 min halten // mit 3 °/min auf 205 °C // mit 10 °/min auf 260 °C // 20 min halten	
Probenaufgabe:	2 µl mit split / splitless-Injektion	
Detektortemperatur:	280 °C	
Injektortemperatur:	250 °C	

Tabelle 3-18:	SIM-Parameter zur Bestin	nmung von Pentafluorb	oenzylderivaten
---------------	--------------------------	-----------------------	-----------------

Analyt	t _r in min	Zeitfenster in min	m/z	Dwell time in
				ms
Propoxur	15,60	$15,\!00 - 17,\!40^*$	109 / 290 / 332	333
Bendiocarb	17,40	17,40 - 17,80	125 / 165 / 346	333
Promecarb	17,90	17,80 – 19,30	330 / 315 / 287	333
Carbofuran	19,47	19,30 – 20,00	344 / 163 / 135	333
Aminocarb	20,17	20,00 - 24,00	331 / 150 / 122	333
Benzimidazol	24,18	24,00 - 25,30	324 / 300 / 557	111
Carbaryl	24,69		143 / 291 / 390	111
Aldrin	24,98		115 / 263 / 208	111
Methiocarb	25,51	25,30 - 30,50	348 / 167 / 139	333
Ethiofencarb	30,80 / 31,8**	30,50 - 32,60	528 / 213 / 241	333
Tribenuron	32,76	32,60 - 34,40	357 / 254 / 298	333
Thiabendazol	34,57	34,40 - 35,40	381 / 362 / 303	333
Carbendazim	35,85	35,40 - 40,00	551 / 492 / 292	333

*

Solvent delay 14,00 min Oxidationsprodukt des Ethiofencarb-Derivats **

3.3.9 Parameter für die GC mit paralleler ECD- und NPD-Detektion

Im folgenden sind die Parameter aufgeführt, die für die Gaschromatographie von den in dieser Arbeit untersuchten underivatisierten Pestiziden und ihren Pentafluorbenzylderivaten eingesetzt wurden.

Gaschromatograph:	Hewlett Packard HP 5890 A	
Autosampler:	Hewlett Packard HP 7673 A	
Detektor:	Elektron Capture Detektor (ECD) und Nitrogen Phosphorus Detektor (NPD) parallel angeordnet	
Datenauswertesoftware:	Nelson Analytical Chromatography Software 2600	
Trägergas:	Helium, konstanter Fluss bei circa 1 ml/min (61 kPa, 70 °C)	
Vorsäule:	HP 5 MS crosslinked; 1 m x 0,2 mm x 0,33 µm	
Trennsäule:	HP 5 MS crosslinked; 25 m x 0,2 mm x 0,33 µm	
Temperaturprogramm:	100 °C / 1 min halten // mit 30 °/min auf 150 °C // 2 min halten // mit 3 °/min auf 205 °C // mit 10 °/min auf 260 °C // 20 min halten	
Probenaufgabe:	2 µl mit split / splitless-Injektion	
Detektortemperatur:	ECD 300 °C / NPD 280 °C	
Injektortemperatur:	210 °C	

3.3.10 Parameter für die HPLC / MS

Im folgenden sind die Parameter aufgeführt, die für die Bestimmung von Benzoylharnstoffen mittels HPLC / MS verwendet wurden. In Tabelle 3-19 sind die Parameter angegeben, die für die massenselektive Detektion im SIM-Modus der untersuchten Substanzen verwendet wurden. Die Ionisationsbedingungen entsprechen den Einstellungen, die für die FIA-MS optimiert wurden.

FIA-MS-System zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen

LC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, D)	
Infusionspumpe:	Spritzenpumpe Modell 11 (Harvard, Hollisten, USA)	
Massenspektrometer:	Quattro-LC Triple-Stage MS (Micromass, Manchester, UK)	

116	Endpunktbestimmung		
Ionisierung:	g: Elektrospray-Ionisierung im negativen Modus		
	Capillary:	3,0 kV	
	Cone:	45 V	
	Source Block Temperature:	80 °C	
	Probe Temperature:	120 °C	
Hilfsgas (Stickstoff):	Stickstoffgenerator Whatman 75-72 (Whatman, Haverhill)		
Nebuliser Gas	100 L/h		
Drying Gas	550 L/h		
Analysator:	Ion Energy 0,8 V		
	Low Mass Resolution:	13,0	
	High Mass Resolution:	13,0	
Datenauswertesoftware:	MassLynxSoftware 3.2 (Micromass, Manchester)		

HPLC-MS-System zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen

HPLC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Trennsäule:	Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Vorsäule aus gleichem Material (Fa. M &. W Chromatographietechnik GmbH, Berlin)	
Säulen-Temperatur:	25 °C	
Eluent:	A: 100 % Wasser, B: 100 % Methanol	
Gradient:	0-10 min 75 % B in A // bis 11 min auf 89 % B // bis 12 min 80 % B halten // bis 14 min auf 100 % B // bis 19 min halten.	
Flussrate:	1,0 ml/min	
Injektionsvolumen:	variabel (1-20 µl)	
Massenspektrometer:	Quattro-LC Triple-Stage MS (Micromass, Manchester, UK), weitere MS-Parameter wie in der FIA / MS und Tabelle 3-19.	

Analyt	t _r in min	Zeitfenster in min	Ausgewählte Ionen	Dwell time in s
Diflubenzuron	6,08	4,00 - 8,00	289 / 309	0,6 / 0,2
Triflumuron	6,88		357 / 359	0,2 / 0,6
Hexaflumuron	9,01	8,00 - 11,75	439 / 459	0,3 / 0,3
Teflubenzuron	10,32		379 / 381	0,7 / 0,7
Flufenoxuron	12,74	11,75 - 14,00	487 / 489	0,3 / 0,4
Lufenuron	12,83		509 / 511	0,6 / 0,6
Chlorfluazuron	15,11	14,00 - 16,00	538 / 540	0,4 / 0,4

Tabelle 3-19:SIR-Programmierung zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen

3.4 Analytik biologisch aktiver Naturstoffe

Die Anwendbarkeit der HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der HPLC auf die Analytik biologisch aktiver Inhaltsstoffe wurde am Beispiel einer Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen geprüft. Folgende fünf Whiskysorten wurden untersucht: Malt-Whiskeys Jameson 12 years old und Tullemore Dew, Paddy und der Scotch-Whisky Grant's. Zusätzlich wurden der Rückstand eines destillierten irischen Whiskeys (Kevin's-Extrakt) untersucht. Je 10, 50, 100 und 200 μ l der Whiskys und 15 μ l des Whiskeyextraktes wurden auf HPTLC-Platten aufgetragen und mittels HPTLC / AMD entwickelt. Nach der Entwicklung wurden die Platten mit physikalischen, chemischen und biologischen Detektionsverfahren detektiert.

Zusätzlich wurde die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD durchgeführt.

Im folgenden sind die Parameter aufgeführt, die für die Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen verwendet wurden.

Auftragegerät:	Linomat III wahlweise mit Sprühkopf für HPLC-AMD /- TLC-Kopplung (Fa. CAMAG, Berlin), 6 bar Druckluft
HPTLC-Fertigplatten:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20x10 cm, 0,2 mm (ArtNr. 105642, Merck, Darmstadt) Die HPTLC-Platten werden zur Reinigung in Dichlor- methan / Methanol (1:1) bzw. Methanol entwickeln und bei 60 °C 30 min getrocknet.
Kopplungssoftware:	ATS3-C [182]
HPLC-Gradient A:	A = 100 % Wasser, B = 100 % Methanol 0 min 50 % B // 5 min 50 % B // 56 min 100 % B, bei 50 μl/min, danach bis 65 min 100 % B bei 200 μl/min
HPLC-Gradient B:	A = 100 % Wasser, B = 100 % Methanol 0 min 30 % B // 40 min 30 % B // 60 min 100 % B // 70 min 100 % B, bei 40 μl/min, danach bis 75 min 100 % B bei 200 μl/min
Auftrageposition:	AMD-TLC: Höhe: 8 mm, Bahnbreite: 4 mm, Bahnabstand:10 mm bzw. 15 mmHPLC-TLC / AMD-Kopplung: Höhe: 6-14 mm, Bahnbreite:

	6 mm, Bahnabstand: 10 mm Die Auftragung des Eluates erfolgt mittels Schnitttabellen.
Entwicklung:	AMD2-System (Fa. CAMAG, Berlin) mit variablen Gradienten nach Abschnitt 3.3.7.5.
UV-Detektion:	TLC Scanner II mit Auswertesoftware Cats 3 Version 3.16 Messbedingungen: Geschwindigkeit 5 mm/s, Deuteriumlampe/Wolframlampe, Sens automatisch, Span 35, Spaltbreite 4 (0,3 mm) Spaltlänge 7 (5 mm), Optik Mikro, Multiwellenlängenscan (200-400 nm) mit 30 nm Auflösung, Spektrenaufnahme im Bereich von 200 bis 400 nm mit 10 nm Auflösung
Chemische Detektion:	Die Platte wurde mit einem Zuckerreagenz, dem Biphenyl- amin / Anilin / Phosphorsäure-Reagenz (6 g + 6 ml + 30 ml mit Methanol auf 300 ml aufgefüllt) angesprüht und 15 min bei 130 °C im Trockenschrank aufbewahrt.
Biologische Detektion:	Leuchtbakterien-Test nach Abschnitt 3.3.4

3.5 Materialien und Chemikalien

3.5.1 <u>Standardsubstanzen und Standardlösungen</u>

Im folgenden sind alle Standardsubstanzen und die daraus hergestellten Standardlösungen aufgeführt. Um eine schnelle Zuordnung zu gewährleisten, sind die Standardlösungen nummeriert oder mit Buchstaben bezeichnet.

Die folgenden Substanzen wurden von Dr. Ehrenstorfer, Augsburg mit einer Reinheit größer 99 % bezogen:

Aldrin, Aminocarb, Bendiocarb, Benzimidazol, Bitertanol, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, Chlorfluazuron, Diflubenzuron, Ethiofencarb, Flufenoxuron, Hexaflumuron, Imazalil, Iprodion, Methiocarb, Myclobutanil, Pentachlorbenzol, o-Phenylphenol, Oxadixyl, Prochloraz, Procymidon, Promecarb, Propoxur, Tebuconazol, Teflubenzuron, Thiabendazol, Triadimenol, Tribenuron-Methyl und Triflumuron.

Lufenuron, das ebenfalls von Dr. Ehrenstorfer, Augsburg bezogen wurde, war lediglich als Standardlösung mit einer Reinheit größer 99 % und einer Konzentration von 10 ng Lufenuron/µl Acetonitril erhältlich.

Die Standardsubstanzen wurden bei -18 °C gelagert.

Von allen Standardsubstanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit Hilfe des Waageprogramms Supcon 2.02 [182] hergestellt. Das jeweils verwendete Lösungsmittel wurde in Abhängigkeit von der Endpunktbestimmung und der Löslichkeit der Substanzen gewählt. Für die GC wurde in der Regel Toluol und für die HPTLC bzw. RP-HPLC in der Regel Methanol verwendet. Diflubenzuron und Carbendazim sind schwerlöslich in Methanol, weshalb die Stammlösungen dieser Substanzen in Toluol hergestellt wurden.

Die Stammlösungen wurden bei 8 °C gelagert, ihre Haltbarkeit betrug 1 Jahr.

Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnen (1:10, 1:100 und 1:1000) oder Mischen Standardlösungen und -mixe hergestellt. Sie wurden ebenfalls bei 8 °C gelagert. Ihre Haltbarkeit betrug abhängig von ihrer Konzentration 1 Woche (0,001 mg/ml) bis 1 Monat (0,1 mg/ml).

Im folgenden sind die hergestellten Standardlösungen und -mixe angegeben.

Standardmixe zur Bestimmung der Benzoylharnstoffe mittels AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP- und der GPC-HPLC

Die sieben Benzoylharnstoffe wurden in zwei verschiedenen Standardlösungen Mix 17 und Mix 18 zusammengefasst. Jede Mischung enthielt die einzelnen Pestizide in einer Konzentration von 10 ng/µl, gelöst in Methanol (RP-HPLC) bzw. Ethylacetat / Cyclohexan-Mischung (GPC-HPLC).

<u>Mix 17</u>

Chlorfluazuron, Diflubenzuron, Hexaflumuron und fakultativ Lufenuron

<u>Mix 18</u>

Flufenoxuron, Teflubenzuron und Triflumuron

Lufenuron war lediglich fakultativ in Mix 17 enthalten. Zur Herstellung dieser Lösung wurde 1 ml der Lufenuronlösung mittels eines Stickstoffstroms bis zur Trockne eingeengt und in 1 ml Mix 17 gelöst.

Standardmixe zur Bestimmung der basischen Fungizide mittels AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC

Die zehn Standardsubstanzen der Gruppe der basischen Fungizide wurden in drei verschiedenen Standardlösungen Mix 1, Mix 2 und Mix 3 zusammengefasst. Die einzelnen Pestizide waren in den Mischungen in einer Konzentration von 10 ng/µl Methanol enthalten. Zur Optimierung der RP-HPLC wurden Mix 2 und Mix 3 zu gleichen Teilen gemischt.

Mix 1

Carbendazim, Bitertanol und Thiabendazol

```
Mix 2
```

Carbendazim, Bitertanol, Tebuconazol, Myclobutanil und Triadimefon

Mix 3

Prochloraz, Oxadixyl, Procymidon und Triadimenol

Standardmixe zur gemeinsamen Bestimmung von Diflubenzuron, Iprodion und den basischen Fungiziden mittels AMD-TLC und ihrer Kopplung mit der RP- und der GPC-HPLC

Zur Überprüfung, ob Iprodion und die Benzoylharnstoffe gemeinsam mit den basischen Fungiziden nachgewiesen werden können, wurden Iprodion und Diflubenzuron (als Vertreter der Benzoylharnstoffe) gemeinsam mit den zehn Standardsubstanzen der Gruppe der basischen Fungizide in drei verschiedenen Standardlösungen Mix A, Mix B und Mix C zusammengefasst. Die einzelnen Pestizide waren in den Mischungen in einer Konzentration von 10 ng/µl Methanol (AMD-TLC und RP-HPLC) bzw. Ethylacetat / Cyclohexan-Mischung (GPC-HPLC) enthalten. Zur Optimierung der RP-HPLC wurden Mix A, Mix B und Mix C zu gleichen Teilen gemischt.

<u>Mix A</u>

Imazalil, Thiabendazol, Carbendazim, Bitertanol, Myclobutanil und Triadimefon

<u>Mix B</u>

Triadimenol, Oxadixyl, (optional Iprodion), Procymidon

Mix C

Prochloraz, Tebuconazol, (optional Diflubenzuron)

Standardmix zur Bestimmung von Carbendazim, Thiabendazol und der Carbamate mittels GC nach Derivatisierung mit PFB-Br

Carbendazim, Thiabendazol und die Carbamate wurden in einer Standardlösung zusammengefasst. Die einzelnen Pestizide waren in den Mischungen in einer Konzentration von 10 ng/µl Acetonitril enthalten.

Pestizid-Mix GC

Aminocarb, Bendiocarb, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, Ethiofencarb, Methiocarb, Promecarb, Propoxur, Thiabendazol, Tribenuron-Methyl

Pilze	Stammnummer, Datum der Anzucht in der Stammsammlung (TU Berlin, Mikrobiologie, Seestraße 12-15, 13 335 Berlin)			
Aspergillus niger	aus dem Praktikum für Biotechnologen, TU Berlin, Institut für Mikrobiologie			
Aspergillus oryzae	Asp./2008 25.10.96			
Botrytis cinerea		03/0102 25.11.97		
Cephalosporium roseum		24/0201 02.04.97		
Cladosporium herbarum		28/0201 02.04.97		
Fusarium avenaceum		39/0201 25.11.97		
Fusarium culmorum		39/0401 25.11.97		
Fusarium equiseti		39/0501 25.11.97		
Giberella fujikuroi		42/0101 25.11.97		
Gliocladium roseum		43/0201 26.11.97		
Gloeosporium spec.		44/0101 26.11.97		
Helminthosporium maydis		49/0201 26.11.97		
Penicillium camemberti		65/0501 07.04.97		
Penicillium chrysogenum		65/0701 07.04.97		
Penicillium lilanicum		65/1801 27.02.96		
Penicillium roqueforti		65/2201 07.04.97		
Phoma hibernica		68/0201 26.11.97		
Phoma spec.		68/0104 26.11.97		
Rhizopus stolonifer		78/0607 08.04.97		
Nährmedien		Spezifikation, Hersteller		
Kartoffel-Glucose-Agar		für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt		
Chemikalien für mineralische	e Medien	Spezifikation, Hersteller		
Glucose		Merck, Darmstadt		
Kaliumdihydrogenphosphat	(KH_2PO_4)	p. a., Merck, Darmstadt		
Kaliumnitrat (KNO ₃)		p. a., Merck, Darmstadt		
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ * 7	7 H ₂ O)	p. a., Merck, Darmstadt		
Natriumchlorid (NaCl)		p. a., Merck, Darmstadt		
Di-Natriumhydrogenphospha	at (Na ₂ HPO ₄)	p. a., Merck, Darmstadt		

3.5.2 <u>Pilze und Chemikalien für die biologische Detektion</u>

Farbstoffe zum Anfärben des Myzels	Spezifikation, Hersteller
2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)	SIGMA Chemical Co., St. Louis
Jodonitrotetrazoliumchlorid (INT)	Fluka, Biochemika, Buchs
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Fluka, Biochemika, Buchs
Abschwemmlösung	Spezifikation, Hersteller
Triton X	Typ X-100, SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg

Es wurde eine 0,01% ige wässrige Lösung hergestellt.

3.5.3	Allgemeine	Materialien

Festphasenextraktion	Spezifikation, Hersteller
Bakerbond Amino (NH ₂)	40 μm Prep, LOT G28082, Mallinckrodt Baker, Griesheim
Knauer C-18	Art. Nr. Y 421, Europrep 60-30 C18, 60 A 20-45 μ irregulär, Batch B92215, Knauer, Berlin
ENV+	Separtis, Grenzach-Wyhlen
Vakuum-Arbeitsstation Baker spe-12G	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Filtrationssäulen (3 ml, 6 ml)	Separtis, Grenzach-Wyhlen
Leerreservoir (70 ml)	Separtis, Grenzach-Wyhlen
PTFE-Fritten	Separtis, Grenzach-Wyhlen
TLC-Fertigplatten*	Spezifikation, Hersteller
Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20x20 cm, 0,25 mm	ArtNr. 105554, Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20x10 cm, 0,2 mm	ArtNr. 105642, Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20x10 cm, 0,1 mm	ArtNr. 111764, Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 WRF ₂₅₄ s, 20x10 cm, 0,2 mm	ArtNr. 115552, Merck, Darmstadt
 * Die HPTLC-Platten wurden zur Reinigung in Dichlo 30 min getrocknet. 	rmethan / Methanol (1:1) entwickelt und bei 90 °C
Lösungsmittelfiltration	Spezifikation, Hersteller
EmporeTM Extractions Disks	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Membranfilter für Alkohole	Celluloseacetat, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen
Membranfilter für organische Lösungsmittel	Polyamid, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen
Membranfilter für Wasser	Cellulosenitrat, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen

Sonstiges	Spezifikation, Hersteller
Membranfilter für die HPLC	Polyamid (0,2 µm), M & W, Berlin
Rundfilter, \emptyset 70 mm	Nr. 595, Schleicher und Suell, Dassel
Faltenfilter \emptyset 90 mm	Nr. 597 ¹ / ₂ , Schleicher und Suell, Dassel
Faltenfilter \emptyset 150 mm	Nr. 597 ¹ / ₂ , Schleicher und Suell, Dassel
Faltenfilter, hydrophob Ø 150 mm	Nr. 597 HY ¹ / ₂ , Schleicher und Suell, Dassel
Probenfläschchen aus Glas mit Krimpverschluss und PTFE beschichtetem Septum	1,6 ml, WGA, Düsseldorf
Mikroeinsatz	200 µl, WGA, Düsseldorf
Probenfläschchen aus braunem oder weißem Glas mit Schraubverschluss und PTFE beschichtetem Septum	1,6 ml, Separtis, Grenzach-Wyhlen
Seesand	Merck, Darmstadt

3.5.4 <u>Allgemeine Lösungsmittel / Chemikalien</u>

Lösungsmittel	Spezifikation, Hersteller
Aceton	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Aceton	SupraSolv [®] , Merck, Darmstadt
Acetonitril	LiChrosolv [®] Gradient Grade, Merck, Darmstadt
tert-Butylmethylether	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Cyclohexan	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Cyclohexan	SupraSolv [®] , Merck, Darmstadt
Dichlormethan	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Dichlormethan	SupraSolv [®] , Merck, Darmstadt
Ethylacetat	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Ethylacetat	SupraSolv [®] , Merck, Darmstadt
Methanol	LiChrosolv Gradient Grade, Merck, Darmstadt
n-Hexan	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Tetrahydrofuran	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Toluol	LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt
Toluol	SupraSolv [®] , Merck, Darmstadt
Wasser	HPLC-Grade, Mallinckrodt Baker, Griesheim

LiChrosolv[®] - für die Flüssigchromatographie (wurde verwendet zur HPLC, TLC) Suprasolv[®] - für die organische Spurenanalytik (wurde verwendet zur GC)

Sonstige Chemikalien	Spezifikation, Hersteller	
Ameisensäure	98-100 %, p. a., Merck, Darmstadt	
Ammoniak	25 %ig, p. a., Merck, Darmstadt	
Celite	Merck, Darmstadt	
n-Dodecan	99 %ig, Merck, Darmstadt	
Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	p. a., Merck, Darmstadt	
Kieselgel 60	70-230 mesh (Nr. 7734) Merck, Darmstadt	
Natriumchlorid (NaCl)	p. a., Merck, Darmstadt	
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	wasserfrei, p. a., Merck, Darmstadt	
Pentafluorbenzylbromid (PFB-Br)	99 %ig, Aldrich, Deisenhofen	
Trimethylsulfoniumiodid	> 98 %, Fluka, Neu-Ulm	

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Probenaufarbeitung

4.1.1 <u>Probenextraktion</u>

4.1.1.1 Benzoylharnstoffe und Iprodion

Zur Extraktion von Benzoylharnstoff- und Iprodionrückständen aus pflanzlichen Lebensmitteln wurden zwei Probenaufarbeitungsmethoden, die DFG-Methode S19 und die DFG-Multimethode S19-online, miteinander verglichen. Dazu wurden verschiedene pflanzliche Lebensmittel mit je 0,01 ppm, 0,1 ppm und 1 ppm der Pestizide in Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe siehe Abschnitt 3.5.1) dotiert und nach den im folgenden beschriebenen Methoden aufgearbeitet. Die Bestimmung der Pestizide erfolgte dann nach Aufreinigung der Extrakte mittels HPTLC / AMD oder der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD.

Bei beiden Probenaufarbeitungsmethoden wurden die homogenisierten und dotierten Lebensmittelproben mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (2:1) in einem Becherglas extrahiert. Bei der DFG-Methode S19 wurde der Acetonextrakt über Celite gefiltert. Anschließend erfolgte eine Flüssig / Flüssig-Verteilung der Pestizide mit Dichlormethan im Schütteltrichter. Bei der DFG-Multimethode S19-online wurden die Pestizide aus dem Acetonextrakt in ein Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch überführt. Diese Extraktion erfolgte direkt im ersten Extraktionsgefäß und wurde mit einem Homogenisierstab unterstützt. Nach Trennung der Phasen wurde ein Aliquot der oberen organischen Phase dekantiert.

Bei beiden Methoden wurden die abgetrennten organischen Phasen über Natriumsulfat, wasserfrei getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum bis zur Lösungsmittelfreiheit eingeengt. In der Handhabung beider Methoden wurden Unterschiede festgestellt.

Der Dichlormethan-Extrakt konnte mit Natriumsulfat sehr gut getrocknet werden. Der Ethylacetat/Cyclohexan-Extrakt enthielt dagegen auch nach der Trocknung mit Natriumsulfat noch etwa 1 bis 2 ml Wasser, die etwa einem Wassergehalt von 2 % im Aceton / Ethylacetat / Cyclohexan-Extrakt entsprechen. Zur Entfernung des Wassers wurden daraufhin zwei Trocknungsmethoden verglichen. Bei der standardmäßig eingesetzten Trocknung A wurde das Natriumsulfat dem Extrakt direkt zugegeben; die Trocknung erfolgte durch gelegentliches Schütteln über 60 min. Bei der Trocknung B wurde die gleiche Menge Natriumsulfat in einen mit einem Filterpapier versehenen Trichter gefüllt und der Extrakt portionsweise auf das Natriumsulfat gegeben. Die Trocknung A führte zu einem niedrigeren Restwassergehalt.

Zur Gewinnung eines wasserfreien Extraktes wurde auch das Prinzip der Flüssig / Flüssig-Verteilung variiert. Die Flüssig / Flüssig-Verteilung des acetonischen Extraktes wurde mit einem Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch im Schütteltrichter durchgeführt. Aber auch hiermit ließ sich der Restwassergehalt nicht reduzieren.

Mit beiden Extraktionsmitteln (Dichlormethan und Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch) konnten keine Unterschiede bei der Trennung der wässrigen von der organischen Phase erzielt werden. Lediglich der Wassergehalt der organischen Phase war vom verwendeten organischen Lösungsmittel und von der Art der Trocknung abhängig. Störungen der Phasentrennung durch Emulsionsbildung waren ausschließlich von der Lebensmittelmatrix abhängig.

Aus der unzureichenden Trocknung bei der DFG-Multimethode S19-online resultierte, dass der Extrakt am Rotationsverdampfer nicht zur Trockne eingeengt werden konnte, da die Pestizide durch Wasserdampfdestillation (in unreproduzierbarem Ausmaß) aus dem Extrakt entfernt werden könnten. Bei einem relativ hohen Druck im Rotationsverdampfer und einer Wasserbadtemperatur von maximal 40 °C konnte der Extrakt dennoch reproduzierbar eingeengt werden. Da Wasser bei etwa 40 °C erst bei einem Druck von 35 mbar siedet, konnten die Lösungsmittel Aceton, Ethylacetat und Cyclohexan abdestilliert werden. Der letzte Rest der Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Stickstoffstromes entfernt. Anschließend wurde der wässerige Extrakt mit 1 ml Ethylacetat versetzt und danach mit 1 ml Cyclohexan gemischt. Die Trocknung des Ethylacetat / Cyclohexan-Extraktes erfolgte mit einem Natriumsulfat/Natriumchlorid-Gemisch (1+1). Von dem Gemisch wurde nach Filtration 1 ml zur GPC eingesetzt.

Die Richtigkeit und die Präzision beider Probenvorbereitungsmethoden (DFG-Methode S19 und S19-online) waren vergleichbar. Die Wiederfindungsraten und die relativen Standardabweichungen der Bestimmung der Benzoylharnstoff- und Iprodionrückstände zeigten bei gleichem Clean-up und gleicher chromatographischer Entwicklung keine Unterschiede.

Da sich die Probenaufarbeitung nach der DFG-Methode S19 im Zusammenhang mit der Trocknung des Extraktes als weniger aufwendig und als besser handhabbar erwies, wurde zur Extraktion von Benzoylharnstoff- und Iprodionrückständen aus pflanzlichen Lebensmitteln diese Aufarbeitungsmethode gewählt. Der Nachteil dieser Methode, die Verwendung von chlorierten Lösungsmitteln, wurde als gering angesehen, da zu einer Analyse lediglich 25 ml Dichlormethan eingesetzt wurden.

4.1.1.2 Basische Pestizide

Für die Gruppe der basischen Pestizide sollte eine geeignete und einfache Probenvorbereitung entwickelt werden, die es erlaubt, Carbendazim und Thiabendazol neben den anderen Pestiziden der Gruppe der basischen Pestizide präzise und mit einer ausreichenden Genauigkeit mittels HPTLC / AMD zu bestimmen.

Dazu wurden zwei Verfahren entwickelt. Eine Methode, bei der die DFG-Methode S19 durch pH-Einstellung an die basischen Pestizide angepasst wurde. Bei der zweiten wird der nach der DFG-Methode S19 erhaltene Aceton / Wasser-Extrakt mittels Festphasenextraktion in eine organische Phase überführt und gleichzeitig aufgereinigt. Auch bei dieser Methode wurde der pH-Wert des Aceton / Wasser-Extraktes mit Natriumcarbonat auf 8 bis 9 eingestellt (der sogenannte basische Probenextrakt), um auch solche Fungizide wie Thiabendazol gut erfassen zu können.

Flüssig / Flüssig-Verteilung

Als Probenmatrix wurden Äpfel eingesetzt, die mit 1 ppm Mix 1, 2 und 3 (Standardmixe für die Bestimmung der basischen Fungizide siehe Abschnitt 3.5.1) dotiert wurden. Die Aufreinigung der dotierten Proben erfolgte nach der angepassten DFG-Methode S19 (Abschnitt 3.1.2). Die dabei erhaltenen Extrakte wurden mittels HPTLC / AMD oder mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD chromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgte densitometrisch.

Unter diesen Bedingungen konnte lediglich Imazalil nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die anderen untersuchten basischen Fungizide sind in Abschnitt 4.4.4 (Tabelle 4-38 und Tabelle 4-39) dargestellt. Prochloraz konnte mit einer Wiederfindungsrate von 51 % und mit einer relativen Standardabweichung von 24 % nur in unbefriedigendem Maße wiedergefunden werden. Für die anderen Pestizide lag die Wiederfindungsrate mit 66 bis 81 % und einer relativen Standardabweichung von 6 bis 15 % im zufriedenstellenden Bereich.

Die vorgestellte Probenaufarbeitung war geeignet, alle untersuchten Fungizide außer Imazalil und Prochloraz in pflanzlichen Lebensmitteln mit ausreichender Richtigkeit und Präzision zu bestimmen. Die beschriebene Methode wurde dennoch nicht weiter optimiert, da Imazalilund Prochloraz-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln mit der DFG-Methode S19 bestimmt werden können und ihre Bestimmung nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war.

RP-Festphasenextraktion - Optimierung der Festphasenextraktion

Neben der Flüssig / Flüssig-Extraktion sollte für die Rückstandsanalytik der basischen Pestizide die RP-Festphasenextraktion untersucht werden. Ziel dieser Untersuchung war die Verbesserung der Wiederfindung, Verbesserung der Aufreinigung, Verkürzung der Analysenzeit und ein verringerter Verbrauch an organischen Lösungsmitteln.

Wie bei der Flüssig / Flüssig-Verteilung sollten die Pestizide mittels Aceton-Extraktion bei einem bestimmten pH-Wert (8 – 9) und einem bestimmten Wassergehalt (2:1) aus dem homogenisierten Lebensmittel extrahiert werden. Der sogenannte basische Probenextrakt sollte durch eine Festphasen-Extraktion in eine organische Phase überführt werden. Gleichzeitig sollte eine effektive Aufreinigung stattfinden. Die Art des Festphasenmaterials und alle Einzelschritte der Festphasen-Extraktion wurden optimiert. Zur Optimierung der Festphasenextraktion wurden dotierte Aceton / Wasser-Gemische eingesetzt, die mit Natriumcarbonat auf pH 8 bis 9 eingestellt wurden. So konnte sichergestellt werden, dass Matrixbestandteile von Lebensmitteln die Chromatographie während der Optimierungsphase nicht störten.

Es wurden drei unterschiedliche Festphasenmaterialien getestet, eine RP-C18-Phase von Knauer, eine Aminophase von Baker und eine ENV+-Phase von Separtis. In ersten Vorversuchen wurden die Pestizide von den Festphase mit dem sehr polaren Lösungsmittel Methanol eluiert. Diese Versuche zeigten dass die Verwendung der RP-C18-Phase am erfolgversprechensten war, da hier die Pestizide am besten an der RP-Phase gebunden wurden und somit die Wiederfindungsraten am höchsten waren. Aus diesem Grund wurde die Festphasen-Extraktion weiter lediglich mit dieser Phase optimiert.

Zuerst wurde der Elutionsschritt der Festphasenextraktion optimiert. Die höchsten Wiederfindungsraten wurden durch aufeinanderfolgende Elution mit 4 ml Dichlormethan und 4 ml Methanol erreicht.

Aufgrund des hohen Acetonanteils im basischen Probenextrakt konnten die Analyten nicht vollständig an der Festphase festgehalten werden. Zur Verbesserung der Retention wurden folgenden Strategien ausprobiert:

- Verringerung des Acetonanteils durch Wasserzugabe,
- Verringerung des Acetonanteils durch Einengen des basischen Aceton/Wasser-Gemisches am Rotationsverdampfer und
- Erhöhung der Ionenkonzentration durch Zugabe von Natriumchlorid.

Bei der Verringerung des Acetonanteils von 60 % auf bis zu 5 % durch Zugabe von Wasser zum basischen Aceton/Wasser-Gemisch ergaben sich keine Verbesserungen der Wiederfindungsraten für die Analyten. Die Verringerung des Acetonanteils durch Einengen des basischen Aceton/Wasser-Gemisches am Rotationsverdampfer erwies sich ebenfalls als ungeeignet, da auch etwa 20 % der Analyten dabei durch Wasserdampfdestillation verloren gingen. Am erfolgreichsten war die Erhöhung der Salzkonzentration. Nach Zugabe von mindestens 2 g Natriumchlorid zum basischen Aceton/Wasser-Gemisch wurden die Pestizide in zufriedenstellendem Maße wiedergefunden (siehe Tabelle 4-1, Spalte - ohne Waschschritt).

Tabelle 4-1:Festphasenextraktion der basischen Fungizide im basischenAceton/Wasser-Gemisch

Vergleich der SPE ohne und mit den Waschschritten mit Methanol/Wasser und mit Dichlormethan/Cyclohexan

	ohne V	Waschschritt	mit Waschschritt 50 ml Methanol/Wasser (20 + 80)		mit Waschschritt 5 ml DCM/Cyclohexan (10+90)	
n = 3	MW %	rel. STABW %	MW %	rel. STABW %	MW %	rel. STABW %
Imazalil	105	9	100	7	99	10
Thiabendazol	94	6	102	5	102	7
Carbendazim	105	2	96	6	106	3
Bitertanol	102	1	98	4	103	5
Myclobutanil	108	5	101	6	109	6
Triadimefon	104	4	104	4	107	6

(Ohne Waschschritt = nach Erhöhung des Ionenkonzentration des basischen Aceton/Wasser-Gemisch und Trocknung mit 4 ml Cyclohexan

MW: Mittelwert rel. STABW: relative Standardabweichung

Als weiterer Parameter wurde der Trocknungsschritt optimiert. Dazu wurde die Trocknung des Festphasenmaterials durch Elution mit 4 ml Cyclohexan mit der üblichen Trocknung des Festphasenmaterials mittels eines Stickstoffstromes verglichen.

Da Cyclohexan nicht mit Wasser mischbar ist, kann die Feuchtigkeit vom Festphasenmaterial vollständig verdrängt und somit die Festphase getrocknet werden. Die auf diese Weise erzielten Wiederfindungsraten für die Analyten entsprachen denen, die durch Trocknung mittels eines Stickstoffstromes erreicht wurden. Aus diesem Grund wurde im weiteren die kostengünstigere und schnellere Trocknung mittels Cyclohexan eingesetzt.

Zur Aufreinigung der Extrakte wurden zwei aufeinanderfolgende Waschschritte in die SPE-Methode eingeführt. Die Entfernung sehr polarer Matrixbestandteile wurde durch Waschen der Säule mit 50 ml verschiedener Wasser/Methanol-Gemische (5, 10, 15, 20, 25 50 und 75 % Methanol, pH - 8,5) vor dem Trocknungsschritt getestet. Die Entfernung sehr lipophiler Matrixbestandteile erfolgte nach dem Trocknen der Säule mit 5 ml verschiedener Cyclohexan / Dichlormethan-Gemische (5 %, 10, 15, 20 und 25 % Dichlormethan). Die besten Ergebnisse wurden mit Gemischen von 20 % Methanol in Wasser und 10 % Dichlormethan in Cyclohexan erzielt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Die Wiederfindungsraten wurden durch die Waschschritte nicht verringert.

RP-Festphasenextraktion - Anwendung der Festphasenextraktion

Für Wiederfindungsversuche an pflanzlichen Lebensmitteln wurden Orangen als Proben ausgewählt, da Zitrusfrüchte eine sehr komplexe Matrix besitzen, deren Bestandteile im gesamten untersuchten Absorptionsbereich von 200 bis 300 nm absorbieren. Auf diese Weise ließ sich die Reinigungsleistung der Festphasenextraktion mit anschließender Minikieselgel-Fraktionierung besonders gut beobachten.

Die Orangen wurden mit 1 ppm Mix A (Standardmix für die Bestimmung der basischen Fungizide, siehe Abschnitt 3.5.1) dotiert und mittels der RP-Festphasenextraktion für basische Fungizide (Abschnitt 3.1.3.3) aufgearbeitet. Die durch anschließende Aufreinigung mit der Minikieselgel-Fraktionierung erhaltenen Extrakte wurden mittels HPTLC / AMD getrennt und densitometrisch im Multiwellenlängenscan vermessen.

Bei der Festphasenextraktion der basischen Probenextrakte wurde beobachtet, dass das Eluat der Festphase lediglich bis zur Aufgabe von etwa einem Drittel des basischen Probenextraktes farblos war. Außerdem nahm die Tropfgeschwindigkeit im Laufe der Extraktion ab. Es ist zu vermuten, dass die Poren der Festphase im Verlauf der Extraktion verstopften und dadurch die Retention der interessierenden Probenbestandteile vermindert wurde. Bei den nachfolgenden Waschschritten waren die Eluate zu Beginn des jeweiligen Waschvorganges farbig und zum Ende farblos. Aus dieser Beobachtung ließ sich schließen, dass die Waschschritte vollständig waren.

In Abbildung 4-1 sind HPTLC / AMD-Chromatogramme einer undotierten Orangenprobe (a), eines Standards, 200 ng je Pestizid Mix A (b) und einer dotierten Orangenprobe (c) gegenübergestellt.



Abbildung 4-1: HPTLC / AMD-Chromatogramme, Orangen nach SPE und MKGF

a Probe: Orange undotiert,

b

- Standard: Mix A 200 ng je Pestizid
- c Probe: Orange dotiert mit 1 ppm Mix A

Von den untersuchten Substanzen ließ sich Thiabendazol aufgrund seines charakteristischen Spektrums mit einem Absorptionsmaximum bei 301 nm sicher identifizieren. Die Identifizierung von Carbendazim und Bitertanol bereitete dagegen Schwierigkeiten. Sie ließen sich trotz ihrer charakteristischen Spektren mit Absorptionsmaxima bei 276 nm und 254 nm nur mit geeigneter Untergrundkompensation^a identifizieren, da die sie überlagernden Orangeninhaltsstoffe im Unterschied zu anderen Lebensmittelinhaltsstoffen im höheren Wellenlängenbereich absorbieren (Vergleiche Abschnitt 4.4.4). Diese die Detektion störenden

^a Messung eines Untergrundspektrums in der Nähe des vermuteten Pestizidpeaks.

Orangeninhaltsstoffe wurden durch die Aufarbeitungsmethode (SPE und MKGF) nicht im ausreichenden Maß abgetrennt.

Imazalil, Myclobutanil und Triadimefon konnten lediglich durch eine Vergrößerung der Peaks im Chromatogramm der dotierten Probe bei den entsprechenden Laufstrecken erkannt werden. Aufgrund ihrer unspezifischen Spektren mit Absorptionsmaxima kleiner 230 nm konnte ihre Anwesenheit jedoch nicht sicher bestätigt werden. Eine Untergrundkompensation wie bei Carbendazim und Bitertanol führte nicht zum Erfolg, da die Pestizidspektren und die Spektren der Orangeninhaltsstoffe sich zu stark ähnelten und dadurch die resultierenden Spektren nicht aussagekräftig waren.

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten wurde versucht, die Pestizide Thiabendazol, Carbendazim, Bitertanol und Myclobutanil zu quantifizieren. Für Thiabendazol, Carbendazim, Bitertanol wurde dazu das Signal in ihrem jeweiligen UV-Maximum herangezogen. Bei den Pestiziden Bitertanol und Myclobutanil mussten die in den parallel aufgearbeiteten Blindproben gefundenen Gehalte der die Pestizide vortäuschenden Matrixbestandteile abgezogen werden. Wie in Tabelle 4-2 dargestellt, waren die Wiederfindungsraten für die Pestizide und die Präzision der Aufarbeitungsmethode nicht zufriedenstellend. Die Wiederfindungsraten lagen mit maximal 50 % zu niedrig und zeigten starke Schwankungen.

	Thiabendazol	Carbendazim	Bitertanol*	Myclobutanil*
Probe 1	24 %	12 %	50 %	0 %
Probe 2	51 %	30 %	101 %	26 %
Probe 3	14 %	7 %	0 %	0 %
Mittelwert	30 %	16 %	50 %	9 %
rel. StAW	65 %	73 %	100 %	173 %

Tabelle 4-2:Wiederfindungen dotierter Orangenproben nach Festphasenextrak-
tion und anschließender MKGF

* Blindwert von 90 bzw. 83 % abgezogen.

Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Wiederfindungsversuche und der beschriebenen Beobachtungen bei der Festphasenextraktion wird vermutet, dass die Kapazität der RP-Festphase nicht ausreichend war.

Eine mögliche Problemlösung für die niedrigen und schwankenden Wiederfindungsraten wäre die Extraktion eines Aliquots des basischen Acetonextraktes. Um trotzdem im gleichen Arbeitsbereich zu bleiben, müsste bei der HPTLC / AMD dann ein entsprechend größeres Probenvolumen auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden.

Die Festphasenextraktion wurde für die Bestimmung von basischen Fungizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln jedoch nicht weiter optimiert, weil die niedrige Reinigungsleistung der Festphasenextraktion gegenüber der Flüssig/Flüssig-Verteilung, und die aufwendige Handhabung durch die notwendigen Waschschritte keine Vorteile gegenüber der Flüssig/Flüssig-Verteilung zeigte. Außerdem ließ eine weitere Optimierung nicht erwarten, dem Ziel, eine möglichst einfache Aufarbeitungsmethode zur Verfügung zu haben, näher zu kommen.

4.1.2 <u>Aufreinigung</u>

4.1.2.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)

In der vorliegenden Arbeit sollten zur Aufreinigung von Probenextrakten die analytische GPC und die präparative GPC eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Eignung dieses chromatographischen Prinzips zur Aufreinigung von pflanzlichen Lebensmittelextrakten geprüft, die die in dieser Arbeit untersuchten Pestizide enthielten. Die Carbamate und Tribenuron-Methyl wurden in diese Untersuchung nicht eingeschlossen, da die Aufreinigung mittels GPC für diese Pestizide nicht vorgesehen war.

Geeignet für die Aufreinigung mittels GPC sind Pestizide, die keine nichtreproduzierbaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, da sich bei nichtreproduzierbaren Wechselwirkungen sich das Elutionsvolumen dieser Pestizide ändert. Sie verlassen nicht reproduzierbar die Säule und die Pestizidfraktion kann nicht zuverlässig bestimmt werden.

Zur Ermittlung des Retentionsverhaltens der untersuchten Pestizide wurde die analytische GPC benutzt, bei der die Pestizide direkt mit einem UV-Detektor nachgewiesen werden können. Da beide GPC-Systeme mit der gleichen mobilen Phase betrieben wurden, konnten die Ergebnisse der analytischen GPC gut auf die präparative GPC übertragen werden.

Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden die Pestizide in der mobilen Phase (Ethylacetat / Cyclohexan (1+1/v+v)) mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

Benzoylharnstoffe und Iprodion

Die Benzoylharnstoffe und Iprodion zeigten im gelchromatographischen System erwartungsgemäß ein gutes Elutionsverhalten. Sie eluierten in reproduzierbaren Mengen immer im gleichen Elutionsvolumen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Pestizide keine nichtreproduzierbaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingingen. Die Reihenfolge der Elution (Chlorfluazuron, Hexaflumuron, Flufenoxuron, Triflumuron, Teflubenzuron, Diflubenzuron, Iprodion, Lufenuron) entsprach jedoch nicht der Reihenfolge der Molekülgrößen (Chlorfluazuron, Lufenuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron, Teflubenzuron, Triflumuron, Iprodion, Diflubenzuron).

Zur Abschätzung der Wechselwirkungen der Pestizide mit der stationären Phase wurden die relativen Retentionsvolumina der Pestizide mit den relativen Retentionsvolumina der Polystyrole, der Gallussäureester und der Phthalate verglichen, die als Kalibrierstandards eingesetzt wurden (mehr im Abschnitt 4.3.4.3).

Um eventuelle Schwankungen der Flussgeschwindigkeit auf das Retentionsvolumen einer Substanz berücksichtigen zu können, wurde ein sogenanntes relatives Retentionsvolumen (rel. V_r) definiert. Das relative Retentionsvolumen ist hierbei die Differenz der Retentionsvolumina von Aceton und dem untersuchten Analyten. Aceton wurde als interner Standard gewählt, weil es ein sehr kleines Molekül ist, das mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht und in der eingesetzten hohen Konzentration (1 % im Lösungsmittel) sehr gut im UV-Detektor nachweisbar ist.

In Abbildung 4-2 ist die Abhängigkeit der relativen Retentionsvolumina der Pestizide und der verschiedenen Kalibrierstandards von ihren Molekülgrößen (log Molmasse) dargestellt. Die Einführung des relativen Retentionsvolumens hatte zur Folge, dass die Analyten mit einer großen Molmasse auch ein großes relatives Retentionsvolumen aufweisen.

Aus dem Vergleich der relativen Retentionsvolumina der Pestizide mit den relativen Retentionsvolumina der Kalibrierstandards konnte geschlossen werden, dass die Benzoylharnstoffe und Iprodion nicht auf Grund von Wechselwirkungen mit der stationären Phase retardiert werden, sondern das Elutionsverhalten überwiegend vom hydrodynamischen Volumen der Pestizide abhängig ist. Lufenuron wurde offensichtlich retardiert; es eluierte an letzter Stelle, besitzt aber die zweitgrößte Molmasse. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich aber, dass Lufenuron reproduzierbar mit einer konstanten Retentionszeit eluiert. Da auch die anderen untersuchten Pestizide keine oder keine nichtreproduzierbaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingingen, war die analytische GPC als Clean-up-Schritt für die Rückstandsanalytik der Benzoylharnstoffe und des Iprodions geeignet.

Die Übertragung der Ergebnisse auf die präparative GPC erfolgte problemlos. Zur Bestimmung der Elutionsbereiche von den Benzoylharnstoffen und von Iprodion wurden diese Substanzen über eine präparative GPC-Säule eluiert und das Eluat in 5-ml-Schritten fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels HPTLC / AMD analysiert.



Abbildung 4-2:Abhängigkeit der relativen Retentionsvolumina (rel. Vr) derPestizide und der verschiedenen Kalibrierstandards von ihren
Molekülgrößen

rel. $V_r = V_r$ (Aceton) - V_r (Analyt)

Chlorfluazuron, Flufenoxuron und Hexaflumuron waren aufgrund ihrer Molekülgröße (541, 489 und 461 g/mol) im üblicherweise bei der DFG-Multimethode S19 aufgefangenen Eluat von 95 – 175 ml nur teilweise nachweisbar. Durch Erweiterung des aufgefangenen Elutionsbereiches auf 90 – 175 ml konnten alle Benzoylharnstoffe und Iprodion erfasst werden.

Die Wiederfindungsraten der Pestizide lagen oberhalb von 90 %. Zu beachten ist, dass sich durch die Änderung des Elutionsbereiches die Reinigungswirkung der GPC verringert, da im Elutionsbereich von 90 bis 95 ml noch ein Teil der höhermolekularen Fette und Fettbegleitstoffe eluieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die analytische und die präparative GPC geeignete Aufreinigungsschritte für die Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffe und Iprodion sind.

Basische Pestizide

Auch bei den basischen Pestiziden entsprach die Reihenfolge der Elution (Tebuconazol, Triadimefon, Bitertanol, Triadimenol, [Diflubenzuron]^a, Myclobutanil, [Iprodion]^a, Procymidon, Prochloraz, Oxadixyl, Thiabendazol, Imazalil, Carbendazim) nicht der Reihenfolge der Molekülgrößen (Prochloraz, Bitertanol, [Iprodion, Diflubenzuron]^a, Tebuconazol, Imazalil, Triadimenol, Triadimefon, Myclobutanil, Oxadixyl, Procymidon, Thiabendazol, Carbendazim).

Erste Versuche zeigten, dass Carbendazim, Thiabendazol und Imazalil im gelchromatographischen System stark retardierten. Ihre Retentionsvolumina waren wesentlich größer als das Retentionsvolumen von Aceton. Das bedeutete, das die drei Pestizide Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingingen. Während die ersten Versuche mit Standardgemischen reproduzierbare Ergebnisse lieferten, ergaben Versuchsreihen mit aufgearbeiteten Lebensmittelextrakten abweichende Werte. Auch die Retentionszeiten der Standards, die nach Benutzung der Säulen untersucht wurden, waren nicht identisch mit den anfänglich ermittelten Retentionszeiten der Standards. Vermutlich wurde die stationäre Phase durch die Lebensmittelmatrix verändert. Dieses Phänomen konnte bei den anderen untersuchten Pestiziden, den Benzoylharnstoffen und Iprodion, nicht beobachtet werden.

Aus den beschriebenen Versuchen wurde geschlossen, dass sich die GPC zur Rückstandsanalytik von Carbendazim, Thiabendazol und Imazalil in pflanzlichen Lebensmitteln nicht als Aufreinigungsmethode eignet. Auf weitere Untersuchungen der basischen Pestizide mittels GPC wurde verzichtet, weil die aus der Literatur bekannten Probleme mit Carbendazim bestätigt wurden. Die Ergebnisse für Imazalil, das üblicherweise mit der DFG-Multimethode erfasst wird, überraschten, da auch Imazalil ein unreproduzierbares Verhalten im gelchromatographischen System zeigte. Auf Grund der Ergebnisse wurde vermutet, dass es bei der Rückstandsanalytik in pflanzlichen Lebensmitteln von Imazalil zu falsch negativen Ergebnissen kommt oder die Matrix eine Schutzwirkung für Imazalil ausübt, so dass dieser Komplex in der Pestizidfraktion eluiert.

4.1.2.2 Minikieselgel-Fraktionierung (MKGF) nach der DFG-Multimethode S19

Im Anschluss an die GPC wurden die Probenextrakte zur weiteren Aufreinigung der Minikieselgel-Fraktionierung nach der DFG-Multimethode S19 zugeführt. Diese MKGF wurde auch zur Reinigung von derivatisierten Extrakten eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.1.1).

^a Iprodion und Diflubenzuron wurde für eine bessere Einordnung der Ergebnisse mit vermessen.

Je 10 µg der Benzoylharnstoffe, des Iprodions und der basischen Pestizide wurden in 1 bis 2 ml n-Hexan gelöst (entspricht 1 ppm nach S-19-Aufarbeitung) und auf die vorbereitete MKG-Säule aufgegeben. Die Pestizide wurden mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen aufsteigender Polarität in fünf Fraktionen eluiert. In Tabelle 4-3 sind die Elutionsdaten der Pestizide aufgeführt.

Alle Benzoylharnstoffe und Iprodion eluierten in der dritten Fraktion [Toluol / Aceton (95+5)]. Die Wiederfindungsraten für die Pestizide lagen oberhalb von 85 %.

Fraktion:	1	2	3	4	5			
Elutionsmittel*:	n-Hexan / Toluol (65+35/v+v)	Toluol (100)	Toluol / Aceton (95+5/v+v)	Toluol / Aceton (8+2)	Aceton (100)			
Chlorfluazuron			87 %					
Diflubenzuron	101 %							
Flufenoxuron	85 %							
Hexaflumuron	90 %							
Lufenuron			87 %					
Teflubenzuron			88 %					
Triflumuron			89 %					
Iprodion			93 %					
Bitertanol				76 %	31 %			
Carbendazim					91 %			
Imazalil					96 %			
Myclobutanil				71 %	23 %			
Oxadixyl				94 %				
Prochloraz				100 %	8 %			
Procymidon			78 %	15 %				
Tebuconazol				87 %	20 %			
Thiabendazol				78 %	23 %			
Triadimefon				88 %	10 %			
Triadimenol				74 %	36 %			

Tabelle 4-3:Fraktionen der Minikieselgel-Fraktionierung / Wiederfindungsraten
der Pestizide

* Jeweils 8 ml

Die basischen Pestizide zeigten ein heterogenes Verhalten, sie eluierten mit einer guten Wiederfindung (größer 91 %) in der dritten bis fünften Fraktion. Zur vollständigen Erfassung der basischen Pestizide müssen die vierte und die fünfte Fraktion zusammengefasst werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Minikieselgel-Fraktionierung einen geeigneten Aufreinigungsschritt für die Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffe, Iprodion und basischen Pestiziden darstellt.

4.1.2.3 Minikieselgel-Fraktionierung (MKGF) nach Pentafluorbenzylierung

Carbendazim, Thiabendazol und die Carbamate wurden für die gaschromatographische Bestimmung zu ihren Pentafluorbenzylderivaten umgesetzt. Vor der GC-Analyse mussten die derivatisierten Extrakte aufgereinigt werden. Hierzu sollte ein Clean-up-Schritt entwickelt werden, der sowohl die Matrixbestandteile weitgehend entfernt, als auch den Reagenzüberschuss vom Probeneluat abtrennt.

Die GPC wurde dazu nicht eingesetzt, weil der Reagenzüberschuss möglicherweise die GPC-Säule schädigen könnte.

Anstelle dessen wurde die Minikieselgel-Fraktionierung eingesetzt, wie sie von der DFG-Multimethode S19 bekannt ist, und für das vorliegende Problem optimiert.

Zur Optimierung der MKGF wurden mit 1 ppm Pestizid-Mix GC (Standardmix für die Bestimmung von Carbendazim, Thiabendazol und der Carbamate mittels GC nach Derivatisierung mit PFB-Br) dotierte Apfel- und Zitronenproben nach Abschnitt 3.1.1 (mit Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch) aufgearbeitet. Diese Probenextrakte sowie ein 4 mg/l Pestizid-Mix GC und eine Blindprobe wurden derivatisiert und zur Minikieselgel-Fraktionierung eingesetzt. Dazu wurden die Derivate in 1 bis 2 ml n-Hexan gelöst und auf die vorbereitete MKG-Säule aufgegeben. Die Pestizide wurden mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen aufsteigender Polarität eluiert (siehe Tabelle 4-4 je 8 ml n-Hexan, verschiedene Lösungsmittelgemische n-Hexan / Toluol, Toluol, Lösungsmittelgemisch Toluol / Aceton und Aceton).

Wie in Tabelle 4-4 dargestellt, wurden lediglich in der Fraktion 0 (n-Hexan) keine Pestizidderivate eluiert. Diese Fraktion kann zur Abtrennung der Lipoide und des dort gefundenen PFB-Br-Überschusses benutzt werden. Die ersten Pestizidderivate wurden in Fraktion 1 [Toluol / n-Hexan (95+5/v+v)] und die letzten Pestizidderivate in Fraktion 9 [Toluol / Aceton (75+25/v+v)] eluiert. Ein großer Teil der Zitronenmatrix wurde in Fraktion 10 eluiert. Die Wiederfindungsraten waren für alle Pestizide außer für Ethiofencarb mit 88 bis 115 % zufriedenstellend.

Da die Pestizidderivate über einen großen Polaritätsbereich in Fraktion 1 bis 9, der PFB-Br-Überschusses in Fraktion 0 und ein großer Teil der Matrix in der Fraktion 10 eluierten, wurde in nachfolgenden Versuchen die Fraktionen zusammengefasst, so dass die Säule mit 8 ml n-Hexan gewaschen und die Pestizidderivate mit 8 ml Toluol/Aceton (75/25) eluiert wurden.

Substanz	Fraktion 0	n-Hexan (100)	Fraktion 1 Hexan/Toluol (95+5)	Fraktion 2	Hexan/Toluol (90+10)	Fraktion 3 Hexan/Toluol (85+15)	Fraktion 4 Hexan/Toluol (80+20)	Fraktion 5 Hexan/Toluol (75+25)	Fraktion 6 Hexan/Toluol (70+30)	Fraktion 7	(cc+co) louol (cc+co)	Fraktion 8 Toluol (100)	Fraktion 9 Toluol/Aceton (75+25)	Fraktion 10 Aceton (100)	Summe Wiederfindung in %
Propoxur							XX	xxx	х						102
Bendiocarb						Х	XXX	Х							115
Promecarb			X	X	XX										92
Carbofuran							Х	XXX	XX						93
Aminocarb												XX	XX		100
Carbaryl			XX												88
Methiocarb				X	XX	XX									98
Ethiofencarb									XX	XXX	K	XX			174*
Tribenuron													XX		95
Thiabendazol													XXX	Х	104
Carbendazim													XXX	х	113
PFB-Br	XX	X													
Zitronenmatrix														XXX	

 Tabelle 4-4:
 Minikieselgel-Fraktionierung der Pentafluorbenzylderivate

x – weniger als 10 %, xx – 10 – 50 %, xxx – mehr als 50 % (bezogen auf den unfraktionierten Standard) * Summe beider Ethiofencarb-Derivate

Die MKGF führte neben der Abtrennung des überschüssigen Derivatisierungsreagenzes auch zu einer erheblichen Abtrennung der Matrixbestandteile. Der Vergleich der TIC-Chromatogramme in Abbildung 4-3 zeigt deutliche Unterschiede zwischen der Apfelprobe ohne und mit optimierter Minikieselgel-Fraktionierung. Durch das Clean-up mittels MKGF wurde ein erheblicher Teil der Matrixbestandteile (Elution im Bereich bis 23 min) entfernt, der möglicherweise das GC / MS-System schädigen könnte.



Abbildung 4-3: GC / MS-Chromatogramme (TIC-Modus) der mit 1 ppm Pestizid-Mix GC dotierten Apfelprobe

Die schlechte Wiederfindung für das Ethiofencarb-Derivat konnte durch Wechselwirkungen des Kieselgels der MKG-Säule mit dem Derivat erklärt werden. Ein Teil des Ethiofencarb-Derivats wurde während der MKGF verändert, so dass zwei Peaks detektiert wurden (30,8 min und 31,8 min). Die unterschiedlichen Massenspektren der Ethiofencarb-Derivate vor und nach MKGF sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Dieses Phänomen wurde bereits bei der MKGF von Malathion beobachtet; vermutet wird hier eine Oxidation des S-Atoms des Malathions bzw. des Ethiophencarb-Derivats an der Kieselgel-Oberfläche.

Da neben der Matrixminderung die Abtrennung des überschüssigen Derivatisierungsreagenzes besonders wichtig war, wurde geprüft, in welcher Minikieselgel-Fraktion das PFB-Br eluiert.

a: ohne MKGF b: nach optimierter MKGF, Fraktion Toluol/Aceton (75+25/v+v)

In Abbildung 4-5 sind die GC / ECD-Chromatogramme der beiden Minikieselgel-Eluate der Zitronenprobe (Aceton und n-Hexan) dem Blindwert (PFB-Br) gegenübergestellt.



Abbildung 4-4: EI-MS-Spektren der Ethiofencarb-Derivate 1 und 2

- a EI-MS-Spektrum des Ethiofencarb-Derivats ohne MKGF und des Derivats 1 nach MKGF ($t_r = 30,8$ min)
- b EI-MS-Spektrum des Ethiofencarb-Derivats 2 nach MKGF (t_r =31,8 min)



Abbildung 4-5: GC / ECD-Chromatogramme der Zitronenprobe

- a: Zitronenprobe Fraktion Aceton (100)
- b: Blindprobe (PFB-Br-Reagenz) ohne MKGF
- c: Zitronenprobe Fraktion n-Hexan (100)

Das PFB-Br retardierte bei 5,4 min. Eine Substanz mit dieser Retentionszeit wurde in den GC / ECD-Chromatogrammen der derivatisierten Zitronenprobe lediglich in der Fraktion n-Hexan (100) gefunden. Nach Lee und Chau sollte in der Fraktion Aceton (100) der Überschuss des PFB-Br gefunden werden [187]. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden.

Eine Überprüfung des Ergebnisses mittels GC / MS erfolgte nicht, da im weiteren Verlauf der Arbeit kein GC / MS-Gerät mehr zur Verfügung stand.

Da die Wiederfindungsraten für alle Pestizidderivate mit Ausnahme des Ethiofencarb-Derivats oberhalb von 88 % lagen und ein Teil der Probenmatrix sowie das überschüssige Derivatisierungsreagenz erfolgreich abgetrennt wurden, kann die MKGF als geeignete Methode zur Aufreinigung von mit PFB-Br derivatisierten Extrakten angesehen werden. Ethiofencarb lässt sich jedoch hiermit nicht quantifizieren.

Aus den vorgestellten Versuchen ergeben sich folgende Elutionsbedingungen:

Das Derivat wird auf die mit n-Hexan vorgewaschene MKG-Säule gegeben. Die Säule wird mit 8 ml n-Hexan gewaschen und mit 8 ml Toluol/Aceton (75/25) eluiert.

4.1.2.4 Vergleich der Reinigungsleistung von der GPC und der MKGF

Üblicherweise wird in der Pestizidanalytik (DFG-Multimethode S19) zur Aufreinigung von pflanzlichen Lebensmittelextrakten die präparative GPC und anschließend die Minikieselgel-Fraktionierung benutzt.

Da sich die präparative GPC für die basischen Pestizide weder vor noch nach Derivatisierung als Clean-up-Schritt geeignet erwies (unreproduzierbare Retention von Carbendazim, Thiabendazol und Imazalil / Zerstörung der GPC-Säule durch das Derivatisierungsreagenz), wurde untersucht, ob die Minikieselgel-Fraktionierung eine ausreichende Aufreinigung der Lebensmittelextrakte erlaubt.

Als Matrix wurden Äpfel der Sorte Jona Gold ausgewählt, weil sie auf Grund ihrer starken Wachsschicht (Lipoide) eine Matrix zur Verfügung stellten, die in der GPC gut abgetrennt werden kann.

Die Äpfel wurden bei den pH-Werten 2, 7 und 9 mit Aceton extrahiert und mit Ethylacetat /-Cyclohexan einer Flüssig / Flüssig-Extraktion unterzogen. Die Hälfte der Probenextrakte wurde mit der GPC nach Abschnitt 3.1.3.1 aufgereinigt und danach mit 1 ppm Pestizid-Mix GC (Standardmix für die Bestimmung von Carbendazim, Thiabendazol und der Carbamate mittels GC nach Derivatisierung mit PFB-Br) dotiert und nach Abschnitt 3.2.2.2 derivatisiert. Die zweite Hälfte der Probenextrakte wurde direkt dotiert, derivatisiert und danach mit der Minikieselgel-Fraktionierung nach Abschnitt 3.1.3.2 aufgereinigt (Vergleiche auch Abschnitt 4.1.2.3).

	nach GPC* Fraktion von 95 – 175 ml	nach MKGF** Fraktion n-Hexan	nach MFGF** Fraktion Toluol/- Aceton (75+25/v+v)
Verbliebene Matrixbestandteile	19 %	29 %	71 %
Entfernte Matrixbestandteile	81 %	71 %	29 %

Tabelle 4-5:Reinigungsleistung der GPC und der Minikieselgel-Fraktionierung
(MKGF) in Äpfeln

* Underivatisierter Probenextrakt

** Derivatisierter Probenextrakt

Die Matrixmengen wurden jeweils vor und nach dem Clean-up gravimetrisch erfasst. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Erwartungsgemäß hatte die GPC von underivatisierten Probenextrakten eine wesentlich größere Reinigungsleistung als die MKGF nach Derivatisierung der Probenextrakte. Werden bei der GPC über 80 % der Matrix entfernt, sind es bei der MKGF lediglich 29 %.

Zum Ausgleich der geringeren Reinigungsleistung der MKGF gegenüber der GPC erwies sich die Aufarbeitung einer geringeren Probenmenge als geeignet. Der Einsatz eines Zehntels (2 g) der üblicherweise eingesetzten Probenmenge (20 g) zur Derivatisierung führte zu positiven Ergebnissen. Hierdurch ließ sich gleichzeitig der Reagenzverbrauch verringern.

4.1.2.5 Reverse-Phase-Festphasenextraktion als Clean-up-Schritt (RP-SPE)

Eine weitere Möglichkeit, die Aufreinigung von Lebensmittelextrakten zu verbessern, ist die Durchführung der Reversed-Phase-Extraktion. Für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln wurde eine solche Methode entwickelt.

Verschiedene pflanzliche Lebensmittel wurden mit 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg und 0,5 mg/kg Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe) dotiert nach der DFG-Methode S19 aufgearbeitet. Die Probenextrakte wurden nach der DFG-Methode S19 mit der GPC und der MKGF (Fraktion 3) gereinigt. Anschließend wurde eine RP-Festphasenextraktion durchgeführt.

Für die RP-SPE wurde 0,1 g einer Bakerbond Amino-Phase, die mit 5 ml Toluol konditioniert war, benutzt. Das Kieselgel-Eluat Fraktion 3 wurde direkt, quasi online, auf die Festphase gegeben und die Festphase mit 2,5 ml eines Toluol/Aceton-Gemisches (95+5) eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und eingeengt. Durch die zusätzlich durchgeführte RP-Festphasenextraktion wurde der Arbeitsaufwand des Aufreinigungsschritts nicht vergrößert. Im Unterschied zum Standardverfahren (siehe Abschnitt Theorie) retardieren an der Amino-Phase nicht die interessierenden Analyten, sondern ein Teil der Matrixbestandteile, die auf diese Weise herausgefiltert werden.

Die erzielten Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe in Blumenkohl nach Aufarbeitung mittels LLE, GPC und MKGF (Fraktion 3) und einer zusätzlichen Aufreinigung an einer Amino-Phase sind in Tabelle 4-35 dargestellt; dort sind die Ergebnisse unterschiedlicher Aufreinigungen am Beispiel von Blumenkohl zusammengefasst. Durch die "Filtration" des Kieselgel-Extraktes über eine Amino-Festphase konnte das Verhältnis Matrix/Analyt so weit verbessert werden, dass die Wiederfindung bei den mit 0,05 mg/kg dotierten pflanzlichen Lebensmittelproben zufriedenstellend war. Damit konnte die vorgestellte Amino-Festphasen-Extraktion als zusätzlicher Clean-up-Schritt den unteren Arbeitsbereich um den Faktor zwei verbessern.
4.2 Derivatisierung

4.2.1 Derivatisierung in der Gaschromatographie

4.2.1.1 Basische Fungizide und Carbamate

Optimierung der Derivatisierung

Für Carbendazim und Thiabendazol sollte eine Derivatisierungsmethode gefunden werden, die es erlaubt, die Rückstände beider Fungizide neben den Rückständen der ebenfalls thermolabilen Carbamate und des Harnstoffherbizids Tribenuron-Methyl in pflanzlichen Lebensmitteln sicher zu bestimmen.

Es wurde die Pentafluorbenzylierung ausgesucht, die für Carbendazim in Getreide und Erde in der DFG-Methode 378 [4] beschrieben ist und von Anastassiades auf die Untersuchung von Carbendazim- und Thiabendazol-Rückständen in Zitronen und anderen pflanzlichen Lebensmitteln angewandt wurde [61, 74]. Die Probenextrakte werden hierbei mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert und die Pestizid-Rückstände als Derivate mittels GC / MS bestimmt. Die gemeinsame Erfassung der Carbamate mit Carbendazim und Thiabendazol machte es notwendig, die Methode zu optimieren.

Erste Optimierungsversuche wurden im Rahmen einer Praktikumsarbeit von C. Wiesner [188] durchgeführt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Pestizide festgelegt und einige Parameter der Methode optimiert. Es wurde die Abhängigkeit des Derivatisierungsgrades von der Reaktionstemperatur und Reaktionszeit untersucht.

Zusätzlich wurden erste Versuche an dotierten pflanzlichen Lebensmitteln durchgeführt. Die Präzision und Richtigkeit der Methode waren jedoch nicht zufriedenstellend.

Um die Präzision und die Richtigkeit der Derivatisierung zu erhöhen, wurde ein geeigneter Standard zur Kontrolle der Derivatisierung gesucht. Der Derivatisierungsstandard sollte in der Probe nicht erwartet werden und sich bei der Derivatisierung quantitativ umsetzen. Es wurde Benzimidazol ausgesucht, da es mit Carbendazim strukturverwandt ist.

Wie in der Tabelle 4-6 dargestellt, ist Benzimidazol als Derivatisierungsstandard geeignet. Benzimidazol konnte in sehr unterschiedlichen Matrices wie in Carbendazimstandards unterschiedlicher Konzentrationen, in einer Apfel- und einer Zitronenprobe in der gleichen Quantität bei einer sehr guten Präzision zum Pentafluorbenzyl-Derivat umgesetzt werden. Um die Gerätepräzision zu erhöhen, wurde (wie in der Pestizidanalytik weit verbreitet) Aldrin als weiterer interner Standard eingesetzt. Die derivatisierten und aufgereinigten Extrakte wurden deshalb in 1 ml einer Aldrin-Lösung (0,01 mg/ml) aufgenommen.

	0,3 mg/l**	1,0 mg/l**	2,0 mg/l**	3,0 mg/l**	4,0 mg/l**	Apfel	Zitrone
Peakfläche (MW)*	40.000	41.000	44.000	45.000	43.000	42.000	44.000
rel. STABW	2%	5%	1%	3%	3%	7%	9%

 Tabelle 4-6:
 Benzimidazol als Derivatisierungsstandard

* Mittelwert der Peakfläche des Benzimidazolderivats, n = 5

** Carbendazimstandard

Nach der Festlegung des Derivatisierungsstandards wurde eine GC / MS-Methode im SIM-Modus entwickelt, die es erlaubt Thiabendazol, Carbendazim, acht Carbamate und das Harnstoffherbizid Tribenuron-Methyl zu bestimmen. Die dabei gemessenen Massen sind in Tabelle 3-18 im experimentellen Teil im Abschnitt 3.3.8 ausführlich beschrieben.

Beispielhaft ist die Trennung der Pestizidderivate in Abbildung 4-6 anhand eines derivatisierten Pestizid-Mixes dargestellt.



Abbildung 4-6: GC / MS-Chromatogramm (SIM-Modus) eines derivatisierten Pestizid-Mix GC

1 Propoxur, 2 Bendiocarb, 3 Promecarb, 4 Carbofuran, 5 Aminocarb, 6 Benzimidazol, 7 Carbaryl, 8 Aldrin, 9 Methiocarb, 10 Ethiofencarb, 11 Tribenuron, 12 Thiabendazol, 13 Carbendazim

Nur im SIM-Modus war es möglich, die Pentafluorbenzylderivate selektiv im Bereich von 0,15 mg/kg bis 2 mg/kg zu quantifizieren. Der SCAN-Modus war erwartungsgemäß nicht

empfindlich genug. Alternativ zur Bestimmung der Pestizid-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln nach Pentafluorbenzylierung mittels GC / MS wurde die Bestimmung mittels GC / ECD + NPD untersucht. Auch diese Methode war nicht geeignet, da die Pestizidderivate teilweise mit der Matrix als kritische Paare detektiert wurden und somit die Selektivität der Methode nicht gegeben war.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Pentafluorbenzylderivate stabil sind. Stellvertretend für alle untersuchten Pestizide ist in Tabelle 4-7 der Einfluss der Lagerungszeit auf den Response des Carbendazims dargestellt. Es wurden stabile Derivate gebildet, deren zeitversetzte Vermessung keine Schwierigkeiten bereitet.

 Tabelle 4-7:
 Einfluss der Lagerungszeit auf den Response des Carbendazims

	sofort	nach 24 h	nach 7 d
Peakfläche (MW)*	21.718	19.279	19.584
rel. STABW	14%	9%	8 %

Mittelwert der Peakfläche des Carbendazimderivats, n = 3

Anwendung der Derivatisierungsmethode auf die Rückstandsanalytik in pflanzlichen Lebensmitteln

Äpfel und Zitronen wurden mit 5 ppm Pestizid-Mix GC (Standardmix für die Bestimmung von Carbendazim, Thiabendazol und der Carbamate mittels GC nach Derivatisierung mit PFB-Br, Abschnitt 3.5.1) dotiert, mit Dichlormethan extrahiert (Abschnitt 3.1.2), nach der Vorschrift (Abschnitt 3.2.2.2) mit PFB-Br derivatisiert und anschließend mit der Minikieselgel-Fraktionierung (Abschnitt 3.1.3.2) aufgereinigt. Die Extrakte wurden mit Aldrin als internem Standard dotiert und mittels GC / MS im SIM-Modus vermessen.

In Tabelle 4-8 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt. Alle Analyten außer Ethiofencarb konnten mit guten Wiederfindungsraten und sehr kleinen Variationskoeffizienten nachgewiesen werden. Ethiofencarb wurde wie in Abschnitt 4.1.2.3 beschrieben während der Mini-Kieselgel-Fraktionierung teilweise oxidiert. Da die Oxidation nicht reproduzierbar war, wiesen die Ergebnisse für beide Ethiofencarb-Derivate große Schwankungen auf. Es erwies sich, dass die Methode für Ethiofencarb-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln nicht geeignet ist.

Methiocarb wurde mit über 200 % in zu hohem Maße wiedergefunden, was vermutlich durch den sogenannten Matrix-Schutz-Effekt hervorgerufen wurde [61]. Auch bei Carbendazim und Thiabendazol (95 und 103 %) wird dieser Effekt vermutet, da bei einer Bestimmung mit

1 ppm dotierten Apfelproben (nach Extraktion mit Dichlormethan und MKGF) mittels HPTLC / AMD Wiederfindungsraten von 62 % für Carbendazim und 65 % für Thiabendazol ermittelt wurden. Deshalb sollte bei positiven Befunden (wie von Anastassiades und Scherbaum empfohlen) die Quantifizierung der drei Analyten mittels Standardadditions-Kalibrierung erfolgen.

Tabelle 4-8:	Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen von mit
	5 ppm dotierte Apfel- und Zitronenproben nach Pentafluor-
	benzylierung und anschließender MKGF, nach GC / MS (SIM)

	Zitro	one	Ap	fel
	Wiederfindung [*]	rel. STABW	Wiederfindung [*]	rel. STABW
Propoxur	102 %	5 %	95 %	6 %
Bendiocarb	99 %	8 %	89 %	3 %
Promecarb	103 %	6 %	107 %	8 %
Carbofuran	101 %	8 %	94 %	9 %
Aminocarb	111 %	3 %	96 %	14 %
Carbaryl	99 %	9 %	96 %	9 %
Methiocarb	215 %	7 %	180 %	7 %
Ethiofencarb 1	46 %	8 %	49 %	12 %
Ethiofencarb 2	48 %	17 %	55 %	9 %
Tribenuron	98 %	9 %	96 %	5 %
Thiabendazol	87 %	10 %	95 %	12 %
Carbendazim	96 %	9 %	103 %	7 %

* Mittelwert, n = 3

Vergleich der Analysenzeit der GC / MS nach Pentafluorbenzylierung mit der HPTLC / AMD

Die Analysenzeit der GC/MS nach Pentafluorbenzylierung mit der HPTLC/AMD zur Bestimmung von Carbendazimrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln wird in Tabelle 4-9 verglichen. Bei einer ausreichend großen Probenzahl (zwölf Proben, sechs Standards) zeigt sich, das die Bestimmung von Carbendazim-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC/AMD gegenüber der GC/MS nach Pentafluorbenzylierung lediglich die Hälfte der Analysenzeit benötigt.

GC / MS nach Pentafluorbenzylierung	HPTLC / AMD
6,0 h	6,0 h
3,0 h	-
1,5 h (18 x)	1,0 h (12 x)
18,0 h	5,5 h*
-	2,0 h**
1,0 h	1,0 h
1,0 h	1,0 h
30,5 h	16,5 h
	GC / MS nach Pentafluorbenzylierung 6,0 h 3,0 h 1,5 h (18 x) 18,0 h - 1,0 h 1,0 h 30,5 h

Tabelle 4-9:Analysenzeit der Bestimmung von Carbendazim in pflanzlichenLebensmitteln für zwölf Proben und 6 Standards

* 1 h Auftragen der Proben auf die HPTLC-Platte, 4,5 h Entwicklung der Platte im AMD-Gerät

** 18 Bahnen bei 280 nm, nach Integration Spektrenaufnahme der zwölf Proben- und der sechs Standardpeaks

4.2.1.2 Benzoylharnstoffe

Für die Gruppe, der unter Abschnitt 2.1.2 vorgestellten Benzoylharnstoffe, sollte alternativ zur dünnschichtchromatographischen Bestimmung mittels AMD/TLC die gaschromatographische Auftrennung mit anschließender massenselektiver Detektion nach pyrolytischer Methylierung mit TMSH, einer Online-Derivatisierung, untersucht werden.

Bei Alkylierung von Verbindungen mit mehreren und unterschiedlichen funktionellen Gruppen kann eine Vielzahl von Reaktionsprodukten gebildet werden. Aus diesem Grund musste zunächst überprüft werden, ob die thermolabilen Benzoylharnstoffe unzersetzt methyliert und mit einer hohen Empfindlichkeit mittels GC / MS detektiert werden können.

Da die Derivatisierung den analytischen Aufwand nicht wesentlich erhöhen sollte, wurde die Alkylierung (Methylierung) mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) angewendet. Das Derivatisierungsreagenz wird dabei einfach der Probenlösung direkt zugesetzt und die pyrolytische Methylierung des Analyten findet im Injektor des Gas-Chromatographen bei vollständigem Umsatz (Injektor mindestens 250 °C) statt. Eine Entfernung des Reagenzienüberschusses, wie bei Verwendung anderer Derivatisierungsreagenzien, ist nicht notwendig, da der Überschuss im Einspritzblock durch Pyrolyse zu leicht flüchtigem Methanol und Dimethylsulfid umgesetzt wird.

Für die Versuche wurden Standardlösungen der verschiedenen Benzoylharnstoffe mit einer Konzentration von 0,06 mg/ml in Methanol hergestellt. Je 0,1 ml der Standardlösungen wurden mit 10 µl der TMSH-Reagenzlösung in einem Probenfläschchen (Microvial) versetzt

und zur Online-Derivatisierung eingesetzt. Es wurden 2,5 μ l (129 ng) Analyt splitless auf einer DB17-Kapillarsäule gaschromatographisch aufgetrennt und mittels MS (EI, 70 eV) detektiert. Die Betriebsparameter (z. B. Injektortemperatur, Temperaturgradient) wurden so gewählt, wie sie für die Derivatisierung von Phenolen und organischen Säuren mit TMSH als optimal beschrieben wurden [189].

Jeder untersuchte Benzoylharnstoff bildete nach pyrolytischer Methylierung mit TMSH eine Vielzahl von Derivaten (derivatisierte Bruchstücke). Lediglich bei Diflubenzuron, Chlorfluazuron, Triflumuron und Hexaflumuron entstanden neben den methylierten Bruchstücken in geringem Maße auch die zweifach methylierten Benzoylharnstoffderivate.

Warum sich die verschiedenen Benzoylharnstoffe bei der Derivatisierung so unterschiedlich verhielten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Beispielhaft für die pyrolytische Methylierung von Benzoylharnstoffen soll das Derivatisierungsverhalten von Flufenoxuron näher beschrieben werden.

In Abbildung 4-7 ist das Total-Ionen-Chromatogramm von Flufenoxuron nach Online-Methylierung mit TMSH dargestellt. Die Hoffnung, dass sich die Benzoylharnstoffe ohne thermische Zersetzung in ihre stabilen Methylderivate überführen lassen, wurde nicht erfüllt. Flufenoxuron zerfiel zum Beispiel in insgesamt fünf verschiedene Derivate, welche mittels Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) identifiziert werden konnten.

Die weiteren Peaks im Chromatogramm konnten durch Analyse des Blindwertes als Fettsäuremethylester ($\Delta m/z = 14 \Rightarrow CH_2$ -Gruppen) identifiziert werden.

Diese stammten von vorherigen Messungen, bei denen pflanzliche Lebensmittelextrakte vermessen wurden. Die teilweise im Injektorsystem verbliebenen pflanzlichen Fette wurden ebenfalls methyliert und als Fettsäuremethylester chromatographiert.

Nach Auswertung der EI-Massenspektren für die im Total-Ionen-Chromatogramm erhaltenen Peaks konnte das in Abbildung 4-8 dargestellte Reaktionsschema aufgestellt werden.

Unter den gewählten Derivatisierungsbedingungen greift TMSH das Sauerstoffatom der Etherbrücke (in 3. Position) sowie die beiden sekundären Aminstickstoffe an. Dadurch zerfällt das Molekül in verschiedene Fragmente, welche methyliert wurden. Im Falle des Flufenoxurons entstanden zwei Methylether (Derivat 1 und 5), davon ein Methylether mit doppelt methyliertem Harnstoff, ein Methylester (Derivat 2), ein Methylcarbamat (Derivat 4) sowie



ein Methylamin (Derivat 3). Die Identität des Methylcarbamats konnte nicht vollständig geklärt werden.

Abbildung 4-7: GC / MS-Chromatogramm (SCAN-Modus) von Flufenoxuron nach Online-Derivatisierung mit TMSH

Die Entstehung der beiden Methylether (Derivat 1 und 5) ist typisch für das Flufenoxuron. Die untersuchten Benzoylharnstoffe ausgenommen Diflubenzuron und Teflubenzuron weisen eine Etherbindung auf und können nach Methylierung Methylether bilden. Die Entstehung des Methylesters und des Methylcarbamats (Derivat 2 und 4) überraschte, war aber durch die Anwesenheit von Methanol als Lösungsmittel des Derivatisierungsreagenz und als Reaktionsprodukt erklärbar.^a Erwartungsgemäß wurde das Methylamin (Derivat 3) gebildet.

Das Derivat 5 ist eine an beiden Stickstoffatomen methylierte Harnstoffverbindung. Dieses Derivat belegt, dass eine Methylierung der Harnstoffstickstoffe bei einer stabilen Etherbindung ohne Zerfall möglich wäre.

^a Die Eignung von Methanol als Derivatisierungsreagenz wurde daraufhin untersucht. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 4.3.5.1 dargestellt.

Alle fünf Derivate konnten ausgehend von der Struktur des Flufenoxurons durch eine Interpretation der dazugehörigen EI-MS-Spektren nach MC Lafferty [190] identifiziert werden.



Abbildung 4-8: Reaktionsschema der pyrolytischen Methylierung von Flufenoxuron mit TMSH

Derivat 1

Das in Abbildung 4-9 dargestellte EI-MS-Spektrum vom Derivat 1 zeigt lediglich eine schwache Fragmentierung. Basispeak ist das Molekül-Ion m/z = 210. Es wird besonders durch die Trifluormethylgruppe am Benzolring stabilisiert. Das auftretende Isotopenmuster des Molekül-Ions (m/z = 210/212 bei einem Intensitätsverhältnis von 3:1) belegt, dass das Derivat 1 aus dem Teil des Moleküls entstanden ist, welches einen Chlorsubstituenten enthält. Vom Molekül-Ion werden unter Beibehaltung des Chlorisotopenmusters in deutlich geringerer Intensität durch Bindungsbrüche die Methylgruppe (Δ m/z = 15) des Methylethers, Kohlenmonoxid (Δ m/z = 28) und ein Fluor-Radikal (Δ m/z = 19) abgespalten. Das größte Fragment-Ion, ein Radikal-Ion m/z = 132 (C₆H₃F₃⁺⁻), entsteht durch Verlust des Chlorsubstituenten und der Methylethergruppe. Das Fragment-Ion m/z = 148 entsteht durch Verlust eines Fluorsubstituenten aus dem Fragment-Ion m/z = 132. Das Fragment-Ion m/z = 63 ist laut Mc Lafferty ein häufiges Fragment-Ion bei aromatischen Verbindungen mit elektronegativen Substituenten.

Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente nach Pellegrin [191] ergab einen Wert von 4, der für einen Ring und drei Doppelbindungen (1 x 3 im Benzolring) im Molekül steht.

Aus den vorliegenden Informationen wurde das Derivat 1 als 2-Chlor-4-trifluormethylphenylmethylether identifiziert.



Abbildung 4-9: EI-MS-Spektrum von Derivat 1

Derivat 2

Das Derivat 2, dessen EI-MS-Spektrum in Abbildung 4-10 abgebildet ist, zeigt ebenfalls nur eine relativ geringe Fragmentierung, wobei das Fragment-Ion m/z = 141 den Basispeak darstellt. Dieses Fragment-Ion entsteht durch α -Spaltung unter Verlust eines Methoxy-Radikals (Δ m/z = 31) aus dem Molekülpeak m/z = 172. Das Molekül-Ion mit seiner geradzahligen Molmasse enthält entsprechend der Stickstoffregel eine gerade Anzahl an Stickstoffatomen (hier Null). Weiterhin entsteht durch Abspaltung des neutralen Kohlenmonoxids (Δ m/z = 28) aus dem Fragment-Ion m/z = 141 ein Fragment-Ion m/z = 113. Die Fragment-Ionen m/z = 113 und 141 sind charakteristisch für Difluorbenzoylverbindungen. Sie traten auch bei den hier nicht ausführlich besprochenen methylierten Difluorbenzoylharnstoffen auf, wenn bei deren Derivaten auf eine Difluorbenzoylverbindung spekuliert wurde. Die Abwesenheit des Chlorisotopenmusters und die Methylesterabspaltung unterstützen die Vermutung, dass es sich beim Derivat 2 um einen Difluorbenzoylsäuremethylester handelt. Auch in diesem EI-MS-Spektrum findet sich das für aromatische Verbindungen mit elektronegativen Substituenten häufige Fragment-Ion m/z = 63. Ausgehend von der Struktur des Flufenoxuron und dem erzeugten Molekül-Ion bzw. Fragment-Ionen ließ sich Derivat 2 als 2,6-Difluorbenzoesäuremethylester identifizieren. Dies wird durch die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente mit einem Wert von 5, der für einen Ring und vier Doppelbindungen (1 x 3 im Benzolring und 1 x in der Carboxygruppe) steht, bestätigt.



Abbildung 4-10: EI-MS-Spektrum von Derivat 2

Derivat 3

Das EI-MS-Spektrum des Derivats 3 (Abbildung 4-11) zeigt neben dem Molekülpeak m/z = 319 und einer Fluorgruppenabspaltung m/z = 300 lediglich ein charakteristisches Fragment m/z = 140. Das stabile Molekül-Ion besitzt ein Chlorisotopenmuster und eine ungerade Molekülmasse (m/z = 319), weshalb es entsprechend der Stickstoffregel eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen enthalten muss (Eins). Basispeak ist ein Fragment m/z = 140, welches im Gegensatz zum Molekülpeak kein Chlorisotopenmuster mehr besitzt und eine gerade Masse aufweist. Bei diesen Fragment-Ion wird ein neutraler radikalischer Teil des Molekül-Ions in diesem Fall Δ m/z = 179 abgespalten. Diese Abspaltung lässt sich ableitend von der Struktur des Flufenoxurons als Abspaltung des 1-Chlor,3-trifluormethylphenyl-Radikals erklären. Daraus resultierend ergibt sich für m/z = 140 folgendes Fragment-Ion *N*-[(1*Z*)-2-Fluor-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-yliden]methylammonium.

Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente ergab einen Wert von 8, der für zwei Ringe und sechs Doppelbindungen (2 x 3 im Benzolring) im Molekül steht.

Das Derivat 3 konnte somit als *N*-{4-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-fluorphenyl}-*N*-methylamin identifiziert werden.



Abbildung 4-11: EI-MS-Spektrum von Derivat 3

Derivat 4

Die Interpretation des EI-MS-Spektrums von Derivat 4 bereitete Schwierigkeiten. Lediglich einige Aussagen konnten eindeutig getroffen werden. Neben dem in Abbildung 4-12 dargestellten EI-MS-Spektrum ist zur besseren Übersicht in Abbildung 4-13 das vermutete Reaktionsschema des Derivat 4 dargestellt.

Das Derivat ist stärker fragmentiert als die anderen Derivate. Das Molekül-Ion m/z = 377 hat ein Chlorisotopenmuster und eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen. Da die für die Difluorbenzoylverbindungen typischen Fragment-Ionen m/z = 113 und 141 im EI-MS-Spektrum fehlen, kann das Molekül-Ion keine Difluorbenzoylverbindungen sein. Lediglich die Zuordnung des für Ester typischen Fragment-Ions m/z = 59 (α -Spaltung) und die Abspaltung eines Fluor-Radikals (Δ m/z = 19) sind eindeutig. Damit kann für das Derivat 4 folgende Aussage sicher getroffen werden: Das Derivat 4 ist ein fluorierter Methylester, der über ein Chlor- und ein Stickstoff-Atom verfügt.

Es besteht die Möglichkeit, dass im EI-MS-Spektrum mehrere Substanzen verborgen sind, die ebenfalls keine Difluorbenzoylverbindungen sein können. Folgenden Fragestellungen wurde in diesem Zusammenhang nachgegangen:

Haben alle Ionenspuren dieselbe Retentionszeit?

Sind die Peaks m/z = 332 und 318 Molekül-Ionen?

Ist das Derivat 4 eine Verunreinigung der Standardsubstanz Flufenoxuron?

Durch Übereinanderlegen der einzelnen Ionenspuren konnte gefolgert werden, dass alle Ionen dieselbe Retentionszeit besitzen. Dass die Peaks m/z = 332 und 318 Molekül-Ionen sind, die keine Difluorbenzoylharnstoffe sind, konnte nicht bestätigt werden, da nach Anwendung der Stickstoffregel diese Molekül-Ionen eine gerade Anzahl an Stickstoffatomen enthalten müssten. Ausgehend von der Struktur des Flufenoxurons. Das größte mögliche Molekül-Ion, das kein Stickstoff enthält, hat eine Molekülmasse kleiner 318. Das kleinste mögliche Molekül mit zwei Stickstoffatomen besitzt eine Molekülmasse von 362 bei einfacher Methylierung und die Molekülmasse von 376 bei zweifacher Methylierung. Ausgehend von der Struktur des Flufenoxuron-Moleküls konnte keine Verbindung gefunden werden, bei dem beide Bedingungen (keine Difluorbenzoylharnstoffverbindung mit gerader Anzahl an Stickstoff-Atomen) zutreffen. Die Möglichkeit, dass das Derivat eine Verunreinigung des Flufenoxurons ist, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da das GC-Chromatogramm der underivatisierten Verbindung dieses Phänomen nicht zeigte (siehe Abschnitt 4.3.5).

Daher liegt die Vermutung nahe, dass das EI-MS-Spektrum von einer Substanz, die ein Derivat des Flufenoxurons ist, gebildet wurde.

Unter der Bedingung, dass das EI-MS-Spektrum aus einer Substanz gebildet wurde, wurden folgende Überlegungen angestellt.

Wenn vom Molekülpeak eine Carboxygruppe ($\Delta m/z = 45$), ein Methoxy-Radikal ($\Delta m/z = 31$) und danach Kohlenmonoxid ($\Delta m/z = 28$) abgespalten werden, sind die Fragment-Ionen m/z = 332 und 318 erklärbar. Durch Abspaltung des Neutralteilchen Kohlenmonoxid vom Fragment-Ion M-OCH₃ entsteht *N*-{4-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-fluorphenyl}-*N*-methyl-*N*-methylen-ammonium (m/z = 318).

Die Abspaltung des Methoxy-Radikals ist nicht sehr sicher, da das vorhandene Fragment-Ion m/z = 346 (377-31=346) kein Chlorchluster besitzt. Hierfür kann allerdings die geringe Intensität des Peaks die Ursache sein.



Abbildung 4-12: EI-MS-Spektrum von Derivat 4

Die Abspaltung einer Carboxygruppe von Methylestern ist bekannt. Vorraussetzung hierfür ist der Tausch der Methylgruppe mit einem Wasserstoffatom. Über dieses Wasserstoffatom in

 α -Stellung verfügt das angenommene Molekül-Ion nicht. Außerdem entspricht das auftretende Isotopenmuster des Fragment-Ions m/z = 318/320 bei einem Intensitätsverhältnis von 1,6:1 nicht einer Verbindung mit einem Chloratom.

Das Fragment-Ion m/z = 154 enthält eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen (Eins); Chor ist nicht enthalten. Wenn das Fragment-Ion m/z = 332 als am Stickstoff doppelt methyliertes Fragment-Ion erklärt werden kann, ist für das Fragment-Ions m/z = 154 ebenfalls eine Doppelmethylierung am Stickstoff (N-[(1Z)-2-Fluor-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]dimethylammonium) möglich.

Der Basispeak m/z = 72 könnte durch eine Spaltung des Benzolringes erklärt werden.

Des weiteren fehlt im Spektrum das wichtige Fragment-Ion m/z = 198, das durch Abspaltung des 1-Chlor-3-trifluormethylbenzol-Radikals (Δ m/z = 179) (wie im Derivat 3) entstehen müsste. Es ist jedoch möglich, dass es sofort durch thermische Decarboxylierung (-CO₂ Δ m/z = 44) zum Fragment-Ion m/z = 154 zerfällt.

Die Fragmente m/z = 254 und 255 konnten nicht erklärt werden. Sicher ist, dass das Fragment 255 eine Fluorverbindung ist, da ein Fragment mit m/ z = 236 ebenfalls im Spektrum vorhanden ist. Das Fragment m/z = 254 wird auch im EI-MS-Spektrum der Verbindung 4-(2-Chlor- α - α -trifluor-p-toloyloxy)-2-fluorphenyl-isocyanat gefunden, die bei der Thermodegradation von Flufenoxuron (Abschnitt 4.3.5.2, Abbildung 4-48) nachgewiesen werden konnte. Daraus wird geschlossen, dass beide Fragmente (m/z = 254 und 255) nicht von einer möglichen Verunreinigung stammen können.

Durch die gesamten Informationen kann als Struktur für das Derivat 4 *N*-Methyl,*N*-(2-fluor,4-(2-chlor,4-trifluorphenoxy)methylcarbamat vorgeschlagen werden.

Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente nach Pellegrin ergab einen Wert von 9, der für zwei Ringe und sieben Doppelbindungen (2 x 3 in Benzolringen und 1 x in der Carbamatgruppe) im Molekül steht.



Abbildung 4-13: Vermutetes Reaktionsschema des Derivat 4

Derivat 5

Das Derivat 5, dessen EI-MS-Spektrum in Abbildung 4-14 abgebildet ist, ist schwach fragmentiert. Das Molekül-Ion hat kein Chlorisotopenmuster und eine gerade Anzahl an Stickstoffatomen (Zwei). Mit der Massenzahl m/z = 352 ist es das größte Derivat des methylierten Flufenoxurons. Das Fragment-Ion m/z = 154 ist gut aus der Abspaltung von $\Delta m/z = 198$ aus dem Molekül-Ion erklärbar. Das EI-MS-Spektrum zeigt die beiden für die Difluorbenzoylgruppe typischen Fragment-Ionen m/z = 113 und 141. Auch in diesem EI-MS-Spektrum findet sich das für aromatische Verbindungen mit elektronegativen Substituenten häufige Fragment-Ion m/z = 63.

Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente ergab einen Wert von 10, der für zwei Ringe und acht Doppelbindungen (2 x 3 im Benzolring und 2 x 1 an den Sauerstoffatomen) im Molekül steht.

Das Derivat 5 konnte als 1,3-(Dimethyl)-1-(4-methoxy-2-fluorphenyl)-3-(2,6-difluorbenzoyl)harnstoff identifiziert werden.



Abbildung 4-14: EI-MS-Spektrum von Derivat 5

Der Zerfall der thermolabilen Benzoylharnstoffe konnte durch die Methylierung mit TMSH nicht verhindert werden. Auch die Nachweisempfindlichkeit ließ sich durch die Derivatisierung nicht steigern. Aus diesen Gründen war pyrolytische Methylierung nicht geeignet, Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln sicher und schnell nachzuweisen.

Eventuell wären "sanftere" Derivatisierungsreagenzien (z. B. PFB-Br) geeignet, die Benzoylharnstoffe ohne Zerfall des Ausgangsmoleküls in flüchtige Derivate zu überführen. Die Auswahl der Derivatisierungsreagenzien ist jedoch sehr beschränkt, da die Reaktion aufgrund der Struktur der Benzoylharnstoffe bei vielen Derivatisierungen sterisch gehindert wäre. Aus diesen Gründen wurde eine Derivatisierung der Benzoylharnstoffe zu ihrer gaschromatographischen Bestimmung nicht weiter verfolgt.

4.2.2 Derivatisierung in der Dünnschichtchromatographie

4.2.2.1 Entwicklung einer postchromatischen Derivatisierungsmethode für die Benzoylharnstoffe

Für die Benzoylharnstoffe wurde eine postchromatische Derivatisierungsmethode gesucht, die die Nachweisempfindlichkeit und die Spezifität in der Dünnschichtchromatographie erhöht. Es wurden drei Derivatisierungsreagenzien - Chlor / Kaliumiodid / Stärke, Chlor / o-Tolidin /- Kaliumiodid und Chlor/o-Toluidin - ausgesucht, die zum Nachweis von Verbindungen, die sich in Chloramine überführen lassen, geeignet sind.

Alle drei postchromatischen Derivatisierungen erfolgten zweiphasig. Zuerst wurden die Benzoylharnstoffe auf der entwickelten HPTLC-Platte in einer Chlorkammer in ihre Chloramine überführt. Danach wurden die HPTLC-Platten in ein Farbreagenz getaucht und anschließend getrocknet. Dadurch erfolgte eine Reaktion der Chloramine mit dem Farbreagenz zu Farbstoffen, die im UV / VIS detektiert werden konnten.

Verschiedene Mengen der Benzoylharnstoffe (Mix 17 und Mix 18) wurden mittels HPTLC / AMD entwickelt und nach entsprechender Farbreaktion densitometrisch im Multiwellenlängenscan bei 400 bis 600 nm vermessen.

Erste Versuche ergaben, dass besonders nach Derivatisierung mit Chlor / o-Toluidin mit den Benzoylharnstoffen keine stabilen Farbstoffe gebildet wurden. Die beiden Derivatisierungsreagenzien Chlor / Kaliumiodid / Stärke und Chlor / o-Tolidin / Kaliumiodid bildeten mit den Benzoylharnstoffen stabilere Farbstoffe, so dass eine densitometrische Detektion innerhalb einer Stunde nach der Farbreaktion möglich wurde. Die gebildeten Farbstoffe waren bis zu zwei Stunden nach der Reaktion stabil, danach dunkelte die HPTLC-Platte stark nach, so dass die Benzoylharnstoffe nicht mehr vom blauen Untergrund unterschieden werden konnten. Die Detektion im Multiwellenlängenscan ergab, dass die gebildeten Farbstoffe am empfindlichsten bei 495 nm nachgewiesen werden können.

Die Optimierung der beiden Farbreaktionen erfolgte durch die Untersuchung der Standardmischungen Mix 17 und 18 (siehe Abschnitt 3.5.1), um eine Störung der Farbdetektion durch die Lebensmittelmatrix während der Optimierungsphase zu vermeiden.

Die Dauer der Begasung der entwickelten HPTLC-Platten mit Chlor, die Dauer der Befreiung der Platten vom überschüssigen Chlor und die Dauer des Tauchvorganges im Farbreagenz wurden optimiert. Dabei ergab sich, dass die Dauer der Begasung sehr variabel gewählt werden kann. Bei einer Begasungsdauer von ein bis fünf Minuten wurden keine unterschiedlichen Ergebnisse gefunden. Die Befreiung von überschüssigem Chlor war dagegen ein sehr kritischer Parameter. Wurde das Chlor nicht vollständig entfernt, wurde die Platte noch während des Tauchvorganges sofort blau, so dass die Analyten nicht mehr detektiert werden konnten. Das Nachdunkeln der Platte konnte um zwei bis drei Stunden verzögert werden, indem die mit Chlor begaste Platte vor dem Tauchvorgang dreißig Minuten in einem warmen Luftstrom gelegt wurde. Der anschließende Tauchvorgang musste schnell durchgeführt werden (eine Sekunde), um eine Verringerung der Nachweisempfindlichkeit durch Diffusion der Analyten so gering wie möglich zu halten.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden verschiedene Mengen der Benzoylharnstoffe (Mix 17 und Mix 18) vor und nach einer HPTLC / AMD-Entwicklung und vor und nach entsprechender Farbreaktion densitometrisch bei 260 und 495 nm vermessen. Die Nachweisgrenzen vor und nach Farbreaktion mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin und Chlor / Kaliumiodid / Stärke sind in Tabelle 4-10 dargestellt. Die Bestimmung der Nachweisgrenze ohne chromatographische Entwicklung diente einer ersten Abschätzung der Nachweisgrenzen, obwohl bekannt war, das die Nachweisgrenzen nach chromatographischer Entwicklung höher liegen, da die Analyten während der Entwicklung von der Oberfläche der Platte in die Platte diffundieren.

Tabelle 4-10:Nachweisgrenzen der Benzoylharnstoffe ohne und nachHPTLC / AMD-Entwicklung mit AMD2-Gradient 6

ohne und nach Farbreaktionen mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin und Chlor /
Kaliumiodid / Stärke, bei 260 bzw. 495 nm

Derivatisierung:	keine Farbreaktion		Chlor / Kal o-To	iumiodid /- lidin	Chlor / Kaliumiodid /- Stärke
Dünnschicht- chromatographische Entwicklung:	nein	ja	nein	ja	nein
Diflubenzuron	2 ng	21 ng	10 - 20 ng	30 ng	50 ng
Flufenoxuron	2 ng	8 ng	8 ng	10 ng	50 ng
Chlorfluazuron	2 ng	10 ng	5 ng	10 ng	40 ng
Triflumuron	2 ng	8 ng	5 ng	6 ng	40 ng
Hexaflumuron	2 ng	20 ng	5 ng	30 ng	40 ng
Teflubenzuron	2 ng	5 ng	8 ng	6 ng	40 ng

Die Farbreaktion mit Chlor / Kaliumiodid / Stärke erwies sich als unempfindlicher als die Farbreaktion mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin; weshalb für dieses Reagenz keine Nachweisgrenzen nach postchromatographischer Derivatisierung bestimmt wurden. Die Nachweisgrenzen für Benzoylharnstoffe nach dünnschichtchromatographischer Trennung liegen vor Derivatisierung bei 5 bis 21 ng und nach Derivatisierung mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin bei 6 bis 30 ng. Die postchromatographische Derivatisierung mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin verbessert nicht die Nachweisempfindlichkeit der Benzoylharnstoffe aber die Spezifität ihres Nachweises. Obwohl die Benzoylharnstoffe sich chemisch stark ähneln, bilden sie mit dem Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin-Reagenz unterschiedliche, grünviolette bis violette Farbstoffe, die in Abbildung 4-15 dargestellt sind.



Abbildung 4-15:Aus den Benzoylharnstoffen gebildete Farbstoffe nachDerivatisierung mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin Reagenz

4.2.2.2 Anwendung der postchromatischen Derivatisierung mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin Reagenz

Die Untersuchung von über zwanzig nach der S-19-Methode aufgearbeiteten Lebensmittelextrakten ergab, dass die Probenmatrices im Bereich der Benzoylharnstoffe wenig oder nicht stören. Somit lassen sich Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln nach Entwicklung der HPTLC-Platten mit einem für die Benzoylharnstoffe optimierten AMD-Gradienten über ihre Laufstrecken und Spektren im ppm-Bereich sicher nachweisen (siehe Abschnitt 4.4.3).



Abbildung 4-16: Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Brokoli mittels HPTLC / AMD, vor und nach Derivatisierung mit Chlor / o-Tolidin

Entwicklung mit AMD1-Gradienten 6 auf einer 0,1-mm-Kieselgel-60-Platte F 254 a: je 50 ng Diflubenzuron (1), Triflumuron (2), Teflubenzuron (3)

- b: 50 mg Brokkoli undotiert
- c: 50 mg Brokkoli 1 ppm dotiert
- d: 100 mg Brokkoli 0,5 ppm dotiert

Die Vorteile einer zusätzlichen Farbreaktion werden beispielhaft an einer Brokkoliprobe vorgestellt, weil dieses Gemüse Matrixstörungen verursachen kann. In Abbildung 4-16 ist die Bestimmung der Benzoylharnstoff-Rückstände in Brokkoli mittels HPTLC / AMD und Detektion mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin dargestellt. Dazu wurde Brokkoli mit je 0,5 ppm und 1 ppm der Pestizide des Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe) dotiert und nach acetonischer Extraktion mit Dichlormethan einer Flüssig /-Flüssig-Verteilung unterzogen. Danach wurden die Extrakte mittels GPC und MKGF (Fraktion 3) aufgereinigt (siehe Abschnitte 3.1.2 / 3.1.3.1 / 3.1.3.2). Die Bestimmung der Pestizide erfolgte dann nach einer chromatographischen Analyse mittels HPTLC / AMD mittels UV-Detektion vor und nach postchromatischer Derivatisierung mit dem mit Chlor / Kaliumiodid / o-Tolidin Reagenz (siehe Abschnitte 3.3.1 / 3.2.1.2).

Bei der Bestimmung der Benzoylharnstoffe durch einfache UV-Detektion bei 260 nm, ergibt sich für Teflubenzuron ein Überbefund, da im Bereich von 40 bis 50 mm die Matrix die Bestimmung stört. Die Störung der Matrix kann durch einen Spektrenvergleich von Teflubenzuron in der Probe und im Standard nachgewiesen werden. Nach Absicherung des Befundes mit der Farbreaktion wird diese Störung beseitigt. Auf der anderen Seite ergibt sich dabei aber eine Störung durch die Matrix bei der Laufhöhe von Diflubenzuron. Deshalb erfolgt die Quantifizierung des jeweiligen Benzoylharnstoffs vor oder nach Derivatisierung bei der Wellenlänge, bei der keine Störungen auftreten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD möglich ist. Einflüsse der Lebensmittelmatrix auf die chromatographische Entwicklung machen sich unterhalb von 0,25 ppm bemerkbar (siehe auch Abschnitt 4.4.3). Oberhalb dieser Konzentration ist die quantitative Bestimmung der Benzoylharnstoffe unabhängig von der Matrix möglich, da eventuelle Störungen durch die postchromatographische Derivatisierung mit Chlor / o-Tolidin beseitigt werden können.

4.3 Endpunktbestimmung

4.3.1 <u>HPTLC / AMD</u>

4.3.1.1 Screening von Pestiziden mittels HPTLC / AMD

Durch die im folgenden vorgestellten Untersuchungen sollte die Hypothese von Burger verifiziert werden [18], dass sich Pestizide in einem Pestizidgemisch durch Entwicklung in zwei voneinander unabhängigen Universal-AMD-Gradienten unterscheiden lassen.

Es wurden 100 Pestizide untersucht, die in Tabelle 4-11 (81 Pestizide unterschiedlichster Polarität) und Tabelle 4-12 (Benzoylharnstoffe und die basischen Fungizide) aufgelistet sind. Je 500 ng der Pestizide wurden auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, mittels AMD entwickelt und densitometrisch bei 200 nm vermessen.

Zur chromatographischen Entwicklung wurden der aus der Wasseranalytik bekannte und im folgenden als AMD1-Gradient 2 bezeichnete sogenannte DIN-Gradient und der von Burger entwickelte im folgenden als AMD1-Gradient 3 bezeichnete sogenannte Burger-Konfirmations-Gradient (BCG) zur Entwicklung der Pestizide benutzt (Die Gradienten sind im Abschnitt 3.3.7.5 vorgestellt.) Die beiden Gradienten besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung eine unterschiedliche Selektivität.

Der AMD1-Gradient 2 enthält als Basislaufmittel Dichlormethan und zusätzlich einen pH-Gradienten von basisch zu sauer. Er enthält Acetonitril als Verstärker und n-Hexan als Abschwächer. Im vorwiegend sauren AMD1-Gradienten 3 wird tertiär-Butylmethylether als Basislaufmittel verwendet. Das Fließmittel der ersten Entwicklungsschritte ist nicht angesäuert. n-Hexan dient hier ebenfalls als Abschwächer.

Nach ersten Erfahrungen mit beiden Gradienten wurden die Fokussierungsschritte von zehn auf vier reduziert. Das war möglich, da nur bei großer Matrixbelastung eine Fokussierung mit zehn Schritten nötig war. Wurden lediglich Standards entwickelt, konnte auf sechs Fokussierungsschritte verzichtet werden. Die geringere Fokussierung hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Laufstrecken der Pestizide, war jedoch mit einem erheblichen Zeitgewinn und Einsparung an Laufmittel verbunden.

In den beiden Gradienten zeigen die meisten der untersuchten Pestizide ein unterschiedliches Verhalten. Die erhaltenen Laufstrecken sind für 81 Pestizide in Tabelle 4-11 dargestellt. Zusätzlich sind in Tabelle 4-12 die Laufstrecken der Pestizide angegeben, auf die in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk gelegt wurde (die Benzoylharnstoffe, Iprodion und die basischen Fungizide). Die Tabellen wurden nach den Laufstrecken der Pestizide im Gradienten 2 (DIN) geordnet.

Pestizid	Laufs in 1	trecke mm		Pestizid	Laufs in 1	trecke nm	
	DIN	BCG			DIN	BCG	
Flamprop	9,4	30,4	\oplus O	Ametryn	35,5	18,8	\oplus O
Ethirimol	9,9	9,8	0	Sebuthylazin	39,0	37,8	\oplus O
Picloram	9,9	8,0	\oplus O	Methabenzthiazuron	41,2	26,2	\oplus O
Flusilazol	10,6	17,5	\oplus O	Terbuthylazin	41,8	54,2	\oplus O
Fluazifop	10,8	36,9	\oplus O	Diuron	42,6	18,5	0
Clopyralid	11,7	8,0	\oplus O	Prometryn	45,3	17,9	\oplus O
Acifluorfen	13,1	38,2	\oplus O	Metazachlor	45,9	37,3	\oplus O
Fluroxypyr	13,7	35,8	\oplus O	Ioxynil	47,0	54,2	\oplus O
Dicamba	13,9	43,3	\oplus O	Phenmedipham	47,5	33,2	\oplus O
Chloramben	14,7	39,2	\oplus O	Bupirimat	47,9	27,0	\oplus O
2,4- D	14,7	34,6	0	Bromoxynil	48,1	50,1	\oplus O
2,4,5- T	15,1	37,3	\oplus O	DNOC	48,5	66,5	\oplus O
Atrazine-Desisopropyl	18,1	28,5	\oplus O	Benalaxyl	48,8	38,5	0
Dichlorprop	18,2	40,2	\oplus O	Carbofuran	49,3	35,1	\oplus O
Triadimenol	18,2	17,6	\oplus O	Metolachlor	49,3	40,5	\oplus O
Prochloraz	18,3	12,7	\oplus O	Chlorfenvinphos	50,1	33,7	\oplus O
Atraton	19,1	23,8	\oplus O	Dinoseb	52,5	71,7	\oplus O
Mecoprop	19,4	42,7	\oplus O	Linuron	53,2	31,8	\oplus O
Methoprotryn	19,7	25,7	\oplus O	Metribuzin	53,8	40,6	\oplus O
Fenoprop	21,1	40,0	0	Diazinon	55,2	46,2	\oplus O
Fentinacetat	21,5	42,0	\oplus O	Propyzamid	55,9	54,3	\oplus O
Chlorfenac	22,3	51,9	\oplus O	Azinphos-Methyl	56,7	35,6	\oplus O
Fenbutatin-Oxid	22,9	8,2	\oplus O	Alachlor	56,9	46,1	\oplus O
DB, 2,4-	23,0	72,9	\oplus O	Benazolin-Ethyl	57,5	54,0	\oplus O
MCPA	23,1	38,3	∇	Azinphos-Ethyl	57,6	38,8	\oplus O
МСРВ	23,1	42,1	\oplus O	Fluazifop-p-Butyl	58,8	56,4	0
Atrazine-Desethyl	24,0	31,2	\oplus O	Chlorbenzilat	59,1	54,4	∇

Tabelle 4-11:Screening und Konfirmation von 81 Pestiziden mittels AMD1-
Gradient 2a (DIN) und AMD1-Gradient 3a (BCG)

Endpunktbestimmung

Pestizid	Laufs in r	trecke nm		Pestizid	Laufs in r	trecke nm	
	DIN	BCG			DIN	BCG	
Ethylenthiurea	24,4	12,0	\oplus O	Propham	59,2	57,5	$\oplus $ O
Propiconazole	24,9	17,9	\oplus O	Deltamethrin	60,0	35,9	\oplus O
Fenarimol	26,2	31,1	\oplus O	Pirimiphos-Ethyl	60,1	49,5	0
Pirimicarb	26,4	21,0	\oplus O	Folpet	60,4	47,3	\oplus O
Desmetryn	26,6	30,1	\oplus O	Chlorpropham	60,8	21,2	\oplus O
Fenpropimorph	26,9	23,9	Ο	Parathion	61,9	66,0	0
Chloridazon	27,7	24,5	\oplus O	Pendimethalin	62,0	-	0
Bentazon	29,3	47,3	\oplus O	Binapacryl	62,1	73,7	\oplus O
Dimethoat	33,3	16,7	\oplus O	Vinclozolin	62,5	65,4	\oplus O
Isoproturon	33,7	21,1	\oplus O	Methoxychlor	62,9	71,0	$\oplus $ O
Simazin	33,7	36,8	Ο	Chlorthalonil	63,0	67,2	\oplus O
Atrazin	34,3	41,0	\oplus O	Chlozolinat	66,7	54,2	0
Cyanazin	34,4	34,2	\oplus O	Chloropyriphos-Ethyl	68,2	-	\oplus O
Ametryn	35,5	18,8	\oplus O	p,p-DDE	76,9	79,5	

 \oplus unterschiedliche Laufstrecke mit einem der beiden Gradienten zum nachfolgenden Pestizid

O unterschiedliches Spektrum zum nachfolgenden Pestizid

abla gleiche Laufstrecke mit beiden Gradienten und gleiches Spektrum zum nachfolgenden Pestizid

Tabelle 4-12:Screening und Konfirmation von 19 Pestiziden* mittels AMD1-
Gradient 2a (DIN) und AMD1-Gradient 3a (BCG)

* Benzoylharnstoffe, Iprodion und die basischen Pestizide

Pestizid	d Laufstrecke in mm		Pestizid Laufstrecke				
	DIN	BCG			DIN	BCG	
Carbendazim	10,8	9,6**	0	Lufenuron	25,6	35,8	\oplus O
Imazalil	11,2	9,6	\oplus O	Triadimefon	31,1	33,9	\oplus
Thiabendazol	14,5	9,2*	0	Iprodion	41,5	37,8	\oplus O
Prochloraz	15,6	11,8	\oplus O	Diflubenzuron	48,8	38,1	∇
Triadimenol	16,8	20,7	0	Flufenoxuron	51,3	37,4	∇
Bitertanol	16,8	20,6	0	Chlorfluazuron	52,2	39,6	∇
Tebuconazol	17,1	14,9	\oplus	Triflumuron	52,5	37,7	∇
Myclobutanil	20,6	14,6	Ο	Hexaflumuron	53,4	38,8	∇

Pestizid	Laufst in n	recke nm	Pestizid	Laufs in	Laufstrecke in mm		
	DIN	BCG		DIN	BCG		
Oxadixyl	22,2	16,0 ⊕ O	Teflubenzuron	53,7	40,4	\oplus O	
Lufenuron	25,6	35,8 ⊕ O	Procymidon	57,3	51,6		

 \oplus unterschiedliche Laufstrecke mit einem der beiden Gradienten zum nachfolgenden Pestizid

O unterschiedliches Spektrum zum nachfolgenden Pestizid

abla gleiche Laufstrecke mit beiden Gradienten und gleiches Spektrum zum nachfolgenden Pestizid

** Analyt hat zwei Peaks

Durch Vergleich der Spektren und der Laufstrecken der Pestizide in beiden Gradienten sollte herausgefunden werden, in wie weit durch die Anwendung zweier Gradienten kritische Pestizidpaare auseinander gehalten werden können. Dabei wurden drei Fälle beobachtet:

- 1. Ein kritisches Pestizidpaar lässt sich im anderen Gradienten trennen,
- Ein kritisches Pestizidpaar lässt sich im anderen Gradienten ebenfalls nicht trennen, aber die beiden Pestizide haben verschiedene Spektren.
- Ein kritisches Pestizidpaar hat in beiden Gradienten gleiche Laufstrecken und ihre Spektren lassen sich nicht unterscheiden.

Im 1. Fall können die Pestizide voneinander unterschieden werden. Ein Beispiel dafür sind Flamprop und Ethirimol, die sich mit dem DIN-Gradienten nicht trennen lassen (Laufstrecke 9,4 bzw. 9,9 mm), aber im BCG sehr unterschiedliche Laufstrecken (30,4 und 9,8 mm) aufweisen und sich so sehr gut nachweisen lassen.

Im 2. Fall ist eine Unterscheidung nur möglich, wenn nur ein Pestizid des kritischen Paares anwesend ist. So haben z. B. die Pestizide Triadimenol und Bitertanol in beiden Gradienten sehr ähnliche Laufstrecken (17 und 21 mm), sind aber aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen UV-Spektren gut zu unterscheiden, da Triadimenol ein UV-Maximum bei 200 nm und Bitertanol ein UV-Maximum bei 260 nm hat. Bei Vorliegen beider Pestizide gemeinsam, würde die Identifizierung des Triadimenols nicht gelingen, da sein relativ unspezifisches Spektrum vom Bitertanolspektrum überdeckt würde.

Im 3. Fall ist die Methode zur Identifizierung von Pestiziden im Pestizidgemisch durch Entwicklung in zwei voneinander unabhängigen Universalgradienten nicht spezifisch.

Besonders deutlich wird dies bei den Benzoylharnstoffen. Aufgrund ihrer großen Strukturähnlichkeit lassen sie sich nicht voneinander unterscheiden. Ihre Laufstrecken und ihre Spektren (siehe Abbildung 4-68) sind zu ähnlich. Eine Ausnahme ist Lufenuron, das in beiden Gradienten unterschiedliche Laufstrecken zeigt.

Auch die Gruppe der basischen Pestizide wurden mit Ausnahme des Triadimefons und des Procymidons mit beiden Universalgradienten nicht optimal getrennt. Lediglich durch Spektrenvergleich können sie zugeordnet werden. Zusätzlich ergab sich im BCG für die beiden basischen Fungizide Thiabendazol und Carbendazim ein Problem. Aufgrund des für die beiden Fungizide ungünstigen pH-Bereichs des Gradienten (neutral - sauer - neutral) erzeugten sie zwei Peaks. Für diese Pestizide muss der AMD-Gradient entweder basisch oder sauer sein.

Die Lösung der Probleme war die Entwicklung von selektiven, speziell für die untersuchten Pestizidgruppen optimierten AMD-Gradienten (siehe Abschnitt 4.3.1.2 und 4.3.1.3).

Die Hypothese von Burger, dass sich Pestizide in einem Pestizidgemisch durch Entwicklung in zwei voneinander unabhängigen Universal-AMD-Gradienten unterscheiden lassen, konnte nicht bestätigt werden. Pestizide mit sehr ähnlichem chromatographischen Verhalten und großer Strukturähnlichkeit müssen nicht unterscheidbar sein. Deshalb ist es empfehlenswert, als Absicherungsgradienten keinen zweiten Universalgradienten, sondern einen für das vorliegende Trennproblem optimierten Gradienten zu verwenden.

4.3.1.2 Entwicklung eines AMD-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion

Die Benzoylharnstoffe ähneln sich in ihrem dünnschichtchromatographischen Verhalten aufgrund ihrer sehr ähnlichen chemischen Struktur. Wie in Abschnitt 4.3.1.1, Tabelle 4-12 dokumentiert, konnte lediglich Lufenuron mit einem der beiden Universal-AMD-Gradienten, dem DIN-Gradienten, selektiv neben den anderen Benzoylharnstoffen und Iprodion erfasst werden. Die anderen Pestizide zeigten in beiden Universal-AMD-Gradienten ein so ähnliches dünnschichtchromatographisches Verhalten, dass die Auflösung zwischen zwei benachbarten Analyten wesentlich kleiner als eins war.

Um Benzoylharnstoff-Rückstände und Iprodionrückstände in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC bestimmen zu können, musste für die Benzoylharnstoffe und Iprodion ein AMD-Gradient entwickelt werden, der alle Analyten zufriedenstellend trennt. Eine zusätzliche Vorgabe war, das die Analyten eine Laufstrecke von mindestens 23 mm haben mussten, damit sie auch nach Kopplung mit der HPLC bestimmbar waren^a.

^a Bei der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD wurden die HPLC-Fraktionen mäanderförmig auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Der resultierende Rechteckspot musste zunächst in der AMD-Entwicklung auf eine schmale Bande (Laufstrecke etwa 20 mm) fokussiert werden.

Bei jedem Optimierungsschritt wurden je 200 ng der untersuchten Pestizide auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, mittels HPTLC / AMD entwickelt und densitometrisch bei 200 nm vermessen.

Entsprechend der von der Firma Camag vorgeschlagenen Vorgehensweise wurde der Universalgradient mit den besseren Trenneigenschaften, der DIN-Gradient, im mittelpolaren Bereich gespreizt. Diese Vorgehensweise brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die Pestizidpaare Flufenoxuron / Chlorfluazuron und Teflubenzuron / Hexaflumuron konnten unter keinen Bedingungen getrennt werden. Da die Trennleistung im AMD-System sehr hoch ist, wurde geschlussfolgert, dass das Basisfließmittel Dichlormethan nicht selektiv genug zur Trennung der Benzoylharnstoffe ist.

Daraufhin wurde ein Basisfließmittel gesucht, das in einer isokratischen Entwicklung die beste Trennung (beste Selektivität) zeigt. Es wurden die Lösungsmittel Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Toluol und tertiär-Butylmethylether getestet. Die Polarität der Laufmittel wurde mit n-Hexan so eingestellt, das die relativen Laufstrecken der Benzoylharnstoffe zwischen 0,2 und 0,8 lagen. Keines der Lösungsmittel trennte die Benzoylharnstoffe vollständig. Das Lösungsmittel mit der größten Selektivität für die dünnschichtchromatographische Trennung der Benzoylharnstoffe war Toluol.

Daraufhin wurden zwei Gradienten mit Toluol als Basisfließmittel für das AMD1-Gerät entwickelt und die Gradienten entsprechend Abschnitt 4.5.4 auf das AMD2-Gerät übertragen. Die Laufstrecken der Benzoylharnstoffe sind bei der Entwicklung in beiden Geräten vergleichbar. Die Gradienten sind für das AMD2-Gerät in Abbildung 4-17 dargestellt.

Bei beiden Gradienten wurde als Basisfließmittel Toluol verwendet und die Laufmittel mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert. Als Verstärker wurden Acetonitril und Ethylacetat ausgewählt.



Abbildung 4-17: Zusammensetzung der AMD2-Gradienten 6 und 7 (optimiert für die Trennung von Benzoylharnstoffen)

Obwohl Acetonitril das polarere Lösungsmittel^a ist, musste im Gradienten 7 das Laufmittel Ethylacetat für die ersten vier Läufe mit dem Basisfließmittel Toluol abgeschwächt werden, damit die relativen Laufstrecken der Benzoylharnstoffe im optimalen Bereich zwischen 0,2 und 0,8 lagen. Ansonsten wurden die Gradienten sehr ähnlich gestaltet, die Abschwächung der Gradienten erfolgte bei beiden Gradienten identisch mit den gleichen Mengen n-Hexan.

Die beiden Verstärker Acetonitril und Ethylacetat zeigten unterschiedlich selektive Eigenschaften. Aus den in Tabelle 4-13 aufgelisteten Laufstrecken der Benzoylharnstoffe kann geschlussfolgert werden, das Ethylacetat das selektivere Laufmittel ist. Beide Gradienten wurden bei der Anwendung der AMD-Technik zur Bestimmung von Benzoylharnstoffen benutzt.

Der Gradient 7 war für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der <u>GPC-</u> oder <u>RP-HPLC</u> geeignet; die Laufstreckenunterschiede betrugen mindestens 2 mm, der Peakabstand zwischen dem niedrigsten (Diflubenzuron) und dem höchsten (Teflubenzuron) Peak beträgt 14,5 mm.

 ^a Trenncharakteristik nach Polarität und Selektivität sogenannter P'-Wert
 P'-Wert (Acetonitril) = 6,2; P'-Wert (Ethylacetat) = 64,3; P'-Wert (Toluol) = 2,3; P'-Wert (n-Hexan) = 0,0
 nach L. R. Snyder auf Grund von Löslichkeitsdaten von L. Rohrschneider, Journal of Chromatography 92 (19974) S. 223

Sollten die Benzoylharnstoffe dagegen mittels HPTLC/AMD nach Online-Kopplung mit der <u>GPC-HPLC</u> bestimmt werden, war der Gradient 6 nicht geeignet. Hier ergaben sich wie nach der Optimierung des DIN-Gradienten zwei kritische Pärchen. Waren die kritischen Pärchen beim optimierten DIN-Gradienten Chlorfluazuron / Flufenoxuron und Teflubenzuron / Hexa-flumuron, war beim Gradienten 6 neben dem kritischen Pärchen Chlorfluazuron / Flufenoxuron das zweite kritische Pärchen Triflumuron / Hexaflumuron.

Die Eignung des Gradienten 6 lediglich für die RP-HPLC ergab sich aus dem unterschiedlichen Elutionsverhalten der Benzoylharnstoffe in der RP-HPLC und der GPC-HPLC. Die beiden kritischen Pärchen des Gradienten 6 Chlorfluazuron / Flufenoxuron und Triflumuron /-Hexaflumuron konnten nach RP-HPLC in unterschiedliche Fraktionen geschnitten werden (Retentionszeiten siehe Abschnitt 4.3.4.2); in der GPC-HPLC würde das kritische Paar Chlorfluazuron / Flufenoxuron in der selben Fraktion (Fraktion 1, Abbildung 4-42) eluieren.

Iprodion konnte mit beiden Gradienten gut von den Benzoylharnstoffen abgetrennt werden, im Gradienten 6 betrug seine Laufstrecke 16,4 mm und im Gradienten 7 18,2 mm. Damit war Iprodion nicht mehr nach HPLC-Kopplung mit den für die Benzoylharnstoffe optimierten AMD1-Gradienten 6 und 7 identifizierbar, weil die Fokussierung der Banden in diesem Bereich stattfindet.

Es wurde das Retentionsverhalten der Benzoylharnstoffe im AMD1-Gradienten 6 bei Verwendung verschiedener Kieselgel-HPTLC-Platten untersucht. Zur Verfügung standen eine Kieselgel-HPTLC-Platte ohne Fluoreszenzfarbstoff mit 0,2 mm Dicke, Kieselgel-HPTLC-Platten mit Fluoreszenzfarbstoff (F 254) mit 0,1 und 0,2 mm Dicke und eine wasser- und säureresistente HPTLC-Platte ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoff (WR F 254s).

Die 0,1-mm-Platte ist laut Herstellerangaben (Merck) besonders für die AMD geeignet. Durch die geringere Dicke ist die Stoffaustauschverzögerung in der stationären Phase geringer und damit die Peakbasisbreite kleiner, allerdings ist durch die geringere Dicke die auftragbare Probenmenge ebenfalls geringer. Das dünnschichtchromatographische Verhalten der Benzoylharnstoffe auf Kieselgel-HPTLC-Platten mit wasser- und säureresistenten Eigenschaften wurde untersucht, um die Eignung dieser Platten für die postchromatographische Derivatisierung der Benzoylharnstoffe zu testen, da die verwendeten Tauchlösungen (Derivatisierungsreagenz) stark wasserhaltig sind.

Wie in Tabelle 4-13 dargestellt, unterscheiden sich die Laufstrecken der Benzoylharnstoffe bei Verwendung der untersuchten Kieselgel-HPTLC-Platten. Die Ergebnisse der HPTLC-Platte ohne Fluoreszenzfarbstoff mit 0,2 mm Dicke unterschieden sich nicht von den Endpunktbestimmung

Ergebnissen der HPTLC-Platte mit Fluoreszenzfarbstoff mit 0,2 mm Dicke. Sie sind deshalb in der Tabelle nicht extra aufgeführt. Die HPTLC-Platte ohne Fluoreszenzfarbstoff mit 0,2 mm Dicke wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr benutzt, da Platten mit Fluoreszenzfarbstoff vor der chromatographischen Entwicklung eine Kontrolle der Auftragequalität der Proben und Standards erlauben.

	Kleseigei-HP I L	C-Platten		
AMD1-Gradient:	Gradient 6	Gradient 6	Gradient 6	Gradient 7
HPTLC-Platte:	0,2 mm, Kieselgel 60 F 254 [*]	0,1 mm, Kieselgel 60 F 254 [*]	0,2 mm, Kieselgel 60 WR F 254s [*]	0,2 mm, Kieselgel 60 F 254 [*]
Iprodion	16,4			18,2
Diflubenzuron	26,9	27,8	33,1	31,8
Flufenoxuron	30,3	31,6	35,4	34,0
Chlorfluazuron	30,7	32,0	37,9	37,0
Triflumuron	34,1	35,8	39,1	38,8
Hexaflumuron	34,3	36,4	44,5	44,3
Teflubenzuron	38,1	39,8	45,8	46,3
Maximaler Peakabstand ^{**}	11,2	12,0	12,7	14,5

Tabelle 4-13:Laufstrecken der Benzoylharnstoffe in der HPTLC / AMD, nach
Entwicklung mit den AMD1-Gradienten 6 und 7 und verschiedenen
Kieselgel-HPTLC-Platten

* Laufstrecke L_f in mm

** maximaler Peakabstand = der Peakabstand zwischen dem niedrigsten (Diflubenzuron) und dem höchsten (Teflubenzuron) Peak

Die Hoffnung auf eine wesentlich verbesserte Trennung der Benzoylharnstoffe bei Verwendung der 0,1-mm-Platten erfüllte sich nicht. Der Unterschied des Peakabstandes zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Peak zwischen der 0,2-mm-Platte und der 0,1-mm-Platte war kleiner als 1 mm und die Peakbasisbreiten der Benzoylharnstoffe^a waren etwas kleiner als bei Verwendung einer 0,2-mm-Platte, wodurch die Auflösung geringfügig verbessert wurde. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich aber heraus, das aufgrund der geringeren Probenkapazität der 0,1-mm-Platten die Gefahr einer Überladung und damit eine

^a Die Basispeakbreiten der Analyten unterscheiden sich bei Verwendung der 0,1-mm- und 0,2-mm-Platten. Diese Beobachtung konnte lediglich unter einer UV-Lampe (254 nm) gemacht werden; bei dem verwendeten UV-Scanner wurden gleiche Basispeakbreiten gemessen, da der Unterschied der Basispeakbreiten kleiner oder gleich dem Messfehler ($\Delta = 0,1$ mm) des UV-Scanners war (Das Auge verfügt über eine wesentlich bessere Auflösung).

schlechtere Trennung der Analyten wesentlich größer als bei Verwendung von 0,2-mm-Platten ist.

Da die 0,1-mm-Platten doppelt so teuer wie die 0,2-mm-Platten sind und die Verwendung keine gravierenden Vorteile brachte, wurde in der Routineanalytik auf den Einsatz der 0,1mm-Platten verzichtet.

Mit der Kieselgel-Platte WR F 254s wurden die Benzoylharnstoffe mit dem Gradienten 6 am besten getrennt; der Peakabstand zwischen dem niedrigsten (Diflubenzuron) und dem höchsten (Teflubenzuron) Peak beträgt 12,7 mm. Da die Peakbasisbreiten der Benzoylharnstoffe nicht wesentlich größer sind als bei den 0,2-mm-Platten, ist die Auflösung der Analyten verbessert. Bei Verwendung der Kieselgel-Platte WR F 254s wurde beobachtet, dass durch wasserhaltige Proben die Kieselgelschicht während des Auftragens verletzt wurde. Besonders deutlich wurde dieses Phänomen bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD. Bei den Kieselgel 60 F254-Platten mit 0,1 oder 0,2 mm Schichtdicke wurde dieses Phänomen nicht beobachtet.

In Abbildung 4-18 ist dieses Phänomen am Beispiel der Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Blumenkohl dargestellt.

Der Blumenkohl wurde mit je 0,01 ppm der Pestizide des Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe)^a dotiert und nach acetonischer Extraktion mit Dichlormethan einer Flüssig / Flüssig-Verteilung unterzogen; danach wurden die Extrakte mittels GPC und MKGF (Fraktion 3) mit anschließener Festphasenextraktion an einer Bakerbond-Aminophase aufgereinigt (siehe Abschnitte 3.1.2 / 3.1.3.1 / 3.1.3.2 / 3.1.3.3). Die Bestimmung der Pestizide erfolgte mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD (HPLC-Chromatogramm eines Standardgemischs der Benzoylharnstoffe siehe Abbildung 4-36).

Bei der Kopplung wurde die Kieselgel-Platte (WRF254s) vom wasserhaltigen HPLC-Eluenten verletzt. Die Kieselgelschicht weichte auf und wurde durch den Stickstoffstrom zur Seite gedrückt. Es entsteht ein Rillenmuster (~relief) auf dem Auftrageort, welches in Abbildung 4-18 dargestellt ist. Die Tiefe dieses Musters nimmt mit der Retentionszeit ab. Sie ist (offensichtlich) mit dem Wassergehalt des HPLC-Eluenten korreliert.

^a In der Abbildung 4-18 sind lediglich die Ergebnisse der mit dem Mix 17 dotierten Blumenkohlprobe dargestellt. Ursprünglich wurden die Proben auch ohne Kopplung vermessen, deshalb wurde wegen der fehlenden Selektivität des AMD-Gradienten die Proben mit den Mix 17 und 18 einzeln dotiert, da dann eine Trennung der Analyten voneinander gegeben war.

Nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung der gekoppelten Platten und UV-Detektion zeigte sich, dass trotz dieser Schichtverletzung die Chromatographie nicht beeinflusst wurde. In den Densitometerchromatogrammen in Abbildung 4-18 ist die Fokussierung der Startbande jeder HPLC-Fraktion bei etwa 20 mm sehr gut erkennbar, die Peakbasisbreiten der Analyten sind bei der durch HPLC-Kopplung aufgetragenen Probe nicht größer als beim mit dem Linomat III aufgetragenen Standard.



Abbildung 4-18: Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Blumenkohl mittels RP-HPLC-HPTLC / AMD-Kopplung

Blumenkohl mit 0,01 ppm Mix 17 dotiert,a - d:vier HPLC-Fraktionen à 6,0 min von 26,0 bis 50,0 mine:50 ng des Mix 17 (1. Diflubenzuron, 2. Chlorfluazuron und 3. Hexaflumuron)Geräteparameter:Injektion: 50 μl, HPLC-Säule 1, HPLC-Gradient 1; HPLC-Eluent 1;HPTLC-Platten:Kieselgel 60 WRF 254s, AMD1-Gradient 6

Die Fraktionen werden besonders durch die Entwicklung mit Acetonitril in den ersten vier Schritten der AMD-Entwicklung auf eine Höhe oberhalb der verletzten Schicht fokussiert. Der Laufstreckenvergleich mit dem Linomat III aufgetragenen Standard zeigte, dass die Laufstrecken der Benzoylharnstoffe dadurch nicht beeinflusst wurden. Deshalb ist der Einsatz der Kieselgel-Platte (WRF254s) auch bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD geeignet. Sie wurden bei der postchromatographischen Derivatisierung der Benzoylharnstoffe eingesetzt.

4.3.1.3 Entwicklung eines AMD-Gradienten für die basischen Fungizide

Auch für die Bestimmung von Rückständen der basischen Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln war es notwendig, einen AMD-Gradienten zu entwickeln mit dem alle Analyten zufriedenstellend getrennt werden können (vergleiche Abschnitt 4.3.1.1, Tabelle 4-12). Eine wichtige Bedingung für den Gradienten war, dass er sauer oder basisch sein musste, um während der dünnschichtchromatographischen Entwicklung ein gleichzeitiges Vorliegen der interessierenden Analyten als Säure und Base zu verhindern.

Bei jedem Optimierungsschritt wurden je 200 ng der untersuchten Pestizide auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, mittels HPTLC / AMD entwickelt und densitometrisch bei 200 nm vermessen.

Auch bei der Optimierung des Gradienten für die basischen Pestizide wurde entsprechend der von der Firma Camag vorgeschlagenen Vorgehensweise der Universalgradient mit den besseren Trenneigenschaften, der DIN-Gradient, entsprechend der Laufstrecken der Pestizide im polaren Bereich gespreizt. Mit dem in dieser Weise von Lindita Tafaj entwickelten Gradienten [183] konnten die Analyten nicht ausreichend getrennt werden. Außerdem war er aufgrund der niedrigen Laufstrecken für die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / - AMD nicht geeignet (Laufstrecken von 18,3 mm – Imazalil bis 44,7 mm – Procymidon). Daraufhin wurde der AMD-Gradient in den ersten Läufe polarer gestaltet. Dadurch wurden die Laufstrecken der Analyten erhöht, aber die Trennung der Analyten nicht verbessert.

Die ausgewählten Fungizide zeigten aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in beiden Gradienten ein sehr ähnliches dünnschichtchromatographisches Verhalten. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für das AMD1-Gerät kein Gradient entwickelt werden konnte, der zur vollständigen Trennung der Fungizide geeignet war.

Weitere Versuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln bei isokratischer Entwicklung der basischen Pestizide zeigten, dass Dichlormethan das Lösungsmittel mit der besten Selektivität darstellt.

Auf Basis von Dichlormethan konnte schließlich für das AMD2-Gerät ein Gradient mit einem sehr flachen und linearen Verlauf entwickelt werden, mit dem die Analyten erfolgreich getrennt werden konnten.

Damit gelang es mit dem AMD2-Gerät eine lineare reproduzierbare Gradientenelution an Kieselgel (AMD2-Gradient 1, siehe Abschnitt 3.3.7.5, Tabelle 3-12) durchzuführen, da hier die Mischung des Gradienten durch ein anderes Prinzip als beim AMD1-Gerät erfolgt (siehe Abschnitt 2.5.1.4).

Abschließend wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung der Analyten untersucht. Die beste Trennung wurde erreicht, wenn wie im optimierten Gradienten die Fließmittel der einzelnen Läufe mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert wurden. So wurden z. B. Imazalil / Thiabendazol und Carbendazim / Bitertanol nicht getrennt, wenn im AMD2-Gradienten 1 die Ameisensäure weggelassen wurde.

In Tabelle 4-14 sind die Laufstrecken der basischen Pestizide bei der dünnschichtchromatographischen Trennung mit automatischer Mehrfachentwicklung mit dem AMD2-Gradienten 1 auf 0,1- und 0,2-mm-HPTLC-Platten zusammengestellt.

Substanz	LS* in mm	LS** in mm	λ_{max} in nm	λ_{neben} in nm
Imazalil	20,1	23,6	202	227, 287
Thiabendazol	23,6	26,0	301	242, 197
Carbendazim	39,6	42,8	276	227, 195
Prochloraz	40,9	43,1	202	282
Triadimenol	42,4	44,9	223	274, 395
Bitertanol	43,2	45,7	254	197
Tebuconazol	46,3	48,2	220	255, 396
Oxadixyl	49,2	50,1	197	267
Myclobutanil	49,2	50,6	194	220, 257
Triadimefon	58,5	58,4	223	273, 395
Procymidon	68,4	68,0	243	371
Front	70,2	70,0		

Tabelle 4-14:Laufstrecken LS und Absorptionsmaxima λ der basischen Pestizide,
entwickelt mit dem AMD2-Gradienten 1, HPTLC-Platten Kieselgel
60 F 254

* Laufstrecke bei einer Schichtdicke von 0,2 mm,

** Laufstrecke bei einer Schichtdicke von 0,1 mm,

 λ_{max} Absorptionsmaximum, λ_{neben} Nebenmaximum.

Eine bessere Trennung der basischen Fungizide ist nicht möglich, da der Raum auf der HPTLC-Platte zur Trennung der Analyten optimal ausgenutzt wurde (Laufstrecken auf der 0,2-mm-Platte von 23,6 bis 68,4 mm). Auch hier wurde bei Verwendung einer 0,1-mm-Platte

keine Verbesserung der Trennung erzielt. In der optimierten Methode wurde deshalb auf die Verwendung der 0,1-mm-Platte verzichtet.

Für die bioautographische Detektion der Fungizide mit Pilzen wurde zusätzlich ein weiterer AMD-Gradient, der AMD1-Gradient 8 (siehe Abschnitt 3.3.7.5, Tabelle 3-11), auf Basis von Ethylacetat entwickelt. Bei dieser Entwicklung waren aufgrund der Fließmittelzusammensetzung die Nachweisgrenzen der Fungizide nach bioautographischer Detektion kleiner als bei Verwendung des AMD-Gradienten auf Basis von Dichlormethan. Dieser Gradient wurde lediglich bei der bioautographischen Detektion der Fungizide verwendet, da bei der UV-Detektion die schlechtere Fokussierung der Analyten nachteilig ist.

4.3.1.4 Konvertierung der Gradienten vom AMD1- zum AMD2-System

Die Weiterentwicklung des AMD1-Systems zum AMD2-System durch die Firma Camag machte es notwendig, die für das AMD1-System schon bestehenden Gradienten an das AMD2-System anzupassen, damit die bereits optimierten Analysenverfahren weiter benutzt werden konnten.

Diese Anpassung war notwendig, weil wie in Abschnitt 2.5.1.4 ausführlich besprochen, die beiden Geräte große Unterschiede im Aufbau aufweisen. Im wesentlichen wurden der Lösungsmittelmischer und die Art der Fließmittellaufstreckenmessung verändert. Im AMD1-System wurde das Lösungsmittel sukzessive vermischt, wodurch nur eine prozentuale Änderung der effektiven Fließmittelzusammensetzung erreicht werden kann. So kann die effektive Fließmittelzusammensetzung im AMD1-System nach einem Flaschenwechsel um 18,62 % und ohne Flaschenwechsel 35,38 % geändert werden. Im AMD2-System kann das Fließmittel dagegen frei gewählt werden.

Zur Anpassung der Gradienten wurde ein Berechnungsprogramm erstellt, das die Fliessmittelzusammensetzung des AMD1-Gradienten in einer Exceltabelle in die Fliessmittelzusammensetzung für einen AMD2-Gradienten berechnen kann.

Die dafür entwickelte Formel fragt:

Ob der Mischer vor Start des Laufes geleert wurde. Falls ja, wird die

Fliessmittelzusammensetzung auf 100 % der neuen Flasche gesetzt.

Ob ein Flaschenwechsel stattgefunden hat.

Falls ja, wird die Fliessmittelzusammensetzung nach folgender Formel berechnet: = 0,8138 x Fliessmittelzusammensetzung des letzten Laufes + 0,1862 x Fliessmittelzusammensetzung der aktuellen Flasche. **Falls nein,** wird die Fliessmittelzusammensetzung nach folgender Formel berechnet = 0,6462 x Fliessmittelzusammensetzung des letzten Laufes + 0,3538 x Fliessmittelzusammensetzung der aktuellen Flasche.

Da das AMD2-Gerät nur in der Lage ist ganzzahlige Lösungsmittelvolumina zu berücksichtigen, muss ein Fehler von kleiner als 2 % in Kauf genommen werden.

Im folgenden wird die Vorgehensweise zur Konvertierung eines AMD1-Gradienten zu einem AMD2-Gradienten durch ein Excel-Berechnungsprogramm beschrieben.

Die Übertragung der effektiven Fliessmittelzusammensetzung des AMD1-Systems auf das AMD2-System wird am Beispiel des in Tabelle 4-15 dargestellten, von Lindita Tafaj entwickelten Gradienten (AMD1-Gradient 1) gezeigt.

Im ersten Arbeitsschritt wird dazu eine Exceltabelle erstellt und die in Tabelle 4-16 dargestellte Matrize zur Berechnung der Lösungsmittel für das AMD2-Gerät herangezogen.

In diesem Schritt kann eine mögliche Reduzierung der Anzahl der Vorratsflaschen durchgeführt werden. Diese ist notwendig, wenn der AMD-Gradient sechs Vorratsflaschen benötigt, da das AMD2-System lediglich über fünf Vorratsflaschen verfügt. Um zu zeigen, dass eine Reduzierung der Flaschen problemlos gelingt, wurden im vorliegenden Beispiel die Flaschen von 6 auf 4 reduziert. Dabei wurde die Flasche 2 des AMD1-Gradienten (Methanol / Dichlormethan / HCOOH (6/94/0,1)) durch je 50 % der Flaschen 1 und 2 des AMD2-Gradienten ersetzt. Die Flasche 5 des AMD1-Gradienten (Dichlormethan/n-Hexan (50/50)) wurde durch je 50 % der Flaschen 3 und 4 des AMD2-Gradienten ersetzt.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die Steuerung des AMD1-Systems abfragt, nach welchem Schritt der Mixer entleert werden soll und in die Exceltabelle eingetragen werden muss, vor welchem Schritt der Mixer entleert werden soll.

AMD	Schritt	Methanol	DCM	n-Hexan	НСООН
Flasche 1	1	12	88		0.1
Flasche 2	5	6	94		0.1
Flasche 3	11		100		0.1
Flasche 4	17		100		
Flasche 5	21		50	50	
Flasche 6	26			100	
Mixer leeren nach Schritt	30				

 Tabelle 4-15:
 AMD1-Gradient 1 (für Oberflächenbehandlungsmittel)
	А	В	C	D	Е	F
9	AMD2	Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flasche 4
10		1	100			
11		5	50	50		
12		11		100		
13		17			100	
14		21			50	50
15		26				100
16						
17	Mixer leeren vor Schritt	31				

Tabelle 4-16:	Exceltabelle zur Berechnung des AMD2-Gradienten (Teil 1)	,
		. /	

Flasche 1 enthält Methanol/Dichlormethan/HCOOH (12/88/0,1),Flasche 3 enthält DichlormethanFlasche 2 enthält Dichlormethan/HCOOH (100/0,1), Flasche 4 enthält n-Hexan

Im zweiten Arbeitsschritt werden im selben Datenblatt die in Tabelle 4-17 dargestellten Berechnungsformeln eingegeben und der AMD2-Gradient durch das Excelprogramm berechnet. Zur besseren Orientierung in der Formel 1 wurden die verschiedenen Zellen farbig markiert.

Tabelle 4-17:	Exceltabelle zur Berechnung des AMD2-Gradienten (Teil 2)
---------------	--

	J	K	L	М	Ν	0
1	Schritt	=C9	=D9	=E9	=F9	
2	1	=C10	=D10	=E10	=F10	
3	2	Formel 1	Formel 2	Formel 3	Formel 4	
4	3	Formel 1 kopiert	Formel 2 kopiert	Formel 3 kopiert	Formel 4 kopiert	

Formel 1:

=WENN(\$J3=\$B\$17;SVERWEIS(\$J3;**\$B\$9:\$H\$15**;**2**;WAHR);WENN(ODER(\$J3=**\$B\$10**; \$J3=**\$B\$11;**\$J3=**\$B\$12;**\$J3=**\$B\$13;**\$J3=**\$B\$14;**\$J3=**\$B\$15**);0.8138*K2+0.1862*SVERWEIS (\$J3;**\$B\$9:\$H\$15**;**2**;WAHR);0.6462*K2+0.3538*SVERWEIS(\$J3;**\$B\$9:\$H\$15**;**2**;WAHR)))

In den Formeln 2 bis 4 wird die Formel 1 kopiert und lediglich die Spaltennummer $\underline{2}$ (die in der Formel 1 unterstrichen ist) durch 3, 4 bzw. durch 5 ersetzt.

Das Ergebnis der Konvertierung des gewählten AMD-Gradienten ist in Tabelle 4-18 zusammengefasst. Das AMD2-Gerät lässt sich nun so programmieren, dass die in der Tabelle 4-18 ermittelten Volumina aus den jeweiligen Flaschen dem Lösungsmittelmischer (Kolbenpumpe mit Achtfach-Ventil) zugeführt werden.

	J	K	L	М	Ν
1	Schritt	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flasche 4
2	1	100	0	0	0
3	2	100	0	0	0
4	3	100	0	0	0
5	4	100	0	0	0
6	5	91	9	0	0
7	6	76	24	0	0
8	7	67	33	0	0
9	8	61	39	0	0
10	9	57	43	0	0
11	10	55	45	0	0
12	11	44	56	0	0
13	12	29	71	0	0
14	13	19	81	0	0
15	14	12	88	0	0
16	15	8	92	0	0
17	16	5	95	0	0
18	17	4	77	19	0
19	18	3	50	47	0
20	19	2	32	66	0
21	20	1	21	78	0
22	21	1	17	73	9
23	22	1	11	65	24
24	23	0	7	60	33
25	24	0	5	56	39
26	25	0	3	54	43
27	26	0	2	44	54
28	27	0	2	28	70

 Tabelle 4-18:
 Konvertierter Gradient f
 ür das AMD2-System

	J	K	L	М	Ν		
29	28	0	1	18	81		
30	29	0	1	12	87		
31	30	0	0	8	92		

4.3.1.5 Praktische Umsetzung der Konvertierung

Übertragbarkeit der AMD-Gradienten vom AMD1- zum AMD2-System

Die Übertragbarkeit der Gradientenberechnung wurde anhand des AMD-Gradienten 1, des AMD-Gradienten 2, einem modifizierten DIN-Gradienten [132], und des AMD-Gradienten 3, einem modifizierten Burger-Konfirmationsgradienten [184], überprüft. Die Gradientenbeschreibungen befinden sich im Abschnitt 3.3.7.5.

Für die Versuche wurden Pestizide ausgewählt, die den gesamten Laufstreckenbereich abdecken. Es wurden 500 ng je Pestizid auf eine HPTLC-Platte appliziert und mit den verschiedenen Gradienten in jeweils beiden AMD-Systemen entwickelt. Die Detektion erfolgte remissionsspektrometrisch im Multiwellenlängen-Modus bei 200 bis 300 nm.

Zur Auswertung der Versuchsreihen wurden die in beiden AMD-Systemen ermittelten Laufstrecken der einzelnen Analyten in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und verglichen. Bei guter Übereinstimmung sollten die in beiden Gradienten erreichten Laufstrecken für die einzelnen untersuchten Analyten jeweils gleich sein. Die zu berechnende Ausgleichsgerade sollte damit eine Steigung von eins und eine Korrelation von größer 0,99 aufweisen.

Abbildung 4-19 zeigt die Gegenüberstellung der Laufstrecken ausgewählter Pestizide, die mit dem Gradienten 1 im AMD1- und AMD2-Gerät erhalten wurden. Unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs wurde die Geradengleichung und ihre Korrelation mittels Excel berechnet und dargestellt. Außerdem wurde unter Annahme eines polynomen Zusammenhangs die polynomische Trendlinie eingezeichnet.

Mit den in beiden AMD-Systemen durch Entwicklung mit den Gradienten 2 und 3 erhaltenden Daten wurde in gleicher Weise verfahren. (Im Vergleich AMD1-AMD2 des Gradienten 2 konnte ein polynomer Zusammenhang nicht hergestellt werden, es ist deshalb keine polynome Funktion eingezeichnet.) Die Diagramme sind in Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 dargestellt.



Abbildung 4-19:Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nachEntwicklung mit Gradient 1 im AMD1- und AMD2-System

(Die Gradienten sind unter Abschnitt 3.3.7.5 aufgelistet)

Wie aus den Abbildungen 4-19 bis 4-21 ersichtlich, konnte in keinem der drei Beispiele der AMD1-Gradient 1:1 zu einem AMD2-Gradienten konvertiert werden. Interessanterweise erwies sich die Abweichung in allen drei Fällen nicht als linear und nicht als miteinander vergleichbar. Zur Ursachenforschung dieser Abweichung wurden verschiedene, im folgenden beschriebene Versuche durchgeführt.

Zuerst wurde der Zusammenhang zwischen den Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe und den Laufstrecken der Analyten untersucht. Dieses war notwendig, da bei der Weiterentwicklung des AMD1-Gerätes zum AMD2-Gerät die Art der Fließmittellaufstreckenmessung verändert wurde und für die ersten Versuche die Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe des AMD2-Gradienten festgelegt wurden (die ersten Fokussierungsschritte 16 mm, danach immer + 3 mm).



Abbildung 4-20:Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nachEntwicklung mit Gradient 2 im AMD1- und AMD2-System

(Die Gradienten sind unter Abschnitt 3.3.7.5 aufgelistet)



Abbildung 4-21: Vergleich der Laufstrecken ausgesuchter Analyten nach Entwicklung mit Gradient 3 im AMD1- und AMD2-System (Trockenzeit 1 min)

(Die Gradienten sind unter Abschnitt 3.3.7.5 aufgelistet)

Es wurde zuerst überprüft, ob sich die Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe der AMD2-Entwicklung von den Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe der AMD1-Entwicklung unterschieden. Dazu wurde auf eine 0,2-mm-Platte mit einem Maßband mit Bleistift gezeichnet, die danach mit dem AMD1-Gradienten 1 entwickelt wurde. Beim Entwicklungsende des Einzellaufs (zum Zeitpunkt des Absaugens des Fließmittels) wurde die Fließmittellaufstrecke abgelesen. Die Fließmittellaufstrecken der Einzelläufe des AMD1- und AMD2-Gerätes differierten um 1 bis 2 mm. Deshalb wurden danach die Laufstrecken des AMD2-Gradienten den Laufstrecken des AMD1-Gradienten angeglichen und die Pestizide mit den drei optimierten Gradienten entwickelt.

Die Änderung der einzelnen Fließmittellaufstrecken ergab keine signifikante Änderung der Laufstrecken der Analyten. So wurden die ursprünglichen Fließmittellaufstrecken beibehalten, um den Gradienten gleichmäßig zu fahren.

Einfluss der Trocknung auf die chromatographische Entwicklung

Im folgenden Abschnitt wird dargelegt, welchen Einfluss die Trocknungszeit zwischen den Entwicklungsschritten auf die Laufstrecken der Analyten hatte.

Ausgewählte Pestizide (je 500 ng) wurden nach Auftragung auf eine HPTLC-Platte mit dem AMD-Gradienten 2b im AMD1- und AMD2-Gerät entwickelt. Dabei wurden als Trocknungszeiten eine, drei, fünf und zehn Minuten gewählt; die Versuche wurden dreimal wiederholt. Die einzelnen Laufstrecken und ihre Standardabweichungen, die mit dem AMD2-Gerät^a erhalten wurden, sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Die Pestizide wiesen bei einer Trocknung von einer Minute die höchsten Laufstrecken auf und die Peakbasisbreiten waren größer als bei einer längeren Trocknung (nicht dargestellt). Die größeren Peakbreiten lassen sich durch eine ungenügende Trocknung der Platten zwischen den Läufen erkläre, wodurch die Analyten im Kieselgel diffundieren konnten, obwohl die mobile Phase ihren Ort noch nicht erreicht hatte. Die Unterschiede der Laufstrecken bei einer Trocknungsdauer von drei bis zehn Minuten waren kleiner als der Fehler der Laufstrecken und damit nicht signifikant.

Bei Vergleich der Laufstrecken der Pestizide, die im AMD1- und AMD2-Gerät erhalten wurden, konnte festgestellt werden, das die Laufstrecken nur vergleichbar waren, wenn die Trocknungszeiten der AMD1- und des AMD2-Gradienten mindestens 5 min betrugen. Beispielsweise wurde eine sehr gute Korrelation von 0,9994 der Laufstrecken beim Gradien-

^a Auf eine Darstellung der Ergebnisse, die mit dem AMD1-Gerät erhalten wurden, wurde verzichtet, da die graphische Darstellung ihrer Ergebnisse ein ähnliches Bild wie in Abbildung 4-22 liefern.

ten 2b bei fünfminütiger Trocknungszeit gefunden. Allerdings sind die Laufstrecken im AMD2-System kleiner als im AMD1-System (Die Steigung der Ausgleichsgeraden betrug 0,94, d. h., die Laufstrecken im AMD2-System betrugen im Mittel 94 % der Laufstrecken im AMD1-System). Die Ergebnisse der dreiminütigen und der fünfminütigen Trocknung sind in Abbildung 4-23 vergleichend dargestellt. Die Laufstrecken der untersuchten Pestizide unterscheiden sich im Gradienten 2b im Gegensatz zum AMD1-System im AMD2-System bei einer drei-, fünf- und zehnminütigen Trocknung nicht stark. Deshalb erscheinen die beiden Ausgleichsgeraden in Abbildung 4-23 parallel verschoben.

Alle Platten wurden nach Remissionsmessung mittels UV-Scanner auch unter einer UV-Lampe bei 254 nm betrachtet. Die Peakbasisbreite der Pestizide war bei einer Trocknungsdauer von zehn Minuten am schmalsten und damit die Trennung der Analyten am besten. Die sehr lange Trocknungszeit erwies sich jedoch nicht als praktikabel, da sie die Analysenzeit extrem verlängert (von 5 h 39 min bei Trocknungsdauer von drei Minuten auf 12 h 41 min bei Trocknungsdauer von zehn Minuten).

In Abwägung der Vor- und Nachteile bei einer dreiminütigen und einer fünfminütigen Trocknung zwischen den Einzelschritten (bessere Vergleichbarkeit der Laufstrecken bei längerer Entwicklungszeit) wurde die Trocknungszeit zwischen den Einzelschritten auf drei Minuten für alle Gradienten festgelegt.



Abbildung 4-22: Einfluss der Trockenzeiten auf die Laufstrecken in der AMD2 (Gradient 2b)



Abbildung 4-23: Vergleich der AMD1- und AMD2-Gradienten 2b bei einer Trockenzeit von drei und fünf Minuten

Einfluss der Konditionierung auf die chromatographische Entwicklung

Da sich die Laufstrecken der untersuchten Pestizide im Gradienten 2 im Gegensatz zum AMD1-System im AMD2-System bei einer drei-, fünf- und zehnminütigen Trocknung nicht stark unterschieden, wird angenommen, dass die Trocknung in der AMD2-Kammer effektiver als die Trocknung der Platten in der AMD1-Kammer war.

Diese Vermutung sollte durch einen letzten Versuch bestätigt werden. Es wurde untersucht, ob durch den unterschiedlichen Aufbau der AMD-Kammern, die Trocknung und damit die Konditionierung der Platte im nächsten Lauf unterschiedlich verläuft.

Wie in Abschnitt 2.5.1.3 erläutert, werden die Fließmittelkomponenten zwischen den Läufen nicht vollständig von der Platte entfernt. Je polarer die Fließmittelkomponente, umso schlechter wird sie entfernt. Daraus folgt, das je stärker die Platte getrocknet wurde, umso polarer ist sie für den nächsten Lauf konditioniert.

Mit einer zusätzlichen Konditionierung der Platte mit Lösungsmitteln, die im Fließmittelgemisch enthalten waren, sollten unterschiedliche Konditionierungsverhältnisse simuliert werden. Die Versuche wurden mit HPTLC-Platten durchgeführt, auf die ausgewählte Pestizide (je 500 ng) aufgetragen wurden. Die Entwicklung erfolgte mit dem Gradienten 3b im AMD1- und AMD2-System. Die Trocknungszeit zwischen den Läufen betrug drei Minuten. Dabei wurden die Konditionierungsbedingungen geändert.

- Im ersten Fall wurde die Konditionierungsflasche nicht befüllt (Konditionierung 1 polar).
- Im zweiten Fall wurde ein Lösungsmittelgemisch gewählt, das der Fließmittelzusammensetzung in den Läufen 10 bis 14 entspricht. Die Konditionierungsflasche wurde mit einem tert-Butylmethylether / n-Hexan-Gemisch (35 + 75) befüllt (Konditionierung 2 – mittel).
- Im dritten Versuch wurde n-Hexan in die Konditionierungsflasche gefüllt (Konditionierung 3 – unpolar).

Zur Auswertung der Versuchsreihen wurden wieder die Laufstrecken der einzelnen Analyten in beiden AMD-Systemen in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und verglichen. Abbildung 4-24 zeigt die Gegenüberstellung der jeweils ermittelten Laufstrecken, die mit dem Gradienten 3b im AMD1- und AMD2-System bei den unterschiedlichen Konditionierungen der Platten zwischen den einzelnen Läufen erhalten wurden. Unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges wurde die Geradengleichung und ihre Korrelation mittels Excel berechnet und dargestellt. Außerdem wurde unter der Annahme eines polynomen Zusammenhanges für die Konditionierung 2 und 3 die polynomische Trendlinie eingezeichnet.



Abbildung 4-24: Unterschiedliche Konditionierung für den Gradienten 3b

(Trocknungszeit 3 min)

Durch die postulierte bessere Trocknung im AMD2-System wurde erwartet, dass sich auf den Platten im AMD2-System geringere Fließmittelreste befanden als auf den Platten im AMD1-System. Zudem wurde angenommen, dass der verbliebene Fließmittelanteil auf den Platten im AMD2-System polarer war als auf den Platten im AMD1-System, weil die unpolaren Fließmittelbestandteile in höherem Maß entfernt wurden.

Für die Konditionierung 1 (ursprüngliche Konditionierung) konnten zwei interessante Beobachtungen gemacht werden. Zum einen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Laufstrecken der Pestizide (Korrelation der Ausgleichsgerade = 0,994) gefunden. Außerdem waren die ermittelten Laufstrecken der Pestizide waren im AMD2-Gradienten kleiner als die Laufstrecken im AMD1-System (Steigung der Ausgleichsgeraden = 0,83).

Wurden die Platten zusätzlich konditioniert, ergab sich für die Konditionierung 2 und 3 folgendes Bild:

- Die Ausgleichsgeraden wurden steiler (Steigung bei Konditionierung 1 = 0,83, Steigung bei Konditionierung 2 = 1,03, Steigung bei Konditionierung 3 = 1,30), und die Korrelation der Ausgleichsgeraden verschlechterte sich, wenn die Konditionierung unpolarer wurde.
- Bei der Konditionierung 2 war die resultierende Konditionierung der HPTLC-Platte im AMD2-System bis Lauf 9 etwas unpolarer, da das Fließmittel tert-Butylmethylether im AMD2-System besser entfernt wurde. Von Lauf 10 bis 14 wurde die Platte im AMD2-System etwas polarer konditioniert, da hier die Fließmittel- und die Konditionier-Zusammensetzung gleich waren, aber die Fließmittelkomponente n-Hexan besser entfernt wurde. Ab Lauf 15 wurde die Fließmittelzusammensetzung der einzelnen Läufe langsam immer unpolarer, deshalb war auch hier die resultierende Konditionierung im AMD2-System etwas polarer als im AMD1-System.

Dadurch sind die mit dem AMD2-System ermittelten Laufstecken im Bereich von 20 bis 40 mm kleiner und im oberen Bereich größer als die mit dem AMD1-System ermittelten Laufstrecken. Die Analyten mit ermittelten Laufstrecken bis 20 mm haben im AMD2-System kleinere Laufstrecken als bei einem linearen Verlauf. Wenn die Laufstrecken der Analyten kleiner 20 mm oder größer 60 mm sind, nähern sich die Laufstrecken der linearen Ausgleichsgerade wieder an, da die Analyten hier besonders stark oder schwach retardiert werden.

 Bei der Konditionierung 3 wirkt sich die bessere Trocknung der Platten im AMD2-System noch stärker aus. Während der ersten Läufe wurde die HPTLC-Platte im Vergleich zum AMD1-System im AMD2-System etwas polarer und in späteren Läufen wesentlich unpolarer konditioniert. Da in den letzten Läufen das Fließmittel immer unpolarer wird, wird der Unterschied der resultierenden Konditionierung immer geringer. Dadurch gleichen sich die ermittelten Laufstrecken der beiden Systeme wieder an.

Damit ist die Ausgleichsgerade noch gekrümmter.

Die beschriebenen Versuche belegen, das die Trocknung der HPTLC-PLatten im AMD2-System besser als im AMD1-System verläuft. Die Abweichungen der Laufstrecken in beiden Systemen konnten aufgrund dieser unterschiedlichen Trocknung als "Fehler" der AMD-Geräte erklärt werden. Die Umsetzung der Gradienten ist somit richtig. Eine Verbesserung der Anpassung der Laufstrecken im AMD2-System an die Laufstrecken im AMD1-System war deshalb nicht möglich.

Die Konvertierung der AMD1-Gradienten zu AMD2-Gradienten durch das vorgestellte mathematische System war praktikabel. Wesentliche Unterschiede der Laufstrecken traten nur auf, wenn die Trocknungszeiten im schon bestehenden AMD1-Gradienten ungünstig (zu niedrig) gewählt waren.

4.3.1.6 Vergleich des AMD1- mit dem AMD2-System

Der essentielle Unterschied der beiden AMD-Systeme wurde bereits im vorigen Abschnitt 4.3.1.5 dargelegt. Im folgenden sollen nun die weiteren Unterschiede zwischen den beiden AMD-Systemen besprochen werden.

Handhabung

Die Handhabung des AMD2-Geräts ist anwenderfreundlicher, da die Programmierung im Personal Computer unter Windows geschieht. Beim AMD1-Gerät war die Programmierung mit dem AMD-Steuergerät komplizierter und benötigte mehr Zeit.

Laufstreckengenauigkeit

Die Präzision der chromatographischen Entwicklung (Laufstreckengenauigkeit) in beiden System wurde durch Auswertung der in Abschnitt 4.3.1.5 erhaltenen Daten berechnet. Dazu wurden die Laufstrecken von ausgewählten Pestiziden betrachtet, die auf je drei HPTLC-Platten aufgetragen worden waren, die mit dem Gradienten 2b sowohl im AMD1- als auch im AMD2-System entwickelt wurden. Die Trocknungsdauer zwischen den einzelnen Läufen betrug fünf Minuten. Die erhaltenen Laufstrecken wurden in Abbildung 4-25 ihren Standardabweichungen zugeordnet. Die Standardabweichungen erwiesen sich in beiden Systemen abhängig von der Laufstrecke des Analyten. Bei der Entwicklung im AMD2-System waren sie jedoch kleiner als bei der Entwicklung im AMD1-System.



Abbildung 4-25: Vergleich AMD1 und AMD2 Laufstreckengenauigkeit, n=3

Die physiko-chemischen Eigenschaften sind vermutlich die Ursache für die unterschiedlich hohen Standardabweichungen innerhalb eines Systems und die Gleichförmigkeit der Trocknung innerhalb des jeweiligen AMD-Systems für die unterschiedlich hohen Standardabweichungen für die einzelnen Pestizide in den beiden Systemen. Die effektivere Trocknung im AMD2-System führt somit zu geringer schwankenden Laufstrecken.

Lösungsmittelverbrauch

Als weiterer wesentlicher Unterschied des AMD2-Systems gegenüber dem AMD1-System gilt der geringere Lösungsmittelverbrauch. Er ist beispielhaft für die drei AMD-Gradienten 1 bis 3 in Tabelle 4-19 dargestellt. Durch Benutzung des AMD2-Gerätes konnte der Lösungsmittelverbrauch auf ein Drittel gesenkt werden.

Gradient	gesamt (18 I	Bahnen)	je Bahn	
	AMD1	AMD2	AMD1	AMD2
Gradient 1	600	187	33	10
Gradient 2 b	600	177	33	10
Gradient 3 b	600	189	33	11

 Tabelle 4-19:
 Lösungsmittelverbrauch Vergleich AMD 1 und AMD2

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das AMD2-Gerät eine echte Weiterentwicklung des AMD-Systems darstellt. Die Handhabung und die Präzision der chromatographischen Entwicklung hat sich verbessert, außerdem konnte der Lösungsmittelverbrauch pro Analyse auf ein Drittel gesenkt werden.

Randeffekte bei der dünnschichtchromatographischer Entwicklung im AMD2-System

Bei der Entwicklung des AMD2-Gradienten 1 für die basischen Fungizide mit seinem sehr flachen und linearen Verlauf wurde festgestellt, dass die Laufstrecken der basischen Fungizide vom Auftrageort abhängig sind. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei dem für die Benzoylharnstoffe entwickelten AMD-Gradienten 6 beobachtet; nicht dagegen bei den (Universal-) Gradienten 2 und 3 (DIN-Gradient und Burger-Konfirmationsgradient) mit ihrem steilen und nichtlinearen Verlauf.

In Abbildung 4-26 sind die Laufstrecken ausgesuchter Pestizide graphisch dargestellt, die durch Entwicklung mit dem AMD2-Gradienten 2b (a) und dem AMD2-Gradienten 1 (b) erhalten wurden. Um den gesamten Laufstreckenbereich abzudecken, wurden Pestizide ausgesucht, die Laufstrecken zwischen 10 und 80 mm aufwiesen.

Die Laufstrecken der Pestizide, die durch Entwicklung mit einem Universalgradienten erhalten wurden, streuten um einen Mittelwert, ihre Standardabweichung ist kleiner 0,4 mm. Die Laufstrecken der Pestizide, die durch Entwicklung mit dem AMD2-Gradienten 1 erhalten wurden, waren in der Mitte der HPTLC-Platte geringer als am Rand der Platte. Dieser sogenannte "Wäscheleinen-Effekt" wurde im polaren und unpolaren Bereich der Platte nicht beobachtet, lediglich im mittelpolaren Bereich zwischen 40 und 60 mm war er ausgeprägt. In diesem Bereich betrug die Standardabweichung der Laufstrecken zwischen 0,4 und 1,4 mm. Der beschriebene Einfluss des Auftrageortes auf die Laufstrecken der Pestizide war bei der Entwicklung mit dem AMD2-Gradienten 1 reproduzierbar und hatte Auswirkung auf die Bestimmung der untersuchten Substanzen. Durch abwechselnde Auftragung von einem Standard und zwei Proben nach der sogenannten Data-Pair-Methode gelang es jedoch die Pestizide sicher zuzuordnen. Dabei muss der zur Probe nächstliegende Standard zum Laufstreckenvergleich herangezogen werden.

	_		-		_	_		_	-	_	_	_	_	-	_
			Ξ		-			-	-	-	2	Ξ	Ξ	Ξ	Ξ
	Ē		Ē	= =	Ē	=		Ξ	Ē	=	=	=	=	=	= =
::::	=	: :	Ξ	: :	=	: :	: :	=	=	=	:	=	Ξ	Ξ	:

Abbildung 4-26: Laufstreckengenauigkeit des AMD2-Gradienten 2b (a) und des AMD2-Gradienten 1 (b)

Der Wäscheleinen-Effekt ist beispielhaft in Abbildung 4-73 dargestellt.

Der bei sehr flachen AMD2-Gradienten auftretende "Wäscheleine-Effekt" wurde im weiteren genauer untersucht. Als Ursache wurde der Fließmittel-Austausch der Schichtränder mit der Kammeratmosphäre vermutet, da das AMD-System beim verwendeten AMD-Gradienten ohne Kammersättigung durch Konditionierung vor jedem Schritt betrieben wurde.

Ob ein Gerätefehler vorlag, konnte nicht geklärt werden, da zu den Untersuchungen lediglich ein AMD2-Gerät zur Verfügung stand.

Es sollte die Frage geklärt werden, ob ein Fehler im betreffenden AMD2-Gradienten vorlag. Dazu wurden einzelne Methodenparameter verändert. Die Untersuchungen erfolgten mit dem AMD2-Gradienten 1 und wurden mit 0,1-mm- und 0,2-mm-Platten durchgeführt, auf die die Standardmischungen Mix A, Mix B und Mix C aufgetragen wurden. Es wurde mit einer Konditionierung der HPTLC-Platten mit Stickstoff, mit 0,1 %iger Ameisensäure ohne Konditionierung gearbeitet. Die Trockenzeit wurde bei diesen Versuchen auf 4,0 min erhöht und die Zahl der Fokussierungsschritte von vier auf zehn. Weder auf den 0,1-mm- noch auf den 0,2-mm-Platten konnte eine Verminderung des "Wäscheleinen-Effektes" beobachtet werden.

Außerdem wurde überprüft, ob eine mögliche Berührung der HPTLC-Platte mit dem Führungsrahmen des AMD2-Gerätes einen Einfluss auf die Laufstrecken der Pestizide hat. Dazu wurde die Platte halbiert und so eingesetzt, dass sie keine Berührung mit dem Rahmen hatte, sodass keine Kapillarkräfte wirken konnten. Eine Verminderung des "Wäscheleinen-Effektes" konnte auch dadurch nicht erreicht werden.

Abschließend wurde untersucht, ob der "Wäscheleinen-Effekt" Auswirkungen auf die Präzision der Methode hat. Dazu wurden die relativen Standardabweichungen der Peakhöhen und Peakflächen der untersuchten Standards (Mix A, Mix B und Mix C) berechnet. Es ließ sich jedoch keine Abhängigkeit der relativen Standardabweichungen der Peakhöhe und Peakfläche von der Laufstrecke des Analyten feststellen.

Trotz des "Wäscheleinen-Effektes" konnten somit die beiden betreffenden AMD2-Gradienten gut zur Rückstandsanalytik von Pestiziden in pflanzlichen Lebensmitteln eingesetzt werden, wenn der Laufstreckenunterschied bei der Identifizierung berücksichtigt wurde.

4.3.2 Bioautographische Detektion von Fungiziden mit Pilzen auf HPTLC-Platten

Ein Problem bei der Bestimmung von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln nach HPTLC / AMD bestand darin, die getrennten Substanzen auf der entwickelten HPTLC-Platte empfindlich und spezifisch zu detektieren. Deshalb sollte zur Detektion von Fungiziden ein biologisches Detektionsverfahren, die Bioautographie mit Pilzen, getestet werden, bei der die Substanzen durch ihre Hemmwirkung nachgewiesen werden.

Die praktischen Arbeiten zur bioautographischen Detektion von Fungiziden mit Pilzen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Kristina Thron [143] durchgeführt. Dabei wurden erstmalig erfolgreich Kieselgel-HPTLC-Platten eingesetzt, während frühere Arbeiten auf diesem Gebiet stets mit handelsüblichen Kieselgel-TLC-Platten durchgeführt wurden.

Nach einer Trennung der Fungizide mittels HPTLC / AMD oder einfacher aufsteigender HPTLC wurden die getrockneten HPTLC-Platten in eine Pilzsporen-Suspension getaucht. Anschließend wurden auf den Platten durch Lagerung in einem Brutschrank bei 28 °C und hoher Luftfeuchtigkeit über 48 Stunden ein "Pilzrasen" gezüchtet. Da Fungizide das Wachstum des Pilzmyzels hemmen, werden sie als Hemmhöfe sichtbar. Zur qualitativen Auswertung werden die Laufstrecken und Hemmhofformen herangezogen. Die Vorgehensweise wurde in Abschnitt 3.3.3 ausführlich beschrieben.

Auswahl des bioautographischen Verfahrens

Zur Ermittlung eines geeigneten bioautographischen Verfahrens wurden die Immersions-Bioautographie und die direkte Bioautographie untersucht.

Die Anzucht der Pilzsporen erfolgte bei beiden Verfahren gleich. Die zur Bioautographie verwendeten Pilze wurden auf Kartoffel-Glucose-Agar gehalten. Die Pilzsporen wurden mit einer 0,01 %igen Triton X-Lösung abgeschwemmt. Die Sporen-Suspension wurde mit entionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von 10⁷ Sporen/ml verdünnt.

Bei der <u>Immersions-Bioautographie</u> wurden die Konidien in einem warmen, flüssigen Agar-Medium suspendiert, das auf die HPTLC-Platte aufgebracht wurde.

Bei der <u>direkten Bioautographie</u> wurde eine Glucose-Mineralsalz-Lösung als Nährmedium verwendet, mit dem die Konidien auf die HPTLC-Platte aufgebracht wurden. Von der Sporen-Suspension wurden 2 ml zu 60 ml einer Mineralsalz-Glucose-Nährlösung gegeben. Die entwickelten HPTLC-Platten wurden in diese Suspension getaucht.

Nach der jeweiligen Aufbringung der Pilzsporen wurde die Platte in feuchter Atmosphäre bei 28 °C 48 Stunden bebrütet.

Aus der Auswertung verschiedener Platten, bei denen Pilzsporen unterschiedlicher Pilze aufgebracht waren, konnte gefolgert werden, dass die direkte Bioautographie gegenüber der Immersions-Bioautographie empfindlicher ist. Da hier der Pilz unmittelbar auf der HPTLC-Platte wächst und damit einen direkten Kontakt zu den dort getrennt vorliegenden fungiziden Substanzen hat. Die direkte Bioautographie war zudem leichter handzuhaben als die Immersions-Bioautographie. Die Handhabung des Agar-Mediums war sehr kompliziert, da das Agar-Medium bei der Aufbringung flüssig sein und danach auf der Platte schnell fest werden musste. Dabei durfte seine Temperatur nicht zu hoch sein, da sonst die Gefahr bestand, einen Teil der empfindlichen Pilzsporen abzutöten.

Bei der direkten Bioautographie erwies sich die Verwendung des Mineralsalz-Glucose-Mediums des niederländischen Gesundheitsministeriums [179] als geeignet; beim Medium nach Homans und Fuchs [180] war dagegen kein Pilzwuchs auf den Platten feststellbar.

Auswahl eines Schimmelpilzes

Gleichzeitig wurde ein geeigneter Pilz gesucht, der die Fungizide empfindlich mittels Bioautographie nachweisen kann. Dazu war es notwendig, einen Pilz zu finden, der gut abschwemmbare Konidien bildete und möglichst durch alle Fungizide im Wachstum gehemmt wird. Der Pilz sollte in der Haltung anspruchslos sein, auf HPTLC-Platten schnell wachsen, sporulieren und dabei auf der HPTLC-Platte einen gleichmäßigen, möglichst farbigen "Pilzrasen" bilden.

Es wurden neunzehn Pilze überprüft. Folgende Pilze wachsen und sporulieren auf HPTLC-Platten: Aspergillus oryzae, Penicillium crysogenum, P. lilanicum, P. roqueforti und Cladosporium herbarum. Die "Pilzrasen" von A. oryzae und C. herbarum haben ein sehr ungleichmäßiges Erscheinungsbild. Die Sporen von P. lilanicum und P. crysogenum sind nur schwach gefärbt, so dass der Kontrast von Hemmhof und Pizrasen nicht stark genug ist. P. roqueforti weist einen homogenen "Pilzrasen" auf, deren Sporen kräftig dunkelgrün gefärbt sind. Dieser Pilz war für die bioautographische Detektion der Fungizide am besten geeignet.

Beispielhaft für die direkte Bioautographie ist in Abbildung 4-27 der Nachweis von Carbendazim, Prochloraz und Prochloraz mit den Pilzen *Penicillium roqueforti*, *Cladosporium herbarum* und *Aspergillus oryzae* dargestellt.

Wie in Abbildung 4-27 gut zu sehen ist, war *Penicillium roqueforti* der geeignetste Pilz. Sein Wachstum wird von den überprüften Fungiziden sehr empfindlich gehemmt. Er bildet einen gleichmäßigen Pilzrasen, der nach der Sporulation dunkelgrün gefärbt ist. Die Hemmhöfe waren darin deutlich zu erkennen. Außerdem ließen sich seine Konidien mit einer Tensidlösung gut abschwemmen. Interessanterweise bildeten sich abhängig vom Fungizid unterschiedliche Hemmhofformen aus.



Abbildung 4-27:Vergleich von Penicillium roqueforti, Cladosporium herbarum und
Aspergillus oryzae (von links nach rechts) auf HPTLC-Platten

Platten ohne dünnschichtchromatographische Entwicklung, 0,5 bis 50 ng je Prochloraz (1), Imazalil (2), Carbendazim (3)

Hemmhofformen

Abbildung 4-28 zeigt die Formen der von den sechs Fungiziden Carbendazim, Thiabendazol, Imazalil, Prochloraz, Tebuconazol und Myclobutanil erzeugten Hemmhöfe.

Die von den Benzimidazol-Fungiziden Carbendazim und Thiabendazol erzeugten Hemmhöfe hatten eine ausgeprägte Tendenz zu einer runden Form. Sie wiesen einen klar vom "Pilzrasen" abgegrenzten Rand auf.

Die von den Imidazol-Fungiziden Imazalil und Prochloraz erzeugten Hemmhöfe nahmen jeweils die Form des Substanzspots an, war er strichförmig, so hatten sie eine ovale Form, war er punktförmig, so waren auch die Hemmhöfe rund. Es gab zwei Zonen. In der inneren Zone wurde das Wachstum des Pilzes vollständig gehemmt, in der äußeren Zone ist dagegen im Auflichtmikroskop Myzel zu erkennen. Die äußere Zone geht kontinuierlich in den "Pilzrasen" über. Ein klarer Rand wie bei den Benzimidazol-Fungiziden ist nicht zu erkennen. Die Wachstumshemmung durch die Triazol-Fungizide Tebuconazol und Myclobutanil war in den betrachteten Mengen-Bereichen nicht vollständig, was in den äußeren Zonen der von den Imidazol-Fungiziden hervorgerufenen Hemmhöfen zu erkennen ist. In diesen Hemmhöfen sind auch Myzelteile zu erkennen.

Die charakteristischen Hemmhofformen können neben den Laufstrecken zur Identifizierung der Fungizide herangezogen werden. So lässt sich durch Berücksichtigung der Hemmhofformen das in der HPTLC / AMD kritische Paar Carbendazim und Prochloraz unterscheiden.



Abbildung 4-28 Hemmhofformen der Benzimidazol-, Imidazol- und der Triazol-Fungizide von rechts nach links

Bestimmung der Nachweisgrenzen und des Arbeitsbereichs

Für zwölf Fungizide wurden die Nachweisgrenzen von ermittelt, die in Tabelle 4-20 aufgelistet sind. Sechs der untersuchten Fungizide hemmen das Wachstum des Pilzes empfindlich: Carbendazim, Thiabendazol, Imazalil, Prochloraz, Tebuconazol und Myclobutanil. Die anderen Fungizide hemmen das Wachstum der Schimmelpilze bis zu einer Fungizidmenge von 500 ng, bzw. 300 ng (Procymidon und Oxadixyl) nicht. Die Bioautographie stellt deshalb für diese Substanzen kein geeignetes Nachweisverfahren dar.

Interessanterweise wurden für Carbendazim, Thiabendazol, Imazalil, Prochloraz, Tebuconazol und Myclobutanil abhängig vom Basisfließmittel der dünnschichtchromatographischen Entwicklung unterschiedliche Nachweisgrenzen gefunden. Die Art der Entwicklung, isokratisch oder mittels AMD entwickelt, hatte keinen Einfluss auf die Detektionsgrenzen.

Die Nachweisgrenzen lagen in Systemen auf Ethylacetat-Basis für Carbendazim bei 0,5 ng und für Thiabendazol bei 5 ng und in Systemen auf Dichlormethan-Basis für beide Fungizide bei 10 ng; in Systemen auf Ethylacetat-Basis für Imazalil bei 1 ng, für Prochloraz bei 0,5 ng und für Myclobutanil bei 10 ng und in Systemen auf Dichlormethan-Basis für die drei zuletzt genannten Fungizide bei 5 ng. Lediglich für Tebuconazol lagen die Nachweisgrenzen in Endpunktbestimmung

beiden Fließmittelsystemen in gleicher Höhe. Vermutet wird, dass die Verteilung des jeweiligen Fungizids in der stationären Phase von der mobilen Phase abhängig ist. Ein Einfluss der unterschiedlichen pH-Werte der mobilen Phase konnte ausgeschlossen werden, da die Platten in ein gepuffertes System getaucht wurden.

Tabelle 4-20:Nachweisgrenzen (NG) der untersuchten Fungizide für die Detektion
mittels UV-Detektion, bei bioautographischer Detektion (BA) mit
Penicillium roqueforti und bei Luminizenz mit Leuchtbakterien
(LUMI)

Fungizid	NG der BA mit P. roqueforti in ng	NG der UV- Detektion in ng	UV-Haupt- und Nebenmaxima in nm	LUMI (Hemmung > 10 % in ng)
Carbendazim	0,5 / 10*	10	280 / 231 /200	< 10
Prochloraz	0,5 / 10*	20	207 / 288 / 373	10
Imazalil	1 / 5*	15	202 / 227	< 10
Tebuconazol	5 / 5*	30	200 / 220 / 254	10
Thiabendazol	5 / 10*	3	304 / 245 / 203	30
Myclobutanil	10 / 5*	30	200 / 225 / 254	30
Bitertanol	> 300	10	260 / 200	30
Oxadixyl	> 300	30	200 / 267	> 200
Procymidon	> 300	30	200 / 267	< 200
Triadimenol	> 300	40	200 / 223 / 274	100
ortho-Phenylphenol	> 500	25	203 / 288 / 373	
Triadimefon	> 500	30	200 / 223 / 273	30

* erster Wert nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung in Systemen auf Ethylacetat-Basis und zweiter Wert nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung in Systemen auf Dichlormethan-Basis ermittelt

Der Vergleich der durch UV-Detektion und Bioautographie erreichten Nachweisgrenzen (siehe Tabelle 4-20) zeigte die erhoffte Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für alle mittels Bioautographie empfindlich nachgewiesenen Fungizide außer für Thiabendazol; sie wurde um den Faktor drei bis vierzig erhöht. Eine Verbesserung der Nachweisgrenze für Thiabendazol war aufgrund dessen besonders empfindlichen Nachweises durch UV-Detektion (3 ng) besonders schwierig.

Die Größe und Intensität (bei den Triazol-Verbindungen) der Hemmhöfe war von der aufgetragenen Menge der Fungizide abhängig. Für eine Quantifizierung der Fungizide wurden verschiedene Möglichkeiten der Quantifizierung untersucht: die Detektion der Platten mit einem UV-Scanner, einem visuellen Vergleich von Proben- und Standardbahnen und dem Ausmessen der Hemmhöfe.

Erste Untersuchungen ergaben, dass der Arbeitsbereich der bioautographischen Detektion der Fungizide mit Pilzen noch kleiner als der Arbeitsbereich der UV-Detektion ist (siehe auch Abbildung 4-27, erste Platte). Deshalb müssen bei der bioautographischen Detektion mehrere Probenmengen aufgetragen werden, um die Analyten im jeweiligen Arbeitsbereich zu erfassen.

Für die Imidazol-Fungizide Imazalil und Prochloraz können lineare Eichkurven unter Verwendung des Durchmessers und des Logarithmus der Fungizid-Menge bis zu Fungizid-Mengen von 10 ng aufgestellt werden. Bei größeren Fungizid-Mengen sind die Kurven nicht linear.

Der UV-Scanner erwies sich nicht geeignet, da der "Plattenuntergrund", hier der Pilzrasen, nicht gleichmäßig genug war, so dass es zu einem starken Untergrundrauschen kam.

Der visuelle Vergleich von Proben- und Standardbahnen erwies sich als sehr geeignet. Es kann durch Auftragung verschiedener Probe-Mengen mit Hilfe der Detektionsgrenzen bzw. der Größe der Spots eine halbquantitative Abschätzung vorgenommen werden, mit der überprüft werden kann, in welchem Bereich die Fungizid-Menge liegt.

Voraussichtlich ist eine CCD-Kamera zur Quantifizierung der Fungizide ebenfalls wie bei der lumigraphischen Detektion mit Leuchtbakterien geeignet. Sie stand zum Zeitpunkt der bioautographischen Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Dünnschichtchromatographische Trennung der Fungizide

Zur Trennung der mit der bioautographischen Detektion untersuchten Fungizide wurden verschiedene dünnschichtchromatographische Trennsysteme eingesetzt; zwei verschiedene isokratische Trennsysteme(siehe Abschnitt 3.3.7.6) und die zwei AMD-Entwicklungssysteme AMD1-Gradient 1 und AMD1-Gradient 8 (siehe Abschnitt 3.3.7.5, Tabelle 3-2 und Tabelle 3-11). Die Trennsysteme basierten auf Dichlormethan und Ethylacetat. Die damit erzielten Laufstrecken für die Fungizide sind zur besseren Vergleichbarkeit als R_{f} -Werte in Tabelle 4-21 aufgelistet.

Mit den beiden isokratischen Trennsystemen konnte keine vollständige Trennung der Fungizide erreicht werden. Ihr Vorteil gegenüber den AMD-Systemen sind die kurzen Entwicklungszeiten von weniger als eine Stunde. Interessanterweise wurden mit diesen beiden Trennsystemen unterschiedliche Nachweisgrenzen für die Fungizide erzielt. Da die Fungizide in dem isokratischen Trennsystem auf Ethylacetatbasis empfindlicher nachgewiesen wurden, wurde ein AMD1-Gradient mit Ethylacetat als Basisfließmittel (AMD1-Gradient 8) entwickelt. Die Trennung der Analyten war etwas schlechter als bei Verwendung des AMD-Gradienten auf Dichlormethan-Basis.

Insgesamt führt die automatische Mehrfachentwicklung (AMD) zu besser fokussierten Substanzspots und hat eine etwas höhere Trennleistung als die isokratische Entwicklung. Die fokussierten Substanzspots sind bei der Bioautographie besonders wichtig, da beim Bebrüten der Platten mit Pilzsporen die Substanzen stark diffundieren und damit der resultierende Fleck wesentlich vergrößert wird. Die AMD nimmt gegenüber der isokratischen Entwicklung jedoch wesentlich mehr Zeit in Anspruch. Auch durch Entwicklung mit dem AMD1-Gradienten 1 wurden nicht alle sechs Fungizide vollständig getrennt, so z. B. Carbendazim und Prochloraz (Tabelle 4-21). Sie konnten aber durch ihre unterschiedlichen Hemmhofformen unterschieden werden.

Bei Verwendung des AMD-Gradienten auf Basis von Ethylacetat ließen sich Thiabendazol und Prochloraz nicht trennen. Diese beiden Fungizide konnten aber auch durch die unterschiedlichen Hemmhofformen unterschieden werden.

Eine vollständige Trennung aller untersuchten Fungizide wird erst mit der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD erreicht. (siehe Abschnitt 4.4.4).

Trennsystem	auf der Basi	s von Dichlormethan	auf Basis	s von Ethylacetat
Fungizid	R _f -Wert (isokratisch)	R _f -Wert (AMD1-Garadient 1)	R _f -Wert (isokratisch)	R _f -Wert (AMD1-Gradient 8)
Imazalil	0,53	0,27	0,47	0,50
Carbendazim	0,57	0,40	0,43	0,38
Thiabendazol	0,58	0,30	0,60	0,67
Tebuconazol	0,71	0,46	0,64	0,61
Prochloraz	0,82	0,42	0,64	0,66
Myclobutanil	0,84	0,50	0,65	0,47

Tabelle 4-21:Rr-Werte der Fungizide in den Trennsystemen auf der Basis von
Ethylacetat und Dichlormethan

Verbesserung der Nachweisgrenzen durch Anfärben des Pilzmyzels

Zur Verbesserung der Nachweisgrenzen wurde das Anfärben des Pilzmyzels mit den Farbstoffen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) und p-Iodonitrotetrazolium-chlorid (INT) (siehe Abschnitt 3.3.3.2) untersucht. Eine Empfindlichkeitssteigerung konnte jedoch nicht erreicht werden. Der Kontrast des gefärbten Myzels zu den Hemmhöfen war schwächer als der Kontrast des Pilzrasens zu den Hemmhöfen nach der Sporenbildung des *Penicillium roqueforti*.

Mit den Farbstoffen konnte aber eine geringe Zeitersparnis erzielt werden. Die Auswertung nach Anwendung von Farbstoffen kann nach 30 Stunden erfolgen, während die Sporenbildung erst nach 48 Stunden abgeschlossen ist.

Anwendung

Im folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst, die durchgeführt wurden, um heraus zufinden, ob die bioautographische Detektionsmethode auch bei der Rückstandsanalytik von Lebensmittelproben anwendbar ist. Dazu wurden verschiedene pflanzliche Lebensmittel untersucht.

Birnen-, Orangen-, Rucola- und Gurkenproben wurden nach der DFG-Multimethode S19 aufgearbeitet. Die aufgearbeiteten Proben wurden parallel mittels Dünnschichtchromatographie mit anschließender bioautographischer Detektion (TLC-BA) und GC / ECD / NPD untersucht. Die Ergebnisse der bioautographischen Detektion sind in Abbildung 4-29 und in Tabelle 4-22 dargestellt.



Abbildung 4-29: Bioautographische Detektion von Fungizidrückständen in Lebensmittelextrakten mit *Penicillium roqueforti*

Entwicklung der HPTLC-Platten mit dem AMD1-Gradient 8, a, b - Gurke, c bis f – Rucola I und II, g bis j – Birnen I und II, k bis l – Orangen I, jeweils zwei verschiedene Volumina aufgetragen In den Extrakten von Gurken-, Rucola-, Birnen- und Orangenproben konnten Carbendazim, Imazalil, Prochloraz und Thiabendazol identifiziert werden. Erfreulicherweise störten die sehr stark UV-aktiven Begleitstoffe der Orangenproben die bioautographische Detektion nicht (siehe auch Abschnitt 4.4.4).

Lediglich bei Rucolaproben wurde eine Beeinträchtigung der Detektion durch einen Matrix-Effekt beobachtet. Carbendazim konnte nicht vollständig von der aktiven Matrix abgetrennt werden. Beim Vergleich der beiden Rucolaproben (Rucola I - Bahn c / d und Rucola II e / f) konnte Carbendazim in Rucola I eindeutig nachgewiesen werden.

Ob die Matrix-Effekte tatsächlich auf fungizide Eigenschaften zurückzuführen sind, oder ob es sich lediglich um hydrophobe Effekte handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und sollte in weiterführenden Versuchen überprüft werden. Falls es sich um hydrophobe Effekte handelt, müssten Verfahren zum Aufbringen der Konidiensuspension gesucht werden, bei denen diese Effekte nicht auftreten.

Ein Vergleich der mittels TLC-BA und mittels GC / ECD / NPD ermittelten Gehalte an der Thiabendazol, Imazalil und Prochloraz in den untersuchten Proben war möglich, da sie gaschromatographierbar sind. In Tabelle 4-22 sind die Ergebnisse der Untersuchung aufgeführt.

Bei der dünnschichtchromatographischen Bestimmung mit bioautographischer Detektion (TLC-BA) wurden die Fungizide durch Laufstreckenvergleich und durch den Vergleich der Hemmhofformen identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Hemmhofgrößen einer Standardverdünnungsreihe und durch die Bestimmung der Probenextraktmenge, bei der das Fungizid nicht mehr nachweisbar war^a. In Tabelle 4-22 wurde deshalb ein Konzentrationsbereich das jeweilige Fungizid angegeben. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der thermostabilen Analyten (Carbendazim konnte gaschromatographisch nicht bestimmt werden) erfolgte die Quantifizierung der nachgewiesenen Pestizide durch externe Kalibrierung.

Meist stimmten die mit beiden Nachweismethoden erhaltenen Ergebnisse gut überein. Lediglich in einem Fall wurden erhebliche Differenzen beobachtet. Der in der Birnen-Probe II mittels TLC-Bioautographie ermittelte Konzentrationsbereich bewegte sich zwischen 0,05 und 0,1 mg/kg, während mittels GC / NPD / ECD eine Thiabendazol-Konzentration von 2 mg/kg in der Probe ermittelt wurde. Dieser Unterschied konnte nicht geklärt werden. Die

^a Die Probenextrakte wurden mehrfach, in unterschiedlichen Mengen auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des Fungizids (in ng) ergibt sich eine Konzentration (in mg/kg) die größer ist als die in der Probe enthaltende Fungizidkonzentration.

Werte der bioautographischen Detektion wurden mehrfach überprüft und konnten bestätigt werden. Eine mögliche Resistenzbildung oder eine mögliche Hemmung des Schimmelpilzwachstums durch Lebensmittelinhaltsstoffe wurde nicht als wahrscheinlich angesehen, da das beschriebene Phänomen lediglich bei einer der zwei parallel untersuchten Birnenproben beobachtet wurde. Bei der Birnenprobe (Birne I) stimmten die Werte mit 0,5 bis 0,8 mg/kg (TLC-BA) und 1 mg/kg (GC) sehr gut überein.

Probe	Fungizid	TLC-BA in mg/kg	GC / ECD / NPD in mg/kg	HM [*] in mg/kg	Matrixeffekte bei der TLC-BA
Gurke	Carbendazim	0,0008 bis 0,0013		0,5	-
	Imazalil	0,05 bis 0,1	0,03	0,2	
	Thiabendazol	0,013 bis 0,018	0,02	0,1	
Rucola I	Carbendazim	-	-	-	+
	Imazalil	0,003 bis 0,013	-	0,02	
	Thiabendazol	0,016 bis 0,023	-	0,1	
Rucola II	Imazalil	0,003 bis 0,013		0,02	+
	Prochloraz	0,002 bis 0,017		0,05	
Birnen I	Imazalil	0,1 bis 0,7	0,7	5	-
	Carbendazim	0,02 bis 0,05		2	
	Thiabendazol	0,5 bis 0,8	1	3	
Birnen II	Imazalil	0,02 bis 0,2	-	5	-
	Thiabendazol	0,05 bis 0,1	2	3	
Orangen I	Carbendazim	0,02 bis 0,05		5	-
	Prochloraz	0,05 bis 0,5	0,7	5	
Orangen II	keinen Hemmhof	-	-	-	-

Tabelle 4-22:Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittel-
extrakten mittels bioautographischer Detektion nach dünnschicht-
chromatographischer Trennung (TLC-BA) und GC / ECD / NPD

HM – zugelassene Höchstmenge

Durch die Screening-Analyse mittels GC wurden neben den mittels TLC-BA nachgewiesenen Fungiziden andere Substanzen gefunden: Captan, Chlorpyriphos-Methyl, Diazinon, Mercarbam, o-Phenylphenol, Oxadixyl, Procymidon und Pyrimethanil. Diese Substanzen störten die Analytik der in der TLC-BA nachweisbaren Fungizide nicht. Die beiden Fungizide Oxadixyl und Procymidon, die mittels GC in den Rucolaproben nachgewiesen wurden, waren bei der bioautographischen Detektion nicht nachweisbar.

Zusammenfassung

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass die Bioautographie mit Schimmelpilzen für die Detektion von Fungiziden auch auf HPTLC-Platten nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung geeignet ist. Dabei war die direkte Bioautographie gegenüber der Immersions-Bioautographie empfindlicher, da hier der Pilz unmittelbar auf der HPTLC-Platte wächst und damit direkten Kontakt zu den fungiziden Substanzen hat. Die direkte Bioautographie war zudem leichter handzuhaben als die Immersions-Bioautographie.

Nach Überprüfung von neunzehn Pilzen erwies sich *Penicillium roqueforti* als der geeignetste Pilz. Seine Konidien ließen sich mit einer Tensidlösung gut abschwemmen. Der Pilz wurde von den überprüften Fungiziden sehr empfindlich gehemmt. Er bildete einen gleichmäßigen Pilzrasen, der nach der Sporenbildung dunkelgrün gefärbt war. Die weißen Hemmhöfe waren darin deutlich zu erkennen. Interessanterweise wiesen die Fungizide je nach Substanzklasse charakteristische Hemmhofformen auf.

Von den zwölf untersuchten Fungiziden hemmten sechs Fungizide das Wachstum des Pilzes empfindlich: Carbendazim, Thiabendazol, Imazalil, Prochloraz, Tebuconazol und Myclobutanil. Ihre Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,5 und 10 ng.

Damit konnten alle sechs Fungizide mittels Bioautographie mit Pilzen mit Ausnahme von Thiabendazol empfindlicher als bei einer UV-Detektion nachgewiesen werden.

Für die Trennung der Substanzen wurden zwei verschiedene isokratische Trennsysteme und eine AMD-Entwicklung verwendet; mit keinem der Trennsysteme konnte eine vollständige Trennung der Fungizide erreicht werden.

Der Vorteil der isokratischen Entwicklung gegenüber der AMD lag in der wesentlich kürzeren Entwicklungszeit. Die automatische Mehrfachentwicklung führt zu besser fokussierten Substanzspots und hat eine etwas höhere Trennleistung als die isokratische Entwicklung. Das bei der AMD-Trennung kritische Paar Carbendazim und Prochloraz war lediglich durch seine unterschiedlichen Hemmhofformen zu unterscheiden.

Eine Anfärbung des Pilzmyzels vor der Sporenbildung führt nicht zu einer Verbesserung der Detektion aber zur Verkürzung der Arbeitszeit von 48 auf 30 Stunden.

Eine halbquantitative Bestimmung von Fungizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln durch Vergleich mit Standards war möglich. Die Detektion wurde lediglich bei Rucola-Proben durch Matrixbestandteile gestört. Die bioautographische Detektion der Lebensmittelproben wurde mit der ECD /NPD-Detektion nach gaschromatographischer Trennung verglichen. Es konnten außer in einem Fall vergleichbare Mengen der Fungizide nachgewiesen werden. Damit ist die Dünnschichtchromatographie mit bioautographischer Detektion mit Pilzen eine geeignete Methode, Fungizide in pflanzlichen Lebensmitteln nachzuweisen.

4.3.3 <u>Biologische Detektion von Pestiziden mit Leuchtbakterien auf HPTLC-</u> <u>Platten</u>

Im vorliegenden Kapitel wurde die Eignung der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien in Verbindung mit der HPTLC / AMD zur Bestimmung von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln untersucht. Von diesem biologischen Detektionsverfahren wurde eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität als bei der UV-Detektion erwartet. Die Detektion erfolgte ähnlich wie bei der Bioautographie mit Pilzen, die in Abschnitt 4.3.2 für Fungizide geprüft wurde, durch die Hemmwirkung bioaktiver (toxischer) Substanzen auf die Leuchtbakterien. Hierbei wird jedoch nicht das Wachstum der Leuchtbakterien gehemmt, sondern ihre Fähigkeit zur Lumineszenz beeinflusst.

Obwohl grundsätzlich jede Art von toxisch wirkenden Substanzen die Leuchtbakterien hemmen könnten, wurden für diese Untersuchungen Fungizide (Imazalil, Thiabendazol, Carbendazim, Bitertanol, Myclobutanil und Triadimefon) ausgewählt, um die Ergebnisse der UV-Detektion, der Bioautographie mit Pilzen und der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien nach dünnschichtchromatographischer Trennung vergleichen zu können.

Bei der Versuchsplanung musste berücksichtigt werden, dass die biologische Detektion der Pestizide mittels Leuchtbakterien durch Matrixbestandteile, die die Lumineszenz hemmen oder verstärken können, gestört werden könnte^a. Aus diesem Grund musste gegenüber der UV-Detektion die Nachweisempfindlichkeit der Pestizide entscheidend gesteigert werden, um ein günstigeres Verhältnis Matrix zu Analyt auf der HPTLC-Platte zu erreichen.

Um störende Einflüsse von Matrixbestandteilen ausschließen zu können, wurde zunächst mit Fungizidstandards gearbeitet. Sie wurden in unterschiedlichen Mengen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Die Platte wurde mit dem AMD2-Gradient 1 entwickelt und nach sorgfältiger Entfernung der Lösungsmittel wurden die Bakterien durch Tauchen der HPTLC-

^a Üblicherweise müssen zur Bestimmung von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln im ppm-Bereich die Matrixbestandteile von mindestens 50 mg Lebensmittelprobe auf die HPTLC-Platten aufgetragen werden (50 ng Pestizid/50 mg Lebensmittel). Nur durch Auftragung wesentlich weniger Lebensmittelprobe kann eine eventuelle Störung der Lebensmittelmatrix grundsätzlich ausgeschaltet werden.

Platte in eine Bakteriensuspension auf die Platte aufgetragen. Die von der überschüssigen Bakteriensuspension befreiten Platten wurden sofort in die Messkammer der CCD-Kamera überführt. Während der Inkubation wurden in Intervallen Aufnahmen von der Platte mit einer lichtempfindlichen CCD-Kamera gemacht (Abbildung 4-30). Durch die densitometrische Auswertung der Aufnahmen wurden toxisch wirksame Banden (Fraktionen) erkannt, da sie eine geringere Lumineszenz als der neutrale Hintergrund zeigten. Zur qualitativen Auswertung wurden die Laufstrecken und die Wirkungskinetik herangezogen. Die Analysenvorschrift der Detektion wurde in Abschnitt 3.3.4 ausführlich beschrieben.

Wie in Abbildung 4-30 gut zu sehen ist, zeigen Fungizide eine unterschiedliche Wirkung sowohl in der zeitlichen Entwicklung der Lumineszenzhemmung als auch nach einer festen Inkubationszeit.

Auf der oberen Platte in Abbildung 4-30 ist die nach dreißig Minuten erzielte Hemmwirkung zu sehen. Hier wird deutlich, dass z. B. Imazalil und Carbendazim eine starke Hemmwirkung auf die Leuchtbakterien haben. Myclobutanil und Thiabendazol bewirken dagegen eine schwache Hemmung. Auf den unteren Plattenausschnitten in Abbildung 4-30 ist die Hemmwirkung der Fungizide (je 90 ng) nach 1, 5, 10, 15, 20 und 25 min Inkubationszeit erkennbar. Alle untersuchten Fungizide außer Myclobutanil riefen bereits nach fünf Minuten eine deutliche Hemmwirkung hervor.

Durch Vergleich der Bahnen von Imazalil und Carbendazim zu unterschiedlichen Inkubationszeiten wird die unterschiedliche Hemmkinetik der Fungizide besonders deutlich. Imazalil hemmt die Luminizenz praktisch sofort, während Carbendazim erst nach fünf Minuten eine Hemmung bewirkt. Nach 30 Minuten wird die Lumineszenz durch beide Fungizide etwa gleich stark gehemmt.

Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Hemmkinetiken wurde in Abbildung 4-31 die Inkubationszeit gegen das Maß der Lumineszenzhemmung für die einzelnen Fungizide aufgetragen; die Auftragsmenge betrug 60 ng je Substanz. Dabei wurden nur Hemmwirkungen > 5% berücksichtigt. Als Bezugswerte zur Berechnung der Hemmwirkung wurden die Leerbahnen zwischen den Substanzbahnen herangezogen. Dadurch konnten unspezifische Wirkungen durch Plattenverunreinigungen weitestgehend korrigiert werden, so zum Beispiel bei Triadimefon, dessen Bande von einer Bande, die durch eine Plattenverunreinigung bedingt war, überlagert wurde (siehe Abbildung 4-30).



Abbildung 4-30: Dünnschichtchromatographische Trennung verschiedener Fungizide mittels HPTLC / AMD mit anschließender lumigraphischer Detektion

Aufnahme der Wirkungskinetik mit einer speziellen CCD-Kamera nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1-30 min), exemplarisch dargestellt an der Bande mit 90 ng Auftragsmenge.

Im weiteren wurden die für die verschiedenen Fungizide erhaltenen Ergebnisse der Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten (Lumigraphie) mit den Ergebnissen des in der Bakteriensuspension durchgeführten Leuchtbakterientests verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 4-32 dargestellt. Beim Leuchtbakterientest in Suspension handelt es sich um eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung, während bei der Lumigraphie die auf die HPTLC-Platte aufgetragene Stoffmenge die Bezugsgröße darstellt. Bei der Lumigraphie wurden Hemmwirkungen > 5% berücksichtigt. Im Leuchtbakterientest sind auch negative Hemmwirkungen berücksichtigt, d. h., die Lumineszenz wurde hier nicht gehemmt sondern verstärkt. Durch die unterschiedlichen Bezugsgrößen war ein direkter Vergleich der Ergebnisse der beiden Testmethoden nicht möglich. Es konnte keine einheitliche Transformation gefunden werden, die es erlaubt, die Ergebnisse der Lumigraphie auf den Leuchtbakterientest zu übertragen.



Abbildung 4-31: Entwicklung der Hemmkinetik unterschiedlicher Fungizide bei einer Auftragsmenge von 60 ng

Vorteilhaft bei der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten war:

- dass die untersuchten Proben in einem beliebigen Lösungsmittel gelöst werden können, so dass die Analyten nicht durch Ausfällen aus der Probe verloren gehen können,
- dass die biologisch aktiven Stoffe vor der Detektion dünnschichtchromatographisch getrennt werden können,
- dass das verwendete Fliessmittel nach der Trennung vollständig von der HPTLC-Platte entfernt werden kann und somit bei einer biologischen Detektion keine Störungen verursacht und
- dass sie gegenüber der Bioautographie mit Pilzen eine sehr schnelle biologische Detektionsmethode ist.

Die für die einzelnen Fungizide erhaltenen Nachweisgrenzen der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten sind in Tabelle 4-20 (siehe Abschnitt 4.3.2) angegeben. Es zeigte sich, dass die biologische Detektion mit Leuchtbakterien im Unterschied zur bioautographischen Detektion mit Pilzen keinen empfindlicheren Nachweis als die UV-Detektion ermöglicht.



Abbildung 4-32: Vergleich der Lumineszenzhemmungen durch unterschiedliche Fungizide im Leuchtbakterientest und der Lumigraphie nach dreißigminütiger Inkubationszeit

Auch ein spezifischerer Nachweis als durch UV-Detektion wurde nicht erwartet, weil die Lebensmittelmatrix ebenfalls einen Einfluss auf die Lumineszenz der Leuchtbakterien haben kann. Da die biologische Detektion mit Leuchtbakterien weder eine hohe Empfindlichkeit noch eine hohe Spezifität gegenüber den untersuchten Fungiziden zeigte, wurde dieses Detektionsverfahren als ungeeignet für den Nachweis von Fungizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln eingestuft.

Die vorliegende Arbeit konnte aber zeigen, dass eine Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten prinzipiell möglich ist. Wie bei der Bioautographie mit Pilzen wurden auch bei der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien erstmalig erfolgreich Kieselgel-HPTLC-Platten eingesetzt. Frühere Arbeiten wurden stets mit handelsüblichen Kieselgel-TLC-Platten durchgeführt. Bei beiden biologischen Detektionsmethoden erfolgte die Applikation der Pilzsporen bzw. Leuchtbakterien auf die HPTLC-Platte auf gleiche Weise. Zum einen erfolgte sie durch direkten Auftragung durch Tauchen der Platte in eine Suspension der Organismen und zum anderen durch Aufbringung von verschiedenen Hydrogelen, in denen die Keime immobilisiert vorlagen (Immersions-Bioautographie). Die Untersuchung mit in Hydrogelen immobilisierten Leuchtbakterien wurde hier nicht dargestellt, weil sich die Tauchmethode wie

auch bei der Bioautographie mit Pilzen als die geeignetere Applikationsmethode erwies. Für detailliertere Informationen wird auf Lothar Vigelahn [181] verwiesen, der die praktischen Arbeiten zur biologische Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 193 "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt hat.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen erwarten, dass die biologische Detektion mit Leuchtbakterien auf HPTLC-Platten eine geeignete Methode für die Analytik biologisch aktiver Naturstoffe darstellt (siehe auch Abschnitt 4.4.5).

4.3.4 Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD

4.3.4.1 Optimierung der Auftrageparameter der HPLC-Kopplung mit der HPTLC / AMD

Im folgenden Abschnitt wird die Optimierung der Parameter der HPLC-Kopplung mit der HPTLC / AMD sowohl für die Anwendung mit der RP-HPLC als auch mit der GPC-HPLC vorgestellt. Aus Arbeiten von Burger [18] waren lediglich der Durchmesser der RP-HPLC-Säule (2,1 mm) und die Flussrate von 40 µl/min bei einem Wasser / Methanol-Gradienten bekannt, so dass folgende Parameter optimiert werden mussten:

- die Flussraten der bei den verschiedenen Systemen RP- und GPC-HPLC eingesetzten Fließmittel,
- die Startverzögerung zwischen der UV-Detektion in der HPLC und der Auftragung auf die HPTLC-Platte und
- die Auftragefläche, d. h., Höhe und Breite der auf die HPTLC-Platte aufzutragenden Banden.

Bestimmung der optimalen Fließgeschwindigkeit

Zur Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD wurden zwei HPLC-Systeme eingesetzt. Für die RP-HPLC wurde eine Gradienten-HPLC mit zwei Spritzenkolbenpumpen verwendet, die in der Lage war, pulsationsfrei und reproduzierbar einen Gradienten mit Flussraten von 10 bis 1000 μ l/min zu erzeugen. Für die GPC-HPLC wurde eine isokratische HPLC mit einer Hochdruckpumpe eingesetzt, die in der Lage war, pulsationsfreie und reproduzierbare, isokratische Flussraten ab 10 bis 45000 μ l/min zu erzeugen.

Um eine Überladung der HPTLC-Platten zu verhindern und Banden von geeigneter Größe auf der HPTLC-Platte zu erhalten, mussten bei der Auftragung des HPLC-Eluats auf die HPTLC-Platten zwei limitierende Faktoren berücksichtigt werden:

- die von der Flüchtigkeit des Fließmittels abhängige Trocknungsgeschwindigkeit der auf die HPTLC-Platten aufgetragenen Banden,
- und die Flussrate der HPLC.

Zur Ermittlung der Flussrate mit der bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD problemlos gearbeitet kann, wurde die maximal mögliche Auftragedauer in Abhängigkeit von der Flussrate ermittelt.

Dazu wurde das Eluat der HPLC bei verschiedenen Flussraten jeweils so lange auf eine Fläche von 8 x 8 mm einer HPTLC-Platte (0,2 mm Schichtdicke) überführt bis das Eluat von der Platte nicht mehr verdampft und somit die Auftragefläche "geflutet" wurde. Für diese Untersuchungen wurde als Fließmittel ein Wasser / Methanol-Gemisch (50+50 / v+v) eingesetzt. Diese Eluatzusammensetzung wurde als Worst-Case gewählt, weil bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD die Eluatzusammensetzung der interessierenden Fraktionen immer einen geringeren Wasseranteil enthielten und dadurch das aufgetragene Eluat besser trocknete. So wurde z. B. Carbendazim in der HPLC-Fraktion von 17,5 bis 26,0 min bei 50 bis 65 % Methanol im Eluat und Bitertanol in der HPLC-Fraktion 44,3 bis 48,4 min bei 72 bis 84 % Methanol im Eluat chromatographiert. Bei diesen Versuchen wurde mit 8 x 8 mm eine größere Auftragefläche als im optimierten System verwendet, da die Auftragefläche erst in einem zweiten Schritt optimiert wurde.

Zusätzlich zur maximal möglichen Auftragedauer wurde die bei verschiedenen Flussraten resultierende Breite der Peaks ermittelt. Dazu wurden stellvertretend für alle Analyten die Peakbreiten von $100 \,\mu$ l^a Aceton, dass keine Wechselwirkung mit der Säule eingeht, bestimmt.

Die graphische Darstellung in Abbildung 4-33 zeigt die Ergebnisse der beschriebenen Versuche. Es wird deutlich, dass bei Flussraten von 30 und 40 μ l/min das Eluat länger bzw. bis zu 10 min auf die Platte aufgetragen werden kann. Die Peaks der Analyten sind aber mit 6 und 4 min sehr breit. Bei einer Flussrate von 50 μ l/min kann das Eluat von mindestens 4 min auf die Platte aufgetragen werden, wobei die Peaks mit 3,4 min schon sehr viel schmaler sind. Die Analysenzeit verkürzt sich dadurch gegenüber einer Flussrate von 40 μ l/min um 20 %.

Ab einer Flussrate von 65 μ l/min wäre es nicht mehr möglich einen Peak vollständig auf eine 8 x 8 mm große Fläche aufzutragen, da ab 2,4 min die Auftragefläche "geflutet" wird, der Peak aber 3,1 mm breit ist. Zusätzliche Versuche mit einer HPTLC-Platte von 0,1 mm Schichtdicke ergaben, dass auch bei einer dünneren Plattenschicht mit einer Flussrate von 50 μ l/min gearbeitet werden kann.

Für die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD wurde die maximal mögliche Auftragedauer für die beiden verwendeten Elutionsmittel auf die gleiche Weise wie zuvor beschrieben bestimmt. Dabei wurden Flussraten zwischen 50 bis 350 μ l/min untersucht.

Aufgrund der höheren Flüchtigkeit der organischen Lösungsmittel konnte ein Fluten der Auftragefläche bei keiner der untersuchten Flussraten beobachtet werden. Im Verlauf der praktischen Arbeiten zur Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD wurden bei einer Flussrate von 50 μ l/min Unterbefunde für die Analyten festgestellt. Als Ursache hierfür wurde die Verdampfung eines Teils des Eluats schon auf dem Weg vom Sprühkopf zur Platte angenommen. Dies konnte durch gute Wiederfindungsraten beim Arbeiten mit höheren Flussraten bestätigt werden. Ab einer Flussrate von 100 μ l/min hatte die Temperatur der Sprühkopfheizung, die sich nicht regulieren lässt, keine negativen Auswirkungen mehr auf die Wiederfindungsraten.

Zur Erhöhung der Analysenpräzision erwies sich die aufeinanderfolgende Auftragung durch Online-Kopplung von Standards und Proben als besonders vorteilhaft. Der Zeitaufwand vergrößert sich dadurch nicht wesentlich, da die Retentionszeiten in der GPC-HPLC relativ kurz sind.



Abbildung 4-33: Optimierung der Flussrate des Elutionsmittels bei einem Wasser / -Methanol-Gradient

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Flussraten mit denen bei der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD gearbeitet werden kann, durch das verwendete HPLC-Elutionsmittel limitiert sind. Bei wässerigen Elutionsmitteln, die in der RP-HPLC verwendet werden, erwies sich neben der von Burger vorgeschlagenen Flussrate von 40 μ l/min auch eine Flussrate von 50 μ l/min für die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD als geeignet. Bei leichter flüchtigen HPLC-Elutionsmitteln, wie sie bei der GPC-HPLC eingesetzt werden, sind höhere Flussraten von mindestens 100 μ l/min notwendig, um Verluste der Analyten durch vorzeitige Verdampfung zu vermeiden. Die aufeinanderfolgende Auftragung durch Online-Kopplung von Standards und Proben wird bei leichter flüchtigen Elutionsmitteln zur Erhöhung der Analysenpräzision empfohlen.

Bestimmung der Verzögerungszeit

Die Bestimmung der Verzögerungzeit, d. h., die Zeit die der Analyt vom UV-Detektor zum Sprühkopf benötigt, ist notwendig, da üblicherweise die Retentionszeiten der Analyten am UV-Detektor gemessen werden, die Zeiten der Eluatschnitte aber durch die Bewegung des Sprühkopfes gesteuert werden (siehe Abbildung 2-19). Da die Verzögerungzeit von der Kapillarlänge zwischen Detektor und Sprühkopf abhängig ist, muss sie bei jedem Wechsel dieser Kapillare neu bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Verzögerungszeit in der Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD musste die Totzeit zwischen Injektor und Detektor und die Gesamttotzeit zwischen Injektor und Sprühkopf bestimmt werden. Die ausführliche Vorschrift findet sich im Experimentellen Teil unter Abschnitt 3.3.7.4.

Optimierung der Auftragefläche

Zur Optimierung der Auftragefläche wurde eine 0,01 %ige Erythrosinlösung (in Methanol / Wasser (1+1) gelöst) verwendet. Diese Lösung wurde mittels Fließinjektionsanalyse (FIA), d. h. ohne HPLC-Säule, bei einer Flussrate von 50 µl/min auf HPTLC-Platten von 0,2 mm Schichtdicke mit unterschiedlichen Auftrageparametern aufgetragen. Als Schnittzeit wurde die maximal möglichen Schnittzeit 4 min gewählt. Die Platten wurden mit dem AMD2-Gerät entwickelt. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wurde ein sehr steiler AMD2-Gradient verwendet. Die Platten wurden zur Fokussierung der Banden in den im Schritten 1 bis 4 jeweils bis zu einer Höhe von 16 mm mit Methanol entwickelt. In den Schritten 5 bis 10 wurden die Platten mit einem linearen Gradienten von Methanol bis Dichlormethan

entwickelt, wobei die Laufhöhe von Schritt zu Schritt um ein Inkrement von 3 mm stieg. Danach wurden die Platten mit dem TLC-Scanner im Optimum des UV / VIS-Spektrums von Erythrosin bei 508 nm vermessen. Ausgewertet wurden die Breite und Höhe der entwickelten Bande und die Fläche des im Chromatogramm erhaltenen Peaks. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-34 und Abbildung 4-35 dargestellt.

Abbildung 4-34 verdeutlicht die Auswirkungen der unterschiedlichen Formen der Auftrageflächen auf die resultierenden Banden. Um die Effekte besser darstellen zu können, sind links verschiedene Ausschnitte einer entwickelten Platte ohne ausreichende Fokussierung (AMD-Gradient nur bis Schritt 8) und rechts verschiedene Ausschnitte einer entwickelten Platte mit ausreichender Fokussierung (AMD-Gradient bis Schritt 10) abgebildet. Auch nach der Entwicklung der Platte sind die resultierenden Auftrageflächen als Schatten sichtbar. Die theoretische Auftragefläche ist als Rechteck in jede resultierende Auftragefläche eingezeichnet. Gut zu erkennen ist, dass es während der Auftragung bei der Kopplung zu einer Minizirkular-Dünnschichtchromatographie, d. h., zu einer Aufkonzentrierung am Rand kommt. Aufgrund der hohen Polarität des Eluats bei der RP-HPLC kann diese Minizirkular-Dünnschichtchromatographie bei keiner der möglichen Flussraten (40 bis 50 µl/min) verhindert werden. Auch bei Auftragung von Proben oder Standards ohne Kopplung kann in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und der Auftragegeschwindigkeit eine Verbreiterung der Auftragebande beobachtet werden.

Im Unterschied zur normalen Probenauftragung ohne Kopplung mit der HPLC führt die bei der Online-Kopplung des HPLC-Eluats beobachtete Minizirkular-Dünnschichtchromatographie aber dazu, dass die Konzentration am Rand der Analysenbanden nach der AMD-Entwicklung größer als in der Mitte der Bande ist. Dies hat Auswirkungen auf die quantitative Bestimmung der Analyten, da der zur Verfügung stehende TLC-Scanner bei notwendiger Empfindlichkeit maximal nur sechs Millimeter breite Banden vermessen kann. Die übliche Vorgehensweise, lediglich 70 % der Bandenbreite zu vermessen, kann aufgrund des Konzentrationsprofils nicht angewendet werden. Damit muss eine Auftragefläche gefunden werden, deren Bandenbreite nach AMD-Entwicklung möglichst nicht mehr als sechs Millimeter beträgt.

Damit steht zur Vergrößerung der Auftragefläche nur noch die Höhe zur Verfügung, wodurch wiederum die Fokussierung der Auftragefläche zu einer schmalen Bande beeinflusst wird. Je höher die Auftragehöhe, um so mehr Fokussierungsschritte werden benötigt, um eine schmale Bande zu erhalten. Dadurch verringert sich die zur Verfügung stehende Laufstrecke zur
Trennung der Analyten. Zum Beispiel sind bei einer Auftragehöhe von z. B. 10 mm (8 bis 18 mm) schmale Banden erst bei einer Laufstrecke ab 25 mm zu erwarten.



Abbildung 4-34: Verschiedene Auftrageformen bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Linkes Bild:	ohne ausreichende Fokussierung,
Rechtes Bild:	mit ausreichender Fokussierung

In Abbildung 4-35 sind für jede untersuchte Auftragefläche jeweils die Mittelwerte und die relativen Standardabweichungen der Breite und Höhe der entwickelten Bande sowie die Fläche des im Chromatogramm enthaltenen Peaks nach AMD-Entwicklung dargestellt. Es wurde die Auftragebande gesucht, die zu einer möglichst großen Peakfläche (beste Empfindlichkeit) und einer möglichst kleinen Breite (beste Präzision) und Höhe (schnellste Fokussierung) der entwickelten Banden führt.

Die größten Peakflächen werden bei den Auftrageflächen $4 \ge 10 \text{ mm}$ und $8 \ge 12 \text{ mm}$ erzielt. Von diesen beiden Flächen weist die mit $4 \ge 10 \text{ mm}$ die geringere Breite und Höhe der entwickelten Bande auf. Die Auftragefläche von $4 \ge 10 \text{ mm}$ ist somit die optimale.

Die Optimierung der Auftragefläche für die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD war unproblematisch, da aufgrund der unpolaren Elutionsmittel keine Minizirkular-Dünnschichtchromatographie stattfindet. Wegen der schnellen Verdunstung des unpolaren Eluats der GPC-HPLC konnte die Auftragefläche gegenüber der RP-HPLC verringert werden.



Abbildung 4-35: Optimierung der Auftragefläche bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Als optimale Auftragefläche für die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD wurde die Auftragefläche von 4 x 6 mm gefunden. Damit ergibt sich eine zur Verfügung stehende Laufstrecke zur Trennung der Analyten bei der Online-Kopplung von etwa 21 mm bis zu maximal 64 mm (80 % der Laufstreckenfront von 80 mm)^a.

Als optimale Auftragefläche für die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD wurde die Auftragefläche von 4 x 10 mm gefunden, damit ergibt sich eine zur Verfügung stehende Laufstrecke zur Trennung der Analyten bei der Online-Kopplung von etwa 25 mm bis zu maximal 64 mm (80 % der Laufstreckenfront von 80 mm)^a.

^a Bei einer optimalen Trennung ergeben sich in der Dünnschichtchromatographie relative Laufstrecken von 0,2 bis 0,8.

4.3.4.2 Optimierung der RP-HPLC

Zur Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC/AMD sollten für die beiden bearbeiteten Trennprobleme (Benzoylharnstoffe und Iprodion / basische Fungizide) möglichst einfache Gradienten entwickelt werden. Mit diesen sollten die Analyten, die sich mittels HPTLC/AMD nicht ausreichend trennen ließen, soweit voneinander getrennt werden, dass sie in unterschiedlichen Fraktionen eluieren. Die vollständige Trennung der Analyten in den HPLC-Fraktionen sollte dann in der anschließend durchgeführten HPTLC/AMD erfolgen. Zusätzlich wurde natürlich die Abtrennung eines Teils der Matrixbestandteile erwartet.

Die Optimierung RP-HPLC erfolgte in mehreren Schritten:

- Auswahl der mobilen Phase
- Auswahl der RP-Säule
- Bestimmung des optimalen Einspritzvolumens
- Optimierung des Gradienten

Als mobile Phase sind für die RP-HPLC Methanol- und Acetonitril-Wasser-Gemische geeignet, deren pH-Werte durch Säure, Basen oder Puffer eingestellt werden können. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde auf eine pH-Einstellung verzichtet, weil sich die Retentionszeit von Carbendazim bei ersten Versuchen, den pH-Wert der mobilen Phase mit 0,1 %iger Ameisensäure einzustellen, als nicht reproduzierbar erwies.

Ein Methanol / Wasser-Gradient wurde als mobile Phase gewählt, weil Methanol eine geringere Toxizität als Acetonitril besitzt und seine nachteilige, höhere Viskosität bei den gewählten Endbedingungen keine negativen Auswirkungen hatte. Der Methanolgehalt des gewählten Gradienten (s. Abschnitt 3.3.7.2, Gradient 1) lag bis 5 min konstant bei 50 % stieg danach innerhalb von 60 min auf 100 %.

Es standen RP-Säulen mit 1 mm und 2,1 mm Innendurchmesser zur Verfügung. Die Flussrate von 50 μ l/min war für beide Säulen eigentlich zu gering. Denn als Faustregel gilt, dass die optimale Flussrate bei einer RP-Säule mit einer Teilchengröße von 5 μ m bei 3 mm/s liegt [192]. Eine RP-Säule mit 1 bzw. 2,1 mm Durchmesser müsste somit mit einer Flussrate von etwa 140 bzw. 640 μ l/min betrieben werden.

Bei einer Flussrate von 50 µl/min zeigte die Säule mit 0,1 mm Innendurchmesser gegenüber der mit 2,1 mm eine bessere chromatographische Trennung der Analyten mit einer besseren Peakform. Die Belastbarkeit der Säule war jedoch gering, weil die Säule durch Lebensmittelmatrixbestandteile relativ schnell verstopfte. Dadurch müsste die Säule nach jedem fünften bis zehnten Probelauf rückgespült werden. Eine Säule mit 1,0 mm Innendurchmesser war somit lediglich für Proben mit einem sehr geringen Anteil von Matrixbestandteilen für den Routine-Einsatz geeignet. Die 2,1-mm-Säule war dagegen für einen Routine-Betrieb robust genug. Eine mögliche Verstopfung der Säule durch Matrixbestandteile konnte durch Arbeiten mit einer ausreichend oft gewechselten Vorsäule aus dem gleichen RP-Material vorgebeugt werden.

Bei der Bestimmung des optimalen Injektionsvolumens mussten die Nachweisgrenze der HPTLC / AMD sowie die im Lebensmittelextrakt zu erwartenden Pestizidkonzentrationen berücksichtigt werden. Da die Nachweisgrenzen der HPTLC zwischen 10 und 30 ng für die einzelnen Pestizide liegen, müssen mindestens 50 ng je Analyt auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden. Dazu müssen bei Annahme eines kritischen Grenzwertes für Pestizide in Lebensmitteln von 0,01 mg/kg, der Aufarbeitung von 50 g Probe nach der DFG-Methode S19 (GPC-Faktor 2 => 250 ng in 25 g Probe) und einem endgültigen Extraktvolumen von 200 μ l 40 μ l des Extraktes in die HPLC injiziert werden. Zur Lösung des Lebensmittelextraktes wurde anstelle der üblicherweise eingesetzten mobilen Phase 100 %iges Methanol verwendet, damit die Analyten sicher in Lösung vorlagen.

Bei Anwendung der konventionellen Injektionstechnik, bei der die Dosierschleife partiell oder vollständig gefüllt wird, können mit 1 bis 5 μ l nur sehr kleine Volumina in die 2,1 mm-Säule injiziert werden. Zur Injektion von 40 μ l mussten somit spezielle Injektionsverfahren verwendet werden. Dabei wurde mit 100- μ l-Dosierschleifen und mit unterschiedlichen Injektionstechniken gearbeitet.

Um eine Aufkonzentrierung der Probe auf der Säule zu erreichen, wurde die Probe in Wasser eingeschlossen (eingeklammert) und so auf die Säule gebracht (partial bzw. complete bracketing injection techniques, siehe auch Abschnitt 2.5.3.2).

Zur Überprüfung, welche Technik am besten geeignet ist, große Volumina in eine 2,1-mm-Säule zu injizieren, wurden die beiden interessierenden Pestizidgruppen (Benzoylharnstoffe und basische Pestizide) in Methanol gelöst und mit vier verschiedenen Techniken in die HPLC eingespritzt. Es wurden die konventionelle Einspritztechnik mit partieller Füllung (10 bis 50 μ 1), mit vollständiger Füllung (100 μ 1), die partial bracketing injection technique (40 μ 1 Probe + 10 μ 1 Wasser) und die comlete bracketing injection technique (30 μ 1 Wasser + 40 μ 1 Probe + 30 μ 1 Wasser) verglichen. Die verwendete 100- μ 1-Dosierschleife wurde vor jeder Einspritzung (n=5) gründlich mit der mobilen Phase bzw. bei der comlete bracketing injection technique mit Wasser gespült. Nach Starten des Laufs wurde die Dosierschleife erst nach etwa 4,5 min in die Ladeposition (Load) zurück gestellt^a, um eine vollständige Überführung der Probe auf die Säule sicherzustellen.

Die konventionelle Einspritztechnik mit partieller und vollständiger Füllung erwies sich zur Probenaufgabe bis zu einem Volumen von 100 µl als geeignet. Es musste jedoch bei der Bestimmung der Schnittzeiten berücksichtigt werden, dass die resultierenden Peaks ab einem aufgegebenen Probevolumen von etwa 20 µl stark verbreitert sind. Mit den beiden speziellen Injektionstechniken konnte diese starke Verbreiterung der Peaks verhindert werden. Die sogenannte complete bracketing injection technique war am besten geeignet, große Volumina in eine 2,1-mm-Säule zu injizieren.

Die Handhabung der beiden speziellen Injektionstechniken erwies sich als kompliziert, da auf eine Spritze erst ein exaktes Volumen der Probe und danach Wasser aufgezogen werden musste. Für eine einfachere Handhabung wurde die complete bracketing injection technique abgeändert. Die Dosierschleife wurde für die Injektion mit 1 ml Wasser gespült (Spritze 1) und danach mit bis zu 50 μ l methanolische Probe (Spritze 2) befüllt. Damit war das Konzentrationsprofil des Methanols während des HPLC-Laufs am Anfang der Säule folgendermaßen:

- Totvolumen (Dosierschleife bis Säule) mobile Phase = 50 % Methanol,
- mindestens 50 μ l Wasser = 0 % Methanol (Spritze 1),
- maximal 50 µl Methanol = 100 % Methanol (Probe Spritze 2),
- 150 μl mobile Phase = 50 % Methanol (250 μl/5 min 100 μl, da 100 μl in der Dosierschleife verbleiben),
- danach steigt der Methanolgehalt 55 min bis zu 100 % Methanol.

Diese Vorgehensweise war aufgrund ihrer einfachen Handhabung sehr reproduzierbar und die resultierenden Peakbreiten waren auch bei großen Probenvolumina wie bei der complete bracketing injection technique ausreichend klein.

Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die Benzoylharnstoffe und Iprodion

Für die Benzoylharnstoffe und Iprodion konnte der einfache Methanol / Wasser-Gradient (s. Abschnitt 3.3.7.2) HPLC-Gradient 1, dessen Methanolgehalt bis 5 min konstant bei 50 % Methanol lag und danach innerhalb von 60 min auf 100 % stieg, beibehalten werden.

^a 4,5 min x 50 μl/min = 225 μl. Die Dosierschleife wird zur Überführung der Probe auf die Säule 2,25 mal mit der mobilen Phase gespült. Um die Zusammensetzung der mobilen Phase auf der Säule reproduzierbar zu halten, sollte in den ersten 5 min des Laufs die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant bleiben.

Versuche mit dotierten Lebensmittelproben ergaben jedoch, dass die Benzoylharnstoffe besser mit dem HPLC-Gradienten 3 von der Lebensmittelmatrix abgetrennt werden. Der Methanolgehalt des Gradienten 3 lag bis 5 min bei 50 %, stieg danach innerhalb von 30 min auf 100 % und wurde dann bis 60 min konstant gehalten.

Nach Bestimmung des Elutionsverhaltens der Pestizide durch Vermessung der Pestizidstandards in der HPLC / UV wurden für die Zielanalyten Schnitt-Tabellen erstellt, mit deren Hilfe die Pestizide gezielt aus dem HPLC-Eluat fraktioniert wurden. Im Verlauf der praktischen Arbeiten wurde beobachtet, dass sich das Elutionsverhalten der Pestizide durch Beanspruchung der Säulen durch die Probenmatrix ändern kann, sodass das Elutionsverhalten der Pestizide routinemäßig überprüft werden muss. Aus diesem Grund muss eine einmal bestimmte Schnitt-Tabelle gegebenenfalls den veränderten Retentionszeiten angepasst werden.

In Abbildung 4-36 und Abbildung 4-56 sind Chromatogramme eines Gemisches von je 0,01 mg/ml der Benzoylharnstoffe und von 0,01 mg/ml Iprodion abgebildet. Die Trennung der Benzoylharnstoffe war nicht vollständig. Flufenoxuron und Teflubenzuron ließen sich unter den verschiedenen gewählten Bedingungen nicht mit einer RP-C18-Säule (auch nicht isokratisch) trennen.

Zur vollständigen Trennung der Substanzen wurden zwei Fraktionen des HPLC-Eluats auf zwei Bahnen einer HPTLC-Platte aufgetragen (32 - 38 - 44 min). Diflubenzuron, Triflumuron und Hexaflumuron waren in der Fraktion 1 und Chlorfluazuron, Flufenoxuron und Teflubenzuron in Fraktion 2.

Die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD führte bei der Bestimmung von je 200 ng der Benzoylharnstoffe und Iprodion zu sehr zufriedenstellenden Wiederfindungsraten von 96 bis 105 % mit einer relativen Standardabweichungen von 1,0 bis 4,5 %. Damit erwies sich die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD als ein geeignetes Analysenverfahren zur Bestimmung von Benzoylharnstoff- und des Iprodionrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln.



Abbildung 4-36: RP-HPLC-Chromatogramm einer Benzoylharnstoffstandard-

mischung

100 ng abs. je Standard (Pestizide in Mix 17 und Mix 18 = Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe), HPLC-Säule 2, HPLC-Gradient 3, λ = 260 nm, geschnitten bei 32 min, 38 und 44 min

- 1* flüchtige Verunreinigung der Benzoylharnstoffe,
- 1 Diflubenzuron,
- 2 Triflumuron,
- 3 Hexaflumuron,
- 4 + 5 Flufenoxuron und Teflubenzuron,
- 6 Chlorfluazuron,

Entwicklung eines RP-HPLC-Gradienten für die basischen Pestizide

Zur Trennung der basischen Pestizide war der einfache Methanol / Wasser-Gradient (siehe Abschnitt 3.3.7.2, HPLC-Gradient 1), dessen Methanolgehalt bis 5 min konstant bei 50 % lag und danach innerhalb von 60 min auf 100 % stieg, nicht geeignet. Tebuconazol und Bitertanol trennten sich nicht. Um eine ausreichende Trennung der Analyten zu erzielen musste der Gradient von 20 bis 32 min isokratisch geführt werden. Danach konnte er steiler werden, so dass der Methanolgehalt bereits nach 48 min 100 % Methanol betrug. Zur schnelleren Reinigung der Säule von den Matrixbestandteilen wurde die Flussrate in der Zeit von 56 bis 65 min von 50 auf 200 μ l erhöht. Außerdem wurde die Zusammensetzung des Gradienten ab 63 min auf 50 % Methanol erniedrigt. So konnte die Säule auch für den nächsten Lauf equilibriert werden.

In Abbildung 4-37 zeigt das Chromatogramm einer Standardmischung der Mixe A, B und C, (alle basischen Pestizide), den Gradientenverlauf der mobilen Phase sowie die interessierenden Fraktionen.





20 ng abs. je Standard (Mixe A, B und C = Standardmixe für die Bestimmung der basischen Fungizide), $\lambda = 230$ nm, HPLC-Gradient 2, geschnitten bei 17,5 min, 26,0 min, 40,0 min, 4,3,0 min, 48,4 min und 54,0 minFraktion 1:Carbendazim, OxadixylFraktion 2:Triadimenol, Myclobutanil, TriadimefonFraktion 3:TebuconazolFraktion 4:BitertanolFraktion 5:Prochloraz, Procymidon

Die Trennung der basischen Pestizide war nicht vollständig. Zur vollständigen Trennung der Substanzen wurden fünf Fraktionen des HPLC-Eluats auf fünf Bahnen einer HPTLC-Platte aufgetragen (17,5 - 26,0 - 40,0 - 44,3 - 48,4 min). In der Fraktion 1 waren Carbendazim und Oxadixyl, in Fraktion 2 Triadimenol, Myclobutanil und Triadimefon, in Fraktion 3 Tebuconazol, in Fraktion 4 Bitertanol und in Fraktion 5 Prochloraz und Procymidon. Damit eluierten alle bei der TLC-Trennung kritischen Paare in verschiedenen Fraktionen der HPLC (siehe auch Abbildung 4-69).

Die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD führte bei der Bestimmung von je 50 ng der basischen Pestizide zu zufriedenstellenden Wiederfindungsraten von 83 bis 112 % mit einer relativen Standardabweichungen von 0,9 bis 6,0 %. Damit erwies sich die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD als ein geeignetes Analysenverfahren zur Bestimmung von basischen Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln.

4.3.4.3 Optimierung der GPC-HPLC

Während die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD zuerst 1990 von Burger beschrieben wurde [18], wurde die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD erstmalig in dieser Arbeit untersucht. Bei dieser Art der Fraktionierung der Probe erfolgt die Trennung der Substanzen nach Molekülgröße an einer lipophilen GPC-Säule.

Die Anwendung der Online-Kopplung der GPC-HPLC ist für die Rückstandsanalyse von Pestiziden interessant, die wie die Benzoylharnstoffe nach der S19-Methode (nach der Extraktion eine präparative GPC) aufgearbeitet und anschließend ohne Minikieselgel-Fraktionierung mittels HPTLC / AMD bestimmt werden können.

Das Verhalten der untersuchten Pestizide in der analytischen GPC wurde bereits in Abschnitt 4.1.2.1 besprochen. Es zeigte sich, dass die analytische GPC nicht für alle untersuchten Pestizide, aber für die Benzoylharnstoffe und Iprodion als Clean-up-Schritt eingesetzt werden kann, weil diese Substanzen keine unreproduzierbaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen.

In den Abschnitten 4.4.2 und 4.4.3 wurde gezeigt, dass Benzoylharnstoff-Rückstände ab einer Rückstandskonzentration von 0,5 mg/kg mittels HPTLC / AMD ohne zusätzliches Clean-up wie der Online-Kopplung der RP-HPTLC mit der HPTLC / AMD bestimmt werden können. Für Iprodion war dies erst ab 10 mg/kg möglich. Da Lufenuron aufgrund seines unterschied-lichen dünnschichtchromatographischen Verhaltens nicht gemeinsam mit den anderen Benzoylharnstoffen untersucht werden konnte (die Laufstrecke von Lufenuron ist im Fokussierungsbereich der HPLC-Fraktion, siehe Abschnitt 4.3.1.2), wurde die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD lediglich für die Benzoylharnstoffen Diflubenzuron, Teflubenzuron, Triflumuron, Hexaflumuron, Flufenoxuron und Chlorfluazuron untersucht.

Zur erfolgreichen Trennung der Benzoylharnstoffe mittels Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD, müssen in der HPTLC / AMD kritische Paare in getrennte Fraktionen von der GPC-HPLC eluieren.

Da bislang in der Analytik von Pestiziden keine Erfahrungen mit der analytischen GPC vorlagen, weil diese üblicherweise zur Proteinanalytik und zur Polymeranalytik eingesetzt wird, wurde zunächst die drei zur Verfügung stehenden GPC-Säulen (eine 50-Å- und zwei 100 Å-Säulen) auf ihre Eignung zur Trennung der Pestizide untersucht.

Dabei wurde der Einfluss der folgenden Parameter auf die Trennung der Pestizide betrachtet:

- die Säulenart (50 und 100 Å)
- die mobile Phase (Tetrahydrofuran oder Ethylacetat / Cyclohexan)
- die Flussrate und
- die Temperatur.

Neben den Pestiziden wurden die in Tabelle 4-23 mit ihrer Molmasse aufgelisteten Standards ein Polystyrolgemisch 3250/580/162, Gallussäureester, Phthalate und p-Hydroxybenzoesäureester untersucht. Sie bilden homologe Reihen und eignen sich deshalb besonders als Standards zur Bestimmung von Molmassen (= Kalibrierstandards).

Die in Tabelle 4-23 aufgeführten Standards wurden in der jeweils verwendeten mobilen Phase in einer Konzentration von 1 bis 10 mg/ml gelöst. Davon wurden jeweils 5 μ l in die GPC injiziert.

Standard	Molmasse
Polystyrolgemisch 3250/580/162	3250/2450/1700/980/684/580/476/372/268/162
Gallussäure-Dodecylester	338
Gallussäure-Octylester	282
Gallussäure-Isobutylester	226
Gallussäure-Methylester	184
Bis(2-ethylhexyl)-Phthalat	390
Di-n-octyl-Phthalat	390
Butylbenzyl-Phthalat	298
Dibutyl-Phthalat	278
Diethyl-Phthalat	222
p-Hydroxybenzoesäure-Propylester	180
p-Hydroxybenzoesäure-Ethylester	166
p-Hydroxybenzoesäure-Methylester	152
p-Hydroxybenzoesäure	138

Tabelle 4-23:Mit der GPC untersuchte Standards

Zunächst wurde die Trennleistung der Säulen mit beiden möglichen mobilen Phasen untersucht. In Abbildung 4-38 sind zur besseren Übersichtlichkeit lediglich die Ergebnisse

mit der mobilen Phase Tetrahydrofuran dargestellt. Sie zeigt die Abhängigkeit der relativen Retentionsvolumina^a der verschiedenen Kalibrierstandards von ihren Molekülgrößen.

Erwartungsgemäß verhält sich jede Standardgruppe unterschiedlich. Die Polystyrole und die p-Hydroxybenzoesäureester zeigen eine lineare Abhängigkeit. Die Gallussäureester zeigen bei Tetrahydrofuran als mobiler Phase ebenfalls eine lineare Abhängigkeit, nicht aber bei einer Ethylacetat / Cyclohexan-Mischung (1+1) als mobiler Phase (siehe Abbildung 4-39). Die Phthalate verhalten sich umgekehrt, sie zeigen lediglich bei einer Ethylacetat / Cyclohexan-Mischung (1+1) als mobiler Phase eine lineare Abhängigkeit. Das Butylbenzyl-Phthalat verhält sich nicht wie die anderen Phthalate, da es nicht zur homologen Reihe der Dialkyl-Phthalate gehört.

Die beiden GPC-Säulen trennen erwartungsgemäß Substanzen mit einer Größe von 100 bis 500 Dalton. Die 50- Å-Säule zeigt eine etwas bessere Trennung im unteren Bereich.



Abbildung 4-38: Optimierung der GPC-Parameter: Vergleich 100 und 50 Å-Säulen, mobile Phase Tetrahydrofuran, 350 μl/min

relatives Retentionsvolumen = Erklärung siehe Abschnitt 4.1.2.1

Anschließend wurde die Abhängigkeit der Trennleistung von der Flussrate untersucht. Dazu wurden alle Kalibrierstandards bei Flussraten von 50, 200 und 350 µl/min untersucht.

^a Wie bereits in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, wurde ein sogenanntes relatives Retentionsvolumen (rel. Vr) definiert, um eventuelle Schwankungen der Flussrate auf das Retentionsvolumen einer Substanz berücksichtigen zu können. Das relative Retentionsvolumen ist hierbei die Differenz der Retentionsvolumina von Aceton und dem untersuchten Analyten.

Stellvertretend für alle Versuchsansätze sind die Ergebnisse für die Polystyrole und die Gallussäuren mit Ethylacetat / Cyclohexan als mobile Phase in Abbildung 4-39 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Flussrate die Trennung nicht beeinflusst und somit entsprechend den Anforderungen der Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD variiert werden kann.



Abbildung 4-39: Optimierung der GPC-Parameter: verschiedene Flussraten in µl/min, mobile Phase Ethylacetat / Cyclohexan, 50 Å-Säule

Abschließend wurde der Einfluss der Temperatur auf die Trennung der Polystyrole in der GPC bei 10, 20, 35 und 40 °C untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-40 dargestellt. Bei höheren Temperaturen eluierten die Analyten erwartungsgemäß später (Brownsche Bewegung). Bei Temperaturen von 10 bis 35 °C hat die Temperatur aber keinen Einfluss auf die Trennleistung der Säule, erst ab 40 °C zeigt die GPC-Säule eine verringerte Trennleistung.

Aus diesen grundsätzlichen Versuchen wurde geschlossen, dass die Parameter, Säulenart (50 und 100 Å), mobile Phase (Tetrahydrofuran oder Ethylacetat / Cyclohexan) und Temperatur die Trennung der Pestizide beeinflussen; der Parameter Flussrate dagegen beeinflusst die Trennung der Pestizide im Bereich von 50 bis 350 ml/min nicht.

Aus diesem Grund wurde das Verhalten der sechs Benzoylharnstoffe auf der 50- und der 100-Å-Säule mit beiden zur Verfügung stehenden mobilen Phasen untersucht. Dabei wurden die Säule einzeln und hintereinander geschaltet verwendet. Somit standen vier verschiedene stationäre Phasen zur Verfügung (50 Å, 100 Å, 50+100 Å und 100+100 Å). Die Temperatur wurde bei diesen Versuchen auf konstant 25 °C gehalten, um Schwankungen der Retentionszeit zu vermeiden.



Abbildung 4-40: Optimierung der GPC-Parameter: bei verschiedenen Temperaturen und 50 µl/min Ethylacetat/Cyclohexan, Polystyrole

Die für die einzelnen Benzoylharnstoffe in den verschiedenen GPC-Systemen erhaltenen relativen Retentionsvolumina sind in Abbildung 4-41 als Balkendiagramme dargestellt. Außerdem zeigt die Abbildung die Laufstrecken der Benzoylharnstoffe in der HPTLC / AMD, die mit dem AMD2-Gradienten 7 erhalten wurden, in Ellipsenform. Chlorfluazuron, das mit 541 g/mol die größte Molmasse besitzt, eluierte als erster Analyt, Diflubenzuron mit dem geringsten Molekulargewicht (311 g/mol) als letzter.

Um in der HPTLC / AMD kritische Paare in zwei, getrennten Fraktionen von der GPC auf die HPTLC schneiden zu können, musste ein GPC-System gefunden werden, mit dem die ersten drei Analyten - Chlorfluazuron, Flufenoxuron und Hexaflumuron - in der ersten Fraktion eluiert werden konnten. Dies gelang am besten durch Hintereinanderschaltung von zwei 100-Å-Säulen mit Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch (1+1) als mobiler Phase. Hierbei ergab sich ein Retentionsunterschied von 0,4 ml zwischen Triflumuron und Hexaflumuron. Die beiden Pestizide sind grundliniengetrennt, sodass hier eine Fraktionierung erfolgen konnte.

Die Benzoylharnstoffe beider Fraktionen konnten in der anschließenden HPTLC / AMD mit dem AMD2-Gradienten 7 gut getrennt werden. Die Analyten der 1. Fraktion – Flufenoxuron,

Chlorfluazuron und Hexaflumuron – besaßen Laufstrecken von 34 mm, 37 mm und 44 mm; die Analyten der 2. Fraktion - Diflubenzuron, Teflubenzuron und Triflumuron – besaßen Laufstrecken von 32 mm, 39 mm und 46 mm.



Abbildung 4-41: Optimierung der GPC-HPTLC / AMD-Kopplung

Eine ausreichende Trennung der Benzoylharnstoffe lieferte ebenfalls das GPC-System mit einer 100-Å-Säule und Ethylacetat/Cyclohexan-Gemischs (1+1) als mobiler Phase. In Abbildung 4-42 ist ein GPC-HPLC-Chromatogramm einer Benzoylharnstoffstandardmischung mit den Schnittzeiten der Fraktionierung dargestellt. Bei Verwendung einer 100-Å-Säule betrug der Retentionsunterschied zwischen Triflumuron und Hexaflumuron lediglich 0,22 ml. Die beiden Pestizide waren deshalb nicht grundliniengetrennt. Es musste somit besonders sorgfältig auf die Einhaltung der Parameter – Temperatur und Flussrate – geachtet werden, damit es nicht zu einer Retentionszeitverschiebung kam.

Die beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die GPC-HPLC sich ebenso wie die RP-HPLC als zweites Trennprinzip zur Online-Kopplung mit der HPTLC / AMD eignet. Dabei erfolgt die Trennung der Analyten nach Molekülgröße an einer lipophilen GPC-Säule. Durch die GPC mit einer einzelnen oder zwei hintereinandergeschalteten 100-Å-Säulen mit Ethylacetat / Cyclohexan (1+1) als mobiler Phase konnten in der HPTLC / AMD kritische Paare der Benzoylharnstoffe erfolgreich in zwei Fraktionen werden.



Abbildung 4-42: GPC-HPLC-Chromatogramm einer Benzoylharnstoffstandard-

mischung und Iprodion

100 ng abs. je Standard (Iprodion und Pestizide in Mix 17 und Mix 18 = Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe + 1 % Aceton), HPLC: 100-Å–Säule, 200 µl/min Ethylacetat /Cyclohexan, $\lambda = 260$ nm, geschnitten bei 15,72 min, 17,44 und 20,77 min (siehe Abbildung 4-67)

- a Hexaflumuron, Flufenoxuron und Chlorfluazuron,
- b Teflubenzuron, Triflumuron,
- c-Difluben zuron, I prodion
- d-Aceton

4.3.5 <u>Direkte Gaschromatographie</u>

4.3.5.1 GC / ECD / NPD

Im folgenden wird die Eignung der Gaschromatographie zur Bestimmung der thermolabilen, mittelpolaren Gruppe der Benzoylharnstoffe, des Iprodions und der Gruppe der basischen Pestizide insbesondere Thiabendazol und Carbendazim untersucht. Da diese Verbindungsklassen alle Stickstoff und/oder elektrophile Gruppen (ECD) enthalten, die sich mit den hochempfindlichen Detektoren NPD bzw. ECD nachweisen lassen, wurden zunächst diese Detektoren zur Bestimmung der Analyten eingesetzt.

Für die Versuche wurden Standards mit einer Konzentration von $100 \mu g/ml$ in Toluol hergestellt. Davon wurde je ein Aliquot, das 100 ng des Analyten enthielt (1 µl), mittels GC / ECD / NPD auf einer HP-5 Kapillarsäule (25 x 0,20 mm i. d. x 0,33 µm Filmdicke) vermessen. Die sehr hohe Konzentration der Analyten wurde gewählt, um eventuelle Zersetzungsprodukte der thermolabilen Analyten mit sehr kleinem Response gut detektieren zu können. Für die Untersuchung wurde ein Temperaturprogramm gewählt, das sich zur Multianalyse von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln als geeignet erwiesen hat^a.

Zur Überprüfung des GC-Systems wurde ein Standard-Mix (sogenannter Einstellmix) mit einer Konzentration von je 1 μ g/ml Aldrin, Captan und Chlorthion gaschromatographiert. Captan gilt als ein sehr empfindliches Pestizid, das nur detektiert werden kann, wenn der Injektor nicht zu stark verschmutzt ist. Aldrin diente zur Überprüfung und Vergleichbarkeit der Retentionszeiten. Bei der Bestimmung der relativen Retentionszeiten der Analyten wurde seine Retentionszeit auf 25,00 min festgelegt. Chlorthion lässt sich sowohl mittels ECD als auch NPD detektieren, so dass durch das Verhältnis der Detektorsignale vom ECD- zum NPD-Signal die Empfindlichkeit des NPD ermittelt werden kann.

Tabelle 4-24 fasst die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchung zusammen; die Analyten sind aufgelistet und jeder Analyt ist mit seinen Zersetzungsprodukten in jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

^a Das gewählte Temperaturprogramm wurde im Arbeitskreis Stan, Institut für Lebensmittelchemie der TU-Berlin, zur routinemäßigen Kontrolle von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln nach der Multimethode S19 verwendet.

Substanz	t _r in min	Peakfläche in $\%^{**}$	ECD/NPD	Bemerkung
Aldrin [*]	24,87	100	+/-	
Captan [*]	27,30	100	+/+	
Chlorthion [*]	25,97	100	+/+	
Chlorfluazuron I	10,78	4	+/+	Ar ₁ CO-Amin ^{****}
Chlorfluazuron II	24,96	58	+/+	
Chlorfluazuron III	28,84	100	+/+	
Chlorfluazuron IV	34,04	11	+/+	
Diflubenzuron I	6,31	21	+/+	
Diflubenzuron II	7,02		-/+	Hauptpeak NPD
Diflubenzuron III	10,73	100	+/+	Hauptpeak ECD, Ar ₁ CO- Amin ^{*****}
Flufenoxuron I	10,75	6	+/+	Ar ₁ CO-Amin ^{****}
Flufenoxuron II	20,04	22	+/+	
Flufenoxuron III	21,04	100	+/+	
Hexaflumuron I	10,26	28	+/+	
Hexaflumuron II	10,71	1	+/+	Ar ₁ CO-Amin ^{****}
Hexaflumuron III	14,90	100	+/+	
Hexaflumuron IV	23,13	8	-/+	
Iprodion I	31,00		-/+	sehr breit
Iprodion II	33,34	100	+/+	sehr breit
Iprodion III	34,40	26	+/+	
Lufenuron I	10,05	$1 \text{ und } 100^{***}$	+/+	Zerfall nicht reproduzierbar
Lufenuron II	12,09	3 und 76*	+/-	
Lufenuron III	39,40	$100 \text{ und } 1^{***}$	+/+	
Lufenuron IV	45,83	1 und 0^{***}	+/-	
Teflubenzuron I	7,56		+/+	noch drei kleinere Peaks
Teflubenzuron II	9,52	100	+/+	
Teflubenzuron III	10,79	7	+/+	Ar ₁ CO-Amin ^{****}
Triflumuron I	6,85	1	+/+	
Triflumuron II	11,40	100	+/(+)	
Bitertanol I	37,81	17	+/+	
Bitertanol II	39,18	6	+/-	
Bitertanol III	40,19	100	+/+	

Tabelle 4-24:Retentionszeiten tr der untersuchten Standardsubstanzen

Substanz	t_r in min	Peakfläche in $\%^{**}$	ECD/NPD	Bemerkung
Bitertanol IV	40,59	30	+/+	
Bitertanol V	43,87	3	+/-	
Carbendazim			-/-	gaschromatographisch nicht nachweisbar
Imazalil I	29,18	100	+/+	tailt
Imazalil II	30,19	10	+/+	
Myclobutanil	29,78	100	+/+	
Oxadixyl I	8,67	4	+/+	tailt
Oxadixyl II	31,28	100	+/+	
Oxadixyl III	34,73	2	+/-	
Prochloraz I	28,96	14	+/+	
Prochloraz II	41,76	100	+/+	tailt
Procymidon	27,71	100	+/+	
Tebuconazol	33,19	100	+/+	
Thiabendazol	27,51	100	+/+	tailt stark
Triadimefon I	25,63	100	+/+	
Triadimefon II	34,15	1	+/-	
Triadimenol I	25,58	24	+/+	
Triadimenol II	27,53	100	+/+	
Triadimenol III	27,83	35	+/+	
Triadimenol IV	29,23	0,6	+/-	

* abweichende Menge 1 ng abs. sonst 100 ng abs.

** bezogen auf den Hauptpeak im ECD = 100 %

*** Ergebnisse zweier Messungen von aufeinanderfolgenden Sequenzen

***** Zuordnung durch die GC / MS

Zur Überprüfung des GC-Systems wurden in der Messreihe der Einstellmix und Toluol als Blindwert wiederholt vermessen. Anhand der qualitativ und quantitativ einheitlichen ECDund NPD-Chromatogramme des Einstellmixes konnte gezeigt werden, dass die Analyten keine Memoryeffekte im GC-System verursachten.

Die Benzoylharnstoffe konnten wie erwartet nicht ohne thermische Zersetzung detektiert werden. Dieses Phänomen lässt sich an dem Auftreten von mehreren Peaks im GC-Chromatogramm der Standardsubstanzen erkennen. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4-43 die GC-Chromatogramme von Diflubenzuron und Flufenoxuron abgebildet. Die Benzoylharnstoffe bildeten abhängig von ihrer Struktur drei bis sieben Zersetzungsprodukte. Unter der Bedingung, dass die thermische Zersetzung der Analyten in reproduzierbarem Maße erfolgt, könnte die direkte GC zur quantitativen Bestimmung der Analyten eingesetzt werden. Aber insbesondere am Beispiel von Lufenuron wird deutlich, wie wenig reproduzierbar die Thermodegradation der Benzoylharnstoffe ist. Beim ersten Versuch betrug die Retentionszeit des gebildeten Hauptbruchsstückes 39,40 min. Bei einem zweiten Versuch betrug die Retentionszeit der Hauptbruchstücke 10,05 min und 12,09 min. Bei beiden Versuchen war das Injektionssystem jedoch intakt, was durch die Detektion von Captan als Indikator hierfür kontrolliert werden konnte.

Da die thermische Zersetzung der Analyten nicht reproduzierbar erfolgt, kann die direkte Gaschromatographie zur Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln nicht eingesetzt werden.



Abbildung 4-43: GC / ECD / NPD-Chromatogramme eines Flufenoxuron- und eines Diflubenzuron-Standards, 100 ng abs.

Zum Nachweis von Iprodion-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln gilt die Gaschromatographie mit ECD / NPD-Detektor als geeignetes Verfahren. Die in vielen Fällen bei Routineuntersuchungen beobachtete thermische Zersetzung von Iprodion im gaschromatographischen System führt zu einem charakteristischen Peakmuster, das sowohl im ECD als auch im NPD in gleicher Weise detektierbar ist. Dieses Peakmuster wird von Rückstandsanalytikern zur Erkennung von Iprodion herangezogen [26, 193]. Die quantitative Bestimmung von Iprodionrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels GC ist vermutlich ungenau, weil sich unter dem breiten Doppelpeak, der im Chromatogramm in Abbildung 4-44 erkennbar ist, Begleitsubstanzen verbergen können.



Abbildung 4-44: GC / ECD-Chromatogramm eines Iprodion-Standards 10 ng abs.

Auch das basische Pestizid Imazalil zersetzt sich im gaschromatographischen System und zeigt im ECD ein ähnliches Peakmuster wie Iprodion mit starkem Tailing.

Die Pestizide Myclobutanil, Procymidon, Tebuconazol ließen sich erwartungsgemäß unzersetzt mittels direkter GC nachweisen. Sie werden üblicherweise nach Aufarbeitung mit der Multimethode S19 mittels GC / ECD / NPD nachgewiesen.

Die beiden basischen Fungizide Carbendazim und Thiabendazol zeigten ein sehr unterschiedliches gaschromatographisches Verhalten. Während Thiabendazol als eine tailende Substanz detektiert werden konnte, erwies sich Carbendazim als nicht gaschromatographierbar.

Die anderen ausgewählten Pestizide verhielten sich ähnlich wie die Benzoylharnstoffe. Sie waren unter den gegebenen Bedingungen nicht unzersetzt gaschromatographierbar.

Interessanterweise zeigten die Benzoylharnstoffe außer Lufenuron und Triflumuron einen Peak bei 10,7 min, der sowohl mittels ECD als auch mittels NPD detektierbar war. Vermutlich handelte es sich dabei in allen Fällen um die gleiche Substanz. Diese Vermutung wird durch das in Tabelle 4-25 aufgeführte Peakhöhenverhältnis des ECD zum NPD gestützt. Es liegt bei etwa acht. Dagegen ist die Intensität, mit der diese Substanz aus den verschiedenen Benzoylharnstoffen gebildet wird, sehr unterschiedlich. Der Nachweis der Substanz mit der Retentionszeit von 10,7 min kann bei der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln in pflanzlichen Lebensmitteln mit der Multimethode S19 als ein erster Anhaltspunkt für den Gruppennachweis der fünf Benzoylharnstoffe, Chlorfluazuron, Diflubenzuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron und Teflubenzuron, herangezogen werden. Allerdings ist die Empfindlichkeit des Nachweises gering. Eine Abschätzung ergab, dass Benzoylharnstoff-Rückstände über das Produkt mit der Retentionszeit 10,7 min erst ab einer Konzentration von 0,1 mg/kg sicher nachweisbar sind. Ihre entgültige Bestimmung muss hierbei anschließend mittels HPTLC / AMD oder ihrer Kopplung mit der HPLC erfolgen.

Tabelle 4-25:Vergleich eines Zersetzungsproduktes der Benzoylharnstoffe nach
gaschromatographischer Trennung

Substanz	t _r in min	Peakfläche in % [*]	Peakhöhenverhältnis ECD/NPD	Peakanzahl der Verbindung
Chlorfluazuron	10,78	4	8	4
Diflubenzuron	10,73	100	9	3
Flufenoxuron	10,75	6	9	3
Hexaflumuron	10,71	0,3	14**	4
Teflubenzuron	10,79	7	7	6

Ausschnitt aus Tabelle 4-24

* bezogen auf den Hauptpeak im ECD = 100 %

** Abweichung durch überlappenden Peak bei 10,31 min (Hauptpeak)

4.3.5.2 GC / MS

Der thermische Zerfall der Benzoylharnstoffe bei der direkten gaschromatographischen Bestimmung sollte untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob alle Benzoylharnstoffe im Injektorsystem ihr aromatisches Isocyanat und ihr Benzoesäureamid bilden. Dazu wurden Standards verwendet, die in Toluol gelöst waren. Da bei der pyrolytischen Methylierung der Benzoylharnstoffe Methylester und Methylcarbamate entstanden, sollte der Einfluss des Methanols auf den thermischen Zerfall der Benzoylharnstoffe untersucht werden, das bei der pyrolytischen Methylierung als Lösungsmittel verwendet wurde und als Reaktionsprodukt entsteht.

Die Benzoylharnstoffe wurden mittels GC / MS unter Standardbedingungen (EI, 70 eV) im Scan Modus vermessen. Dazu wurde von jedem Standard 1 µl der Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml gelöst in Toluol bzw. Toluol/Methanol (9:1) in das GC-System injiziert. Auch bei diesen gaschromatographischen Untersuchungen wurden Bedingungen gewählt, die sich zur Multianalyse von Pestizid-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln als geeignet erwiesen haben (siehe Abschnitt 4.3.5.1).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-26 zusammengefasst. Zur besseren Übersicht wurden die Bruchstücke der Benzoylharnstoffe (Ar_1CO -Harnstoff- Ar_2) mit ihren Resten Ar_1CO - und Ar_2 -bezeichnet.

Tabelle 4-26:	Bruchstücke der Benzoylharnstoffe nach Thermodegradation im
	GC / MS-System bei Toluol und Methanol / Toluol als Lösungsmittel

Ar ₁ CO- Harnstoff-Ar ₂	Ar ₁ CO- Amin	Ar ₂ - Anilin	Ar ₂ -Iso- cyanat	Ar ₁ -Carbamat- methylester [*]	Ar ₂ -Carbamat- methylester [*]	Ar ₁ -Methyl- ester [*]
Chlorfluazuron	X	Х	х	X		
Diflubenzuron	x	Х	** X	X		
Flufenoxuron	X	Х	X	X		
Hexaflumuron	X	Х	х	Х	X	
Teflubenzuron	X	Х	х	X	X	
Triflumuron	X	Х	X		X	Х

* Bei Anwesenheit von Methanol zusätzlich nachgewiesene Bruchstücke

** Kann lediglich durch Vergleich der Retentionszeiten im GC / ECD / NPD und GC /MS zugeordnet werden, da die Substanz während der Ausblendzeit des MS retardiert.

Die untersuchten in Toluol gelösten Benzoylharnstoffe bildeten nach Thermodegradation im GC-System drei Bruchstücke. Wie erwartet konnten das Difluor- bzw. Chlorbenzoesäureamid (Ar₁CO-Amin) und das Ar₂-Isocyanat identifiziert werden. Das im GC / ECD / NPD detektierte Bruchstück mit der Retentionszeit von 10,7 min konnte als 2,6-Difluorbenzoesäureamid (Ar₁CO-Amin) identifiziert werden.

Zusätzlich wurde das Ar_2 -Amin gebildet, vermutlich reagierte im Lösungsmittel Toluol in Spuren enthaltenes Wasser sofort mit dem Ar_2 -Isocyanat zum Ar_2 -Amin. Problematisch war der Nachweis des aus Diflubenzuron gebildeten Isocyanats. Es konnte mittels GC / MS nicht nachgewiesen werden, da seine Retentionszeit in der Ausblendzeit des MS lag. Seine Zuordnung erfolgte über die GC / ECD / NPD-Chromatogramme der Benzoylharnstoffe bei direkter Gaschromatographie (siehe Abschnitt 4.3.5.1).

Bei den Untersuchungen in einem Methanol-Toluol-Gemisch wurden zusätzlich Ar₁-Carbamatmethylester und Ar₂-Carbamatmethylester nachgewiesen. Lediglich Triflumuron bildete Ar₂-Carbamatmethylester und Ar₁-Methylester. Alle zusätzlichen Bruchstücke können durch Reaktion des Methanols mit den Benzoylharnstoffen und die durch Thermodegradation gebildeten Substanzen Ar₁CO-Amin und Ar₂-Isocyanat erklärt werden. Ar₂-Isocyanat reagiert zum Ar₂-Carbamatmethylester, Ar₁CO-Amin zum Ar₁-Methylester. Aus dem Ursprungsmolekül können unter Einwirkung von Methanol Ar₁-Carbamatmethylester und Ar₂-Anilin gebildet werden.

Beispielhaft für den thermischen Zerfall von Benzoylharnstoffen soll wie im Abschnitt 4.2.1.2 der thermische Zerfall von Flufenoxuron näher beschrieben werden.

In den Abbildungen 4-45 bis 4-49 sind die EI-MS-Spektren der Bruchstücke des Flufenoxurons im Methanol/Toluol-Gemisch nach Thermodegradation abgebildet. Die Moleküle der Bruchstücke sind mit ihren Retentionszeiten und ihren relativen Peakflächen aufgeführt. Es konnten alle Bruckstücke identifiziert werden. Auf eine ausführliche Interpretation der Spektren an dieser Stelle wird verzichtet, da sie den bereits ausführlich beschriebenen EI-MS-Spektren der Derivate von Flufenoxuron nach pyrolytischer Methylierung sehr ähnlich sind.

Die EI-MS-Spektren der Bruchstücke 1 und 2 (Abbildung 4-45 und Abbildung 4-46) können mit dem EI-MS-Spektrum von Derivat 2 (2,6-Difluorbenzoesäuremethylester siehe Abbildung 4-10) verglichen werden. Lediglich ihre Molekülpeaks haben eine ungeradzahlige Masse, da sie im Gegensatz zum 2,6-Difluorbenzoesäuremethylester über ein Stickstoffatom im Molekül verfügen. Sie konnten als 2,6-Difluorbenzoesäureamid und 2,6-Difluorbenzoyl-carbamatmethylester identifiziert werden.



Abbildung 4-45: EI-MS-Spektrum von Bruchstück 1

 t_r - 7,04 min, Peakfläche - 6 %, m/z = 219 und 264 sind Verunreinigungen



Abbildung 4-46: EI-MS-Spektrum von Bruchstück 2

tr - 9,76 min, Peakfläche - 15 %min

Das Molekül-Ion und das Fragment-Ion des EI-MS-Spektrums von Bruchstück 4 (Abbildung 4-47) ist jeweils um 14 u kleiner als die entsprechenden Ionen des Derivates 3 (siehe Abbildung 4-11) N-{4-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-fluorphenyl}-N-methylamin), da das Bruchstück 4 das unmethylierte Molekül des Derivates 3, das (N-{4-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-fluorphenyl}-N-methylamin) darstellt.



Abbildung 4-47: EI-MS-Spektrum von Bruchstück 4

 t_r - 21,06 min, Peakfläche - 67 %

Lediglich das EI-MS-Spektrum vom Bruchstück 3 (Abbildung 4-48), das als 4-(2-Chlor- $\alpha-\alpha$ -trifluor-p-toloyloxy)-2-fluorphenyl-isocyanat identifiziert wurde, war nicht gut mit den EI-MS-Spektren der Derivate von Flufenoxuron nach pyrolytischer Methylierung vergleichbar.

In Abbildung 4-49 ist der besonders interessierende Teil des Spektrums vom Bruchstück 3 vergrößert dargestellt. Das stabile Molekülion, der Basispeak, besitzt ein Chlorisotopenmuster (3:1) und eine ungerade Molekülmasse (m/z = 331), weshalb es entsprechend der Stickstoffregel eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen enthalten muss (Eins). Da das Bruchstück 3 als Isocyanat über ein sehr stabiles Molekül-Ion verfügt, besitzen die Fragment-Ionen eine geringe Intensität. Zur besseren Übersicht wurde deshalb der interessierende Ausschnitt des EI-MS-Spektrums von Bruchstück 3 vergrößert in Abbildung 4-49 dargestellt.

Die Fragment-Ionen m/z = 312 und 296 entstehen durch Abspaltung eines Fluor- bzw. Chlor-Radikals. Das Fragment-Ion m/z = 276 entsteht durch Verlust von Flusssäure (Δ m/z = 20) aus dem Fragment-Ion m/z = 296. Das nach dem Molekül-Ion größte Fragment m/z = 268 entsteht aus dem Molekül-Ion durch Abspaltung des Chlorradikals(Δ m/z = 35) und eines Kohlenmonoxids (Δ m/z = 28). Interessanterweise tritt im EI-MS-Spektrum von Bruchstück 3 das identische Fragment des Derivat 4 m/z = 254 auf. Durch Abspaltung des Chlorradikals und anschließende Abspaltung des neutralen Isocyanato-Radikals kann dieses Fragment erklärt werden. Als viertes neutrales Teilchen kann das Trifluormethyl-Radikal vom Fragment-Ion m/z = 296 zum Fragment m/z = 227 abgespalten werden. Somit konnten alle vier Substituenten des Diphenylether-Gerüstes im EI-MS-Spektrum nachgewiesen werden.

Durch die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente mit einem Wert von 10, der für zwei Ringe und acht Doppelbindungen (2 x 3 im Benzolring und 2 x in der Isocyanato-Gruppe) steht, konnte die Identifizierung des Bruchstücks 3 als das 4-(2-Chlor- α - α -d-trifluorp-toloyloxy)-2-fluorphenyl-isocyanat bestätigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei thermischem Zerfall von Benzoylharnstoffen im GC-System das aromatische Isocyanat und das Benzoesäureamid gebildet werden. Die Untersuchungen ergeben weiter, dass die bevorzugten Reaktionen im Injektorsystem stark von der Matrix abhängig sind. Bei Vorhandensein von Wasserspuren oder anderen nucleophilen Reagenzien wie z. B. Methanol reagiert ein Teil des gebildeten Isocyanats zum Ar₂-Carbamatmethylester und das Ar₁CO-Amin zum Ar₁-Methylester. Aus dem Ursprungsmolekül werden unter Einwirkung von Methanol Ar₁-Carbamatmethylester und Ar₂-Anilin gebildet.



Abbildung 4-49: Ausschnitt von 220 bis 340 u des EI-MS-Spektrums von Bruchstück 3

Die beschriebenen Versuche zeigen deutlich, dass das Verhalten der Benzoylharnstoffe bei der direkten Gaschromatographie stark von mitextrahierten Lebensmittelinhaltsstoffen abhängig sein wird. Eine Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels direkter Gaschromatographie ist deshalb nur möglich, wenn im Probenextrakt die Anwesenheit nucleophiler Substanzen wie Wasser oder Methanol vermieden wird, da lediglich beim Nachweis von Ar₂-Isocyanaten auf den Ursprungsanalyten geschlossen werden kann. Die anderen nachgewiesenen Bruchstücke können schon im pflanzlichen Lebensmittel als Rückstand vorliegen und sind nicht Gegenstand der Rückstandsanalytik, da bei den Benzoylharnstoffen in der RHVO explizit Grenzwerte für den Wirkstoff und nicht für seine Abbauprodukte angegeben sind. Die Integration von Benzoylharnstoffen in Multimethoden zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln kann nur teilweise erfolgen. Hierbei können nachgewiesene Bruchstücke als erstes Indiz für das Vorhandensein von Benzoylharnstoffen dienen. Der sichere Nachweis und die Bestimmung der Benzoylharnstoffe muss dann mit flüssigchromatographischen Methoden erfolgen, mit denen die Benzoylharnstoffe ohne Zersetzung chromatographiert werden können.

4.3.6 <u>LC / MS</u>

Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen war es, eine Methode zu entwickeln, mit der Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln unzersetzt, sicher und präzise nachgewiesen werden können. Dazu wurde die LC / MS eingesetzt. Die gewählte Detektionsmethode sollte alle sieben Benzoylharnstoffe gleich empfindlich detektieren und im Bereich von 0,01 bis 1,0 mg/kg in pflanzlichen Lebensmitteln nachweisen können. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend der modifizierten Multimethode S19. Der acetonische Probenextrakt wurde einer Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan unterzogen (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer GPC (Abschnitt 3.1.3.1) und MKGF (Abschnitt 3.1.3.2).

In Vorversuchen wurde die Eignung der Ionisierungsformen (APCI+, APCI-, ESI+ und ESI-) zur Detektion der Benzoylharnstoffe untersucht. Dazu wurden Standardlösungen der Analyten direkt in das MS-System (FIA / MS) injiziert. Die Konzentration der Lösungen betrug 100 µg/ml in Methanol.

Mit allen der zur Verfügung stehenden Ionisierungstechniken ließen sich die Benzoylharnstoffe detektieren. Ihr Ionisierungsverhalten bei den unterschiedlichen Techniken wird im folgenden genauer beschrieben und verglichen.

Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck im negativen Modus (APCI-)

Im APCI- Modus zeigten die Benzoylharnstoffe bei schonender Ionisation Spektren mit hoher Intensität. Immer traten das Molekülion [M-H]⁻, und außer beim Triflumuron das Anion [M-H-HF]⁻ durch Abspaltung eines neutralen Flußsäuremoleküls auf. Bei Teflubenzuron wurde zusätzlich durch Abspaltung von zwei Flusssäuremolekülen das Anion $[M-H-HF-HF]^{-}$ gebildet. Clorfluazuron $[Ar_1COHarnstoffAr_2]$ zeigte zusätzlich das Anilinanion $[Ar_2NH]^{-}$; Hexaflumuron zeigte das Anion [M-H-Cl] und das Amid-Anion $[Ar_1CONH]^{-}$.

Alle Benzoylharnstoffe waren durch APCI- zwar nachweisbar, aber die Nachweisempfindlichkeit war sehr unterschiedlich. Diese Ionisierungsmethode war demzufolge nicht geeignet, alle Benzoylharnstoffe gleichzeitig mit gleicher Empfindlichkeit nachzuweisen.

Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck im positiven Modus (APCI+)

Auch mittels APCI+ konnten die Benzoylharnstoffe nicht gleichzeitig mit gleicher Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Für Chlorfluazuron erwies sich die APCI+ als besonders geeignet. Die Intensität des Basispeaks war um den Faktor 1000 höher als bei den anderen Benzoylharnstoffen, da vom Molekülion Flusssäure besonders gut abgespalten wird, so dass es eine sehr geringe Intensität hat. Die Bedingungen der Ionisierung waren allerdings nicht reproduzierbar, so dass die Intensität des Spektrums sehr schwankend war.

Flufenoxuron, das mittels APCI- nicht empfindlich detektiert wurde, bildete bei der APCI+ ein stabiles M-Cl+Na+-Addukt und wurde deshalb im positiven Modus wesentlich empfindlicher als im negativen Modus detektiert.

Elektrospray-Ionisierung im negativen Modus (ESI-)

Wie bei der APCI- wurden bei der ESI- in den Benzoylharnstoff-Spektren das Molekülion [M-H]⁻ und nach Abspaltung eines Flußsäuremoleküls das Anion [M-H-HF]⁻ beobachtet. Es konnten Ionisierungsparameter gefunden werden, bei denen alle Benzoylharnstoffe ähnlich empfindlich nachweisbar waren. Somit war die ESI- für eine gemeinsame Detektion der Benzoylharnstoffe geeignet.

Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus (ESI+)

Die überwiegende Mehrheit der Verbindungen ließ sich sehr empfindlich im ESI+ Modus messen. Im Gegensatz zum negativen Modus war das Fragmentierungsverhalten der Benzoylharnstoffe im positiven Modus sehr unterschiedlich. Beispielsweise war das Molekülion des Triflumurons besonders intensiv, weil von diesem Molekül nicht wie von anderen Benzoylharnstoffen Flusssäure abgespalten wurde, sondern bevorzugt das Fragment-Ion m/z = 154, das Ar₁CO-NH⁺, entstand. Somit konnten die Benzoylharnstoffe auch im ESI+ nicht gleichzeitig mit gleicher Empfindlichkeit nachgewiesen werden.

Entwicklung der LC / MS-Methode

Da die Ionisierungsmethode ESI- robuster als die APCI- war und bei ihr die Benzoylharnstoffe empfindlicher mit ähnlicher Intensität nachgewiesen wurden, wurde eine Detektionsmethode für alle sieben Benzoylharnstoffe im ESI- entwickelt.

Erste Versuche zeigten, dass die massenselektive Detektion im SCAN-Modus erwartungsgemäß nicht empfindlich genug war. Die Nachweisgrenzen der Benzoylharnstoff-Rückstände lagen im ppm-Bereich. Deshalb wurde eine Detektionsmethode entwickelt, die es erlaubte, die Benzoylharnstoffe nach flüssigchromatographischer Trennung im SIR-Modus sicher nachzuweisen und zu quantifizieren. Zur Identifizierung sollten die Retentionszeit in der RP-HPLC und der Anwesenheit von mindestens zwei Ionen herangezogen werden.

Die Trennung im flüssigchromatographischen System erfolgte mit einem Wasser/Methanol-Gradienten, der schon durch Versuche im Bereich der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD bekannt war. Obwohl für die flüssigchromatographische Trennung eine RP-HPLC-Methode mit möglichst hoher Selektivität für die Benzoylharnstoffe gesucht wurde, konnten die Benzoylharnstoffe Flufenoxuron und Lufenuron auf keiner der zur Verfügung stehenden RP-HPLC-Säulen getrennt werden. Deshalb wurden beide Analyten gleichzeitig ionisiert. Da beide Analyten im ESI- Modus das Ion 489 [Flufenoxuron-H]⁻ und [Lufenuron-HF]⁻ zeigten, sollten die Ionisierungsbedingungen so optimiert werden, dass Lufenuron keine Abspaltung und Flufenoxuron eine vollständige Abspaltung eines Flusssäuremoleküls zeigte. Diese Bedingungen konnten nicht gefunden werden. Deshalb wurde das Ion als gemeinsames Target-Ion bestimmt und bei gleichzeitigem Vorliegen beider Benzoylharnstoffe bei der Quantifizierung auf das Ion 489 verzichtet. Die optimierten Bedingungen der RP-HPLC/MS (ESI-) sind in Abschnitt 3.3.10 dargestellt.

Die Grenzen bei der Bestimmung der Benzoylharnstoffe über für sie charakteristische Ionenspuren lagen für sechs der sieben untersuchten Substanzen bei 0,25 ng absolut (entspricht 0,005 mg/kg). Für Lufenuron, das über die Ionenspur 509 und 511 bestimmt wurden, konnte dagegen für die Ionenspur 511 nur eine Bestimmungsgrenze von 1,5 ng absolut (entspricht 0,03 mg/kg) erreicht werden. Die RP-HPLC / MS-ESI- war somit nicht geeignet, Lufenuron quantitativ zu bestimmen. Da die Nachweisgrenze dieser Methode für die Ionenspur 511 jedoch bei 0,5 ng absolut lag, konnte Lufenuron in einer Konzentration von 0,01 mg/kg, die der erlaubten Höchstmenge entspricht, sicher identifiziert werden und über die Ionenspur 509 quantifiziert werden.

Der lineare Bereich für die zur Bestimmung der Benzoylharnstoffe herangezogenen Ionenspuren war 0,25 bis 10 ng absolut relativ klein (entspricht 0,005 mg/kg bis 1 mg/kg bei einem Einspritzvolumen von 10 bis 2 μ l). Für die Ionenspur 511 war wegen der höheren Bestimmungsgrenze der lineare Bereich noch etwas enger (1,5 bis 10 ng absolut). Der Bereich oberhalb 10 ng absolut wurde er nicht untersucht, weil für die quantitative Bestimmung nicht relevant war.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten im Bereich von 0,01 mg/kg und 1,0 mg/kg wurden methanolische Probenextrakte eingesetzt, die erst nach Aufarbeitung durch die DFG-Methode S19 und nach Aufnahme in 2 ml Methanol entsprechend dotiert wurden. Diese Vorgehensweise war möglich, weil die Wiederfindungsraten der Aufarbeitung bereits aus vorangegangenen Untersuchungen (Abschnitt 4.4.3) für die einzelnen Benzoylharnstoffe mit 70 bis 120 % bekannt waren.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibrierung. Da der lineare Bereich bei der HPLC / MS im ESI- im Gegensatz zur GC sehr klein war, mussten unterschiedliche Probevolumina in die HPLC eingespritzt werden. Maximal konnten 10 μ l des methanolischen Probenextraktes injiziert werden. Dabei konnten maximal 10 μ l des methanolischen Probenextraktes injiziert werden. Da sich bei höheren Volumina wie 20 μ l die höhere Elutionskraft des Lösungsmittels (100 % Methanol) gegenüber der mobilen Phase (Methanol+Wasser / 1+1) negativ bemerkbar machte ^a.

Zum Screening auf die sieben Benzoylharnstoffe wurden $10 \,\mu l$ des Probenextraktes untersucht. Falls nach einer ersten Abschätzung Pestizidgehalte im ppm-Bereich erwartet wurden, wurden für die Quantifizierung lediglich $2 \,\mu l$ oder $10 \,\mu l$ der 1/5 verdünnten Probe injiziert.

Tabelle 4-27 zeigt die Wiederfindungsraten für die einzelnen Benzoylharnstoffe, die bei der Untersuchung von verschiedenen, dotierten pflanzlichen Lebensmittelproben erhalten wurden (0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg und 1,0 mg/kg dotiert). Zusätzlich ist die Gerätepräzision (dreifach bestimmter Standard) angegeben. Ähnlich wie bei der HPTLC / AMD machte sich ein Matrix-Effekt erst bei geringeren Konzentrationen bemerkbar.

Bei Konzentrationen im ppm-Bereich erwies sich eine externe Kalibrierung als ausreichend präzise und richtig. Die Wiederfindungsraten bei einer Dotierung in Höhe von 1 mg/kg lagen zwischen 88 und 111 % mit einer Gerätepräzision von 0,8 bis 2,9 % abhängig vom Pestizid.

^a Wie schon bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD besprochen, muss Methanol als Lösungsmittel verwendet werden, um alle Pestizide zu lösen.

	Pestizid	Blumenkohl	Pflaumen	Kopfsalat	Champignons	rel. STAW*
	Diflubenzuron	96 %	93 %	100 %	118 %	9,1 %
ц	Triflumuron	75 %	114 %	49 %	104 %	7,7 %
	Hexaflumuron	68 %	72 %	65 %	81 %	9,1 %
11 ppi	Teflubenzuron	86 %	92 %	52 %	95 %	12 %
0,0	Flufenoxuron	93 %	111 %	79 %	99 %	5,7 %
	Lufenuron	120 %	196 %	115 %	105 %	7,4 %
	Chlorfluazuron	66%	119%	62%	97%	5,4%
	Diflubenzuron	102 %	88 %	76 %	81 %	7,6 %
	Triflumuron	110 %	87 %	77 %	91 %	2,8 %
-	Hexaflumuron	95 %	70 %	62 %	82 %	13 %
l ppm	Teflubenzuron	54 %	100 %	82 %	95 %	6,6 %
0,	Flufenoxuron	69 %	68 %	53 %	84 %	7,5 %
	Lufenuron	78 %	81 %	58 %	52 %	9,8 %
	Chlorfluazuron	56 %	69 %	55 %	93 %	9,2 %
	Diflubenzuron	102 %	95 %	93 %	92 %	2,0 %
	Triflumuron	104 %	97 %	99 %	95 %	1,5 %
_	Hexaflumuron	104 %	92 %	97 %	89 %	0,8 %
0 ppm	Teflubenzuron	111 %	88 %	101 %	105 %	1,4 %
1,	Flufenoxuron	103 %	92 %	99 %	95 %	1,8 %
	Lufenuron	103 %	94 %	96 %	91 %	2,9 %
	Chlorfluazuron	103%	92%	97%	91%	1,1%

Tabelle 4-27:Wiederfindungsraten der Benzoylharnstoffe nach RP-HPLC / MS
(ESI-) im SIM-Modus

* Gerätepräzision

Bei Dotierungen in Höhe von 0,01 mg/kg und 0,1 mg/kg schwankten die Ergebnisse in höherem Maße. Die Wiederfindungsraten lagen bei Dotierungen von 0,1 mg/kg zwischen 54

bis 110 % mit einer Gerätepräzision von 2,8 bis 13 %, und bei Dotierungen von 0,01 mg/kg zwischen 49 bis 196 % mit einer Gerätepräzision von 5,4 bis 12 %. Aufgrund der großen Abweichungen sollte die Quantifizierung im ppb-Bereich mittels Standardadditionskalibrierung erfolgen, die eine exakte Quantifizierung ermöglicht.

Beispielhaft für die untersuchten Lebensmittelproben zeigen Abbildung 4-50 und Abbildung 4-51 die HPLC / MS- und HPLC / Dioden-Array-Chromatogramme des mit den sieben Benzoylharnstoffen dotierten Pflaumenextraktes (0,01 mg/kg) und einer entsprechenden Standardmischung (0,5 ng absolut).



Abbildung 4-50: Vergleich der HPLC / Dioden-Array-Chromatogramme mit den

Totalionen-Chromatogrammen der Ionenspuren im negativen ESI-

Modus

links: 10 μl eines mit 0,01 mg/kg Benzoylharnstoff-Mix dotierten Pflaumenextraktes
rechts: 10 μl Benzoylharnstoff-Mix (50 ng/ml = 0,5 ng absolut)
a - Diflubenzuron, b - Triflumuron, c - Hexaflumuron, d - Teflubenzuron
e - Flufenoxuron, f - Lufenuron, g - Chlorfluazuron
Die Chromatogramme wurden normiert auf den grössten Peak, dessen Intensität durch den Zahlenwert rechts im Chromatogramm angegeben wird

In Abbildung 4-50 sind die HPLC / Dioden-Array-Chromatogramme und die Totalionen-Chromatogramme der Probe und des Standards einander gegenübergestellt. In den Dioden-Array-Chromatogrammen waren weder Analyten noch Matrix detektierbar. Damit ist die Methode zur Bestimmung der Benzoylharnstoffe im ppb-Bereich nicht geeignet. Die MS-Chromatogramme der Probe und der Standardmischung waren trotz des spezifischen Nachweises nicht identisch. Bei 15 min trat im Probenchromatogramm ein zusätzlicher Peak auf. Dieser wurde im HPLC / MS-Chromatogramm in der Ionenspur 540 wiedergefunden (Abbildung 4-51) und als Matrixpeak identifiziert. In der Ionenspur 538 trat er nicht auf. Um einen Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, wurde Chlorfluazuron deshalb lediglich über die Ionenspur 538 quantifiziert.



Abbildung 4-51: SIM der Benzoylharnstoffe in einem mit 0,01 mg/kg dotierten Pflaumenextrakt, je 0,5 ng absolut (TIC in Abbildung 4-50)

a - Diflubenzuron, b - Triflumuron, c - Hexaflumuron, d - Teflubenzuron e - Flufenoxuron, f - Lufenuron, g - Chlorfluazuron Die Chromatogramme wurden normiert auf den größten Peak, dessen Intensität durch

den Zahlenwert rechts im Chromatogramm angegeben wird

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass es in der HPLC / MS (ESI-) zu zwei verschiedenen Matrixeffekte kommen kann. Die Matrixbestandteile können die Ionisierung der Analyten beeinflussen, so dass es zu Über- oder Unterbefunden kommen kann. Außerdem können sie durch Bildung von Ionen gleicher Masse (m/z) wie die Zielionen Analyten vortäuschen.

Vergleich der Analysenzeit der LC / MS mit der HPTLC / AMD

Die Analysenzeit der LC/MS mit der HPTLC/AMD zur Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln wird am Beispiel von Diflubenzuron in Tabelle 4-28 verglichen. Bei einer ausreichend großen Probenzahl (zwölf Proben, sechs Standards) zeigt es sich, das die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD oder HPLC / MS die gleiche Analysenzeit benötigt. Erst die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC/AMD verkürzt die Analysenzeit wesentlich.

Lebensmitteln für zwölf Proben und sechs Standards					
	HPLC / MS	HPTLC / AMD	Online-Kopplung GPC mit der HPTLC AMD		
Extraktion	6,0 h	6,0 h	6,0 h		
GPC	12,0 h (12 x)	12,0 h (12 x)	7,5 h (18 x)		
MKGF	1,0 h (12 x)	1,0 h (12 x)	-		
Chromatographie	9,0 h	5,5 h*	4,5 h		
UV-Detektion	-	2,0 h**	2,0 h**		
Manuelle Integration	1,0 h	1,0 h	1,0 h		
Auswertung	1,0 h	1,0 h	1,0 h		
Summe	30,0 h	29,5 h	22,0 h		

Tabelle 4-28: Analysenzeit der Bestimmung von Diflubenzuron in pflanzlichen

* 1 h Auftragen der Proben auf die HPTLC-Platte, 4,5 h Entwicklung der Platte im AMD-Gerät

** 18 Bahnen bei 280 nm, nach Integration Spektrenaufnahme der zwölf Proben- und der sechs Standardpeaks

Zusammenfassung

Zur Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln erwies sich die HPLC/MS mit Elektrospray-Ionisierung im negativen Modus als geeignet. Die Benzoylharnstoffe mussten nach der flüssigchromatographischen Trennung im SIR-Modus detektiert werden. Bei einem kleinen linearen Bereich von 0,25 bis 10 ng für die zur Quantifizierung herangezogenen Ionenspuren, musste das zur Untersuchung eingesetzte Probevolumen an die zu erwartende Rückstandskonzentration angepasst werden. Für eine Quantifizierung im ppm-Bereich wurde das Probevolumen entweder von $10 \,\mu$ l auf $2 \,\mu$ l reduziert oder die Probe 1/5 verdünnt. Um Matrixeffekte gering zu halten und alle sieben Benzoylharnstoffe sicher ab 0,005 mg/kg bestimmen zu können, war es notwendig, die Benzoylharnstoffe mittels Standardadditionskalibrierung zu quantifizieren.

Obwohl eine weitere Verbesserung der LC / MS-Methode durch die Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität erwartet wurde, konnte aufgrund fehlender Messzeiten keine Methode entwickelt werden.

4.4 Anwendung der HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC

4.4.1 <u>Trennung eines Pestizidgemisches mittels Online-Kopplung der RP-HPLC</u> mit der HPTLC / AMD

Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen war es, eine Multimethode für die Rückstandsanalyse von Pestiziden zu entwickeln, bei der die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD zur Trennung der Pestizide eingesetzt wird.

Die Absicht einer Multimethode ist, dass die Analyten unabhängig von großen Unterschieden in der chemischen Struktur, wie Organophosphorinsektizide und chlororganische Pestizide gemeinsam in einem Analysengang chromatographiert werden können. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Untersuchungen ein Standard-Mix von 74 Pestiziden aus den unterschiedlich polaren Substanzgruppen Phenoxycarbonsäuren, Organophosphorinsektizide, Benzoylharnstoffen, Imidazolen und chlororganische Pestiziden hergestellt. Die einzelnen Substanzen waren in einer Konzentration von 0,01 mg/ml enthalten.

In dem zuerst durchgeführten HPLC-Lauf sollte keine vollständige Trennung der Pestizide erzielt werden, sondern ihre Fraktionierung aufgrund ihrer Polarität sowie eine Abtrennung der Analyten von der Matrix. In der nachfolgenden HPTLC/AMD-Trennung sollten die Analyten optimal chromatographiert und damit vollständig voneinander getrennt werden.

20 µl des Standard-Mixes (200 ng je Pestizid) wurden bei einem Fluss von 40 µl/min des in Tabelle 4-29 dargestellten Wasser/Methanol-Gradienten an einer RP-C18-Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm chromatographiert.

Zeit/min	% Methanol	Fluss/(µl/min)	Zeit/min	% Methanol	Fluss/(µl/min)
0	48,9	40	55	100	40
5	48,9	40	58	100	200
25	90,1	40	62	48,9	200
32	90,1	40	65	48,9	200
35	100	40			

Tabelle 4-29:HPLC-Gradient

Das resultierende HPLC-Chromatogramm und das Auftrageschema der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD sind in Abbildung 4-52 dargestellt. Das HPLC-Eluat wurde
im Auftragezeitraum von 10 bis 60 min automatisch auf drei HPTLC-Platten zu je 11 Bahnen fraktioniert (automatischer Auftragemodus). Parallel dazu wurden je 200 ng von einzelnen Pestizidstandards auf HPTLC-Platten direkt aufgetragen.



Abbildung 4-52: Auftrageschema der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD, HPLC-Chromatogramm bei 230 nm

Pestizid-Mix (je 200 ng der 74 Analyten), nach HPLC-Trennung wurde das Eluat von 10 bis 60 min auf drei HPTLC-Platten zu je 11 Fraktionen aufgetragen

Die HPTLC-Platten wurden im AMD1-System mit dem Gradienten 4 (siehe Abschnitt 3.3.7.5) entwickelt, der von F. Dethlefs [185] für die Trennung von mittelpolaren Pestiziden wie die Carbamate und Phenylharnstoffe optimiert wurde. Nach einem Multiwellenlängenscan von 200 bis 300 nm und der Spektrenaufnahme von den gefundenen Komponenten wurden die Laufstrecken und die Spektren mit den Daten der Standards verglichen. In Abbildung 4-53 sind zur besseren Übersicht lediglich Remissionschromatogramme der drei HPTLC-Platten bei 200 nm dargestellt.

Nach der Entwicklung mit dem AMD1-Gradienten 4 konnten auf Platte 1 nur vier, auf Platte 2 einundzwanzig und auf Platte 3 zwölf Pestizide identifiziert werden. Besonders problematisch war die Identifizierung der Analyten auf den Platten 1 und 3.

Bei der dritten Platte wurde nicht mehr die gesamte Laufhöhe der Platte ausgenutzt, weil in den auf die Platte aufgetragenen Fraktionen des HPLC-Eluats die unpolarsten Pestizide enthalten waren. Diese weisen in der Normal-Phasen-HPTLC sehr große Laufstrecken auf, so dass ihre Trennung mit dem angewendeten Gradienten für mittelpolare Analyten ungünstig war.

Hinzu kommt, dass die Auflösung durch Weichmacher^a, die eine Laufstrecke von etwa 60 mm aufweisen, verschlechtert wird. Auf eine Optimierung der Trennung der Pestizide auf Platte 3 wurde verzichtet, weil hier Pestizide nachgewiesen wurden, deren Nachweis mit der Gaschromatographie kein Problem darstellt.



Abbildung 4-53: Untersuchung eines Pestizid-Mixes (74 Pestizide) mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Entwicklung der TLC-Platten 1 bis 3 mit dem AMD1-Gradient 4



Abbildung 4-54:Untersuchung eines Pestizid-Mixes (74 Pestizide) mittels Online-
Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Entwicklung der HPTLC-Platte 1 mit AMD1-Gradient 5

^a Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit Standards. Weichmacher sind im chemisch-analytischen Labor ubiquitär vorhanden. Sie stammen insbesondere aus Plastikteilen und Lösungsmitteln und werden durch die Laborluft fein verteilt. Da kein besonderer Schutz für die HPTLC-Platten während der Online-Kopplung vorhanden war, konnte das Problem der Belastung der HPTLC-Platten mit Weichmachern nicht vollständig gelöst werden.

Aufgrund der schlechten Trennung der Substanzen auf der Platte 1 wurde diese später mit einem für Phenoxycarbonsäuren optimierten AMD-Gradienten, dem AMD1-Gradienten 5, entwickelt, der für die Trennung polarer Analyten geeigneter ist. Das Remissionschromatogramm dieser HPTLC-Platte ist in Abbildung 4-54 (200 nm) dargestellt. Es konnten dreizehn Pestizide mehr als bei der Untersuchung mit dem mittelpolaren Gradienten identifiziert werden.

Insgesamt konnten von den 74 Pestiziden nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD 50 Pestizide identifiziert werden, die mit ihren HPLC-Fraktionen in Tabelle 4-30, Tabelle 4-31 und Tabelle 4-32 aufgeführt sind.

Tabelle 4-30:Nachgewiesene Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der
HPTLC / AMD, mit Platte 1

Bahn	Substanz	Laufstrecke [mm]*	Laufstrecke [mm]**
2-3	Bentazon	33,2	36,3
4-5	Bromoxynil	45,7	-
7-8 (9)	Chlorfenac	23,3	46,3
8-10 (10)	Desisoprophyl-atrazin	21,3	26,8
3	Clopyralid		23,8
3	Chloramben		36,2
4-5	2,4-D		29,7
4	Dicamba		34,6
5	MCPA		32,4
6	Carbofuran		32,3
6-7	Dichlorprop		37,4
7-8	2,4,5-T		30,7
7	Fluazifop-Acid		32,1
7	Mecoprop		36,9
8-9	Fenoprop		36,7
9	Acifluorfen		33,4
11	Desethylatrazin		27,2

* AMD1-Gradient 4

** AMD1-Gradient 5

Bahn	Substanz	Laufstrecke [mm]*
1-4	МСРВ	22,2
4-5	Simazin	33,3
4	Metribuzin	55,5
5-7	Paraoxon-Ethyl	48,0
6-7	Atrazin	40,0
7-8	Atraton	23,0
7-8	Desmetryn	31,8
7-8	Azinphos-Methyl	58,0
8-9	Sebuthylazin	41,8
8-9	Propazin	45,1
8-9	Ametryn	40,4
8-9	Methoprotryn	23,3
8-9	Myclobutanil	25,0
9-11	Fentinacetat	25,1
10-11	Prometryn	46,6
10	Azinphos-Ethyl	58,0
10	Chlorthalonil	62,3
10	Dichloran	63,3
9-11	Parathion-Methyl	62,0
11	Chlorfenphinvos	49,5
11	Bupirimat	48,0

Tabelle 4-31:Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der HPTLC / AMD,
Platte 2

AMD1-Gradient 4

*

Tabelle 4-32:Pestizide nach Online-Kopplung RP-HPLC mit der HPTLC / AMD,
Platte 3

Bahn	Substanz	Laufstrecke [mm] [*]
1	Bitertanol	20,6
1	Metolachlor	20,9
1	Diazinon	56,1
3-4	Fenbutatin-Oxid	20,9
3-4	Parathion-Ethyl	64,0
5	Metoxychlor	62,8

Bahn	Substanz	Laufstrecke [mm] [*]
5-6	Pirimiphos-Ethyl	60,3
5-6	Chlorpyriphos-Methyl	65,2
6-7	Cypermethrin	61,9
6	Chlorpyriphos-Ethyl	67,0
6	Triflurazin	69,7
6	p,p-DDE	72,7

* AMD1-Gradient 4

Sehr gut konnten polare bis mittelpolare nichtflüchtige Pestizide wie die Triazine, einige Organophosphorinsektizide oder Phenylharnstoffe nachgewiesen werden. Besonders geeignet waren sie für die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD, wenn ihr UV-Spektrum aussagekräftig (UV-Maxima größer 200 nm und mit Nebenmaxima) und ihr Nachweis empfindlich (Extinktionskoeffizient groß) ist.

Nicht nachgewiesen werden konnten flüchtige (meist unpolare) Pestizide, da sie wie zum Beispiel DDT für eine Auftragung auf die HPTLC-Platte zu flüchtig sind. Ebenfalls nicht nachweisbar waren Pestizide, die nicht mittels RP-HPLC chromatographiert werden konnten.

Bei späteren Versuchen zeigte sich, dass Thiabendazol, das durch UV-Messung bei 300 nm empfindlich nachweisbar ist, nach Online-Kopplung mit der RP-HPLC nicht nachgewiesen werden kann, da Thiabendazol auf der verwendeten RP-Säule nicht reproduzierbar retardierte.

Aus der Summe der Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass nicht nur die AMD-Gradienten auf die nachzuweisenden Pestizide abgestimmt werden müssen, sondern auch geeignete RP-Säulen verwendet werden müssen.

4.4.2 <u>Bestimmung von Iprodion-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln</u> <u>mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC</u>

Screening mit Gaschromatographie

Im theoretischen Teil der Arbeit wurde bereits beschrieben, dass Iprodion-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln nach Aufarbeitung mit der modifizierten Multimethode S19 mittels GC/ECD/NPD nachgewiesen werden können. Die dabei im gaschromatographischen System auftretende thermische Zersetzung führt zu einem charakteristischen Peakmuster, das sowohl im ECD als auch im NPD in gleicher Weise detektiert wird (siehe Abbildung 4-44). Dieses Peakmuster kann zur Erkennung von Iprodion herangezogen werden. Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass die quantitative Bestimmung von Iprodion jedoch durch Begleitsubstanzen, die unter dem breiten Peakmuster liegen können, häufig ungenau sein wird. Aus diesem Grund sollte für eine korrekte Bestimmung von Iprodion-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln eine Methode eingesetzt werden, bei der Iprodion nicht thermisch zersetzt wird. Hierfür boten sich die flüssigchromatographischen Methoden HPTLC / AMD sowie deren Kopplung mit der RP-HPLC an.

Bestimmung mittels HPTLC / AMD

Bereits in einer früheren Arbeit [30] wurde gezeigt, dass sich Iprodion mittels HPTLC / AMD bestimmen lässt; es besitzt ein charakteristisches Remissionsspektrum mit einem Maximum bei 202 nm. Allerdings wurde der Iprodion-Peak bei vielen der untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln von mitextrahierten Matrixbestandteile überlagert, die sowohl die Erkennung des Iprodions als auch seine Quantifizierung erschweren können. Deshalb wurden mehr als zwanzig verschiedene pflanzliche Lebensmittel nach der modifizierten DFG-Methode S19 aufgearbeitet, die vereinten Fraktionen 3 und 4 der Kieselgel-Fraktionierung in 1 ml Toluol aufgenommen und davon 25 μ l auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Die Platten wurden mit einem für mittelpolare bis unpolare Analyten geeigneten universellen AMD1-Gradienten 4 in der AMD-Kammer entwickelt. Abbildung 4-55 zeigt die Chromatogramme einer Auswahl dieser Probenextrakte.

Unter den gewählten Chromatographiebedingungen ergab sich für Iprodion eine Laufstrecke von 49 mm. Die abgebildeten Chromatogramme zeigen, dass das Fungizid unter den gewählten Bedingungen von Bestandteilen der verschiedenen Probenmatrices überlagert werden würde. Jedoch wurden auch Extrakte, wie die aus Erdbeeren und Blaubeeren gefunden, deren Chromatogramme keine Matrixpeaks im Bereich von 45 bis 55 mm enthielten. Bei Erdbeeren wurde allerdings eine Sortenabhängigkeit beobachtet.

Aus den beschriebenen Untersuchungen wird deutlich, dass für die meisten pflanzlichen Lebensmittel die Kapazität der HPTLC/AMD nicht ausreicht, Iprodion-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln zu bestimmen. Zur Abtrennung von Matrixbestandteilen sollte der üblichen Aufarbeitung ein weiterer Reinigungsschritt folgen, der möglichst für alle Lebensmittel gleichermaßen effektiv ist. Hierzu wurde im folgenden wurde die RP-HPLC online der HPTLC/AMD vorgeschaltet.



Abbildung 4-55: HPTLC / AMD-Chromatogramme von mit der S19-Methode aufgearbeiteten Lebensmittelproben, Fraktionen 3-4, Remissionsmessung bei 200 nm

a: Kopfsalat, b: Gurke, c: Eisbergsalat, d: Möhren, e: Erdbeeren, f: Tafelbirnen

Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC-AMD

Zur Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD wurde die HPLC mit einem einfachen HPLC-Gradienten Nr. 1 aus Methanol und Wasser betrieben. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Durchflussdetektor bei 230 nm. Iprodion wurde unter den gewählten Bedingungen als symmetrischer Peak nach 41,5 min eluiert. Die HPLC-Trennung wurde nicht für die Iprodion-Bestimmung optimiert, weil sie auch für andere thermolabile Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden sollte.

Für die Untersuchungen mit Iprodion wurde eine Reihe von repräsentativen pflanzlichen Lebensmitteln mit verschiedenen Mengen Iprodion dotiert und nach der Multimethode S19 aufgearbeitet (siehe Abschnitte 3.1.2, 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Die vereinten Fraktionen 3 und 4 der Kieselgel-Fraktionierung wurden eingeengt, der Trockenrückstand in Methanol gelöst und mittels der RP-HPLC chromatographiert. In den Chromatogrammen der HPLC wurde das Iprodion bei vielen der untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln von mitextrahierten

Matrixbestandteilen überlagert. In Abbildung 4-56 ist diese Problematik am Beispiel einer Kopfsalatprobe dargestellt. Die Iprodion enthaltende Fraktion des HPLC-Eluates zwischen 40 und 45 min wurde mit der Kopplungstechnik direkt auf die HPTLC-Platte appliziert und mittels HPTLC/AMD weiter aufgetrennt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 4-57 dargestellt.



Abbildung 4-56: RP-HPLC-Chromatogramme

- a: Kopfsalat dotiert mit 70 ng Iprodion abs.,
- b: Standard 400 ng Iprodion abs.



Abbildung 4-57: HPTLC / AMD-Chromatogramme, Remissionsmessung bei 200 nm

- a: Kopfsalatprobe aus Abbildung 4-56 ohne Online-Kopplung der HPLC
- b: Kopfsalatprobe aus Abbildung 4-56 RP-HPLC-Fraktion zwischen 40 und 45 min aufgetragen durch Online-Kopplung der HPLC
- c: Iprodionstandard 70 ng (100 %) als Vergleichssubstanz direkt aufgetragen

Die Abbildung zeigt außerdem die Chromatogramme von dem parallel chromatographierten Iprodion-Standard und dem ohne vorhergehende HPLC-Trennung direkt auf die HPTLC-Platte applizierten Probenextrakt (Fraktion 3-4). Die erfolgreiche Abtrennung der koextrahierten Lebensmittelinhaltsstoffe wird in dieser Gegenüberstellung der Chromatogramme eindrucksvoll sichtbar. Iprodion war in der mit 0,07 mg/kg dotierten Kopfsalatprobe durch direkte HPTLC / AMD-Trennung nicht sichtbar, hingegen in der gleichen Probe nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD eindeutig nachweisbar und leicht quantifizierbar. Die mit dem HPLC-Eluat auf die HPTLC-Platte mit überführten Lebensmittelinhaltsstoffe wurden durch die HPTLC / AMD vollständig abgetrennt; sie hatten höhere Laufstrecken als das Iprodion. Außerdem ließ sich Iprodion nach der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD auch über sein Remissionsspektrum eindeutig identifizieren (siehe Abbildung 4-58). Zusätzlich wird die Identifizierung des Iprodions durch die Sequenz Fraktionierung an der Minikieselgel-Säule, Gradienten-Elution mit RP-HPLC und HPTLC / AMD erleichtert.



Abbildung 4-58: Vergleich der Remissionsspektren der Kopfsalatprobe (ohne / mit Kopplung) mit einem Iprodion-Spektrum

- a: Remissionsspektrum von Iprodion in der Kopfsalatprobe, direkte HPTLC / AMD-Trennung;
- b: Remissionsspektrum des Iprodion-Standards;
- c: Remissionsspektrum von Iprodion in der Kopfsalatprobe, Trennung durch Online-Kopplung von RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Um den Wert der Online-Kopplung abschätzen zu können, wurde ein Vergleich der Bestimmung von Iprodion in einigen pflanzlichen Lebensmitteln allein durch die Auswertung der HPLC-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 230 nm mit der nach Online-Kopplung auf den HPTLC-Platten vorgenommen. Dieser Versuch ergab, dass die eingesetzte HPLC-Methode für eine quantitative Bestimmung von Iprodion völlig ungeeignet ist, weil die Miterfassung von Lebensmittelinhaltsstoffen als Iprodion zu beträchtlichen Überbefunden führen kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch Optimierung der Trennbedingungen eine HPLC-Methode für Reihenuntersuchungen an einzelnen Lebensmitteln entwickelt werden könnte.

Quantitative Bestimmung und Nachweisgrenze

Die durch Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD für Iprodion erzielten Wiederfindungsraten lagen mit 72 - 107 % für verschiedene Lebensmittelproben, die mit 0,05 und 1 mg/kg dotiert waren, in einen sehr zufriedenstellendem Rahmen. Die geringste bestimmbare Menge betrug 30 ng, die noch ein Signal mit einem für Iprodion spezifischen Spektrum zeigte. Aus den Wiederfindungsversuchen ergab sich eine Bestimmungsgrenze von 0,03 mg/kg, wenn der Extrakt nach der Fraktionierung an der Minikieselgel-Säule entsprechend der Analysenvorschrift in 200 µl Methanol aufgenommen wird. Für pflanzliche Lebensmittel, für die eine Höchstmenge von 0,02 mg Iprodion/kg gilt, muss dagegen die Aufarbeitung modifiziert werden. Die Probenmenge kann entweder auf 50 g erhöht werden oder der Extrakt der üblichen Aufarbeitung muss in 100 µl Methanol gelöst werden.

Die qualitative und quantitative Auswertung der entwickelten HPTLC-Platten erfolgte durch Remissionsmessung. Dazu wurden die einzelnen Chromatogrammbahnen mit Hilfe des Dünnschichtscanners bei 200 nm vermessen. Diese Messanordnung ergab im Bereich der Kalibrierungskurve von 30 bis 400 ng einen linearen Zusammenhang zwischen aufgetragener Wirkstoffmenge und gemessener Fläche; der Arbeitsbereich reichte über eine Zehnerpotenz. In Abbildung 4-59 ist die gute Reproduzierbarkeit der Kalibrierung durch Vergleich von fünf verschiedenen HPTLC-Platten dokumentiert. Alle Kalibrierungen ergaben eine Regressionsgerade, die durch den Nullpunkt geht. Für Routinemessungen ist es somit ausreichend, für jede neue Charge von HPTLC-Platten die Eichgerade zu überprüfen und ansonsten mit Standards der drei Mengen 50, 200 und 400 ng zu quantifizieren.



Abbildung 4-59: Vergleich der HPTLC-Kalibrierung für Iprodion im Bereich von 30 bis 400 ng, Remissionsmessung bei 200 nm

Identifizierung mittels Remmissionsspektren

Die Identifizierung von Iprodion erfolgte über den Vergleich der Remissionsspektren. Das Spektrum von Iprodion weist ein Maximum bei 202 nm und Nebenmaxima bei 216 nm und 234 nm auf. Die Ausprägung dieser Nebenmaxima ist allerdings von der aufgetragenen Iprodion-Menge abhängig. Abbildung 4-60 stellt die Mengenabhängigkeit der Spektren von Iprodion dar.

Dieses Phänomen wird auch bei anderen Substanzen gefunden und ist typisch für Remissionsspektren, die von HPTLC-Platten aufgenommen werden. Außerdem zeigte sich eine Abhängigkeit von der Schichtdicke des Kieselgels [137]. Dieser Effekt kann bei unerfahrenen Analytikern zur Fehlinterpretation führen, wenn das Spektrum einer Bande von mehr als 100 ng Iprodion mit einer Vergleichsprobe von 30 ng Iprodion erkannt werden soll.

Da sich die Rückstandskonzentration aus der gaschromatographischen Screeninganalyse abschätzen lässt, kann eine geeignete Verdünnung für die HPLC-TLC/AMD-Analyse gewählt werden, um den in Abbildung 4-59 dargestellten Konzentrationsbereich zu erreichen. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass bei einer Rückstandskonzentrationen von 10 mg/kg und höher der HPTLC/AMD keine HPLC-Trennung vorgeschaltet werden muss, weil koextrahierte Matrixbestandteile so stark verdünnt werden, dass sie bei der HPTLC/-AMD-Bestimmung nicht mehr stören.



Abbildung 4-60: Abhängigkeit der Remissionsspektren von der applizierten Menge von Iprodion

Zusammenfassung

Durch die zuvor beschriebenen Untersuchungen kann gezeigt werden, dass durch Online-Kopplung HPLC an RP-C18 mit der HPTLC/AMD auf Kieselgel 60 Iprodion im Spurenbereich von mitextrahierten Lebensmittelinhaltsstoffen vollständig abgetrennt werden kann. Diese Trennung konnte ohne aufwändige Optimierungsarbeiten mit universell anwendbaren Gradienten, sowohl für die RP-HPLC als auch für die HPTLC/AMD erreicht werden. Durch Anwendung nur einer der beiden Methoden war die Bestimmung von Iprodion dagegen nicht möglich. Das unterstreicht die große Steigerung der Trennleistung durch Kombination unterschiedlicher Trennprinzipien. Dadurch wird gleichzeitig auch die Nachweissicherheit entscheidend verbessert, so dass in der Routineanalytik meist keine weiteren Absicherungen erforderlich sind.

4.4.3 <u>Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen</u> Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC

Screening mit Gaschromatographie

Im folgenden sollte untersucht werden, ob sich die üblicherweise in der Multimethode S19 zum Nachweis von Pflanzenschutzmittel-Rückständen eingesetzte Gaschromatographie ebenso wie für Iprodion als Screeningmethode für die thermolabilen Benzoylharnstoffe eignet.

Im Abschnitt 4.3.5 wurde gezeigt, dass aus den Benzoylharnstoffe (Ar₁CO-Harnstoff-Ar₂) im gaschromatographischen System durch thermische Zersetzung mehrere charakteristische Bruchstücke gebildet werden, die meist im ECD und auch im NPD detektiert werden können. Es entstand das jeweilige Ar₁CO-Amin und das Ar₂-Isocyanat. Wenn in der Probenlösung Spuren von Wasser enthalten waren, wurde zusätzlich das Ar₂-Amin nachgewiesen. Bei Anwesenheit von Methanol wurden außerdem der jeweilige Ar₁-Carbamatmethylester und der Ar₂-Carbamatmethylester gebildet; nur Triflumuron bildete dabei den Ar₂-Carbamatmethylester und den Ar₁-Methylester.

Auch eine Online-Methylierung mit TMSH verhindert die Thermodegradation der Benzoylharnstoffe nicht. (Die Reaktion ist unter Abschnitt 4.2.1.2 ausführlich beschrieben.) Es konnten methylierte Bruchstücke der Thermodegradation und bei den Benzoylharnstoffen mit Etherbindung außerdem Methylether nachgewiesen werden.

Für ein Screening auf Benzoylharnstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln, die mittels der DFG-Methode S19 untersucht wurden, boten sich als Targetmoleküle das Ar₁CO-Amin (2,6-Difluorbenzoesäureamid bzw. das 2-Chlorbenzoesäureamid) und das jeweilige Ar₂-Isocyanat an. Der Nachweis dieser Moleküle war jedoch sehr unempfindlich, so dass es leicht zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Die in der Multimethode S19 eingesetzte Gaschromatographie kann demzufolge nicht als Screeningmethode für den Nachweis von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln eingesetzt werden.

Sowohl für den Nachweis als auch für die Quantifizierung dieser Substanzen müssen somit flüssigchromatographische Methoden wie HPTLC / AMD eingesetzt werden.

Bestimmung mittels HPTLC / AMD

Für die Bestimmung der Benzoylharnstoff-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1 ppm bis 1 ppm) der Pestizide des Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe) dotiert und nach acetonischer Extraktion mit Dichlormethan einer Flüssig/Flüssig-Verteilung unterzogen. Danach wurden die Extrakte mittels GPC und MKGF (Fraktion 3-4 bzw. 3) aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.1.2, 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Zusätzlich wurde für eine bessere Aufreinigung der Probenextrakte ein Clean-up an einer Amino-Festphase (siehe Abschnitt 3.1.3.3) eingesetzt.

Zur Bestimmung der Pestizide wurde die HPTLC / AMD mit UV-Detektion eingesetzt. Dabei wurde für die Trennung der strukturell sehr ähnlichen Benzoylharnstoffe ein speziell für diese Substanzgruppe entwickelter AMD-Gradient (AMD2-Gradient 6) verwendet.

Der Nachweis der Benzoylharnstoffe wurde durch die Lebensmittelmatrixbestandteile weniger gestört als der von Iprodion (siehe Abschnitt 4.4.2). Zum einen weil die Substanzen ein deutliches und charakteristisches Maximum im Bereich von 252 bis 260 nm besitzen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist aber auch darin zu sehen, dass die Matrixbestandteile der untersuchten Lebensmittel mit dem eingesetzten Laufmittelsystem weitgehend von den Analyten abgetrennt werden konnten; wie in Abbildung 4-61 zu sehen, erscheinen die Benzoylharnstoffe im Laufstreckenbereich von 25 bis 38 mm und die meisten Matrixsubstanzen treten mit Laufstrecken unter 25 mm auf.



Abbildung 4-61: HPTLC / AMD-Trennung von sechs Lebensmittelproben und

Benzoylharnstoff-Standardgemischen

Lebensmittelproben mit der S-19 Methode (Fraktion 3-4) aufgearbeitet, Entwicklung mit AMD2-Gradienten 6 auf einer 0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 260 nm vermessen

a - rote Johannesbeeren, b - schwarze Johannesbeeren, c - Nektarinen,

d - Stachelbeeren, e - Birnen, f - Melonen

Mix 17: je 200 ng Diflubenzuron (1), Chlorfluazuron (3) und Hexaflumuron (5) Mix 18: je 200 ng Flufenoxuron (2), Triflumuron (4) und Teflubenzuron (6) Im oberen Teil der Abbildung sind die Banden der sechs Benzoylharnstoffe erkennbar. Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich deutlich in ihren Laufstrecken, werden aber nicht vollständig getrennt. Da in einem pflanzlichen Lebensmittel in der Regel nur einer der Wirkstoffe zu erwarten ist, kann dieser sicher an Hand der Laufstrecke und des vollständigen Remissionsspektrums erkannt werden. Die aufgetragenen Mengen sind 200 ng je Wirkstoff, das entspricht einer Rückstandskonzentration von 0,5 mg/kg bei Anwendung der beschriebenen Aufarbeitungsmethode.

Quantitative Bestimmung und Nachweisgrenze

Wie bei der Bestimmung von Iprodion-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der RP-HPLC wurden die entwickelten HPTLC-Platten durch Remissionsmessung direkt qualitativ und quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die einzelnen Chromatogrammbahnen mit Hilfe des Dünnschichtscanners bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Benzoylharnstoffe, aufgenommen. Diese Messanordnung ergibt im Bereich der Kalibrierungskurve von 20 bis 200 ng einen linearen Zusammenhang zwischen aufgetragener Wirkstoffmenge und gemessener Fläche; der Arbeitsbereich reichte über eine Zehnerpotenz. Der kleinere lineare Bereich ist auf die größere Empfindlichkeit der Remissionsmessung der Benzoylharnstoffe gegenüber der Remissionsmessung des Iprodions zurückzuführen. Die Kalibrierungsgeraden waren wie bei Iprodion sehr gut reproduzierbar. Die Kalibrierungen ergaben eine Regressionsgerade, die durch den Nullpunkt geht. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit war es für Routinemessungen wie beim Iprodion ausreichend, die Kalibriergerade jede neue Charge von HPTLC-Platten zu überprüfen. Für die quantitative Bestimmung genügte es mit Standards der drei Mengen 50, 100 und 200 ng pro Bande zu arbeiten.

Kontrolle der zulässigen Höchstmenge in Birnen

Als Beispiel für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln im ppm-Bereich wurden Birnen gewählt, da die Höchstwerte für die drei Benzoylharnstoffe Diflubenzuron, Teflubenzuron und Triflumuron in Kernobst auf 1 mg/kg festgesetzt worden sind [107].

Abbildung 4-62 zeigt die Chromatogramme der Fraktion 3-4 von unbehandelten Birnen, mit Benzoylharnstoffen dotierte Birnen und Standardmischungen. Bei einer Rückstandskonzentration von 0,5 mg/kg ließen sich alle sechs Wirkstoffe sicher nachweisen. Die Remissionsspektren der Banden in den Extrakten stimmten mit denen der Standards überein. Eine quantitative Bestimmung war gut möglich; die Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe lagen zwischen 82 und 110 %. Mit 91 % und 127 % wurden ähnliche Werte auch für die Extraktion aus Blumenkohl und anderen pflanzlichen Lebensmittel gefunden. Sie sind in Tabelle 4-33 dargestellt.



Abbildung 4-62: Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Birnen mittels HPTLC / AMD (0,5 mg/kg)

Aufarbeitung mittels DFG-S 19 Methode, Fraktion 3-4, Entwicklung mit AMD1-Gradienten 6 auf einer 0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 260 nm vermessen, je 200 ng Diflubenzuron (1), Flufenoxuron (2), Chlorfluazuron (3), Triflumuron (4, Hexaflumuron (5) und Teflubenzuron (6) entspricht 0,5 mg/kg im Lebensmittel

- a: ohne Dotierung
- b: mit 0,5 mg/kg Benzoylharnstoffen (1, 3, 5) dotiert
- c: mit 0,5 mg/kg Benzoylharnstoffen (2, 4, 6) dotiert
- d: mit 0,5 mg/kg Benzoylharnstoffen (1, 2, 3, 4, 5, 6) dotiert

e: 200 ng je Benzoylharnstoff (1, 2, 3, 4, 5, 6)

Mix 17: 200 ng je Benzoylharnstoff (1, 3, 5,)

Mix 18: 200 ng je Benzoylharnstoff (2, 4, 6)

Substanz	Birnen	Blumenkohl	Champignons	Pfifferlinge
Diflubenzuron	115 %	127 %	98 %	105 %
Triflumuron	96 %	105 %	94 %	99 %
Teflubenzuron	97 %	106 %	98 %	87 %
Flufenoxuron	82 %	101 %	108 %	91 %
Chlorfluazuron	94 %	106 %	102 %	103 %
Hexaflumuron	98 %	107 %	91 %	113 %

 Tabelle 4-33:
 Wiederfindungsraten f
 ür die Benzoylharnstoffe nach HPTLC / AMD

Dotierung 0,5 mg/kg, n = 3

Bei der wesentlich geringeren Rückstandskonzentration von 0,1 mg/kg tritt der Matrixuntergrund stärker hervor, wie aus Abbildung 4-63 ersichtlich wird. In diesem Fall wurden die Birnen mit allen sechs Benzoylharnstoffen dotiert.

Durch Spektrenvergleich von Proben- und Standardbahnen konnten die Substanzen in Birnen eindeutig erkannt werden. Die Wiederfindungsraten, die in Tabelle 4-34 zusammengefasst sind, waren insbesondere für Diflubenzuron viel zu hoch. Bei der Untersuchung von wie Champignons und Pfifferlingen konnten die Benzoylharnstoffe bei einer Dotierung von 0,1 mg/kg nicht mehr nachgewiesen werden. In Blumenkohl konnten dagegen alle Benzoylharnstoffe außer Diflubenzuron bei einer Dotierung von 0,1 mg/kg sicher bestimmt werden.

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass die Rückstandsmenge, die mittels HPTLC / AMD mit UV-Detektion noch nachweisbar ist, nicht nur von der Nachweisgrenze der Methode für die Substanzen abhängig ist sondern auch von der Art der Lebensmittelmatrix. Sie muss somit für jede Lebensmittelmatrix individuell ermittelt werden. Für den Nachweis der Benzoylharnstoffe müssen 5 bis 21 ng (Nachweisgrenzen siehe Tabelle 4-10) auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden. Daraus ergibt sich, dass die aufzutragende Probenmenge umso größer sein muss, je geringer die Rückstandskonzentration im Lebensmittel ist. Die Menge der auf die Platte applizierten Matrixbestandteile verändert sich entsprechend.

In Abbildung 4-64 ist am Beispiel von Pfifferlingen die Abhängigkeit des Nachweises der Benzoylharnstoffe von ihrer Konzentration in der Probe dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden nur die Dotierungen mit Diflubenzuron, Chlorfluazuron und Hexaflumuron dargestellt. Je mehr Matrix aufgetragen wurde, umso mehr stört sie die Chromatographie. Diese Störungen konnten schon im Chromatogramm der Probe mit der höchsten Rückstandskonzentration (0,5 mg/kg; Chromatogramm b) sehr gut erkannt werden. Es kam zu einer leichten Verschiebung der Retentionszeiten der Benzoylharnstoffe. In den Chromatogrammen der Proben mit geringeren Rückstandskonzentrationen (0,25 und 0,1 mg/kg; Chromatogramme d und f aus Abbildung 4-64) dagegen wurden die Benzoylharnstoffe dagegen vollständig von der Probenmatrix überdeckt.

Tabelle 4-34: Wiederfindungsraten f ür die Benzoylharnstoffe nach HPTLC / AMD

Substanz	Birnen	Blumenkohl	Champignons	Pfifferlinge
Diflubenzuron	431 %	229 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Triflumuron	188 %	114 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Teflubenzuron	191 %	136 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Flufenoxuron	163 %	101 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Chlorfluazuron	177 %	96 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Hexaflumuron	187 %	102 %	nicht auswertbar	nicht auswertbar

Dotierung 0,1 mg/kg, n = 2



Abbildung 4-63: Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in Birnen mittels HPTLC / AMD (0,1 mg/kg)

Aufarbeitung mittels DFG-S 19 Methode, Fraktion 3-4, Entwicklung mit AMD1-Gradienten 6 auf einer 0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 260 nm vermessen, a: je 40 ng Benzoylharnstoffstandard Diflubenzuron (1), Flufenoxuron (2),

- Chlorfluazuron (3), Triflumuron (4) Hexaflumuron (5) und Teflubenzuron (6) entspricht 0,1 mg/kg im Lebensmittel
- b: Probenextrakt mit 0,1 mg/kg Benzoylharnstoffen (1, 2, 3, 4, 5, 6) dotiert

Identifizierung mittels Remmissionsspektren

Die Identifizierung der Benzoylharnstoffe erfolgte wie beim Iprodion über den Vergleich der Remissionsspektren von Standard- und Probenbahnen (siehe Abbildung 4-65 und Abbildung 4-68). Die UV-Spektren der Benzoylharnstoffe weisen ein Maximum bei etwa 260 nm auf. Die Ausprägung der Spektren ist wie beim Iprodion von der aufgetragenen Wirkstoffmenge abhängig (ohne Abbildung), denn unterhalb einer bestimmten Stoffkonzentration beeinflusst auch hier der Plattenuntergrund die Spektren. Deshalb ist es besonders wichtig, eine geeignete Verdünnung der Probe zur Analyse einzusetzen, deren aufgetragene Analytmenge im für die HPTLC geeigneten Messbereich von etwa 30 bis 200 ng liegt. Die Wahl der zur Analyse eingesetzten Probenverdünnung wird dadurch vereinfacht, dass bei der Analyse von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln besonders die auf die Einhaltung der in der RHmV [107] festgelegten Höchstmengen (siehe Tabelle 2-5) geachtet werden muss.



Abbildung 4-64: Vergleich von dotierten und undotierten Pfifferlingsproben

Aufarbeitung mittels DFG-S 19 Methode, Fraktion 3-4, Entwicklung mit AMD1-Gradienten 6a (Abweichung vom Gradienten 6: Flasche 2 mit Wasser gesättigt)auf einer0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 260 nm vermessen,Dotierungen mit Mix 17: (1) Diflubenzuron, (2) Chlorfluazuron und (3) Hexaflumuron,Mix 17: je 50 ng Benzoylharnstoffstandarda: 0,100 g Probe,b: Probe b mit 0,50 mg/kg dotiertc: 0,200 g Probe,d: Probe d mit 0,25 mg/kg dotierte: 0,500 g Probe,f: Probe f mit 0,10 mg/kg dotiert

Mit den in Abbildung 4-65 dargestellten Remmissionsspektren soll graphisch verdeutlicht werden, welche Probleme bei einem ungünstigen Probenmatrix-Wirkstoff-Verhältnis bei der Identifizierung eines Analyten durch Remissionsmessung auftreten können. Für zwei unterschiedlich hoch mit Diflubenzuron dotierte Pfifferlingsproben (Chromatogramme siehe Abbildung 4-64.b und d) werden die Spektren der Banden (gleiche Laufstrecke wie Diflu-

benzuron) gezeigt und jeweils parallel dazu das Spektrum des Diflubenzuron-Standards. Bei einer Dotierung von 0,5 mg/kg Diflubenzuron (Abbildung 4-65.1) stimmte das Remissionsspektrum der Extraktbande mit dem Remissionsspektrum des Standards gut überein. Schon bei einer Dotierung von 0,25 mg/kg Diflubenzuron (Abbildung 4-65.2) besaßen die Remissionsspektren der Extraktbande und des Standards keine Ähnlichkeit mehr. Diflubenzuron konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Ursache hierfür war die Überladung der HPTLC-Platte mit Matrixbestandteilen, die durch "Schweifbildung" auch höhere Laufstrecken als bei Nichtüberladung aufwiesen. Um das Verhältnis der Wirkstoff- zur Matrixmenge günstiger zu gestalten, war somit eine Verbesserung der Aufreinigung der Probenextrakte erforderlich.



Abbildung 4-65: Vergleich der Remissionsspektren von dotierten Pfifferlingsproben mit einem Diflubenzuron-Standard; HPTLC / AMD

- 1 Pfifferlingsprobe mit 0,50 mg/kg Diflubenzuron dotiert (aus Chromatogramm b Abbildung 4-64)
- 2 Pfifferlingsprobe mit 0,25 mg/kg Diflubenzuron dotiert (aus Chromatogramm d Abbildung 4-64)
- a: Standardspektrum; b: Probenspektrum

Verbesserung der Nachweisgrenzen durch eine verbesserte Aufreinigung

Zur Verbesserung der Nachweisgrenzen durch eine verbesserte Aufreinigung wurden drei Strategien verfolgt:

- 1. eine verfeinerte Kieselgel-Fraktionierung (Fraktion 3 statt Fraktion 3-4),
- 2. eine zusätzliche Aufreinigung an einer Aminophase (nach Abschnitt 3.1.3.3) und
- 3. die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4-35 am Beispiel von Blumenkohl dargestellt, da dieses pflanzliche Lebensmittel besonders problematische Matrixbestandteile enthält. Wie bereits ausführlich dargelegt, konnten Benzoylharnstoffe ab einer Konzentration von 0,5 mg/kg unabhängig von der Lebensmittelmatrix sicher mittels HPTLC / AMD bestimmt werden. Für Blumenkohl lagen die Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe zwischen 77 und 90 %.

Durch eine verfeinerte Kieselgel-Fraktionierung (Fraktion 3) konnten auch 0,1 mg/kg der Benzoylharnstoffe mit zufriedenstellenden Wiederfindungsraten von 65 bis 118 % bestimmt werden.

Durch zusätzliche Aufreinigung des Kieselgel-Eluats, durch eine Filtration über eine Amino-Festphase, gelang es 0,05 mg/kg der Benzoylharnstoffe mit zufriedenstellenden Wiederfindungsraten von 71 bis 101 % zu analysieren.

Erst durch Kombination aller Aufreinigungsmethoden mit der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD konnten für die Benzoylharnstoffe bei einer Dotierung von 0,01 mg/kg zufriedenstellende Wiederfindungsraten zwischen 69 und 128 % erreicht werden.

Tabelle 4-35:Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach verbesserterAufreinigung der Lebensmittelextrakte, am Beispiel von Blumenkohl

Aufreinigung	ohne Fraktion 3-4 [*]	1 Fraktion 3 [*]	2 Fraktion 3 [*] , RP-NH ₂ ^{**}	3 Fraktion 3 [*] , RP-NH ₂ ^{**}
Kopplung mit HPLC	nein	nein	nein	ja
Dotierung	0,5 mg/kg	0,1 mg/kg	0,05 mg/kg	0,01 mg/kg
Diflubenzuron	82 %	101 %	101 %	94 %
Triflumuron	79 %	72 %	91 %	128 %
Teflubenzuron	88 %	118 %	84 %	78 %
Flufenoxuron	81 %	85 %	71 %	69 %
Chlorfluazuron	77 %	74 %	74 %	81 %
Hexaflumuron	90 %	65 %	94 %	120 %

(n = 3)

* Minikieselgel-Fraktionierung

** Festphasenextraktion mit einer Aminophase

Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC / AMD

Durch die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD konnte ein erheblicher Teil der Matrixbestandteile abgetrennt werden, so dass eine größere Probenmenge auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden konnte. Auf diese Weise konnten für die Benzoylharnstoffe auch bei einer Dotierung von 0,1 mg/kg zufriedenstellende Wiederfindungsraten zwischen 62 und 110 % erreicht werden. Die einzelnen Ergebnisse der Untersuchung unterschiedlicher pflanzlicher Lebensmittel sind in Tabelle 4-36 zusammengefasst. Für diese Analysen wurden die vereinten Kieselgel-Fraktionen 3 und 4 der DFG-S19-Methode eingesetzt, d. h., die Probenextrakte wurden keiner verbesserten Aufreinigung unterzogen.

Tabelle 4-36:Wiederfindungsraten für die Benzoylharnstoffe nach Online-
Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Substanz	Birnen	Blumenkohl	Champignons	Pfifferlinge
Diflubenzuron	89 %	82 %	62 %	80 %
Triflumuron	110 %	79 %	78 %	66 %
Teflubenzuron	93 %	88 %	82 %	76 %
Flufenoxuron	82 %	81 %	76 %	73 %
Chlorfluazuron	89 %	77 %	77 %	68 %
Hexaflumuron	95 %	90 %	70 %	90 %

Dotierung 0,1 mg/kg, (n = 3)

Zur Veranschaulichung der Aufreinigungsleistung der RP-HPLC sind in Abbildung 4-66 die Chromatogramme der HPLC-Fraktionen einer dotierten Pfifferlingsprobe dargestellt.

Die Probe wurde mit 0,1 mg/kg der Benzoylharnstoffe Diflubenzuron, Chlorfluazuron und Hexaflumuron dotiert und mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD analysiert. Es handelt sich um den Extrakt, dessen Chromatogramm der alleinigen HPTLC / -AMD-Untersuchung in Abbildung 4-64.f dargestellt ist. Durch Vergleich beider Abbildungen wird deutlich, dass durch die zweidimensionale Verknüpfung der zwei sehr unterschiedlichen Trennprinzipien eine Abtrennung der Matrix von den Wirkstoffen erreicht wurde. Die Benzoylharnstoffe wurden in fünf Fraktionen^a von der RP-HPLC-Säule eluiert, was zu ihrer Erkennung zusätzlich genutzt werden kann. Die Matrixanteile sind in den Bahnen der

^a Im optimierten System wurde das HPLC-Eluat der Benzoylharnstoffe in zwei Fraktionen auf die HPTLC-Platte aufgetragen (siehe Abschnitt Optimierung der RP-HPLC).

Fraktionen deutlich reduziert, wodurch die quantitative Bestimmung sehr viel reproduzierbarer wird. Die Reinigungsleistung der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / -AMD ist mit der Reinigungsleistung der Filtration der Kieselgel-Fraktion 3 aus der MKGF (DFG-S19-Methode) über eine Aminophase vergleichbar. Ihr Vorteil ist die höhere Selektivität des chromatographischen Systems gegenüber der alleinigen HPTLC / AMD und der damit verbundenen höheren Sicherheit bei der Identifizierung der Analyten.



Abbildung 4-66: Bestimmung von Benzoylharnstoffen in Pfifferlingen mittels Online-

Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Pfifferlinge dotiert mit einem Benzoylharnstoff-Mix Mix 17:, 0,1 mg/kg, Aufarbeitung mittels DFG-S 19 Methode, Fraktion 3-4, Entwicklung mit HPLC-Gradient 1 und AMD1-Gradienten 6 auf einer 0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 260 nm vermessen, Fraktioniert mit HPLC-Säule 1, geschnitten bei 24,0 - 50,0 min, mit AMD2-Gradienten

6 entwickelt, bei 260 nm vermessen,

a: Mix 17 - 50 ng je (1) Diflubenzuron, (2) Chlorfluazuron und (3) Hexaflumuron,

b-f: Fünf HPLC-Fraktionen der dotierten Pfifferlinge, zum Vergleich siehe Chromatogramm der alleinigen HPTLC / AMD-Untersuchung in Abbildung 4-64.f

Abschließend soll erwähnt werden, dass die kritische Höchstmenge von 0,01 mg/kg auch durch Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD nicht nachweisbar war. Sie konnte erst erreicht werden, wenn der Lebensmittelextrakt vor der chromatographischen Analyse bestmöglichst aufgereinigt wurde. Die gelang durch Filtration der Kieselgel-Fraktion 3 aus der MKGF (DFG-S19-Methode) über eine Aminophase. Die dabei für die Benzoylharnstoffe erhaltenen Wiederfindungsraten sind bereits in Tabelle 4-35 am Beispiel der Untersuchung von Blumenkohl wiedergegeben. Die Lebensmittelextrakte müssen vor der Online-Kopplung neben der MKGF (Fraktion 3) durch Filtration an einer Aminophase aufgereinigt werden.

Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffen mittels Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD

Als eine weitere Möglichkeit, gut aufgereinigte Probenextrakte für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPTLC/AMD zu erhalten, sollte die Kopplung einer GPC-HPLC mit der HPTLC/AMD untersucht werden. Dahinter stand die Idee, die üblicherweise in der DFG-S19-Methode verwendete präparative GPC unter Verzicht der MKGF durch eine analytische GPC zu ersetzen und somit die Analysenzeit sowie den Arbeitsaufwand für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln erheblich zu verringern. Das Eluat der analytischen GPC sollte online auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden.

Für diese Untersuchungen wurden die Proben mit je 1 mg/kg Iprodion und den Pestiziden des Mix 17 und Mix 18 (Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe) dotiert und nach acetonischer Extraktion einer Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan unterzogen. Der nach Entfernung des Dichlormethans erhaltene Extraktrückstand wurde in 2 ml einer Ethylacetat / Cyclohexan-Mischung (1+1) gelöst. Dieser Probenextrakt wurde mit Natriumsulfat sorgfältig getrocknet und filtriert. Davon wurden 10 µl direkt auf die GPC-HLPC gegeben. Als stationäre Phase diente eine 100-Å-Säule, die mit einem Ethylacetat / Cyclohexan-Gemisch als mobiler Phase betrieben wurde.

Abbildung 4-67 zeigt die HPTLC-Chromatogramme der mittels GPC Fraktionen einer Blumenkohl-Probe, die 1 mg/kg je Benzoylharnstoff und Iprodion dotiert war. Parallel dargestellt sind die Chromatogramme einer entsprechend fraktionierten Standardmischung. Es wird deutlich, dass die mit auf die HPTLC-Platte übertragenen Matrixbestandteile mit Laufstrecken bis maximal 30 mm in ausreichenden Maße von den Benzoylharnstoffen abgetrennt werden. Der Vergleich mit Abbildung 4-61 zeigt, dass die analytische GPC und die präparative GPC die lipoiden Matrixbestandteile der Probenextrakte in gleichem Maße abtrennen.

Unter den gewählten, für die Benzoylharnstoffe optimierten Bedingungen konnte Iprodion (Laufstrecke 18 mm) nicht in pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen werden, da die Lebensmittelmatrix den Iprodion-Peak überdeckte. Die Trennung der Benzoylharnstoffe in zwei Fraktionen erwies sich wie bereits in Abschnitt 4.3.4.3 dargelegt als sehr kritisch. Aufgrund der geringen Retentionsunterschiede wurden die Pestizide der Fraktion 1, Flufenoxuron, Chlorfluazuron und Hexaflumuron zu einem kleinen Teil (weniger als 5 %) auch in die Fraktion 2 geschnitten. Daraus resultierte im Vergleich zur präparativen GPC eine geringere Präzision des Verfahrens (siehe Tabelle 4-34 und Tabelle 4-37). Die in Tabelle 4-37 zusammengefasste Ergebnisse für mit 1 mg/kg dotierten Apfel-, Champignon-, Birnen- und Blumenkohl-Proben zeigen jedoch, dass die Richtigkeit des Verfahrens mit 73 bis 113 % bei einer Präzision von 3 bis 21 % ausreichend ist Benzoylharnstoffe im ppm-Bereich mittels Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD sehr schnell und sicher zu bestimmen.



Abbildung 4-67: Bestimmung von Benzoylharnstoffen in Blumenkohl mittels Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD

Dotierung 1 mg/kg, HPLC: 100-Å–Säule, 200 µl/min Ethylacetat /Cyclohexan, geschnitten bei 15,72 min - 17,43 min und 17,43 - 20,77 min, mit AMD2-Gradienten 7 entwickelt, bei 260 nm vermessen,

- Bahn 1 und 2: dotierte Blumenkohl-Probe fraktioniert
- Bahn 3 und 4 100 ng abs. je Standard fraktioniert (Pestizide 1 bis 7 in Mix 17 und Mix 18 = Standardmixe für die Bestimmung der Benzoylharnstoffe),
- 1 Flufenoxuron, 2 Chlorfluazuron, 3 Hexaflumuron, 4 Diflubenzuron;
- 5 Triflumuron, 6 Teflubenzuron, 7 Iprodion

Tabelle 4-37:Wiederfindungen für die Benzoylharnstoffe nach Online-Kopplung
der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD

	Äpfel		Champignons		Birnen		Blumenkohl	
	MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK
Diflubenzuron	106 %	3 %	92 %	5 %	76 %	16 %	89 %	19 %
Flufenoxuron	94 %	15 %	78 %	10 %	78 %	16 %	79 %	14 %
Chlorfluazuron	94 %	19 %	80 %	4 %	77 %	13 %	76 %	20 %
Triflumuron	103 %	21 %	76 %	3 %	73 %	3 %	80 %	16 %
Hexaflumuron	113 %	11 %	81 %	4 %	76 %	13 %	76 %	13 %
Teflubenzuron	81 %	9 %	90 %	6 %	75 %	9 %	79 %	17 %

Dotierung 1 mg/kg, n = 3

Stellvertretend für die untersuchten pflanzlichen Lebensmittel werden in Abbildung 4-68 die Remissionsspektren der Benzoylharnstoffe in der Blumenkohl-Probe aus Abbildung 4-67 denen der Standardsubstanzen gegenübergestellt. Sie zeigen jeweils eine gute Übereinstimmung, so dass eine Identifizierung der einzelnen Substanzen möglich war.

Zusammenfassung

Für die Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln erwies sich die Technik der Dünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (HPTLC / AMD) als geeignet. Zur Bestimmung von Rückständen im ppm-Bereich konnten die durch die üblicherweise in der Pestizidanalytik eingesetzte DFG-S19-Methode gewonnenen Extrakte problemlos eingesetzt werden. Lediglich bei der angewandten präparativen GPC muss einer Anpassung an die Analyten erfolgen. Zur Erfassung von Rückstandskonzentrationen unterhalb von 0,5 mg/kg war eine zusätzliche Aufreinigung der Extrakte erforderlich. Diese konnte durch eine feiner abgestufte Fraktionierung bei der MKGF und durch zusätzliche Filtration des Extraktes über eine Aminophase erreicht werden.

Besonders elegant gelang die Aufreinigung der Extrakte durch Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD. Um jedoch die kritische Höchstmenge von 0,01 mg/kg sicher bestimmen zu können, war es auch hierbei notwendig die Probenextrakte zuvor durch hintereinandergeschaltete Festphasenextraktion besonders gut aufzureinigen.

Durch Online-Kopplung einer GPC-HPLC mit der HPTLC/AMD konnte das gesamte Analysenverfahren erheblich verkürzt werden. Diese Vorgehensweise erwies sich zur Bestimmung von Rückstandskonzentrationen im ppm-Bereich als geeignet. Für niedrigere



Konzentrationen war die oben beschriebene aufwendigere Aufreinigung der Probenextrakte notwendig.

Abbildung 4-68: Vergleich von Remissionsspektren von Benzoylharnstoffstandards und Benzoylharnstoffe in Blumenkohl nach Online-Kopplung der GCP-HPLC mit der HPTLC /AMD

Blumenkohlprobe dotiert mit 1 mg/kg, Chromatogramm siehe Abbildung 4-67 4 Flufenoxuron;

mit 1 Diflubenzuron; 2 Triflumuron;

3

- Chlorfluazuron; 5
- Teflubenzuron;
- 6 Hexaflumuron; a - Standardspektrum; b - Probenspektrum

Vergleich der HPTLC / AMD-Analytik für Benzoylharnstoffe und Iprodion

Durch die Untersuchung von Benzoylharnstoffen und Iprodion mit der HPTLC/AMD-Technik konnte der große Einfluss der gewählten Aufarbeitungsmethode, der AMD-Gradienten und der Messwellenlänge auf die Qualität des Analysenergebnisses gezeigt werden.

Zur Bestimmung von Iprodion, dessen UV-Maximum bei 202 nm liegt, musste die Messwellenlänge von 200 nm gewählt werden. Bei dieser Wellenlänge wird die Analyse durch Probenmatrixbestandteile erheblich stärker gestört als bei 260 nm, mit der die Benzoylharnstoffe erfasst werden können.

Obwohl für die Trennung von Iprodion und Benzoylharnstoffen von den Lebensmittelmatrixbestandteilen optimierte Gradienten (Iprodion: AMD2-Gradient 4 und Benzoylharnstoffe: AMD1-Gradient 6 und 7) eingesetzt wurden, gelang es häufig nicht Iprodion von den Matrixbestandteilen in ausreichenden Maße zu trennen.

Die unterschiedliche Selektivität und Polarität der eingesetzten für das jeweilige Trennproblem optimierte AMD-Gradienten hatten aufgrund der Verwendung von Dichlormethan (Iprodion AMD1-Gradient 4) und Toluol (Benzoylharnstoffe AMD2-Gradient 6 und 7) als Basisfließmittel Einfluss auf die störungsfreie Analytik. Bei der Bestimmung von Iprodion konnten oft die Matrixbestandteile nicht vom Analyten abgetrennt werden. Bei den Benzoylharnstoffen wurde die Matrix zum großen Teil von den Analyten abgetrennt. Deshalb konnten die Benzoylharnstoffe gut von den Matrixbestandteilen getrennt werden, wenn die Rückstandskonzentration bei mindestens 0,5 mg/kg lag. Die bei der Bestimmung niedriger Rückstandskonzentrationen erhöhte Probenmenge führte zu einer Überladung der HPTLC-Platte mit Matrixbestandteilen, die dann durch "Schweifbildung" die Erfassung der Benzoylharnstoffe störten.

Der Vorteil der besseren Abtrennung der Matrixbestandteile auf der HPTLC-Platte wird aber teilweise wieder aufgehoben, weil die Aufreinigung des Lebensmittelextraktes mittels präparativer GPC bei der Benzoylharnstoffanalytik geringer ist als die Aufreinigung des Lebensmittelextraktes mittels GPC bei der Iprodionanalytik. (siehe Abschnitt 4.1.2.1) Aus diesem Grund kann bei der Benzoylharnstoffanalytik die HPTLC-Platte schneller überladen werden, die zu große Matrixmenge bildet während der AMD-Entwicklung einen "Schweif", der dann die Analyten überlagert. Aus den genannten Gründen ist Iprodion erst ab etwa 10 mg/kg ohne Kopplung gut analysierbar, aber aufgrund der geringeren Matrixbelastungen gab es keine Probleme bei der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD.

Die Benzoylharnstoffe sind schon ab 0,5 mg/kg ohne Kopplung gut analysierbar. Die Kopplung ist aber problematischer, weil auf die RP-HPLC mehr Matrix aufgegeben werden muss. Deshalb wird bei der Benzoylharnstoffanalytik im Gegensatz zur Iprodionanalytik mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD die verwendete RP-Säule mehr beansprucht.

4.4.4 <u>Bestimmung von ausgewählten Fungizidrückständen in pflanzlichen</u> Lebensmitteln mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC

Screening mit Gaschromatographie

Zur Bestimmung von ausgewählten Fungiziden aus der Gruppe der basischen Pestizide sollte zunächst die Eignung der Gaschromatographie als Screening-Methode zum Auffinden der Substanzen geprüft werden.

Die Pestizide Myclobutanil, Procymidon, Tebuconazol ließen sich erwartungsgemäß unzersetzt gaschromatographieren. Sie werden üblicherweise nach Aufarbeitung mit der Multimethode S19 mittels GC / ECD / NPD nachgewiesen. Das basische Pestizid Imazalil zersetzte sich im gaschromatographischen System und zeigte im ECD ein dem Iprodion ähnliches Peakmuster mit starkem Tailing. Das basische Fungizid Thiabendazol konnte als tailender Peak detektiert werden. Im Unterschied dazu erwies sich Carbendazim als nicht gaschromatographierbar. Die anderen ausgewählten Pestizide, Bitertanol, Oxadixyl, Prochloraz, Triadimefon und Triadimenol, verhielten sich ähnlich wie die Benzoylharnstoffe. Sie waren unter den gegebenen Bedingungen nicht unzersetzt gaschromatographierbar.

Bestimmung mittels Online-Kopplung von RP-HPLC mit HPTLC-AMD

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass für die quantitative Bestimmung von Imazalil, Thiabendazol und Carbendazim ein chromatographisches System eingesetzt werden sollte, mit dem die Substanzen unzersetzt erfasst werden können. Dazu sollte im folgenden die HPTLC / AMD und ihre Kopplung mit der RP-HPLC zur Anwendung kommen. Um ein Analysenverfahren zur Verfügung zu haben, mit dem alle kritischen Pestizide der dünnschichtchromatographischen Trennung erfasst werden können, wurden in dieser Untersuchung auch Myclobutanil, Procymidon, Tebuconazol einbezogen. In erste Voruntersuchungen ließen sich Rückstände von allen Substanzen außer Imazalil mittels HPTLC / AMD in pflanzlichen Lebensmitteln nachweisen. Der Imazalil-Peak wurde immer von Matrixbestandteilen überlagert. Weder eine weitere Aufreinigung der Probenextrakte noch eine Untergrundkompensation bei der Detektion verbesserten die Analytik für Imazalil, so dass dieses Pestizid unter den gewählten chromatographischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Nachweis von Carbendazim- und den anderen untersuchten Fungizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln war nach basischer Extraktion und Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan mittels Online-Kopplung von RP-HPLC und HPTLC / AMD gut möglich.

Die parallele Untersuchung einer dotierten Apfelprobe durch direkte HPTLC /AMD ergab, dass zur vollständigen Trennung aller in die Analyse einbezogenen Fungizide die Online-Kopplung von RP-HPLC mit der HPTLC / AMD erforderlich ist. Die für diese Untersuchung eingesetzte Apfelprobe enthielt die Substanzen der Standardmischung Mix 2 und Mix 3 (Standardmixe für die Bestimmung der basischen Fungizide, siehe Abschnitt 3.5.1) in einer Konzentration von je 1 mg/kg.

Abbildung 4-69 zeigt die Chromatogramme der direkt auf die HPTLC-Platte applizierten Apfelprobe sowie die der fünf durch RP-HPLC gewonnenen Fraktionen der selben Probe. (Zur Gewinnung der Fraktionen wurde das HPLC-Eluat wie in Abschnitt 4.3.4.2 beschrieben von 17,5 bis 54,0 min in fünf Fraktionen auf die Kieselgel-Platte aufgetragen.) Die HPLC-Bedingungen wurden so gewählt, dass alle bei der HPTLC-Trennung kritischen Paare nach der HPLC-Trennung in verschiedenen Fraktionen erschienen. Beispielsweise wurden die drei Fungizide Oxadixyl (9), Tebuconazol (4) und Myclobutanil (5), die in der HPTLC / AMD-Trennung kritische Paare bildeten, in drei verschiedenen RP-HPLC-Fraktionen eluiert. Ebenso ließen sich Carbendazim (2), Prochloraz (7) und Triadimenol (8) mittels RP-HPLC gut trennen.

Die für die einzelnen Substanzen bei dieser Untersuchung erreichten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 4-38 zusammengefasst. Sie lagen mit 51 bis 81 % in einem zufriedenstellenden Bereich. Das Fungizid Thiabendazol konnte durch Online-Kopplung von RP-HPLC mit der HPTLC / AMD nicht nachgewiesen werden, da es im verwendeten HPLC-System sehr stark retardiert wurde, wodurch es nicht reproduzierbar von der Säule eluierte.



Abbildung 4-69: HPTLC / AMD-Chromatogramme einer Apfelprobe

Äpfel dotiert mit Standardmixe für die Bestimmung der basischen Fungizide Mix 2 und Mix 3: 1 mg/kg, nach basischer Extraktion und Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan mittels Online-Kopplung von RP-HPLC und HPTLC / AMD analysiert, entwickelt mit HPLC-Gradient 2 (HPLC-Säule 1) und AMD2-Gradienten 1 auf einer 0,2-mm-Kieselgel-60-Platte F 254, bei 200 nm vermessen

- Mix 2: 200 ng je Thiabendazol (1), Carbendazim (2), Bitertanol (3), Tebuconazol (4), Myclobutanil (5), Triadimefon (6),
- Mix 3: 200 ng je Prochloraz (7), Triadimenol (8), Oxadixyl (9), Procymidon (10) a Apfelprobe ohne Kopplung, 1 mg/kg dotiert
- b-f Apfelprobe nach HPLC-HPTLC / AMD-Kopplung; b 17,5 26,0 min, c –
- 26,0- 40,0 min, d 40,0 44,3 min, e 44,3 48,4 min, f 48,4 54,0 min

Tabelle 4-38:Wiederfindungsraten für die Fungizide nach Online-Kopplung derRP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Substanz	Mittelwert $(n = 3)$	Variationskoeffizient
Bitertanol	81 %	9 %
Carbendazim	77 %	10 %
Myclobutanil	78 %	12 %
Oxadixyl	66 %	15 %
Prochloraz	51 %	24 %
Procymidon	81 %	9 %
Tebuconazol	80 %	6 %
Triadimefon	71 %	8 %
Triadimenol	79 %	9 %

Apfelprobe, Dotierung 1 mg/kg

Bestimmung mittels HPTLC / AMD

Thiabendazol konnte aber in vielen Lebensmittelmatrices ebenso wie Carbendazim und Bitertanol durch direkte HPTLC-AMD identifiziert und quantifiziert werden, wenn die Rückstandskonzentration im ppm-Bereich lag. Aufgrund ihrer charakteristischen Spektren (vergleiche Tabelle 4-14) mit Absorptionsmaxima bei 301, 276 und 254 nm wurde ihre Detektion nur geringfügig von Lebensmittelmatrixbestandteilen beeinflusst, da die meisten Lebensmittelinhaltsstoffe im niedrigeren Wellenlängenbereich absorbieren. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4-70 dargestellt. Es sind die Remissionsspektren der drei Fungizide jeweils als Standard und in den Lebensmittelextrakten von Äpfeln, Champignons, Erdbeeren und Pflaumen dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Spektren der Substanzen in dotierten Lebensmittelproben eine gute Übereinstimmung mit den Standardspektren aufweisen und keine Störungen durch die Matrixbestandteile auftreten. Überbefunde durch coextrahierte Lebensmittelinhaltsstoffe sind daher nicht zu befürchten. Die Wiederfindungen für die mit je 1 mg/kg dotierten Lebensmittelproben lagen für die Fungizide Thiabendazol, Carbendazim und Bitertanol zwischen 42 % und 80 % (Tabelle 4-39).



Abbildung 4-70: Vergleich von Remissionsspektren von Fungizidstandards und Fungiziden in Lebensmitteln

0

- 1 Remissionsspektren der Standards (je 200 ng);
- 2 Spektrenvergleich von Thiabendazol (je 200 ng);
- 3 Spektrenvergleich von Carbendazim (je 200 ng);
- 4 Spektrenvergleich von Bitertanol (je 200 ng);
- a Thiabendazol, b Carbendazim, c Bitertanol, d Äpfel 1 mg/kg dotiert,
- e Champignons 1 mg/kg dotiert, f Erdbeeren 1 mg/kg dotiert, g Pflaumen 1 mg/kg dotiert

Tabelle 4-39:Wiederfindungsraten für Thiabendazol, Carbendazim und
Bitertanol nach HPTLC / AMD

Dotierung 1 mg/kg, verschiedene Lebensmittelproben

(n = 3)	Äpfel	Champignons	Erdbeeren	Pflaumen	Zitronen
Thiabendazol	65%	42%	59%	58%	*
Carbendazim	62%	53%	67%	50%	*
Bitertanol	63%	80%	76%	53%	56%

* Überlagerung des Pestizidpeaks mit der Matrix

Bei sogenannten Problemlebensmitteln wie Zitronen kommt es auch im Wellenlängenbereich zwischen 240 und 300 nm zu Störungen. Dabei erweist sich die Bestimmung von Thiabendazol als besonders problematisch. Bei der Untersuchung von Zitronen, die mit 1 mg/kg Standardmischung Mix 1 (Standardmix für die Bestimmung der basischen Fungizide, siehe Abschnitt 3.5.1) dotiert waren, wurde festgestellt, dass Thiabendazol bei der dünnschichtchromatographischen Trennung ein kritisches Paar mit einem Lebensmittelinhaltsstoff bildet und infolgedessen nicht sicher identifiziert werden kann. Der in Abbildung 4-71.2 gezeigte Spektrenvergleich demonstriert dies. Erst nach Aufnahme des Spektrums mit Untergrundabzug in der Nähe des untersuchten Peaks, d. h. im vermuteten Peakmaximum der Verunreinigung (Spektrum 2.dd), konnte Thiabendazol nachgewiesen werden. Die schon von Stan und Dethlefs [30] beschriebene Methode des gezielten Untergrundabzugs ist sehr zeitaufwendig, da jedes Spektrum manuell und separat aufgenommen werden muss. Darüber hinaus ist eine Quantifizierung unter diesen Bedingungen nicht möglich, da die Lebensmittelmatrix das Ergebnis stark verfälscht.



Abbildung 4-71: Vergleich von Remissionsspektren von Fungizidstandards und Fungiziden in Zitronen, HPTLC / AMD und Online-Kopplung der RP-HPLC mit HPTLC / AMD

- 1 Spektrenvergleich von Carbendazim ohne Kopplung
- 2 Spektrenvergleich von Thiabendazol ohne Kopplung
- 3 Spektrenvergleich von Carbendazim mit Kopplung
- 4 Spektrenvergleich von Bitertanol ohne Kopplung

a – Thiabendazol, b – Carbendazim, c – Bitertanol, d – Zitrone 1 mg/kg dotiert – HPTLC / AMD ohne Kopplung mit der RP-HPLC, da – am Anfang des Peaks gemessen, dm – in der Mitte des Peaks gemessen, de – am Ende des Peaks gemessen, dd – Spektrum nach speziellen Untergrundabzug, e – Zitronen 1 mg/kg dotiert Online-Kopplung RP-HPLC mit HPTLC / AMD, ea - am

Anfang des Peaks gemessen, em – in der Mitte des Peaks gemessen

Auch Carbendazim-Rückstände in Zitronen konnten ohne Online-Kopplung mit der RP-HPLC nicht sicher nachgewiesen oder quantifiziert werden. Das in Abbildung 4-71.1 dargestellte Carbendazim-Spektrum in der Lebensmittelprobe war nur andeutungsweise erkennbar und zeigte eine Verunreinigung mit einem Maximum bei 315 nm. Diese konnte durch speziellen Untergrundabzug teilweise eliminiert werden (Abbildung 4-71, Spektrum 1.dd), so dass sich der Verdacht auf Anwesenheit von Carbendazim in der Probe erhärtete.

Durch Kopplung der HPTLC / AMD mit der RP-HPLC konnte Carbendazim jedoch sicher identifiziert und auch quantifiziert werden, obwohl auch durch vorgeschaltete HPLC die Verunreinigung nicht vollständig entfernt werden konnte. Vergleicht man die in Abbildung 4-71.3 dargestellten Spektren, die am Anfang und im Maximum des Peaks aufgenommen wurden, wird die Verunreinigung am Peakanfang sichtbar. Im Maximum des Peaks störte die Verunreinigung die Detektion von Carbendazim nicht, so dass sicher identifiziert und quantifiziert werden konnte.

Die Bestimmung von Bitertanol bereitete keine Schwierigkeiten. Wie in Abbildung 4-71.4 dargestellt, konnte diese Substanz sowohl mit als auch ohne Kopplung der HPTLC / AMD mit der RP-HPLC in Zitronen sicher identifiziert und quantifiziert werden.

Bei einer Rückstandskonzentration von 5 mg/kg konnten Thiabendazol, Carbendazim und Bitertanol in Zitronen auch mit Hilfe der HPTLC / AMD ohne Online-Kopplung mit der RP-HPLC bestimmt werden. Die aufzutragende Probenmenge musste in so geringen Mengen auf die HPTLC-Platte appliziert werden, so dass die coextrahierenden Lebensmittelinhaltsstoffe die Bestimmung der Analyten nicht störten.

Zusammenfassung

Der Nachweis der mittels HPTLC / AMD untersuchten basischen Pestizide ist nach basischer Extraktion und LLE mit Dichlormethan möglich.

Zur Erhöhung der Trennleistung war die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD eine geeignete Methode. Unter den gewählten Bedingungen konnten alle basischen Pestizid-Rückstände außer Thiabendazol und Imazalil in pflanzlichen Lebensmitteln im ppm-Bereich bestimmt werden.

Thiabendazol konnte nach Online-Kopplung nicht nachgewiesen werden, da es unreproduzierbar an der RP-HPLC-Säule retardiert. Sein Nachweis ist aber aufgrund seines spezifischen Spektrums ohne Kopplung gut möglich. Carbendazim und Bitertanol mit ebenfalls spezifischen UV-Spektren sind auch ohne Kopplung nachweisbar. Um die Empfindlichkeit und die Spezifität der Rückstandsbestimmung insbesondere von Carbendazim und Thiabendazol zu verbessern, wurden zwei biologische Detektionsmethoden nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf HPTLC-Platten im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die biologische Detektion von Pestiziden mit Leuchtbakterien ist eine sehr schnelle Methode. Mit ihr konnten die untersuchten Pestizide aber lediglich ähnlich empfindlich wie nach einer UV-Detektion nachgewiesen werden. Damit ist diese Detektion nicht besser als die UV-Detektion geeignet, die untersuchten Pestizid-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln zu bestimmen, da nicht davon ausgegangen werden kann, das die biologische Detektion mit Leuchtbakterien spezifischer als die UV-Detektion ist.

Die zweite biologische Detektionsmethode, die Bioautographie mit Schimmelpilzen benötigt für den Nachweis der Fungizide 48 Stunden, da auf die HPTLC-Platten Pilzsporen aufgetragen werden, die nach zwei Tagen einen gleichmäßigen Pilzrasen bilden. Die Analysenzeit wird auf 30 Stunden verkürzt, wenn das Pilzmyzel vor Sporenbildung angefärbt wird. Da die Hemmung der Pilze sehr spezifisch ist, kann auf die zeitaufwendigere AMD-Entwicklung verzichtet werden.

Mit Penicillium roqueforti konnten sechs von zwölf untersuchten Fungizide, Carbendazim, Imazalil, Prochloraz, Tebuconazol Myclobutanil, Thiabendazol, und empfindlich nachgewiesen werden (0,5 bis 10 ng). Damit konnten alle sechs Fungizide mit Ausnahme von Thiabendazol mittels Bioautographie mit Schimmelpilzen empfindlicher als bei der UV-Detektion nachgewiesen werden. Imazalil, das aufgrund der Überlagerung mit der Matrix in der HPTLC / AMD nach UV-Detektion nicht nachweisbar war, konnte nach Bioautographie mit Schimmelpilzen gut bestimmt werden. Da eine halbquantitative Bestimmung der Fungizide möglich ist, wurde die Bioautographie mit Schimmelpilzen nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf HPTLC-Platten mit der ECD / NPD-Detektion nach gaschromatographischer Trennung bei realen Lebensmittel-Proben verglichen. Es wurden außer in einem Fall vergleichbare Mengen der Fungizide nachgewiesen.

Damit ist die Bioautographie mit Schimmelpilzen geeignet, Fungizide in pflanzlichen Lebensmitteln nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung empfindlich und spezifisch nachzuweisen.

Alternativ zur HPTLC / AMD sollte geprüft werden, ob Carbendazim- und Thiabendazol-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln nach Pentafluorbenzylierung bestimmt werden können. Carbendazim und Thiabendazol können neben ausgewählten Carbamaten
empfindlich und spezifisch nachgewiesen werden. Wegen eventuell auftretende Matrixeffekte muss die Bestimmung mittels Standardadditionskalibrierung durchgeführt werden. Ein Vergleich des Zeitaufwandes für die Bestimmung von Carbendazim-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln ergab, dass der Arbeitsaufwand bei der HPTLC / AMD mit UV-Detektion gegenüber der GC / MS nach Pentafluorbenzylierung um bis zur Hälfe geringer ist.

4.4.5 <u>Analytik biologisch aktiver Naturstoffe</u>

Im vorliegenden Kapitel wurde die Eignung der HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC zur Analytik biologisch aktiver Naturstoffe untersucht.

Zur Bestimmung biologisch aktiver Naturstoffe werden üblicherweise Extrakte von naturstoffproduzierenden Organismen (Pflanze, Mikroorganismen oder Tiere) mittels HPLC fraktioniert, diese Fraktionen dann auf ihre biologische Aktivität (Bioassay) untersucht und sogenannte Aktivitätsprofile aufgestellt. Gleichzeitig mit der Fraktionierung erfolgt eine Online-Spektroskopie (UV / MS). Abschließend werden die biologisch aktiven Stoffe zur umfassenden strukturellen und pharmakologischen Charakterisierung und Beschreibung der Wirkprinzipien (zur Strukturaufklärung der Wirkprinzipien) isoliert [194].

Als ein Beispiel für die Analytik biologisch aktiver Naturstoffe bot sich die Charakterisierung von nichtflüchtigen Whiskyinhaltsstoffen an. Sie erfolgte mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der RP-HPLC mit anschließender physikalischer, chemischer und biologischer Detektion. Die chemische Detektion erfolgte hierbei mit einem Zuckerreagenz (Biphenyl-amin / Anilin / Phosphorsäure). Aufgrund der mindestens dreijährigen Lagerung der Destillate wurde davon ausgegangen, dass sich Holzinhaltsstoffe wie z. B. die Hemicellulosen im Destillat lösen. Diese Hemicellulosen sollten sich mit dem Zuckerreagenz nachweisen lassen.

Nachweis von Whiskyinhaltsstoffen mittels HPTLC / AMD

Mit Hilfe der HPTLC / AMD sollte ein erster Einblick in die Zusammensetzung der untersuchten Whiskysorten (Malt-Whiskeys Jameson 12 years old, Tullamore Dew, Paddy und Grant´s und der Destillierrückstand eines Whiskeys = Kevin`s-Extrakt) gewonnen werden.

Hierbei wurden verschiedene Mengen des Kevin's-Extraktes auf HPTLC-Platten aufgetragen, die zunächst mit dem Universalgradienten 2 in der AMD2-Kammer (siehe Abschnitt 3.3.7.5) entwickelt wurden.

Durch UV-Detektion und Detektion mit postchromatischer Derivatisierung mit einem Zuckerreagenz (siehe Abschnitt 3.4) wurden die meisten der detektierbaren Whisky-

inhaltsstoffe im ersten Drittel des Chromatogramms gefunden. Die maximale Laufstrecke der mit dem Zucker-Reagenz detektierbaren Substanzen betrug 20 mm und die der UV-aktiven Majorkomponenten betrug 40 mm. Die geringen Laufstrecken zeigten, dass die meisten Komponenten sehr polar sind. Es wurden fünf verschiedene Minorkomponenten im Bereich von 40 bis 65 mm beobachtet, die mittelpolarer Natur waren.

Für eine bessere Auftrennung der polareren Majorkomponenten wurde bei anschließenden Versuchen der AMD2-Gradient 1 verwendet, der ursprünglich für die Trennung der basischen Pestizide entwickelt wurde. Dieser Gradient war in der Lage, die Majorkomponenten der Whiskyinhaltsstoffe gut zu trennen.

Abbildung 4-72 zeigt das HPTLC-Chromatogramm des Whiskey-Extraktes; es werden die Signale der physikalischen UV-Detektion bei 200 - 400 nm, der chemischen Detektion mit dem Zuckerreagenz sowie der biologischen Detektion mit Leuchtbakterien dargestellt.

Es wurde eine Vielzahl von Whiskeyinhaltsstoffen detektiert. Erwartungsgemäß hatten die Whiskeyinhaltsstoffe sehr unterschiedliche Eigenschaften. Einige, wie z. B. Peak g, waren lediglich UV-aktiv ($\lambda_{max} = 200$ nm). Andere konnten wie Peak f mit allen drei Detektionsverfahren detektiert werden. Andere waren UV-aktiv und konnten lediglich durch Derivatisierung (Peak d) oder Lumineszenz (Peak h) nachgewiesen werden. Im Laufstreckenbereich bis zu 15 mm (bis Peak c) wurden auch Substanzen vermutet, die keine UV-Aktivität besitzen und ausschließlich durch Derivatisierung nachweisbar sind. Erwartungsgemäß bildeten die mit dem Zuckerreagenz reagierenden Whiskyinhaltsstoffe des Kevin's-Extraktes unterschiedliche Farben:

- gelb (Peak l und m / 60 und 62 mm),
- grau (Peak b, c und e / 12, 14 und 23 mm) und
- verschiedene Blautöne (Peak a, d, f und j / 11, 18, 26 und 50 mm).

Das Multiwellenlängen-Chromatogramm belegt die Anwesenheit von mindestens sechsundzwanzig UV-aktiven Whiskyinhaltsstoffen. Aufgrund der Vielzahl an Substanzen im Kevin's-Extrakt konnten nicht alle Whiskyinhaltsstoffe selektiv getrennt werden. Aber durch Vergleich der Peakformen im Multiwellenlängenscan wurden zum Beispiel unter dem Peak m zwei Whiskyinhaltsstoffe mit Laufstrecken von 61,4 mm und 61,8 mm und Absorptionsmaxima von 300 und 340 nm nachgewiesen.

Für eine Charakterisierung der Whiskys erwies sich neben der UV-Detektion die chemische Detektion als besonders geeignet. Für einen Vergleich der Whiskyinhaltsstoffe wurden jeweils 10 bis 200 µl der Malt-Whiskeys Jameson 12 years old und Tullamore Dew, Paddy

und Grant's mit 1, 7,5 und 15 µl Kevin's-Extrakt auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Nach Entwicklung der Platten mit dem AMD2-Gradienten 1 wurde die Derivatisierung mit dem Zucker-Reagenz durchgeführt.



Abbildung 4-72: HPTLC-Chromatogramm des Kevin's-Extraktes

AMD2-Gradient1, 15 μl Probenvolumen, UV-Detektion bei 200 bis 400 nm, Derivatisierung mit Biphenylamin / Anilin / Phosphorsäure-Reagenz (Zucker-TLC), Biologische Detektion mit Leuchtbakterien (Lumineszenz-TLC)^a

In Tabelle 4-40 sind Whiskyinhaltsstoffe angegeben, die in den untersuchten Whiskysorten mit Hilfe des Zuckerreagenzes detektiert werden konnten. Es zeigte sich, dass die Zahl der detektierbaren Substanzen von der Whiskysorte und der Auftragemenge abhängig ist. Interessanterweise korrelierte die Zahl der detektierbaren Substanzen mit der Qualität bzw. Art und Dauer der Lagerung des Whiskys. Der Scotch Whisky Grant's enthielt die geringste Zahl und Menge an mit dem Zuckerreagenz detektierbaren Substanzen. Tullamore Dew und Paddy zeigten ein sehr ähnliches Muster, lediglich der Whiskyinhaltsstoff b konnte im

^a Zwischen der Lumineszenz-TLC und der Zucker-TLC ergaben sich geringe Laufstreckenunterschiede der Whiskyinhaltsstoffe von 1 mm. Sie resultieren aus der Laufstreckenvariabilität bei der Entwicklung verschiedener Platten.

Jameson 12 years old in einer höheren Konzentration nachgewiesen werden. Jameson 12 years old und der Kevin's-Extrakt zeigen ebenfalls ein ähnliches Muster; der Whiskyinhaltsstoff f konnte lediglich im Jameson 12 years old und im Kevin's-Extrakt detektiert werden. Der Whiskyinhaltsstoff c wurde ausschließlich im Kevin's-Extrakt nachgewiesen.

In Abbildung 4-73 ist ein Ausschnitt einer HPTLC-Platte (die Whiskys mit dem jeweils höchsten Auftragevolumen) nach postchromatischer Detektion mit dem Zucker-Reagenz dargestellt. Dieses differenzierte Bild zeigt, dass sich mit diesem Analysenverfahren Whiskysorten charakterisieren lassen. In weiteren Arbeiten müsste untersucht werden, welche Abhängigkeit zwischen der Zahl und Konzentration der mit dem Zucker-Reagenz detektierbaren Substanzen und der Art und Dauer der Lagerung besteht; außerdem sollte die Identität dieser Substanzen, die vermutlich Hemicellulosen sind, geklärt werden.

Peak		10	μl			50	μl			100) µ1			200) µ1		1μl	7,5 µl	15 µl
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	5	5
а	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b	+				+				+	+	+		+	+	+	+		+	+
c																	+	+	+
d	+				+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e					+				+				+	+	+	+		+	+
f													+						+
j	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	÷	+	+	+	+	+		+	+
1													+					+	+
m													+					+	+

Tabelle 4-40:Postchromatischer Nachweis von Whiskyinhaltsstoffen nach
HPTLC / AMD

1: Jameson12 years old, 2: Tullamore Dew, 3: Paddy, 4: Grant's, 5: Kevin's-Extrakt.





Peaknummerierung a bis l entsprechend Abbildung 4-72, AMD2-Gradient1, Probenvolumen: Bahn 1 bis 4 - je 100 μl, Bahn 5 - 15 μl, Derivatisierung mit Biphenylamin / Anilin / Phosphorsäure-Reagenz (Zucker-Reagenz), 1: 200 μl Jameson12 years old,

- 200 µl Julleson12 years
 200 µl Tullamore Dew,
- $\begin{array}{ccc} 2. & 200 \ \mu \text{I} \ \text{I} \ \text{dim} \text{ore} \\ 3. & 200 \ \mu \text{I} \ \text{Paddy}, \end{array}$
- 4: 200 μ1 Grant's,
- 5: 15 µl Kevin's-Extrakt,
- 5a: 15 µl Kevin's-Extrakt, Zucker-DC aus Abbildung 4-72

Charakterisierung von Whiskyinhaltsstoffen mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD

Als weitere Methode wurde die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD eingesetzt, um die Trennung der Whiskyinhaltsstoffe zu verbessern. Dazu konnte der für die HPTLC / AMD verwendete AMD2-Gradient 1 nicht eingesetzt werden, da mit diesem die meisten mit dem Zuckerreagenz detektierbaren Whiskyinhaltsstoffe Laufstrecken bis maximal 26 mm aufwiesen. Für die Online-Kopplung war es aber notwendig, dass die Analyten Laufstrecken oberhalb von 23 mm besaßen.

Mit einem extra für dieses Trennproblem entwickelten Gradienten, dem AMD2-Gradienten 7, wurde eine bessere Trennung der Whiskyinhaltsstoffe angestrebt, die leider nicht erreicht werden konnte. Während bei der direkten HPTLC / AMD mit dem AMD2-Gradienten 1 sechs der interessierenden Substanzen im Laufstreckenbereich von 10 bis 26 mm getrennt wurden und drei weitere Substanzen Laufstrecken von etwa 50 mm (Peak j), 60 und 62 mm (Peak 1

und m) besitzen, konnten mit dem AMD2-Gradienten 7 lediglich fünf Substanzen im Laufstreckenbereich von 30 bis 65 mm getrennt werden.

Für die flüssigchromatographische Trennung des Kevin's-Extraktes musste der HPLC-Gradient ebenfalls optimiert werden. Zur Trennung der Whiskyinhaltsstoffe des Kevin's-Extraktes war der einfache Methanol / Wasser-Gradient (s. Abschnitt 3.4, HPLC-Gradient A), dessen Methanolgehalt bis 5 min konstant war und danach innerhalb von 56 min von 50 auf 100 % stieg, nicht geeignet. Bei einer Fraktionierung des HPLC-Eluates von 10 bis 60 min in 16 Fraktionen auf die HPTLC-Platte befanden sich die UV-aktiven und mit dem Zucker-Reagenz detektierbaren Substanzen lediglich in den Fraktionen 1 und 3 des HPLC-Eluates.

Für eine bessere Trennung der Whiskyinhaltsstoffe mittels HPLC sollte der wesentlich polarere HPLC-Gradient B (Abschnitt 3.4) eingesetzt werden. Er begann mit 30 % Methanol und wurde bis 40 min isokratisch geführt, der danach steil anstieg, so dass er nach 60 min 100 % Methanol enthielt. Ab 70 bis 75 min wurde die Flussrate von 50 auf 200 µl erhöht. Das HPLC-Eluat wurde von 10 bis 71,3 min in 17 Fraktionen auf die HPTLC-Platte mit Hilfe einer Schnitttabelle aufgetragen.

In Abbildung 4-74 ist das HPLC-Chromatogramm des Kevin's-Extrakts mit den entsprechenden Fraktionen der Online-Kopplung mit der HPTLC / AMD abgebildet. Mit dem HPLC-Gradienten B konnten die UV-aktiven Whiskyinhaltsstoffe über den gesamten Retentionsbereich aufgetrennt werden. Durch Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD unter den optimierten Bedingungen konnten im Kevin's-Extrakt sechszehn mit dem Zucker-Reagenz nachweisbare Substanzen und einundzwanzig mit Leuchtbakterien nachweisbare Substanzen detektiert werden. Dreiunddreißig Substanzen waren UV-aktiv. In Tabelle 4-41 sind die im Kevin's-Extrakt mit dem Zucker-Reagenz nachweisbaren Substanzen aufgeführt. Dabei sind jeweils die Farbe des Derivats, das UV-Maximum und die Bioaktivität der Substanz mit der gleichen Laufstrecke gegenübergestellt. Unter der Annahme, dass nach der Online-Kopplung alle Whiskyinhaltsstoffe getrennt wurden, besitzen mit Ausnahme von zwei Substanzen (Fraktion 4 und 12) alle mit dem Zucker-Reagenz nachweisbaren Substanzen UV-Maxima von 200 nm^a.

Von den sechzehn mit dem Zucker-Reagenz nachweisbaren Whiskyinhaltsstoffen waren zehn ebenfalls mittels biologischer Detektion mit Leuchtbakterien detektierbar, d. h. wie bei der

^a Die beide gelben Derivate, Peak k und l, konnten nach der Online-Kopplung nicht nachgewiesen werden, obwohl im Gegensatz zur einfachen HPTLC /AMD für die Online-Kopplung mit 20 µl Extrakt ein größeres Probenvolumen untersucht wurden.

einfachen HPTLC / AMD waren sechs von den mit dem Zucker-Reagenz nachweisbaren Whiskyinhaltsstoffen nicht bioaktiv.



Abbildung 4-74:HPLC-Chromatogramm des Kevin's-Extraktes (20 μl) mitFraktionen für die Online-Kopplung

HPLC-Gradient B, bei 230 nm vermessen

Tabelle 4-41:Whiskyinhaltsstoffe nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der
HPTLC / AMD

Fraktion	Laufstrecke in mm	Farbe	UV-Maximum in nm	LUMI				
2	32*/36	blau / grau	200 / 200	n. u. **				
3	32 / 37 / 39	blau / grau / grau	200 / 220 / 200	L / L / L				
4	32 / 36 / 45	blau / grau /grau / blau	200 / 200 / <mark>280</mark>	L / <mark>N</mark> / L				
11	37	grau	200	Ν				
12	39 /56	grau / graubraun	200 / 300	L / L				
13	37	grau	200	Ν				
14	35-37	grau	200	Ν				
15	36-38	grau / grau	200	Ν				
16	38 / 41 / 43 / 44	grau	200 / 200 / 200 / 200	L/L/L/ <mark>N</mark>				
* D	Das blaues Derivat mit der Laufstrecke 32 mm wurde in Fraktion 2 bis 4 nachgewiesen							

* Das blaues Derivat mit der Laufstrecke 32 mm wurde in Fraktion 2 bis 4 nachgewiesen.

n. u. – HPLC-Fraktionen 1 und 2 (10 bis 20 min) wurden nach dünnschichtchromatographischer Trennung nicht mittels Biologischer Detektion mit Leuchtbakterien untersucht.

LUMI Biologische Detektion mit Leuchtbakterien

L biologisch aktiv, Lumineszenzhemmung

N nicht biologisch aktiv

Vergleich der chromatographischen Systeme

Trotz der besseren Trennung der Whiskyinhaltsstoffe des Kevin's-Extrakt mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD gegenüber der einfachen HPTLC / AMD wurde hierbei kein größerer Informationsgehalt für eine Charakterisierung von Whiskysorten gewonnen.

Gegenüber der traditionellen RP-HPLC bietet die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD den Vorteil einer höheren Selektivität bei der Bestimmung biologisch aktiver Inhaltsstoffe. So konnten von den fünfzehn untersuchten Fraktionen (Fraktion 3 bis 17) nach dünnschichtchromatographischer Trennung in acht Fraktionen mindestens je zwei bioaktive Stoffe nachgewiesen werden, die ohne anschließende Trennung der HPLC-Fraktionen lediglich als eine Substanz erkannt würden.

Für eine weitere Charakterisierung des Kevin's-Extraktes ist das vorliegende Verfahren der Online-Kopplung (HPLC-Gradient B und AMD2-Gradient 7) geeignet.

Zum Beispiel konnten beide Substanzen des Peaks m nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD weitergehend charakterisiert werden, obwohl seine zwei Substanzen auch nach der Entwicklung mit dem AMD2-Gradienten 7 nicht getrennt wurden (beide Laufstrecken 56 mm). Die Substanz mit dem UV-Maximum von 300 nm (Peak m1) wurde in die Fraktion 12 und die Substanz mit dem UV-Maximum von 340 nm (Peak m2) in die Fraktion 15 eluiert. Der Peak m1 konnte auch nach chemischer Detektion nachgewiesen werden^a. Beide Peaks waren bioaktiv.

Vergleich der physikalischen, chemischen und biologischen Detektion

Die chemische Detektion erwies sich für eine Charakterisierung der Whiskys als besonders geeignet. Die UV-Detektion im Multiwellenlängenscan war jedoch für die richtige Zuordnung der mit dem Zucker-Reagenz nachweisbaren Substanzen auch sehr wichtig, da hiermit die geringen Unterschiede der Laufstrecken in der Abhängigkeit vom Ort auf einer Platte (siehe Abschnitt 4.3.1.6) und zwischen verschiedenen Platten ausgeglichen werden konnten.

Für eine Charakterisierung der Whiskys erwies sich die Detektion mit Leuchtbakterien als weniger geeignet. Obwohl eine Vielzahl von Substanzen nachgewiesen werden konnte, ergab sich für den Kevin's-Extrakt kein aussagekräftiger (gut strukturierter) Fingerprint.

^a Die unterschiedlichen Farben des Peaks m (gelb) und des Peaks m1 (graubraun) konnten im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden. Vorstellbar ist ein Einfluss der Peak m2 auf die Derivatisierung.

Die Kombination von stoff- und wirkungsbezogener Analytik ermöglicht eine Charakterisierung von bioaktiven Stoffkomponenten. Die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD ist dabei ein geeignetes chromatographisches Verfahren, da aufgrund der großen Selektivität eine Vielzahl von Substanzen auf der HPTLC-Platte getrennt werden kann und anschließend sowohl eine physikalische als auch eine biologische oder chemische Detektion möglich ist.

Zusammenfassung

Als ein mögliches Anwendungsgebiet für die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD bietet sich die HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe an.

In der vorliegenden Arbeit sind alle Arbeitsschritte zur Erstellung von Aktivitätsprofilen und Online-Spektroskopie beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD auf den entwickelten HPTLC-Platten nach UV-Detektion eine biologische Detektion mit Pilzen oder Leuchtbakterien möglich ist. Für eine weitere Identifizierung kann eine parallele massenspektrometrische Detektion nach flüssigchromatographischer Trennung durchgeführt werden, da eine Splittung des HPLC-Eluats für eine Online-Spektroskopie (MS) unproblematisch wäre.

Beispielhaft wurde in der vorliegenden Arbeit ein Screening von biologisch aktiven Stoffen in Whisky vorgestellt. Es wurden fünf Whiskysorten mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC untersucht. Sie wurden mittels UV-Detektion, mit einer für Zucker spezifischen chemischen Detektion und parallel dazu mit der biologischen Detektion mittels Leuchtbakterien untersucht. Auf eine weitere Aufklärung der Struktur wurde verzichtet, da lediglich die Anwendbarkeit der HPTLC / AMD und ihre Kopplung mit der RP-HPLC mit anschließender physikalischer, chemischer und biologischer Detektion untersucht werden sollte. Die Untersuchung war erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Lagerung des Whiskys mehr biologisch aktive Stoffe entstehen, von denen interessanterweise einige mit einem für Zucker spezifischen Reagenz detektiert werden konnten. Durch die chemische Detektion mit einem für Zucker selektiven Reagenz konnten Whiskysorten charakterisiert werden. Die Anzahl der detektierbaren Substanzen korreliert mit der Qualität bzw. Art und Dauer der Lagerung des Whiskys.

Wie das Beispiel der Whiskyuntersuchung gezeigt hat, bietet die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD gegenüber der traditionellen HPLC eine höhere Selektivität bei der Bestimmung biologisch aktiver Inhaltsstoffe.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass nach der dünnschichtchromatischen Trennung das verwendete Laufmittel sorgfältig von der HPTLC-Platte entfernt werden kann und somit bei einer biologischen Detektion keine Störungen durch das Laufmittel zu erwarten sind.

Die Sensitivität des chromatographischen Systems erlaubt auch die Bestimmung von echten Minorkomponenten, die z. B. in einer Pflanze mit einem Gehalt von etwa 0,1 % enthalten sind. Wird der zu untersuchende Extrakt in μ g-Mengen über eine analytische Säule getrennt und auf die HPTLC-Platte aufgetragen, enthalten die HPLC-Fraktionen ng-Mengen dieser Minorkomponenten, die auf einer HPTLC gut detektiert werden können. In Abhängigkeit von der Sensitivität der biologisch aktiven Stoffe ist eine Optimierung des Probenvolumens schnell möglich.

Das System Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD führt zu einer Miniaturisierung und einer Beschleunigung der HPLC-basierten Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, mit denen Rückstände thermolabiler und nichtflüchtiger Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln bestimmt und quantifiziert werden können.

Für die chromatographische Trennung wurde hierbei die Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (HPTLC / AMD) mit und ohne Online-Kopplung zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt, da mit diesen Verfahren eine Trennung von Matrixkomponenten und Analyten ohne Hitzeeinwirkung möglich ist. Zunächst wurde die Eignung dieser chromatographischen Verfahren geprüft und auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse Analysenmethoden für ausgewählte Pestizide, wie Benzoylharnstoffe, Iprodion und basische Fungizide, erstellt. Zusätzlich wurden Alternativmethoden für die Analytik der ausgewählten Pestizide entwickelt.

Am Beispiel der Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen wurde zusätzlich zur Pestizidrückstandanalytik mittels der HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der HPLC der große Anwendungsbereich dieser chromatographischen Verfahren gezeigt. Die Whisky-Inhaltsstoffe wurden durch physikalische, chemische und biologische Detektionsverfahren nachgewiesen.

Für die Aufarbeitung der Pestizid-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln wurde die DFG-Methode S19 und die Methode S19-Online eingesetzt. Diese Methoden wurden für die ausgewählten Pestizide, die Benzoylharnstoffe, Iprodion und basische Fungizide, optimiert. Daneben wurden Festphasenextraktionen an Kieselgel und an Umkehrphasen zur Aufreinigung der pflanzlichen Lebensmittelextrakte eingesetzt. Zur weiteren Aufreinigung der Probenextrakte wurde neben der präparativen GPC erstmalig die analytische GPC eingesetzt, deren Eluat Online auf die HPTLC aufgetragen wurde. Sie ist zur Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffen in pflanzlichen Lebensmitteln im ppm-Bereich geeignet.

Nach Optimierung der Auftrageparameter der HPLC-Kopplung wurde die Eignung der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD zur Screening- oder Konfirmationsanalyse von Pflanzenschutzmittel-Rückständen untersucht. Eine erste Analyse ergab, dass bei der zweidimensionalen Trennung der Pestizide für beide flüssigchromatographischen Methoden ein für die jeweilige Pestizidgruppe optimierter Gradient eingesetzt werden muss. Alle untersuchten Pestizide mit Ausnahme von Thiabendazol und Imazalil konnten mittels Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD bei zufriedenstellenden Wiederfindungsraten und Standardabweichungen bestimmt werden.

Eine Weiterentwicklung des AMD1-Systems zum AMD2-System durch die Firma Camag machte es notwendig, die für das AMD1-System schon bestehenden Gradienten an das AMD2-System anzupassen, damit die bereits optimierten Analysenverfahren weiter benutzt werden konnten. Zur Anpassung der Gradienten wurde ein Berechnungsprogramm erstellt, das die Fliessmittelzusammensetzung des AMD1-Gradienten in einer Exceltabelle in die Fliessmittelzusammensetzung für einen AMD2-Gradienten berechnen kann.

Der Vergleich des AMD1- mit dem AMD2-System zeigte, dass das AMD2-Gerät eine echte Weiterentwicklung des AMD-Systems darstellt. Die Handhabung und die Präzision der chromatographischen Entwicklung hat sich verbessert, außerdem konnte der Lösungsmittelverbrauch pro Analyse auf ein Drittel gesenkt werden.

Mit Verwendung des neuen AMD2-Gerät konnte eine bessere Trennung der Pestizide erreicht werden, weil mit diesem Gerät die Verwendung eines linearen Gradienten möglich war. Dadurch konnten auch Pestizide mit sehr ähnlichem dünnschichtchromatographischen Verhalten, wie die Benzoylharnstoffe oder die Gruppe der sogenannten basischen Pestizide getrennt werden.

Als Alternative zur Entpunktbestimmung mittels HPTLC / AMD wurde die Gaschromatographie und die HPLC untersucht.

Die Eignung der direkten Gaschromatographie und der Gaschromatographie nach Derivatisierung wurde zur Bestimmung der Benzoylharnstoffe, des Iprodions und der Gruppe der basischen Pestizide insbesondere Thiabendazol und Carbendazim untersucht.

Die Benzoylharnstoffe konnten nicht ohne thermische Zersetzung detektiert werden. Nachgewiesene Bruchstücke können als erstes Indiz für das Vorhandensein von Benzoylharnstoffen dienen. Der sichere Nachweis und die Bestimmung der Benzoylharnstoffe muss dann mit flüssigchromatographischen Methoden erfolgen, mit denen die Benzoylharnstoffe ohne Zersetzung chromatographiert werden können.

Auch nach Derivatisierung (pyrolytischer Online-Methylierung mit TMSH) konnten die Benzoylharnstoffe mittels GC/MS nicht empfindlich und präzise genug nachgewiesen werden, da verschiedene Derivate entstanden.

Geeigneter als die GC erwies sich Rückstandsanalytik von Benzoylharnstoffen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels LC/MS mit Elektrospray-Ionisierung im negativen Modus. Die Benzoylharnstoffe wurden nach einer flüssigchromatographischen Trennung im SIM-Modus detektiert. Um Matrixeffekte zu minimieren, ist es notwendig, die Benzoylharnstoffe mittels Standardadditionskalibrierung zu quantifizieren.

Die Pestizide Myclobutanil, Procymidon, Tebuconazol ließen sich erwartungsgemäß unzersetzt mittels direkter GC nachweisen. Sie werden üblicherweise nach Aufarbeitung mit der Multimethode S19 mittels GC / ECD / NPD nachgewiesen.

Die beiden basischen Fungizide Carbendazim und Thiabendazol zeigten ein sehr unterschiedliches gaschromatographisches Verhalten. Während Thiabendazol als ein tailender Peak detektiert werden konnte, erwies sich Carbendazim als nicht gaschromatographierbar. Die anderen ausgewählten Pestizide verhielten sich ähnlich wie die Benzoylharnstoffe. Sie waren unter den gegebenen Bedingungen nicht unzersetzt gaschromatographierbar.

Es wurde die Rückstandsanalytik von Carbendazim und Thiabendazol neben den ebenfalls thermolabilen Carbamate und des Harnstoffherbizids Tribenuron-Methyl in pflanzlichen Lebensmitteln nach Pentafluorbenzylierung mittels GC / MS untersucht. Carbendazim und Thiabendazol konnten neben ausgewählten Carbamaten empfindlich und spezifisch nachgewiesen werden. Auch hier muss wegen eventuell auftretende Matrixeffekte muss die Bestimmung mittels Standardadditionskalibrierung durchgeführt werden. Ein Vergleich des Zeitaufwandes für die Bestimmung von Carbendazim-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln ergab, dass der Arbeitsaufwand bei der HPTLC / AMD mit UV-Detektion gegenüber der GC / MS nach Pentafluorbenzylierung um bis zur Hälfe geringer ist.

Nachdem die Probenaufarbeitung einschließlich der Aufreinigung und die Endpunktbestimmung der ausgewählten Pestizide festgelegt war, wurden Untersuchungen zur Eignung der Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD zur Rückstandsanalytik der untersuchten Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln durchgeführt.

Es können besonders gut polare bis mittelpolare nichtflüchtige Pestizide nachgewiesen werden. Besonders geeignet waren sie für die Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD, wenn ihr UV-Spektrum aussagekräftig (UV-Maxima größer 200 nm und mit Nebenmaxima) und der Nachweis empfindlich (Extinktionskoeffizient groß) ist. Nicht nachgewiesen werden konnten flüchtige (meist unpolare) Pestizide. Ebenfalls nicht nachweisbar waren Pestizide, die nicht mittels RP-HPLC chromatographiert werden konnten.

Am Beispiel der Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln konnte in der vorliegenden Arbeit gut der Einfluss der Analytkonzentration zum Aufarbeitungsaufwand gezeigt werden. Für eine Bestimmung von Benzoylharnstoff-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln im ppm-Bereich kann die Online-Kopplung der GPC-HPLC mit der HPTLC / AMD eingesetzt werden, dadurch wird die Analysenzeit sehr verkürzt.

Durch Derivatisierung der Benzoylharnstoffe mit dem Chlor/Kaliumiodid/o-Tolidin-Reagenz nach HPTLC/AMD konnte die Spezifität des Nachweises erhöht werden.

Der Vergleich der HPTLC / AMD-Analytik für Benzoylharnstoffe und Iprodion zeigt den großen Einfluss der unterschiedlichen Aufarbeitung (GPC), der unterschiedlichen AMD-Gradienten und der Messung bei verschiedenen Wellenlängen aufgrund der unterschiedlichen Maxima der UV-Spektren.

Am Beispiel der Bestimmung von Pestizid-Rückständen einer Gruppe von sogenannten basischen Pestiziden in pflanzlichen Lebensmitteln konnte in der vorliegenden Arbeit gut der Einfluss des Maximums des UV-Spektrums zum Aufarbeitungsaufwand gezeigt werden. Carbendazim und Thiabendazol waren wegen ihres ausgeprägten UV-Spektrum besonders gut nachweisbar.

Um die Empfindlichkeit und die Spezifität der Rückstandsbestimmung insbesondere von Carbendazim und Thiabendazol zu verbessern, wurden zwei biologische Detektionsmethoden nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf HPTLC-Platten im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die biologische Detektion von Pestiziden mit Leuchtbakterien ist eine sehr schnelle Methode. Mit ihr konnten die untersuchten Pestizide aber lediglich ähnlich empfindlich wie nach einer UV-Detektion nachgewiesen werden. Damit ist diese Detektion nicht besser als die UV-Detektion geeignet, die untersuchten Pestizid-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln zu bestimmen, da nicht davon ausgegangen werden kann, das die biologische Detektion mit Leuchtbakterien spezifischer als die UV-Detektion ist.

Die Bioautographie mit Schimmelpilzen ist geeignet, Fungizide in pflanzlichen Lebensmitteln nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung empfindlich und spezifisch nachzuweisen und zu quantifizieren.

Aus der Summe der Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD die Bestimmung von Pestizid-Rückständen oberhalb einer Konzentration von 0,1 mg/kg ohne aufwendige Aufreinigung erlaubt.

Unterhalb dieser Konzentration wird das Verhältnis von Matrix zu Analyt ungünstiger, sodass entweder ein größerer Aufwand für ein erweitertes Aufreinigung, mit der Möglichkeit einer schlechteren Wiederfindungsrate des Analyten, notwendig ist oder die Rückstandsanalytik keine befriedigenden Ergebnisse liefert.

Als weiteres mögliches Anwendungsgebiet für die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD bietet sich die HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe an.

In der vorliegenden Arbeit sind alle Arbeitsschritte zur Erstellung von Aktivitätsprofilen und Online-Spektroskopie beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass nach Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD auf den entwickelten HPTLC-Platten nach UV-Detektion eine biologische Detektion mit Pilzen oder Leuchtbakterien möglich ist. Eine Teilung des HPLC-Eluats für eine parallel durchgeführte Online-Spektroskopie (MS) wäre unproblematisch, da die Flussraten für beide Verfahren gleich sind.

Beispielhaft wurde in der vorliegenden Arbeit ein Screening von biologisch aktiven Stoffen in Whisky vorgestellt. Es wurden fünf Whiskysorten mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC untersucht. Sie wurden mittels UV-Detektion, mit einer für Zucker selektiven chemischen Detektion und parallel dazu mit der biologischen Detektion mittels Leuchtbakterien untersucht. Auf eine weitere Aufklärung der Struktur wurde verzichtet, da lediglich die Anwendbarkeit der HPTLC / AMD und ihre Kopplung mit der RP-HPLC mit anschließender physikalischer, chemischer und biologischer Detektion untersucht werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Lagerung des Whiskys mehrere biologisch aktive Stoffe entstehen, von denen interessanterweise einige mit einem für Zucker spezifischen Reagenz detektiert werden konnten. Durch diese chemische Detektion konnten die Whiskysorten charakterisiert werden. Die Anzahl der detektierbaren Substanzen steigt mit der Qualität bzw. Lagerungszeit des Whiskys.

Wie das Beispiel der Whiskyuntersuchung gezeigt hat, bietet die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD gegenüber der traditionellen HPLC eine höhere Selektivität bei der Bestimmung biologisch aktiver Inhaltsstoffe.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass nach der dünnschichtchromatischen Trennung das verwendete Laufmittel sorgfältig von der HPTLC-Platte entfernt werden kann und somit bei einer biologischen Detektion keine Störungen durch das Laufmittel zu erwarten ist.

Die Sensitivität des chromatographischen Systems erlaubt auch die Bestimmung von echten Minorkomponenten, wie sie z. B. in einer Pflanze mit einem Gehalt von etwa 0,1 % enthalten sind. Dazu muss der zu untersuchende Extrakt in µg-Mengen über eine analytische Säule getrennt und auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden, um ng-Mengen dieser Minorkomponenten in den HPLC-Fraktionen nachweisen zu können.

Die Untersuchungen belegen, dass das System Online-Kopplung der RP-HPLC mit der HPTLC / AMD zu einer Miniaturisierung und einer Beschleunigung der HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels HPTLC / AMD und ihrer Kopplung mit der HPLC thermolabile und nichtflüchtige Pflanzenschutzmittel-Rückständen in pflanzlichen Lebensmitteln identifiziert und quantifiziert werden können.

Aus der Summe der Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass die Online-Kopplung der HPLC mit der HPTLC / AMD die Bestimmung von Pestizid-Rückständen oberhalb einer Konzentration von 0,1 mg/kg ohne aufwendige Aufreinigung erlaubt. Durch die Verbesserung der Empfindlichkeit bzw. der Spezifität der Rückstandsbestimmung wie bei der Bioautographie mit Schimmelpilzen oder einer chemischen Derivatisierung konnte eine aufwendige Aufreinigung auch unterhalb dieser Konzentration unterbleiben. Bei optimaler Aufreinigung konnten die untersuchten Pestizide bei einer Konzentration von 0,01 mg/kg bestimmt werden.

Im Vergleich zu geeigneten Alternativmethoden der GC nach Pentafluorbenzylierung und der LC / MS zeigten sich die Vorteile der HPTLC/AMD. Sie benötigte wegen der Parallelbestimmung von bis zu achtzehn Proben weniger Analysenzeit als die GC nach Pentafluorbenzylierung und das chromatographischen System musste nicht aufwendig gereinigt werden. Außerdem war bei ihr keine Quantifizierung mittels Standardadditions-kalibrierung notwendig.

Zusätzlich wurde anhand der Charakterisierung von Whisky-Inhaltsstoffen mittels der HPTLC / AMD und ihrer Online-Kopplung mit der HPLC der große Anwendungsbereich dieser chromatographischen Verfahren gezeigt.

6 Literatur

- Deutsche Forschungsgemeinschaft
 Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Bd. III,
 Sammelmethode S19,
 VCH, Weinheim (1991)
- 2 Butz S., Stan H.-J.

Determination of Chlorophenoxy and Other Acidic Herbicides Residues in Ground
Water by Capillary Gas Chromatography of Their Alkyl Esters Formed by Rapid
Derivatisation Using Various Chloroformates
Journal of Chromatography <u>643</u> (1993) S. 227-238

- Heberer Th., Butz S., Stan H.-J.
 Detection of 30 Acidic Herbicides and Related Compounds as Their
 Pentafluorobenzylic Derivatives Using Gas Chromatography / Mass Spectrometry
 Journal of Aoac International <u>77</u> (1994) S. 1587-1604
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG Nr. 378, Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in Lebensmitteln - Carbendazim in Getreide Deutsche Forschungsgemeinschaft Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Methode 378-1 VCH, Weinheim (1991)
- Morlock G. E.
 Analysis of Pesticide Residues in Drinking Water by Planar Chromatography
 Journal of Chromatography A <u>754</u> (1996) S. 423-430
- 6 Poole C. F., Poole S. K.
 Multidimensionality in Planar Chromatography
 Journal of Chromatography A <u>703</u> (1995) S. 573-612

7 Burger K.

in: Stan H.-J. (Editor), Analysis of Pesticides in Ground and Surface Water II.
Latest Developments and State-of-the-Art of Multiple Residue Methods,
Chemistry of Plant Protection, Vol. 12, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1995)
S. 181-195

- 8 Butz S., Stan H.-J.
 Screening of 265 Pesticides in Water by Thin-Layer Chromatography with Automated Multiple Development Analytical Chemistry <u>67</u> (1995) S. 620-630
- 9 Sherma J.
 Determination of Pesticides by Thin Layer Chromatography Journal of Planar Chromatography <u>7</u> (1994) S. 265-272
- 10 Pfaab G., Jork H.

Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking Water Part III: Solid Phase Extraction and Affection Factors Acta Hydrochimica Hydrobiologica <u>22</u> (1994) S. 216-223

- Jork H., Keller G., Kocher U.
 Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking
 Water. Part II: Limitations
 Journal of Planar Chromatography <u>5</u> (1992) S. 246-250
- de la Vigne U., Jänchen P.
 Determination of Pesticides in Water by HPTLC Using Automated Multiple
 Development (AMD)
 Journal of Planar Chromatography <u>3</u> (1990) S. 6-9
- Burger K., Köhler J., Jork H.
 Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking Water
 Part I: Fundamentals and Method
 Journal of Planar Chromatography <u>3</u> (1990) S. 504-510

- Zietz E., Ricker I.
 Methods to Monitor Pesticides in Ground and Drinking Water by HPTLC / AMD According to Drinking Water Regulations Journal of Planar Chromatography 2 (1989) S. 262-267
- Lodi G., Betti A., Menziani E., Brandolini V., Tosi B.
 Some Aspects and Examples of Automated Multiple Development (AMD) Gradient
 Optimization
 Journal of Planar Chromatography <u>4</u> (1991) S. 106-110
- Qin-Sun W., Zhuang-Ping Z., Yi-Hong W.
 Computer-Assisted Optimization of HPTLC Separations of Mixtures of Unknown
 Compostion Using UV Spectra
 Journal of Planar Chromatography <u>6</u> (1993) S. 66-69
- Qin-Sun W., Bing-Wen Y., Zhi-Chao Z.
 Computer-Assisted Optimization of Mobile Phase Composition in Stepwise Gradient HPTLC
 Journal of Planar Chromatography 7 (1994) S. 229-232
- 18 Burger K.Online Coupling HPLC / AMDAnalusis <u>18</u> (1990) S. 13-21
- Poole C. F., Mesfin T. B.
 Progress in Automated Development
 Journal of Planar Chromatography <u>4</u> (1991) S. 345-359
- Perkow W., Ploss H.
 Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel,
 Parey Buchverlag Berlin 1999, 3. Auflage [Losebl. Ausg.]
- Picó Y., Moltó J. C., Font G.
 Solid Phase Techniques in the Extraction of Pesticides and Related Compounds from Foods and Soil
 Journal of Microcolumn Separation <u>6</u> (1994) S. 331-359

- Columé A., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M.
 Simplified Method for the Determination of Chlorinated Fungicides and Insecticides in Fruits by Gas Chromatography
 Journal of Chromatography A 882 (2000) S. 193-203
- Soleas G. J., Yan J., Hom K., Goldberg D. M.
 Multiresidue Analysis of Seventeen Pesticides in Wine by Gas Chromatography with Mass-Selective Detection
 Journal of Chromatography A <u>882</u> (2000) S. 205-212
- 24 Specht W., Tilkes M.

Gaschromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie <u>301</u> (1980) S. 300-307

25 Specht W, Tillkes M.

Gaschromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie 5. Mitteilung: Methode zur Aufarbeitung von Lebensmitteln und Futtermitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft für die Multirückstandsbestimmung lipoid- und wasserlöslicher Pflanzenbehandlungsmittel (erweiterte Tabellen der Chromatographie-Bedingungen der 3. Mitteilung) Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie <u>322</u> (1985) S. 443-455

26 Pylypiw H. M.

Rapid Gas-Chromatographic Method for the Multiresidue Screening of Fruits and Vegetables for Organochlorine and Organophoshate Pesticides Journal of AOAC International <u>76</u> (1993) S. 1369-1373 Specht W., Pelz S., Gilsbach W.
Gas-Chromatographic Determination of Pesticide Residues after Clean-up by gelpermeation Chromatography and Mini-Silica Gel-Column Chromatography
6. Communication: Replacement of dichloromethane by ethyl acetate / cyclohexane in Liquid-Liquid Partition and Simplified Conditions for Extraction and Liquid-Liquid Partition

Fresenius Journal of Analytical Chemistry 353 (1995) S. 183 - 190

- Gilsbach W., Thier H.-P., Specht W.
 Ringversuch der Arbeitsgruppe Pestizide zur Qualitätssicherung von Rückstandslaborien
 Lebensmittelchemie <u>48</u> (1994) S. 74
- Beck H.
 Bundesgesetzblatt. <u>17</u> (1974) S. 269 276
- Stan H.-J., Dethlefs F.
 in Baltes W., Eklund T., Fenwick R., Pfannhauser W., Ruiter A., Thier H. P. (Editors): Strategies for Food Quality Control and Analytical Methods in Europe Proceedings of EURO FOOD CHEM VI, Hamburg, September 22-26, 1991; Behr's, Hamburg (1991) Vol. 2 S. 859-864
- Fishbein L., Zielinski Jr. W. L.
 Structural Transformation during the Gas Chromatography of Carbamates Chromatographia <u>2</u> (1969) S. 38-56
- Müller H.-M.
 Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen mit Hilfe der Kappillar Gaschromatographie
 Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie,
 1989, S. 174-178
- Wie S. I., Hammock B. D.
 Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assays for Residue Analysis of Diflubenzuron and BAY SIR 8514
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>30</u> (1982) S. 949-957

- Gebauer C.
 HPTLC Analysis of Diflubenzuron in Needles and Leaves
 Camag Bibliography Service (CBS), No.77 (September 1996) 6-7
 CAMAG Application Note A-66.1
- 35 Dommarco R., Santilio A., Fornarelli L., Rubbiani M.
 Simultaneous Quantitative Determination of Thirteen Urea Pesticides at Sub-ppb Levels on a Zorbax SB-C18 column
 Journal of Chromatography A <u>825</u> (1998) S. 200-204
- Mensah J. K., Lundanes E., Greibrokk T., Holen B.
 Determination of Diflubenzuron in Apples by Gas Chromatography
 Journal of Chromatography A <u>765</u> (1997) S. 85-90
- Hopkins W. A., Lauren D. R
 Analysis of the Pesticide Flufenoxuron in Apples and Kiwifruit by High-Performance
 Liquid Chromatography
 Journal of Chromatography 516 (1990) S. 442-445
- Singh P. P., Kaira R. L.
 Determination of Diflubenzuron Residues by Thin Layer Chromatography Chromatographia <u>27</u> (1989) S. 53-54
- Wimmer M. J., Smith R. R., Jones J. P.
 Analysis of Diflubenzuron by Gas Chromatography / Mass Spectrometry Using Deuterated Diflubenzuron as Internal Standard Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>39</u> (1991) S. 280-286
- Miliadis G. E., Tsiropoulos N. G., Aplada-Sarlis P. G.
 High-performance Liquid Chromatographic Determination of Benzoylurea Insecticides Residues in Grapes and Wine Using Liquid and Solid-Phase Extraction Journal of Chromatography A <u>835</u> (1999) S. 113-120

- 41 Bicchi C., Balbo C., Binello A., D'Amato A.
 HPLC-UV Determination of Pesticide Residues at 0.01 ppm in Apple and Pear Pulp
 Used for Baby Food
 HRC Journal of High Resolution Chromatography 19 (1996) S. 105-110
- Smith S., Willis G. H., McDowell L. L
 Electron Capture Gas Chromatographic Determination of Diflubenzuron and
 Permethrin in Soil and Water
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>31</u> (1983) S. 610-612
- 43 Armishaw P., Ward J., Millar R. G.
 Development of a Reference Material for Residues of Chlorfluazuron and Fluazuron in Beef Fat ACSL CRM 3,
 Part I. Preparation, Homogeneity and Stability
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>356</u> (1996) S. 10-12
 Part II. Certification
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>356</u> (1996) S. 13-16
- Tomsej T., Hajslová J.
 Determination of Benzoylurea Insecticides in Apples by High-Performance Liquid Chromatography
 Journal of Chromatography A <u>704</u> (1995) S. 513-517
- 45 Balinova A.

Multiresidue Determination of Pesticides in Plants by High-Performance Liquid Chromatography Following Gel Permeation Chromatographic Clean-up Journal of Chromatography A <u>823</u> (1998) S. 11-16

- Barnes K. A., Startin J. R., Thorpe S. A., Reynolds S. L., Fussell R. J.
 Determination of the Pesticide Diflubenzuron Mushrooms by High-Performance Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry Journal of Chromatography A <u>712</u> (1995) S. 85-93
- 47 Correia M., Delerne-Matos C. D., Alves A.
 Multi-Residue Methodology for Pesticide Screening in Wines Journal of Chromatography A <u>889</u> (2000) S. 59-67

- Sims J. J., Mee H., Erwin D. C.
 Methyl 2-Benzimidazolecarbamate, a Fungitoxic Compound Isolated from Cotton
 Plants Treated with Methyl-1-(Butylcarbamoyl)-2-Benzimidazolecarbamate (Benomyl)
 Phytopathology <u>59</u> (1969) S. 1775-1776
- Vonk J. W., Mihanovic B, Sijpesteijn A. K.
 Biochemical Mechanism for Conversion of Thiophanate-Methyl into Methyl Benzimidazol-2-yl-Carbamate (MBC) in Plant Tissue
 Netherlands Journal of Plant Pathology <u>83</u> (1977) S. 269-276
- 50 Chiba M., Singh R. P.
 High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Benomyl and Carbendazim in Aqueous Media
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>34</u> (1986) S. 108-112
- 51 Dhoot J. S., del Rosario A. R.
 Determination and Confirmation of Benomyl and Carbendazim in Water Using High-Performance Liquid Chromatography and Diode Array Detection
 Journal of Chromatography <u>645</u> (1993) S. 178-181
- Hock B., Elstner E.F. (Hrsg.)
 Schadwirkungen auf Pflanzen, Lehrbuch der Pflanzentoxikologie
 BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1988
- Marvin C. H., Brindle I. D., Singh R. P.
 Simultaneous Determination of Trace Concentrations of Benomyl, Carbendazim (MBC) and Nine Other Pesticides in Water Using an Automated Online Preconcentration High Performance Liquid Chromatographic Method
 Journal of Chromatography <u>518</u> (1990) S. 242-249
- Marvin C. H., Brindle I. D., Hall C. D., Chiba M.
 Rapid Online Precolumn High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Benomyl, Carbendazim and Aldicarb Species in Drinking Water Journal of Chromatography <u>555</u> (1991) S. 147-154

- Thomas D. H., Lopez-Avila V., Betowski L. D., Van Emon J.
 Determination of Carbendazim in Water by High Performance Immunoaffinity
 Chromatography Online with High-Performance Liquid Chromatography with Diode
 Array or Mass Spectrometric Detection
 Journal of Chromatography A <u>724</u> (1996) S. 207-217
- Mallat E., Barcelo D., Tauler R.
 Degradation Study of Benomyl and Carbendazim in Water by Liquid Chromatography and Multivariate Curve Resolution Methods Chromatographia <u>46</u> (1997) S. 342-350
- 57 Hogendoorn E. A., Hoogerbrugge R., Baumann R. A., Meiring H. D., de Jong A. P. J. M., van Zoonen P.
 Screening and Analysis of Polar Pesticides in Environmental Monitoring Programmes by Coupled-Column Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass
 Spectrometry
 Journal of Chromatography A 754 (1996) S. 49-60
- Bean K. A., Henion J. D
 Determination of Carbendazim in Soil and Lake Water by Immunoaffinity Extraction and Coupled-Column Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Journal of Chromatography A, Volume <u>791</u> (1997) S. 119-126
- López L.F., López A.G., Riba M. V.
 HPLC Method for Simultaneous Determination of Fungicides: Carbendazim, Matalaxyl, Folpet and Propiconazole in Must and Wine Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>37</u> (1989) S. 684-687
- Bernal J. L., del Nozal M. J., Toribio L., Jimenez J. J., Atienza J.
 High Performance Liquid Chromatographic Determination of Benomyl and Carbendazim Residues in Apiarian Samples
 Journal of Chromatography A <u>787</u> (1997) S. 129-136

- Loewy M., Kirs V., Carvajal G., Venturino A., Pechen de D'Angelo A. M.
 Groundwater Contamination by Azinphos Methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina)
 The Science of The Total Environment 225 (1999) S. 211-218
- Anastassiades M., Scherbaum E.
 Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutz- und Oberflächenbehandlungsmittelrückständen in Zitrusfrüchten mittels GC-MSD;
 Teil 1: Theoretische Grundlagen und Methodenentwicklung
 Deutsche Lebensmittel-Rundschau, <u>93, 10</u> (1997) S. 316-327
 Teil 2: Untersuchung von Proben aus dem Handel
 Deutsche Lebensmittel-Rundschau <u>93, 10</u> (1997) S. 393- 396
- 63 Nath A., Patyal S. K., Dubey J. K.
 A New Protocol for Rapid Sample Preparation for Spectrometric Estimation of Carbendazim Residues in Apple, Tomato and Mushroom Journal of Food Science and Technology <u>30</u> (1993) S. 239-240
- Garrido J., de Alba M., Jimenez I., Casado E., Folgueiras M. L.
 Chromatographic Analysis of Imazalil and Carbendazim in Fruits, Method Validation and Residue Monitoring Program 1995
 Journal of Chromatography A <u>765</u> (1997) S. 91-97
- Thapar S., Bhushan R., Mathur R. P.
 Degradation of Organophophorus and Carbamate Pesticides in Soils HPLC
 Biomedical Chromatography <u>9</u> (1995) S. 18-22
- 66 Tharsis N., Portillo J. L., Broto-Puig F., Comellas L.
 Simplified Reversed-Phase Conditions for the Determination of Benzimidazole
 Fungicides in Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection
 Journal of Chromatography A <u>778</u> (1997) S. 95-101
- Honing M., Riu J., Barceló D., van Baar B. L. M., Brinkman U. A. T.
 Determination of Ten Carbamate Pesticides in Aquatic and Sediment Samples by Liquid Chromatography-Ionspray and Thermospray Mass Spectrometry Journal of Chromatography A <u>733</u> (1996) S. 283-294

- Di Muccio A., Girolimetti S., Barbini D. A., Pelosi P., Generali T., Vergori L., De Merulis G., Leonelli A., Stefanelli P.
 Selective Clean-up Applicable to Aqueous Acetone Extracts for the Determination of Carbendazim and Thiabendazole in Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection Journal of Chromatography A <u>833</u> (1999) S. 61-65
- 69 Sannino A.
 Investigation into Contamination of Processed Fruit Products by Carbendazim, Methylthiophanat and Thiabendazole
 Food Chemistry <u>52</u> (1995) S. 57-61
- Färber H., Schöler H. F.
 Gas Chromatographic Determination of Carbamate Pesticides after Flash-Heater Methylation with Trimethylsulfonium Hydroxide
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>41</u> (1993) S. 217-220
- Di Corcia A., Nazzari M., Rao R., Samperi R., Sebastiani E.
 Simultaneous Determination of Acidic and Non-acidic Pesticides in Natural Waters by Liquid Chromatography Mass Spectrometry
 Journal of Chromatography A <u>878</u> (2000) S. 87-98
- Junker-Buchheit A., Witzenbacher M.
 Pesticide Monitoring of Drinking Water with the Help of Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography
 Journal of Chromatography A <u>737</u> (1996) S. 67-74
- Di Muccio A., Camoni I., Ventriglia M., Ausili A., Girolimetti S.
 Simplified Clean-up for the Benzimidazolic Fungicides by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection
 Journal of Chromatography A <u>697</u> (1995) S. 145-152
- Pawlowski T. M., Poole C. F.
 Extraction of Thiabendazole and Carbendazim from Foods Using Pressurized Hot (Subcritical) Water for Extraction: A Feasibility Study
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>46</u> (1998) S. 3124-3132

- Anastassiades M., Schwack W.
 Analysis of Carbendazim / Benomyl, Thiophanate Methyl and 2,4-d in Fruits and Vegetables after Supercritical Fluid Extraction Journal of Chromatography A 825 (1998) S. 45-54
- Orea J. M., Bescós B., Montero C., Ureña A. G.
 Analysis of Carbendazim in Agricultural Samples by Laser Desorption and REMPI Time-of-Flight Mass Spectrometry
 Analytical Chemistry <u>70</u> (1998) S. 491-497
- 77 Bushway R. J.
 - Complementation of Direct-Injection High-Performance Liquid Chromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Analysis of Thiabendazole in Fruit Juices and Concentrates Journal of Chromatography A <u>754</u> (1996) S. 431-435
- Dellacassa E., Martinez R., Moyna P.
 Simultaneous Determination of o-Phenylphenol, Imazalil and Thiabendazole Residues in Citrus Fruits by TLC-Densitometry Journal of Planar Chromatography <u>6</u> (1993) S. 326-327
- Carretero A. S., Blanco C. C., Fernández R. E., Gutiérrez A. F.
 Micellar-Stabilized Room-Temperature Phosphorimetric Determination of the
 Fungicide Thiabendazole in Canned Pineapple Samples
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>360</u> (1998) S. 605–608
- 80 Corti P., Dreassi E., Politi N., Aprea C.
 Comparison of an HPTLC and an HPLC Procedure for the Determination of Chlorpropham, Propham and Thiabendazole Residues in Potatoes Food Additives and Contaminants <u>8</u> (1991) S. 607-615
- 81 Onishi O. K.

Capillary Gas Chromatographic Determination of Thiabendazole in Citrus and Apple Juices Journal of Aoac International <u>77</u> (1994) S. 1293-1296

- Motohashi N., NaGashima H., Meyer R.
 Simultaneous Determination of Fungicide Residue in Citrus Journal of Liquid Chromatography <u>13</u> (1990) S. 345-355
- Motohashi N., NaGashima H., Meyer R.
 High-Performance Liqiud Chromatography of Fungicides in Citrus Fruits
 Journal of Liquid Chromatography <u>14</u> (1991) S. 3591-3602
- Bisposable Extraction Columns Rapid Extraction of Thiabendazole and Imazalil from Citrus Fruit
 Application Note J. T. Baker AN 044
- Cannavan A., Haggan S. A., Kennedy D. G.
 Simultaneous Determination of Thiabendazole and its Major Metabolite, 5 Hydroxythiabendazole, in Bovine Tissues Using Gradient Liquid Chromatography with
 Thermospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry
 Journal of Chromatography B <u>718</u> (1998) S. 103-113
- 86 Ito Y., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Kagami T.
 Application of Ion-Exchange Cartridge Clean-up in Food Analysis
 I. Simultaneous Determination of Thiabendazole and Imazalil in Citrus Fruit and
 Banana Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection
 Journal of Chromatography A <u>810</u> (1998) S. 81-87
- Arenas R. V., Rahman H., Johnson N. A.
 Determination of Thiabendazole Residues in Whole Citrus Fruits by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Journal of AOAC International <u>79</u> (1996) S. 579-582
- 88 Hock B.
 Schadwirkungen auf Pflanzen, Lehrbuch der Pflanzentoxikologie
 BI-Wissenschaftsverlag, 2., überarbeitete Auflage (1988)

- Navarro S., Barba A., Navarro G., Vela N., Oliva J.
 Multiresidue Method for the Rapid Determination in Grape, Must and Wine of Fungicides Frequently Used on Vineyards
 Journal of Chromatography A <u>882</u> (2000) S. 221-229
- 90 Develash R. K., Sugha S. K.
 Management of Downy Mildew (Peronospora Destructor) of Onion (Allium Cepa)
 Crop Protection <u>16, 1</u> (1997) S. 63-67
- 91 Yang S. S., Goldsmith A. I., Smetena I.
 Recent Advances in the Residue Analysis of N-Methylcarbamate Pesticides
 Journal of Chromatography A <u>754</u> (1996) S. 3-16
- 92 Chiron S., Barceló D.
 Determination of Pesticides in Drinking Water by Online Solid Phase Disc Extraction Followed by Various Liquid Chromatographic Systems
 Journal of Chromatography A <u>645</u> (1993) S. 125-134
- Slobodnik J., Jager M. E., Hoekstra-Oussoren S. J. F., Honing M., van Baar B. L. M., Brinkman U. A. T.
 Identification of Carbamates by Particle Beam / Mass Spectrometry Journal of Mass Spectrometry <u>32</u> (1997) S. 43-54
- 94 Sennert S., Volmer D., Levsen K., Wünsch G.
 Multiresidue Analysis of Polar Pesticides in Surface and Drinking Water by Online Enrichment and Thermospray LC-MS
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>351</u> (1995) S. 642-649
- Möder M., Popp P., Eisert R., Pawliszyn J.
 Determination of Polar Pesticides in Soil by Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray / Mass Spectrometry Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>363</u> (1999) S. 680-685

- McGinnis S.C., Sherma J.
 Determination of Carbamate Insecticides in Water by C-18 Solid Phase Extraction and Quantitative HPTLC
 Journal of Liquid Chromatography 12 (1994) S. 151-156
- 97 Redondo M. J., Ruiz M. J., Boluda R., Font G.
 Determination of Thiobencarb Residues in Water and Soil Using Solid-Phase Extraction Discs
 Journal of Chromatography A <u>678</u> (1994) S. 375-379
- Parrilla P., Vidal J. L. M., Galera M. M., Frenich A. G.
 Simple and Rapid Screening Procedure for Pesticides in Water Using SPE and HPLC
 DAD Detection
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>350</u> (1994) S. 633-637
- Fernández M., Picó Y., Mañes J.
 Determination of Carbamate Residues in Fruits and Vegetables by Matrix Solid-Phase
 Dispersion and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
 Journal of Chromatography A <u>871</u> (2000) S. 43-56
- Di Corcia A., Crescenzi C., Lagana A.
 Evaluation of a Method Based on Liquid Chromatography Electrospray Mass
 Spectrometry for Analyzing Carbamate Insecticides in Fruits and Vegetables
 Journal of Agricultural and Food Chemistry <u>44</u> (1996) S. 1930-1938
- Nunes G. S., Ribeiro M. L., Polese L., Barceló D.
 Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-Methyl-Carbamate Insecticides in Vegetable Matrices by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection
 Journal of Chromatography A <u>795</u> (1998) S. 43-51
- Brooks M. W., Barros A.
 Determination of Carbosulfan in Oranges by High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Fluorescence Analyst <u>120</u> (1995) S. 2479-2481

Study of the Feasibility of the Use of Activated Carbon Membranes for the Online Clean-up of Vegetable Extracts in the Determination of N-Methylcarbamate Pesticides by Liquid Chromatography Journal of Chromatography A 788 (1997) S. 87-94

- Patik V. B., Shingare M. S.
 Thin-Layer Chromatographic Spray Reagent for the Screening of Biological Materials for the Presence of Carbaryl Analyst <u>119</u> (1994) S. 415-416
- Stan H.-J., Klaffenbach P.
 Determination of Carbamate Pesticides and Some Urea Pesticides after Derivatization with Acetic Anhydride by Means of GC MSD
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>339</u> (1991) S. 151-157
- Stuart I. A., Ansell R. O., Maclachlan J., Bather P. A., Gardiner W. P.
 Five-way ANOVA Interaction Analysis of the Selective Extraction of carbaryl, pirimicarb and Aldicarb from Soils by Supercritical Fluid Extraction
 Analyst <u>122</u> (1997) S. 303-308
- 107 Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in und auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Rückstands-Höchstmengen-Verordnung – RHmV) vom 01. September 1994 (BGBl. I S. 2299), zuletzt geändert durch dritte VO zur Änderung der Rückstands-Höchstmengen-Verordnung vom 26. September 1997 (BGBl. I S. 2366)
- Scherz H., Senser F. [Hrsg.], Souci S. W. [Begr.]
 Die Zusammensetzung der Lebensmittel, N\u00e4hrwerttabellen
 Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, S. 803

Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography Journal of Chromatography A <u>856</u> (1999) S. 3-54

¹⁰⁹ Hennion M.-C.

- 110 Sonderheft zum Thema Festphasenextraktion Journal of Chromatography A 885 (2000) S.1-464 111 Ravindranath B. Principles and Practice of Chromatography John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1989) S. 201 ff. 112 Heitz W. Zum Mechanismus der Gelpermeations-Chromatographie Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie 277 (1975) S. 323-333 113 Pasch H., Kilz P. Copolymeranalytik mit Online gekoppelter 2D-Chromatographie GIT Labor-Fachzeitschrift 3 (1999) S. 239-244 114 Phenomenex Broschüre 115 Doerffel K., Geyer R. Analytikum VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 7. Auflage (1987) S. 448-451 116 Specht W., Tilkes M. Gaschromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gelchromatographie und Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie, 1. Mitteilung: Organochlor-Pflanzenbehandlungsmittel in Tabak und Tabakerzeugnissen Beiträge zur Tabakforschung International <u>10</u> (1979) S. 73-79 117 Roos A. H., van Munsteren A. J., Nab F. M., Tuinstra L. G. M. T.
 - III/ Roos A. H., van Munsteren A. J., Nab F. M., Tunistra L. G. M. T.
 Universal Extraction / Clean-up Procedure for Screening of Pesticides by Extraction
 with Ethyl Acetate and Size Exclusion Chromatography
 Analytica Chimica Acta <u>196</u> (1987) S. 95-102

- Baumann R. A., Ernst G. F., Jansen J. T. A., de Kok A., Olthof P. D. A., Tuinstra L. G. M. T., Verwaal W., van Zoonen P., Hernandez Hernandez F.
 Development of a Multiresidue Method for Nitrogen Containing Pesticides
 Part 1: Preliminary Results
 Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 339 (1991) S. 357-364
- 119 Butz S.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Wasser - Entwicklung einer Multimethode Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie,

Wissenschaft und Technik Verlag, 1. Auflage, Berlin, 1995, S. 181-185

- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.
 Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1b,
 VCH, Weinheim (1993)
- 121 Frey H. P., Zieloff K.

Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie - Grundlagen und Praxis, VCH, Weinheim (1993) S. 153-158 und S. 237-241

- 122 Knapp D. R.Handbook of Analytical DerivatisationJohn Wiley & Sons, New York, 1979
- Blau K., Halket J.Handbook of Derivates for ChromatogrphyWiley, Chichester 1993, S. 3 ff.
- Färber H., Peldszus S., Schöler H. F.
 Gaschromatographische Bestimmung von aciden Pestiziden in Wasser nach Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid Vom Wasser <u>76</u> (1991) S. 13-20

- 125 Amijee M., Cheung J., Wells R. J.
 Direct On-Column Derivatisation in Gas Chromatography
 II. Comparison of Various On-Column Methylation Reagents and the Development of a New Selective Methylation Reagent
 Journal of Chromatography A <u>738</u> (1996) S. 43-55
- 126 Heberer T.

Identifizierung und Quantifizierung von Pestizidrückständen und Umweltkontaminationen in Grund- und Oberflächenwässer mittels Kapillargaschromatographie–Massenspektrometrie Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, Wissenschaft und Technik Verlag Dr. Jürgen Groß, 1. Auflage, 1995, S. 53 ff.

- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1b,VCH, Weinheim (1993) S. 179 ff.
- 128 Beyerinck M. W.Zeitschrift für physikalische Chemie <u>3</u> (1889) S. 110
- 129 Stahl E.Dünnschicht-ChromatographieSpringer-Verlag, Berlin (1967), 2. Auflage
- Frey H. P., Zieloff K.
 Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie Grundlagen und Praxis,
 VCH, Weinheim (1993) S. 102
- 131 Burger K.,

TLC-PMD, Dünnschichtchromatographie mit Gradientenelution im Vergleich zur
Säulenflüssigkeits-Chromatographie
Fresenius Z. Analytical Chemistry <u>318</u> (1984) S. 228-254

 Bestimmung ausgewählter Pflanzenschutzmittel mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik
 DIN 38407, Teil 11 Dezember 1990

- 133 BedienungsanleitungCAMAG AMD SystemAbschnitt 5.2 und 5.3
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.
 Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1a und 1b,
 VCH, Weinheim (1993)
- Williams D. H., Fleming I.
 Spektren im Ultravioletten und sichtbaren Bereich in:
 Strukturaufklärung in der organischen Chemie. Williams, D. H., Fleming I. (Hrsg.)
 Thieme, Stuttgart, New York (1991) 6. Auflage, S. 1-36
- Frey H. P., Zieloff K.
 Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie Grundlagen und Praxis,
 VCH, Weinheim (1993) S. 267 ff
- 137 Engler R.

Neue Arbeitstechniken in der Dünnschicht-Chromatographie Labor Praxis 6 (1982) S. 1345-1354

138 Ebel S.

UV / VIS Spectra and Spectral Libraries in TLC / HPTLC. 1. Background Correction and Normalization Journal of Planar Chromatography <u>3</u> (1990) S. 42-46

139 Weins C., Jork H.

Toxicological Evaluation of Harmful Substances by in Situ Enzymatic and Biological Detection in High Performance Thin-Layer Chromatography Journal of Chromatography A <u>750</u> (1996) S. 403-407

140 Kovác J., Henselová M.

Detection of Triazine Herbicides in Soil by a Hill-Reaction Inhibition Technique after Thin-Layer Chromatography Journal of Chromatography <u>133</u> (1977) S. 429-422
- Sackmauerova M., Kovac J.,
 Thin-Layer Chromatographic Determination of Triazine and Urea Herbicides in Water
 by Hill-Reaction Inhibition Technique
 Fresenius Journal of Analytical Chemistry <u>292</u> (1978) S. 414-415
- 142 Lawrence J. F.Simple, Sensitive and Selective Thin Layer Chromagraphic Technique for Detecting

Some Photosynthesis Inhibiting Herbicides Journal of Association of Offical Analytical Chemists <u>63</u> (1980) S. 758-761

143 Thron K.

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Fungiziden in Lebensmitteln mit biologischer Detektion Diplomarbeit an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1998

- 144 Ministry of Public Health, Welfare and Sport,The Netherlands / General Inspectorate for Health Protection, Screening Methods,Part IV, 8, 1996
- Hostettmann K., Terreaux C., Marston A., Potterat O.
 The Role of Planar Chromatography in the Rapid Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants
 Journal of Planar Chromatography <u>10</u> (1997) S. 251-257
- 146 Lovelock J. E.

The Electron Capture Detector – a Personal Odyssey Chemtech (1981) S. 531-537

147 Böcker J.

Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese Vogel Buchverlag, Würzburg (1997) S. 106-107

148	Stan HJ.
	Pesticides in:
	Gordon, M. H.,
	Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis,
	Hrsg.: Ellis Horwood, New York (1990) S. 261-325
149	Gordon M. H.
	Principles of Gas Chromatography in:
	Gordon, M. H., Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis
	Hrsg.: Ellis Horwood, New York (1990) S. 11-58
150	Dressler M.
	Selective Gas Chromatographic Detectors
	Journal of Chromatography 36 (1986) S. 15-90
151	Stan HJ., Heberer T.
	Identification and Confirmatory Analysis Based on Capillary GC-Mass Spectrometry
	in:
	Stan HJ. (Editor), Analysis of Pesticides in Ground and Surface Water I, Progress in
	Basic Multi-Residue Methods,
	Chemistry of Plant Protection, Vol. 11, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1995)
	S. 146-150
152	Gerhardt K. O.
	Gas Chromatography-Mass Spectrometry in:
	Gordon, M. H., Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis
	Hrsg.: Ellis Horwood, New York (1990) S. 59-85
153	Böcker J.
	Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und

Kapillarelektrophorese

Vogel Buchverlag, Würzburg (1997) S. 236-237

154 Sample Injectors, Switching Valves, and Accessories for Liquid Chromatography Katalog der Firma Rheodyne Nr. 5 (1991) S. 3

- 155 Claessens H. A., Kuyken M. A. J.
 A Comparative Study of Large Volume Injection Techniques for Microbore Columns in HPLC
 Chromatographia <u>23</u> (1987) S. 57
- 156 Schröder, H. Fr.
 Application of LC-MS in Environmental Chemistry in: Barceló D. (Ed.)
 Journal of Chromatography Library 59 (1996) S. 303
- Stan, H.-J., Schwarzer, M.
 Online Coupling of Liquid Chromatography with Thin-Layer Chromatography Journal of Chromatography A <u>819</u> (1998) S. 35 - 44
- 158 Schwarzer M.

Computergestützte Rückstandsanalytik Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, Wissenschaft & Technik Verlag, Berlin, 1998, Kapitel 6

- Hamburger M., Danz H., Dittmann K.
 HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe
 BIOforum 4 (2002) S. 182-185
- 160 7700. Verordnung (EWG) Nr. 1576/89 des Rates vom 29. Mai 1989 zur Festlegung der allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen zuletzt geändert am 01.01.1989 (Abl. Nr. L 1 S. 1, 78)
- 161 Jackson M.Malt Whisky, Der Guide f
 ür Kenner und GenießerWilhelm Heyne Verlag, M
 ünchen, 3. Auflage, 1992
- Belitz H.-D., Grosch W.
 Lehrbuch der Lebensmittelchemie
 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, 1987, S. 751

163 Doerffel K., Geyer R.

Analytikum

Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1987, S. 17

164 EG-Richtlinie 85 / 591 / EWG

Zur Einführung gemeinschaftlicher Probennahmenverfahren und Analysemethoden für Kontrolle von Lebensmitteln vom 20. Dezember 1985

165 Linkerhägner M.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen mittels Kapillargaschromatographie und Atomemissionsdetektion Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, Verlag Shaker, Aachen, 1. Auflage, 1994, S. 41

166 Frehse H., Thier H. P.

Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept GIT Labor-Fachzeitschrift <u>4</u> (1991) S. 285-291

- 167 Funk W., Dammann V., Oehlmann G.
 Statistische Methoden in der Wasseranalytik: Begriffe, Strategien, Anwendungen VCH, Weinheim; Deerfield Beach, Fl., (1985) S. 69
- Fong G., Moye H. A., Seiber J. N., Toth J. P.
 Pesticide Residues in Foods: Methods, Techniques and Regulations
 John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore,
 Toronto, 1999, S. 3-9
- 169 DFG-Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Statistische Beurteilung von Analysenverfahren und Analysenergebnissen Weinheim, 1991, Kapitel XI-13
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 29.00 1 (EG)
 Untersuchung von Lebensmitteln, Probenahmeverfahren für die amtliche Kontrolle der
 Rückstände von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf und in Obst und Gemüse

- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.
 Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1b,
 VCH Weinheim (1993) S. 169
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.
 Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1b,
 VCH Weinheim (1993) S. 179
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.
 Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1b,
 VCH Weinheim (1993) S. 185
- 174 Zapf A.

Identifizierung und Bestimmung von Metaboliten des anaeroben mikrobiellen Abbaus von chlorierten Benzolen Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1998

- Arens M., Schulte E., Weber K.
 Fettsäuremethylester, Umesterung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (Schnellverfahren)
 Fat Science Technology <u>96</u> (1994) S. 67-68
- Anastassiades M., Scherbaum E., Mandel F., Schwack W.
 Analysis of Several N-Methyl-O-Aryl-Carbamates in Fruits and Vegetables after Supercritical Fluid Extraction;
 2nd European Pesticide Residue Workshop 1998
- 177 Anastassiades M., Scherbaum E.
 Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutz- und Oberflächenbehandlungsmittelrückständen in Zitrusfrüchten mittels GC-MSD
 Teil 1: Theoretische Grundlagen und Methodenentwicklung
 Deutsche Lebensmittel-Rundschau <u>93, 10</u> (1997) S. 316 ff.

- Anastassiades M., Schwack W.
 Analysis of Carbendazim / Benomyl; Thiophanate-Methyl and 2,4-D in Fruits and Vegetables after Supercritical Fluid Extraction
 2nd SFE-SFC-XSE Symposium in Siegen, Germany, 09.-10. Oktober 1997
- Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Netherlands General Inspektorate for Health Protection
 Screening Methods, Part IV, 8, 1996
- 180 Homans A. L., Fuchs A.Journal of Chromatography <u>51</u> (1970) S. 327-329
- 181 Vigelahn L.

Bioautographie

Sonderforschungsbereich 193 "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" der Deutschen Forschungsgemeinschaft Zwischenbericht 1996-1998; Arbeits- und Ergebnisbericht 1997-1999

182 Schwarzer, M.

Computergestützte Rückstandsanalytik Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, Wissenschaft und Technik Verlag, 1. Auflage, Berlin, 1998, Kapitel 6

183 Tafay L.

Bestimmung der Oberflächenbehandlungsmittel in Zitrusfrüchten mittels Automatisierter Mehrfachentwicklung - Dünnschichtchromatographie Praktikumsarbeit an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1995

Burger K., Köhler J., Jork H.
Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking Water
Part 1: Fundamentals and Method
Journal of Planar Chromatography <u>3</u> (1990) S. 504

185 Dethlefs F.

Qualitative Untersuchung und Bestimmung der Nachweisgrenze von Phenylharnstoffund Carbamatpestiziden mit der AMD-Technik Praktikantenbericht im Rahmen der Ausbildung zum Lebensmittelchemiker an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1995

186 Butz S.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Wasser - Entwicklung einer Multimethode

Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, Wissenschaft und Technik Verlag, 1. Auflage, Berlin, 1995, S 154

187 Lee H.-B., Chau A. S. Y.,

Analysis of Pesticide Residues by Chemical Derivatization.VI. Analysis of Ten Acid Herbicides in SedimentJournal of Association of Offical Analytical Chemists <u>66</u> (1986) S. 1023-1028

188 Wiesner C.

Untersuchung einer Derivatisierungsmethode mit Pentafluorbenzylbromid von Carbamaten zum Einsatz in der Gaschromatographie Praktikumsarbeit an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1998

189 Zapf A.

Identifizierung und Bestimmung von Metaboliten des anaeroben mikrobiellen Abbaus von Benzolen Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 1998

- McLafferty F. M., Tureček F.
 Interpretation von Massenspektren
 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)
- 191 Pellegrin V.Journal of Chemical Education <u>60</u> (1983) S. 626zitiert in [190] S. 27

- 192 Gottwald W.PR-HPLC f
 ür AnwenderVCH, New York, Basel, Cambridge, Tokio (1993) S. 100
- Holland P. T., McNaughton D. E., Malcolm C. P.
 Multiresidue Analysis of Pesticides in Wines by Solid-Phase Extraction Journal of AOAC International <u>77</u> (1994) S. 79-89
- Hamburger M., Danz H., Dittmann K.HPLC-basierte Auffindung biologisch aktiver NaturstoffeBIOforum 4 (2002) S. 182-185

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Ursula Wippo
Anschrift:	Wasserland 2, 53129 Bonn
Geburstdatum/ -ort:	28. Januar 1960 in Berlin
Familienstand:	verheiratet, Adoptivsohn



Schul- und Berufsausbildung

1966 – 1976	2. Polytechnische Oberschule Prenzlauer Berg Berlin, Mittlere Reife
1976 - 1978	2. Berufsschule Berlin / Rewatex Berlin,
	Textilreinigerin
1985 - 1987	Berlin Kolleg, Allgemeine Hochschulreife

Studium

09/1978 - 03/1979	Studium der Textiltechnik, Fachschule für Textiltechnik Forst
04/1988 - 07/1992	Studium der Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin
15. Juli 1992	Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker, Teil A

Berufspraktikum

09/1993 - 02/1994	Praktikum für Lebensmittelchemiker (1. Teil)
	Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin, Arbeitskreis von
	Prof. HJ. Stan; Anfertigung einer experimentellen Arbeit
	"Untersuchung des Sorptions- und Abbauverhalten von Alachlor an
	Boden"
03/1994 – 08/1994	Praktikum für Lebensmittelchemiker (2. Teil)
	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin

14. November 1994 Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker, Teil B

Dissertation

10/1994 - 09/2003	Anfertigung der Promotionsarbeit "Bestimmung von thermolabilen
	und nichtflüchtigen Pflanzenschutzmittelrückständen in pflanzlichen
	Lebensmitteln, Anwendung der Hochleistungsdünnschichtchromato-
	graphie mit automatischer Mehrfachentwicklung und ihrer Online-
	Kopplung mit der Hochleistungsflüssigchromatographie"

Fachspezifische Berufstätigkeiten

08/1992 - 09/1992	Studentische Aushilfskraft, Bilacon GmbH, Handelslabor für
	Lebensmittelanalytik, Berlin
12/1992 - 06/1993	Technische Assistentin, Bundesgesundheitsamt, Institut für Wasser-,
	Boden- und Lufthygiene, Berlin
10/1994 - 09/1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Lebensmittelchemie der
	Technischen Universität Berlin im Arbeitskreis von Prof. HJ. Stan,
	Leitung des toxikologischen Praktikums (Schwerpunkt: Rückstands-
	analytik von Pflanzenschutzmitteln und Schwermetallen)
seit 04/2000	Wissenschaftliche Angestellte, Bundesinstitut für Arzneimittel und
	Medizinprodukte, Abteilung 3 Qualität, Bonn