

KfK 5182
April 1993

Trennung von Pestiziden mit der Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie sowie ihre spektralphotometrische und elektrochemische Detektion

B. S. Seidel, W. Faubel, H. J. Ache
Institut für Radiochemie
Energie- und Stoffumsetzungen in der Umwelt

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Radiochemie

Energie- und Stoffumsetzungen in der Umwelt

KfK 5182

Trennung von Pestiziden mit der

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

sowie

ihre spektralphotometrische und elektrochemische Detektion

B. S. Seidel, W. Faubel, H. J. Ache

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Trennung von Carbamatpestiziden mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie ihre spektralphotometrische und elektrochemische Detektion

In der vorliegenden Arbeit ist die Trennung der fünf Carbamatpestizide Carbaryl, Propham, Chlorpropham, Barban und Chlorbufam in wäßrigen Lösungen unter Verwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie beschrieben. Der Nachweis der aufgetrennten Substanzen erfolgte sowohl mit einem elektrochemischen (HPLC/ELCD) als auch mit einem Diodenarray Detektor (HPLC/UV).

Als Eluentenphase wurden unterschiedliche pH-Wert gepufferte Acetonitril/Wasser Mischungen eingesetzt, mit dem Ziel, die Hydrolyseempfindlichkeit der Carbaminsäureester zu verringern.

Mit beiden Detektionssystemen (HPLC/ELCD und HPLC/UV) wurden die Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen der fünf Pestizide bestimmt, die im Bereich von 10 bis 90 ppb liegen. Es zeigte sich, daß der elektrochemische Detektor eine um einen Faktor 3 bessere Nachweisgrenze besitzt als der Diodenarray-Detektor, dennoch konnte der gültige Grenzwert von Pestiziden in Trinkwasser von 0,1 µg/l (0,1 ppb) für die Einzelsubstanz nicht ohne Voranreicherung erreicht werden.

Summary

Trace determination of carbamate pesticides via HPLC-separation with electrochemical and spectrophotometric detection.

In this paper, we describe the separation of five carbamate pesticides Carbaryl, Protham, Chlorprotham, Barban and Chlorbufam in aqueous solution by using the high performance liquid chromatography (HPLC) in combination with an electrochemical (HPLC/ELCD) and a conventional ultraviolet-visible diode array (HPLC/UV) detection device.

As eluent a mixture of acetonitril/water was used and various buffer solutions were added to avoid hydrolysis reactions of the carbamate acid esters. With both systems, HPLC/ELCD and HPLC/UV, calibration curves for all five pesticides have been recorded and the limits of detection have been determined between 10 and 90 ppb. The performance of the electrochemical device seems to be a factor of about 3 better than the diodearray detector, however the 0,1 ug/l (0,1 ppb) limit for the maximum amount of pesticides in drinking water can not be reached without a preconcentration step.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	-5-
2. Die Pestizidgruppe der Carbamate	-6-
3. Trennung der Pestizide	-9-
3.1. Grundlagen der HPLC	-9-
3.2. Reversed-Phase-Chromatographie (RP)	-14-
3.3. Experimenteller Teil	-16-
3.3.1. Aufbau der Apparatur	-16-
3.3.2. Durchführung der Trennung	-17-
4. Untersuchungen zur Ultraviolett-Detektion	-18-
4.1. UV-Detektionssysteme	-18-
4.2. Der Diodenarray-Detektor	-19-
4.3. Experimenteller Teil	-21-
4.3.1. Durchführung der Trennung	-21-
4.3.2. Quantitative Analyse	-25-
4.3.3. Bestimmung der Nachweisgrenzen	-27-
5. Untersuchungen zur elektrochemischen Detektion (ELCD)	-29-
5.1. Elektrochemische Detektionssysteme	-29-
5.2. Das amperometrische Detektionssystem	-31-
5.3. Einflußgrößen auf das Detektorsignal	-33-
5.4. Experimentelle Durchführung	-38-
5.4.1. Anforderungen des ELCD an das HPLC-System	-38-
5.4.2. Meßvorgang	-39-
5.4.3. Eignung des Detektors zum Nachweis von Carbamaten	-40-
5.4.4. Abhängigkeit des Detektorsignals von Leit-salz und pH-Wert	-43-
5.4.5. Abhängigkeit des Detektorsignals von der Fließgeschwindigkeit	-46-
5.4.6. Abhängigkeit des Detektorsignals von der Temperatur	-47-
5.5. Durchführung der Trennung und Bestimmung der Nachweisgrenzen	-48-

	Seite
6. Diskussion und Ausblick	-52-
7. Literatur	-54-
8. Anhang: Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	-56-

1. Einleitung und Problemstellung

In der Zeit nach dem zweiten Weltkrieg konnte mit der Entwicklung und dem Einsatz von neuartigen Pestiziden die Beschaffenheit und Menge der erzeugten landwirtschaftlichen Produkte deutlich verbessert werden. Die rechtliche Zulassung von Pflanzenschutzmitteln wurde hierbei durch das Pflanzenschutzgesetz geregelt, das in seiner Fassung von 1968 erstmals von den Herstellern Angaben über die Auswirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Umwelt forderte. Dies setzte einen enormen Entwicklungsbedarf an rückstandsanalytischen Methoden für die Boden-, Wasser-, Luft- und Pflanzenanalyse in Gang.

Besondere Aufmerksamkeit gilt naturgemäß dem Auftreten von Rückständen im Grundwasser als möglicher Kontaminationsquelle für Trinkwasser. Im Jahre 1985 trat eine EG-Richtlinie in Kraft, nach der die zulässige Höchstmenge an Pestiziden in Trinkwassern auf $0,1 \mu\text{g/l}$ für die Einzelsubstanz und $0,5 \mu\text{g/l}$ für die Summe der Substanzen limitiert ist [1]. In der neugefaßten Trinkwasserverordnung vom 1. Oktober 1986 wurden diese Grenzwerte in nationales Recht übernommen [2].

In der bisher gängigen Praxis werden leichtflüchtige Pestizide vorwiegend gaschromatographisch bestimmt. Schwerflüchtige oder thermisch instabile Verbindungen werden hingegen mit der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) aufgetrennt.

Ziel dieser Arbeit ist es, thermisch instabile Carbamatpestizide mit der HPLC in einem on-line Verfahren ohne Zwischenanreicherung oder Derivatisierung der Probesubstanzen zu trennen und in den gesetzlich geforderten Grenzkonzentrationen nachzuweisen. Hierzu stand - wie vom Gesetzgeber für solche Analysen vorgesehen - ein Diodenarray-Detektor zur Verfügung, der mit einem elektrochemischen Detektor mit besonders hoher Substanzempfindlichkeit in seiner Anwendbarkeit verglichen wurde.

Aus der Gruppe der Carbamate wurden fünf der bekanntesten Substanzen ausgesucht, die im Hinblick auf die flüssigkeitschromatographische Trennung als auch auf eine erfolgreiche Detektion besondere Ansprüche stellten.

Zur Durchführung wurde ein HPLC-System mit einem Diodenarray und einem elektrochemischen Detektor aufgebaut und in Betrieb genommen. Die Empfindlichkeit des elektrochemischen Detektors wurde durch Optimierung seiner Einflußgrößen erhöht. Die Trennungen und die Pestiziddetektion wurden hinsichtlich einer minimalen Nachweisgrenze ausgelegt.

2. Die Pestizidgruppe der Carbamate

Die in dieser Arbeit untersuchten Pestizide gehören zu der Stoffgruppe der Carbamate. Es sind Derivate der in freier Form nicht existenten Carbamidsäure HOOC-NH_2 , von der sich große Gruppen fungizider, herbizider und insektizider Wirkstoffe ableiten.

Carbamate besitzen in der Regel folgende Grundstruktur:



Abbildung 1: Grundstruktur der Carbamate

Als Fungizide wirken Derivate der Dithiocarbamidsäure ($\text{X} = \text{S}$). Die Carbamate mit bedeutender insektizider oder herbizider Wirkung sind Carbamidsäureester (Urethane), bei denen $\text{X} = \text{O}$ ist.

Dabei werden die Carbamidsäureester nach ihrer chemischen Struktur in N-Alkylcarbamate und N-Arylcarbamate unterteilt.

Die N-Alkylcarbamate ($\text{R}_2 = \text{CH}_3$, $\text{R}_1 = \text{H}$ oder CH_3) sind Insektizide, wobei ihr R_3 -Rest meist aromatische Carbo-, Heterocyclen oder Oximderivate enthält.

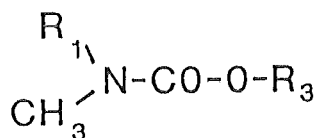


Abbildung 2: Grundstruktur der N-Alkylcarbamate

Als Herbizide wirksam sind N-Arylcarbamate, bei denen R_3 ein Alkylrest, R_2 ein H-Atom und R_1 eine häufig chlorierte Phenylgruppe enthält.

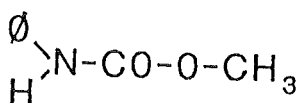
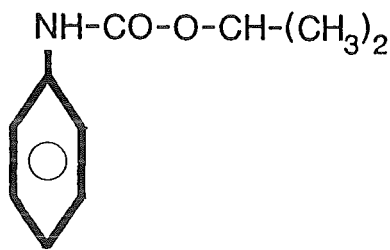


Abbildung 3: Grundstruktur der N-Arylcarbamate

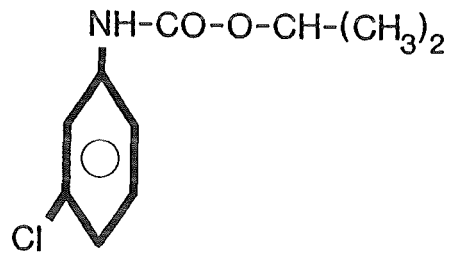
Die analytische HPLC-Trennung wurde mit vier N-Arylcarbamaten und einem N-Alkylcarbamate durchgeführt. Die N-Arylcarbamate stammen alle aus der Gruppe der N-Phenylcarbamate, von deren herbiziden Wirkung Friesen schon 1929 berichtete [3] und deren keimhemmende Wirkung erstmals in der Zeit des zweiten Weltkrieges genauer untersucht wurde [4]. Die verwendeten N-Arylcarbamate sind in den Abbildungen 4-7 dargestellt.

Propham



Isopropyl-phenylcarbamate

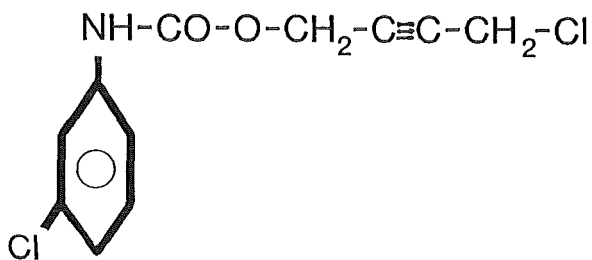
Chlorpropham



Isopropyl-3-chlorphenylcarbamate

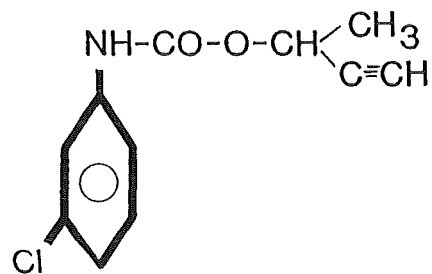
Abbildung 4 und 5: Grundstrukturen von Propham und Chlorpropham

Barban



4-Chlor-2-butynyl-N-chlorphenyl Carbamate

Chlorbufam



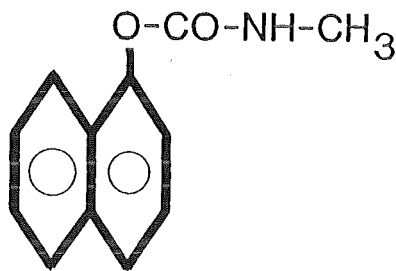
Carbamate

Abbildung 6 und 7: Grundstrukturen von Barban und Chlorbufam

Alle vier Carbamate werden in Mischungen als selektive Breitbandinsektizide zur Unkrautbekämpfung eingesetzt, wobei mit steigender C-Anzahl des Alkoholrestes deren Aktivität sinkt. Die Chlorierung erhöht die Aktivität, vermindert jedoch häufig die Selektivität.

Aus der Gruppe der insektiziden N-Alkylcarbamate wurde mit dem Carbaryl der bekannteste Vertreter ausgesucht, der weltweit in großen Mengen zur Bekämpfung beißender Insekten im Obst-, Garten-, Acker- und Weinbau eingesetzt wird. Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Cholinesterase, einem Enzym, das den Cholinhaushalt regelt. Hierbei besitzt gerade das Carbaryl eine extrem niedrige Säugetiertoxizität [5]. Abbildung 8 zeigt die Grundstruktur von Carbaryl:

Carbaryl



1-Naphthyl-N-methylcarbamate

Abbildung 8: Grundstruktur von Carbaryl

3. Trennung der Pestizide

3.1 Grundlagen der HPLC

Die Flüssigkeitschromatographie ist ein physikalischer Trennprozeß, bei dem das zu trennende Probengemisch zwischen zwei Phasen verteilt wird. Dies geschieht in einer Trennsäule, die auf einem stark porösem Packungsmaterial mit hoher spezifischer Oberfläche die feste stationäre Phase als dünnen äußeren Film enthält. Das aufgegebene Lösungsmittelgemisch (Eluent) durchströmt als mobile Phase die Packung und transportiert das gelöste Probengemisch mit sich.

Stehen stationäre und mobile Phase in innigem Kontakt miteinander, so stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht einer Substanz X ein, das durch den Verteilungskoeffizienten K oder dem Kapazitätsfaktor k' wiedergegeben wird:

$$K_X = c_{\text{stat}}/c_{\text{mob}} \text{ oder } k'_X = n_{\text{stat}}/n_{\text{mob}}, \quad (3.1)$$

mit c_{stat} = Konzentration der Substanz X in der stationären Phase
 c_{mob} = Konzentration der Substanz X in der mobilen Phase
 n_{stat} = Anzahl Mole des Stoffes X in der stationären Phase
 n_{mob} = Anzahl Mole des Stoffes X in der mobilen Phase.

Um ein Stoffsystem trennen zu können, müssen die Komponenten verschiedene Verteilungskoeffizienten besitzen. Diese beruhen auf unterschiedlich starken physikalischen Sorptionskräften der Substanzen an der stationären Phase und werden durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, sowie Dispersionskräfte hervorgerufen. Eine Chemisorption des Analyten ist wegen der irreversiblen Haftung an der stationären Phase unerwünscht.

Soll nun ein Substanzgemisch getrennt werden, so spült man die Säule zu Beginn mit reinem Eluenten. Hiermit wird eine gleichmäßige Belegung der stationären Phase mit Lösungsmittelmolekülen erreicht. Abbildung 9 zeigt den gesamten Trennvorgang. Dem kontinuierlichem Lösungsmittelstrom wird durch Injektion das Probengemisch aufgegeben (Abbildung 9 a). Je nach Kapazitätsfaktor haften die Substanzen unterschiedlich lange an der Säulenphase, werden aber durch frischen, nachfolgenden Eluenten unter Einstellung eines neuen Verteilungsgleichgewichtes wieder von der Säule gelöst (Abbildung 9 b). Nach oftmaliger Wiederholung dieses Vorganges ergibt sich eine Trennung in Abhängigkeit von der Verweilzeit (Abbildung 9 c).

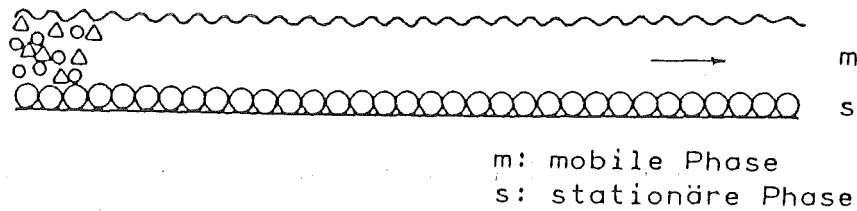


Abbildung 9 a: Injektion zweier Komponenten

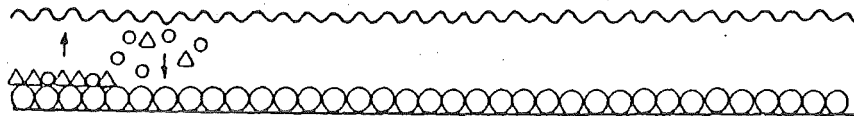


Abbildung 9 b: Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes

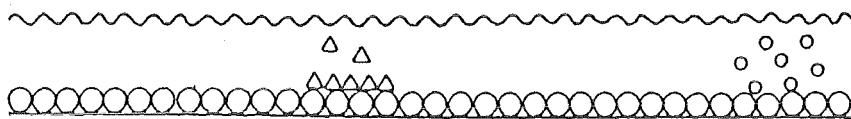


Abbildung 9 c: Auftrennung durch wiederholte Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes

Eine Verbesserung der beschriebenen Trennmethode stellt die HPLC (High Performance Liquid Chromatography (=Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) dar, deren Grundlagen schon früh aufgezeigt wurden [6]:

Die stationäre Phase besteht hierbei aus möglichst kleinen Teilchen, um eine große spezifische Oberfläche zu verwirklichen. Dementsprechend müssen hohe Drücke zum Durchpressen der mobilen Phase angewandt werden, weshalb man auch von High Pressure Liquid Chromatography (=Hochdruckflüssigkeitschromatographie) spricht. Die so erreichten Trennleistungen sind mit denen von Gaschromatographen vergleichbar.

Dabei setzte die stürmische Entwicklung der HPLC erst in den 70er Jahren ein, als mit der technischen Bereitstellung von porösen Füllmaterialien genau definierter Kornradien und Porengrößen in Säulensystemen auch rheologisch eindeutige Strömungsverhältnisse bei hohen Drücken realisiert werden konnten. Man erhielt mit der HPLC ein Verfahren, das im Gegensatz zur klassischen Säulenchromatographie eine Analysenzeit von nur wenigen Minuten erreichte, sowie ein stark verbessertes Trennverhältnis bzw. eine höhere Auflösung besaß.

Die eluierten Substanzen werden von der mobilen Phase in den Detektor transportiert und vom Schreiber im idealen Fall als Gaußkurven registriert. Die aufgezeichnete Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit nennt man das

Chromatogramm. Mit diesem Chromatogramm können neben der qualitativen und quantitativen Bestimmung Angaben über die Güte der Trennung gemacht werden. Die wichtigsten Kenngrößen sind im folgenden erläutert und in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt:

-*Retentionszeit* t_R : t_R ist die Zeit zwischen Injektion der Substanz und ihrer Detektion im Peakmaximum. Ihr Wert ist für eine Substanz spezifisch und wird zur qualitativen Bestimmung genutzt.

-*Totzeit* t_0 : t_0 entspricht der Zeit, welche die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern.

Anstelle der Retentionszeiten wird häufig der dimensionslose Kapazitätsfaktor k' -Wert eingeführt, der von der Fließgeschwindigkeit des Eluenten und von der Länge der Säule unabhängig ist, um Chromatogramme unterschiedlicher Säulensysteme miteinander zu vergleichen:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{oder} \quad k' = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}} \quad (3.2)$$

Der k' -Wert steht mit dem zuvor erwähnten Verteilungskoeffizienten K_X in unmittelbarer Beziehung.

$$k' = K_X \cdot \frac{V_S}{V_m}, \quad (3.3)$$

wobei V_S das Volumen der stationären Phase, V_m das Volumen der mobilen Phase bezeichnet.

Da V_S und V_m schwierig zu bestimmende Größen sind, wird der Kapazitätsfaktor k' zur Charakterisierung der Chromatogramme bevorzugt, denn die Größen t_R und t_0 sind unmittelbar zugänglich.

-*Basisbreite* w : Strecke auf der Nulllinie, die von den Wendetangenten des Detektorsignals begrenzt wird. Allgemein gilt, daß $w = 4 \cdot S$ ist, wobei S die Standardabweichung der Gaußkurve darstellt.

-*Trennfaktor* α : Über die Trennbarkeit zweier Substanzen gibt der Trennfaktor α (auch als relative Retention bezeichnet) Aufschluß. Er entspricht dem Verhältnis ihrer beiden Kapazitätsfaktoren:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{mit } k'_2 > k'_1 \quad (3.4)$$

Der Trennfaktor ist ein direktes Maß für die Eigenschaft eines Systems, zwei Substanzen trennen zu können. Je größer der Faktor, desto leichter erfolgt die Trennung. Nimmt er den Wert eins an, so ist das System untrennbar. Durch Modifikation der mobilen oder stationären Phase ist α beeinflussbar.

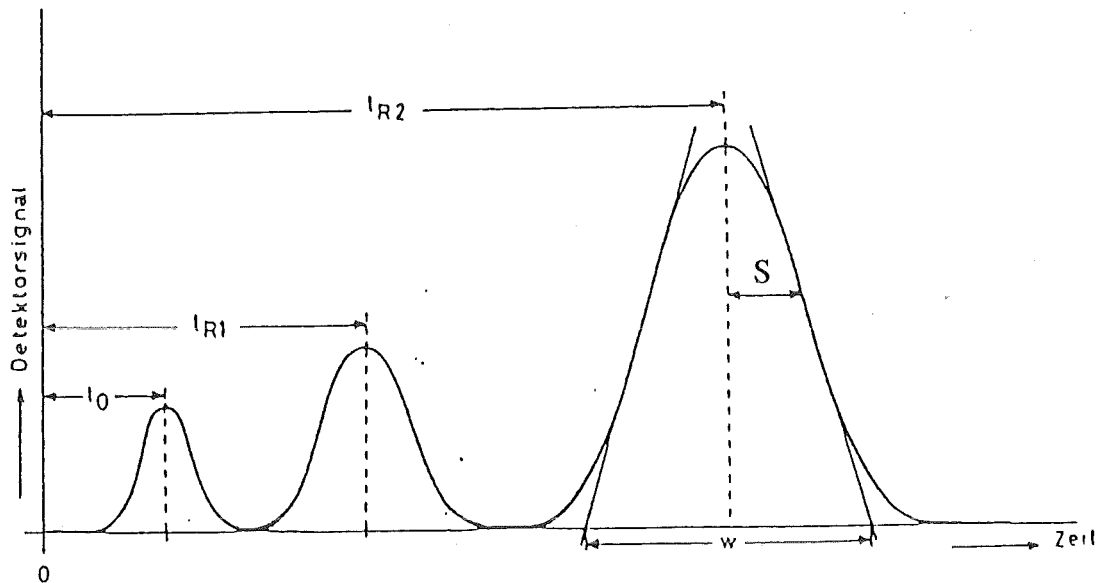


Abbildung 10: Erläuterung der wichtigsten Parameter zur Charakterisierung einer Trennung [7]

- *Auflösung R*: Die Auflösung R ist ein Maß für die Qualität der erreichten Peakauftrennung. Sie ist definiert durch den Quotienten aus dem Abstand der beiden Peakmaxima voneinander und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basisbreiten.

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (3.5)$$

Hat die Auflösung R den Wert eins, so sind die Peaks zwar nicht vollständig getrennt, doch erkennt man in jedem Fall zwei Komponenten. Die Wendetangenten der Gaußkurve berühren gerade einander und die Peakflächen überlappen nur noch zu zwei Prozent [8]. Ab einer Auflösung R größer 1,25 ist auch für quantitative Analysen die Flächenintegration ausreichend genau. Obwohl keine Überlappung der Peaks mehr vorliegt, werden Auflösungen größer 1,5 nicht angestrebt, da längere

Analysenzeiten zum Erstellen des Chromatogramms erforderlich sind. Die Auswirkung der Auflösung R zeigt Abbildung 11:

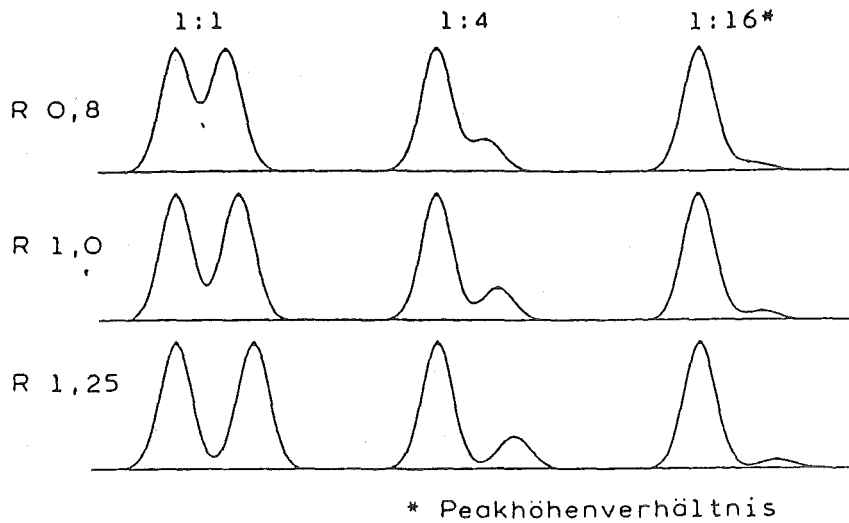


Abbildung 11: Die Auflösung zweier benachbarter Peaks nach [8]

- *Peakasymmetrie T*: Infolge von Verunreinigungen der zu trennenden Substanzen oder einer Überladung der Säule können die Gaußkurvensignale verzerrt sein. Fällt man das Lot im Peakmaximum auf die Abszisse (Abbildung 12), so erhält man zwei Teilstrecken (a und b), deren Verhältnis b/a die Peakasymmetrie charakterisiert. Eine Peakasymmetrie T von eins ergibt die unverzerrte Gaußkurve. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Verzerrungsformen:

Bei einer Peakasymmetrie größer eins erfasst man einen nach hinten geneigten Peak ("tailing") und bei einer Peakasymmetrie kleiner eins verschiebt sich das Peakmaximum nach vorne ("fronting").

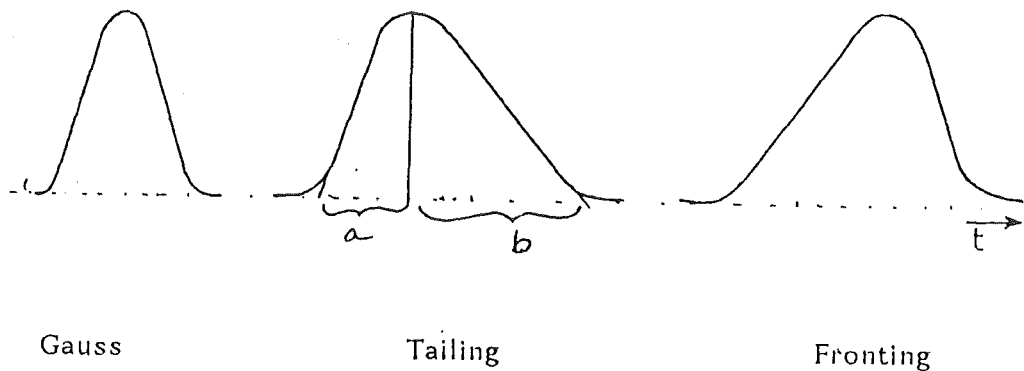


Abbildung 12: Peakasymmetrie und Peakformen nach [8]

3.2. Reversed-Phase-Chromatographie (RP)

Die Reversed-Phase-Chromatographie (Phasenumkehrchromatographie) wird der sogenannten Adsorptionschromatographie zugeordnet, bei der im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie die stationäre Phase unpolarer als die mobile Phase ist. Dies wird durch eine Silanisierung des Trägermaterials erreicht. Die am häufigsten verwendete Phase ist chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS), ein n-Alkan mit 18 C-Atomen. Die oberste Kontaktfläche besteht aus der völlig apolaren Alkylkette, wodurch eine Polarität der stationären Phase erreicht wird, die niedriger als die des Eluenten ist.

Über die Eignung von Lösungsmitteln als Eluenten entscheidet ihre Elutionskraft e° , die für das jeweilige Säulenmaterial experimentell bestimmt und als dimensionsloser Zahlenwert angegeben wird. Die Lösungsmittel werden der Stärke nach in der sogenannten elutropen Reihe eingeordnet (siehe Tabelle 1). Man spricht von einem "starken" Eluenten, wenn er in der Lage ist, die adsorbierte Probensubstanz möglichst rasch von der Säule zu verdrängen. Dies gelingt, wenn die Polarität der stationären Phase der des Eluenten ähnlicher ist als der der Probensubstanz. Da in der RP-Chromatographie die stationäre Phase nahezu völlig unpolar ist, besitzt Wasser infolge seines hohen e° -Wertes (bezüglich Al_2O_3) die geringste Elutionskraft gegenüber den Reversed-Phasen, unpolare Eluenten wie Alkane die höchste. Auf der Umkehr der Elutionsmittelstärke beruht die enorme Bedeutung der RP-Chromatographie. Da für Trennungen ein Lösungsmittelgemisch benötigt wird, das etwas schwächer an die Säule adsorbiert als die Probensubstanzen, kann Wasser mit seiner geringen Elutionskraft in Mischungen mit stärkeren Lösungsmitteln als Eluent eingesetzt werden.

Neben der niedrigen Elutionskraft von H_2O in der RP-Chromatographie sollte beachtet werden, daß wäßrige Probelösungen und mobile Phasen ionische Bestandteile (Probensubstanzen und Salze) lösen können. Die sauren oder basischen Probensubstanzen werden durch Variation des pH-Wertes neutralisiert und getrennt. Ferner ist für die elektrochemische Detektion das Vorhandensein von Elektrolyten zur Erzeugung der Leitfähigkeit innerhalb der Detektionszelle unentbehrlich (siehe Kapitel 5).

Lösungsmittel	Fließmittelstärke e° (bez. auf Al_2O_3 -Phase)
Wasser	größer 1
Methanol	0,95
Acetonitril	0,65
Dioxan	0,56
Tetrahydrofuran	0,45
Isopropylether	0,28
n-Pentan	0,00

Tabelle 1: Fließmittelstärke verschiedener Eluenten gegenüber der Normalphase Al_2O_3 nach [8]

3.3. Experimenteller Teil

3.3.1. Aufbau der Apparatur

Zur Trennung der Pestizide wurde ein isokratisch (d.h. mit konstanter Eluentenzusammensetzung) betriebenes HPLC-System aufgebaut. Eine Hochdruckpumpe fördert einen Volumenstrom des Eluenten mit konstanter Fließgeschwindigkeit durch die Trennsäule. Die aufgetrennten Substanzen werden in einem angeschlossenen Durchflußdetektor erfaßt und elektronisch registriert. Die Lösung verläßt das Detektorsystem und wird im Ausfluß aufgefangen. Abbildung 13 zeigt den Aufbau schematisch:

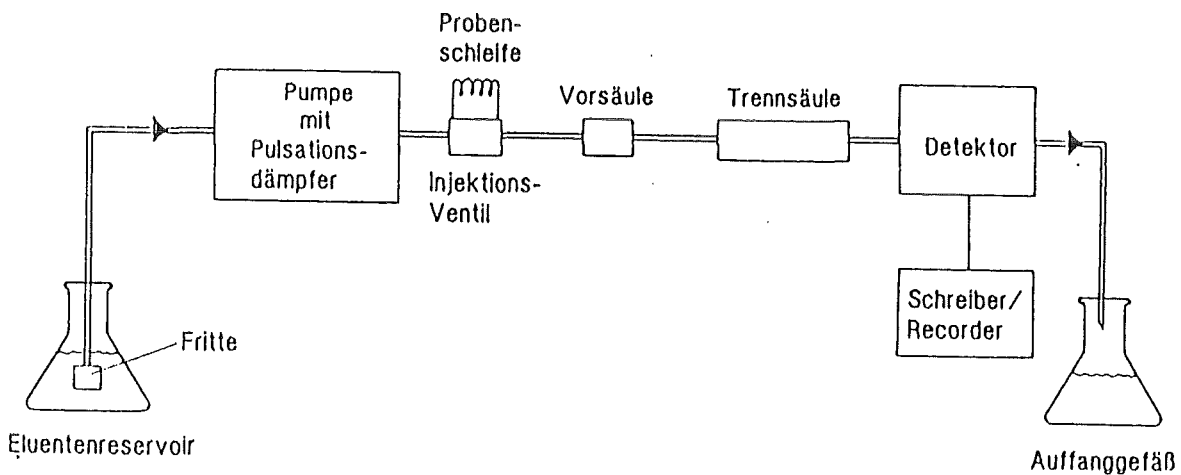


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der HPLC-Apparatur

In dieser Arbeit wurde eine Hochdruckpumpe der Firma Gynkotec, München, Modell 300 B mit Pulsationsdämpfer PP-1 verwendet. An diese war ein Probenaufgabeventil der Firma Negretti und Zambra, Hampshire, (England) direkt angeschlossen, das mit einer 20 μ l Probenschleife versehen wurde. Über ein Injektionsventil konnte die Probensubstanz direkt in die Schleife eingegeben und mit dem sie durchströmenden Eluenten über das Säulensystem transportiert werden. Zur Detektion der Pestizide wurde ein Photodiodenarray der Firma Millipore, Pforzheim, Modell Waters 990, benutzt. Eine spezielle Software diente der Systemsteuerung sowie der Meßwerterfassung. Die elektrochemische Detektion wurde hinter das Diodenarray in Reihe geschaltet, so daß die spektralphotometrische Detektion als

Referenzmessung dienen konnte. Für die eigentlichen amperometrischen Messungen wurde das Diodenarray ausgebaut, um kürzeste Analysezeiten zu verwirklichen. Der elektrochemische Detektor (ELCD) stammte von der Firma Metrohm, Filderstadt, Modell 656, sein Datenerfassungssystem von der Firma Gynkosoft, München.

3.3.2. Durchführung der Trennung

Das verwendete Säulensystem bestand aus einer LiChroCart RP-18, (5 μm), 25 mm*4 mm Vorsäulenkartusche und einer LiChrospher 100 RP-18, (5 μm), 250 mm*4 mm Trennsäule der Firma Merck, Darmstadt. Für die elektrochemische Detektion wurde die Trennsäule Parcosil 300 ProRP-18, (5 μm), 250 mm*4 mm der Firma Serva, Heidelberg, verwendet. In der Säulenbenennung folgt dem Herstellernamen der Porenradius des Trägermaterials in Å, die Bezeichnung des Säulenmaterials, sein Teilchendurchmesser und letztlich die Säulendimension. Das Lösungsmittel Acetonitril (HPLC-Reinheit) stammte wie die verwendeten Phosphat- und Acetatpuffer ebenfalls von der Firma Merck. Alle Pestizidproben wurden von Riedel de Haen bezogen und in den entsprechenden Eluenten als Konzentrationstandards angesetzt.

4. Untersuchungen zur Ultraviolett-Detektion

4.1. UV-Detektionssysteme

Allgemein hat ein HPLC-Detektor die Aufgabe, ein Konzentrationsprofil der Substanztrennung zu erfassen. Er muß hierzu eine physikalisch-chemische Eigenschaft der mobilen Phase überwachen und diese Information in ein elektrisches Signal umwandeln. In der HPLC unterscheidet man zwischen Detektoren, die nur eine Soluteigenschaft "sehen" (*unselektive Detektoren*), wie z.B. der Brechungsindex-Detektor, und solchen, die zwischen den Substanz- und Lösungsmittleigenschaften unterscheiden. Man spricht hier von *selektiven oder substanzspezifischen Detektoren*.

Neben der Selektivität unterscheidet man Detektoren nach ihrer Konzentrations- oder Stoffstromabhängigkeit.

- *Konzentrationsabhängig* ist ein Detektor, wenn sein Signal direkt proportional zur Konzentration der Probe ist.

- *Stoffstromabhängig* ist ein Detektor, wenn sein Signal proportional zur Anzahl der Probemoleküle pro Zeiteinheit ist, wie z.B. der elektrochemische Detektor.

UV-Detektoren sind selektive, *konzentrationsabhängige Detektoren*. Sie messen die Lichtabsorption von Lösung und Probenkomponenten, gemäß dem Lambert-Beerschem Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d. \quad (4.1)$$

E ist die Extinktion, die definiert ist als dekadischer Logarithmus des Verhältnisses von eingestrahelter (I_0) zur durchgelassener Lichtintensität (I_T):

$$E = \log_{10}(I_0/I_T). \quad (4.2)$$

Die Extinktion ist eigentlich dimensionslos, doch ist es üblich eine Extinktion von eins als eine Absorptionseinheit (absorption unit = Au) anzugeben.

c ist die Konzentration der Substanz im Eluenten, d die Küvettendicke und ϵ der molare Extinktionskoeffizient, ein Wert der stoffspezifisch und stark wellenlängenabhängig ist. ϵ kann Werte von 1-100000 l/mol·cm annehmen. Das Lambert-Beersche Gesetz gilt streng nur für stark verdünnte Lösungen, daher ist die direkte Proportionalität zwischen der Konzentration und dem Signal nur etwa bis zu Absorptionseinheiten kleiner $5 \cdot 10^{-4}$ gegeben.

UV-Detektoren lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen einordnen, die Festwellendetektoren und die Detektoren mit variabler Wellenlänge. Während die

Festwellendetektoren Lampen verwenden, die ein scharfes Emissionsmaximum besitzen (z.B. Niederdruck-Hg-Lampen (253,7 nm), Cd-Lampe (229 nm)), benutzen die variablen Wellenlängendetektoren D₂-Lampen, die das gesamte UV-Spektrum von 190 nm-350 nm emittieren. Die D₂-Lampen haben eine geringere Lichtintensität pro Wellenlänge, demzufolge verliert ihre Empfindlichkeit um etwa einen Faktor 20. Allerdings muß die Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Wellenlänge beachtet werden. Die betrachteten Carbamate haben ihre Absorptionsmaxima über einen Spektralbereich von 21 nm verteilt (siehe Kapitel 4.3.1.). Um alle Verbindungen in ihren Absorptionsmaxima mit einer einzigen Aufnahme untersuchen zu können, müssen variable Wellenlängendetektoren verwendet werden. Von den variablen Wellenlängendetektoren existieren zwei Ausführungsformen. Die "schnellen Monochromatoren" trennen das Spektrum der D₂-Lampe zuerst auf und werfen die einzelnen Wellenlängen nacheinander auf die Probenküvette. Durch die schnelle Verstellungsmöglichkeit des Monochromators können bis zu 10 Spektren pro Sekunde im Spektralbereich von 190 nm bis 350 nm aufgenommen werden. Der letztendlich benutzte "Diodenarray-Detektor" läßt hingegen das gesamte D₂-Spektrum auf die Zelle fallen, so daß zu jeder Zeit die gesamte spektrale Information ausgewertet werden kann. Sein Bauprinzip ist im folgenden dargestellt.

4.2. Der Diodenarray-Detektor

Im Diodenarray-Detektor fällt das gesamte Lampenspektrum auf die Meßzelle (Abbildung 14). Hinter der Küvette wird das Licht an einem holographischen Gitter spektral zerlegt und auf das Diodenarray abgelenkt. Dieses besteht aus einem Band von 512 kleinen, nebeneinander angeordneten Photodioden, von denen jede einen gewissen Wellenlängenbereich erfaßt. Um einen Meßbereich von 100 nm zu erfassen, müssen für eine spektrale Auflösung von 2 nm 50 Halbleiterdioden eingesetzt werden. Die maximal erreichbare spektrale Auflösung beträgt 1,4 nm. Das Lampenlicht tritt über eine Streulichtfiltereinheit und eine Blende auf eine Z-förmige Durchflußzelle, die laminare Strömungsverhältnisse realisiert. Um eine möglichst hohe Absorption zu gewährleisten, hat diese Zelle eine Länge von 1 cm. Der Radius wird möglichst klein gewählt, weil nur ein kleines Volumen (hier 8 µl) eine Bandenverbreiterung verhindert. Als Faustregel gilt, daß das Zellvolumen nur 10% des Elutionsvolumens des schmalsten, ersten Peaks erreicht.

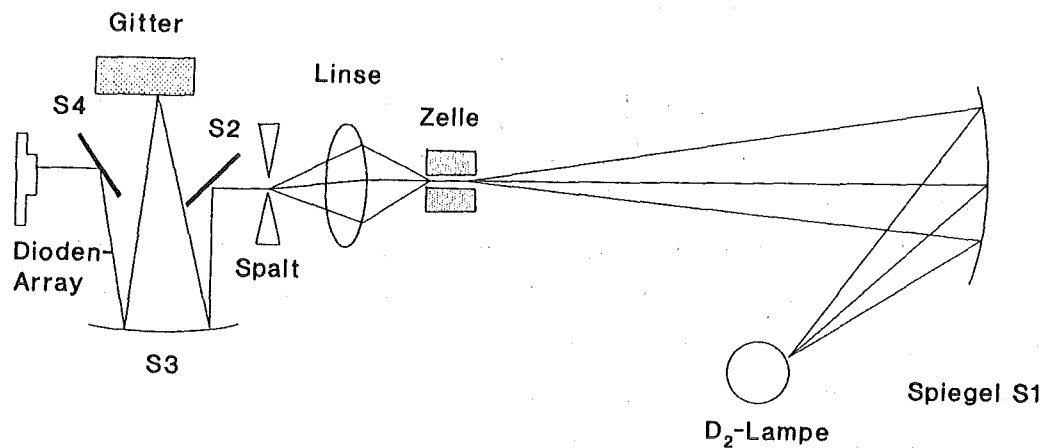


Abbildung 14: Schematische Anordnung des Diodenarrays

Mit diesem Detektor kann man wie mit einem Festwellenlängendetektor arbeiten, wobei der enge Wellenlängenbereich durch das Abfragen einer einzelnen Diode erreicht wird. Werden hingegen alle Dioden eingesetzt, so nimmt der Detektor nicht nur die Intensität der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit auf, sondern man erhält auch die Wellenlängenabhängigkeit als dritte Informationsachse. Neben dem Chromatogramm besitzt man die Spektren zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme. Dies ist ein bedeutender Vorteil des Diodenarrays gegenüber den Festwellenlängendetektoren, da somit eine Identifikation der Substanzpeaks wie auch ihre Untersuchung auf Verunreinigungen anhand ihrer Spektren vorgenommen werden kann.

4.3. Experimenteller Teil

4.3.1 Durchführung der Trennung

Zur Bestimmung des Detektionswellenlängenbereiches des Diodenarrays wurden die Absorptionsspektren der fünf Carbamate aufgenommen (siehe Abbildungen 15-17). Ihre intensivste Bande wird durch die π - π^* -Übergänge der Carbonylgruppe erzeugt und liegt im Wellenlängenbereich zwischen 195 und 225 nm. Dies ist ein für die Absorptionsspektroskopie durchaus kritischer Bereich, weil durch die Eigenabsorption der Lösungsmittel Bereiche mit Wellenlängen kleiner 195 nm mit der gewählten Apparatur nicht mehr untersuchbar sind. Die Auswahl der gängigen Lösungsmittel für die HPLC-Trennung wird ferner erheblich eingeschränkt (siehe Tabelle 2), wenn die Viskosität des Eluenten berücksichtigt wird. Sie sollte zur Verwirklichung frei wählbarer Strömungsgeschwindigkeiten möglichst gering sein, da bei hohen Viskositäten der Druck in der Trennsäule stark ansteigt und zu Schwankungen neigt. Dies führt zu driftenden Grundlinien oder zum Abbruch der Messung.

Lösungsmittel	Viskosität (mPa s)	UV-Grenze (nm)
Wasser	1,0	190
Methanol	0,6	205
Acetonitril	0,37	190
Isopropanol	2,3	210
n-Propanol	2,3	210
Dioxan	1,54	220
THF	0,46	220
n-Pentan	0,23	195

Tabelle 2: UV-Grenzen der Lösungsmittel nach [8]

Weil das Gemisch Acetonitril - Wasser diese Bedingungen am besten erfüllt, wurden alle Trennungen mit diesem Eluentengemisch durchgeführt.

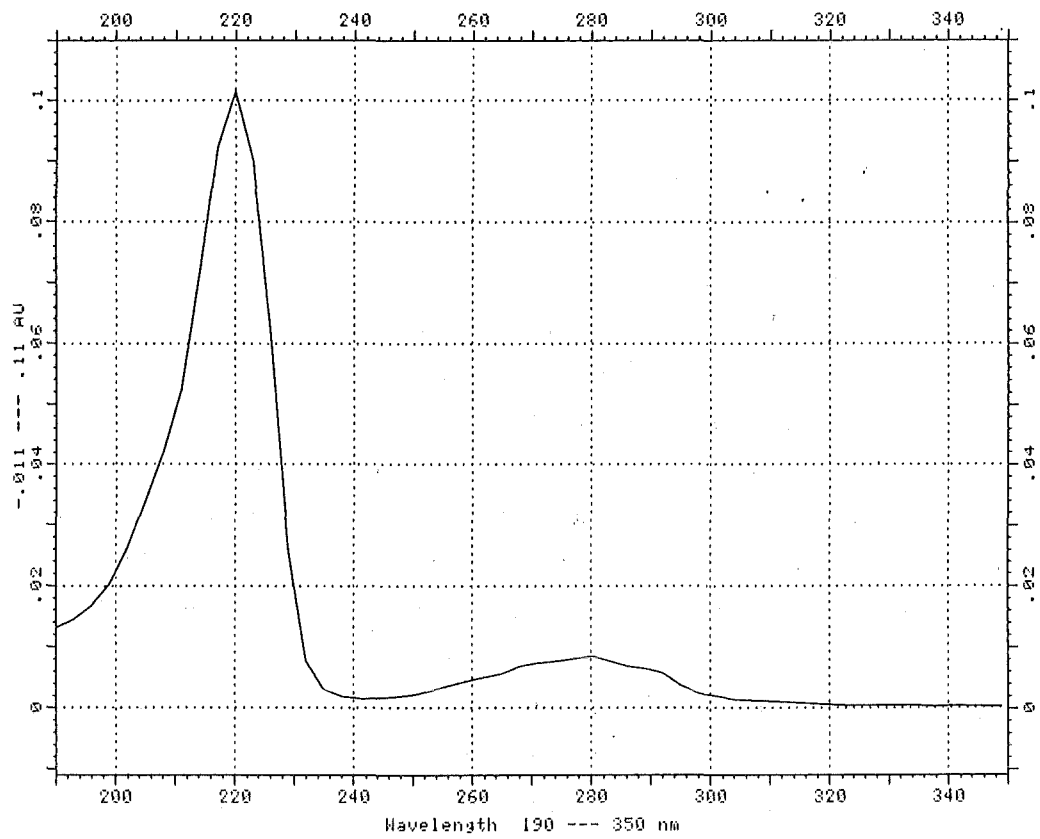


Abbildung 15: Absorptionsspektrum von Carbaryl

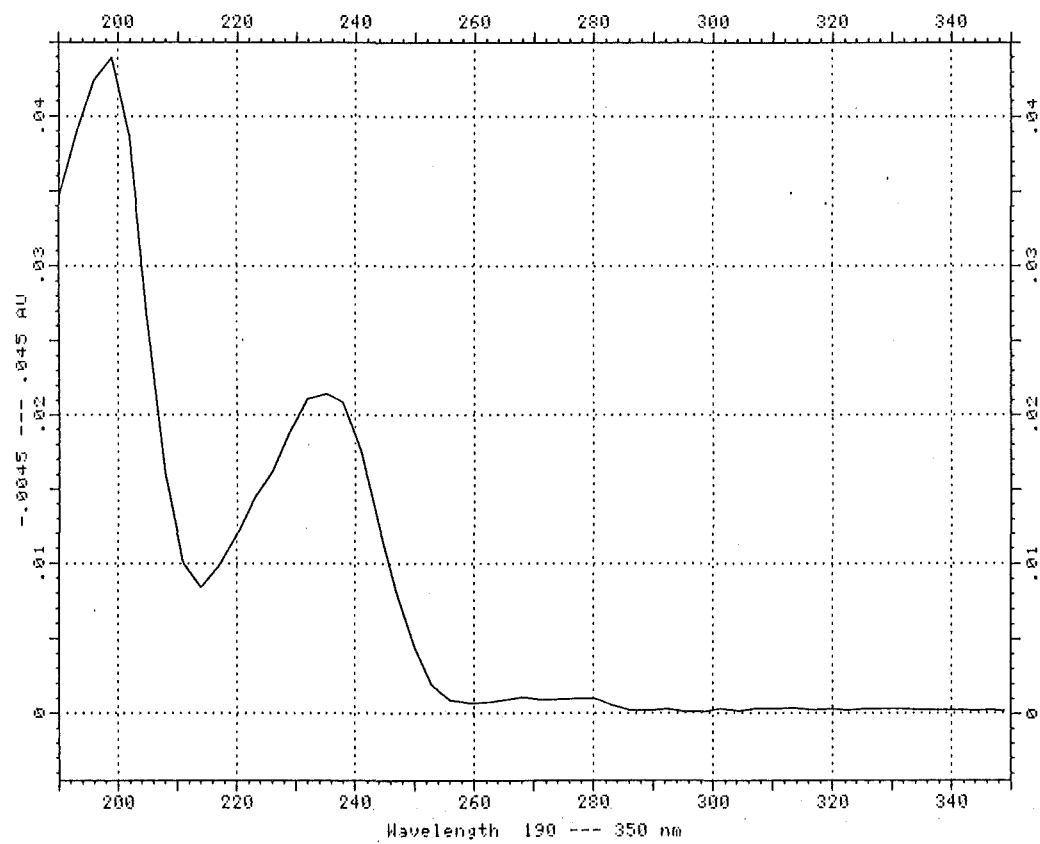


Abbildung 16: Absorptionsspektrum von Propham

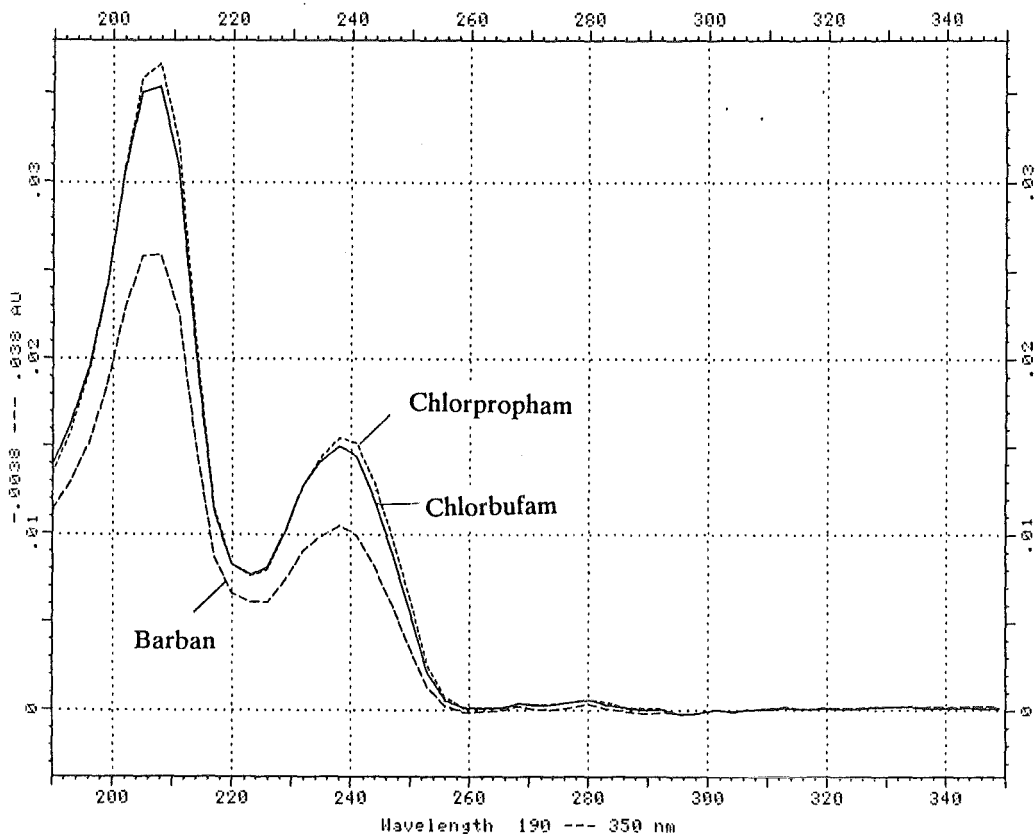


Abbildung 17: Absorptionsspektren von Barban, Chlorbufam und Chlorpropham

Allgemein ist es das Ziel einer Trennung, sämtliche Substanzpeaks in möglichst kurzer Zeit voneinander vollständig aufzulösen. Die Auflösung R zweier Peaks steht mit den bereits erwähnten Größen relative Retention α , Trennstufenzahl N und Kapazitätsfaktor k' nach [9] wie folgt in Beziehung:

$$R = 0,25 \cdot (\alpha - 1) \cdot (N)^{0,5} \cdot \frac{k'}{1 + k'}, \quad (4.3)$$

mit k' als arithmetischem Mittel zwischen k'_1 und k'_2 nach [9].

Die Trennstufenzahl N ist mit der Auswahl der Trennsäule vorgegeben. Eine Verlängerung der Trennsäule bewirkt zwar eine höhere Auflösung, jedoch nehmen die Retentionszeiten infolge der Wurzelfunktion erheblich stärker zu, so daß neben der längeren Analysezeit mit starken Bandenverbreiterungen gerechnet werden muß. Es ist daher sinnvoller, die relative Retention α als Maß für die Wechselwirkung der Substanzen mit der stationären und mobilen Phase zu beeinflussen. Dies wird durch die Änderung der Zusammensetzung des Eluenten erreicht.

Zur Optimierung der Trennung wurden die Lösungsmittelkomponenten in ihrer Zusammensetzung von 30 bis 70 Volumenprozent variiert. Es zeigte sich, daß bei

einer Eluentenzusammensetzung von 45 Volumenprozent Acetonitril zu 55 Volumenprozent Wasser die Substanzpeaks der fünf Carbamate vollständig aufgelöst werden konnten. Man erhält folgendes Chromatogramm:

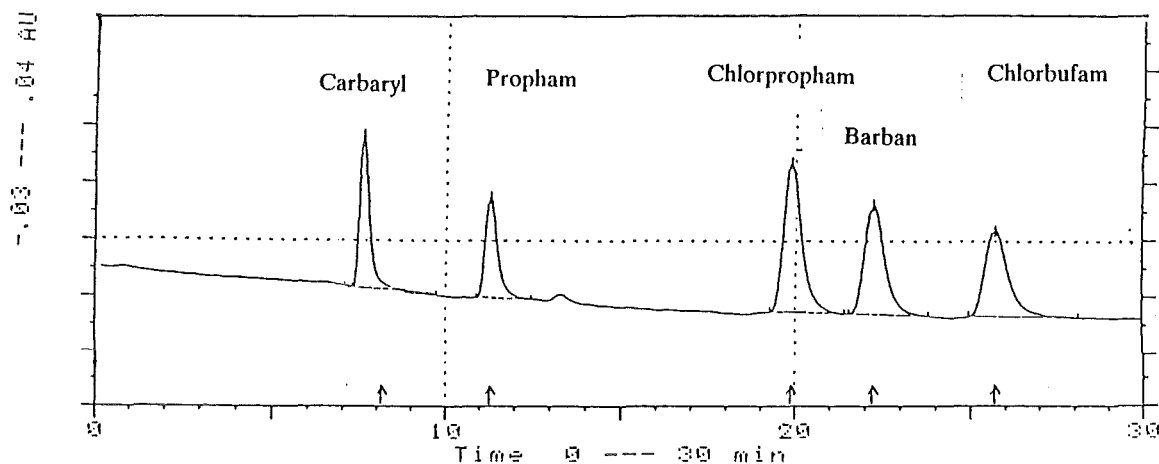


Abbildung 18: Chromatogramm der Carbamate

Der Substanzpeak von Carbaryl zeigt ein deutliches "tailing", in diesem Bereich sich mit zunehmender Standzeit der angesetzten Probenstandards ein deutlich wahrnehmbarer Verunreinigungspeak ausbildete. Anhand der Retentionszeit und des Spektrums konnte Naphtyl als ein Hydrolyseprodukt des Carbaryls identifiziert werden [10]. Da in saurer Lösung die Hydrolyse verzögert wird [10], wurden Standards mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte angesetzt. Als geeignet erwies sich der Essigsäure/Na-Acetatpuffer, pH 4,75, weil mit diesem die Hydrolyse zumindest für Wochen zurückgedrängt werden konnte.

Abbildung 19 zeigt die Peaks der ungepufferten Standardlösung von Carbaryl nach vier Wochen, Abbildung 20 das gepufferte System bei gleichen Konzentrationen.

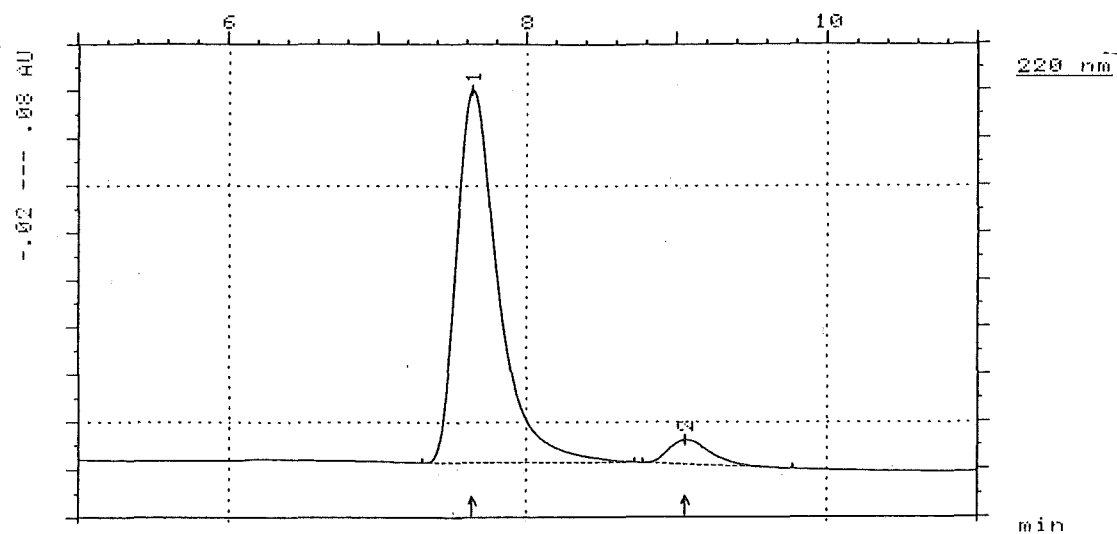


Abbildung 19: Ungepufferter Standard mit Carbarylverunreinigungspeak

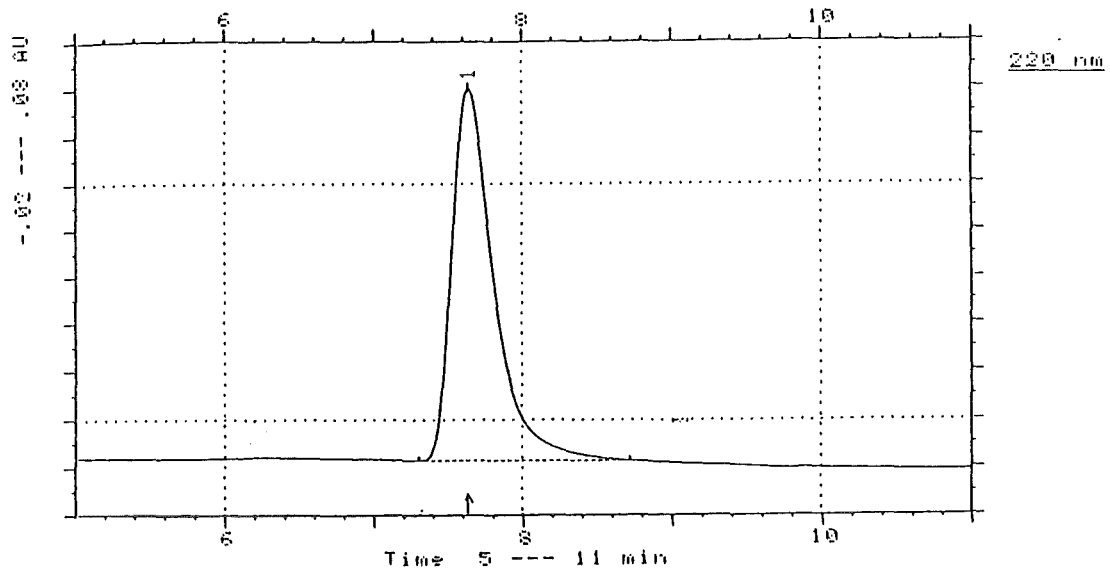


Abb. 20: Gepuffertes System ohne Verunreinigungen

4.3.2. Quantitative Analyse

Die Substanzpeaks des Chromatogramms können generell auf zwei Arten ausgewertet werden. Die eingesetzte Menge ist proportional zur Peakfläche und zur Peakhöhe. Wie in einer vorhergehenden Diplomarbeit gezeigt werden konnte [11], wird die Peakfläche als Funktion der Zeit von Kurzzeitänderungen der Fließrate stärker beeinflusst als die Peakhöhe. Somit ist der erwartete Fehler bei der Peakhöhenauswertung geringer als jener bei der Auswertung der Peakfläche.

Um quantitative Aussagen über vorhandene Stoffmengen treffen zu können, wurden Eichreihen erstellt, die den Bezug zwischen Peakhöhe und der Konzentration lieferten. Diese als Konzentrationsreihen bezeichneten Eichmessungen sind substanz- und säulenspezifisch. Für die untersuchten Substanzen ergeben sich folgende Konzentrationsreihen, wobei im untersuchten Meßbereich nahezu strenge Linearität herrscht (siehe Abbildung 21 bis 25). Der Korrelationskoeffizient war für alle Messungen größer 99% [12].

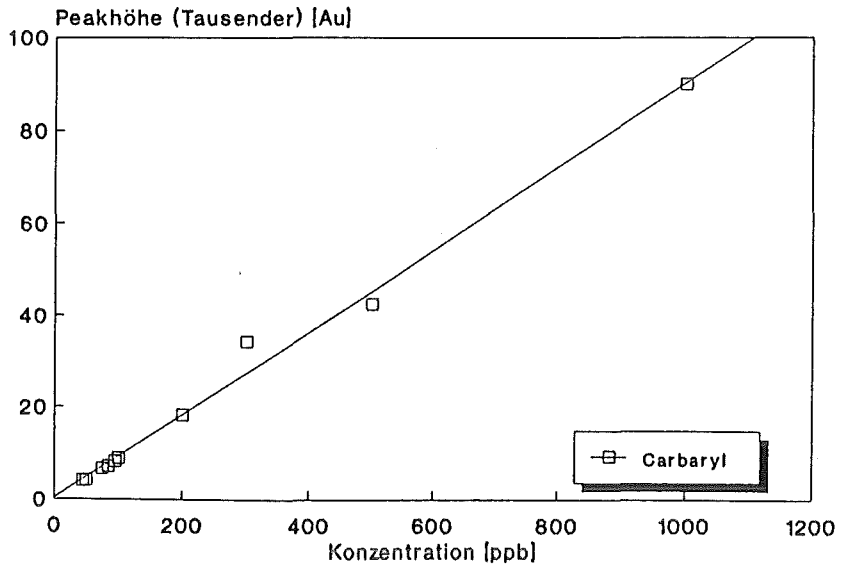


Abbildung 21: Konzentrationsreihe von Carbaryl

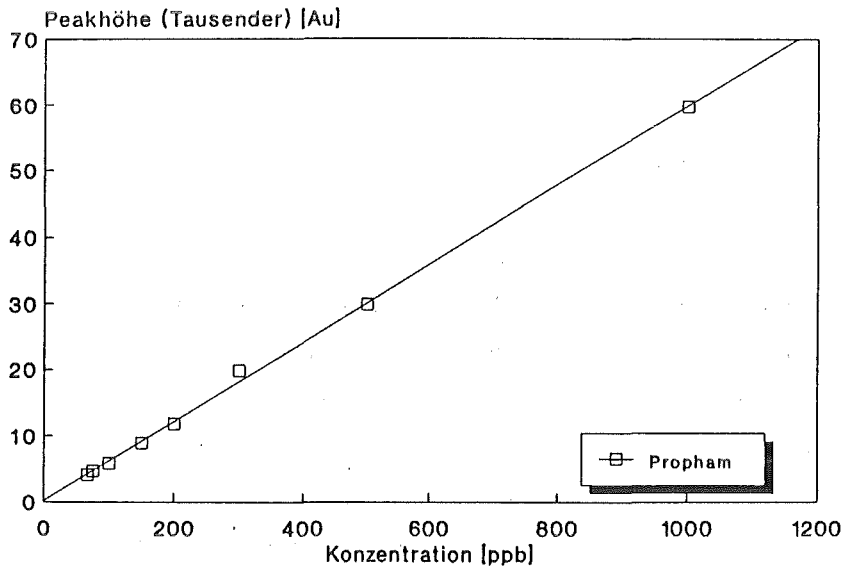


Abbildung 22: Konzentrationsreihe von Propham

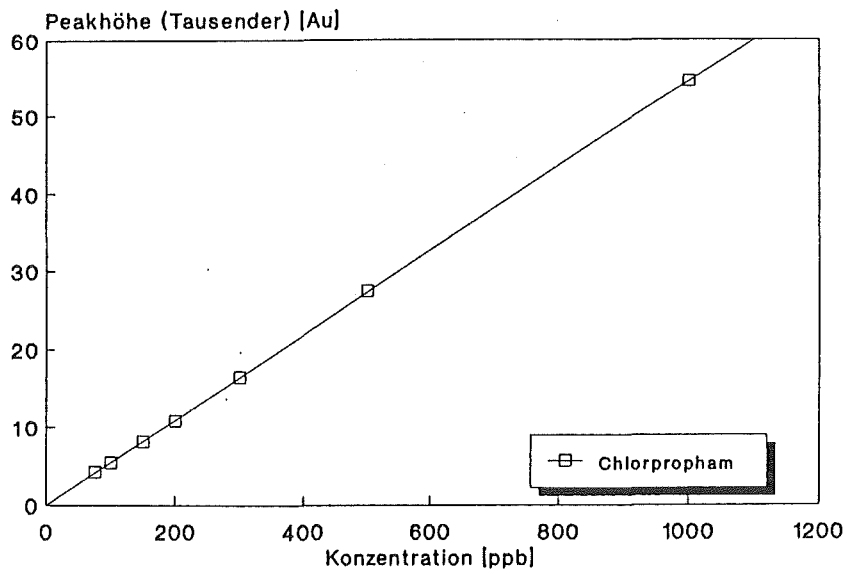


Abbildung 23: Konzentrationsreihe von Chlorpropham

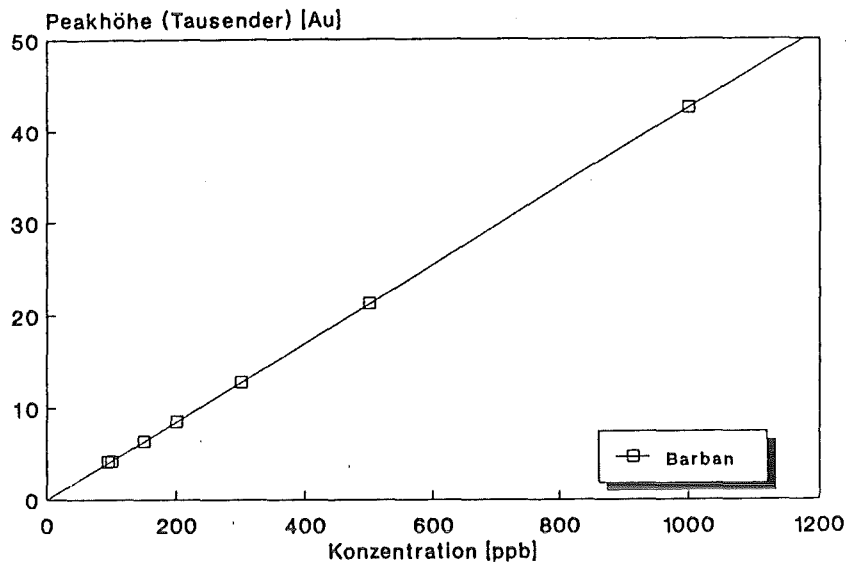


Abbildung 24: Konzentrationsreihe von Barban

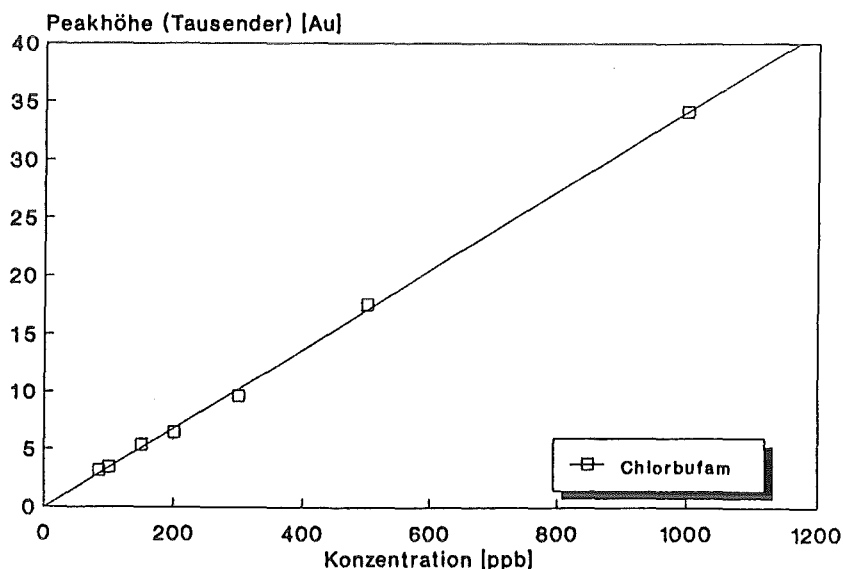


Abbildung 25: Konzentrationsreihe von Chlorbufam

4.3.3. Bestimmung der Nachweisgrenzen

Ziel dieser Arbeit war es, klassische Detektionssysteme auf ihre Eignung zur Untersuchung von Pestiziden hin zu überprüfen. Als wichtiges Kriterium ist hierbei die Linearität des Arbeitsbereiches wie auch die Nachweisgrenze zu nennen. Unter der Nachweisgrenze eines Analysensystems versteht man die geringste detektierbare Menge einer Substanz. Die Angabe erfolgt in der üblichen Mengenangabe (ppb) oder der entsprechenden Einheit ($\mu\text{g}/\text{ml}$), wobei die Spektren und Nachweisgrenzen mit einer $20 \mu\text{l}$ Probenschleife aufgenommen wurden. Der kleinste aus der Grundlinie noch auflösbare Peak ergibt sich nach [13]:

$$x = x_{bl} + 3\sigma_{bl}, \quad (4.4)$$

wobei x_{bl} das Mittel der Blindwerte
 σ_{bl} die Standardabweichung der Blindwerte ist.

Nach obiger Gleichung gilt derjenige Peak noch als detektierbar, dessen Maximum der dreifachen Höhe des Basislinienrauschens entspricht. Die computergestützte Chromatogrammauswertung im Diodenarray erlaubt die automatische Integration und Höhenangabe der Peaks.

Im Bereich des Grundrauschens können die Integrationsgrenzen nicht mehr festgelegt werden, eine selbständige Meßwertangabe unterbleibt. Um dennoch über eine automatische Meßwerterfassung verfügen zu können, muß jede Substanz einzeln als Vergleichsreferenz in einer "Chromatogramm-Bibliothek" erfaßt werden. Mit diesen Chromatogrammen wird die Grundlinie der Trennung verglichen, wobei neben der Retentionszeit das Spektrum analysiert wird. Unter Angabe eines Übereinstimmungsintervalles werden die Peakhöhe und -fläche angegeben und somit quantitativ erfaßt.

Folgende Detektionsgrenzen wurden für die getrennten Substanzen ermittelt:

Substanzen	Grenzmengen (ppb)
Carbaryl	45
Propham	67
Chlorpropham	74
Chlorbufam	85
Barban	90

Tabelle 3: Nachweisgrenzen der Carbamate mit dem Diodenarray bei einem Probenvolumen von 20 μ l

5. Untersuchungen zur elektrochemischen Detektion (ELCD)

5.1. Elektrochemische Detektionssysteme

Elektrochemische Detektoren (ELCD) werden wegen ihrer hohen Empfindlichkeit gerne für die quantitative Erfassung von oxidierbaren oder reduzierbaren Verbindungen verwendet [14,15,16]. Die Detektion beruht auf einer Redoxreaktion der Substanz an der Arbeitselektrode. Hierdurch wird ein Elektronenfluß zwischen Elektrodenoberfläche und Molekül angeregt, der als Stromsignal erfaßt und im Chromatogramm registriert wird. Die höchste Empfindlichkeit besitzen elektrochemische Detektoren, die bei einer konstant angelegten Polarisationsspannung (U_{Pol}) den Stromfluß messen. Man unterscheidet zwischen dem *amperometrischen* und dem *coulometrischen* Detektor. Wesentliches Unterscheidungsmerkmal ist der vollständige Stoffumsatz bei der coulometrischen Detektion, der in der Regel durch größere Elektrodenflächen erreicht wird. Da hierdurch gleichzeitig das Grundrauschen steigt (siehe Einfluß der Elektrodenfläche Kapitel 5.3), ist seine Empfindlichkeit geringer.

In Tabelle 4 werden die beiden Detektorsysteme verglichen:

amperometrischer Detektor	coulometrischer Detektor
Signal abhängig von Konzentration (Umsatz kleiner 3%)	Signal ist massenabhängig (vollständiger Umsatz erforderlich)
hohe Fließgeschwindigkeit erwünscht	unabhängig von Fließgeschwindigkeit
rasche Deaktivierung der Arbeitselektrode	geringe Deaktivierung
Empfindlichkeit kleiner 10 pA	Empfindlichkeit etwa 1 nA
Grundstrom etwa 10 nA	Grundstrom etwa 1 μ A

Tabelle 4: Elektrochemische Detektoren mit konstanter Polarisationsspannung

Infolge seiner höheren Empfindlichkeit wurde in dieser Arbeit ein amperometrischer Detektor verwendet. Hiermit wurde in Kauf genommen, daß seine kleinere Arbeitselektrode durch Substanzablagerungen schneller an Aktivität verliert. Dies erforderte ein häufiges Reinigen der Elektrodenoberfläche (siehe Kapitel 5.4.2). Seine vor jeder Messung fest einzustellende Polarisationsspannung lag zwischen ± 2 V.

Infolge der Zersetzung des Eluenten ist dieser Bereich auf $\pm 1,3$ V beschränkt. Positive Spannungen erfassen oxidierbare Substanzen, negative reduzierbare Verbindungen. Einen Überblick über die in diesem Bereich detektierbaren Verbindungen gibt Tabelle 5:

Stoffklassen, die <i>oxidativ</i> detektiert werden	ungefähre Polarisationsspannung (RE : Ag/AgCl/c(KCl) = 3 mol/l)
Aromatische Hydroxyverbindungen	+ 800 mV bis + 1200 mV
Aromatische Amine	+ 600 mV bis + 1200 mV
Indole	+ 800 mV bis + 1000 mV
Phenothiazine	+ 1000 mV
Mercaptane	+ 800 mV
Verschiedene (Vitamin A, Purine, Carotine, Ascorbinsäure)	+ 800 mV bis + 1000 mV
Stoffklassen, die <i>reduktiv</i> detektiert werden	ungefähre Polarisationsspannung (RE : Ag/AgCl/c(KCl) = 3 mol/l)
Chinone	-400 mV
Nitroverbindungen (z.B. Nitrophenole)	-700 mV bis -800 mV

Tabelle 5: Polarisationsspannungen von detektierbaren Substanzen nach [15]

Die Substanzselektivität des oxidativ betriebenen amperometrischen Detektors ist bei kleinem Arbeitspotential sehr groß, da schwerer oxidierbare Verbindungen nicht detektiert werden. Ist das Ziel einer Analyse, einen einzelnen Stoff aus einem Gemisch nachzuweisen, so gelingt dies ohne Auftrennung, wenn diese Verbindung das kleinste Potential besitzt. Soll, wie im vorliegenden Fall eine Stoffklasse von Verbindungen untersucht werden, so muß von ähnlichen Zersetzungsspannungen ausgegangen werden. Eine spezifische Substanzdetektion mit Hilfe der Polarisationsspannung war nicht möglich, da alle beteiligten Verbindungen zersetzt wurden. Darüberhinaus stellten die hohe Zersetzungsspannungen der untersuchten Herbizide extreme Anforderungen an die Reinheit des Eluenten gegenüber oxidierbaren Verunreinigungen.

*

RE = Referenzelektrode

5.2. Das amperometrische Detektionssystem

Das verwendete amperometrische Detektionssystem besteht aus drei Teilen:

- der elektrochemische Detektor mit der Detektorzelle, welche die Elektroden enthält,
- ein potentiostatisches Strom-Spannungsmeßgerät für die Strommessung und zur Einstellung der Polarisationsspannung (VA-Detektor), sowie
- die Computereinheit zur Steuerung der HPLC-Apparatur und zur Meßwert-
erfassung.

Zur Meßwert-erfassung konnte anstelle des bisher verwendeten X/Y-Schreibers ein Chromatographiedatensystem der Firma Gynkosoftware verwendet werden, welches über Analogeingänge der A/D-Karte an den Analogausgang des VA-Detektors angeschlossen wurde.

Das potentiostatische Strom-Spannungsmeßgerät diente zur Wahl der Polarisationsspannung, die im Bereich von ± 2 V auf ein Hundertstel exakt einstellbar war, und der Strommessung, welche im empfindlichsten Fall 0,1 nA entsprach.

Die Detektorzelle ist nach dem Drei-Elektrodenprinzip aufgebaut (siehe Abbildung 26 und [16]). Zwischen der Arbeitselektrode und der Hilfelektrode fließt der Meßstrom, der als Faradayscher Strom bezeichnet wird und durch die Redoxreaktion der Substanzen an der Arbeitselektrode entsteht. Mit der Referenzelektrode wird das Potential der Arbeitselektrode fixiert und über einen Potentiostaten des Strom-Spannungsmeßgerätes der Spannungsabfall zwischen Arbeitselektrode und Hilfelektrode reguliert. Um den Spannungsabfall minimal zu halten, soll der Abstand der Referenzelektrode und der Hilfelektrode von der Arbeitselektrode möglichst klein und gleich groß sein.

Die allgemein üblichen Zelltypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stoffstromführung [16]. Die Flußrichtung des Eluenten in der verwendeten Zelle ist senkrecht zur Oberfläche der Arbeitselektrode. Man spricht vom *WALL-JET-Prinzip*. Diese Anordnung wurde erstmals von Yamada und Matsuda 1973 beschrieben [17], [18]. Abbildung 26 verdeutlicht das Prinzip.

Der Eluent tritt durch eine enge Zuleitung auf die kreisförmige Arbeitselektrodenoberfläche, welche in etwa den 10-fachen Durchmesser der Eintrittsöffnung besitzt. Der Flüssigkeitsstrahl muß ohne Verwirbelung auf der Oberfläche auftreffen und unter laminaren Strömungsbedingungen über diese fließen. Im 90°-Winkel zur Arbeitselektrode ist im Zellenausfluß die Hilfelektrode angeordnet, der gegenüber - im gleichen Abstand zur Arbeitselektrode - die Referenzelektrode liegt. Die eigentliche Zelle wird möglichst schmal gehalten

(Volumen etwa $1 \mu\text{l}$), um ein großes Oberflächen - Volumenstromverhältnis zu erzeugen. Hiermit soll ein inniger Kontakt des Eluenten mit der Arbeitselektrode bei laminarer Strömung erreicht werden, ohne durch Verwirbelung des Eluenten eine Peakverbreiterung infolge Rückvermischung zu erhalten. Tatsächlich beobachtet man an der Elektrodenoberfläche die Ausbildung einer Diffusionsgrenzschicht, die den Stoffübergang zwischen strömender Phase und Elektrode maßgeblich beeinflusst. Aus Abbildung 27 geht hervor, daß ein senkrechter Fluß günstiger ist als ein paralleler, da die Diffusionsgrenzschicht eine geringere Dicke besitzt.

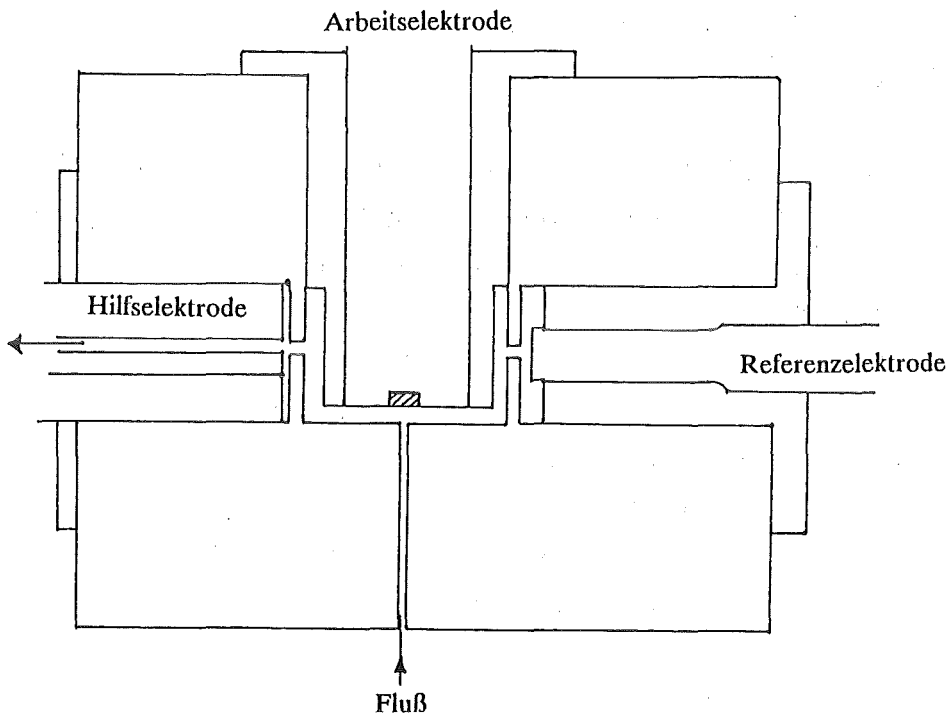


Abbildung 26: Detektorzelle des ELCD nach dem *WALL-JET-Prinzip*

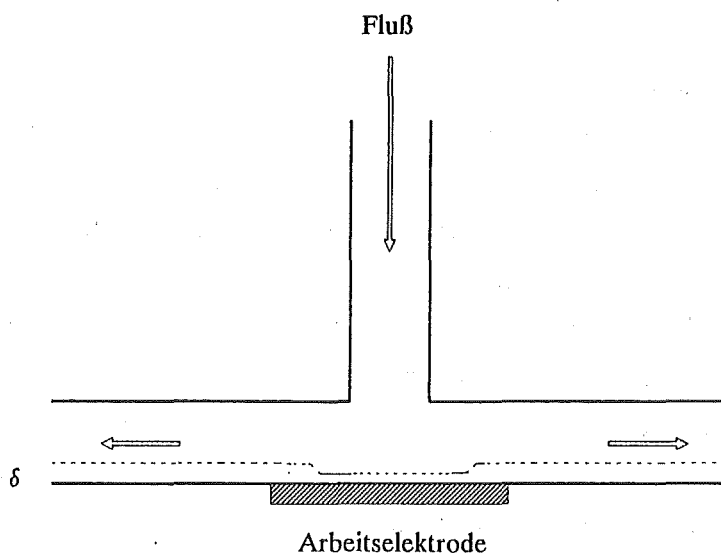


Abbildung 27: Diffusionsgrenzschicht an der Arbeitselektrode

5.3. Einflußgrößen auf das Detektorsignal

Das Stromsignal des amperometrischen Detektors ergibt sich durch die Redoxreaktion der Substanzen an der Elektrodenoberfläche und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden [19]:

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot \beta \cdot c \cdot u^a, \quad (5.1)$$

mit i = Stromstärke

n = Anzahl der ausgetauschten Elektronen pro Molekül

F = Faraday-Konstante

A = Oberfläche der Arbeitselektrode

β = Stoffübergangskoeffizient

c = Konzentration der Probensubstanz

a = Konstante mit Werten zwischen 0,33 und 0,5

u = Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Die Proportionalität des Signals zur ausgetauschten Elektronenzahl n und der Faradayschen Konstanten F ist gemäß den Faradayschen Gesetzen gegeben. Der Eingang der Strömungsgeschwindigkeit belegt, daß das Signal des Detektors direkt proportional zur Anzahl der pro Zeiteinheit umgesetzten Probemoleküle ist. Folglich gehört der elektrochemische Detektor im Gegensatz zu dem Diodenarray zur Klasse der *stoffstromabhängigen Detektoren*.

Nach Gleichung (5.1) ist i proportional zu c , so daß ein linearer Zusammenhang zwischen der Pestizidkonzentration und dem Detektorsignal zu erwarten ist. Als frei wählbare und optimierbare Variablen gehen die Größen der Oberfläche der Arbeitselektrode A , die Strömungsgeschwindigkeit u und der Stoffübergangskoeffizient β ein:

- *die Arbeitselektrodenoberfläche A* sollte nach obiger Formel möglichst groß gewählt werden, um einen hohen Stromfluß zu erreichen. Gleichzeitig steigt aber auch das Grundrauschen, da es schwierig ist, eine weitgehend störungsfreie Oberfläche zu gewährleisten. Werden solche großflächigen Elektroden nur begrenzt kontaktiert, so kommt es infolge der endlichen Leitfähigkeit des Elektrodenmaterials zu einem Potentialabfall innerhalb der Elektrode. Deshalb gibt es für jedes Elektrodenmaterial eine optimale Oberflächengröße, für die das Signal/Rausch-Verhältnis optimiert werden kann.

- *die Strömungsgeschwindigkeit u* des Eluenten hat je nach Zelltyp einen mehr oder weniger starken Einfluß auf die Dicke der Diffusionsschicht an der Arbeitselektrode.

Einerseits führt die Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit zu einer dünneren Diffusionsschicht und damit zu einem besseren Stofftransport der Probensubstanzen an die Arbeitselektrode, andererseits wird ein deutlich größerer Anteil an Analytmolekülen pro Zeiteinheit an der Elektrodenoberfläche vorbeitransportiert.

- der Stoffübergangskoeffizient β sollte möglichst groß sein, damit Substanzmoleküle aus dem Bulk durch die Nernstsche Strömungsschicht δ an die Oberfläche der Elektrode diffundieren können. Es gilt nach [20]:

$$\beta = D/\delta . \quad (5.2)$$

Je kleiner die Schichtdicke δ ist, desto größer ist der Stoffübergang. Dies wird z.B. durch die Wahl eines Eluenten mit geringer Viskosität erreicht.

Für die Diffusion gilt nach dem 1. Fickschen Gesetz [22]:

$$dn/dt = D \cdot A \cdot (-dc/dx) . \quad (5.3)$$

Unter Annahme eines linearen Konzentrationsgradienten (dc/dx) ergibt sich für die pro Zeiteinheit transportierte Stoffmenge dn/dt :

$$dn/dt = -D \cdot A \cdot (c_0 - c)/\delta = D \cdot A \cdot (c - c_0)/\delta , \quad (5.4)$$

mit c_0 = Konzentration an der Elektrodenoberfläche
 c = Konzentration in der bulk-Strömung
 δ = Dicke der Nernstschen Schicht.

Da der Stromfluß nach Gleichung (5.1) dem Stofftransport proportional ist, gilt:

$$I \propto D \cdot A \cdot (c - c_0)/\delta . \quad (5.5)$$

Mit steigender Temperatur wird der Diffusionskoeffizient größer. Nach der Stokes-Einstein-Beziehung [21] zwischen Diffusionskoeffizienten und der Viskosität η der Lösung gilt:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \pi \cdot \eta \cdot a} , \quad (5.6)$$

mit k = Boltzmannkonstante
 T = Temperatur
 η = Viskosität
 a = effektiver hydrodynamischer Teilchenradius.

Die Viskosität η einer Flüssigkeit unterliegt selbst einer Boltzmannschen Temperaturabhängigkeit:

$$\eta = e^{-E/RT} \quad (5.7)$$

Somit ergibt sich aus Gleichung (5.6) und (5.7) für den Diffusionskoeffizienten D folgende Temperaturabhängigkeit:

$$D \propto T \cdot e^{E/RT} \quad (5.8)$$

Allerdings ist der Einfluß der Temperatur auf das Stromsignal stark begrenzt, da das Grundrauschen, welches abhängig von Arbeitspotential, Elektrodenmaterial und der Zusammensetzung des Eluenten ist, mit steigender Temperatur ebenfalls wächst. Folglich ist die Temperatur eine experimentelle Optimierungsgröße (siehe Kapitel 5.4.).

Zur Optimierung des Detektorsignals wird Gleichung (5.5) herangezogen. Es zeigt sich, daß ein maximales Stromsignal nur dann entsteht, wenn die Konzentration der Substanz c_0 an der Elektrodenoberfläche möglichst klein ist, d.h. die Substanz vollständig oxidiert wird. Dies wird durch Anlegen einer Spannung erreicht, die so hoch ist, daß durch ein weiteres Steigern das Stromsignal nicht mehr anwächst. Diese Spannung ist substanz- und elektrodenpezifisch und wird als Polarisationsspannung U_{Pol} bezeichnet. Zur Bestimmung der Polarisationsspannungen werden üblicherweise voltametrische Untersuchungen durchgeführt [25], bei der der Stromfluß gemessen wird, während die Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden kontinuierlich geändert wird. Um diese Strom-Spannungskurven zu erhalten, wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche voltametrische Messungen mit dem amperometrischen Detektor durchgeführt, die das gleiche Ergebnis lieferten (siehe Kapitel 5.4.2.).

Neben der Temperatur und dem angelegten Polarisationspotential wird das detektierbare Stromsignal durch die Elektrolytbeschaffenheit und -konzentration beeinflusst. Ihre eigentliche Aufgabe ist die Erzeugung der elektrischen Leitfähigkeit in der Zelle. Darüberhinaus wird durch Adsorption von Leitsalzen die Eigenschaft der Elektrodenoberfläche beeinflusst. Hiermit wird die Potentialdifferenz an der Grenzfläche verändert. Das einfachste Modell einer Grenzfläche ist das der elektrischen Doppelschicht nach Helmholtz. Im Gegensatz zur Nernstschen Diffusionsschicht, die eine Dicke von etwa 0,1 mm besitzt, erstreckt sich die Helmholtz-Doppelschicht höchstens über 1 nm (siehe Abbildung 28).

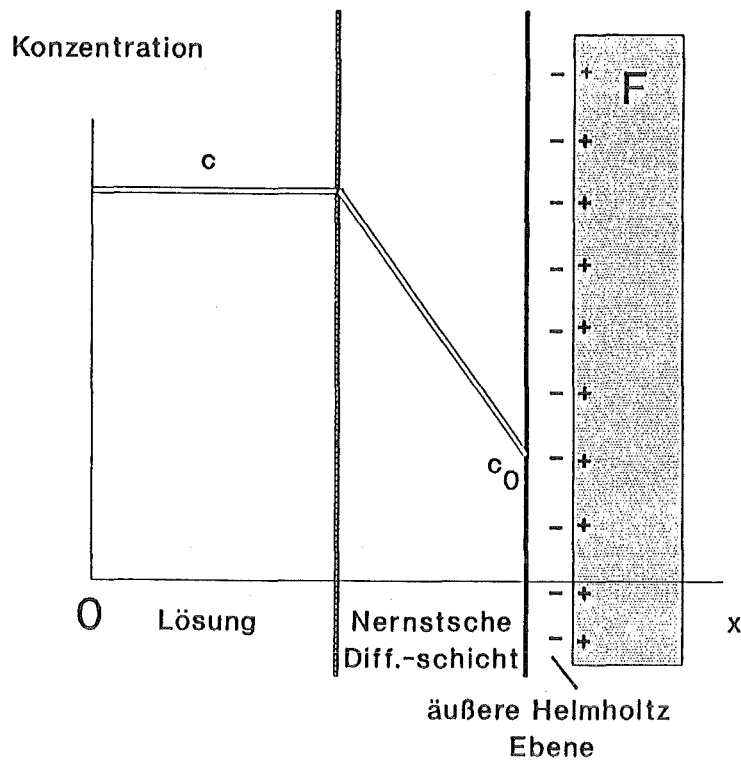


Abbildung 28: Verlauf der Konzentration an der Elektrodenoberfläche

Die Helmholtz-Doppelschicht besteht aus einer positiv geladenen Schicht an der Oberfläche der Elektrode und einer negativ geladenen Schicht in der Lösung. Man unterscheidet die äußere Helmholtzebene (bestehend aus den solvatisierten Anionen und Substanzmolekülen) von der inneren Helmholtzebene, die durch die Ladungsverteilung in der Elektrode gegeben ist. Diese elektrische Doppelschicht beeinflusst das elektrochemische Potential in der Nähe der Elektrode und mögliche Abscheidungs Vorgänge maßgeblich (siehe Abbildung 29).

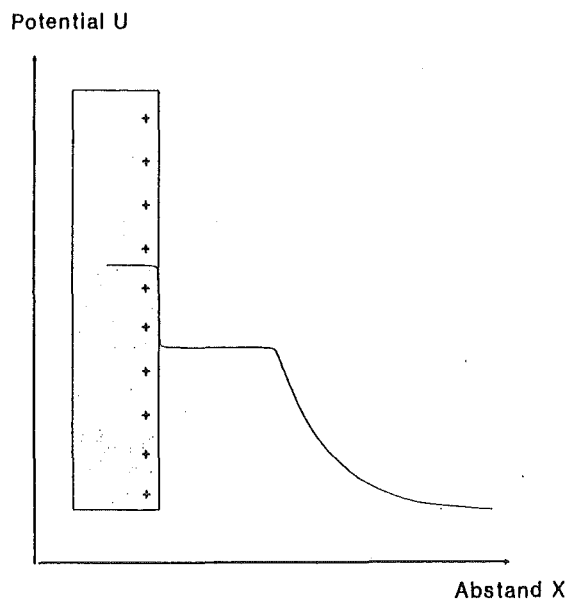


Abbildung 29: Verlauf des elektrochem. Potentials an der Elektrodenoberfläche

Der pH-Wert des Eluenten ist ein äußerst wichtiger Parameter bei der Optimierung, weil sowohl das erforderliche Arbeitspotential als auch die Stromausbeute hiervon abhängen. Die Abhängigkeit ist allerdings häufig nicht vorhersehbar. So sollte die nicht protonierte Form wegen der höheren Elektronendichte leichter oxidierbar sein als die protonierte, elektronenärmere Form.

Die untersuchten Carbamate lassen als sekundäre Amine ein solches Verhalten erwarten. Es zeigt sich jedoch oft, daß diese vereinfachte Betrachtung nicht zutrifft, wie z.B. bei Paracetamol, ein Phenol, das in seiner protonierten Form empfindlicher detektierbar ist [22].

Als Konsequenz ergibt sich hieraus, daß der Parameter pH-Wert eine experimentelle Optimierungsgröße ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die in Tabelle 6 dargestellten Parameter zur Erzielung eines möglichst hohen Stromsignals experimentell optimiert werden müssen.

Nachweissystem	variable Einflußgröße
Durchflußzelle	Potential Temperatur
Eluent	Fließgeschwindigkeit pH-Wert Art des Leitsalzes

Tabelle 6: Optimierungsgrößen in der elektrochemischen Detektion

5.4. Experimentelle Durchführung

5.4.1. Anforderungen des ELCD an das HPLC-System

Die grundsätzliche Voraussetzung der elektrochemischen Detektion ist die Leitfähigkeit des Eluenten. Diese wird durch Zusätze von Salzen in Mindestkonzentrationen von 10^{-3} mol/l erreicht, gleichzeitig wird aber dadurch die Auftrennung des Substanzgemisches verändert. Damit es zu keinen Wechselwirkungen der nur in polaren Eluenten löslichen Salze mit dem Säulenmaterial kommen kann, sollten ausschließlich Reversed-Phasen-Säulen benutzt werden, die eine völlig unpolare Oberfläche besitzen.

An den Eluenten wird ferner die Anforderung gestellt, eine möglichst kleine Viskosität zu besitzen, da wie in 5.3. beschrieben, die Signalstärke maßgeblich durch die Stoffstromlimitierung in der Nernstschen Diffusionsschicht beeinflusst wird. Tabelle 7 zeigt die Viskositäten der für die Trennung verwendbaren Lösungsmittel:

Eluent	Viskosität (mPa·s)	Fließmittelstärke e° (RP 18)
Wasser	1,0	0
Methanol	0,6	0,05
Acetonitril	0,37	0,35
Dioxan	1,54	0,44
THF	0,46	0,55
Isopropylether	0,37	0,72
n-Pentan	0,23	1,0

Tabelle 7: Lösungsmittelkriterien zur elektrochemischen Detektion

Für den elektrochemischen Detektor ist ein Eluentengemisch aus Acetonitril und Wasser optimal, da die Elutionskraft gegenüber den auf der Säule haftenden Verbindungen ausreichend klein gewählt werden kann (e° von H_2O beträgt null, siehe Tabelle 7) und die Viskosität des vorteilhaften wässrigen Analysenmediums durch Beimischung von Acetonitril ebenfalls erniedrigt werden kann.

Infolge seiner extrem kleinen, rückvermischungsfreien Durchflußzelle besitzt der ELCD ein hohes Auflösungsvermögen, das die Verwendung einer besonders schnellen Trennsäule erlaubt. Es ist dies die Paracosil ProRP C18 Säule der Firma

Serva in Heidelberg, die im Gegensatz zu den sonst üblichen RP-Säulen Füllmaterial mit 300 Å Porenradius besitzt. Der sterische Einfluß der Porenradiengröße führt zu dreifach kürzeren Analysenzeiten, die für die ELCD von großem Vorteil sind, da somit zeitabhängige Aktivitätsverluste des Detektionssystems eine geringere Rolle spielen.

5.4.2. Meßvorgang

Nach Anschluß der Meßzelle an das Strom-Spannungsmeßgerät wurde der gewünschte Spannungsbereich eingestellt. Die Arbeitselektrode muß vor jeder Messung aktiviert werden, d.h. die äußerste Schicht der Elektrode muß frei von störenden Ablagerungen und Oberflächengruppen sein, wie auch eine ebene, porenfreie Oberfläche besitzen. Hierzu mußte die Arbeitselektrode aus ihrer Zellenhalterung herausgeschraubt und mit Al_2O_3 -Pulver ($\varnothing = 0,3 \mu\text{m}$) poliert werden [24]. Eine Verbesserung der Aktivierung wurde zusätzlich erreicht, indem die Elektrode bei einer Spannung von 2 V eine 0,1 normale HCl-Lösung für fünf Minuten zersetzte. Durch diese Behandlung ergab sich ein deutlich gesteigertes Meßsignal.

Der Aktivierungsprozeß wurde vor jeder Meßreihe wiederholt, da die "Alterung" der Elektrode und damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht nur ein zeitabhängiger Prozeß war, sondern vor allem vom mengenmäßigem Umsatz abhing. Die aktivierte Elektrode wurde nun unmittelbar in die Detektionszelle eingeschraubt, durch die ein konstanter Eluentenstrom floß. Die "Einlaufphase" der Arbeitselektrode begann, d.h. es baute sich die Grenzschicht zwischen Oberfläche und Eluent auf. Ein anfänglicher Ladestrom von mehreren hundert Nanoampere geht mit der Zeit in den Grundstrom über (siehe Abbildung 30).

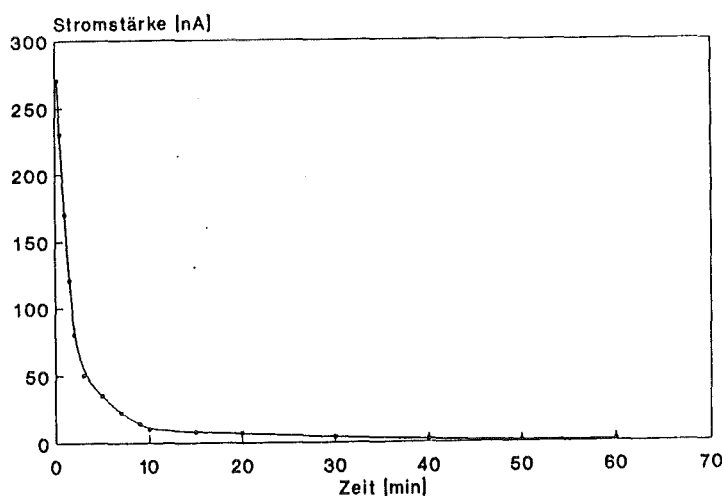


Abbildung 30: Polarisationsprozeß der Arbeitselektrode

Der Grundstrom wurde mit Hilfe des Potentiometers des Strom-Spannungsmeßgerätes auf den gewünschten Nullpunkt abgeglichen. Erst wenn der Grundstrom einen konstanten Wert besaß, konnten Proben in die HPLC-Säule eingespritzt werden. Für empfindlichste Messungen betrug die Einlaufzeit mehrere Stunden. Hierbei erwies es sich als sinnvoll, den Eluenten über Nacht im Kreislauf zu führen, so daß zusätzlich eventuell vorhandene Verunreinigungen aufoxidiert wurden. Diese Oxidationsprodukte konnten bei erneutem Kontakt mit der Arbeitselektrode nicht mehr detektiert werden.

5.4.3. Eignung des Detektors zum Nachweis von Carbamaten

Carbamate sind Verbindungen, die nach [25] erst bei Potentialen größer 1,2 V oxidativ zersetzt werden.

Für solch hohe Potentiale werden in der Regel Metall- oder glassy-carbon-Elektroden (GCE) als Arbeitselektroden eingesetzt. Besonders die GCE, die aus thermisch behandelten Phenol-Formaldehyd-Polymeren besteht, ist infolge ihrer hohen Beständigkeit gegenüber den chemischen Lösungsmitteln für den Spannungsbereich von -800 mV bis +1200 mV bei pH-Werten kleiner 7 geeignet.

Über die Detektierbarkeit der untersuchten Carbamate geben die voltametrischen Strom-Spannungskurven Aufschluß. Sie wurden mit dem amperometrischen Detektorsystem erstellt, wobei die Spannung für jeden einzelnen Meßpunkt neu festgelegt werden mußte. Neben der Zersetzungsspannung (Spannung, bei der erstmals die Probensubstanz oxidiert wurde), lieferten sie zugleich die optimalen Polarisierungsspannungen (Spannung, bei der das stärkste Stromsignal erhalten wird, infolge der nahezu vollständigen Zersetzung der Substanz an der Elektrodenoberfläche). In den Abbildungen 31-33 sind die Voltagramme der fünf getrennten Pestizide dargestellt, anhand von Abbildung 31 erfolgt die prinzipielle Erläuterung. Die Strom-Spannungskurve ist durch drei Bereiche gekennzeichnet. Bereich 1 zeigt bis zu einem Potential von 1,07 V den eigentlichen Grundstrom, der erst ab Spannungen größer 1,03 V meßbare Stromstärken anzeigt und damit die beginnende Zersetzung der untersuchten Substanz andeutet. Der Bereich 2 ist der eigentliche Arbeitsbereich, in dem durch Wahl des Potentials ein unterschiedlich hoher Umsetzungsgrad der Substanz erreicht wird. Durch Anlegen einer Tangente im Wendepunkt der Kurve erhält man die Zersetzungsspannung auf der Abszisse, also die kleinste Spannung, bei der die Oxidation der Substanz eintritt. Dieser Bereich wird nicht durch eine vollständige Stoffumsetzung limitiert (insgesamt werden nur bis zu fünf Prozent der Substanz oxidiert), sondern durch den Diffusionsgrenzstrom, der

trotz ansteigendem Potentials, infolge Stofftransporthemmung in der Nernstschen Diffusionsschicht, den Umsatzgrad beschränkt. Ein Erhöhen des Polarisationspotentials führt im Bereich 3 zwar gemäß dem Ohmschen Gesetz zu einem schwach ansteigendem linearen Verlauf, doch wird mit zunehmenden Potential das Grundrauschen empfindlich höher. So konnten mit dem verwandten System keine Spannungen größer 1,4 V zu Messungen verwendet werden, da der Grundstrom (hiermit ist das Rauschen des Eluenten ohne Probesubstanz gemeint) so hoch war, daß er nicht mehr abgeglichen werden konnte. Tabelle 8 zeigt die graphisch bestimmte Zersetzungsspannung und die optimale Polarisationsspannung der Substanzen, die sich durch eine maximale Spannung im Arbeitsbereich ergibt.

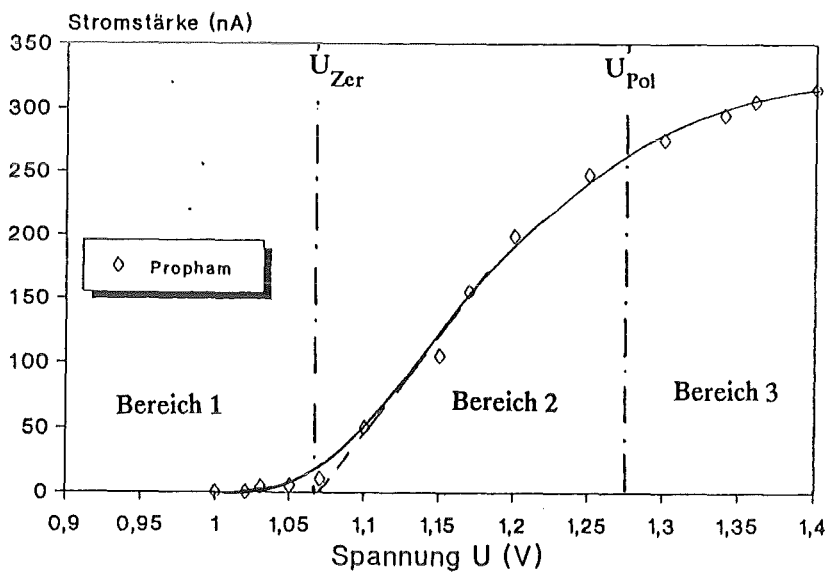


Abbildung 31: Strom-Spannungskurve von Propham, aufgenommen im Eluenten $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O} = 9:11$ Volumenanteile mit NaAc-Puffer 0.02m, pH=4,75

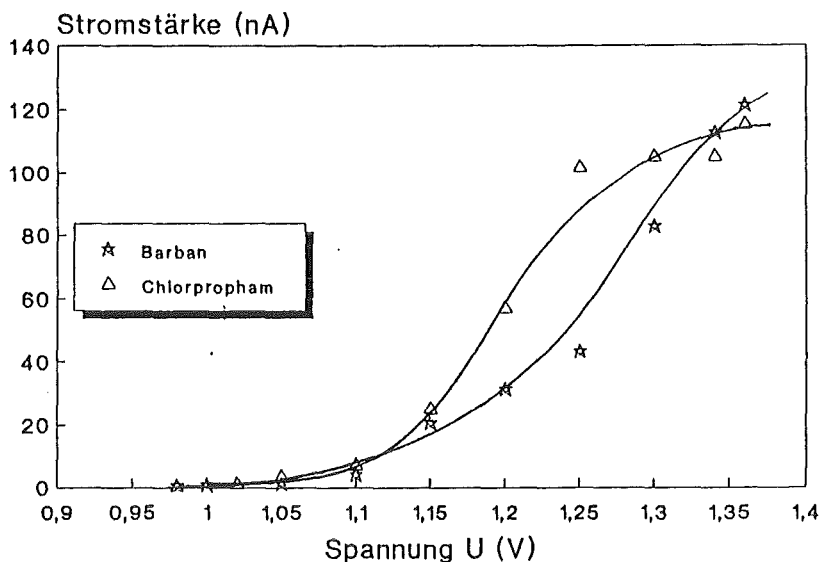


Abbildung 32: Strom-Spannungskurven von Barban und Chlorpropham, aufgenommen im Eluenten $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O} = 9:11$ Volumenanteile mit NaAc-Puffer 0.02m, pH=4,75

Barban zeigt in Abbildung 32 einen deutlich schlechter abgrenzbaren Arbeitsbereich, bei Carbaryl in Abbildung 33 ist der Diffusionsgrenzstrombereich nicht mehr erfaßt.

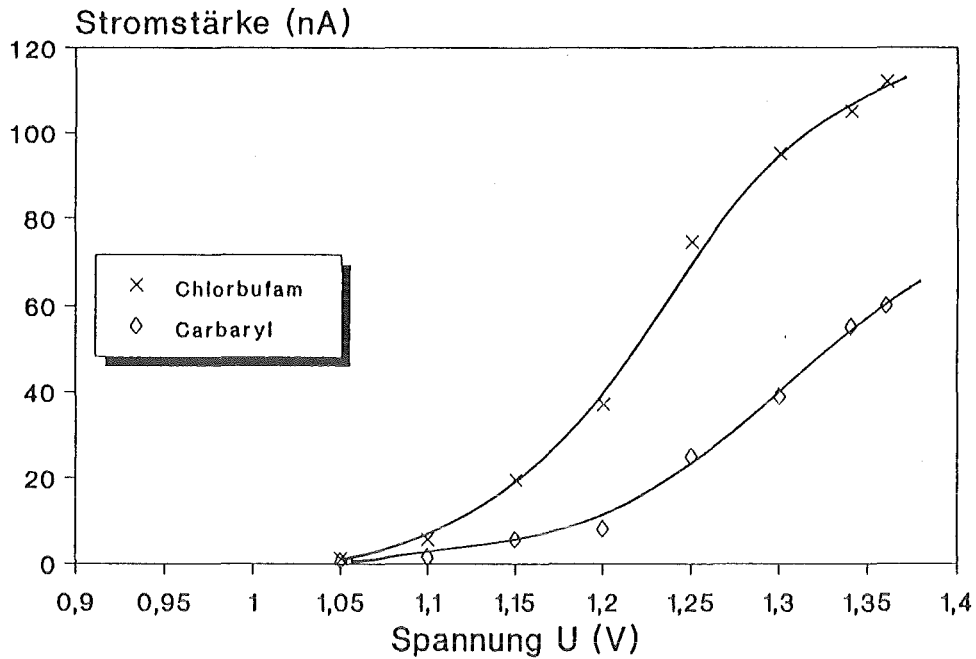


Abbildung 33: Strom-Spannungskurve von Chlorbufam und Carbaryl, aufgenommen im Eluenten $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O} = 9:11$ Volumenanteile mit NaAc-Puffer, $\text{pH} = 4,75$

Substanz	Zersetzungsspannung (V)	Polarisationsspannung (V)
Carbaryl	1,17	-
Chlorbufam	1,11	1,34
Barban	1,06	1,36
Propham	1,06	1,27
Chlorpropham	1,03	1,25

Tabelle 8: Zersetzungsspannungen und optimale Polarisationsspannungen der Carbamate im Eluenten $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O} = 9:11$ Volumenanteile mit NaAc-Puffer, $\text{pH} = 4,75$

Mit Ermittlung der optimalen Polarisationsspannungen der Einzelsubstanzen kann nun die für die Trennung geeignetste ausgesucht werden. Alle Trennungen wurden

dennoch mit nur max. 1,25 V Polarisationsspannung durchgeführt, da hierbei die Grundlinie noch hinreichend stabil war. Folglich konnten Barban, Chlorbufam und Carbaryl nicht bei ihrer maximalen Polarisationsspannung untersucht werden.

Werden mehrere Messungen bei verschiedenen Spannungen durchgeführt, so kann außer durch die Retentionszeit der Substanz durch das Verhältnis der Peakhöhen eine Substanzidentifikation vorgenommen werden, da selbst die Strom-Spannungskurven von Verbindungen einer Stoffgruppe sich relativ stark unterscheiden.

5.4.4. Abhängigkeit des Detektorsignals von Leitsalz und pH-Wert

Die elektrische Leitfähigkeit des Eluenten wurde durch Zusatz von Salzen erreicht. Ihre Konzentrationen sollen nach Herstellerangaben zwischen 0,01 mol/l und 0,1 mol/l liegen. Tatsächlich wurde mit zunehmenden Elektrolytzusatz ein steigender Grundstrom beobachtet, so daß eine relativ kleine Salzkonzentration stets vorteilhaft schien. Ferner werden die Eigenschaften von Elektrolyten durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ionen beeinflusst. Solche Effekte werden durch Einführung der Funktion der Ionenstärke berücksichtigt:

$$I = \sum m_i \cdot z_i^2, \quad (5.9)$$

mit m_i = Molalität einer Ionenart i
 z_i = spezifische Ladung einer Ionenart i .

In verdünnten Lösungen sind die Aktivitätskoeffizienten der Elektrolyte, ihre Leitfähigkeit, die Geschwindigkeit von Ionenreaktionen und andere Eigenschaften Funktionen der Ionenstärke. Um experimentell einen Einfluß der Ionenstärke auf die Detektion ermitteln zu können, wurden unterschiedliche Ionenarten verwendet. Neben dem Leitsalz ist der pH-Wert des Eluenten für die stoffliche Umsetzung der Probensubstanz oftmals entscheidend, da ihre Zersetzungsspannung maßgeblich beeinflusst werden kann. Ursache ist in der Regel die Veränderung der Elektronendichte im Substanzmolekül, die beispielsweise durch eine Protonierung hervorgerufen wird. Eines der bekanntesten Beispiele ist die reduktive Bestimmung von Nitrophenolen, die bei einem pH-Wert von 3 durchgeführt wird. Die protonierte Form besitzt eine geringere Elektronendichte, so daß sie leichter reduziert werden kann. Um konstante pH-Werte garantieren zu können, wurden als Leitsalze Puffersysteme mit fest vorgegebener Konzentration eingesetzt. Bei der oxidativen Bestimmung der Carbamate darf der pH-Wert der untersuchten Ester wegen ihrer

sauren bzw. alkalischen Hydrolyse nur im Bereich zwischen 3 bis 7 variieren, wobei bei höheren Säurekonzentrationen ihre Stabilität deutlich höher ist. Sollte eine Signalverstärkung oder eine Änderung der Zersetzungsspannungen auftreten, so kann dies durch die Strom-Spannungskurven der Substanzen nachgewiesen werden. Mit den für die elektrochemische Detektion üblichen Puffersystemen wurde der pH-Wert im Bereich zwischen 3 bis 7 variiert, wobei die unterschiedliche Ionenstärke der Puffersysteme berücksichtigt wurde.

Als Puffer wurden in dem Eluentengemisch, Acetonitril:Wasser = 9:11, verwendet:

- KH_2PO_4 (0,02 m)/ H_3PO_4 , pH = 3
- NaAc (0,02 m)/HAc (0,02 m), pH = 4,75
- KH_2PO_4 (0,02 m)/NaOH, pH = 6,88

Abbildung 34 zeigt den Einfluß der Ionenstärke und des pH-Wertes auf Propham:

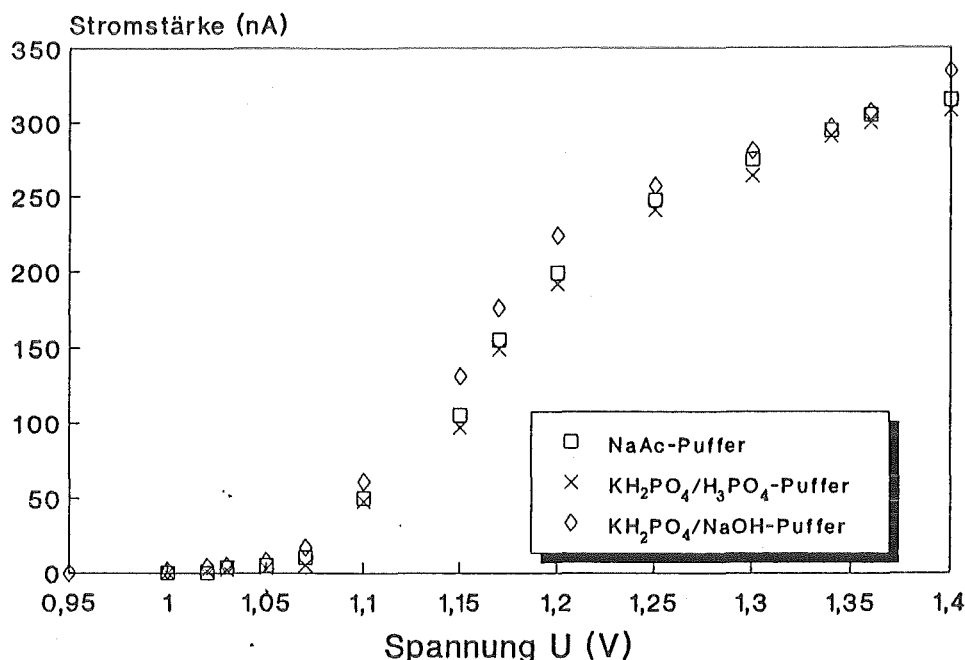


Abbildung 34: Strom-Spannungskurve von Propham bei verschiedenen pH-Werten

Die Strom-Spannungskurven von Propham bei unterschiedlichen Elektrolyten und pH-Werten des Eluenten zeigen, daß die Zersetzungsspannung bei höheren pH-Werten geringfügig niedriger liegt, während die Signalintensität nahezu unverändert bleibt. Mit der Ionenstärke konnte folglich keine Signalverstärkung erreicht werden. Die beste Detektierbarkeit der Substanzen sollte bei hohen pH-Werten erreicht werden. Experimentell zeigte sich jedoch, daß vollständige Trennungen am leichtesten im acetatgepufferten System zu realisieren waren. Die phosphathaltigen Eluenten zeigten eine deutliche Deaktivierung der Arbeitselektrode, so daß aus

einem Gemisch jeweils nur die ersten Substanzpeaks erhalten werden konnten, während die letzten nicht angezeigt wurden (siehe Kapitel 5.5).

Tabelle 9 zeigt die Abhängigkeit der Zersetzungsspannung von dem Puffersystem.

Puffersystem	Zersetzungsspannung (V)
Phosphatsystem pH = 3	1,075
Acetatsystem pH = 4,75	1,07
Phosphatsystem pH = 6,88	1,06

Tabelle 9: pH-Wert Abhängigkeit der Zersetzungsspannung

5.4.5. Abhängigkeit des Detektionssignals von der Fließgeschwindigkeit

Das Signal des stoffstromabhängigen amperometrischen Detektors wird durch die Strömungsgeschwindigkeit nach Gleichung (5.1) beeinflusst. Für Gemischtrennungen mit der benutzten HPLC-Apparatur sind Strömungsgeschwindigkeiten von 0,7 bis 1,3 ml/min relevant, da kleinere Strömungsgeschwindigkeiten zu langen Analysezeiten und Peakverbreiterungen, größere zu unvollständigen Auftrennungen und starken Druckschwankungen führen.

Abbildung 35 zeigt den Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf das Detektionssignal von 100 ppb Prophan, bei einer Temperatur von 24°C im acetatgepufferten Eluenten Acetonitril : Wasser = 9:11 Volumenprozent.

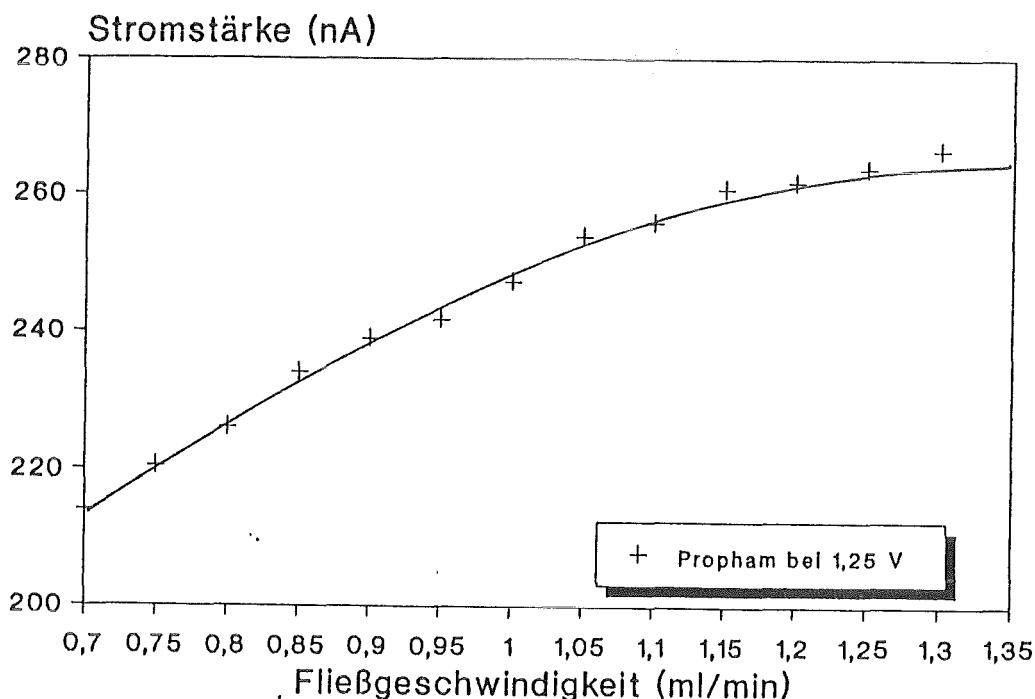


Abbildung 35: Abhängigkeit des Detektionssignals von der Strömungsgeschwindigkeit

Bis zu einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,05 ml/min steigt das Signal stark an. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten nimmt der Effekt des Vorbeitransportes zu, so daß die Signalstärke etwas langsamer zunimmt. Im untersuchten Bereich ergibt sich eine Signalveränderung um etwa 15%. Der Exponent a läßt sich anhand der Messungen bestimmen und besitzt den Wert 0,41. Somit wurde der erwartete Kurvenverlauf durch das Experiment bestätigt.

5.4.6. Abhängigkeit des Detektorsignals von der Temperatur

Die Beeinflussung des Detektorsignals durch die Temperatur konnte experimentell durch eine Thermostatisierung des Eluentenstromes unmittelbar vor der Detektorzelle erreicht werden. Eine steigende Temperatur hat, wie in Kapitel 5.3. beschrieben, größere Diffusionskoeffizienten zufolge. Somit sollte eine größere Substanzstoffmenge an die Elektrode herantransportiert werden und abreagieren können. Infolge der Eluentenzusammensetzung wurde für einen Temperaturbereich von 5-40 °C das Stromsignal bestimmt und bezüglich der Nachweisgrenzen das Grundrauschen ermittelt. Abbildung 36 zeigt folgende Abhängigkeiten:

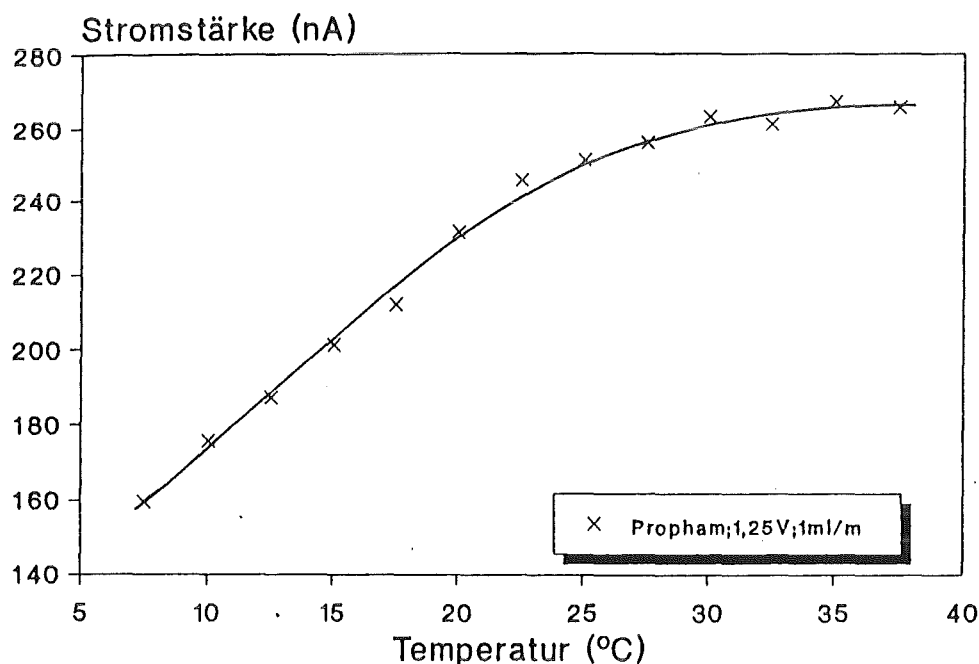


Abbildung 36: Temperaturempfindlichkeit des Detektionssignals

Bis zu einer Temperatur von 22,5 °C steigt die Signalstärke nahezu linear an. Bei höheren Temperaturen zeigt die Kurve eine abnehmende Steigung, ein Verhalten, das durch die Theorie qualitativ erklärt wird (Gleichung (5.8)).

Der Stromfluß bei 22,5 °C ist nahezu um etwa 50 % höher als bei 7,5 °C. Reproduzierbare Ergebnisse können folglich nur unter exakter Thermostatisierung erhalten werden. Für Spurennachweise ist der Temperatureffekt nicht unbegrenzt ausnutzbar, weil das Grundrauschen bei höheren Temperaturen stark ansteigt.

5.5. Durchführung der Trennung und Bestimmung der Nachweisgrenzen

Die experimentellen HPLC-Trennungen zur elektrochemischen Detektion wurden mit einer RP-Säule mit Porenradien von 300 Å durchgeführt. Diese erlaubt Analysenzeiten von weniger als 10 Minuten. Um die am Diodenarray auf Volumenfluß und Eluent optimierte Trennung möglichst unbeeinflusst zu lassen, wurden die dort verwendeten Puffersysteme in höheren Konzentrationen als Leitsalze verwendet. Eine Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase von 1,0 ml/min wurde beibehalten, da diese auch für das Detektionssystem als geeignet erschien. Die hinsichtlich der elektrochemischen Detektion wichtigen Größen (Temperatur, Polarisationsspannung, Strömungsgeschwindigkeit und pH-Wert) wurden im Kapitel 5.4 untersucht und optimiert.

Sämtliche Trennungen zur Bestimmung des Detektorverhaltens und der Nachweisgrenzen wurden mit folgenden, experimentell optimierten Größen durchgeführt:

Einflußgröße	Wert
Puffersystem, bzw. Leitsalz	NaAc/HAc, 0,02 m, pH = 4,75
Strömungsgeschwindigkeit des Eluenten	1,0 ml/min
Thermostatisierung der Detektorzelle	konstant 25°C
Polarisationsspannung	1,25 V

Tabelle 10: Meßbedingungen für die ELCD

Das Acetatpuffersystem zeigte an der Arbeitselektrode das geringste Deaktivierungsverhalten, während die Phosphatpuffer eine Erfassung von fünf Substanzpeaks nicht zuließen. Die Strömungsgeschwindigkeit von 1,0 ml/min war nicht nur für die Trennung der Pestizide durch das HPLC-System optimal, sondern auch für das Stromstärke-/Rauschsignal des elektrochemischen Detektors. Eine Thermostatisierung der Detektionszelle ist für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unerlässlich. Die theoretische Temperaturabhängigkeit des

Detektorsignals ließ eine optimale Detektion bei hohen Temperaturen erwarten. Doch ist dieser Effekt durch das Eluentenverhalten beschränkt, bei Temperaturen größer 25°C eine deutlich schwächere Temperaturabhängigkeit zu zeigen (siehe Kapitel 5.4.6.). Die Polarisationsspannung von 1,25 V war ebenfalls ein Kompromiß zwischen Signalstärke und Rauschverhalten, wie in Kapitel 5.4.3 gezeigt wurde.

Unter diesen konstant gehaltenen Meßbedingungen wurde folgendes Chromatogramm aufgenommen:

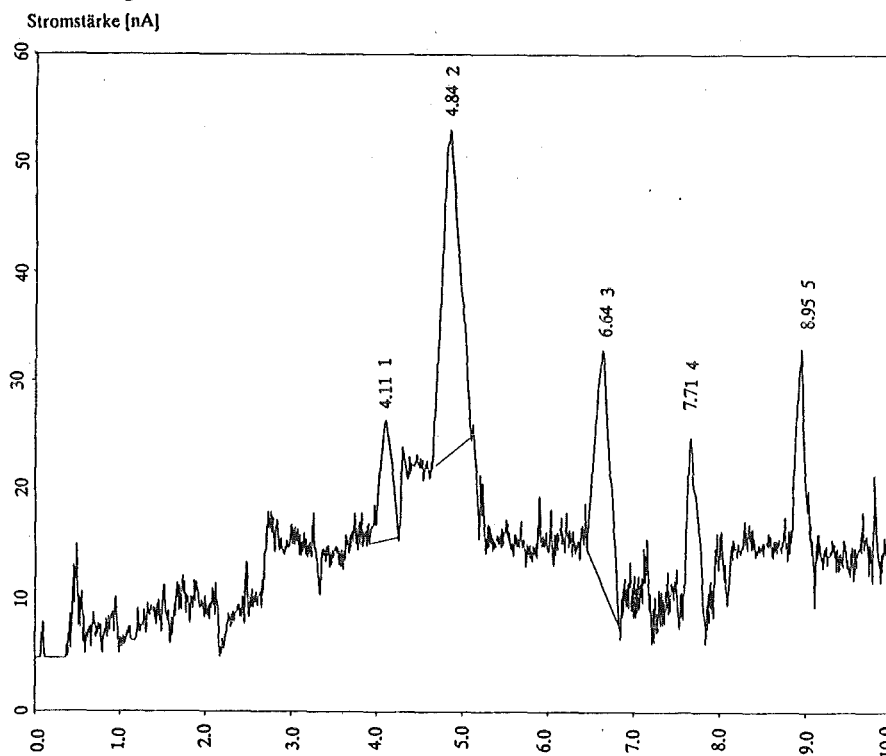


Abbildung 37: Chromatogramm der fünf Carbamate mit je 100 ppb. Zeit [min]

Tabelle 11 gibt für die getrennten Carbamate die Retentionszeiten, Kapazitätsfaktoren und die relativen Fehler der Peaksignale bei dreimaliger Wiederholung der Messung an.

Carbamat	Retentionszeit t_R (min)	Kapazitätsfaktor k'	Fehler des Detektorsignals
Carbaryl	4.10	2,73	4,7%
Propham	4.78	3,19	6,3%
Chlorbufam	6.57	4,38	7,2%
Barban	8.03	5,35	6,8%
Chlorpropham	9.03	6,02	6,5%

Tabelle 11: Identifikation und Fehleranalyse der Substanztrennung

Zur Auswertung von quantitativen Messungen wurden für die Substanzen Konzentrationsreihen aufgenommen. Die höchsten Konzentrationen betragen 200 ppb pro Vertreter, da größere Mengen unmittelbar zur Deaktivierung der Arbeitselektrode führten. Dieser Effekt, der vermutlich auf Ablagerungen an der Arbeitselektrode zurückzuführen ist, wurde auch an einer Gold-Arbeitselektrode beobachtet. Abbildungen 38 und 39 zeigen die Konzentrationsreihen der Carbamate. Der lineare Bereich des Detektors ($\text{Signal} \propto \text{Konzentration}$) ist durch diese Maßnahme stark eingeschränkt. Außerdem fällt auf, daß für höhere Konzentrationen die Abweichung von einer Geraden infolge der geringeren Aktivität der Arbeitselektrode größer wird.

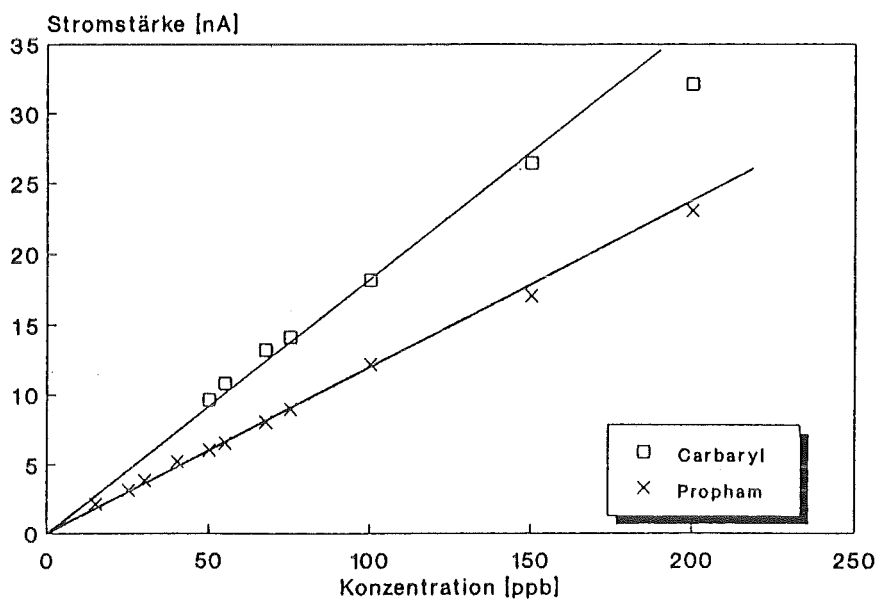


Abbildung 38: Konzentrationsreihen von Carbaryl und Propham

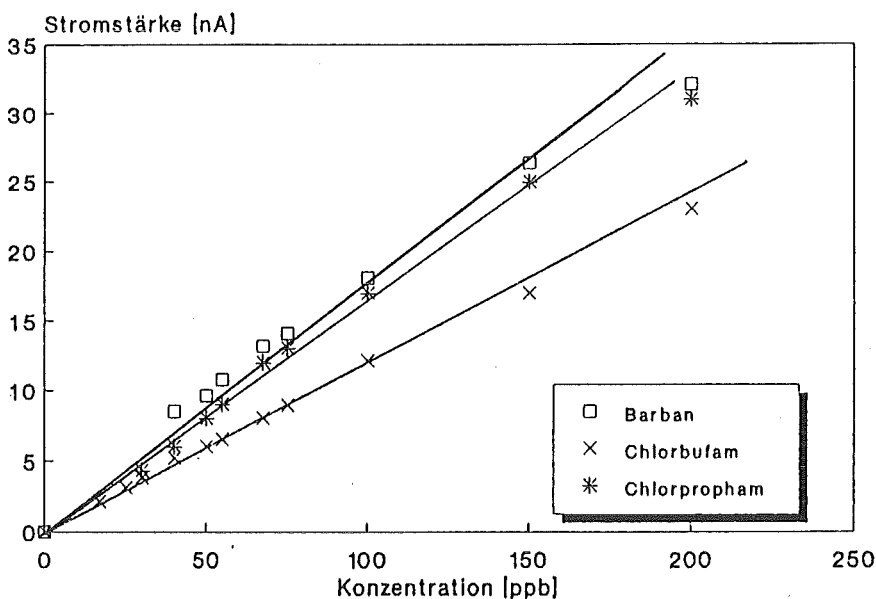


Abbildung 39: Konzentrationsreihen von Chlorbufam, Barban und Chlorpropham

Der elektrochemische Detektor ist gekennzeichnet durch eine extrem hohe Empfindlichkeit. Seine Nachweisgrenzen liegen für die betrachteten Verbindungen unter den spektralphotometrisch erfaßten Werten. Hierbei fällt auf, daß aufgrund des geänderten Detektionsprinzips die einzelnen Verbindungen in ihrer Nachweisempfindlichkeit untereinander in einer veränderten Reihenfolge stehen. Es ergeben sich die in Tabelle 12 dargestellten Nachweisgrenzen.

Carbamat	Nachweisgrenze (ppb)
Carbaryl	53
Propham	13
Chlorpropham	24
Barban	31
Chlorbufam	17

Tabelle 12: Nachweisgrenzen des ELCD für Carbamat-Pestizide

6. Diskussion und Ausblick

Der Vergleich der Nachweisgrenzen in Tabelle 13 zeigt, daß der amperometrische Detektor die Carbamate (mit Ausnahme des Carbaryl) um bis zu einem Faktor fünf empfindlicher nachweisen kann als der spektralphotometrische Diodenarray-Detektor. Aufgrund des veränderten physikalischen Detektionsprinzips ergibt sich unter den Carbamaten eine veränderte Reihenfolge in der Nachweisgrenze. Beide Systeme können jedoch die gesetzlich geforderten Nachweisgrenzen für Pestizide von 0,1 µg/l (0,1 ppb) für die Einzelsubstanz und 0,5 µg/l (0,5 ppb) für die Summe der Substanzen im Rahmen eines on-line Verfahrens nicht erfüllen.

Im Vergleich zu der spektralphotometrischen Detektion besitzt der elektrochemische Detektor einige erhebliche Nachteile:

Das elektrochemische Detektionssystem ist infolge seiner Lösungsmittelabhängigkeit auf HPLC mit Umkehrphasen beschränkt, ferner wird der detektierte Stoff zumindest teilweise bei der Detektion zersetzt. Nur relativ leicht oxidierbare oder reduzierbare Verbindungen sind untersuchbar. Folglich kann an eine vollständige Erfassung aller Pestizidgruppen nicht gedacht werden.

Durch die Wahl eines bestimmten Polarisationspotentials wird die detektierbare Substanzgruppe nochmals eingeschränkt, wie auch keine Möglichkeit besteht, die Substanzen in einer einzigen Messung selektiv zu erfassen.

Die Arbeitselektrode muß in einer speziellen Vorbehandlung vor jeder Messung aktiviert werden. Durch Stoffumsätze an der Elektrode wird diese während der Messung deaktiviert und liefert häufig zu geringe Werte.

Die elektrochemische Detektion kann durch Fremdionen (Fe^{2+}) relativ leicht gestört werden. Absolut reine Eluenten sind daher Voraussetzung für die erfolgreiche Detektion.

Das Diodenarray erfaßt hingegen sämtliche spektralphotometrisch detektierbaren Substanzen, allerdings bei deutlich höheren Nachweisgrenzen.

Die experimentelle Handhabung des Detektorsystems ist nahezu problemlos, ein Anschluß an spezielle HPLC-Säulen ist vorstellbar. Die Möglichkeit, jeden Substanzpeak eines Chromatogramms auf sein Spektrum hin zu untersuchen, läßt Selektivitätsbetrachtungen zu. Dies kann zumindest zur Überprüfung der Reinheit eines aufgetrennten Substanzgemischs oder einer einzigen Substanz genutzt werden.

Da die vom Gesetzgeber erwarteten Nachweisgrenzen für Pestizide in der on-line Analyse nicht erreicht werden konnten, müssen die Detektoren in ihrer Empfindlichkeit weiterhin gesteigert werden.

Für das Diodenarray bestehen prinzipiell drei Möglichkeiten dies zu erreichen.

- Die Entwicklung stärkerer Lichtquellen zur Absorption
- Verbesserung der Empfindlichkeit der Halbleiterdioden
- Verbesserung des Signal/Noise-Verhältnisses von Durchflußzelle, Strahlengang oder Auswertungsmethode.

Die erwähnten Veränderungen sind für die Spektralphotometrie von grundsätzlicher Bedeutung, daher wurden diese Faktoren in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich optimiert. Andererseits bedarf es einer prinzipiellen Verbesserung, mit der die Empfindlichkeit um einen Faktor 100 erhöht werden könnte. Daher erscheint die on-line Analyse von Pestiziden im gesetzlich geforderten Nachweisbereich ohne Säulenanreicherung zunächst eher unwahrscheinlich.

Bei der elektrochemischen Detektion besteht im Gegensatz dazu ein enormer Entwicklungsbedarf. Durch Einführung der Pulsationstechnik (d.h. Anlegen einer Wechselspannung an die Arbeitselektrode im 10 Hz-Bereich) wurde in den letzten Jahren das Problem der Feststoffablagerung weitgehend gelöst [26]. Da nur für ein extrem kurzes Zeitintervall die eigentliche Meßspannung anliegt, kann das Zersetzungspotential deutlich erhöht werden. Dies hat eine entscheidende Verbesserung der Empfindlichkeit zufolge. Gleichzeitig kann an eine Erhöhung der Selektivität gedacht werden, wenn die Meßintervalle mit unterschiedlichen Meßspannungen betrieben werden. Allerdings ist die Einschränkung des Systems auf oxidierbare und reduzierbare Verbindungen hiermit generell nicht gelöst. Die bevorzugte Verwendung des elektrochemischen Detektors liegt derzeit noch in dem Nachweis einer einzigen, sehr leicht oxidierbaren Verbindung, die in bestimmten Medien durch ihre geringe Zersetzungsspannung ohne große Auftrennung selektiv detektiert werden kann.

Eine generelle Eignung der beschriebenen Detektoren zum empfindlichen Nachweis der Pestizide ohne Zwischenanreicherung erscheint somit fragwürdig. Neuere nachweisstärkere Methoden, wie die photothermische Ablenkungsspektroskopie oder Photoakustik sind daher diesen klassischen Detektionsprinzipien vorzuziehen.

7. Literatur

- [1] Richtlinie des Rates vom 15. Juli 1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EWG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr.: L 229/11-29, 30.08.80.
- [2] Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, Fassung vom 22. Mai 1986, § 2 Abs. 1 in Verbindung mit Anlage 2 Nr. 13; Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1986, Teil 1.
- [3] G. Matolcsy, M. Nadasy, Pesticide chemistry, Elsevier Verlag, 1988.
- [4] H. P. Thier, H. Frehse, Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Springer, 1986.
- [5] G. H. Schmidt, Pestizide und Umweltschutz, Vieweg, 1986.
- [6] A. Martin, R. L. M. Synge, Biochem. J., 35 (1941) 1358.
- [7] H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer, 1975.
- [8] V. Meyer, Praxis der Hochleistungschromatographie, Salle und Sauerländer, 1990.
- [9] L. R. Snyder, J. Chromatogr. Sci., 10 (1972) 200 und 369.
- [10] S. Kawai, J. of Chromatography, 442 (1988) 451.
- [11] A. Schikarski, Diplomarbeit, Institut für Radiochemie, Universität Karlsruhe, 1991.
- [12] J. R. Taylor, Fehleranalyse, VCH Weinheim, 1988.
- [13] H. Kaiser, Z. analyt. Chemie, 209 (1965) 1-18A.
- [14] A. Heuschen, K. P. Hupe, HPLC in Biochemistry, VCH Weinheim, 1985.
- [15] Handbuch des Metrohm-Detektors 656, Deutsche Metrohm AG, Filderstadt, 1985.

- [16] J. M. Elbicki, *Anal. Chem.* **56** (1984) 978-985.
- [17] M. Cardosi, *European Chromatography and Analysis*, **4** (1992) 9-12.
- [18] J. Yamada, H. Matsuda, *J. Electroanalyt. Chem.*, **44** (1973) 189-198.
- [19] R. P. W. Scott, *Liquid chromatography detectors*, Elsevier Verlag, 1986.
- [20] Fitzer, Fritz, *Technische Chemie*, Springer, 1989.
- [21] P. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Weinheim, 1987.
- [22] P. Surmann, *Fres. Z. Anal. Chem.*, **316** (1983) 373-381.
- [23] W. E. van der Linden, J. W. Diecker, *Anal. Chim. Acta*, **119** (1980) 1-24.
- [24] *Gebrauchsanweisung des ELCD 656*, Metrohm AG, Filderstadt, 1985.
- [25] W. J. Mayer, M. S. Greenberg, *J. of Chromatography*, **208** (1981) 295-304.
- [26] M. B. Thomas, P. E. Sturrock, *J. of Chromatography*, **357** (1986) 318-324.

8. Anhang: Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Grundstruktur der Carbamate

Abbildung 2: Grundstruktur der N-Alkylcarbamate

Abbildung 3: Grundstruktur der N-Arylcarbamate

Abbildung 4: Grundstruktur von Propham

Abbildung 5: Grundstruktur von Chlorpropham

Abbildung 6: Grundstruktur von Barban

Abbildung 7: Grundstruktur von Chlorbufam

Abbildung 8: Grundstruktur von Carbaryl

Abbildung 9: Verlauf der chromatographischen Trennung

Abbildung 10: Erläuterung der wichtigsten Parameter zur Charakterisierung einer
Trennung

Abbildung 11: Die Auflösung zweier benachbarter Peaks

Abbildung 12: Peakasymmetrie und Peakformen nach [7]

Abbildung 13: Schematischer Aufbau der HPLC-Apparatur

Abbildung 14: Schematische Anordnung des Diodenarrays

Abbildung 15: Absorptionsspektrum von Carbaryl

Abbildung 16: Absorptionsspektrum von Propham

Abbildung 17: Absorptionsspektren von Barban, Chlorbufam und Chlorpropham

Abbildung 18: Chromatogramm der Carbamate

Abbildung 19: Ungepufferter Standard mit Carbarylverunreinigungspeak

Abbildung 20: Gepuffertes System ohne Verunreinigungen

Abbildung 21: Konzentrationsreihe von Carbaryl

Abbildung 22: Konzentrationsreihe von Prophan

Abbildung 23: Konzentrationsreihe von Chlorprophan

Abbildung 24: Konzentrationsreihe von Barban

Abbildung 25: Konzentrationsreihe von Chlorbufam

Abbildung 26: Detektorzelle des ELCD nach dem WALL-JET-Prinzip

Abbildung 27: Diffusionsgrenzschicht an der Arbeitselektrode

Abbildung 28: Verlauf der Konzentration an der Elektrodenoberfläche

Abbildung 29: Verlauf des elektrochemischen Potentials an der Elektrodenoberfläche

Abbildung 30: Polarisationsprozeß der Arbeitselektrode

Abbildung 31: Strom-Spannungskurve von Prophan

Abbildung 32: Strom-Spannungskurven von Barban und Chlorprophan

Abbildung 33: Strom-Spannungskurven von Chlorbufam und Carbaryl

Abbildung 34: Strom-Spannungskurve von Prophan bei verschiedenen pH-Werten

Abbildung 35: Abhängigkeit des Detektionssignals von der Strömungsgeschwindigkeit

Abbildung 36: Temperaturempfindlichkeit des Detektionssignals

Abbildung 37: Chromatogramm der fünf Carbamate mit je 100 ppb

Abbildung 38: Konzentrationsreihe von Carbaryl und Protham

Abbildung 39: Konzentrationsreihen von Chlorbufam, Barban und Chlorprotham

Tabelle 1: Fließmittelstärke verschiedener Eluenten gegenüber der Normalphase
 Al_2O_3

Tabelle 2: UV-Grenzen der Lösungsmittel nach [8]

Tabelle 3: Nachweisgrenzen der Carbamate mit dem Diodenarray bei einem Probevolumen von $20 \mu\text{l}$

Tabelle 4: Elektrochemische Detektoren mit konstanter Polarisationsspannung

Tabelle 5: Polarisationsspannungen von detektierbaren Substanzen nach [14]

Tabelle 6: Optimierungsgrößen in der elektrochemischen Detektion

Tabelle 7: Lösungsmittelkriterien zur elektrochemischen Detektion

Tabelle 8: Zersetzungsspannungen und optimale Polarisationsspannungen der Carbamate

Tabelle 9: pH-Wert Abhängigkeit der Zersetzungsspannung

Tabelle 10: Meßbedingungen für die ELCD

Tabelle 11: Identifikation und Fehleranalyse der Substanztrennung

Tabelle 12: Nachweisgrenzen des ELCD für Carbamat-Pestizide