

Analytische Chemie

Dissertationsthema:

**ANALYSE VON PHENOLEN IN KOMPLEXEN MATRICES NACH  
DERIVATISIERUNG ZU FERROCENESTERN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Nina Kolbe**

aus Herdecke

- 2008 -

Dekan: Prof. Dr. F. Ekkehardt Hahn

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jan T. Andersson

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf

Tag der mündlichen  
Prüfung: 31.03.2008

Tag der Promotion: 31.03.2008

---

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Vorkommen von Phenolen .....</b>	<b>4</b>
3.1	Gefährdungspotential industriell verwendeter Phenole .....	4
3.1.1	Endokrine Wirkung.....	4
3.1.2	Toxizität.....	6
3.1.3	Industrielle Verwendung .....	8
3.1.4	Gefährdungspotential für Mensch und Umwelt.....	9
3.2	Phenole in Kraftstoffen .....	11
3.2.1	Hydrodesulfurierung.....	12
3.2.2	Adsorptive Entschwefelung (OWI-Verfahren).....	13
3.2.3	Auswirkung des Zusatzes von Biodiesel zu Kraftstoffen .....	14
<b>4</b>	<b>Phenolanalytik – Stand der Technik .....</b>	<b>16</b>
4.1	Extraktionstechniken.....	16
4.2	Derivatisierungen für Phenole .....	17
4.2.1	Silylierung .....	17
4.2.2	Acetylierung .....	18
4.2.3	Derivatisierung mit fluorierten Markern .....	18
4.2.4	Veresterung mit Ferrocencarbonsäurechlorid.....	19
<b>5</b>	<b>Instrumente und Analytische Methoden .....</b>	<b>20</b>
5.1	Methode zur Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäurechlorid .....	20
5.2	Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion im eisenselektiven Modus ..	21
5.3	Gaschromatographie-Massenspektrometrie von Ferrocenestern.....	22
<b>6</b>	<b>Optimierung der Derivatisierung.....</b>	<b>24</b>
6.1	Synthese von Ferrocenpropionsäurechlorid und Derivatisierungstests.....	24
6.2	Synthese von Ferrocenpropionsäureanhydrid.....	27
6.3	Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure und 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid .....	28
6.4	Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure und Carbodiimiden .....	30

---

6.4.1	Dicyclohexylcarbodiimid.....	30
6.4.2	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid.....	31
6.5	Blindwerte .....	36
6.5.1	Blindwerte aus Dimethylaminopyridin .....	37
6.5.2	Blindwerte aus Ferrocencarbonsäurechlorid .....	38
6.5.3	Blindwerte aus Pipettenspitzen.....	38
6.5.4	Identifizierung des Derivatisierungsartefaktes .....	39
6.5.5	Reproduzierbarkeitsschwierigkeiten aufgrund von Blindwerten .....	41
6.6	Zusammenfassung .....	42
<b>7</b>	<b>o-Phenylphenol auf Zitrusfrüchten .....</b>	<b>43</b>
7.1	Methodenentwicklung .....	45
7.1.1	Extraktionsmethoden .....	45
7.1.2	Interne Standards .....	48
7.1.3	GC-Temperaturprogramm .....	49
7.2	Optimierte Probenvorbereitung und Analyse.....	50
7.3	Methodenvalidierung .....	51
7.3.1	Nachweisgrenze und linearer Bereich .....	51
7.3.2	Wiederfindung in dotierten Proben .....	53
7.3.3	Ergebnisse der GC-AED-Analysen und Vergleich mit GC-MS.....	54
7.3.4	Vergleichsanalyse mit HPLC-FLD .....	55
7.3.5	Fehlerbetrachtung der OPP-Analyse.....	57
7.4	Tiefenprofil in einer Orangenschale.....	57
7.5	Identifizierung von Alkoholen in Zitrusfruchtschalen.....	59
7.6	Zusammenfassung .....	61
<b>8</b>	<b>Nonylphenole in Verpackungsmaterial .....</b>	<b>63</b>
8.1	Charakterisierung des technischen Nonylphenolgemisches .....	65
8.2	Methodenentwicklung .....	67
8.2.1	Interne Standards .....	68
8.2.2	Extraktion .....	69
8.3	Detektionsprobleme Nonylphenolferrocenester.....	70
8.4	Ergebnisse der Folienanalysen mittels GC-AED .....	74
8.5	Vergleich mit HPLC-MS und HPLC-UV .....	75
8.6	Zusammenfassung .....	78

---

<b>9</b>	<b>Alkylphenole in entschwefelten Heizölen .....</b>	<b>80</b>
9.1	Probenvorbereitung .....	82
9.2	Quantitative Analyse mittels GC-AED .....	84
9.2.1	Phenole in Heizöl EL nach OWI-Entschwefelung .....	86
9.2.2	Phenole in Heizöl EL schwefelarm nach OWI-Entschwefelung .....	92
9.2.3	Phenole in hydrodesulfuriertem spanischen Diesel .....	97
9.3	Qualitative Analyse mittels GC-MS .....	101
9.3.1	Große Alkylphenole in zwei entschwefelten Heizölen .....	101
9.3.2	Heizöle mit Decanolkontamination .....	106
9.3.3	Phenole in Heizöl mit Zusatz von Biodiesel .....	107
9.4	Vergleich der Phenolanalysen in Heizölen mit Kohlenwasserstoff- und Schwefel- aromatenanalysen .....	109
9.5	Zusammenfassung .....	110
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>Summary .....</b>	<b>117</b>
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>128</b>
13.1	Ergänzende Untersuchungen .....	128
13.1.1	Qualitätssicherung der Standards .....	128
13.1.2	Nachweisgrenze und linearer Bereich des GC-AED im eisenselektiven Modus .....	130
13.1.3	Empfindlichkeitssteigerung GC-MS .....	131
13.1.4	Massenspektrometrie der Ethylphenolferrocenester .....	132
13.2	Allgemeine Synthesevorschriften .....	133
13.2.1	Synthese von Ferrocencarbonsäurechlorid .....	133
13.2.2	Synthese von Phenolferrocenestern .....	134
13.2.3	Synthese von 2,3,4-Trimethylphenol .....	134
13.2.4	Synthese von Ferrocenpropionsäurechlorid .....	135
13.3	Geräte .....	136
13.4	Chemikalien .....	139
13.5	Abkürzungsverzeichnis .....	141



# 1 EINLEITUNG

Phenole sind ubiquitär in der Umwelt zu finden und stammen sowohl aus natürlichen Quellen (z.B. Alkylphenole in Erdöl, Polyphenole in Wein) als auch aus anthropogenen Quellen (z.B. Alkylphenoethoxylate als Tenside, Chlorphenole als Holzschutzmittel, Phenylphenol als Pestizid). Ihr Einsatz ist allerdings nicht unproblematisch. Sie haben eine physiologische Wirkung und können je nach Struktur toxisch, krebserzeugend oder endokrin wirksam sein.

Die Europäische Union hat Nonylphenole, Octylphenole und Pentachlorphenol als „prioritäre Stoffe“ klassifiziert, welche als Gefahr für die Wasserqualität in Europa gelten. Nonylphenol gilt sogar als einer von elf „prioritär gefährlichen Stoffen“. Diese Substanzen werden im Rahmen der Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG besonders überwacht und Emissionen sollen möglichst reduziert, von prioritär gefährlichen Stoffen innerhalb der nächsten 15 Jahre sogar komplett gestoppt werden. Die Aufgabe der Analytik ist es in diesem Zusammenhang, die Substanzen in Wasser und anderen Matrices auch noch in Spurenkonzentrationen nachzuweisen, um die Einhaltung dieser Richtlinien zu überwachen.

Auch im Lebensmittelbereich spielen Phenole als Schadstoffe eine Rolle. Nonylphenolrückstände aus Detergentien und Stabilisatoren finden sich in Lebensmitteln und in deren Verpackungsmaterialien. Das Pestizid *ortho*-Phenylphenol wird zur Konservierung von Zitrusfrüchten und als Desinfektionsmittel eingesetzt, steht aber im Verdacht, Krebs zu erregen. Deshalb ist seine Verwendung als Lebensmittelzusatzstoff in der Zusatzstoffzulassungsverordnung gesetzlich geregelt [1], was eine analytische Kontrolle der Rückstände, zum Beispiel auf behandelten Zitrusfruchtschalen, nötig macht.

Alkylphenole haben aber nicht nur negative Auswirkungen. Sie wirken in Kraftstoffen als natürliche Antioxidantien und als Schmiermittel, können allerdings auch Probleme verursachen, wenn sie während der Lagerung des Kraftstoffes polymerisieren und dann unlösliche Ablagerungen bilden. Phenole werden während des Entschwefelungsprozesses in der Raffinerie teilweise als Nebenreaktion entfernt, wobei aber der Mechanismus der Entfernung und die Auswirkung der Entschwefelungsbedingungen auf den Phenolgehalt noch weitgehend unbekannt sind. Entschwefelungsprozesse werden ständig weiterentwickelt, da zur Verlängerung der Lebensdauer von Katalysatoren und zur Reduktion der Schwefeldioxidemissionen immer niedrigere Schwefelkonzentrationen im Treibstoff angestrebt

werden<sup>1</sup>. Dabei ist die Analytik gefragt, Konzentrationen der Spurenbestandteile des Kraftstoffes wie der Phenole zu bestimmen. Mit diesen Informationen können dann Entschwefelungsprozesse besser verstanden werden, um sie dann im Hinblick auf gewünschte Charakteristika des Kraftstoffes wie Schmierfähigkeit und Lagerstabilität zu optimieren.

Zur Überwachung der Schadstoffbelastung befindet sich die Analytische Chemie also in einer Schlüsselposition. Ebenso wichtig ist sie für die Aufklärung der Mechanismen technologischer Prozesse bzw. für die produktionsbegleitende Qualitätssicherung. Eine Herausforderung ist dabei insbesondere die Spurenanalytik in komplexen Proben. Hier ist die Entwicklung von immer nachweisstärkeren und selektiveren Methoden gefragt, die zudem möglichst schnell und kostengünstig sein sollten, um einen hohen Probendurchsatz zu erlauben. Probenvorbereitungsschritte sind zur Abtrennung störender Substanzen, zur Anreicherung der Analyten und / oder zur Verbesserung der Detektionseigenschaften häufig essentiell für die Spurenanalyse, allerdings auch oft zeitaufwändig.

Für die Analytik von Phenolen in Erdöl wurde von Rolfes und Andersson [2] ein Derivatisierungsverfahren entwickelt, mit dem Alkylphenole sehr empfindlich und schnell bestimmt werden können. Die Phenole werden dabei in einer einfachen Reaktion zu Ferrocenestern umgesetzt und damit mit einem Eisenatom markiert. Die guten Detektionseigenschaften des Eisens werden bei der darauf folgenden gaschromatographischen Analyse mit Atomemissionsdetektion ausgenutzt, um eine empfindliche und selektive Bestimmung ohne weitere Abtrennungs- oder Anreicherungsschritte zu erlauben. Diese Methode wurde bisher erfolgreich für Phenole in Erdöl und dessen Raffinationsprodukten eingesetzt [2, 3]. Angesichts des vielfältigen Einsatzes diverser Phenolverbindungen ist ein erweiterter Anwendungsbereich dieser selektiven Bestimmungsmethode auf unterschiedliche Matrices, z.B. Lebensmittel oder Verpackungsmaterialien, wünschenswert.

---

<sup>1</sup> Dieseldieselkraftstoffe enthalten in Deutschland seit 2003 nur 10 ppm Schwefel, da höhere Gehalte mit einer Sondersteuer belegt sind. Heizöl enthält bisher deutlich mehr Schwefel, ist aber 2008 EU-weit auf maximal 1000 ppm Schwefelgehalt begrenzt worden.



## 2 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Anwendungsbereich einer Methode zu Analyse von ferrocenmarkierten Phenolen auf die Bestimmung von toxikologisch bedenklichen und technologisch wichtigen Phenolen erweitert werden. Die ausgewählten Matrices sollen dabei relevante Beispiele für die Phenolanalytik darstellen und so unterschiedliche Proben wie Lebensmittel, Kunststoffe und Erdölprodukte umfassen.

Die von Rolfes [2], Wasinski [3] und Andersson entwickelte Derivatisierung von Phenolen mit Ferrocencarbonsäurechlorid soll als Grundlage für die Methodenentwicklung dienen. Alkylphenole in Erdöl und verschiedenen Kraftstoffen wurden so bereits erfolgreich mittels Gaschromatographie und Atomemissionsdetektion oder massenspektrometrischer Detektion bestimmt.

Geplant sind nun die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von phenolischen Pestizidrückständen auf Zitrusfruchtschalen, sowie zur Analyse endokrin wirksamer Phenole in Lebensmittelverpackungsmaterialien. Dazu müssen für jede Anwendung Extraktionsverfahren entwickelt oder angepasst werden, wobei eine Kompatibilität mit der Derivatisierung gewährleistet sein muss. Es müssen geeignete interne Standards zur Quantifizierung gefunden werden und gegebenenfalls muss das Derivatisierungsverfahren angepasst werden. Nach erfolgreicher Methodenentwicklung soll die Validierung der Methode und die Anwendung für Realproben erfolgen.

Weiterhin sollen im Rahmen dieser Arbeit Alkylphenole in Heizölen bestimmt werden, um einen Beitrag zur Aufklärung des Einflusses verschiedener Entschwefelungsverfahren auf die Qualität des Heizöls (bezüglich Schmierfähigkeit und Lagerstabilität) zu leisten.

Das Derivatisierungsreagenz Ferrocencarbonsäurechlorid ist allerdings nicht kommerziell erhältlich und die quantitative Derivatisierung stark sterisch gehinderter Verbindungen ist problematisch. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher zusätzlich andere ferrocenbasierte Derivatisierungsreagenzien entwickelt und hinsichtlich quantitativer Umsetzung sowie einfacher Handhabbarkeit evaluiert werden. Dadurch soll eine einfache und zuverlässige Anwendung der zu entwickelnden Analysenmethoden auch in Routinelaboren ohne Syntheseeinrichtung möglich sein.

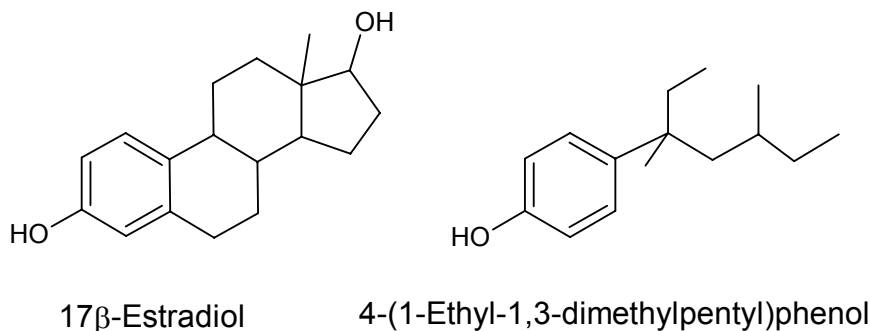
### 3 VORKOMMEN VON PHENOLEN

Aufgrund der großen Vielfalt an phenolischen Verbindungen wird in den folgenden Kapiteln ausschließlich auf Vorkommen, Bedeutung und Analyse von alkylierten und arylierten Phenolen mit einer Hydroxylgruppe eingegangen, da diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Zunächst wird in diesem Kapitel die Wirkung ausgewählter Phenole auf den menschlichen und tierischen Organismus vorgestellt. Die Exposition gegenüber diesen Phenolen und die damit verbundene mögliche Gefährdung wird in diesem Zusammenhang analysiert. Anschließend wird auf Vorkommen und Bedeutung von Phenolen in Kraftstoffen und auf die Beeinflussung der Phenolgehalte durch Entschwefelungsprozesse eingegangen.

#### 3.1 Gefährdungspotential industriell verwendeter Phenole

##### 3.1.1 Endokrine Wirkung

Alkylphenole besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zum weiblichen Sexualhormon  $17\beta$ -Estradiol. Sie können damit kompetitiv zu Estradiol an einen Östrogenrezeptor (ER) binden und ihn aktivieren, wodurch unterschiedliche Vorgänge ausgelöst werden können. Weibliche Brustkrebszellen (MCF-7) reagieren zum Beispiel auf Östrogene, indem die Aktivierung des ER die Mitose stimuliert und sich die Zellen vermehren. Dabei weisen die verschiedenen Alkylphenole eine sehr verschieden starke östrogene Wirksamkeit auf, die im Bereich von  $10^3$  -  $10^6$  Mal schwächer als  $17\beta$ -Estradiol selbst liegt [3, 4].



**Abbildung 3-1: Strukturformeln von  $17\beta$ -Estradiol und einem endokrin wirksamen Nonylphenolisomer (nach [3])**

Die östrogene Wirkung wird *in vitro* häufig mit dem E-Screen Assay getestet, bei dem die Zellvermehrung (Proliferation) von Brustkrebszellen nach Zusatz der zu testenden

Substanz gemessen und dann relativ zur Zellproliferation von  $17\beta$ -Estradiol angegeben wird [4]. Alternativ enthalten beim MVLN Zellassay [3] die weiblichen Brustkrebszellen ER, an die ein Luciferin exprimierendes Reportergen gekoppelt ist, so dass bei Aktivierung des ER eine Färbung des Mediums messbar ist. Statt Brustkrebszellen werden auch gentechnisch veränderte Hefezellen verwendet, welche die Gensequenz des humanen ER und des Reportergens integriert haben (YES-Assay) [5].

*In vivo* kann zum Beispiel der Vitellogeninspiegel in Fischen nach Exposition gegenüber Alkylphenolen gemessen werden, da dieses Eidotterprotein durch Östrogene vermehrt gebildet wird [6]. Der Vorteil von *in vivo* Tests ist, dass eine mögliche Bioakkumulation nachgewiesen werden kann. Ebenso werden Resorption, Verteilung im Körper, Metabolisierung und Ausscheidung berücksichtigt. Nachteilig ist, dass *in vivo* Tests deutlich aufwändiger und stör anfälliger durch eine Überlagerung unterschiedlicher Effekte sind. *In vivo* wurden noch keine systematischen Untersuchungen der relativen Wirksamkeit unterschiedlicher Alkylphenole durchgeführt.

Die verschiedenen *in vitro* Tests reagieren unterschiedlich empfindlich und ergeben teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Tabira fand beispielsweise im Gegensatz zu anderen Autoren eine ähnliche Wirksamkeit für geradkettige und verzweigte Isomere [6]). Es lassen sich allerdings einige allgemeine Trends ableiten. Endokrin wirksam sind Alkylphenole besonders, wenn sie dem  $17\beta$ -Estradiol strukturell ähnlich sind, das heißt:

- sie besitzen nur eine Alkylkette in *para*-Stellung [5],
- sie weisen mindestens vier Kohlenstoffatome in der Seitenkette auf (stärkere Wirkung bei acht oder neun Kohlenstoffatomen) [4, 7],
- sie sind am  $\alpha$ -C verzweigt (wobei eine Ethylgruppe stärker wirkt als eine Methylgruppe) [5, 7].

So wurde *p-tert*-Octylphenol als potentestes endokrin wirksames Alkylphenol identifiziert [5], gefolgt vom technischen *p*-Nonylphenolisomerenmisch, in dem unterschiedlich verzweigte Nonylphenole (mit unterschiedlicher Potenz) enthalten sind. Als endokrin wirksamstes Isomer wurde in [3] 4-(1-Ethyl-1,3-dimethylpentyl)phenol (siehe Abbildung 3-1) identifiziert, welches zu etwa 20% im technischen Gemisch enthalten ist. *p*-Nonylphenole sind industriell wesentlich bedeutender als *p-tert*-Octylphenol, daher wird im Folgenden hauptsächlich auf Nonylphenole eingegangen.

### 3.1.2 Toxizität

#### 3.1.2.1 *p*-Nonylphenole

*p*-Nonylphenole sind ubiquitär in der Umwelt zu finden, da sie in großen Mengen industriell produziert werden und über verschiedene Wege freigesetzt werden (siehe Kapitel 3.1.3). Eine Zusammenfassung mehrerer Studien zur Toxizität der Nonylphenole findet sich im „EU risk assessment report“ [8]. Tierversuche zeigten, dass die Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt schnell und extensiv funktioniert. Metabolisiert wird Nonylphenol hauptsächlich über Glucuronidierung und Sulfatkonjugation, so dass es hauptsächlich über den Kot und den Urin ausgeschieden werden kann. Die Bioverfügbarkeit von freiem Nonylphenol wird mit 10-20% der oral aufgenommenen Dosis angenommen. Nonylphenol verteilt sich im ganzen Körper, wobei die höchsten Konzentrationen im Fettgewebe gefunden wurden. Eine Bioakkumulation wird als unwahrscheinlich angesehen, aber bisherige Daten reichen für eine endgültige Beurteilung nicht aus. LD<sub>50</sub>-Werte für Ratten betragen 1200 – 2400 mg/kg, so dass Nonylphenol als moderat toxisch anzusehen ist.

Bei Ratten wurden in einer Mehrgenerationen-Studie über 20 Wochen [9] ab einer oralen Aufnahme von 15 mg/kg Körpergewicht leichte Veränderungen der Nieren festgestellt. Auch geringe östrogene Effekte wurden in dieser Studie bei Dosen größer als 15 mg/kg festgestellt, darunter eine veränderte Zykluslänge der weiblichen Nachkommen sowie verringerte Spermienzahlen der männlichen Nachkommen, welche aber die Reproduktionsfähigkeit nicht beeinträchtigten.

Wasserorganismen wie Fische sind besonders gefährdet, da sich Nonylphenol im Wasser aufgrund seiner Lipophilie ( $\log K_{ow} = 4,5$  [10]) bevorzugt im Fettgewebe von Lebewesen anreichert. Es wurden Biokonzentrationsfaktoren (BCF) von 6000-7000 L/kg in Algen und 200-600 L/kg in Fischen gefunden [10], wobei allerdings die gefundenen BCF großer Variation unterlagen. Tests an Fischen zeigten, dass Konzentrationen ab etwa 0,1 mg/L toxisch sind. Konzentrationen ab 10-20 µg/L riefen schon östrogene Effekte hervor, wie die vermehrte Produktion von Vitellogenin, ein reduziertes Körpergewicht und einen Rückgang des Hodengewebes (Zusammenfassung mehrerer Studien in [8]). Lachse zeigten nach Exposition gegenüber 10 µg/L Nonylphenol im Larvenstadium noch ein Jahr später eine verminderte Stress- und Salzwassertoleranz [11]. In [8] wurde auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studien und unter Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren eine „predicted no-effect concentration“ von 0,33 µg/L vorgeschlagen.

### 3.1.2.2 *o*-Phenylphenol

*ortho*-Phenylphenol (OPP) wird als Pestizid für Zitrusfrüchte eingesetzt, um die Früchte vor Pilzbefall nach der Ernte zu schützen (siehe Kapitel 7). Das Pestizid hat allerdings im Tierversuch eine potentiell Krebs erzeugende Wirkung gezeigt und verursachte außerdem in hohen Dosen Wachstumsstörungen, verringerte Fruchtbarkeit und Nierenschädigungen [12]. In [12] werden vor allem die reaktiven Metaboliten Phenylhydrochinon (PHQ) und Phenylbenzoquinon (PBQ, siehe Abbildung 3-2) für oxidativen Stress in Zellen und damit für Cytotoxizität und Kanzerogenität von OPP verantwortlich gemacht.

Die Gefährdung durch OPP wird aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert [13], dennoch ist die Verwendung für Lebensmittel als Vorsichtsmaßnahme gesetzlich geregelt. In Deutschland sind OPP und sein Natriumsalz unter den Nummern E231 bzw. E232 in der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuIV) zugelassen. Es gilt eine Höchstgrenze für Rückstände auf der Frucht von 12 mg OPP/kg ganze Frucht [1], wobei die Verwendung deklariert und die Schalen als „nicht zum Verzehr geeignet“ bezeichnet werden müssen.

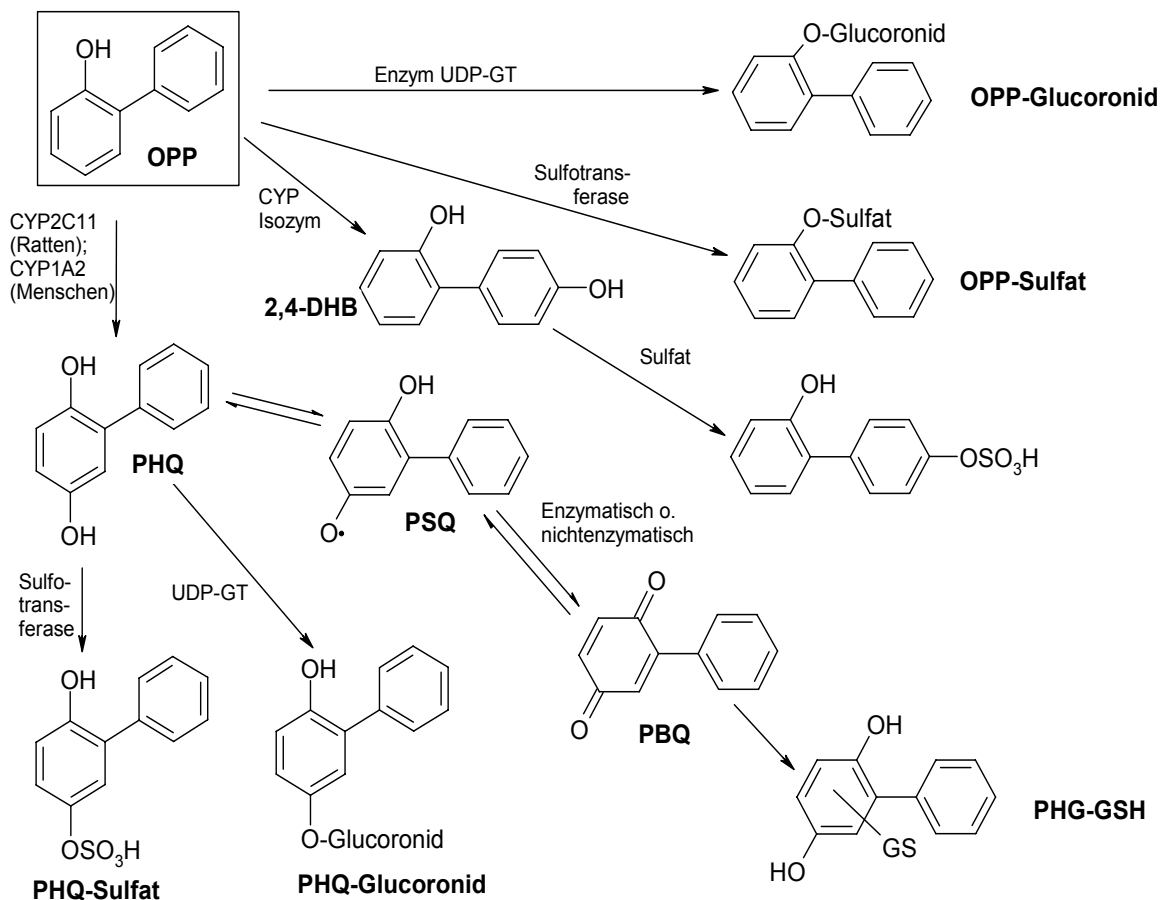
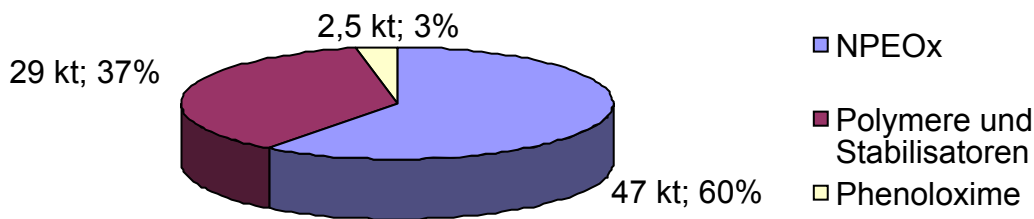


Abbildung 3-2: Metabolismus von *o*-Phenylphenol (nach [13])

### 3.1.3 Industrielle Verwendung

Der Weltmarkt für Alkylphenole hatte 2001 ein Volumen von 400 kt pro Jahr [10], wovon technisches Nonylphenol etwa 80 - 90% und Octylphenol etwa 15% ausmachte. Andere Alkylphenole werden in weitaus geringerem Maßstab hergestellt. Technisches *p*-Nonylphenol wird durch Alkylierung von Phenol mit technischem Nonen hergestellt, wobei ein komplexes Isomerengemisch mit ca. 90% *p*-Nonylphenolen und geringen Mengen an *o*-Nonylphenolen entsteht. Daraus werden zum großen Teil Nonylphenoethoxylate (NPEO<sub>x</sub>) hergestellt. Diese werden aufgrund der hydrophilen Ethoxylatkette und des lipophilen Nonylrestes als nichtionische Detergentien, Emulgatoren und Dispergiemittel eingesetzt. Daten über die Verwendung von Nonylphenol in der Europäischen Union sind nur von 1997 erhältlich [8]. Der Gesamtverbrauch betrug 78,5 kt/Jahr, wobei die Aufteilung auf verschiedene Anwendungsbereiche in Abbildung 3-3 dargestellt ist.



**Abbildung 3-3: Verwendung von Nonylphenol in der EU im Jahr 1997, Produktionsvolumina angegeben in kt und in Prozent der Gesamtproduktion**

Hauptverbraucher von NPEO<sub>x</sub> sind die Textilindustrie (zur Entfettung von Fasern und als Emulgator beim Färben), die Polymerindustrie (z.B. als Dispersionsmittel in der Emulsionspolymerisation), die Lederindustrie (zur Entfettung von Häuten) und die industrielle Großreinigung. Im Jahr 1994 hatten Anwendungen als Reinigungsmittel (44,7%) und als oberflächenaktive Substanz (46,1%) mit Abstand den größten Anteil am Gesamtverbrauch [8]. NPEO<sub>x</sub> mit langen Ethoxylatketten sind selbst nicht endokrin wirksam, werden aber während der Abwasserreinigung biologisch zu kurz-kettigen Mono- oder Diethoxylaten und teilweise zu Nonylphenolen abgebaut. Die Halbwertszeit von Nonylphenolen beträgt etwa 150-300 Tage [8], so dass sie sich besonders im Klärschlamm anreichern können.

Seit 1986 geht der Verbrauch in Deutschland zurück, da sich die Industrie selbst verpflichtet hat, auf den Einsatz von Alkylphenoethoxylaten in Haushaltswaschmitteln und -reinigungsmitteln zu verzichten. Die EU stufte Nonylphenole 2000 in Richtlinie 2000/60/EG als prioritär gefährliche Substanz ein und erwirkte einen EU-weiten freiwilligen Verzicht der Industrie auf den Einsatz von NPEO<sub>x</sub> in Reinigungsmitteln. Seit 2005 ist innerhalb der EU

der Einsatz von Nonylphenol und NPEO<sub>x</sub> in Mengen von mehr als 0,1% des Produktes verboten, außer beim Einsatz in geschlossenen Systemen (z. B. in der Textilreinigung mit Recycling des Detergenzes) [14]. Es ist davon auszugehen, dass sich der Gesamtverbrauch in der EU inzwischen reduziert und besonders der Anteil der NPEO<sub>x</sub> verringert hat.

In der Polymerindustrie werden Nonylphenole auch zur Produktion von Tris(4-nonylphenol)-phosphiten (TNPP) eingesetzt (etwa 4 kt/Jahr [10]), die als Antioxidant zur Stabilisierung diverser Kunststoffe zugesetzt werden. Bis zu 6% TNPP-Gehalt ist erlaubt, wobei bis zu 3% freies Nonylphenol enthalten sein kann [8]. Durch UV-Einwirkung geschieht ein langsamer oxidativer Abbau, wodurch Nonylphenole aus den Produkten freigesetzt werden. Außerdem werden Nonylphenole als Monomere für die Herstellung von Phenol- und Formaldehydharzen eingesetzt, wobei eine Freisetzung durch die feste Bindung im Polymer aber praktisch ausgeschlossen ist.

OPP spielt nur eine untergeordnete Rolle auf dem Weltmarkt. Zahlen zur Produktion und Verwendung waren nur aus Kalifornien erhältlich [15]. Hier wurden 2006 etwa eine Tonne OPP und 3 Tonnen seines Natriumsalzes verwendet. Das Natriumsalz von OPP wurde fast ausschließlich für die Behandlung von Zitrusfrüchten verwendet (2,9 t), während OPP selbst für diverse Zwecke als Pestizid und Desinfektionsmittel eingesetzt wurde. Allerdings wandeln sich OPP und sein Natriumsalz je nach pH-Wert ineinander um, so dass die Verbindungen auf der Frucht oder in der Umwelt nicht mehr unterschieden werden können.

### 3.1.4 Gefährdungspotential für Mensch und Umwelt

Eine Exposition des Menschen gegenüber Phenolen kann über mehrere Wege erfolgen. OPP kann durch den Verzehr von behandelten Früchten aufgenommen werden. Die Migration von der Schale ins Fruchtfleisch wurde im Rahmen dieser Arbeit als sehr gering identifiziert (siehe Kapitel 7.4), so dass nur bei der Verwendung behandelter Schalen (z.B. zum Backen oder in Getränken) von einer nennenswerten Exposition auszugehen ist. Weiterhin wird OPP teilweise als Oberflächendesinfektionsmittel eingesetzt. In amerikanischen Haushalten wurde OPP in allen untersuchten Raumluftproben (10 - 1000 ng/m<sup>3</sup>) und 70% der Hausstaubproben (bis 2 µg/g) gefunden [16], wodurch aber maximal Mengen im niedrigen µg-Bereich aufgenommen werden können. Quantitative Angaben liegen für Deutschland oder Europa nicht vor.

Hauptquelle an Nonylphenol sind NPEO<sub>x</sub> aus Produktionsabwässern und Haushaltsabwasser, wobei in den letzten Jahren die veränderte Gesetzeslage eine deutliche Reduktion der Emissionen zur Folge gehabt haben müsste. Aktuelle Daten für den Zeitraum nach

2005 liegen allerdings nicht vor. Einer Langzeitstudie der Deutschen Umweltprobenbank zur Belastung von Wasserlebewesen mit Nonylphenol, Octylphenol und deren Monoethoxylaten zufolge ließ sich zwischen 1985 und 2001 schon eine deutliche Reduktion der Gehalte feststellen. Dieses wurde auf den freiwilligen Verzicht der deutschen Industrie auf NPEO<sub>x</sub> in Reinigungsmitteln seit 1986 zurückgeführt [17].

Mögliche Quellen für Nonylphenole in Lebensmitteln sind vielfältig. Feldgemüse kann durch Behandlung mit NPEO<sub>x</sub>-haltigen Pestizidformulierungen und durch Düngung mit Klärschlamm, der Nonylphenole enthält, belastet werden. Aus TNPP-haltigen Lebensmittelverpackungen kann freigesetztes Nonylphenol besonders in fetthaltige Lebensmittel migrieren. Zusätzlich werden Lebensmittelverpackungen oft aus ästhetischen Gründen oberflächlich mit NPEO<sub>x</sub> behandelt, um eine Kondensation von Wasser an der Verpackung zu verhindern. Im „EU Risk Assessment Report“ [8] wird eine Migration von 11 ppb aus Polyethylenverpackungen (aus TNPP und NPEO<sub>x</sub>) und 25 ppb aus PVC-Verpackungen angenommen. Daraus lässt sich mit Daten der FDA (Food and Drug Administration, USA) zum statistischen Konsumverhalten der Amerikaner eine durchschnittliche abgeschätzte Aufnahmemenge an Nonylphenol von 140 µg/Tag aus Lebensmittelverpackungsmaterialien berechnen. Günther et al. [18] fanden 2002 in praktisch allen untersuchten Lebensmitteln Spuren von Nonylphenolen (0,1 - 19 µg/kg), wobei die Gesamtexposition eines Erwachsenen über Lebensmittel auf etwa 7,5 µg/Tag und eines Säuglings auf 0,2 – 1,4 µg/Tag geschätzt wird. Diese Schätzung von Günther ist wesentlich niedriger als das „worst case scenario“ der angenommenen Exposition in [8], was die große Unsicherheit der Abschätzung verdeutlicht.

Weitere Aufnahmequellen sind die Benutzung von NPEO<sub>x</sub>-haltigen Spezialfarben oder Pestizidformulierungen sowie Kosmetikprodukte wie Haarfärbemittel. Insgesamt wird in [8] die Exposition auf etwa 0,6 µg/kg Körpergewicht pro Tag geschätzt (da nur etwa 10% des oral aufgenommenen Nonylphenols resorbiert werden). Eine Aufnahme von Nonylphenol über Luft oder Wasser ist dagegen außer in unmittelbarer Nachbarschaft zu nonylphenol-emittierenden Industrieanlagen zu vernachlässigen (Nonylphenolgehalte in amerikanischen Luftproben 20 – 400 ng/m<sup>3</sup> [16]).

In Tierversuchsstudien wurden wesentlich höhere „lowest observed adverse effect level“ (LOAEL) für Nonylphenol gefunden als die wahrscheinliche Exposition des Menschen, so dass in [8] nicht von einer Gefährdung der Konsumenten ausgegangen wird. Allerdings können in Studien nur begrenzt Informationen über Langzeitexposition gewonnen werden und ein Synergismus mit anderen endokrin wirksamen Chemikalien in der Umwelt kann



ebenfalls nicht ausgeschlossen werden („Something from nothing“). Hinweise darauf gibt es zum Beispiel in [19] aus einem Experiment mit Fischen. Ein weiterer Artikel [20] stellt einen (bisher allerdings unbewiesenen) Zusammenhang zwischen der Zunahme von Fettleibigkeit in Industriestaaten mit der Exposition gegenüber östrogen wirksamen Chemikalien her. *In vitro* konnte hier gezeigt werden, dass endokrine Disruptoren in hohen Konzentrationen im embryonalen Stadium die Umwandlung von Körperzellen in Fettzellen unterstützen.

Während also eine Gefährdung der Umwelt (besonders aquatischer Ökosysteme) durch Nonylphenol allgemein als wahrscheinlich angesehen wird [8], wird eine mögliche Gefährdung des Menschen durch Nonylphenol noch diskutiert. Weitere Forschung wird benötigt, um zu einer abschließenden Beurteilung zu kommen. Hier können schnelle und empfindliche analytische Methoden helfen, Nonylphenolquellen und Aufnahmewege aufzuklären. Mit diesen Informationen kann dann die tägliche Belastung des Menschen durch Nonylphenole und andere endokrin wirksame Substanzen besser eingeschätzt werden.

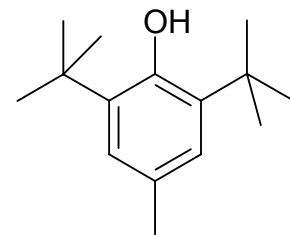
### 3.2 Phenole in Kraftstoffen

Alkylphenole bedeuten allerdings nicht immer eine Gefahr für Mensch und Umwelt, sondern sie sind auch natürliche Spurenbestandteile des Erdöls. Ihre Herkunft wird noch diskutiert. Mögliche Quellen sind eine Hydroxylierung von Alkylbenzenen [21] oder eine elektrophile Addition von Alkenen an Phenol [22] im Muttergestein, sowie eine Zersetzung des phenolische Gruppen enthaltenen Lignins aus Hölzern. Isopropylmethylphenole wie Thymol und Carvacrol kommen in Pflanzen vor und sind unverändert im Erdöl zu finden. Am häufigsten sind Alkylphenole mit geringem Molekulargewicht ( $C_0$ – $C_3$  in Alkylketten) im Erdöl enthalten, es wurden aber schon Alkylphenole mit bis zu 33 Kohlenstoffatome langen Seitenketten gefunden [23]. Die Gesamtphenolgehalte können 0,25 bis 80 ppm betragen [24, 25], während die Konzentrationen einzelner Alkylphenole zwischen 20 ppb und 40 ppm schwanken [26, 27].

Phenole überdauern teilweise die Raffinerieprozesse und sind daher auch in Kraftstoffen zu finden. Das Verhalten eines Kraftstoffs und seine Schmierfähigkeit und Lagerstabilität werden zum großen Teil durch polare Verbindungen bestimmt, darunter hauptsächlich Alkylphenole [28, 29]. Phenole haben sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Qualität des Kraftstoffs. Sie wirken der Autoxidation des Treibstoffs entgegen, da sie resonanzstabilisierte Radikale bilden können, welche als Radikalfänger für die verschiedenen aus Kohlenwasserstoffen entstehenden Radikale dienen können [29].

Natürlich vorkommende Phenole wirken so synergistisch mit synthetischen Antioxidantien wie BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, siehe Abbildung 3-4) zusammen. Ein Nachteil ist, dass sterisch ungehinderte Phenole nach Oxidation polymerisieren können und dann unlösliche Rückstände (sogenannte „gums“) bilden, die besonders für Kerosin in Ventilen und Pumpen eines Flugzeugs problematisch sind [30, 31].

Durch Entschwefelungsprozesse werden als Nebenreaktion Phenole aus dem Öl entfernt und müssen durch synthetische Antioxidantien ersetzt werden [28]. Bisher gibt es jedoch wenige Informationen über den Einfluss von Entschwefelungsbedingungen auf die Phenolentfernung, sowie darüber, ob unterschiedliche Alkylphenole unterschiedlich reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Phenolgehalte in Heizölen untersucht, welche mit zwei verschiedenen Entschwefelungsverfahren behandelt wurden. Die beiden Verfahren werden deshalb kurz vorgestellt.



**Abbildung 3-4: Strukturformel von BHT als Beispiel für einen synthetischen Antioxidant**

### 3.2.1 Hydrodesulfurierung

Bei der klassischen Hydrodesulfurierung (HDS) werden schwefelorganische Verbindungen katalytisch zu Kohlenwasserstoffen und Schwefelwasserstoff hydriert, welcher aufgrund seiner Flüchtigkeit leicht abgetrennt werden kann. Als heterogene Katalysatoren werden gemischte Metallsulfide auf Aluminiumoxid-Trägermaterial verwendet, wobei Kombinationen aus Molybdän und Kobalt oder Nickel zum Einsatz kommen. Die Reaktoren arbeiten bei Temperaturen von 300 bis 360 °C und Wasserstoffdrücken von drei bis fünf Megapascal.

Aufgrund der ständig sinkenden gesetzlichen Grenzwerte für den Schwefelgehalt in Kraftstoffen<sup>2</sup> muss der Prozess zur Entschwefelung höher siedender Fraktionen wie Diesel weiter optimiert werden, da zunehmend entschwefelungsresistentere Schwefelverbindungen zurückbleiben. Bei drastischeren Bedingungen kommt es vermehrt zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie Cracken von Paraffinen und Hydrierungen. Damit kommt es zu erhöhtem Verbrauch von teurem Wasserstoff und die Qualität des Treibstoffes wird

<sup>2</sup> In Europa gilt nach DIN EN 590 ab 2009 der Grenzwert von 10 ppm Schwefel für Diesel, was aber in Deutschland aufgrund einer Sondersteuer für höhere Schwefelgehalte bereits seit 2003 umgesetzt ist. Benzin ist leichter zu entschwefeln und enthält daher kaum noch Schwefel.

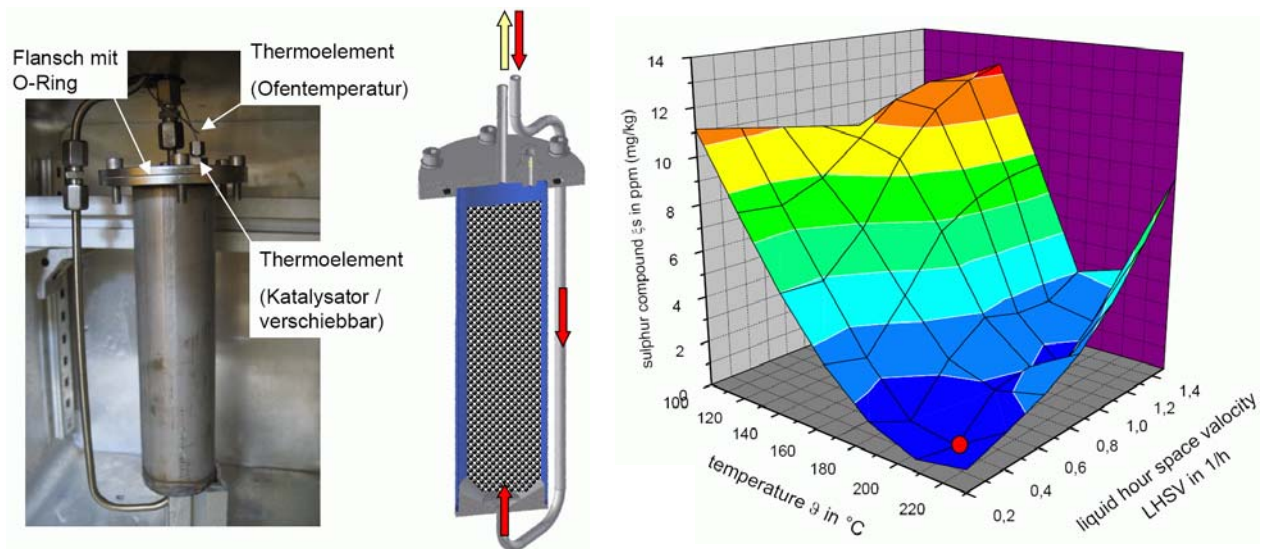
negativ beeinflusst. So ist die Entwicklung effektiverer Katalysatoren gefragt. Der Mechanismus der Entschwefelung an der Katalysatoroberfläche ist trotz vieler Untersuchungen noch nicht vollständig aufgeklärt (siehe Diskussion und Literaturangaben in [32]). Die Adsorption an die Oberfläche erfolgt entweder über den Schwefel oder bei aromatischen Verbindungen auch über eine Wechselwirkung mit den  $\pi$ -Elektronen des Aromaten. Anschließend erfolgt entweder eine direkte Eliminierung des Schwefels durch Hydrierung, oder sequentiell erst eine partielle Hydrierung mit anschließender Eliminierung. Unterschiedlich substituierte Schwefelaromaten scheinen unterschiedliche Reaktionswege zu bevorzugen. Phenole konkurrieren mit Schwefelaromaten um die Bindungsstellen auf der Katalysatoroberfläche. Der Sauerstoff kann dann ebenfalls direkt eliminiert werden, oder es wird zunächst der aromatische Ring gesättigt und der Sauerstoff wird anschließend entfernt [33].

### 3.2.2 Adsorptive Entschwefelung (OWI-Verfahren)

Ein neuartiges adsorptives Entschwefelungsverfahren für Heizöl wurde im Aachener Oel-Wärme-Institut (OWI) entwickelt. Hier werden sehr niedrige Schwefelgehalte bis zu Restschwefelgehalten von deutlich unter 1 ppm erreicht. Das ist für die Anwendung von Heizöl in Brennstoffzellen wichtig, wobei der in der Brennstoffzelle benötigte Wasserstoff durch Reformieren des Heizöls freigesetzt wird. Verschiedene zur Feinreinigung des erzeugten Synthesegases verwendete Katalysatoren werden durch Schwefelverbindungen vergiftet, weshalb die Tiefentschwefelung des Heizöls nötig ist.

Beim OWI-Verfahren wird das Heizöl mit einem Nickel-Katalysator im Durchflussverfahren adsorptiv entschwefelt (siehe Abbildung 3-5). Bisher ist nicht geklärt, ob die Schwefelverbindungen hauptsächlich adsorbiert oder auch durch wasserstoffreiche Verbindungen des Öls hydriert werden und dann Schwefel eliminieren. Mit zunehmender Anwendungsdauer verliert der Katalysator allerdings durch Ablagerungen und Bildung von Nickelsulfid an Effektivität, was höhere Restschwefelgehalte im Heizöl zur Folge hat.

Mit diesem Entschwefelungsverfahren wurde sowohl Heizöl EL („extra leicht“, üblicherweise in Haushaltsheizungen verwendet) mit einem Schwefelgehalt von etwa 850 ppm, als auch kommerzielles schwefelarmes Heizöl EL behandelt. Das schwefelarme Heizöl wies durch Hydrodesulfurierung in der Raffinerie einen Schwefelgehalt von etwa 50 ppm auf.



**Abbildung 3-5: Aachener Entschwefelungsreaktor (links) und Abhängigkeit des Restschwefelgehaltes von den Prozessparametern (rechts) bei der Entschwefelung von Heizöl EL schwefelarm [34]**

Wie in Abbildung 3-5 zu sehen, lagen die optimalen Bedingungen für die Tiefentschwefelung von Heizöl EL schwefelarm bei einer Temperatur von 200°C und LHSV-Werten<sup>3</sup> von etwa 0,3/h. Der Druck betrug 5 bis 7 bar.

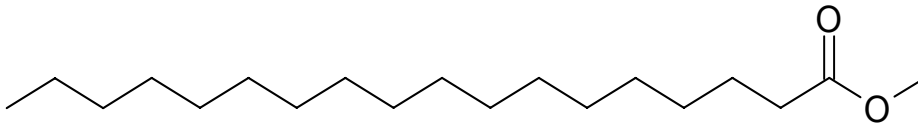
In Untersuchungen von Schade ([35], siehe auch Kapitel 9.4) wurde festgestellt, dass das OWI-Entschwefelungsverfahren polyzyklische Schwefelaromaten in ähnlicher Weise entfernt wie die HDS. Es konnte kein qualitativer Unterschied in den Mustern zurückbleibender Schwefelverbindungen festgestellt werden. Die Auswirkung dieser Entschwefelung auf den Phenolgehalt des Öls ist bisher nicht erforscht und soll daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### 3.2.3 Auswirkung des Zusatzes von Biodiesel zu Kraftstoffen

Um die Abhängigkeit vom Erdöl sowie CO<sub>2</sub>-Emissionen zu verringern, wird konventionellem Diesel zunehmend Biodiesel beigemischt. Von der Europäischen Union wird seit 2005 ein Anteil von 2% am verkauften Diesel und Benzin gefordert, welcher bis 2010 noch auf 5,75% steigen soll (EU Richtlinie 2003/30/EG). Biodiesel besteht aus Fettsäuremethylestern (FAME, engl. „fatty acid methyl ester“) und wird durch Umesterung von

<sup>3</sup> LHSV = Liquid Hourly Space Velocity; gibt das Volumen an Öl an, was pro Stunde und pro Volumen an Katalysator entschwefelt werden kann und ist so ein Maß für die Verweildauer im Reaktor.

Pflanzenölen mit Methanol im Alkalischen gewonnen. Methylester gesättigter C<sub>18</sub>-Fettsäuren sind die Hauptkomponente (siehe Abbildung 3-6), aber auch Fettsäuren anderer Kettenlängen und ungesättigte Fettsäuren sind enthalten. Allgemein besitzt Biodiesel eine bessere Schmierfähigkeit als konventioneller Diesel. Enthaltene ungesättigte Fettsäuren werden aber leicht oxidiert, wodurch sich unlösliche Ablagerungen bilden können. Deshalb spielen Phenole aus dem konventionellen Diesel im Gemisch als natürliche Antioxidantien eine wichtige, bisher im Detail aber weitgehend ungeklärte Rolle. Es ist daher ebenfalls interessant, Phenolgehalte in mit Biodiesel versetzten Kraftstoffen zu untersuchen, um die Zusammenwirkung dieser oxidationsempfindlichen Verbindungen aufklären zu können.



**Abbildung 3-6: Strukturformel von Octadecansäuremethylester, der Hauptkomponente von Biodiesel**

## 4 PHENOLANALYTIK – STAND DER TECHNIK

Die wichtigsten Methoden für die Analyse von Phenolen in den unterschiedlichen Matrices (siehe Kapitel 3) sind chromatographische Trenntechniken nach Extraktion und einer angepassten Probenvorbereitung (Aufreinigung, eventuell Derivatisierung). Am häufigsten werden Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), seltener Kapillarelektrophorese (CE), zur Trennung ausgewählt. Die Detektion erfolgt oft mittels Massenspektrometrie (MS), aber auch andere universelle oder selektive Detektoren sind im Einsatz. Beispiele sind der Fluoreszenzdetektor (FLD) in der Flüssigchromatographie und der Atomemissionsdetektor (AED) in der Gaschromatographie. Die Anforderungen an die Analytik sind je nach Anwendung (Analyt, Konzentrationsbereich, Matrix) sehr unterschiedlich, so dass man die Vor- und Nachteile jedes Analysenverfahrens immer im Hinblick auf das jeweilige Analysenproblem bewerten muss. Ein detaillierter Literaturüberblick mit analytischen Kenndaten der einzelnen veröffentlichten Analysenmethoden ist deshalb den Kapiteln 7, 8 und 9 bezogen auf die jeweilige Anwendung einleitend vorgestellt. In diesem Kapitel soll eine allgemeine Übersicht gegeben werden.

### 4.1 Extraktionstechniken

Phenole sind polar ( $\log K_{OW}$ -Werte zwischen 1,5 und 5 [36]) und reagieren schwach sauer. Daher besteht die klassische Isolierung in der Phenolanalytik aus Flüssig-flüssig-Extraktion (engl. liquid liquid extraction, LLE), wobei entweder eine wässrige Extraktion der Phenolationen bei hohem pH-Wert aus unpolarer Matrix (z.B. [37]) oder eine Extraktion der Phenole mit organischem Lösungsmittel nach Ansäuerung der wässrigen Matrix (z.B. [36, 37]) angewendet wird. Teilweise werden auch beide Extraktionen sukzessive zur Abtrennung von mitextrahierten Matrixkomponenten angewendet (z.B. [27, 38]). LLE lässt sich aber schlecht automatisieren und bedeutet damit einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand für die Routineanalytik, hinzu kommt ein hoher Lösungsmittelverbrauch. Eine häufig angewendete Extraktionstechnik besonders aus Lebensmittelproben ist die Kombination einer Wasserdampfdestillation mit einer Extraktion in ein organisches Lösungsmittel (z.B. [18, 39]). Ein Beispiel dafür ist die Clevenger-Extraktion, die in Kapitel 7.1.1 vorgestellt wird. Hier ist der Zeitaufwand ebenfalls hoch, aber es wird ein relativ reines Extrakt erhalten, da nur mit dem Wasserdampf destillierbare und zudem in der organischen Phase lösliche Substanzen extrahiert werden.

Weit verbreitet ist die Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE) zur Extraktion, Aufreinigung und Anreicherung von Phenolen aus diversen Matrices. Beispiele sind Umkehrphasen- $C_{18}$ -Materialien, Ionenaustauscherphasen oder Kohlenstoffsorbentien. Eine ausführliche Diskussion würde weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Die Vor- und Nachteile gebräuchlicher Phasenmaterialien zur Extraktion von Phenolen aus Wasser (allerdings hauptsächlich von Chlor- und Nitrophenolen) werden ausführlich im Übersichtsartikel von Rodriguez et al. [36] diskutiert. Viele Anwendungen von SPE werden in den Literaturübersichten der Kapitel 6, 7 und 8 vorgestellt. Zwei Beispiele sollen die Bandbreite verdeutlichen: die Anreicherung von Phenolen aus Erdölmatrices mittels „non-endcapped“  $C_{18}$ -Phasen [38] und die Aufreinigung von *o*-Phenylphenol aus Zitrusfruchtextrakten mittels einer Kombination aus Amin- und Anionenaustauscherphase [39].

Weitere Extraktionstechniken mit festen Phasen umfassen die „solid phase micro-extraction“ (SPME) [40, 41], die „stir bar sorptive extraction“ (SBSE) [42] und die „matrix solid phase dispersion“ (MSPD) [43], welche hauptsächlich für wässrige Proben angewendet werden. Die lösungsmittelfreien und gut automatisierbaren Techniken SPME und SBSE benötigen wenig Probenvorbereitung, sind aber von matrixabhängigen Gleichgewichtseinstellungen abhängig und extrahieren die Analyten daher meistens nicht quantitativ.

## 4.2 Derivatisierungen für Phenole

HPLC-Methoden für die Phenolanalytik kommen ohne Derivatisierung aus, bieten für Phenolisomeregemische und komplexe Matrices jedoch häufig keine ausreichende Trennleistung. Vor der GC-Analyse werden Phenole häufig derivatisiert, da sie auf unpolaren Säulen zu sogenanntem Tailing neigen. Tailing verursacht eine Verschlechterung der Trennleistung und unschärfere Integrationsgrenzen für die Quantifizierung. Derivatisierungsmethoden können desweiteren gezielt genutzt werden, um die Detektionseigenschaften zu verbessern. Die Strategie der Derivatisierung ist es generell, die Polarität der OH-Gruppe zu verringern, was durch Silylierung, Veresterung oder Alkylierung geschehen kann.

### 4.2.1 Silylierung

Silylierung ist die verbreitetste Derivatisierungsmethode für Hydroxylgruppen. Dabei wird das saure Proton durch eine Alkylsilylgruppe (z.B. Trimethylsilyl-) ersetzt. Die Derivate sind weniger polar und flüchtiger als die underivatisierten Phenole und ergeben charakteristische Fragmente in der Massenspektrometrie. Als Silylierungsreagenzien wurden

MSTFA (*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid) [17], BSTFA (*N*,*O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid) [25, 40, 46] und MTBSTFA (*N*-Methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoracetamid) [18] eingesetzt. Die Derivatisierung findet üblicherweise direkt vor Injektion in den Gaschromatographen statt, wobei Reagenzienüberschüsse und Nebenprodukte durch ihre höhere Flüchtigkeit vor den Analyten eluieren. Die Effektivität der Derivatisierung sinkt in der Reihe Alkohole > Phenole > Carbonsäuren und wird durch sterische Hinderung beeinträchtigt. Die Silylderivate sind außerdem hydrolyseempfindlich.

### 4.2.2 Acetylierung

Acetylierung in Wasser mit Acetanhydrid in Gegenwart von Carbonat oder Hydrogencarbonat [44] ist eine klassische Derivatisierungsmethode für Phenole, welche häufig vor der Extraktion durch SPE [45], SPME [41] oder LLE [46] angewendet wird, um die Polarität der Phenole zu senken. Die Derivate haben bessere chromatographische Eigenschaften als die underivatisierten Phenole, aber die Detektionseigenschaften werden nicht verbessert. Zusätzlich kann bei der Reaktion entstehendes CO<sub>2</sub> zu Problemen bei der SPE-Extraktion führen [36]. Durch Derivatisierung mit Trifluoracetanhydrid und Dimethylaminopyridin als Katalysator wurde die chromatographische Trennung der Alkylphenole aus Treibstoffen verbessert und es wurden zusätzlich charakteristischere Massenspektren erhalten [47].

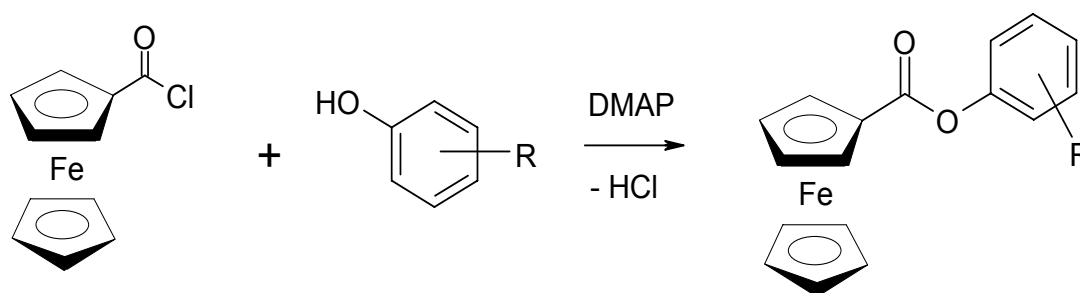
### 4.2.3 Derivatisierung mit fluorierten Markern

Das Ziel der Derivatisierung mit fluorierten Markern ist die Verbesserung der Detektionseigenschaften für die GC-ECD- oder GC-MS-Analyse nach negativer chemischer Ionisierung (NCI). Es wurden diverse fluorhaltige Derivatisierungsreagenzien für Phenole eingesetzt, darunter Pentafluorbenzylbromid (PFBBr) [48], Pentafluorbenzoylchlorid (PFBC) [49, 50] und Pentafluorpyridin [51]. Die Derivatisierung in Erdölproben durch PFBBr erfolgte in der Matrix ohne Isolierung [48]. Aus Wasserproben konnten Phenole nach SPE-Extraktion mit PFBC [49] oder direkt auf der SPE-Kartusche mit Pentafluorpyridin derivatisiert werden [51], während aus Fischproben eine Aufreinigung durch Gelpermeationschromatographie nötig war [50]. Vorteilhaft ist bei allen fluorierten Derivatisierungsreagenzien die hohe Selektivität der GC-MS-Analyse im NCI-Modus, wodurch gute Nachweisgrenzen (0,5 pg Phenol absolut [48], ng/L-Bereich in Wasserproben [49]) und ein Verzicht auf weitere Probenvorbereitung möglich sind. Nachteilig ist eine nicht quantitative Derivatisierung *ortho*-substituierter Phenole durch PFBC. 2,6-Dimethylphenol wurde zum Beispiel in [49] nur zu <10% umgesetzt. Hinzu kommt bei Ölproben eine starke Verschmutzung des chromatographischen Systems durch hohe Matrixbelastung.



#### 4.2.4 Veresterung mit Ferrocencarbonsäurechlorid

Die Anwendungsmöglichkeiten von Ferrocenverbindungen als Derivatisierungsreagenzien in der Analytischen Chemie wurden in einem aktuellen Übersichtsartikel von Seiwert [52] zusammengefasst. Sowohl die leichte Oxidierbarkeit als auch die spektroskopischen Eigenschaften des Eisens können die Detektionseigenschaften für verschiedene Analyten entscheidend verbessern. Rolfes und Andersson [53] entwickelten eine Derivatisierungsmethode für die Analyse von Phenolen, bei der die Analyten bei Raumtemperatur mit Ferrocencarbonsäurechlorid (FCC) unter Katalyse durch 4-(*N,N*-Dimethylamino)-pyridin (DMAP) schnell und selektiv zu Ferrocenestern umgesetzt werden (siehe Abbildung 4-1). Zur Probenvorbereitung von Erdölen ist lediglich der Zusatz der Derivatisierungsreagenzien in Dichlormethan und die Abtrennung überschüssiger Reagenzien und des Großteils der Kohlenwasserstoffe auf zwei Aluminiumoxid-Minisäulen notwendig.



**Abbildung 4-1: Derivatisierung von Phenolen mit Ferrocencarbonsäurechlorid**

Die Analyse erfolgt dann mittels Gaschromatographie und Atomemissionsdetektion im eisen selektiven Modus, wobei die sehr gute Nachweisgrenze des Atomemissionsdetektors für Eisen und die extrem hohe Selektivität von Eisen gegenüber Kohlenstoff für eine empfindliche und selektive Analyse ausgenutzt werden (siehe auch Kapitel 5). Ein weiterer Vorteil der Methode ist die verringerte Polarität der Phenolderivate, wodurch Peaktailing auf unpolaren GC-Säulen verhindert wird. Durch eine geringere Flüchtigkeit der Ester werden darüber hinaus Verdampfungsverluste während der Probenvorbereitung vermieden (Meier [50] fand ohne Derivatisierung bis zu 90% Verlust an Phenol und 50% Verlust an Butyl- und Octylphenol nach Einengen der Probe bis zur Trockene für 5 min).

Die Eignung dieser Analysenmethode für Alkylphenole in Erdölproben wurde von Rolfes bereits eindrucksvoll gezeigt [54]. Wasinski ergänzte den Einsatzbereich um Phenole in diversen Erdölprodukten und nutzte GC-MS als alternative Bestimmungsmethode [3].

## 5 INSTRUMENTE UND ANALYTISCHE METHODEN

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die in Kapitel 4.2.4 beschriebene Derivatisierung von Phenolen zu Ferrocenestern mit anschließender gaschromatographischer Bestimmung. Daher soll in diesem Kapitel kurz die allgemeine Vorschrift zur Derivatisierung erläutert werden. Anschließend wird die eisenselektive Analyse von Ferrocenestern mittels Gaschromatographie und Atomemissionsdetektion (GC-AED) vorgestellt. Die Besonderheiten von Ferrocenestern bei massenspektrometrischer Detektion werden ebenfalls aufgezeigt.

### 5.1 Methode zur Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäurechlorid

Die Derivatisierungsreaktion wird immer ähnlich durchgeführt und variiert nur im Detail. Diese Details für bestimmte Anwendungen werden in den Kapiteln 6, 7.2, 8.2 und 9.1 beschrieben, in denen auch die jeweiligen Probenmengen angegeben sind. Ein allgemeines Schema lautet:

- Probe in 1 - 5 mL Dichlormethan aufnehmen (z.B. 50 – 200 mg Heizöl oder Extrakt aus 3 g Zitrusfruchtschalen)
- Zugabe von 11 mg Ferrocencarbonsäurechlorid (FCC) und 15 mg 4-(*N,N*-Dimethylamino)-pyridin (DMAP), in wenig Dichlormethan gelöst und gemischt (eine bleibende tiefrote Farbe zeigt einen genügenden Überschuss an FCC an)
- 10 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur
- Entfernung überschüssiger Reagenzien auf einer Aluminiumoxid-Minisäule: 1,7 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Dichlormethan eingeschlämmt in einer 3 mL-SPE-Glaskartusche
- Elution der Ferrocencarbonsäureester mit 3 – 5 mL Dichlormethan (polarere Reagenzien verbleiben auf der Säule)
- Das Lösungsmittel durch Einengen im Stickstoffstrom bei 40°C entfernen
- Probe zur gaschromatographischen Analyse in Cyclohexan aufnehmen

## 5.2 Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion im eisenselektiven Modus

Die GC-AED-Analyse von Ferrocenestern nutzt die sehr guten Detektionscharakteristika des des Atomemissionsdetektors (AED) für Eisen eine empfindliche und selektive Analyse aus. Die Nachweisgrenze von Eisen und die Selektivität von Eisen gegenüber Kohlenstoff sind besser als bei allen anderen Elementen, wie in Tabelle 5-1 zu sehen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Nachweisgrenze des verwendeten Geräts auf 0,25 pg/s bestimmt werden (siehe 13.1.2) und lag damit vierfach niedriger als Herstellerangaben.

**Tabelle 5-1: Detektionseigenschaften des GC-AED für einige Elemente (Modell G2350A) [55]**

Element	Wellenlänge [nm]	Nachweisgrenze [pg/s]	Selektivität gegenüber Kohlenstoff
Kohlenstoff	193	6,0	1
Stickstoff	174	4,6	7.000
Chlor	479	14,3	13.000
Phosphor	186	0,5	14.000
Sauerstoff	171	43,4	18.000
Schwefel	181	0,6	37.000
Blei	261	0,8	314.000
Zinn	326	0,4	3.300.000
<b>Eisen</b>	<b>302</b>	<b>0,1</b>	<b>4.600.000</b>

Die Analyten werden im Atomemissionsdetektor (wie in Abbildung 5-1 dargestellt) aus der GC-Säule in ein mikrowelleninduziertes Heliumplasma überführt, dort atomisiert und elektronisch angeregt. Die Lichtemission mit den für jedes Element charakteristischen Wellenlängen wird im Spektrometer auf einem Diodenarray detektiert, so dass elementselektive Chromatogramme erhalten werden. Der Response des AED ist (bei vollständiger Atomisierung) proportional zur Anzahl der Eisenatome und daher unabhängig von der Molekülart. Dieses Charakteristikum des AED bietet die Möglichkeit, dass ein einziger eisenhaltiger interner Standard zur Quantifizierung verwendet werden kann. Empfohlen wird jedoch, dass aufgrund von Abweichungen vom idealen Verhalten der Standard chemisch dem Analyten möglichst ähnlich sein sollte. Die für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräteparameter sind im Anhang zusammengefasst.

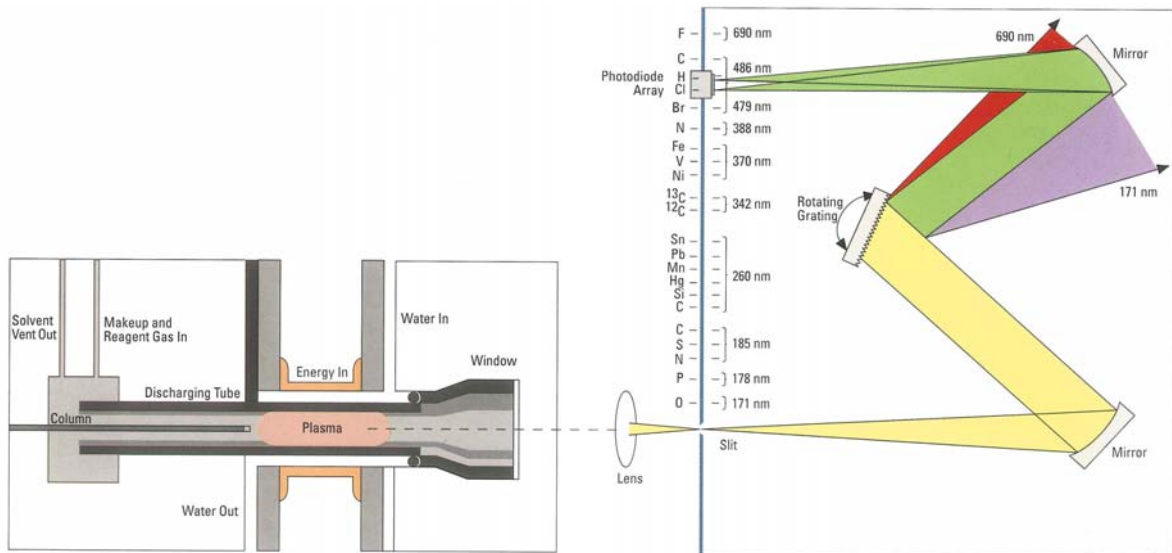


Abbildung 5-1: Schema des Atomemissionsdetektors (AED) [56]

### 5.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie von Ferrocenestern

Der Vorteil der Derivatisierung in Verbindung mit GC-MS-Analyse ist die in Abbildung 5-2 dargestellte charakteristische Fragmentierung der Ferrocenester [57]. Alkohol- und Phenolester können so selektiv nebeneinander in einem GC-Lauf analysiert werden. Phenolferrocenester produzieren die Fragmente  $m/z$  213 (Hauptfragment, Ferrocen-carbonylkation), 185 (Ferrocenkation) und 129 (vermutlich Dicyclopentadienykation). Alkoholester gehen dagegen eine McLafferty-Umlagerung ein und produzieren ausschließlich das Fragment  $m/z$  230 (Ferrocencarbonsäurekation). So können phenol- oder alkoholelektive Chromatogramme durch Auswahl der entsprechenden Massenspuren aus einem „full scan“ GC-MS-Experiment generiert oder als charakteristische Ionen für „selected ion monitoring“-Messungen (SIM) verwendet werden. Eine noch größere Selektivität der Analyse ist möglich, wenn die Fragmentierungen  $M^+ \rightarrow 213$  und  $M^+ \rightarrow 230$  für Tandem-MS-Experimente verwendet werden. Die für GC-MS-Analysen verwendeten Geräteparameter sind ebenfalls im Anhang aufgeführt.

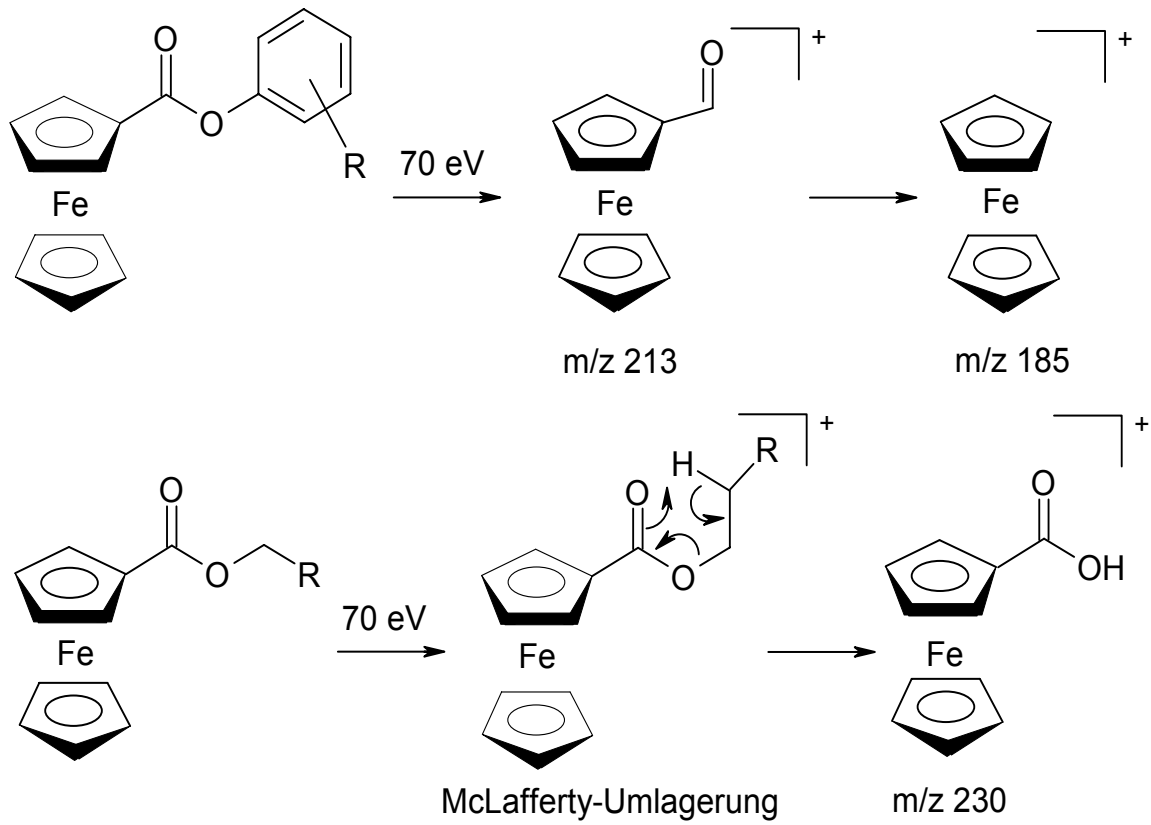


Abbildung 5-2: Fragmentierung von Phenol- und Alkoholferrocenestern im GC-MS (EI-Ionisierung)

## 6 OPTIMIERUNG DER DERIVATISIERUNG

Die Derivatisierungsreaktion mit FCC in Gegenwart von DMAP verläuft schnell und quantitativ für sterisch nicht zu anspruchsvolle Phenole. Für Alkohole kann hingegen keine vollständige Veresterung erreicht werden (primäre Alkohole reagieren zu 50-70%, tertiäre praktisch gar nicht). Größere *ortho*-Substituenten (z.B. *tert*-Butyl) an Phenolen sind ebenfalls problematisch, so dass die Entwicklung eines effektiveren Reagenzes für die Analyse dieser Substanzen notwendig ist. Im folgenden Kapitel werden verschiedene alternative ferrocenbasierte Reagenzien inklusive ihrer Synthese vorgestellt und auf ihre Eignung zur quantitativen Derivatisierung überprüft. Das Augenmerk soll vor allem auf einem geringeren sterischen Anspruch des Derivatisierungsreagenzes liegen.

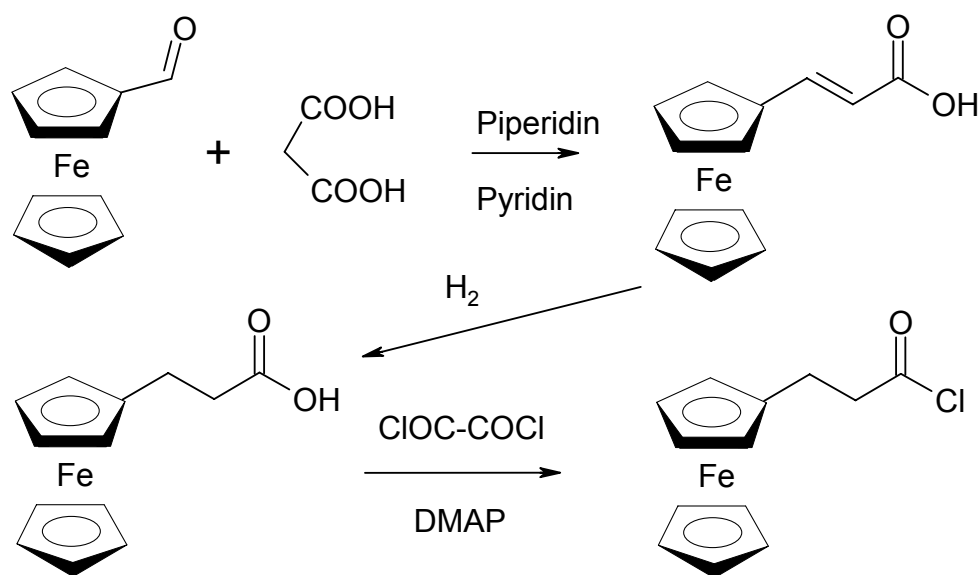
Ebenfalls Thema dieses Kapitels ist die Entwicklung einer Derivatisierungsmethode für Phenole basierend auf kommerziell erhältlichen Reagenzien. FCC muss in einer (wenn auch einfachen) Synthese aus Ferrocencarbonsäure hergestellt werden, was der Anwendung der Analysenmethode in Routinelabors ohne Synthesemöglichkeiten entgegensteht. Daher wurden verschiedene, aus der Organischen Chemie bekannte Veresterungsreaktionen bezüglich ihrer Anwendbarkeit zur analytischen Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure untersucht. Wichtig war hier eine möglichst quantitative Ausbeute der Ester im analytischen Maßstab mit Spuren Mengen der Alkohole und Phenole. Die Reaktion sollte zudem möglichst schnell verlaufen und einfach im analytischen Labor durchführbar sein.

Zur Evaluierung der Reaktionen wurden mehrere Phenole mit und ohne *ortho*-Substituenten, sowie primäre und sekundäre Alkohole als Modellsubstanzen eingesetzt. Die Bestimmung der Derivatisierungsausbeuten erfolgte jeweils über eine GC-AED-Analyse und über Peakflächenvergleich mit den internen Standards 2-Fluorphenolferrocenester (2FPE) oder 4-Fluor-2-methylphenolferrocenester (4F2MPE).

### 6.1 Synthese von Ferrocenpropionsäurechlorid und Derivatisierungstests

Ferrocenpropionsäurechlorid (FPC) besitzt eine Ethanobrücke mehr als FCC, wodurch der Abstand zwischen Ferrocenrest und der Säurechloridfunktion größer ist. Erwartet wird daher eine geringere sterische Hinderung, die zu einem besseren Umsatz sterisch anspruchsvoller Phenole und Alkohole führen könnte. Das Derivatisierungsreagenz FPC

muss allerdings in drei Stufen synthetisiert werden (siehe Abbildung 6-1). Die Darstellung der Ferrocenpropionsäure aus Ferrocencarbaldehyd und Malonsäure mit anschließender Hydrierung ist im Anhang (13.2.4) beschrieben. Die Ferrocenpropionsäure wurde dann analog zur FCC-Synthese (Anhang, 13.2.1) in Cyclohexan mit 30%igem Überschuss an Oxalylchlorid in Cyclohexan zum Chlorid umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Pentan erhält man einen braun-gelben Feststoff (für Ausbeuten und analytische Daten siehe ebenfalls Anhang 13.2.4).

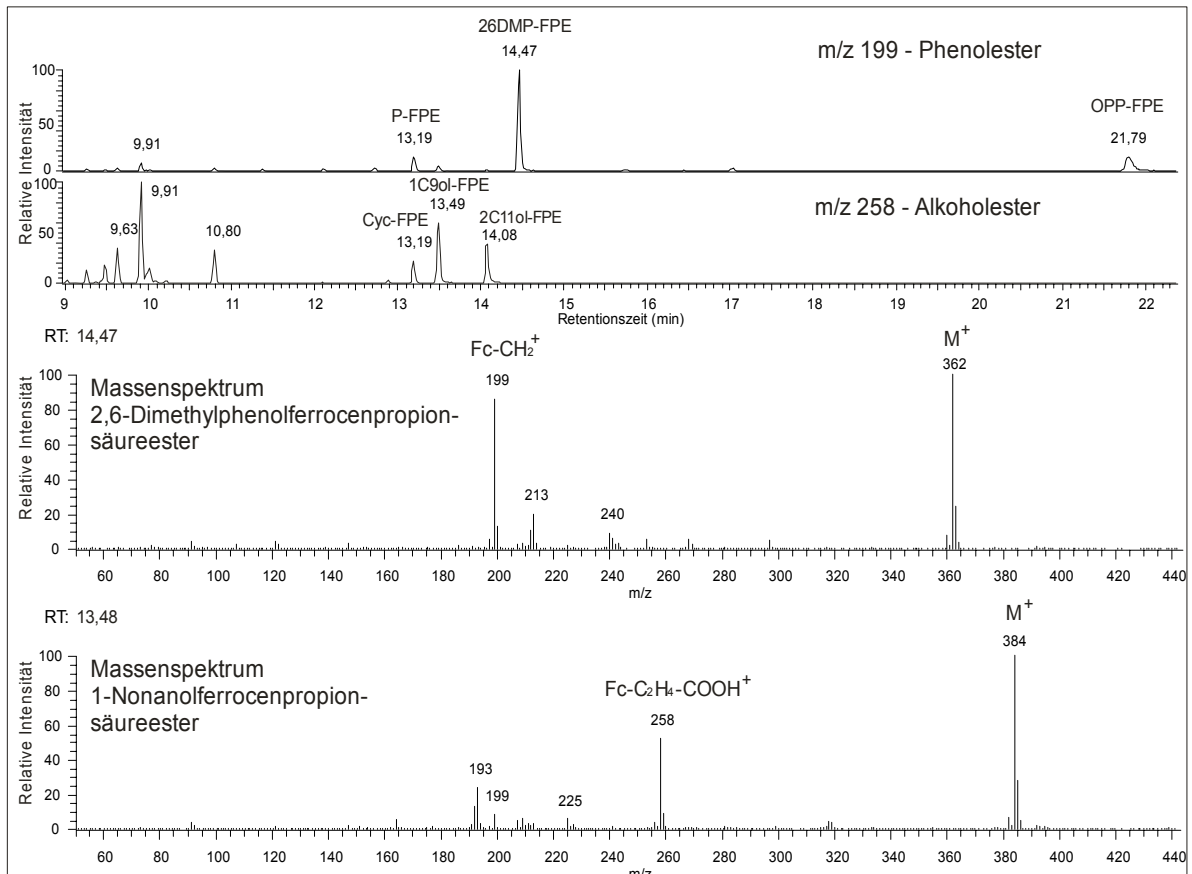


**Abbildung 6-1: Synthese von Ferrocenpropionsäurechlorid**

Als Test zur Eignung von FPC als Derivatisierungsreagenz wurde eine Mischung aus Modellsubstanzen mit FPC und DMAP umgesetzt, analog zu der in Kapitel 5.1 beschriebenen FCC-Derivatisierung. Es wurden 100  $\mu$ L Modellsubstanzenmix (bestehend aus je 100  $\mu$ M Phenol, 2-Ethylcyclohexanol, 2,6-Dimethylphenol, 1-Nonanol, 2-Undecanol und 2-Phenylphenol in Toluol) in 1 mL Dichlormethan mit ca. 13 mg FPC und 15 mg DMAP derivatisiert. Reagenzienüberschüsse wurden nach 10 Minuten auf einer Aluminiumoxid-Minisäule (siehe Kapitel 5.1) entfernt und die Ferrocenpropionsäureester wurden mit 5 mL Dichlormethan eluiert.

Ferrocenpropionsäurechlorid reagierte prinzipiell wie Ferrocencarbonsäurechlorid mit Phenolen und Alkoholen. Mittels GC-MS wurden ebenfalls charakteristische Fragmentierungen für die unterschiedlichen Ester erhalten (siehe Abbildung 6-2): das Fragment  $m/z$  258 bei Alkoholestern, was dem Ferrocenpropionsäurekation entspricht (wahrscheinlich Fe(II) zu Fe(III) oxidiert), und  $m/z$  199 bei Phenolestern, was Ferrocen-CH<sub>2</sub><sup>+</sup> entspricht. Die unterschiedliche Fragmentierung der Alkonol- und

Phenolderivate von FPC kann wie bei Ferrocencarbonsäureestern durch McLafferty-Umlagerung des Molekularions erklärt werden, welche nur bei Alkylestern möglich ist (siehe Kapitel 5.3). Die Retentionszeiten verlängern sich durch die zusätzliche Ethanobrücke bei Alkoholen etwas stärker als bei Phenolen (etwa 1 – 2 min unter den gewählten Bedingungen) gegenüber FCC-Derivaten.



**Abbildung 6-2: GC-MS Chromatogramm und Massenspektren von mit FPC derivatisierten Testsubstanzen – Phenol- und Alkoholester zeigen charakteristische Fragmentierungen (Abkürzungen werden im Anhang erläutert)**

Das Ergebnis der Derivatisierungstests war eine quantitative Derivatisierung der beiden untersuchten Phenole 2,6-Dimethylphenol und *o*-Phenylphenol in 1 mL Dichlormethan. Phenolester und 2-Ethylcyclohexanolester koeluierten auf beiden verwendeten GC-Phasen (DB5 und DB17), so dass diese Modellsubstanzen nicht quantitativ auswertbar waren. Die Alkohole Undecanol und Nonanol wiesen Derivatisierungsausbeuten von 18-58% (2-Undecanol) und 40-87% (1-Nonanol) auf. Diese Ausbeuten waren ähnlich oder besser als bei Verwendung von FCC, aber sehr schlecht reproduzierbar. Ein weiterer Versuch der Derivatisierung der problematischen sekundären Alkohole Cyclohexanol und 1-Phenyl-2-propanol (ebenfalls 100  $\mu$ L einer 100  $\mu$ M-Lösung) ergab mit beiden Reagenzien Derivati-



sierungsausbeuten zwischen 3 und 11%. Dabei veresterte FCC Cyclohexanol besser als FPC, während Phenylpropanol durch FPC etwas leichter verestert wurde.

Eine bessere Veresterung von sekundären Alkoholen durch FPC war also nicht in jedem Fall gegeben. Die Derivatisierung funktionierte in wenig Dichlormethan (1 mL) deutlich besser als in verdünnter Lösung (5 mL) und nur mit frisch hergestelltem FPC, da sich FPC unter Lufteinfluss leichter als FCC zu einem grünlichen Zersetzungsprodukt zersetzte, welches unreaktiv ist. Ein weiteres Problem war die ungenügende Reinheit des FPC. Außer den gewünschten Ferrocenestern waren in den Chromatogrammen immer Blindpeaks, zum Teil in gleicher Größenordnung wie die Analytpeaks, zu erkennen. Hier müssten Syntheseeedukte oder die Zwischenstufen aufgereinigt werden, um ein in der Routineanalytik einsetzbares Derivatisierungsreagenz zu erhalten. Insgesamt sind die erreichbaren Unterschiede in der Derivatisierungseffektivität nicht so groß, dass sie den höheren Synthese- und Aufreinigungsaufwand für FPC rechtfertigen würden. Daher wurden keine weiteren Versuche zur Reinigung des FPC und zur Optimierung der FPC-Derivatisierung unternommen.

## 6.2 Synthese von Ferrocenpropionsäureanhydrid

Ferrocenpropionsäureanhydrid besitzt wie FPC eine Ethanobrücke zwischen Ferrocen und Säurefunktion und könnte so ebenfalls eine verminderte sterische Hinderung bei der Reaktion mit Alkoholen und Phenolen aufweisen. Ferrocenpropionsäureanhydrid wurde bereits von Eckert [58] als Derivatisierungsreagenz für Peptide eingesetzt. Um die Anwendbarkeit als Reagenz für sterisch gehinderte Alkohole und Phenole im analytischen Maßstab zu überprüfen, wurde das Anhydrid aus Ferrocenpropionsäure hergestellt.

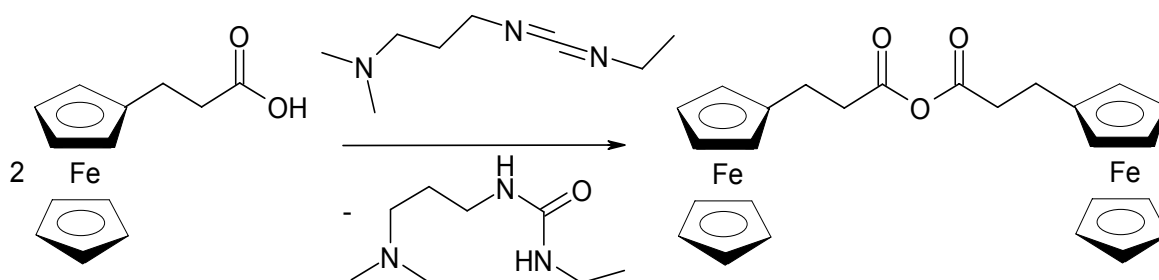


Abbildung 6-3: Synthese von Ferrocenpropionsäureanhydrid

Eine Synthese wurde von Eckert [58] beschrieben, konnte allerdings in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Daher wurde statt des von Eckert verwendeten Dicyclohexylcarbodiimid das 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid (1,1 mmol) in trockenem

Toluol unter Stickstoff zur vorgelegten Ferrocencarbonsäure (1 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 20 h gerührt. Nach Aufreinigung über eine Kieselgelsäule wurde eine geringe Menge des Anhydrids erhalten (identifiziert über ESI-MS/MS;  $M^+$  498, Fragmente  $m/z$  258 (Säurekation), 147, 121). Als Nebenprodukt entstand in großen Mengen das Ferrocenpropionamid des Harnstoffderivats des eingesetzten Carbodiimids ( $M+H^+$  414) neben weiteren unidentifizierten Substanzen. Das gewünschte Anhydrid war zudem mit einer unbekannt Substanz verunreinigt und zersetzte sich bei weiteren Aufreinigungsversuchen zu Ferrocenpropionsäure. Ein derart instabiles Derivatisierungsreagenz ist nicht für Routineanalysen einsetzbar. Deshalb wurden keine weiteren Synthesversuche unternommen.

### 6.3 Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure und 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid

Von Shiina [59] wurde ein neuer Weg zur Synthese von Carbonsäureestern aus der freien Säure beschrieben, welcher bei Raumtemperatur zur fast quantitativen Umsetzung von einigen untersuchten Carbonsäuren mit Alkoholen führte. Ferrocencarbonsäure und das verwendete Kupplungsreagenz 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid sind zudem kommerziell erhältlich. Es wurde daher evaluiert, ob sich diese Reaktion zur Derivatisierung von Alkoholen und Phenolen mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Reagenzien eignet. Die Carbonsäure wird dabei zunächst unter basischen Bedingungen durch 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid in ein gemischtes Anhydrid überführt, welches dann *in situ* mit Alkoholen oder Phenolen zu den entsprechenden Carbonsäureestern weiter reagiert. Dabei ist die elektronenziehende Nitrogruppe des Anhydrids für einen hohen Umsatz nötig, während die 2,6-Substitution durch sterische Hinderung die Bildung ungewünschter Nitrobenzoesäureester unterdrückt.

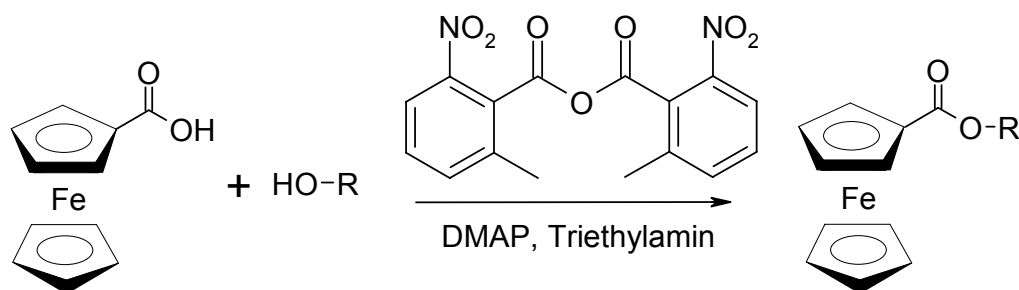
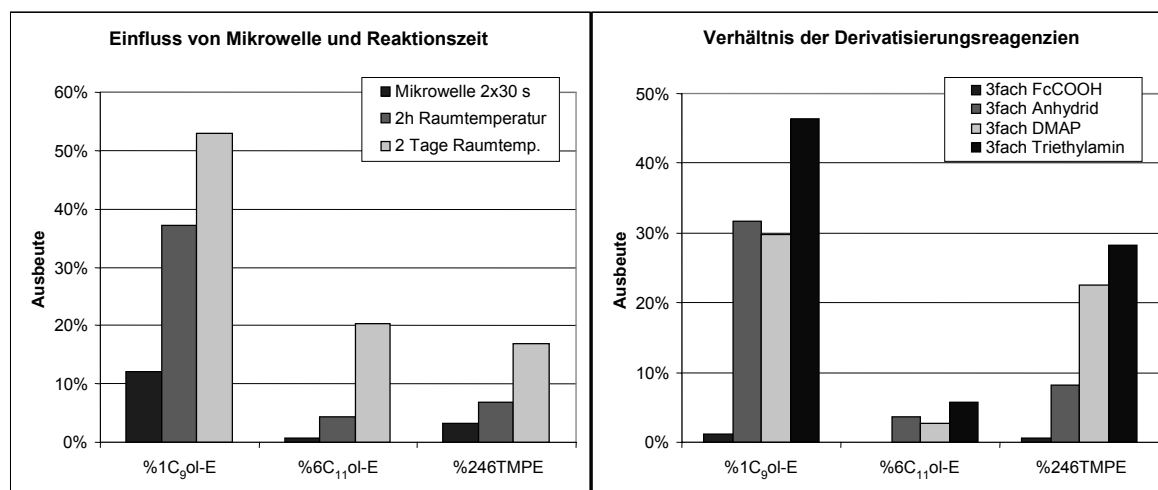


Abbildung 6-4: Derivatisierungsreaktion mit 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid

Die Methode ist als präparative Methode veröffentlicht und wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit hohen Konzentrationen an Modellsubstanzen (je 0,2 mmol 1-Nonanol, 6-Undecanol, 2-Ethylcyclohexanol und 2,6-Dimethylphenol) untersucht. Das Reaktionsgemisch mit Ferrocencarbonsäure (FcCOOH, 0,24 mmol), Anhydrid (0,24 mmol), DMAP (0,02 mmol) und Triethylamin (0,65 mmol) wurde 20 Stunden in Dichlormethan bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Waschen mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung und Rückextraktion der wässrigen Phase mit Dichlormethan. Die Derivatisierungsausbeuten betragen ca. 40% für 2-Ethylcyclohexanol, 100% für 2,6-Dimethylphenol, 90% für 1-Nonanol und 45% für 6-Undecanol und waren damit auch für sekundäre Alkohole vergleichsweise gut.

Im analytischen Maßstab von 30 nmol lagen die Derivatisierungsausbeuten aber deutlich unter 50%, so dass Optimierungsbedarf bestand. Das Ausschütteln war zeitintensiv und verursachte hier Analytverluste: In einer getrennt analysierten dritten Rückextraktion der wässrigen Phase wurden erhebliche Mengen der Analytester gefunden (bis zu 7% der zugegebenen Analytmenge). Stattdessen wurde eine Aluminiumoxid-Minisäule (siehe Kapitel 5.1) zur Abtrennung überschüssiger Reagenzien und Nebenprodukte verwendet. Zur weiteren Optimierung wurde der Einfluss der Reaktionszeit untersucht, sowie überprüft, ob ein Erhitzen in der Mikrowelle die Ausbeuten verbessert. Außerdem wurden die Reagenzienüberschüsse erhöht.



**Abbildung 6-5:** Einfluss der Reaktionsbedingungen (links) und der Reagenzienmengen (rechts) auf die Ausbeuten bei Derivatisierung mit 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid (Abkürzungen werden im Abkürzungsverzeichnis erläutert)

Wie in Abbildung 6-5 zu sehen, verlief die Reaktion recht langsam und wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle nicht beschleunigt. Höhere Basenmengen erhöhten die Esterausbeuten, während die Erhöhung der Ferrocencarbonsäuremenge schlechtere Ausbeu-

ten verursachte (wahrscheinlich durch Verringerung des pH-Wertes). Mit optimierten Reagenzienmengen von 10  $\mu\text{mol}$   $\text{FcCOOH}$ , 30  $\mu\text{mol}$  Anhydrid und je 100  $\mu\text{mol}$  der Basen DMAP und Triethylamin konnten die Modellverbindungen 1-Nonanol, 6-Undecanol, 2,4,6-Trimethylphenol und 2-Phenylphenol zu ca. 50% umgesetzt werden. Für 6-Undecanol ist die Derivatisierungsausbeute deutlich besser als bei Verwendung von FCC, allerdings funktioniert die Derivatisierung besonders von *o*-Phenylphenol deutlich schlechter. Eine Optimierung zu annähernd quantitativer Umsetzung ließ sich nicht erzielen, weshalb weitere Derivatisierungsvarianten getestet wurden.

## 6.4 Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure und Carbodiimiden

Carbodiimide werden in der Synthese außer zur Darstellung von Anhydriden häufig zur Kupplung von Alkoholen oder Phenolen mit Carbonsäuren eingesetzt. Sie wirken dehydrierend, da sie mit Wasser stabile Harnstoffderivate bilden können und so das Reaktionsgleichgewicht der Veresterung auf die Seite der Produkte verschieben. Im synthetischen Maßstab werden mit Carbodiimiden im Eintopfverfahren häufig quantitative Ausbeuten der Ester erreicht. Die Reaktion verspricht daher auch im analytischen Maßstab eine erfolgreiche Derivatisierung. Zudem sind verschiedene Carbodiimide ebenso wie die Ferrocencarbonsäure kommerziell erhältlich, so dass auf eine vorgeschaltete Synthese des Derivatisierungsreagenzes verzichtet werden kann.

### 6.4.1 Dicyclohexylcarbodiimid

In einer Arbeit von Neises [60] konnten Phenole mit Carbonsäuren unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Katalyse durch DMAP in guten Ausbeuten verestert werden. Es wurden 3-10 mol-% DMAP bei Ansätzen von 10 mmol vorgeschlagen. Die Aufarbeitung erfolgte durch Waschen mit Salzsäure und Natriumhydrogencarbonatlösung nach Abfiltrieren des ausgefallenen Harnstoffderivats.

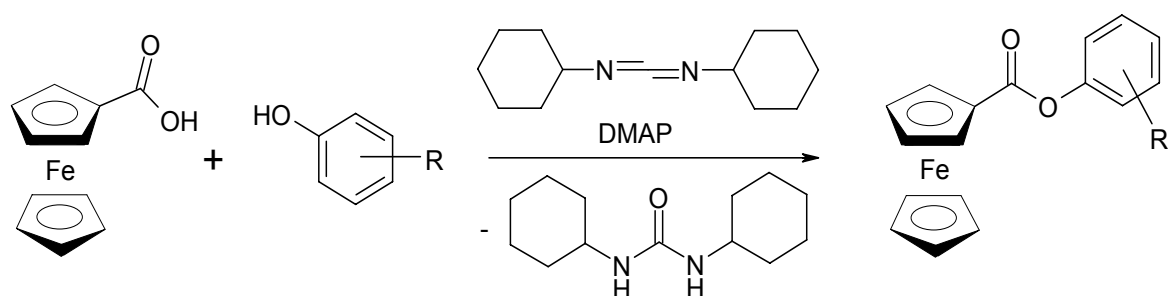


Abbildung 6-6: Derivatisierung von Phenolen mit Ferrocencarbonsäure und DCC

Es wurde direkt ein Ansatz von 10  $\mu\text{mol}$  zur Evaluierung gewählt, da sich der präparative Maßstab bei der Derivatisierung in Kapitel 6.3 als nicht repräsentativ für die analytische Anwendbarkeit heraus gestellt hatte. Außerdem wurde die Menge an DMAP gegenüber [60] erhöht und das aufwändige und für kleine Mengen verlustträchtige Ausschütteln durch die übliche Aluminiumoxidsäule ersetzt. Diese sollte sowohl das Harnstoffderivat als auch überschüssige Ferrocencarbonsäure und DMAP entfernen.

Es stellte sich allerdings heraus, dass das Cyclohexylamid der Ferrocencarbonsäure in großen Mengen als Nebenprodukt entstand. Dieses wurde mittels GC-MS über den  $\text{M}^+$ -Peak ( $m/z$  311) und das Fragment mit  $m/z$  229 identifiziert, welches durch Abspaltung des Cyclohexylringes entstand. Das Amid wurde zwar auf der Aluminiumoxidsäule retardiert, brach aber teilweise durch und störte damit die gaschromatographische Analyse. Die Ferrocenesterausbeuten betrugen auch bei großen Reagenzienüberschüssen nur 20 bis 65%. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, sondern es wurde ein weiteres Carbodiimid als Kupplungsreagenz untersucht.

#### 6.4.2 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid

Das Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid) wirkt als Kupplungsreagenz ähnlich wie DCC. Es besitzt jedoch eine Aminofunktion und liegt in Lösung teilweise cyclisiert vor (siehe Abbildung 6-7), weshalb es eine etwas andere Reaktivität als DCC aufweist. Daher wurde erwartet, dass sich ein günstigeres Verhältnis von gewünschten Estern zu Amid-Nebenprodukt bilden sollte.

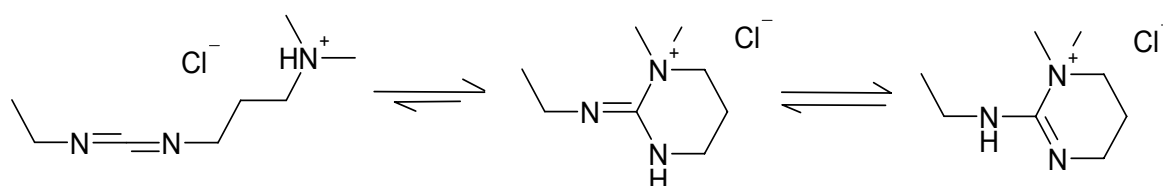
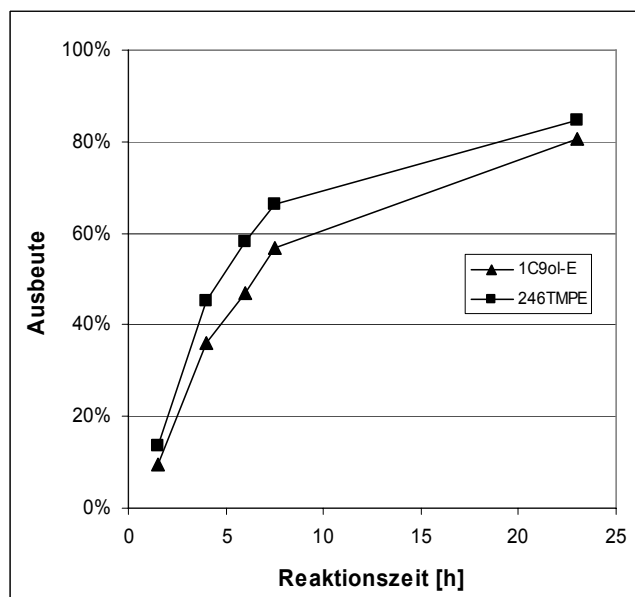


Abbildung 6-7: Tautomere Formen von EDC

Zur ersten Evaluierung wurden semipräparative Mengen von je 3  $\mu\text{mol}$  der Modellverbindungen 1-Nonanol, 6-Undecanol und 2,4,6-Trimethylphenol mit 15,4 mg EDC (80  $\mu\text{mol}$ ), 14,2 mg  $\text{FcCOOH}$  (62  $\mu\text{mol}$ ) und 17 mg DMAP (149  $\mu\text{mol}$ ) in 2 mL Dichlormethan verestert, wobei 4F2MPE (1,8  $\mu\text{mol}$ ) als interner Standard zugegeben wurde. Die Umsetzungen waren weitaus besser als mit DCC und das störende Amid entstand in

deutlich geringerem Ausmaß. Außerdem zeigte das Amid eine höhere Polarität als Cyclohexylferrocenamid, so dass es besser auf der Aluminiumoxidsäule abgetrennt werden konnte. Zur Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde immer wieder ein Tropfen der bei Raumtemperatur gerührten Reaktionsmischung entnommen und analysiert. Die Ausbeuten der Ester bezogen auf den internen Standard sind in Abbildung 6-9 dargestellt. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur relativ langsam, so dass die Reaktionsmischung mindestens über Nacht gerührt werden musste.



**Abbildung 6-8: Reaktionsverlauf der Derivatisierung mit EDC/ FcCOOH im semipräparativen Maßstab bei Raumtemperatur - Ausbeuten der Ferrocenester von zwei Modellverbindungen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit**

Zur Übertragung auf den analytischen Maßstab wurde die Derivatisierungsreaktion mit geringeren Alkohol-/Phenolmengen (7 bis 10 nmol) und ähnlichen Reagenzienmengen wiederholt. Ein Ansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann über die Aluminiumoxidsäule aufgereinigt, da eine Derivatisierung über Nacht als nicht routinemäßig anwendbar erschien. Ein paralleler Ansatz wurde dagegen zwei Mal für eine Minute in der Mikrowelle aufgeheizt und dann direkt auf die Säule gegeben. Dabei konnte aufgrund des geringen Siedepunktes von Dichlormethan nicht länger als eine Minute erhitzt werden, ohne ein Austreten der Lösung aus dem verschraubten Vial zu riskieren. Auffällig war, dass sich die gelbliche Reaktionsmischung in der Mikrowelle tiefrot verfärbte. Die Derivatisierungsausbeuten sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

Tabelle 6-1: Ausbeuten der Derivatisierung mit EDC/FcCOOH im analytischen Maßstab

Ausbeuten [%]	1C <sub>9</sub> ol-E	6C <sub>11</sub> ol-E	246TMPE	OPPE
Mikrowelle	90%	34%	91%	84%
2 h rühren bei Raumtemperatur	40%	4%	37%	78%

Die Mikrowelle hatte hier also einen großen Einfluss auf die Reaktionsausbeuten, anders als bei der Veresterung mit FCC. Auch nach kurzen Reaktionszeiten waren die Derivatisierungsausbeuten nach Erhitzen in der Mikrowelle gut. Die rote Färbung scheint ein Indikator für die Bildung eines reaktiven Intermediats und damit für eine erfolgreiche Umsetzung zu sein. Auch die Ausbeuten ohne Mikrowelle waren besser als beim ersten Versuch mit größeren Mengen, was für eine gute Anwendbarkeit der Methode für Spurenanalysen spricht. Zur weiteren Optimierung wurden die Verhältnisse der Reagenzien zueinander variiert, wie in Abbildung 6-9 dargestellt.

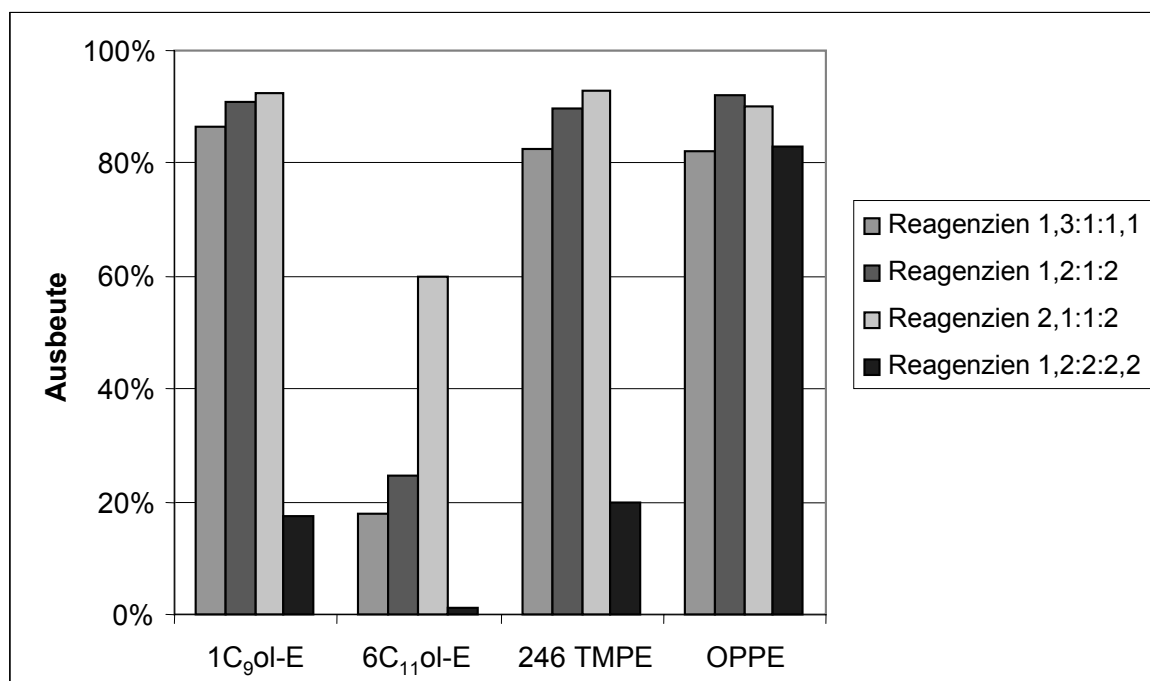


Abbildung 6-9: Derivatisierungsausbeuten bei Variation der Reagenzienverhältnisse EDC:FcCOOH:DMAP - hohe Ausbeuten bei großen DMAP- und EDC-Mengen

Sowohl die Erhöhung der DMAP- als auch der EDC-Menge verbesserte die Ausbeuten weiter, während eine Erhöhung der FcCOOH-Menge (wie auch in Kapitel 6.3) einen negativen Einfluss hatte. Ein Reagenzienverhältnis von etwa 2 EDC : 1 FcCOOH : 2 DMAP war optimal. Weitere Tests zeigten, dass neben den gewählten Modellverbindungen auch 4-

Methyl-, 4-Ethyl-, 2-Isopropyl- und 3-*n*-Propylphenol mit guten Ausbeuten verestert wurden. Nur für das stark sterisch gehinderte 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol lag die Derivatisierungsausbeute mit 12 bis 20% deutlich unter der mit FCC (48 – 51%).

Um zu überprüfen, ob sich diese optimierte Derivatisierung auch für Realproben eignet, wurde ein Heizöl mit 210 ppm Schwefelgehalt (nähere Angaben zur Probe siehe Kapitel 9) vergleichend mit EDC/FcCOOH und mit der üblichen Derivatisierung mit FCC verestert. Für beide Derivatisierungen wurden 100 µL Heizöl (86,8 mg) in 2 mL Dichlormethan gelöst. Zur EDC/FcCOOH-Derivatisierung wurden die optimierten Reagenzienmengen verwendet: 24 mg (130 µmol) EDC, 12 mg (50 µmol) FcCOOH und 16 mg (130 µmol) DMAP. Die Reaktionsmischung wurde zwei Mal je eine Minute in der Mikrowelle erhitzt, während die FCC-Derivatisierung bei Raumtemperatur mit üblichen Mengen (12 mg FCC, 15 mg DMAP) stattfand. Die erhaltenen Gehalte nach FCC-Analyse stimmten mit denen dreier älterer Analysen desselben Heizöls überein. Daher wurden die Ergebnisse aller vier Analysen nach FCC-Derivatisierung zusammengefasst, so dass Mittelwerte und relative Standardabweichungen berechnet werden konnten.

**Tabelle 6-2: Phenolgehalte im Heizöl S210 - Vergleich der Derivatisierungsmethoden**

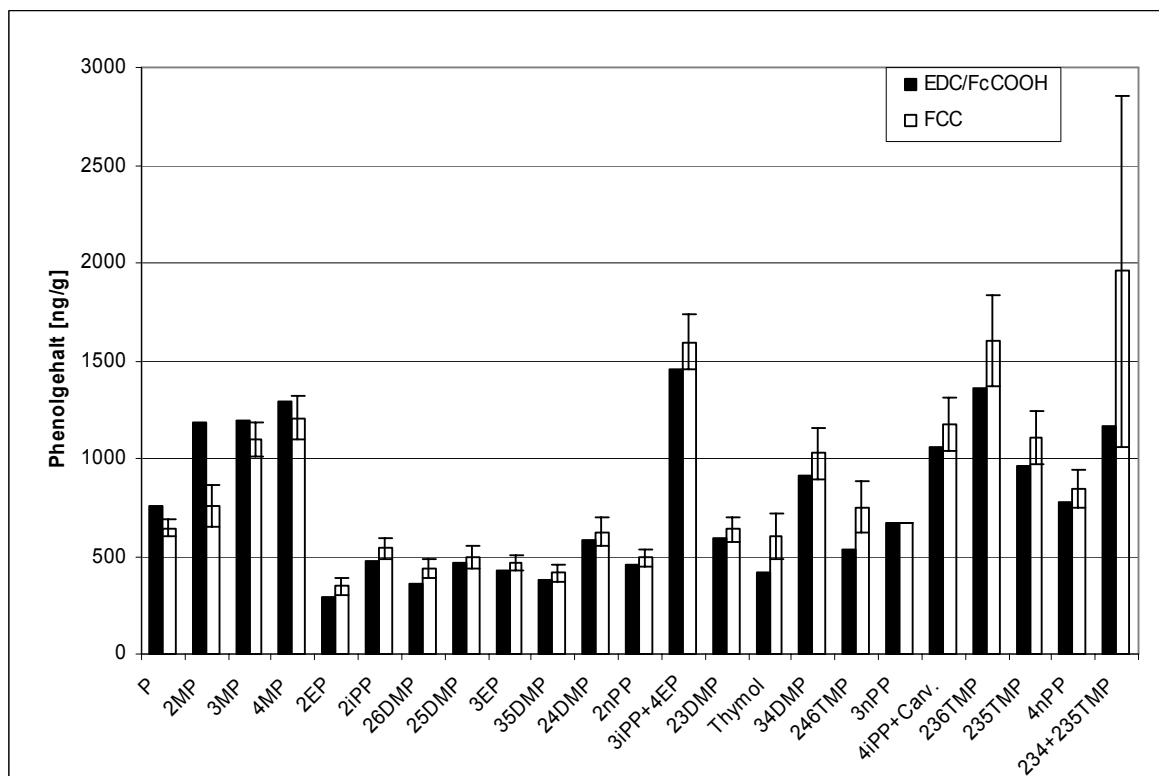
	EDC/FcCOOH	FCC (SD, n = 4)
Summe C <sub>0</sub> - bis C <sub>3</sub> -Phenole	17,8 µg/g	18,9 µg/g (± 2,4 µg/g)
Summe C <sub>0</sub> - bis 24DMP	7,4 µg/g	7,0 µg/g (± 0,6 µg/g)
Gesamtphenolgehalt	436 µg/g	500 µg/g (± 38 µg/g)

Die erhaltenen Gesamtphenolgehalte (bestimmt durch Integration über das gesamte Chromatogramm, siehe auch Kapitel 9.2) nach Derivatisierung mit EDC/FcCOOH lagen im Bereich des Mittelwertes der FCC-Analysen ± dessen zweifacher Standardabweichung. Die Abweichung der mit EDC/FcCOOH erhaltenen Summe der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole vom Mittelwert der FCC-Analysen war geringer und lag in der Größenordnung einer Standardabweichung der FCC-Analysen. Noch besser stimmten die Werte überein, wenn nur die relativ gut getrennten Phenole bis zur Retentionszeit des Esters von 2,4-Dimethylphenol berücksichtigt wurden. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich, dass der Integrationsfehler bei den schlechter getrennten, später eluierenden Phenolestern deutlich zunahm und damit die Genauigkeit der Bestimmung abnahm.



Auch die Gehalte der einzeln bestimmten C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole waren mit beiden Derivatisierungsvarianten recht gut vergleichbar, wie in Abbildung 6-10 zu sehen ist. Abgesehen von wenigen Ausnahmen (PE, 2MPE, 26DMP, Thymol) lagen die mittels EDC/FcCOOH bestimmten Gehalte innerhalb des Bereichs der Standardabweichung der mittels FCC bestimmten Gehalte. Die Abweichungen bei einzelnen Phenolen können ebenfalls zufällig bedingt sein, da für die Derivatisierung mittels EDC/FcCOOH aufgrund von zu hohem Aufwand von kompletten Mehrfachanalysen im Verhältnis zum Erkenntnisgewinn keine Standardabweichungen bestimmt wurden.

Im Rahmen der erreichbaren Präzision bei Realproben mit einer Vielzahl nur angetrennter Peaks kann man von einer guten Übereinstimmung der Ergebnisse beider Derivatisierungsmethoden ausgehen. Diese Derivatisierung ist also für die Bestimmung von Phenolen geeignet und anwendbar für Labore ohne Syntheseeinrichtung. Für diese Arbeit war jedoch FCC leicht verfügbar und es war viel Erfahrung mit der FCC-Derivatisierung in den untersuchten Probenmatrixen vorhanden, weshalb FCC auch für die weiteren Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.



**Abbildung 6-10: Einzelne Phenolgehalte im Heizöl S210 nach Derivatisierung mit FCC und mit EDC/FcCOOH (Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung der Analyse)**

## 6.5 Blindwerte

Blindwerte sind grundsätzlich problematisch bei Spurenanalysen und können vielfältige Quellen haben. Sie können durch Lösungsmittel oder Derivatisierungsreagenzien eingeschleppt werden, aus verunreinigten Glasgeräten oder Pipettenspitzen oder auch aus der Laborluft<sup>4</sup> in die Lösung gelangen. Durch die Selektivität des Analysenverfahrens stören nur eisenhaltige, GC-gängige Verbindungen oder mit FCC derivatisierbare Substanzen die Analyse. Dazu zählen prinzipiell alle Verbindungen mit OH-Gruppen sowie eventuell Substanzen mit SH- oder NH-Gruppen.

Blindwertquellen sollten daher durch vergleichende Analysen unter unterschiedlichen Bedingungen (wie durch Verwendung unterschiedlicher Reagenzienchargen) identifiziert werden. Alkylphenolblindwerte aus Kunststoff- und Gummimaterialien sind literaturbekannt [50, 61], weshalb die Verwendung dieser Materialien möglichst vermieden wurde. Sämtliche vor und während der Derivatisierung verwendeten Glasgeräte wurden vor dem Gebrauch über Nacht bei 450°C ausgeheizt und verwendete Lösungsmittel wurden über Aluminiumoxid<sup>5</sup> gereinigt, um eventuell vorhandene derivatisierbare Verunreinigungen zu entfernen.

Zur Überprüfung möglicher Blindwertquellen wurden jeweils Derivatisierungsblindproben analog zu Realproben mit 5 mL Dichlormethan sowie mit 11 mg FCC und 15 mg DMAP durchgeführt. Überschüssige Reagenzien wurden nach 10 min auf einer Aluminiumoxid-Glaskartuschensäule entfernt, bevor die Lösung bei 40 °C im Stickstoffstrom eingengt wurde und die GC-AED-Analyse in Cyclohexan erfolgte. Derivatisierungsreagenzien und Pipettenspitzen wurden einzeln auf ihren Beitrag zu den Blindwerten überprüft und werden im folgenden Kapitel diskutiert. Waren Blindwertpeaks vorhanden, wurde versucht, die Störsubstanzen zu identifizieren und sie möglichst zu entfernen.

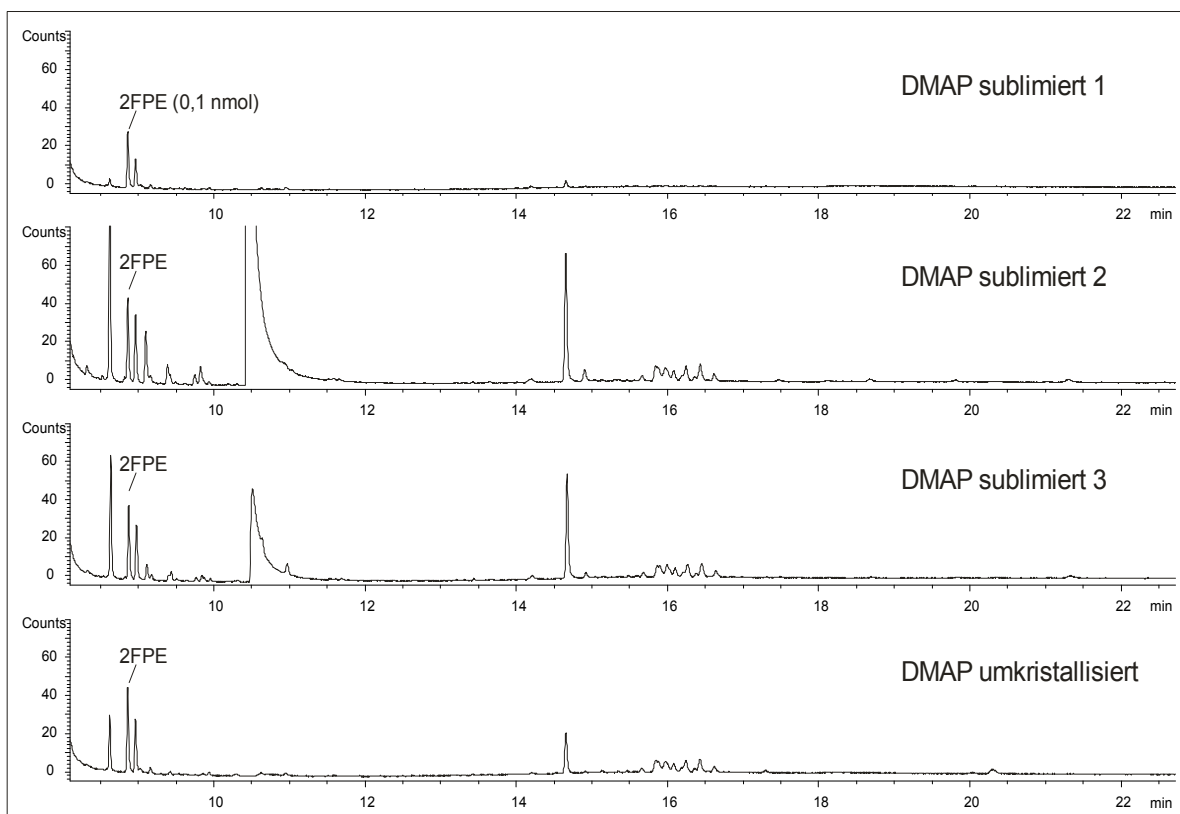
---

<sup>4</sup> In amerikanischen Haushaltsluftproben wurden 4NP, OPP, 4-*tert*-Butylphenol (in allen Proben, Gehalte bis 1µg/m<sup>3</sup>) und teilweise p-Phenylphenol, 2,4-Dichlorphenol und 4-Nitrophenol gefunden [16]

<sup>5</sup> Zur Reinigung wurde eine Säule mit 1cm Durchmesser mit etwa 10 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gefüllt für etwa 100 mL Lösungsmittel verwendet.

### 6.5.1 Blindwerte aus Dimethylaminopyridin

Bei einer Charge DMAP traten große Peaks im eisenselektiven GC-AED-Chromatogramm der Derivatisierungsblindwertprobe auf, wobei besonders ein unbekannter stark tailender Alkohol- oder Phenolesterpeak mit einer Retentionszeit von etwa 10 Minuten auffiel. DMAP lässt sich bei bis zu 90 °C im Vakuum (etwa 0,2 mbar) zu klaren Kristallen sublimieren. In einem ersten Versuch konnte DMAP dadurch effektiv gereinigt werden, wie in Abbildung 6-11 zu sehen ist. Bei weiteren Sublimationsversuchen einer anderen Charge an DMAP unter gleichen Bedingungen war die Reinigung aus unbekanntem Gründen dagegen weniger erfolgreich. Eine doppelte Umkristallisation aus einem Cyclohexan-Dichlormethan-Gemisch erwies sich als effektiver, war allerdings auch deutlich zeitaufwändiger. Verschiedene Chargen an DMAP zeigten deutliche Unterschiede in der Reinheit (obwohl nominell 99%), so dass eine Überprüfung jeder Charge notwendig ist.



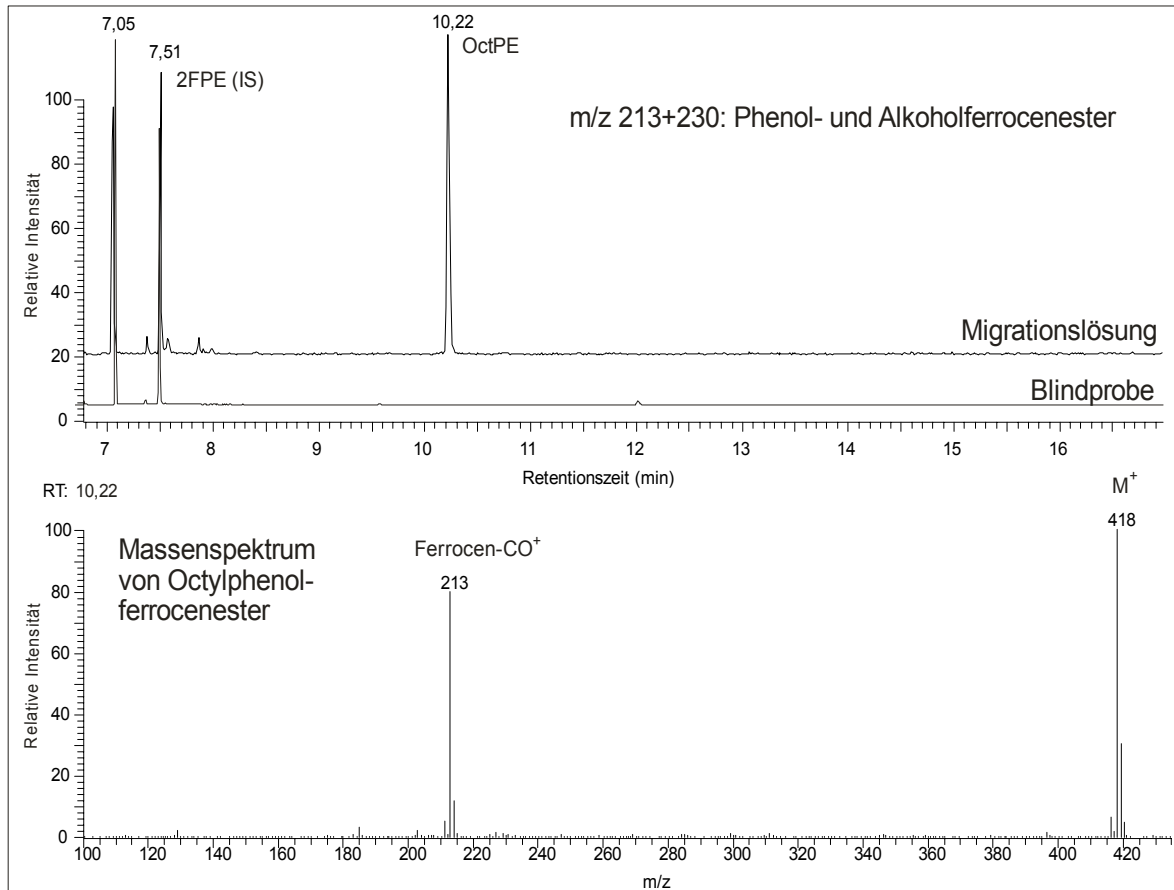
**Abbildung 6-11: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme der Blindwerte verschiedener DMAP-Chargen, bei ansonsten selben Derivatierungsbedingungen**

### 6.5.2 Blindwerte aus Ferrocencarbonsäurechlorid

Routinemäßig wurde nach der Synthese die Reinheit des FCC überprüft, indem 11 mg ohne Zugabe von DMAP auf die Aluminiumoxidsäule gegeben wurden und die eventuell enthaltenen Ferrocenester mit Dichlormethan eluiert und bestimmt wurden. Meistens wurden geringe Mengen an Ferrocen, sowie an Methanol-, Ethanol- und Phenolferrocenester gefunden, die aber üblicherweise nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Das könnte bedeuten, dass das FCC relativ sauber war. Andererseits ist es auch möglich, dass eventuelle Verunreinigungen noch nicht als Ferrocenester vorliegen und erst bei Anwesenheit des Katalysators DMAP verestert werden. Bei Verwendung verschiedener FCC-Chargen wurden teilweise unterschiedlich ausgeprägte Blindwertpeaks erhalten. Eine weitere Überprüfung war hier nicht möglich, da nicht unterschieden werden konnte, ob zusätzliche Störsubstanzen durch DMAP eingeschleppt wurden, oder ob sie zuvor schon unverestert vorlagen und damit in der GC-AED-Analyse nicht auftraten. Für eine vergleichende GC-MS-Analyse waren die Konzentrationen zu gering.

### 6.5.3 Blindwerte aus Pipettenspitzen

Laborverbrauchsmaterialien aus Kunststoff wurden schon in [50] als Quelle für Nonylphenol- und Octylphenolblindwerte identifiziert. Werwein untersuchte in ihrer lebensmittelchemischen Abschlussarbeit [62] die Migration von Phenolblindwerten aus einer Gilson Microman Pipettenspitze in ein Cyclohexan / Toluol-Gemisch (1:1). Sie fand nach 12 h Migrationszeit und anschließender Derivatisierung einen Octylphenolblindwert in der Größenordnung des zugesetzten internen Standards (10 nmol 2FPE, siehe Abbildung 6-12), welcher in einer parallel dazu bearbeiteten Blindwertanalyse von frischem Lösungsmittel nicht enthalten war. Bei kurzer Kontaktzeit zur pipettierten Lösung sollte die Migration aus Pipettenspitzen wesentlich geringer sein. Soweit wie möglich sollte aber bei Ultraspurenanalysen der Einsatz dieser Kunststoffmaterialien vermieden werden.

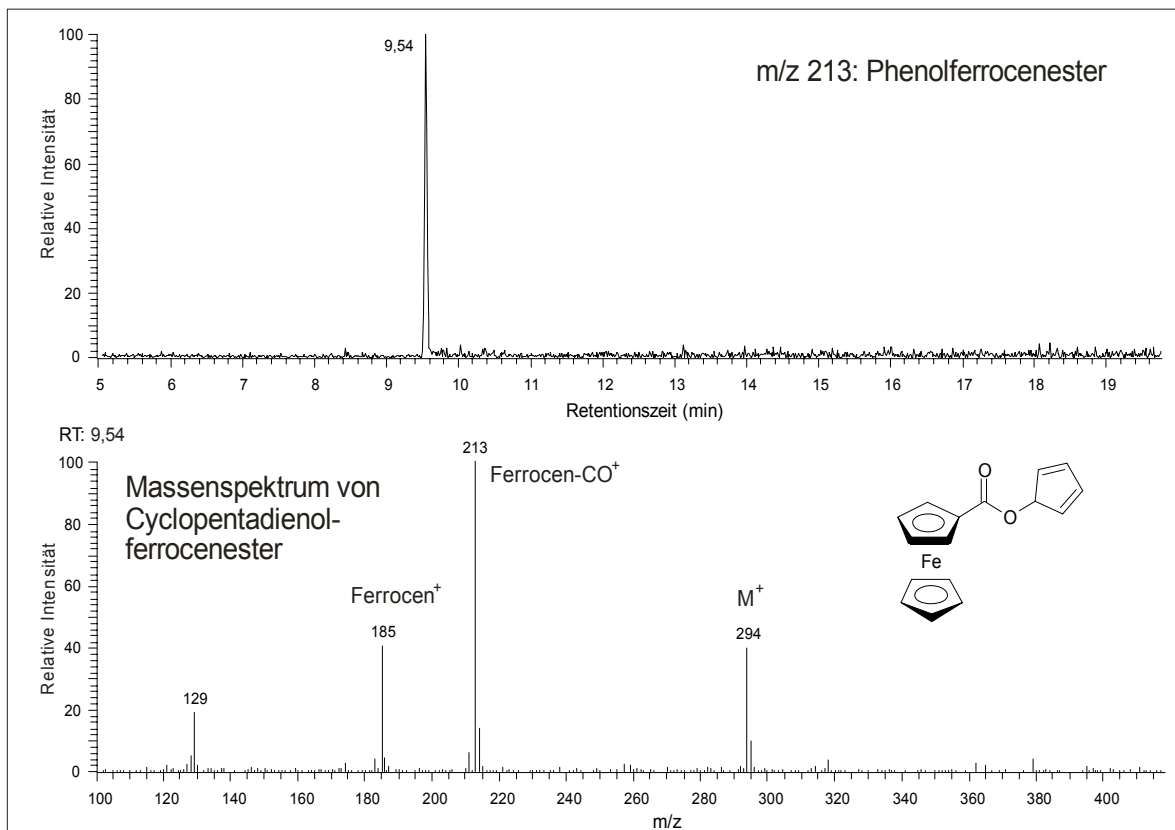


**Abbildung 6-12: GC-MS Chromatogramme der Migrationslösung aus Pipettenspitzen und der zugehörigen Blindprobe (oben) und Massenspektrum des identifizierten Octylphenolesters (unten)**

#### 6.5.4 Identifizierung des Derivatisierungsartefaktes

In Derivatisierungsblindproben und derivatisierten Realproben wurde immer ein großer, Eisen enthaltender Peak mit einer Retentionszeit kurz vor den Phenolferrocenestern gefunden. Die Struktur und Herkunft dieser Verbindung war jedoch bislang ungeklärt.

Die für Phenolferrocenester typische Fragmentierung mit den Ionen der Massen 213, 185 und 129 weist darauf hin, dass sich ein  $\pi$ -System direkt an die Estergruppe anschließt und damit keine McLafferty-Umlagerung möglich ist (siehe Kapitel 5.3).



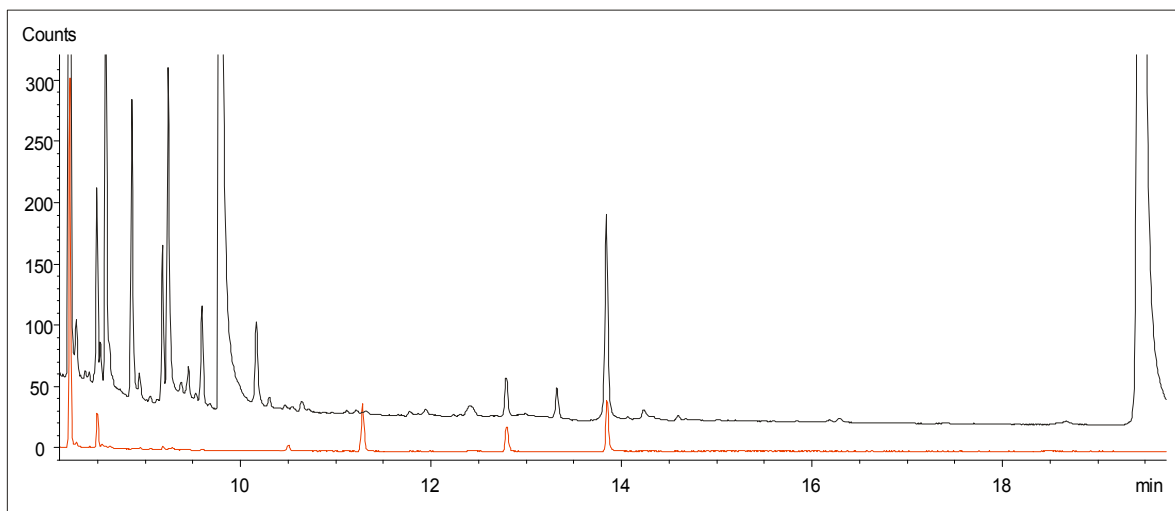
**Abbildung 6-13: GC-MS Chromatogramm (oben) und Massenspektrum (unten) des Derivatisierungsartefaktes Cyclopentadienolferrocenester**

Phenolferrocenester besitzt allerdings eine Molekülmasse von 306 g/mol, während der Molekülionenpeak hier eine Masse von 294 aufweist. Die Massendifferenz von 12 amu deutet auf ein Kohlenstoffatom weniger hin, womit es sich bei der Substanz um Cyclopentadienolferrocenester handeln könnte. Diese Vermutung konnte durch eine TOF-MS-Messung<sup>6</sup> bestätigt werden: Nach ESI-Ionisierung in Methanol erhält man das Natriumaddukt mit der exakten Masse von 317,0225 (theoretisch 317,0236) und einem für Eisen typischen Isotopenmuster, so dass die Summenformel  $C_{16}H_{14}FeNaO_2$  zumindest sehr wahrscheinlich ist. Wie sich dieser Ester bilden könnte oder woher das Cyclopentadienol stammt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Alkylphenolanalysen werden allerdings aufgrund der kürzeren Retentionszeit des Cyclopentadienolesters nicht gestört.

<sup>6</sup> MicroToF (Bruker Daltronics) mit Schleifeneinlass, Organisch Chemisches Institut. Die Massenkalisierung erfolgte unmittelbar vor der Probenmessung an Natriumformiat-Clustern

### 6.5.5 Reproduzierbarkeitsschwierigkeiten aufgrund von Blindwerten

Derivatisierungsblindwerte wurden im Rahmen dieser Arbeit fortlaufend bestimmt, teilweise parallel zu Realproben, teilweise zur Überprüfung der Reinheit verschiedener Chargen an Derivatisierungsreagenzien oder Lösungsmitteln. Dabei wurden allerdings, wie in Abbildung 6-14 dargestellt, mit denselben Chargen an Reagenzien und Lösungsmitteln an unterschiedlichen Tagen teilweise sehr unterschiedliche Blindwerte erhalten. Der Grund dafür konnte nicht geklärt werden. Wahrscheinlich hat die Laborumgebung einen großen und schwer zu kontrollierenden Einfluss. Die Laborluft spielt vermutlich die größte Rolle, da selbst in Haushaltsluftanalysen Alkylphenole gefunden wurden [16]. Ein zur Überprüfung dieser Vermutung im Reinraum durchgeführter Derivatisierungsversuch zeigte allerdings keine verringerten Blindwerte. Reagenzien und Glasgeräte waren allerdings zuvor normaler Laborluft ausgesetzt gewesen, so dass die Kontamination wahrscheinlich vorher stattfand. Die reproduzierbare und zuverlässige Analyse von Ultra-spurenmengen an Phenolen mit der vorgestellten Methode erfordert anscheinend eine reinere Laborumgebung, als für die Durchführung der Analysen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stand.



**Abbildung 6-14: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme von Derivatisierungsblindproben, an verschiedenen Tagen mit den selben Chargen der Reagenzien durchgeführt**

## 6.6 Zusammenfassung

Die Derivatisierung von Phenolen und Alkoholen zu Ferrocenestern war außer mit FCC auch mit Ferrocencarbonsäure und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid in guten Ausbeuten und mit guter Reproduzierbarkeit möglich. Der Arbeits- und Zeitaufwand ist bei beiden Derivatisierungsvarianten ähnlich gering. Bei Verwendung von EDC/FcCOOH sollte allerdings zusätzlich eine Mikrowelle zur Beschleunigung der Reaktion eingesetzt werden. Ferrocencarbonsäure und EDC sind im Gegensatz zu FCC beide kommerziell erhältlich, was die Anwendung dieser Analysemethode in Laboren ohne Synthesemöglichkeiten erleichtert. Die Derivatisierungsausbeuten waren bei beiden Varianten vergleichbar: Phenole wurden quantitativ derivatisiert, während Alkohole unterschiedliche Ausbeuten zeigten. Die Vergleichbarkeit der Derivatisierungsmethoden konnte sowohl anhand von Standards als auch anhand einer Realprobe (Heizöl S210) gezeigt werden.

Andere Kupplungsreagenzien wie das Carbodiimid DCC und 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid konnten sich aufgrund von schlechteren Derivatisierungsausbeuten und der Bildung von Nebenprodukten dagegen nicht als Ersatz für FCC bewähren. Ebenso erwiesen sich Ferrocenpropionsäurebasierte Derivatisierungsreagenzien aufgrund ihrer schwierigeren Synthese und Instabilität als nicht geeignet für die Veresterung von Phenolen und Alkoholen im analytischen Maßstab. Ein für die quantitative Analyse von Alkoholen geeignetes, ferrocenhaltiges Derivatisierungsreagenz bleibt also ein Ziel für die zukünftige Forschung.

Blindwertquellen bei der Analyse konnten durch vergleichende Derivatisierungsblindwertanalysen zum Teil identifiziert und eliminiert werden. So traten in verschiedenen DMAP-Chargen Verunreinigungen auf, die zum großen Teil durch Sublimation oder Umkristallisation beseitigt werden konnten. Außerdem konnte ein Blindwert an Octylphenol aus Kunststoff-Pipettenspitzen identifiziert werden. Für Ultrapurenanalysen akzeptable Derivatisierungsblindwerte konnten aber auch bei Verwendung reiner Chargen an Derivatisierungsreagenzien und sorgfältig gereinigten Lösungsmitteln und Glasgeräten nicht über längere Zeiträume gewährleistet werden. Hier wäre wahrscheinlich eine reinere Laborumgebung während der gesamten Analyse, beispielsweise in einem Reinraum, nötig. Bei den in den Kapiteln 7, 8 und 9 vorgestellten Anwendungen lagen Phenole allerdings in deutlich höheren Konzentrationen vor, deren Bestimmung die beschriebenen Blindwerte bei sauberer Arbeitsweise und regelmäßiger Überprüfung nicht störten.



## 7 o-PHENYLPHENOL AUF ZITRUSFRÜCHTEN

Zitrusfrüchte werden nach der Ernte häufig mit dem Pestizid *o*-Phenylphenol (OPP) behandelt, um sie vor Pilzbefall während Lagerung und Transport zu schützen. Dazu werden die Früchte in OPP-haltige Wasser- oder Wachsbäder getaucht, wodurch die Früchte zusätzlich vor dem Austrocknen geschützt werden und ein attraktiveres Aussehen erhalten sollen. OPP greift hauptsächlich in zentrale Zellvorgänge von Grün- und Blauschimmel verursachenden Pilzen ein und wirkt als Sporulationshemmer [63]. Es ist aber auch gegen andere Mikroorganismen wie Bakterien aktiv. Das Pestizid hat im Tierversuch in hohen Dosen neben anderen Effekten eine potentiell Krebs erzeugende Wirkung gezeigt, wobei die Gefährdung durch geringere Dosen kontrovers diskutiert wird, wie in Kapitel 3.1.2.2 dargelegt wird. Die Verwendung von OPP ist daher gesetzlich geregelt und die Höchstgrenze für Rückstände in der Frucht beträgt in Deutschland 12 µg/g Frucht [1].

OPP auf Zitrusfrüchten wird routinemäßig von Untersuchungsämtern analysiert. Es existiert daher eine Vielzahl an Methoden, welche als Überblick in Tabelle 7-1 zusammengefasst sind. Viele Methoden sind aber zeitaufwändig und benötigen große Probenmengen. Häufig kommt Flüssigchromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (FLD) [39, 64-69] zum Einsatz, aber auch elektrochemische Detektion [70] oder Massenspektrometrie [43] werden angewendet. Weitere Ansätze verwenden Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor [71] oder Massenspektrometrie [63, 72, 73], teilweise nach Derivatisierung, da Phenole underivatisiert zu Tailing neigen.

Häufig sind aufgrund der geringen Selektivität und Empfindlichkeit der Analysenmethoden aufwändige Probenaufreinigungsschritte nötig, um verschiedenste Fruchtkomponenten abzutrennen und um den OPP-Gehalt anzureichern. Dabei kommen Wasserdampfdestillation (mit kombinierter Extraktion in ein organisches Lösungsmittel) [67, 71, 72], Flüssigflüssig-Extraktion (LLE) [63, 68], oder verschiedene Festphasenextraktionstechniken (SPE, SPME, MSPD) zum Einsatz [40, 43, 66].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine schnelle und empfindliche Analysenmethode basierend auf der in Kapitel 5 vorgestellten Derivatisierung zu Ferrocenestern mit anschließender GC-AED- oder GC-MS-Analyse entwickelt und im Journal of Agricultural and Food Chemistry veröffentlicht [74]. Im folgenden Kapitel wird die Methodenentwicklung beschrieben. Anschließend werden Ergebnisse der Validierung und der Analyse von Zitrusfruchtproben vorgestellt.

Tabelle 7-1: Literaturüberblick zur Analyse von OPP in Zitrusfrüchten

Erstautor	Methode	Probenvorbereitung	Zeitbedarf	Nachweis-/Best.-grenze	Wiederfindung, Menge der Dotierung (Analysezahl)	Probenmenge
Gieger [65]	HPLC-FLD	Extraktion, Säulenchromatographie	hoch	50 ppb	91-98%, 0,25 ppm	400 g
Mock [66]	HPLC-FLD	SFE mit CO <sub>2</sub> , SPE	mittel	10 ppb	90-96%, 0,5-5 ppm	2 g
Motohashi [67]	HPLC-FLD	Wasserdampfdestillation/Extraktion	hoch	50 ppb	98-100% (RSD<1%), 1-100 ppm	50 g
Saad [68]	HPLC-FLD	LLE	hoch	5 ppb Standard	84%, 0,5 ppm	25 g
Yamazaki [39]	HPLC-FLD	Extraktion, SPE	hoch	10 ppb Standard	80% (RSD 9%), 0,1 ppm (n=5) 92% (RSD 3%), 10 ppm (n=5)	10 g
Zamora [69]	LC-LC-FLD	Extraktion (verschiedene Lsgm.)	hoch	LOQ 50 ppb Probe	83% (RSD 5%), 50 ppb (n=3) 95% (RSD 1%), 4 ppm (n=3)	10 g
Yang [70]	µHPLC-ECD	Extraktion	mittel	1,4 ppb Standard	99% (RSD 2%), 14-51 ppb (n=5)	1 g
Blasco [43]	LC-MS	MSPD (C <sub>8</sub> )	gering	LOQ 5 ppb	67%+-5, 10 ppb - 10 ppm (n=5)	0,5 g
Wood [71]	GC-FID	Wasserdampfdestillation/Extraktion	hoch	ca. 1 ppm	48% (RSD <sub>R</sub> 40%), 15 ppm (n=21)	300 g
Anastasiades [63]	GC-MS	Extraktion, LLE, GPC	hoch	LOQ 5 ppb	80% (RSD 4%), 0,25 ppm	20 g
Johnson [72]	GC-MS	Wasserdampfdestillation/Extraktion	hoch	LOQ 50 ppb Probe	83-95% (RSD 3-4%), 0,05-5 ppm (n=4-18)	10 g
Yu [73]	GC-MS	Extraktion	hoch	10 ppb Probe	165%+-4, 30 ppb (n=3) 89%+-12, 0,64 ppm (n=3)	50 g
Rodriguez [40]	CE-MS	Extraktion, LLE SPME	hoch	LOQ 1 ppm Probe	60% (RSD 7%), 1 ppm (n=5)	5 g

## 7.1 Methodenentwicklung

Da die Analysenmethode möglichst einfach und schnell durchzuführen sein sollte, wurde bei der Methodenentwicklung besonders auf eine wenig aufwändige Probenvorbereitung geachtet. Da OPP auf die Schale aufgebracht wird, wurden die Früchte zunächst manuell geschält und es wurden üblicherweise nur die Schalen analysiert. OPP migriert nicht nennenswert in das Innere der Frucht (siehe Kapitel 7.4), daher muss das Fruchtfleisch bei der Analyse nicht berücksichtigt werden. Anschließend wurde OPP aus den Schalen extrahiert, wobei das Extrakt wegen der Hydrolyseempfindlichkeit des Derivatisierungsreagenzes FCC nicht zu wasserhaltig sein darf. Hier wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet und verglichen. Die darauf folgende Derivatisierung musste auf veränderte Lösungsvolumina und Matrices angepasst werden, wobei die quantitative Derivatisierungsausbeute überprüft wurde. Als letztes wurde das GC-Temperaturprogramm optimiert.

### 7.1.1 Extraktionsmethoden

Zur effektiven Extraktion des OPP aus den Zitrusfruchtschalen wurden verschiedene, teilweise in der Literatur beschriebene, Extraktionsmethoden getestet, unter anderem die kombinierte Wasserdampfdestillation und Extraktion mit einem modifizierten Clevenger-Extraktor [71]. Außerdem wurde eine Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan evaluiert, sowie eine Ultraschallextraktion ebenfalls mit Dichlormethan.

Bei der Clevenger-Extraktion wird die Probe in Wasser suspendiert und angesäuert, dann unter Rückfluss im Extraktor (siehe Abbildung 7-1) gekocht. Die kondensierende Flüssigkeit tropft kontinuierlich durch eine Cyclohexanphase und eine wässrige Phase im Seitenarm der Apparatur.

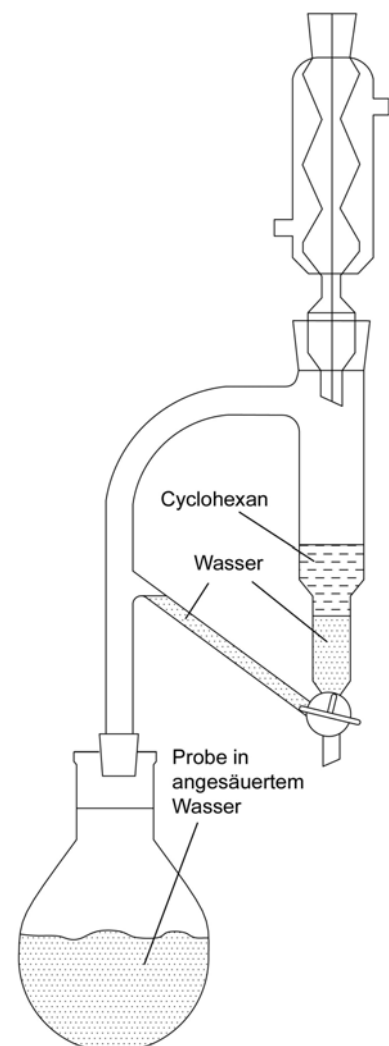


Abbildung 7-1: Schema Clevenger-Extraktor nach Wood [71]

Im Cyclohexan sollen so mit dem Wasserdampf „mitgerissene“ lipophile Substanzen wie OPP angereichert werden. Der kondensierende Wasserdampf wird kontinuierlich in den Extraktionskolben zurückgeleitet. Anschließend ist eine manuelle Phasentrennung und Flüssig-flüssig-Extraktion der wässrigen Phase im Seitenarm nötig, wodurch das Analysenverfahren recht zeit- und arbeitsaufwändig ist. Ein Vorteil dieser Extraktionsmethode ist der niedrige pH-Wert des Extraktionsmediums, wodurch eventuell vorhandenes Natrium-*o*-phenylphenolat in OPP überführt wird und daher quantitativ extrahiert werden sollte. Außerdem ist die Extraktion selektiv für flüchtige, lipophile Substanzen, so dass ein sauberes Extrakt erhalten wird.

Drei Gramm zerkleinerte Fruchtschale wurden zur Clevenger-Extraktion in einen 100 mL Rundkolben genau eingewogen und in 50 mL destilliertem Wasser suspendiert, welches mit etwa 2 mL konzentrierter Salzsäure angesäuert wurde. Im Seitenarm der Clevenger-Apparatur befanden sich 10 mL Cyclohexan auf 10 mL destilliertem Wasser. Die Suspension wurde zwei Stunden unter Rückfluss gekocht, wobei am Anfang wegen starker Schaumbildung sehr vorsichtig erhitzt werden musste. Anschließend wurde die wässrige Phase im Seitenarm in einen Schütteltrichter abgelassen. Die Apparatur wurde mit 5 mL Cyclohexan gespült, welches anschließend zur Extraktion der abgelassenen wässrigen Phase benutzt wurde. Beide organischen Phasen wurden in einem 20 mL-Messkolben vereinigt. In den Messkolben wurden 10 nmol 2FPE (100 µL 100 µM in Toluol) als interner Standard gegeben, bevor mit Dichlormethan auf 20 mL aufgefüllt und dann über Natriumsulfat getrocknet wurde. Von dieser Lösung wurden jeweils 2 mL derivatisiert wie unter 5.1 beschrieben.

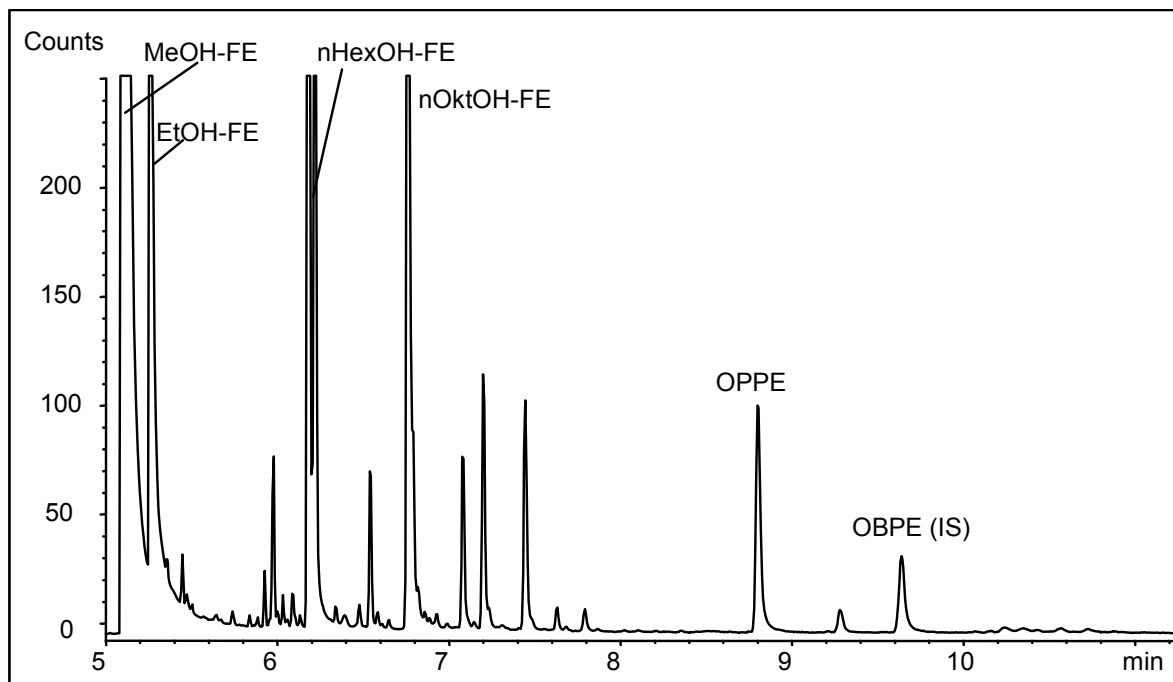
Die OPP-Gehalte nach Clevenger-Extraktion waren aus ungeklärter Ursache schlechter reproduzierbar als nach anderen Extraktionen. Sie waren zudem in Grapefruits teilweise höher als sowohl die GC-AED-Analyse nach Ultraschallextraktion als auch die HPLC-Vergleichsanalyse ergaben. Eine Koelution mit Matrixbestandteilen konnte durch GC-MS-Analyse nicht aufgedeckt werden, ist aber möglich. Aufgrund der genannten Nachteile wurde die Clevenger-Extraktion nicht weiter verfolgt, sondern es wurde die insbesondere aufgrund des geringen Zeitbedarfs vielversprechende Ultraschallextraktion evaluiert.

Bei der Ultraschallextraktion wurden die homogenisierten zerkleinerten Schalen in Dichlormethan suspendiert und im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Schalenreste durch Glaswolle abfiltriert. Eine zehnmütige Ultraschallextraktion erwies sich als nicht ausreichend für eine quantitative Extraktion von OPP. Bis zu 20% des nach der ersten Extraktion gefundenen OPP-Gehaltes konnten in einer zweiten, gleichartigen

Extraktion derselben Schalen gefunden werden. Die Extraktion wurde daher zwei Mal für je 15 Minuten mit frischem Lösungsmittel durchgeführt. Anschließend konnten vernachlässigbare Mengen (unter 2% der Gehalte) an OPP in einem weiteren Nachextrakt nachgewiesen werden. Eine detaillierte Arbeitsvorschrift zur Extraktion findet sich in Kapitel 7.2. Vorteilhaft bei dieser Extraktion ist der relativ geringe Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Extrakte waren im Gegensatz zu den Clevengerextrakten gelb gefärbt, es wurden also mehr Farbstoffe aus der Schale mitextrahiert. Durch die Selektivität der Derivatisierung und der anschließenden Bestimmung störten diese Farbstoffe jedoch nicht.

Die Soxhlet-Extraktion ergab bei Chromatogrammvergleichen Extraktionsausbeuten in gleicher Größenordnung wie die Ultraschallextraktion bei deutlich höherem Zeit- und Lösungsmittelaufwand (drei Stunden Extraktionszeit und 160 mL Dichlormethan) und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Da die GC-AED-Analyse nach Ultraschallextraktion gut vergleichbare Werte mit denen eines unabhängigen Verfahrens mittels HPLC ergab (siehe Kapitel 7.3.4), und die Wiederfindungsrate etwa 100% betrug, wurde nachfolgend für alle festen Proben die Ultraschallextraktion verwendet. Nur für flüssige Proben wie Saft und Fruchtfleisch wurde die Clevenger-Extraktionsmethode verwendet, da für diese Proben nach Ultraschallextraktion der hohe Wassergehalt des Extraktes problematisch für die Derivatisierung war.



**Abbildung 7-2: Eisenselektives GC-AED Chromatogramm eines Grapefruitextraktes, 0,22 µg/g OPP-Gehalt – zusätzlich wurden einige Alkohole identifiziert**

### 7.1.2 Interne Standards

Zunächst wurden die Fluorphenole 2FPE und 4F2MPE als interne Standards verwendet, wobei ein Standard vor der Probenvorbereitung, der andere kurz vor der Injektion in den GC zugesetzt wurde. Allerdings koeluierte 4F2MPE teilweise mit dem Ferrocenester von *n*-Octanol, einem Alkohol, der häufig in Zitrusfruchtschalen vorkommt, und konnte deshalb hier nicht verwendet werden. Außerdem unterscheiden sich die chemischen Eigenschaften des schon als Ferrocenester vorliegenden 2FPE relativ stark von OPP, weshalb die Extraktionsausbeute und eventuelle Verluste während der Probenvorbereitung von Analyt und Standard nicht gut vergleichbar sind. Erste Versuche der Analyse einer mit geringen Mengen an OPP belasteten Zitronenschale ergaben eine schlechte Reproduzierbarkeit. Die Werte streuten zwischen 12 und 79 ng OPP/g Schale nach vier unabhängigen Extraktionen. Auch in einer stärker belasteten Grapefruitschale wurden nach Ultraschallextraktion Werte zwischen 1,2 und 2,1 µg OPP/g Schale gefunden.

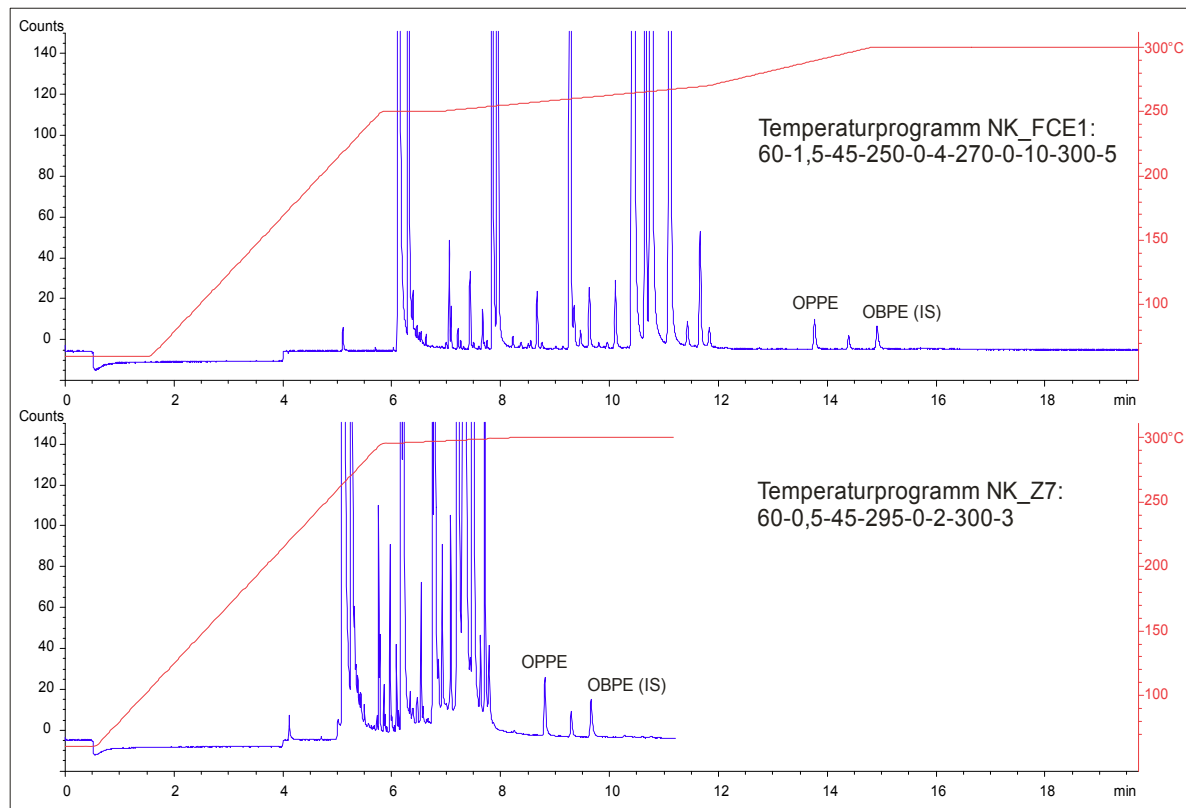
Aufgrund dieser Probleme wurde ein Standard gesucht, der OPP chemisch möglichst ähnlich ist, aber nicht mit einem in den derivatisierten Probenextrakten vorkommenden Ferrocenester koeluiert. Zunächst wurde *para*-Phenylphenol getestet, welches aber wegen der gestreckten Form des Moleküls einen höheren Siedepunkt als OPP besitzt und daher als Ferrocenester deutlich später als OPPE von der GC-Säule eluierte. So verlängerte sich die Analysenzeit und die verbreiterte Peakform erschwerte eine genaue Integration. Der Ester eluierte auch später von der Aluminiumoxidsäule, wodurch eine quantitative Abtrennung der Reagenzienüberschüsse schwieriger wurde. Zusätzlich wurde in einigen Zitrusfruchtexttrakten ein Peak bei gleicher Retentionszeit gefunden, weshalb *p*-Phenylphenol als Standard nicht in Frage kam.

*o*-Benzylphenol (OBP) erwies sich als geeignet, da diese Verbindung nur eine CH<sub>2</sub>-Gruppe mehr als OPP besitzt und ebenfalls in *ortho*-Stellung substituiert ist. Als Ferrocenester eluierte OBP unter den gewählten Analysenbedingungen nur 0,8 min später als OPPE von der GC-Säule (siehe Abbildung 7-2). Koelutionen mit Matrixbestandteilen konnten mittels GC-MS-Analyse von Realproben durch Überprüfung des Massenspektrums bei der Retentionszeit von OBPE ausgeschlossen werden. Die Derivatisierungsausbeute wurde überprüft, indem Standardlösungen von OPP und von OBP in Gegenwart von 2FPE als internem Standard derivatisiert wurden (je 25 µL oder je 100 µL 100 µM-Lösung in Toluol). Die Ausbeuten der Ferrocenester betragen 102 bzw. 95% mit Standardabweichungen von unter 6% und waren damit quantitativ. Durch die chemische Ähnlichkeit war ein ähnliches Extraktionsverhalten und eine ähnliche Flüchtigkeit gewährleistet,

wodurch eventuelle Analytverluste während der Probenvorbereitung kompensiert wurden. Mit OBP als internem Standard konnte die Reproduzierbarkeit der Analysenmethode deutlich gesteigert werden: Standardabweichungen betragen nur noch bis zu 9% bei Wiederfindungsanalysen dotierter Proben (siehe Tabelle 7-2, Seite 54) und bis 13% bei der Analyse von Realproben mit geringen OPP-Gehalten (siehe Tabelle 7-3, Seite 56).

### 7.1.3 GC-Temperaturprogramm

Das zunächst verwendete GC-Temperaturprogramm (NK\_FCE1, siehe Abbildung 7-3) war für eine optimale Auftrennung der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole entwickelt worden. Die Analysenzeit betrug hier etwa 20 Minuten, wobei OPPE und OBPE sehr spät eluierten und daher relativ breite Peaks aufwiesen. Deshalb wurde die anfängliche steile Temperaturrampe des Ferrocenester-GC-Programms von 45 °C/min für die OPP-Analyse bis 295 °C ausgedehnt. Anschließend wurde mit 2 °C/min bis 300 °C geheizt und noch drei Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Eine Analyse benötigte mit dem optimierten Temperaturprogramm nur gut elf Minuten, wobei eine gute Auftrennung von OPPE, OBPE und Matrixkomponenten sowie gute Peakformen der Analyten gewährleistet waren (siehe Abbildung 7-3).



**Abbildung 7-3: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme (blau) eines Zitronenextraktes mit 100 ng OPP/g bei verschiedenen GC-Temperaturprogrammen (Ofentemperatur rot)**

## 7.2 Optimierte Probenvorbereitung und Analyse

Die in verschiedenen Supermärkten in Münster gekauften Früchte wurden gewogen und dann manuell geschält, wobei Einweghandschuhe getragen wurden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Schale jeder Frucht einzeln gewogen, um einen Umrechnungsfaktor vom OPP-Gehalt in der Schale auf den Gehalt der Frucht zu bestimmen. Die Schale wurde dann mit einem Haushaltspürerstab zerkleinert und so homogenisiert. Dann wurde sie frisch weiterverarbeitet oder bei  $-18^{\circ}\text{C}$  zur späteren Verwendung eingefroren. Zur Analyse wurden etwa drei Gramm Schale (genau eingewogen) mit 10 nmol OBP als internem Standard versetzt, indem 100  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{M}$ -Lösung in Toluol zugegeben wurden. Nach zehn Minuten, in denen das Lösungsmittel verdunsten sollte, wurden die Schalen zweifach mit Dichlormethan für je 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Bei der ersten Extraktion wurden 20 mL und bei der Nachextraktion 15 mL Dichlormethan zugegeben. Die Suspension wurde dann jeweils über Glaswolle dekantiert und in einem 50 mL-Messkolben vereinigt. Die Schalenreste wurden mit weiterem Dichlormethan gewaschen, bis der Messkolben aufgefüllt war. Anschließend wurde der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet.

Etwa 5 mL des Extraktes wurden dann derivatisiert, indem 11 mg FCC und 15 mg DMAP zugegeben wurden. Nach zehn Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die überschüssigen Reagenzien auf einer Aluminiumoxid-Minisäule entfernt. Dazu wurde eine SPE-Glaskartusche 3 cm hoch mit Aluminiumoxid (1,7 g) in Dichlormethan eingeschlämmt und die Ferrocenester wurden mit 3 mL Dichlormethan eluiert. Bei diesem Vorgehen verbleiben die polareren Reagenzien auf der Säule. Von der resultierenden Lösung wurden etwa 1,5 mL in ein GC-Vial überführt, im Stickstoffstrom bei  $40^{\circ}\text{C}$  bis fast zur Trockne eingengt und anschließend in 1 mL Cyclohexan für die GC-AED Analyse aufgenommen. Für die GC-MS-Analyse musste die Probe auf ca. 50  $\mu\text{L}$  aufkonzentriert werden. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 2  $\mu\text{L}$ .



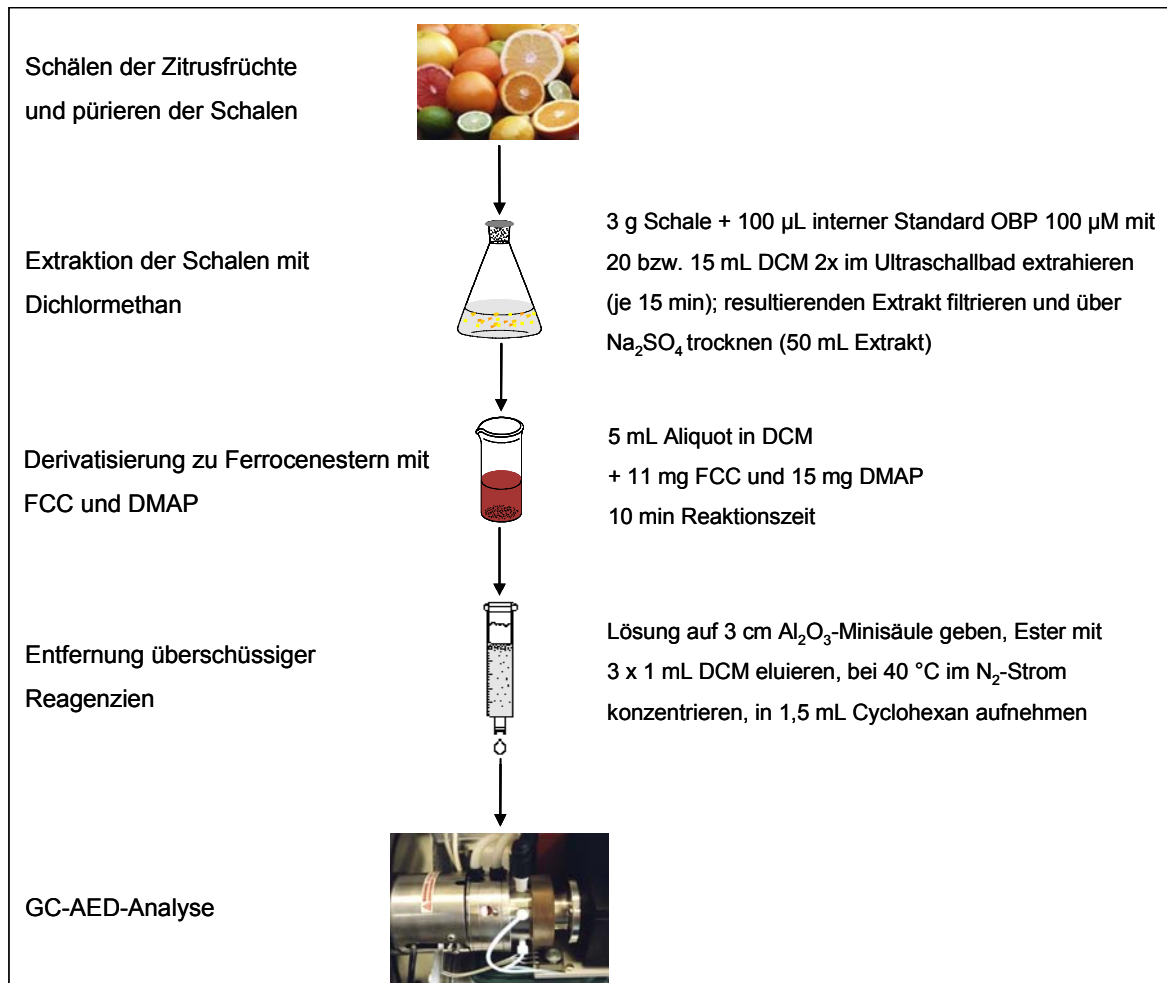


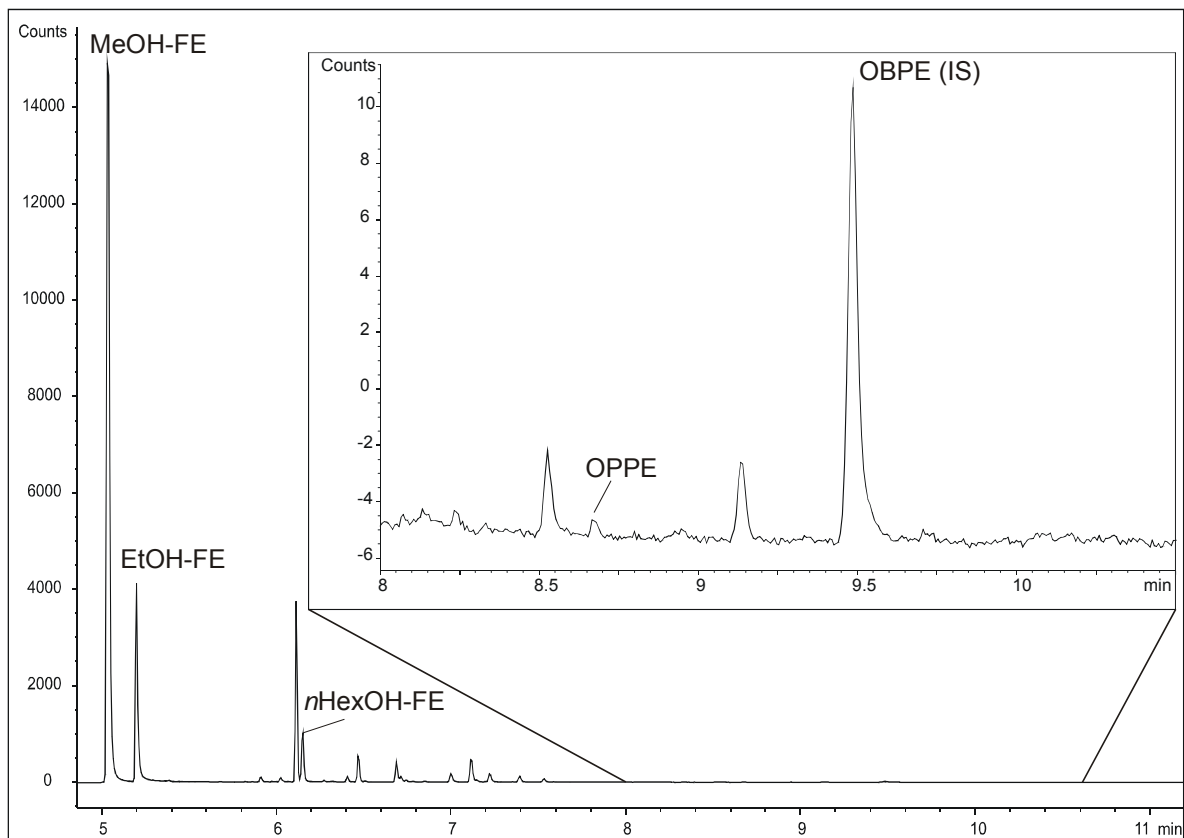
Abbildung 7-4: Analysenschema für OPP in Zitrusfrüchten

## 7.3 Methodvalidierung

### 7.3.1 Nachweisgrenze und linearer Bereich

Die Nachweisgrenze der Methode wurde durch Zusatz immer geringerer Mengen an OPP zu einer unbehandelten Zitrone, die anschließend analysiert wurde, bestimmt. Im GC-AED-Chromatogramm wurde dann ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (engl. signal to noise ratio, S/N) des Analytpeaks in seiner unmittelbaren Retentionszeitumgebung bestimmt. Mit dem Kriterium  $S/N = 2$  (wie in [75] empfohlen) wurde so eine Nachweisgrenze von 2 ng OPP/g Frucht (siehe Abbildung 7-5) erhalten, während die Nachweisgrenze mit  $S/N = 3$  als Kriterium etwa 3 ng/g Frucht betrug.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, mit geringen Mengen der Standardsubstanzen OPPE und OBPE das S/N der GC-AED-Messung zu bestimmen. Mit S/N = 3 als Kriterium ergab sich eine Nachweisgrenze von 3 fmol an injiziertem Ferrocenester, was bei Zitrusfrüchten durchschnittlich etwa 1,4 ng OPP/g Frucht entspricht (abhängig von der eingewogenen Menge und der Dicke der Schale). Die so bestimmte Nachweisgrenze betrug nur etwa die Hälfte der nach der anderen Methode bestimmten, da bei Injektion von Standards die Basislinie ruhiger war als in Gegenwart der Zitrusfrucht-Matrix und da bei Realproben geringe Verluste während der Probenvorbereitung auftreten können.



**Abbildung 7-5: Eisenselektives GC-AED Chromatogramm eines Zitronenextraktes mit einem OPP-Gehalt von 2 ng/g (Nachweisgrenze)**

Der lineare Bereich der Methode wurde mittels Kalibrationsreihen von OPPE und OBPE bestimmt. Am GC-AED reichte der lineare Bereich von 6 bis 12 000 fmol OPPE bei einem Korrelationskoeffizienten  $R^2$  von 0,9996, was Gehalten von etwa 3 ng/g Frucht bis etwa 6  $\mu\text{g/g}$  Frucht entspricht. Höhere Gehalte im Bereich des gesetzlichen Grenzwertes von 12  $\mu\text{g/g}$  können nach Injektion von 1 statt 2  $\mu\text{L}$  derivatisiertem Extrakt oder nach Verdünnung bestimmt werden.

Zur Quantifizierung am GC-MS wurde der Basispeak mit  $m/z$  213 verwendet. Der Responsefaktor von OPPE zu OBPE wurde durch Analyse einer 10  $\mu\text{M}$ -Lösung der Ester

in Cyclohexan bestimmt. Er betrug 0,98 mit einer relativen Standardabweichung von 5% bei sechsfacher Injektion. Linearer Bereich und Nachweisgrenze sind geräteabhängig. Das zunächst verwendete Ionenfallen-GC-MS-Instrument wies eine relativ geringe Empfindlichkeit auf. Die Nachweisgrenze betrug hier nach Aufkonzentration der Probe etwa 35 ng/g Frucht, bestimmt durch Messung einer dotierten Probe mit einem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von drei. Ein für spätere Messungen verwendetes Tandem-Quadrupol-Instrument war empfindlicher. Der lineare Bereich der Methode betrug hier 50 bis 90 000 fmol OPPE ( $R^2 = 0,998$ ), womit sich Gehalte von etwa 9 ng/g bis 15 µg/g Frucht quantifizieren lassen.

Eine Bestimmung von OPP nach Derivatisierung zum Ferrocenester ist also auch mittels GC-MS möglich und damit auch von Laboren ohne GC-AED-Instrument durchführbar. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit ist aber die GC-AED-Analyse besser für die Quantifizierung von niedrigen OPP-Gehalten geeignet, weshalb in dieser Arbeit hauptsächlich zur Identifikation unbekannter Peaks auf GC-MS zurückgegriffen wurde.

### 7.3.2 Wiederfindung in dotierten Proben

Zur Bestimmung von Wiederfindungsraten wurden zunächst unbehandelte Zitronen analysiert, um zu gewährleisten, dass weder OPP-Verunreinigungen auf der Frucht noch Blindwerte aus Reagenzien oder Lösungsmitteln nachweisbar waren. Anschließend wurden die Schalen für Wiederfindungsbestimmungen mit zwei verschiedenen Konzentrationen an OPP versetzt. Dazu wurden drei Gramm Schalen mit 50 µL einer 50 µM- oder mit 100 µL einer 100 µM-Lösung von OPP in Toluol versetzt und zehn Minuten trocknen gelassen. Die resultierende beaufschlagte Menge entsprach damit 0,035 bzw. 0,14 µg OPP pro Gramm Frucht. Anschließend wurden die Schalen wie in Kapitel 7.2 beschrieben extrahiert und die Extrakte derivatisiert. Danach wurden 2,5 nmol 2FPE (25 µL einer 100 µM-Lösung in Toluol) als zweiter interner Standard zugegeben, um Verluste an OBP und OPP während der Aufarbeitung (Extraktion und Derivatisierung) bestimmen zu können. Für jedes Konzentrationslevel wurden drei Analysen inklusive Extraktion durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-2 zusammengefasst.

**Tabelle 7-2: Wiederfindung von OPP aus Zitronen bezogen auf OBP als erster interner Standard sowie auf 2FPE als zweiter interner Standard**

Zugegebenes OPP [ $\mu\text{g/g}$ ]	Wiederfindung bezogen auf OBP [%]	RSD (n = 3)	Wiederfindung bezogen auf 2FPE [%]	RSD (n = 3)
0,035	101	8%	86	9%
0,140	106	3%	94	6%

Die Wiederfindungsraten bezogen auf den ersten internen Standard OBP waren quantitativ. Sie lagen sogar geringfügig über 100%, was aber in der Größenordnung des Messfehlers lag (Fehlerdiskussion siehe Kapitel 7.3.5). Ein eventueller Mehrbefund durch eine Kontamination oder durch Störsubstanzen war damit auch bei diesen geringen OPP-Mengen (mindestens Faktor 100 unterhalb des gesetzlichen Höchstwertes) vernachlässigbar gering. Die fast quantitativen Wiederfindungsraten gegenüber dem zweiten internen Standard 2FPE deuteten auf eine funktionierende Extraktion und Derivatisierung des OPP hin. Geringe Verluste traten hier auf, werden aber bei der üblichen Berechnung bezogen auf OBP als Standard berücksichtigt. Die Standardabweichungen aller Analysen lagen unter 10%, was für die Spurenanalyse in Lebensmitteln eine zufriedenstellende Präzision darstellt.

### 7.3.3 Ergebnisse der GC-AED-Analysen und Vergleich mit GC-MS

Auf verschiedenen Zitrusfrüchten (Grapefruits, Orangen und Zitronen) wurde mehrfach OPP mit der beschriebenen GC-AED-Methode bestimmt. Dazu wurden im Fall der Grapefruit und der Zitrone Aliquots derselben Frucht fünf- oder sechsfach analysiert (inklusive Extraktion und Derivatisierung). Bei den Orangen wurden drei Früchte derselben Charge jeweils zwei Mal extrahiert und analysiert. Die Ergebnisse aller Analysen sind zusammen mit den Ergebnissen der HPLC-Vergleichsanalysen (siehe Kapitel 7.3.4) in Tabelle 7-3 auf Seite 56 dargestellt, um einen übersichtlichen Vergleich aller verwendeten Methoden zu gewährleisten. Die gefundenen Gehalte nach GC-AED-Analyse liegen zwischen 0,06 und 0,37  $\mu\text{g/g}$  Frucht und damit weit unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte. Am höchsten belastet war eine Orangenprobe.

Die derivatisierten Extrakte wurden anschließend für die GC-MS-Bestimmung auf etwa 50  $\mu\text{L}$  aufkonzentriert und sowohl mit dem Ionenfallen- als auch mit dem Tandem-Quadrupol-Instrument analysiert. Mittels GC-MS wurden vergleichbare Ergebnisse wie nach GC-AED-Analyse erreicht (siehe Tabelle 7-3). Nur in der am geringsten belasteten

Zitrone lag der Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze der GC-MS-Methode und konnte daher nicht überprüft werden. Die relative Standardabweichung der kompletten Analyse mittels Gaschromatographie betrug zwischen 7 und 13%, und war damit nur etwas höher als die der reinen Wiederfindungsexperimente.

### 7.3.4 Vergleichsanalyse mit HPLC-FLD

Zum Vergleich der GC-AED-Methode mit einer etablierten, unabhängigen Analyse-methode wurden einige Zitrusfrüchte zusätzlich mit einer HPLC-FLD-Methode des Chemischen Landes- und Veterinäruntersuchungsamtes [64] analysiert. Zehn Gramm der homogenisierten Schalen wurden für fünf Minuten mit 100 mL einer Mischung aus Cyclohexan und Ethylacetat (1:1, v:v) im Ultraschallbad extrahiert, und dann fünf Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Extraktion wurde mit 50 mL des Lösungsmittelgemisches wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und auf ein Volumen von 20 mL gebracht. 15 mL des Extraktes wurden über eine 20 mL ChemElut Diatomeenerde-Säule (als Ersatz für LLE) aufgereinigt, wobei die Analyten mit 75 mL Cyclohexan / Ethylacetat eluiert wurden. Nach Zugabe von 1 mL 5%iger wässriger Ammoniaklösung wurde der Extrakt am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingeengt, bevor er mit Methanol wieder auf 10 mL aufgefüllt wurde. Vor Injektion in das HPLC-System wurde die Probe durch einen 45 µm-Membranfilter filtriert.

Die Analyse erfolgte auf einer C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Säule mit einem Gradienten aus wässrigem Phosphatpuffer und Methanol als Laufmittel, wobei eine Analyse 40 min dauerte (genaue Analysenbedingungen sind im Anhang aufgeführt). Detektiert wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 330 nm nach Anregung bei 275 nm. Die ebenfalls aufgezeichneten UV-Chromatogramme bei Wellenlängen von 245,4 bzw. 285,4 nm erwiesen sich aufgrund mangelnder Selektivität und Sensitivität als nicht auswertbar (siehe auch Abbildung 7-6). Quantifiziert wurde über externe Kalibration der Fluoreszenzdetektion mit einer Messreihe von sechs Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,05 und 1,0 mg/L OPP in Methanol. Dabei betrug der Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup> 0,998. Die erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 7-3 dargestellt und stimmten gut mit den Ergebnissen der GC-Methoden überein.

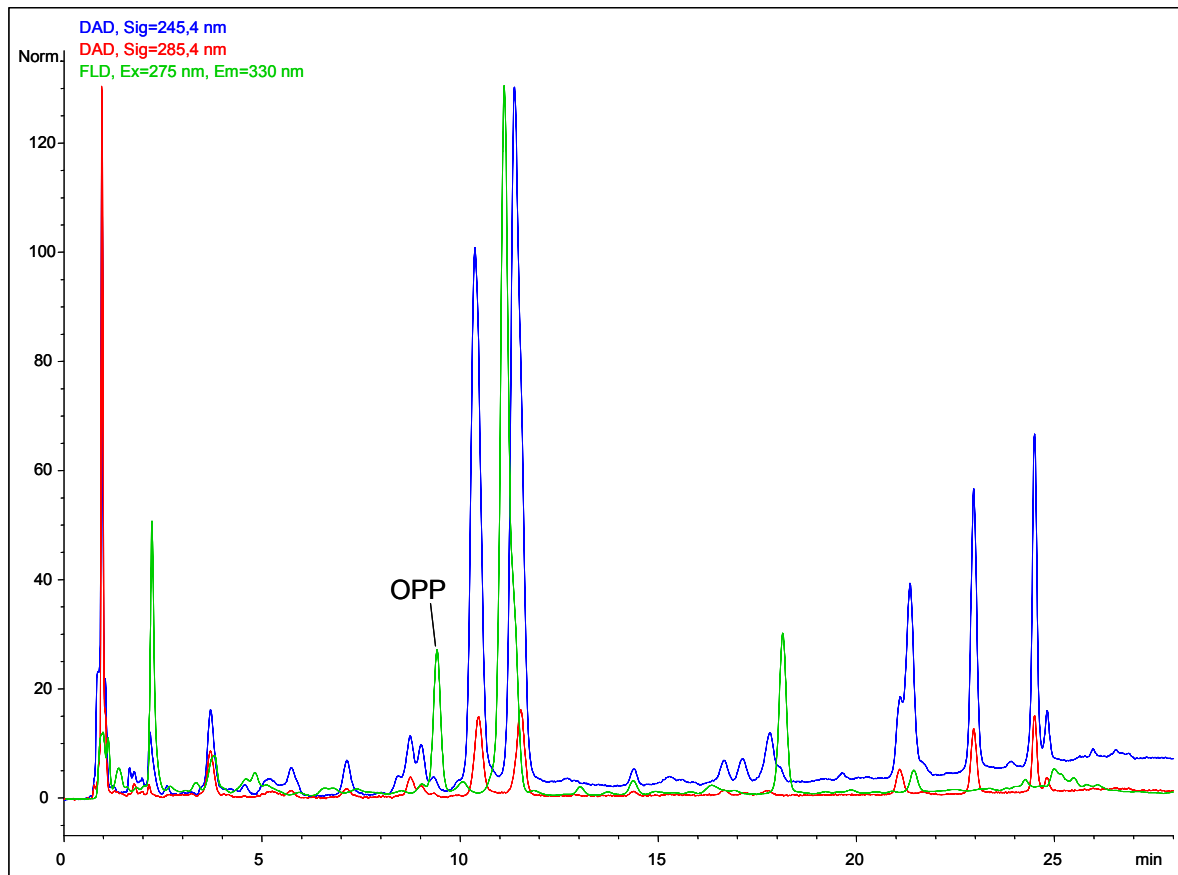


Abbildung 7-6: HPLC-Chromatogramm eines Zitronenschalenextraktes (Zitrone 1), UV-Detektor mit 2 Wellenlängen (rot und blau), Fluoreszenzdetektor (grün) – nur Fluoreszenz ist selektiv und sensitiv genug für die Bestimmung.

Tabelle 7-3: Vergleichsanalysen von Zitrusfrüchten mit verschiedenen Analysenmethoden

Frucht	GC-AED			GC-MS Ionenfalle			GC-MS Quadrupol			HPLC-FLD		
	OPP (µg/g)	n	RSD	OPP (µg/g)	n	RSD	OPP (µg/g)	n	RSD	OPP (µg/g)	n	RSD
Orange	0,37	6	8%	0,32	5	10%	0,34	2		n. a.	-	
Grapefruit	0,23	5	7%	0,24	1		0,26	1		0,23	2	
Zitrone 1	0,28	5	13%	0,26	2		0,34	1		0,35	1	
Zitrone 2	0,06	2		< BG*	1		-	-		0,06	1	

\* Die Bestimmungsgrenze entspricht 0,1 µg/g

### 7.3.5 Fehlerbetrachtung der OPP-Analyse

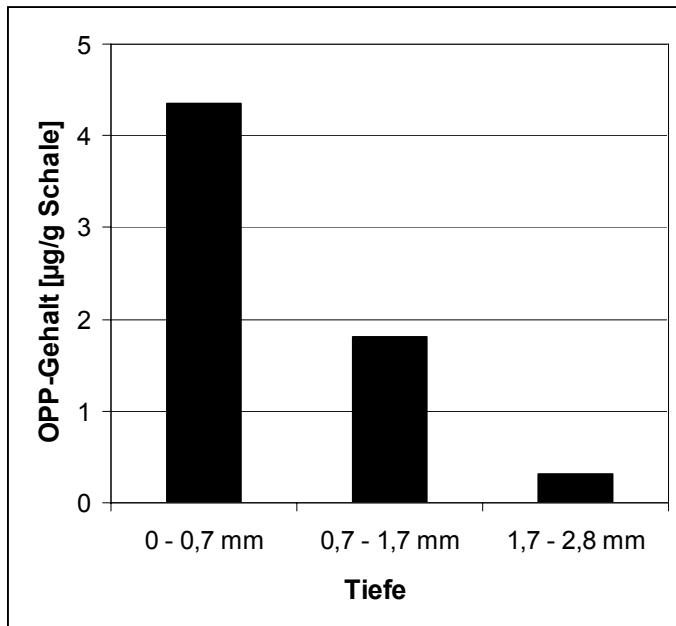
Eine detaillierte Fehlerbetrachtung der einzelnen Analysenschritte ist schwer möglich, da die wichtigsten Fehlerquellen (wie unvollständige Extraktion) nicht leicht zu quantifizieren sind. Einfach anzugebende Fehler wie die Toleranz der Messkolben und der Pipetten tragen kaum zum Gesamtfehler bei. Am größten ist noch der Pipettenfehler mit beispielsweise 1% beim Abmessen von 100  $\mu\text{L}$  (nach Herstellerangaben). Aufgrund dieser Schwierigkeiten wird der Gesamtfehler des Analysenergebnisses hier besser über die Präzision von Wiederholungsanalysen und über den Vergleich mit einer komplementären Methode abgeschätzt. Die Standardabweichungen der gaschromatographischen Analysen inklusive der Probenvorbereitung lagen in Realproben bei 8 bis 13% (siehe Tabelle 7-3). Damit ist die Präzision des Analyseverfahrens für Lebensmittelproben gut. Systematische Fehler konnten durch Vergleich der Gehaltsbestimmungen mittels eines unabhängigen Analyseverfahrens weitgehend ausgeschlossen werden. Dabei wurde sowohl ein anderes Lösungsmittel zur Extraktion als auch eine direkte Analyse ohne vorgeschaltete Derivatisierung verwendet. Die eigentliche Messung bei der Vergleichsanalyse erfolgte mit einer anderen chromatographischen Trenntechnik (HPLC statt GC), wobei auch eine komplementäre Detektion (Fluoreszenz statt Atomemissionsdetektion oder Massenspektrometrie) zum Einsatz kam. Die Kalibration erfolgte zudem extern statt intern. Die höchste Abweichung des OPP-Gehalts zwischen GC- und HPLC-Analyse betrug 20% (Zitrone 1, Tabelle 7-3). Der Gesamtfehler des Analyseverfahrens sollte daher in dieser Größenordnung liegen.

### 7.4 Tiefenprofil in einer Orangenschale

Hier wurde bestimmt, wie tief OPP in die Schale einer behandelten Frucht eindringt, um beurteilen zu können, ob eine Belastung des Fruchtfleisches mit OPP zu erwarten ist. Dazu wurde eine Orange manuell in drei etwa 0,7 – 1,2 mm dicke Schichten geschält. Die beiden äußersten Schichten werden botanisch Exokarb genannt. Dabei umfasste die äußerste Schicht nur die glatte, orange Außenhaut, während die zweite Schicht porös und eher gelb-orange war. Die dritte weichere, weißliche Schicht ist botanisch das Mesokarb. Die durchschnittliche Dicke der abgeschälten Schale wurde mit einem Messschieber bestimmt und es wurden jeweils drei bis vier Gramm zur Analyse eingewogen. Zusätzlich wurde etwa die Hälfte (35 g) des Fruchtfleisches nach Clevenger-Extraktion analysiert.

Das bestimmte Gehaltsprofil ist als semiquantitativ anzusehen, da die Dicke der Schichten durch den Schälvorgang nicht genau definiert ist. Für eine genaue Bestimmung wäre eine

maschinelle Schälung notwendig, was aber hier nicht relevant war, da keine detaillierte Migrationsstudie erfolgen sollte.



Die OPP-Konzentration in der Schale fiel steil ab. In der äußersten Schale waren etwa 4,4 µg/g Schale enthalten, während in der mittleren Schicht nur 1,8 µg/g und im Mesokarp nur 0,3 µg/g zu finden waren (siehe Abbildung 7-7). Das Fruchtfleisch enthielt nur Spuren an OPP im Bereich der Nachweisgrenze. Man kann also davon ausgehen, dass beim Verzehr behandelter Früchte, die geschält wurden, kaum OPP aufgenommen wird.

Abbildung 7-7: Tiefenprofil von OPP in einer Orangenschale

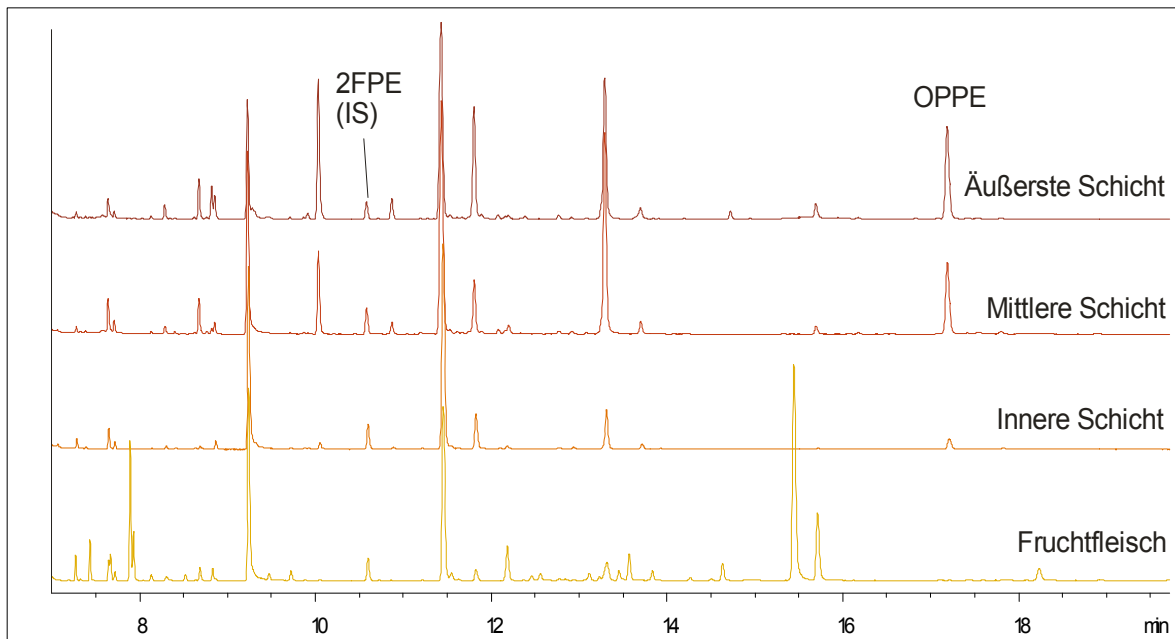
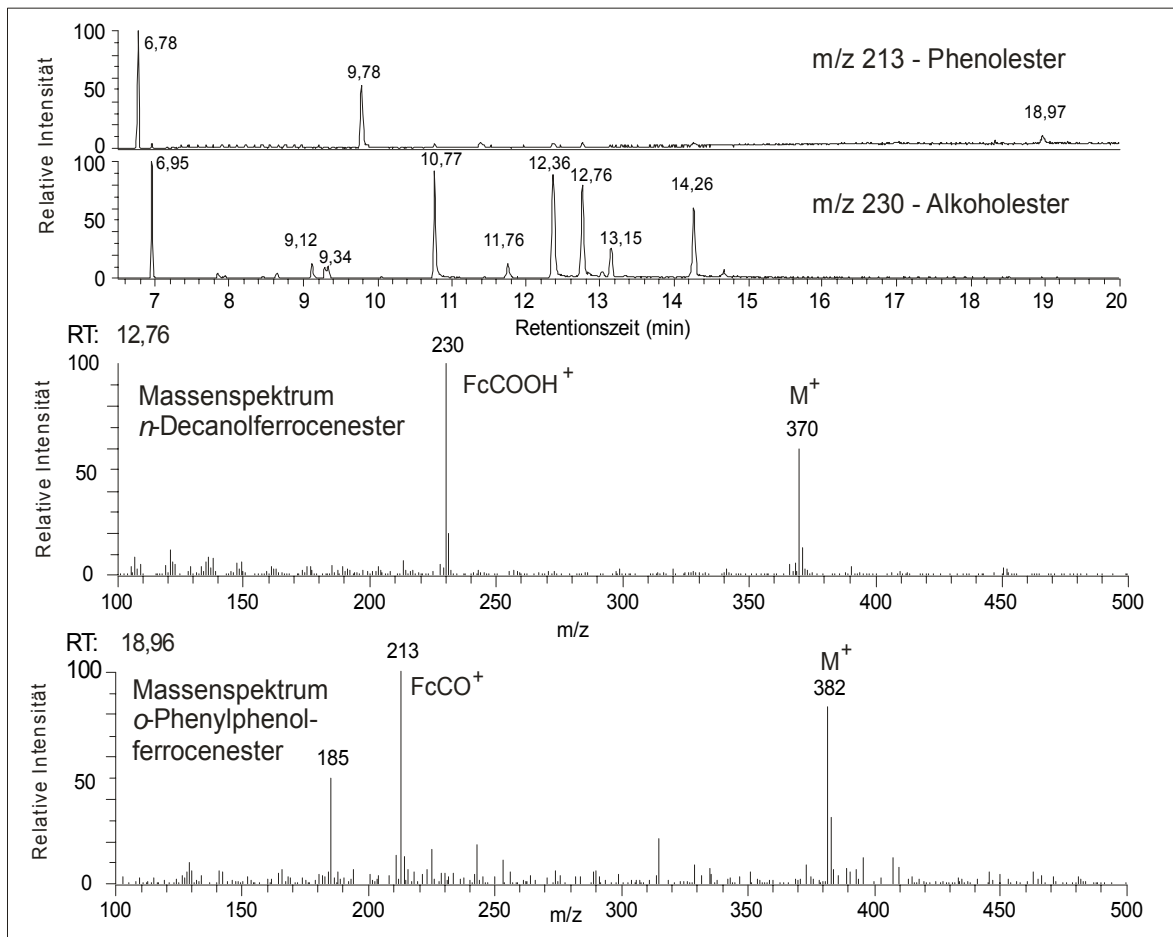


Abbildung 7-8: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme der Orangenschalenschichten im Tiefenprofil



## 7.5 Identifizierung von Alkoholen in Zitrusfruchtschalen

Bei der Derivatisierung werden auch Alkohole verestert. Daher lassen sich die Alkohole in Zitrusfruchtschalen im GC-MS-Chromatogramm leicht über die für Alkohole charakteristische Fragmentierung identifiziert werden. Der Basispeak im Massenspektrum von Alkoholferrocenestern ist mit  $m/z$  230 das Ferrocencarbonsäurekation<sup>7</sup>, wie in Abbildung 7-9 gezeigt. Phenolferrocenester zeigen dagegen  $m/z$  213 (Ferrocencarbonylkation) als Basispeak und kein Fragment der Masse 230. So sind durch Auftragung extrahierter Massenspektren alkohol- und phenolselektive Chromatogramme zugänglich. Zusätzlich ist sowohl bei Alkohol- als auch bei Phenolferrocenestern der  $M^+$ -Peak gut sichtbar, wodurch eine Zuordnung über die Molmasse möglich ist.



**Abbildung 7-9:** Phenolselektives (oben) und alkoholselektives (2.v.o.) GC-MS-Chromatogramm eines Orangenextraktes mit Massenspektren von Decanolferrocenester (3.v.o.) und von OPPE (unten)

<sup>7</sup> Das Ferrocencarbonsäurekation entsteht wahrscheinlich nach McLafferty-Umlagerung des oxidierten  $M^+$  ( $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$ ), siehe Kapitel 5.

Zur Identifizierung standen eine Reihe veresteter *n*-Alkohole sowie Citronellol (3,7-Dimethyl-oct-6-en-1-ol, siehe auch Abbildung 7-10) als Standards für Retentionszeitenvergleiche zur Verfügung. In den Zitrusfruchtschalen konnten *n*-Alkohole bis zu *n*-Undecanol nachgewiesen werden. Als Beispiel sind in Tabelle 7-4 die identifizierten Alkohole und Phenole in einer Orangenschale aufgelistet. Methanol war besonders in Grapefruits mit einer Konzentration von wenigen µg/g Frucht der am stärksten vertretene Alkohol. Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben über Methanolgehalte von Zitrusfruchtschalen, was aber eventuell auf die hohe Flüchtigkeit des underivatisierten Alkohols zurückzuführen ist. Ebenfalls in hohen Konzentrationen wurden die in [76] erwähnten Alkohole Ethanol, *n*-Hexanol und *n*-Octanol identifiziert, sowie Citronellol in Zitronen und Orangen. Weiterhin wurden ungesättigte oder zyklische C<sub>6</sub>- und C<sub>10</sub>-Alkohole gefunden, die aber aufgrund fehlender Standards nicht über Retentionszeitenvergleiche identifiziert werden konnten. Eventuell waren darunter die in [77] beschriebenen Alkohole Geraniol (3,7-Dimethyl-*trans*-2,6-octadien-1-ol) und dessen *cis*-Isomer Nerol. Über die Alkohole kann nur eine qualitative Aussage gemacht werden, da die Derivatisierung nicht quantitativ verläuft (wobei primäre Alkohole bessere Ergebnisse zeigen als sekundäre) und die Extraktionsausbeuten nicht überprüft wurden.

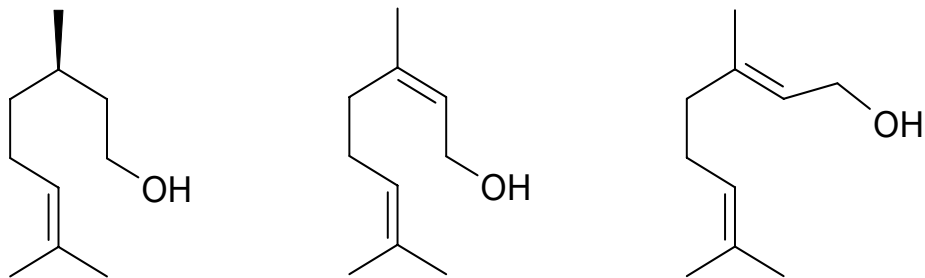


Abbildung 7-10: Strukturformeln von Citronellol (links), Nerol (mitte) und Geraniol (rechts)

Tabelle 7-4: Identifizierung von Alkoholen und Phenolen in Orangenschale mittels GC-MS

Retentionszeit [min]	M <sup>+</sup> [m/z]	Hauptfragmente [m/z]	Substanz	Identifizierung durch Standards
6,78	244	-	Methanol-FE	Ja
6,95	258	230	Ethanol-FE	Ja
9,12	314	230	<i>n</i> -Hexanol-FE	Ja
9,34	312	230	C <sub>6</sub> -Alkohol-FE*	-
9,78	294	213, 185	Cyclopentadienol-FE (Derivatisierungsartefakt)	-
10,77	342	230	<i>n</i> -Octanol-FE	Ja
11,39	324	213, 185	2FPE (IS)	-
11,76	356	230	Nonanol-FE	-
12,36	368	230, 320	Citronellol-FE + ?	Ja
12,76	370	230	<i>n</i> -Decanol-FE	Ja
13,15	366	230	C <sub>10</sub> -Alkohol-FE mit 2DBE*	-
14,26	364	230	C <sub>10</sub> -Alkohol-FE mit 3DBE*	
18,97	382	213, 185	OPPE	Ja

## 7.6 Zusammenfassung

Eine schnelle und empfindliche Analysenmethode für die Bestimmung von Rückständen des Pestizids *o*-Phenylphenol auf Zitrusfrüchten wurde entwickelt und validiert. Die Extraktion des OPP aus den Zitruschalen erfolgte dabei mit Dichlormethan im Ultraschallbad. *o*-Benzylphenol wurde vor der Extraktion als interner Standard zugesetzt, so dass keine zeitaufwändige externe Kalibration nötig war. Anschließend wurde OPP zum Ferrocenester derivatisiert. Die gaschromatographische Bestimmung konnte mittels GC-AED oder GC-MS in nur 11 Minuten durchgeführt werden, so dass eine Analyse inklusive Probenvorbereitung nur 2,5 Stunden benötigte.

Mit GC-AED wurde eine Nachweisgrenze von 2 ng OPP/g Frucht erreicht und Gehalte ab 6 ng/g konnten quantifiziert werden. So reichten bei höheren Gehalten wenige mg an

\* 1DBE = zyklisch oder einfach ungesättigt

Probe für die Analyse aus. Es wird aber eine Probenmasse von drei Gramm empfohlen, um Homogenität und Repräsentativität der Verteilung von OPP auf der Frucht zu gewährleisten. Die Methode war linear bis zu Gehalten von 6 µg/g Frucht, wobei der lineare Bereich durch einfache Verdünnung zu höheren Gehalten hin erweitert werden kann.

GC-MS war ebenfalls für die quantitative Analyse von OPP geeignet, wies aber eine (geräteabhängige) höhere Nachweisgrenze auf. Ein Vorteil beim Einsatz von GC-MS war aber die einfache Möglichkeit der qualitativen Analyse. Alkohol- und Phenolferrocenester konnten leicht durch ihre unterschiedliche Fragmentierung unterschieden werden. Über die molare Masse war die Identifizierung unbekannter Verbindungen möglich. So konnte eine Reihe natürlich vorkommender Alkohole in einer Orangenschale identifiziert werden.

Bei der Methodvalidierung konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse vertrauenswürdig waren. Die Analysenergebnisse in Realproben mit Gehalten an OPP von maximal 3% des gesetzlichen Grenzwertes waren gut mit denen einer etablierten, unabhängigen Analysenmethode vergleichbar. Hier wurde eine andere Extraktionsmethode angewendet und die Analyse der underivatisierten Phenole wurde mittels HPLC-FLD durchgeführt. Die Abweichung der Ergebnisse betrug maximal 20%. Auch die Ergebnisse nach GC-AED und nach GC-MS-Analyse stimmten gut überein. Die Bestimmungen in Realproben waren mit relativen Standardabweichungen bis 13% über den gesamten Analysengang zudem präzise. Die Wiederfindungsraten nach Dotierung unbehandelter Zitronenschalen waren quantitativ und wiesen eine relative Standardabweichung unter 10% auf.

Die vorgestellte Methode ist also dazu geeignet, Rückstände des Pestizids OPP auf Zitrusfruchtschalen empfindlich und genau zu bestimmen. Dabei ist die Analysenzeit kürzer als in vielen veröffentlichten Methoden und die erforderliche Probenmenge ist sehr gering.

## 8 NONYLPHENOLE IN VERPACKUNGSMATERIAL<sup>8</sup>

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, sind *p*-Nonylphenole (4NP) und *p*-*tert*-Octylphenol (4OP) endokrine Disruptoren. Sie wirken zwar um ein Vielfaches schwächer als natürlich vorkommende Steroidhormone, aber ihr Gefährdungspotential für Menschen und Tiere, besonders in frühen Entwicklungsstadien und in Kombination mit anderen endokrin wirksamen Substanzen, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist daher wichtig, Nonylphenole in Matrices wie Lebensmittel, Trinkwasser und Gebrauchsgegenstände zu bestimmen, um damit Expositionswege und Akkumulationen aufzuklären. In dieser Arbeit wurden Lebensmittelverpackungsmaterialien auf Nonylphenole untersucht.

Es gibt diverse Untersuchungen zu 4NP in unterschiedlichen Matrices, welche in Tabelle 8-1 zusammengefasst sind. Octylphenole wurden oft auch bestimmt, sind aber nur in wenigen Proben und in geringen Konzentrationen gefunden worden. Extrahiert werden 4NP und 4OP mittels Wasserdampfdestillation, kombiniert mit Extraktion in ein organisches Lösungsmittel [18, 77, 78], oder mittels klassischer LLE [37, 38, 79], was aber zeitaufwändig ist. Wenige Autoren benutzen Extraktionsmethoden wie SBSE [42] oder „accelerated solvent extraction“ (ASE) [17]. Häufig erfolgen Aufreinigungsschritte mittels SPE [17, 37, 38, 78, 80, 81], Gelpermeationschromatographie (GPC) [17] oder präparativer HPLC [18].

Als Analysenmethoden werden sowohl Gaschromatographie (hauptsächlich mit massenspektrometrischer Detektion) [17, 18, 38, 44, 78, 81] als auch Flüssigchromatographie (mit UV-, Fluoreszenz-, elektrochemischer oder massenspektrometrischer Detektion) angewendet [37, 77, 79, 80, 82]. Ein Problem bei der GC-MS-Analyse underivatisierter Phenole ist, dass ein zur Quantifizierung benutztes Fragment mit  $m/z$  149 auch charakteristisch für Phthalate ist. Diese Weichmacher treten sowohl als Blindwert in Labormaterialien als auch in vielen Proben auf, so dass in Realproben leicht Überbefunde auftreten können [61]. Auch die Fragmente  $m/z$  135 und 107 unterliegen aufgrund ihrer geringen Masse leicht Matrixinterferenzen. Eine entsprechende ISO-Methode (ISO 18857-1) zeigte keine zufrieden stellenden Ringversuchsergebnisse und wird daher momentan überarbeitet [61]. Die Ergebnisse eines weiteren Ringversuchs der Nonylphenolanalyse in Wasser mittels GC-MS oder LC-MS und -FLD zeigten eine große Streuung der Ergebnisse in Wasserproben (5 – 110 ng/L Nonylphenol in Flusswasser) und selbst in Standardlösung (25-125% Wiederfindung) [61].

---

<sup>8</sup> Die Ergebnisse in diesem Kapitel wurden zum Teil zusammen mit Lebensmittelchemikerin Anna Werwein im Rahmen ihrer Wissenschaftlichen Abschlussarbeit [62] erarbeitet.

Tabelle 8-1: Literaturüberblick zur Analyse von Nonylphenolen in verschiedenen Matrices

Erst- autor	Matrix	Metho- de	Probenvor- bereitung	Zeit- be- darf	Nach- weis-/ Best- grenze	Wieder- findung + Reprodu- zierbarkeit	Pro- ben- menge
Inoue [78]	Kunst- stoff	HPLC- ECD (RP)	Extraktion (Einlegen), Migrationstest	ge- ring	500 µg/g	84%, RSD 3%	0,5 g
Kata- oka [79]	Kunst- stoff, Lebens- mittel	HPLC- UV (RP)	Extraktion (Einlegen) + LLE bzw. Migrations- test + LLE, Zentrifug.; SPME	ge- ring	0,6ng/mL	21-29%, RSD 6%	0,5 x 4 cm bzw. 0,4 g
Ozaki [80]	Kunst- stoff	GC-MS	Migrationstest (24h), SPE, ext. Kalibration	hoch	2 ng/mL	106% (20 µg/g), RSD 4%	1 g
Gün- ther [18]	Lebens- mittel	GC-MS	Wasserdampf- dest./ Extr., HPLC, Deriv. mit MTBSTFA	hoch	18 ng (Blind- wert 9 ng)	12-126% (Ergebnisse korrigiert), RSD 3-25%	15-80 g
Fer- nandes [81]	Lebens- mittel	GC-MS	2xLLE, 2xSPE	hoch	3,8 µg/kg	79-130%, RSD 19%	20 g
Wenzel [17]	Muschel, Fisch	GC-MS	ASE, GPC, SPE, Deriv. mit MSTFA	hoch	LOQ: 2 ng/g (Blindw. 1,6 ng/g)	90-138%, RSD 5%	0,2-1 g
Loyo- Rosa- les [82]	Wasser, Milch	LC- MS/MS	LLE oder SPE	mittel	LOQ: 8 ng/L	78%, RSD <10%	500 mL - 3,8 L
Lye [83]	Fisch, Wasser, Sedi- ment	GC-FID + GC- MS	Wasserdampf- dest./ Extr., SPE	hoch	n.a.	104% in Wasser, 98% Fisch, RSD 3-28%	2-20 g bzw. 1-2 L
Ahel [84]	(Ab-) Wasser, Schlamm	HPLC- UV (NP)	Wasserdampf- dest./ Extr.	mittel	0,5 µg/L	94% (21 µg/L Wasser), RSD 4%	2 L bzw. 10-50 g
Nunez [85]	Boden	HPLC- FLD (RP)	Ultraschallextrak- tion, SPE	ge- ring	60 ng/g, LOQ: 0,62 µg/g	84% (0,1µg/g), RSD 14%	2 g
Ieda [42]	Wasser	GCx GC-MS	SBSE	mittel	0,5 ng/L, LOQ: 1 ng/L	76% (100 ng/L), RSD 7%	60 mL

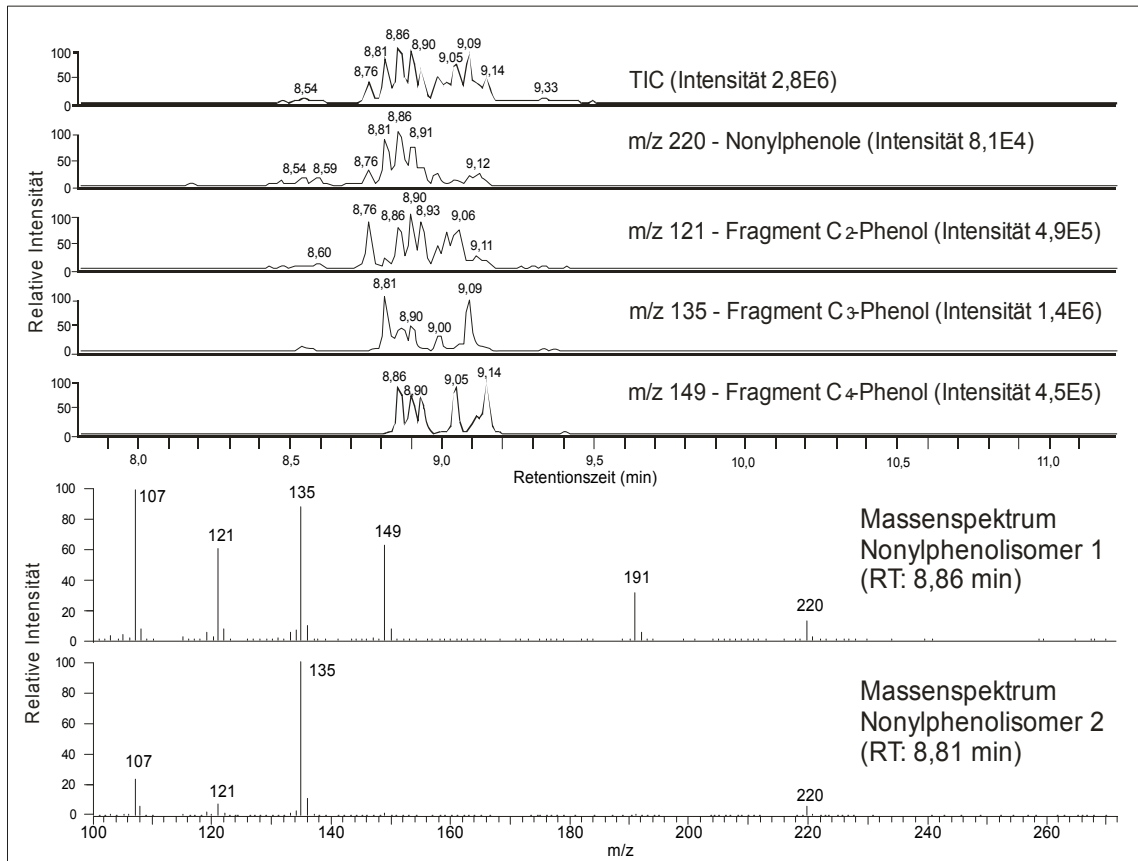
## 8.1 Charakterisierung des technischen Nonylphenolgemisches

Allgemein wird mit „Nonylphenol“ ein technisches Gemisch der *para*-Isomere gemeint. Eine Trennung aller Nonylphenolisomere ist mit eindimensionaler GC nicht möglich: Ieda et al. identifizierten im technischen Gemisch 102 Isomere mittels GCxGC-MS [42], während durch Wheeler selbst auf einer 100 m langen GC-Säule (DB1, 0,25 mm x 0,5  $\mu$ m) nur 22 Isomere getrennt werden konnten [86]. Üblicherweise wird daher zur Quantifizierung die Summe der Nonylphenolisomere gebildet.

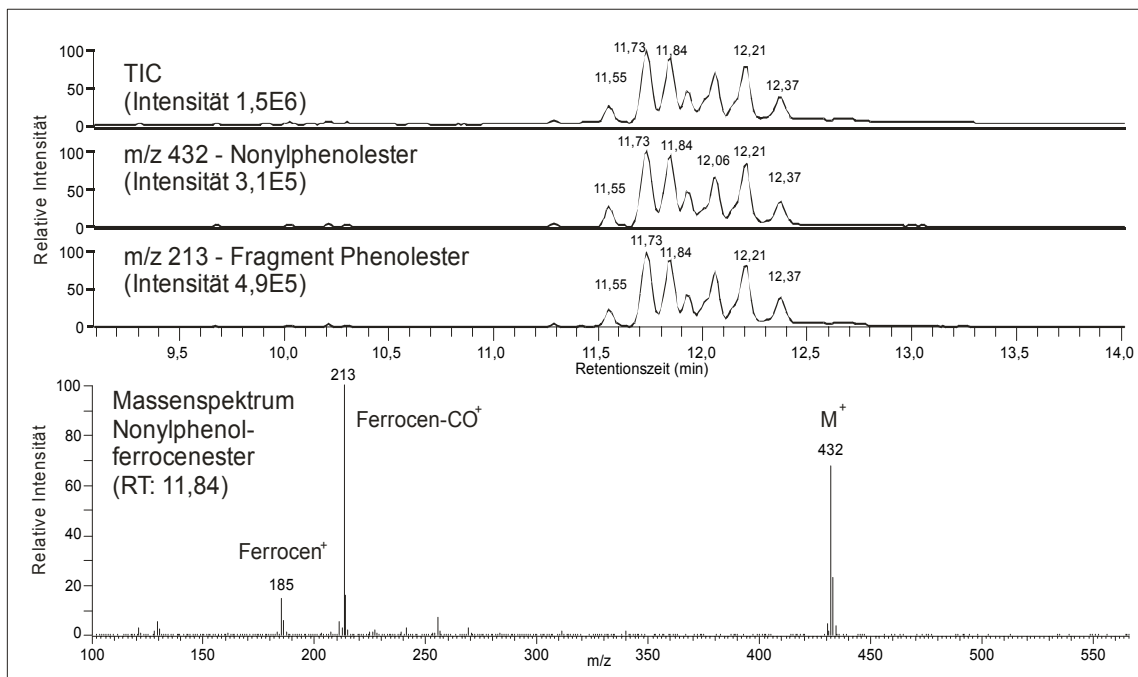
Ungerivatisiert oder silyliert zeigen die Nonylphenolisomere bei GC-MS-Untersuchungen unterschiedliche Massenspektren [17, 83, 84], wie auch in Abbildung 8-1 zu sehen ist. Besonders wenn im „selected ion monitoring“-Modus (SIM) gemessen wird, ist eine komplexe Fragmentierung nachteilig zur Bestimmung eines Summenparameters. Die Auswahl der detektierten Massen im SIM muss repräsentativ für das Fragmentierungsverhalten der Mischung sein, da Isomere mit verschiedener Fragmentierung zwangsläufig ein unterschiedliches Responseverhalten zeigen. In Abbildung 8-1 kann keine der ausgewählten Massenspuren die Intensitätsverteilung der Nonylphenole im Gesamtchromatogramm („total ion current“, TIC) vollständig abbilden. Beispielsweise zeigt das ausgewählte Nonylphenolisomer 2 in Abbildung 8-1 kein Fragment mit  $m/z$  149 ( $C_4$ -Phenolfragment), welches aber in einigen Methoden zur Quantifizierung verwendet wurde. Die Auswahl eines einzigen Fragmentes zur Quantifizierung ist also fehlerbehaftet. Eine GC-MS-Analyse im „full scan“-Modus ist jedoch häufig zu unempfindlich.

Eine Derivatisierung ist daher vorteilhaft, deren Derivate charakteristische und für alle Isomere gleiche Fragmentierung zeigen. Ferrocenester der Nonylphenolisomere erfüllen diese Bedingung. Das Massenspektrum weist den  $M^+$ -Peak ( $m/z$  432) und die Phenolferrocenesterfragmente  $m/z$  213 und 185 auf (siehe Abbildung 8-2). Die Massenspuren  $m/z$  432 und 213 zeigen beide ein mit dem TIC übereinstimmendes Peakmuster. Aus diesem Grund sollte die Derivatisierung zu Ferrocenestern auch vorteilhaft für die GC-MS-Analyse sein. Durch Detektion von  $m/z$  432 und 213 (oder MS/MS 413  $\rightarrow$  213) sollten sowohl Empfindlichkeit und Selektivität als auch Repräsentativität des Responseverhaltens gewährleistet sein.

Die Trennleistung des gaschromatographischen Temperaturprogramms wurde nicht optimiert, da eine vollständige Trennung nicht möglich ist. Sowohl bei der Analyse der ungerivatisierten Phenole (Abbildung 8-1) als auch nach Derivatisierung (Abbildung 8-2) sind etwa 10 Peaks im Chromatogramm unterscheidbar.



**Abbildung 8-1:** GC-MS-Chromatogramm des underivatisierten technischen Nonylphenolgemisches (ausgewählte Massenspuren, oben) und beispielhafte Massenspektren zweier Isomere (unten)



**Abbildung 8-2:** GC-MS-Chromatogramm des derivatisierten technischen Nonylphenolgemisches (ausgewählte Massenspuren, oben) und repräsentatives Massenspektrum (unten)



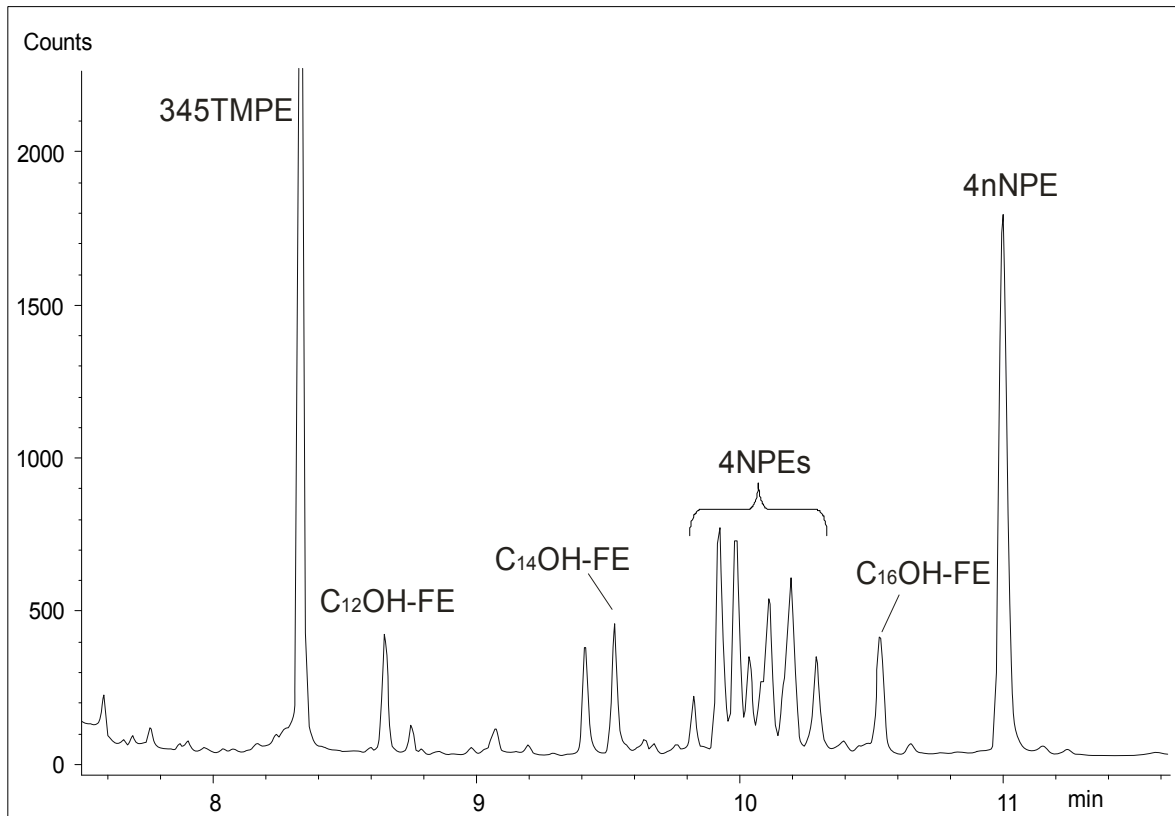
## 8.2 Methodenentwicklung

Wie die aufgezeigten Nachteile verschiedener Methoden zeigen, besteht trotz einer Vielzahl publizierter Methoden Bedarf für eine schnelle, selektive, robuste und empfindliche Analysenmethode. Diese Ansprüche sollten durch eine Methode basierend auf der Derivatisierung zu Ferrocenestern mit anschließender GC-AED- oder GC-MS-Analyse erfüllt werden.

Bereits in Zusammenarbeit mit Werwein [62] wurde eine erste Methode zur Analyse von Nonylphenolen entwickelt. Es wurden verschiedene Lebensmittel und Bedarfsgegenstände nach Derivatisierung auf Nonylphenole untersucht, darunter Äpfel, Dosenthunfisch und Frischhaltefolien. Apfel- und Thunfischproben wurden sowohl einer Clevengerextraktion (siehe Kapitel 7.1.1) als auch einer Ultraschallextraktion mit Dichlormethan unterzogen, um Octyl- und Nonylphenole zu extrahieren. Hierbei wurden nach Derivatisierung jedoch nur geringe Gehalte im Bereich des Blindwertes gefunden. Frischhaltefolien aus Polyethylen wiesen nach Ultraschallextraktion mit Cyclohexan höhere Nonylphenolgehalte auf (siehe Abbildung 8-3), so dass sich die Methodenentwicklung anschließend auf diese Proben konzentrierte.

Bei der Entwicklung dieser Methode mussten geeignete interne Standards gefunden, Extraktionsmethoden evaluiert und die gaschromatographischen Messbedingungen optimiert werden. Zusätzlich sollten besonders Blindwerte überwacht werden, da Nonylphenole in vielen Laborverbrauchsmaterialien (Kunststoffe, Gummi) vorkommen (siehe Kapitel 6.5). Es wurden daher regelmäßig Blindproben parallel zu den in der Arbeit untersuchten Folien bzw. deren Extrakten analysiert. Die gefundenen Nonylphenolgehalte waren im Bereich der Nachweisgrenze, also mindestens zwei Größenordnungen geringer als die Nonylphenolgehalte in Folien und deshalb vernachlässigbar.

Zusätzlich zu den Nonylphenolen konnten mittels GC-MS langkettige Alkohole (Dodecanol, Tetradecanol und Hexadecanol) in den Frischhaltefolien nachgewiesen werden. Octylphenol wurde in [62] ebenfalls im Folienextrakt identifiziert, was aber später nicht reproduziert werden konnte. Eventuell lag hier eine Kontamination beispielsweise durch Octylphenol aus Pipettenspitzen vor.



**Abbildung 8-3: Eisenselektives GC-AED-Chromatogramm eines Folienextraktes – außer Nonylphenolen wurden langkettige Alkohole identifiziert (als Ferrocenester)**

### 8.2.1 Interne Standards

Zur Quantifizierung sollte ein interner Standard eingesetzt werden, welcher vor der Extraktion der Folie zugesetzt werden sollte. Die für die Analyse von Erdölproben bewährten fluorierten Ferrocenesterstandards 2FPE und 4F2MPE erwiesen sich für die Analyse von Nonylphenolen als nicht gut geeignet. Sie eluieren wesentlich früher als die Nonylphenol-ester von der GC-Säule, und zwar in einem Bereich, in dem bei Lebensmittelproben Interferenzen durch Matrixbestandteile (Alkohole) zu erwarten sind. 4-*n*-Nonylphenol (4nNP) wird häufig aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit dem technischen 4-Nonylphenolgemisch als interner Standard benutzt [17, 18, 37]. Es ist im technischen Gemisch der 4-Nonylphenole nicht enthalten, ist aber kommerziell erhältlich und chemisch den verzweigten Isomeren sehr ähnlich. Als Ferrocenester besitzt 4nNP allerdings eine deutlich geringere Flüchtigkeit als das technische Gemisch, neigte in unseren Experimenten zu Tailing und zeigte teilweise geringere Wiederfindungsraten. Daher wurde ein Kontrollstandard benötigt, welcher erst vor der Injektion in den Gaschromatographen zugegeben wird, um die Wiederfindung des 4nNP zu kontrollieren. Nur wenn die Wiederfindung von 4nNP im Rahmen der Standardabweichung quantitativ ist, kann auch eine quantitative Analyse der technischen Nonylphenolisomere gewährleistet werden.

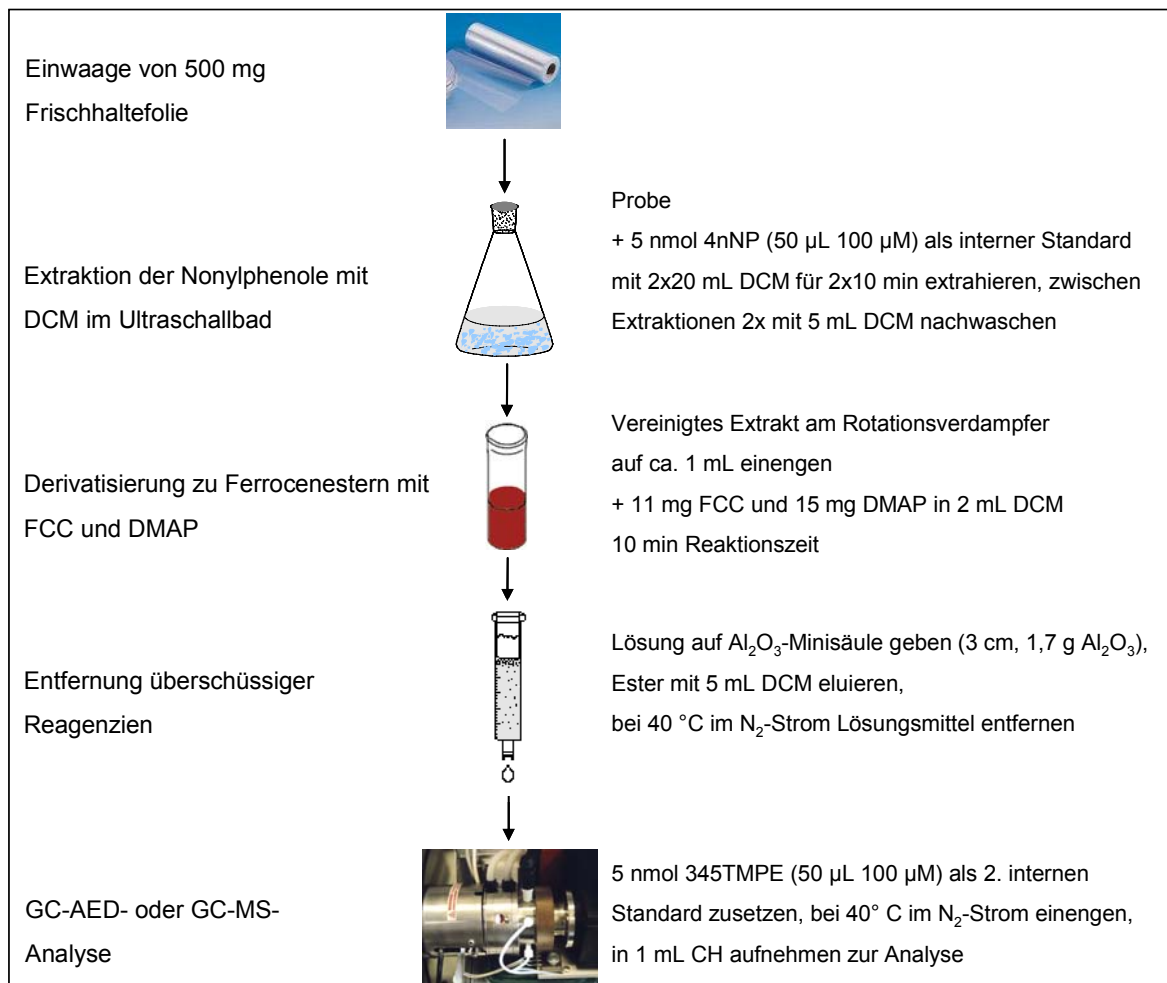
Der Ferrocenester von 9-Phenanthrol wurde bezüglich seiner Eignung als Kontrollstandard untersucht. Er ist aber schwerer flüchtig als 4nNPE und zeigte noch größere Reproduzierbarkeitsprobleme, wahrscheinlich aufgrund von Adsorptionseffekten oder unvollständiger Verdampfung. Als besser geeignete Standards erwiesen sich 3,4,5-Trimethylphenolferrocenester (345TMPE) und 4-*n*-Pentylphenolferrocenester (4nPentPE), welche kurz vor den 4NPEs von der GC-Säule eluieren. In diesem Retentionsbereich konnte in Folienextrakten eine Störung durch Matrixkomponenten ausgeschlossen werden. 345TMPE wurde als Ferrocenester kurz vor der GC-AED-Analyse als Kontrollstandard zugegeben, um über das Peakflächenverhältnis von 345TMPE zu 4nNPE Verluste während der Extraktion und Probenvorbereitung, sowie aufgrund von gaschromatographischen Problemen, zu überwachen. Zusätzlich wurde bei späteren Analysen 4nPentP unterivatisiert den Folienproben zusammen mit dem ersten internen Standard 4nNP zugesetzt. Somit konnte bei zu geringen Wiederfindungsraten von 4nNP aufgrund der Wiederfindungsrate von 4nPentP entschieden werden, ob ein Problem bei Extraktion und Derivatisierung vorlag (was beide Phenole annähernd gleich beeinflusst hätte) oder ein chromatographisches bzw. Injektionsproblem (was 4nNP stärker beeinflusste als 4nPentP). Alle Standards wurden als 100 µM-Lösung in Toluol eingesetzt.

### 8.2.2 Extraktion

Wie in Tabelle 8-1 gezeigt, sind einfache Lösungsmittlextraktionen für Kunststoffproben üblich. Für Frischhaltefolien erwies sich in [62] eine einfache fünfzehnminütige Ultraschall-extraktion mit Cyclohexan allerdings als nicht ausreichend zur quantitativen Extraktion, da in einem Nachextrakt noch signifikante Mengen an Nonylphenolen zu finden waren. Eine Dreifachextraktion konnte allerdings die Extraktionsausbeute gegenüber einer Zweifachextraktion nicht weiter steigern. Cyclohexan als Lösungsmittel erwies sich bezüglich der Extraktionsausbeute als gleichwertig im Vergleich zu Dichlormethan und Toluol. Weitere Untersuchungen wurden daher mit dem leichter zu entfernenden und besser mit der Derivatisierungsreaktion kompatiblen Dichlormethan durchgeführt. In [62] wurden Folienproben (0,4 bis 1 g) zwei Mal für je 15 min mit je 40 mL Dichlormethan extrahiert. Vor der Extraktion wurden 0,8 bis 1 nmol 4nNP als interner Standard zugesetzt. Nach Extraktion und Derivatisierung wurde 345TMPE als Kontrollstandard zugegeben.

Die Extraktion konnte später bezüglich des Lösungsmittelverbrauchs optimiert werden. Dazu wurde nach Zugabe der Standards 4nNP und 4nPentP (je 5 nmol) die Folienprobe zunächst 15 Minuten mit 20 mL Dichlormethan im Ultraschallbad extrahiert. Die Lösung wurde abdekantiert und die Folienreste wurden mit 5 mL Dichlormethan nachgespült. Eine

zweite Extraktion derselben Folie erfolgte unter denselben Bedingungen. Anschließend wurden die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer auf etwa 2 mL eingengt. Die Derivatisierung fand dann wie in den Kapiteln 7 und 9 beschreiben durch Zugabe von 11 mg FCC und 15 mg DMAP statt. Eine separat derivatisierte dritte Extraktion von bereits extrahierten Folien ergab nur vernachlässigbare Analytmengen (1 – 2% der Erstextraktion).



**Abbildung 8-4: Analysenschema Nonylphenole in Frischhaltefolien**

### 8.3 Detektionsprobleme Nonylphenolferrocenester

Ein generelles Problem bei der Analyse schwerflüchtiger Analyten sind unvollständige Verdampfung oder Adsorptionseffekte im chromatographischen System. In [62] traten bereits Reproduzierbarkeitsschwierigkeiten der Peakflächenverhältnisse von Ferrocenestern auf, wobei die spät eluierenden Peaks von 4nNPE und 9PhenE am stärksten betroffen waren.

Diese Peaks zeigten häufig im Verhältnis zu anderen Ferrocenesterstandards zu kleine Peakflächen. Vermutet wurde, dass kalte Stellen im chromatographischen System die Ursache waren. Tatsächlich konnte das Problem durch höhere Gerätetemperaturen verringert werden, wobei sowohl die Endtemperatur des Programms des Gaschromatographen wie auch die Temperaturen der Transferline zum AED und der Plasmakammer (Cavity) jeweils auf 320°C erhöht wurden. Bei späteren Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch mit der in [62] verwendeten Methode erneut stark verringerte Peakflächen von 4nNPE gefunden (siehe Tabelle 8-2, 1. Zeile). Deshalb wurde anhand der wiederholten Injektion einer Standardlösung der Einfluss der Injektionsparameter eingehender untersucht. Die Standards 4NPE-Gemisch, 4nNPE und 345TMPE wurden jeweils in gleichen Mengen eingesetzt, so dass die Peakflächenverhältnisse in Tabelle 8-2 jeweils gleich Eins sein sollten. Zusätzlich wurde das GC-Temperaturprogramm optimiert. Die Dauer eines GC-Laufs konnte so von 18 auf 13 Minuten verkürzt werden, ohne die Trennung der Analyten zu verschlechtern.

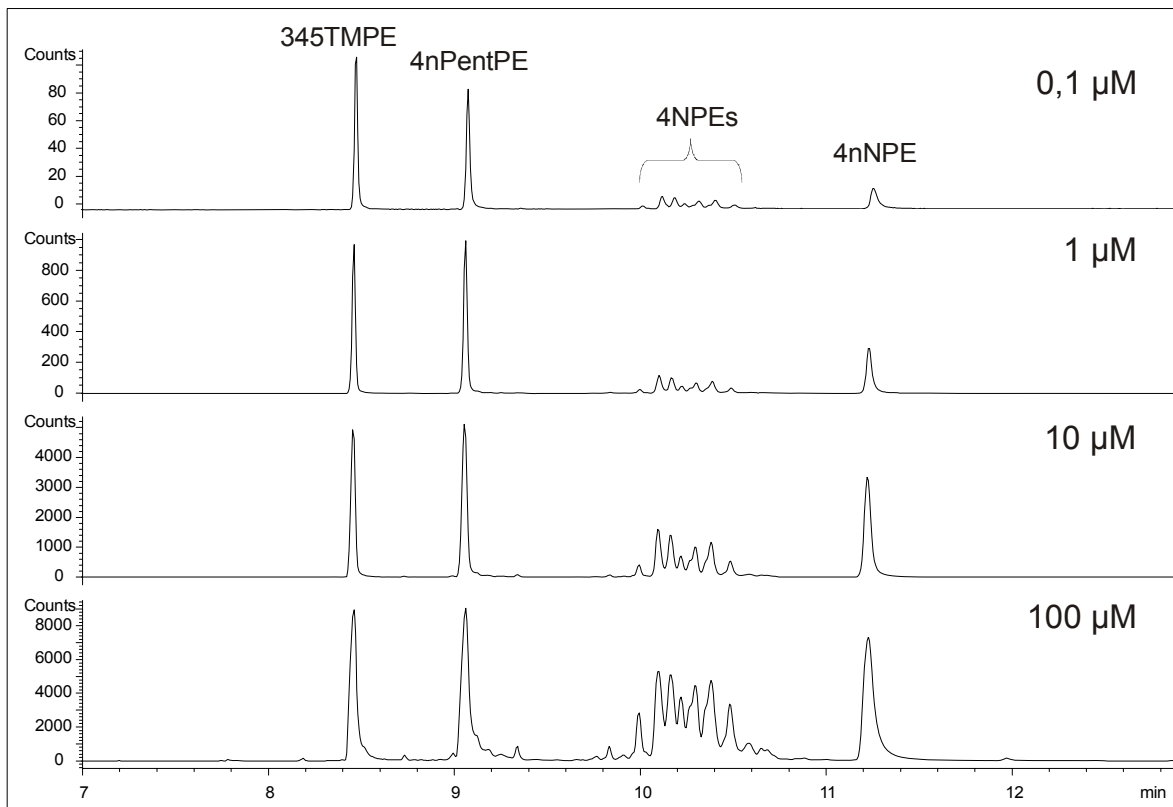
Wie in Tabelle 8-2 dargestellt, ist eine Erhöhung der Splitloszeit auf mindestens drei Minuten bei heißem Injektor sowie die Verwendung eines Liners ohne Glaswollefüllung wichtig für eine quantitative Elution des 4nNPE-Peaks. Auch Cavity- und Transferline-Temperaturen sollten nicht unter 320° gewählt werden, um die Kondensation der Analyten an kalten Stellen im System zu verhindern. Mit optimierten Messbedingungen (siehe Tabelle 8-2, letzte Zeile) wurden zunächst im Rahmen der Messgenauigkeit die erwarteten Peakflächenverhältnisse von Eins gefunden.

**Tabelle 8-2: Auswirkung der Gerätetemperaturen auf Peakflächenverhältnisse am GC-AED**

Liner	Injektortemperatur (Splitloszeit)	GC-Temperaturprogramm	Cavity- + Transferline-Temperatur	Fläche 4NPEs/ 345TMPE	Fläche 4nNPE/ 345TMPE
Glaswolle	60 °C → 300 °C (2 min)	60-1-40-285-5-20-320-5	320 °C	<b>0,71</b>	<b>0,11</b>
Glaswolle	310 °C (3 min)	60-1-40-285-5-20-320-5	300 °C	<b>0,53</b>	<b>0,20</b>
Glaswolle	300 °C (3 min)	60-1-40-285-5-20-320-5	320 °C	<b>0,84</b>	<b>0,51</b>
Glaswolle	310 °C (4 min)	60-1-45-295-1-10-320-4	320 °C	<b>0,89</b>	<b>0,59</b>
ungefüllt	310 °C (4 min)	60-1-45-295-1-10-320-4	320 °C	<b>1,09</b>	<b>0,96</b>

Ein anschließender vierfach durchgeführter Derivatisierungstest von je 5 nmol der Nonylphenolstandards 4NP-Mix und 4nNP zeigte zufrieden stellende Ergebnisse. Das technische Gemisch wurde mit einer Ausbeute von 109% derivatisiert (relative Standardabweichung 6%), während 4nNP eine Derivatisierungsausbeute von 84% aufwies (relative Standardabweichung 12%). Die Standardabweichung der 4nNP-Ausbeute dieser vier Derivatisierungen war akzeptabel, aber höher als bei niedriger alkylierten Phenolen üblich (z.B. RSD < 6% für OPP und OBP, siehe Kapitel 7.1.2). Der geringe Überbefund im technischen Gemisch ist nur durch Integrationsfehler erklärbar, da eine parallel analysierte Blindprobe keine Kontamination durch Nonylphenole aufwies.

Später wurden jedoch auch mit dem in Tabelle 8-2 (Zeile 5) vorgestellten optimiertem Messprogramm geringere Peakflächen des 4nNPE-Peaks als erwartet gefunden. Bei näherer Untersuchung anhand von Standardlösungen, welche aus einer Stammlösung verdünnt wurden, wurde zusätzlich eine Konzentrationsabhängigkeit der Flächenverhältnisse festgestellt (siehe Abbildung 8-5 und Tabelle 8-3).



**Abbildung 8-5: Verdünnungsreihe Ferrocenesterstandards (eisenselektive GC-AED Chromatogramme)**

**Tabelle 8-3: Peakflächenverhältnisse der Ferrocenesterstandards einer Verdünnungsreihe**

Konzentration	Flächenverhältnis 4nPentPE/345TMPE	Flächenverhältnis 4NPEs/345TMPE	Flächenverhältnis 4nNPE/345TMPE	Flächenverhältnis 4NPEs/4nNPE
0,1 µM	0,88	0,62	0,31	1,99
1 µM	1,14	0,86	0,59	1,45
10 µM	1,21	1,82	1,09	1,66
100 µM	1,08	3,47	1,32	2,64

Die höchste Konzentration von 100 µM (unterstes Chromatogramm) lag schon deutlich oberhalb des linearen Bereichs, wie an der nur etwa dreifachen Peakfläche von 345TMPE im Vergleich zur zehnfach niedriger konzentrierten 10 µM-Lösung erkennbar war (siehe Tabelle 8-3). Bei einer Verteilung der Emissionsintensität auf viele Peaks im technischen Gemisch der Nonylphenolester ist der lineare Bereich des Detektorresponses nicht so stark überschritten, wie bei einem einzigen, schmalen Peak. Daher zeigte das 4NPE-Gemisch eine im Verhältnis zu 345TMPE um Faktor 3,5 erhöhte Peakfläche. Auch die Analyse der 10 µM-Lösung zeigte schon eine Überschreitung des linearen Bereichs an, weshalb Konzentrationen unter 10 µM analysiert werden sollten. Bei kleinen Konzentrationen sind die Flächen der Nonylphenolester dagegen zu klein im Vergleich zu 345TMPE und 4nPentPE. Wie auch in Tabelle 8-2 zu sehen ist, wurde der 4nNPE-Peak dabei deutlich stärker beeinflusst als die 4NPE-Peaks des Gemisches. Bei der Analyse der 0,1 µM-Lösung betrug die Fläche des 4nNPE-Peaks nur 31% der Fläche des 345TMPE-Peaks (bei gleicher Konzentration), während die integrierte Fläche der 4NPE-Peaks des Gemisches noch 62% der Fläche des 345TMPE-Peaks betrug.

Konzentrationsabhängige Effekte deuten auf Adsorption der Analyten im analytischen System hin. Ein Verlust einer jeweils gleichen Menge an Analyt wirkt sich bei kleiner Konzentration wesentlich stärker aus als bei großer Konzentration. Das Problem konnte jedoch weder durch Linerwechsel, noch durch Discharge-Tube-Wechsel<sup>9</sup>, durch Tausch der Säule oder weiter erhöhte Injektor-, Cavity- oder Transferlinetemperaturen nachhaltig behoben werden. Auch bei anderen Detektoren (FID, MS) traten verminderte Peakflächen des 4nNPE auf, so dass ein chromatographisches Problem wahrscheinlich ist. Die genaue Ursache konnte allerdings nicht ermittelt werden. Eine verlässliche Analyse von Realproben ist somit nur möglich, wenn zuvor sichergestellt wird, dass zum Analysenzeitpunkt das Peakflächenverhältnis der Standards gleich Eins ist. Ansonsten ist vor der Analyse ein

<sup>9</sup> GC-AED-Entladungsröhrchen, in dem das Plasma brennt

Anpassen des Konzentrationsbereiches der Probe (durch Verdünnung oder Aufkonzentration) oder eine vollständige Gerätewartung nötig.

## 8.4 Ergebnisse der Folienanalysen mittels GC-AED

Nach der Optimierung der Messparameter (Tabelle 8-2) wurden einige Folienextrakte mittels GC-AED analysiert, bei denen aufgrund der Erwartung entsprechender Peakflächenverhältnisse der Standards (4nNPE zu 345TMPE) auswertbare Ergebnisse erhalten wurden. Die Gehalte (berechnet mit 4nNP als internem Standard) sind in Tabelle 8-4 zusammengefasst. Die GC-Analyse der weiteren Extrakte ergab wegen der in Kapitel 8.3 erwähnten Probleme abweichende Gehalte (höhere im Vergleich zu 4nNP und niedrigere im Vergleich zu 345TMPE), so dass diese Daten nicht verwendet werden konnten.

**Tabelle 8-4: Nonylphenolgehalte in Folien nach GC-AED-Bestimmung (Angaben in µg/g, RSD in Klammern)**

	<b>Peakflächenverhältnis 4nNPE/345TMPE (RSD, n = 3)</b>	<b>Gehalt 4NPs (RSD, n = 3)</b>
Folie, Extrakt 1	0,99 (6%)	4,0 µg/g (4%)
Folie, Extrakt 2	1,06 (2%)	4,1 µg/g (5%)

Belastungen von Verpackungsmaterialien mit Nonylphenolen scheinen über einen sehr weiten Bereich zu variieren. Ozaki [80] fand zum Beispiel in 43% der untersuchten Kunststoff- und Gummimaterialien Gehalte zwischen 2,6 und 513 µg/g (ohne direkte Korrelation zum Material), so dass der gefundene Gehalt einer eher gering belasteten Folie entspricht.



## 8.5 Vergleich mit HPLC-MS und HPLC-UV

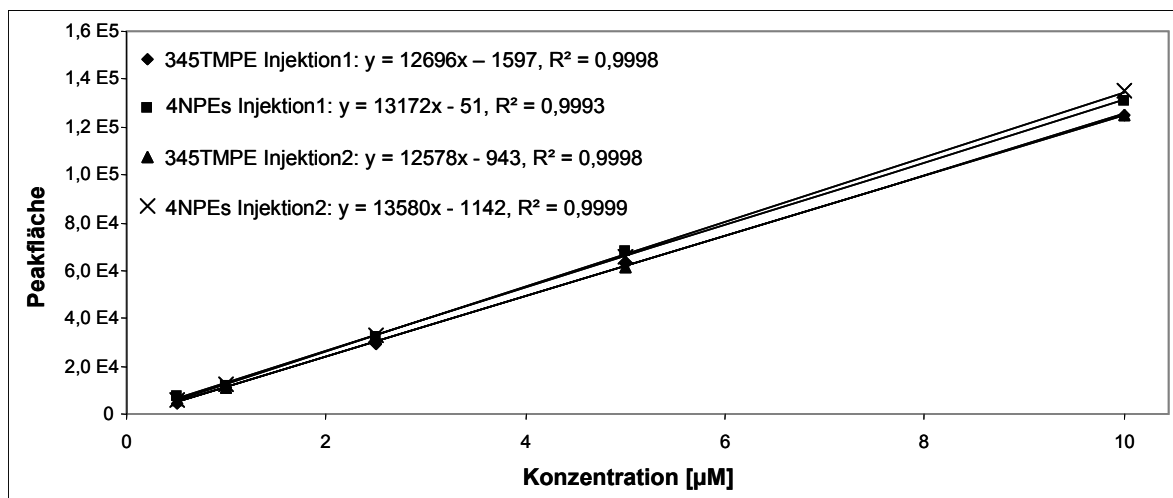
Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen wurden durch HPLC-Analysen überprüft. Damit sollte die Ursache der Reproduzierbarkeitsschwierigkeiten eingegrenzt werden, indem dieselben Extrakte mit einer unabhängigen Analysenmethode untersucht wurden. Zudem sollte die prinzipielle Eignung der Derivatisierung für die flüssigchromatographische Analyse gezeigt werden. Zur HPLC-Analyse mussten Standards und Folienextrakte in ein zu Umkehrphasen kompatibles Lösungsmittel überführt werden. Acetonitril erwies sich als geeignet für Ferrocenesterstandards, konnte aber die derivatisierten Folienextrakte nicht lösen. Mit Tetrahydrofuran wurde bei allen Proben eine homogene Lösung erhalten und die Ferrocenester waren darin über mehrere Wochen stabil.

Die HPLC-Analyse erfolgte auf einer C<sub>18</sub>-Säule (Supelco Discovery Bio Wide Pore) mit einem Laufmittelgradienten aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure und Acetonitril (60% bis 90% Acetonitril innerhalb von 11,6 min, anschließend eine weitere Minute 90% Acetonitril). Unter den gewählten HPLC-Bedingungen eluierten die Isomere der Ester des technischen Nonylphenolgemisches als ein Peak, während der interne Standard 4nNPE kurze Zeit später, fast basisliniengetrennt von den 4NPE-Isomeren, eluierte. Die weiteren internen Standards 345TMPE und 4nPentPE wurden deutlich weniger retardiert, so dass die Elutionsreihenfolge der Ferrocenester wie im GC-Chromatogramm blieb. Eine Quantifizierung war trotz relativ breiter Peaks (Peakbreite an der Basislinie etwa 1 min) gut möglich. Unerwartet war, dass der Peak von 4nNPE selbst in Kalibrationsstandards ebenso breit war wie der Peak des Isomerengemisches der 4NPEs. Die Retentionseigenschaften der unterschiedlich verzweigten 4NPE-Isomere unterschieden sich also unter den gewählten Analysenbedingungen kaum.

Als Massenanalysator wurde ein „Q-Trap“-Instrument verwendet, was ähnlich wie ein „Triple-Quadrupol“-Instrument aufgebaut ist, wobei der dritte Quadrupol aber durch eine lineare Ionenfalle ersetzt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Massenanalysator jedoch im einfachen SIM-Modus wie ein „Single-Quadrupol“-Instrument verwendet. Das Massenspektrum nach Elektrospray-Ionisierung wurde wie erwartet durch den Quasimolekülionenpeak dominiert, der durch Protonierung des Ferrocenesters entsteht. Mit deutlich geringeren Intensitäten waren im Spektrum die Fragmente mit  $m/z$  338, 231 (Ferrocencarbonsäure+H<sup>+</sup>) und 213 (Ferrocen-CO<sup>+</sup>) zu erkennen. Für die Bestimmung im SIM-Modus wurden daher die Massen mit  $m/z$  (M+1) ausgewählt. Die UV-Detektion erfolgte vor dem Einlass ins Massenspektrometer bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die Ionisierung im Massenspektrometer war schlecht reproduzierbar. Die Standardabweichung der Peakfläche des in konstanter Menge zur Kalibrationsreihe zugegebenen 4nNPE betrug 15,8%, obwohl hier keine Störung durch Matrix vorlag. Die Kalibrationsgeraden waren im untersuchten Bereich von 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$  linear. Allerdings betrugen die Korrelationskoeffizienten im Bereich zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{M}$  aufgrund der starken Schwankungen nur zwischen 0,95 und 0,99. Bei der dreifachen Injektion von Folienextrakten betrug die Standardabweichung der Peakflächen sogar bis zu 50%.

Die UV-Detektion war dagegen deutlich besser reproduzierbar mit Standardabweichungen der Peakflächen von 1-3% bei Standards und maximal 5% in Realproben. Die Schwankung konnte somit weder an Pipettierfehlern (bei der Kalibrationsreihe) noch an Abweichungen bei der Chromatographie oder Injektion liegen. Wahrscheinlich lag ein gerätetechnisches Problem bei der Ionisierung oder Überführung der Ionen ins Spektrometer vor. Mittels UV-Detektion waren die Kalibrationsgeraden zwischen 0,5 und 100  $\mu\text{M}$  linear mit Korrelationskoeffizienten von  $R^2 > 0,9999$  (oder  $R^2 > 0,999$  unter Auslassung von 100  $\mu\text{M}$ ).



**Abbildung 8-6: Kalibrationsgeraden der Ferrocencester 345TMPE und 4NPEs (technisches Gemisch) mittels HPLC-UV**

Die UV-Detektion war bei der Analyse der Folien trotz schlechterer Nachweisgrenzen empfindlich genug für die Bestimmung von 4NPs in 0,5 g Frischhaltefolien. Der 4nNPE-Peak zeigte zwar eine unregelmäßige Peakform (siehe Abbildung 8-7), wurde aber trotzdem mit reproduzierbaren Ergebnissen als Standard verwendet. Bei früheren Retentionszeiten zeigten sich störende Matrixinterferenzen, weshalb 345TMPE und 4nPentPE nicht als Standards verwendet werden konnten. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen der sechs derivatisierten Folienextrakte sind in Tabelle 8-5 zusammengefasst.

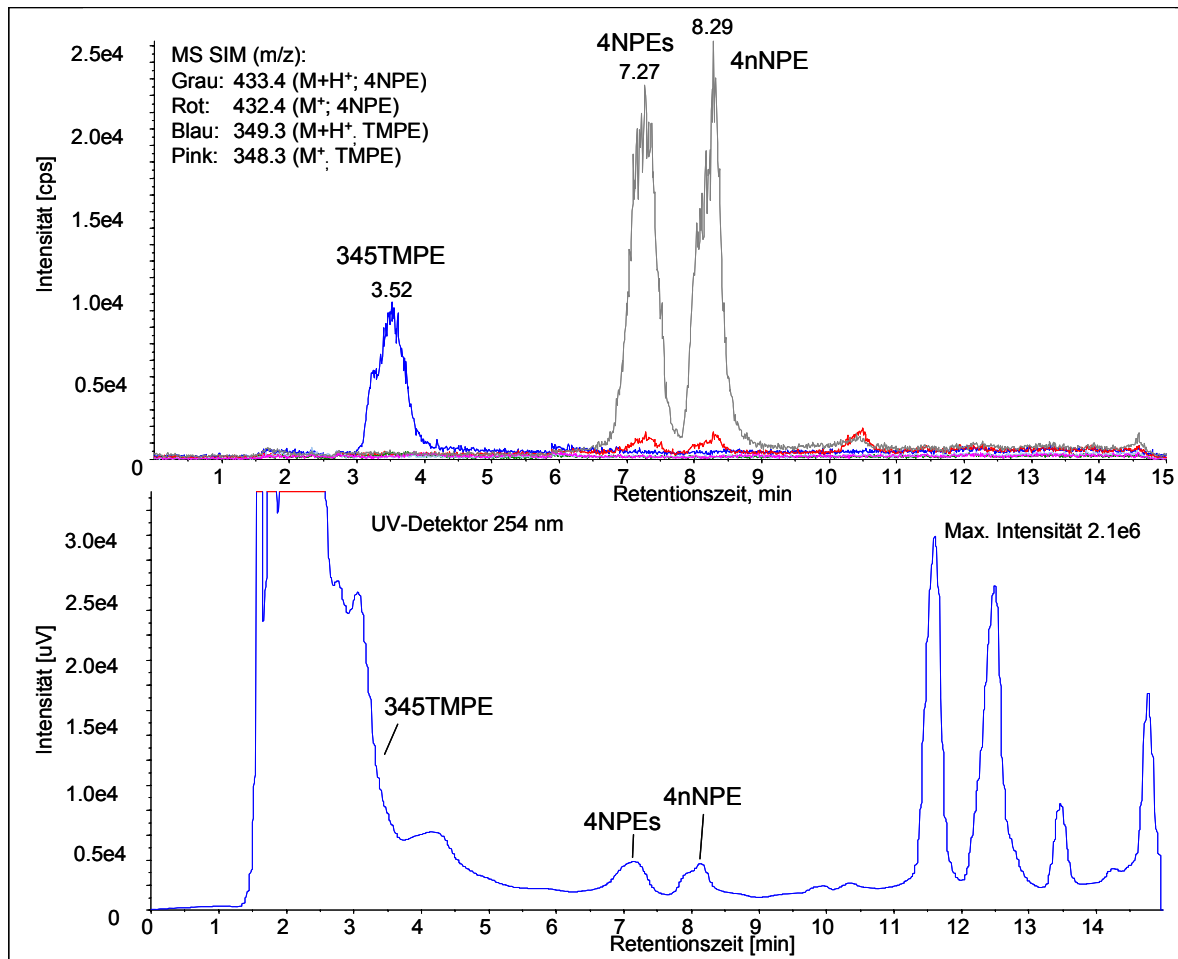


Abbildung 8-7: HPLC-MS und -UV Chromatogramme eines derivatisierten Folienextraktes

Tabelle 8-5: Nonylphenolgehalte in Folien, HPLC-Bestimmung (Angaben in µg/g)

	LC-MS (SIM) (RSD, n = 3)	LC-UV (254 nm) (RSD, n = 3)
Folie, Extrakt 1	3,0 µg/g (25%)	2,96 µg/g (1,8%)
Folie, Extrakt 2	2,4 µg/g (4%)	3,01 µg/g (0,4%)
Folie, Extrakt 3	4,2 µg/g (6%)	3,02 µg/g (1,4%)
Folie, Extrakt 4	2,5 µg/g (19%)	3,09 µg/g (0,5%)
Folie, Extrakt 5	3,0 µg/g (10%)	2,44 µg/g (0,7%)
Folie, Extrakt 6	3,1 µg/g (1%)	2,72 µg/g (3,7%)
<b>Mittelwert (RSD, n = 6)</b>	<b>3 µg/g (21%)</b>	<b>2,9 µg/g (8,6%)</b>

Die erhaltenen Ergebnisse mittels MS-Detektion und UV-Detektion stimmten gut überein, wobei die Standardabweichung der LC-MS-Analyse mit 21% allerdings sehr hoch war. Die ermittelten Gehalte lagen mit 3 µg/g etwas niedriger als der mittels GC-AED ermittelte Gehalt derselben Extrakte von 4 µg/g. (siehe Tabelle 8-4). Eine Abweichung von 25% kann allerdings bei Spurenanalysen noch als akzeptabel angesehen werden.

## 8.6 Zusammenfassung

Nonylphenolferrocenester sind relativ schwer flüchtig, erreichen aber noch nicht die Grenze der GC-Gängigkeit. In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass eine reproduzierbare quantitative Analyse dieser langkettigen Alkylphenolester mittels GC schwierig ist. Es traten schlecht reproduzierbare Analytverluste auf, deren Ursache nicht im Detail geklärt werden konnte. Wahrscheinlich waren Adsorptionseffekte an kalten Stellen im GC-AED-System oder an aktiven Stellen für die Verluste verantwortlich. Der Ferrocenester des internen Standards 4nNP wurde deutlich stärker von den chromatographischen Problemen beeinflusst als die Ferrocenester des technischen Nonylphenolgemisches. Flüchtigere Ferrocenester wie 3,4,5-Trimethylphenolester (345TMPE) oder 4-n-Pentylphenolester (4nPentPE) wurden nicht beeinflusst. Durch Zusatz von 345TMPE und 4nPentP als Kontrollstandards konnte daher als Qualitätssicherungsmaßnahme überprüft werden, ob das Peakflächenverhältnis von 4nNPE zu den Kontrollstandards bei gleicher Konzentration gleich Eins war. War dies der Fall, trat das chromatographische Problem nicht auf, und die Analyse der Nonylphenole in Folienproben konnte mit guter Reproduzierbarkeit durchgeführt werden.

Die Vergleichsmessungen mit HPLC-UV haben gezeigt, dass Nonylphenole aus Frischhaltefolien mit einer Standardabweichung von unter 9% reproduzierbar bestimmt werden können. Somit wurde gezeigt, dass die Extraktion mittels Dichlormethan im Ultraschallbad sowie die Derivatisierung von 4NPs präzise funktionieren. Die LC-MS-Analyse erwies sich allerdings als problematisch. Die massenspektrometrische Detektion mittels Q-Trap-Analysator war schon bei Kalibrationsstandards schlecht reproduzierbar. Bei Folienproben betrug die Schwankung der Peakflächen von Injektion zu Injektion bis zu 50% und die Standardabweichung der Gehalte über 20%. Hier könnte ein instrumentelles Problem bei der Ionisierung oder der Überführung der Ionen ins Massenspektrometer vorliegen.

---

Wenn Qualitätssicherungsmaßnahmen beachtet wurden, waren die erhaltenen Ergebnisse nach GC-AED-Analyse vergleichbar mit HPLC-UV-Ergebnissen. Die Abweichung der Gehalte betrug hier 25%. Im Vergleich dazu wurden in [61] Streuungen von im Rahmen eines Ringversuches ermittelten Nonylphenolgehalten beschrieben. Selbst in Standardlösung wurden Gehalte von 25 bis 125% des nominellen Gehalts bestimmt. Im Technikvergleich zeigten die beiden entwickelten Analysenmethoden also trotz bestehender analytischer Probleme besser reproduzierbare Ergebnisse als in der Literatur beschriebene Methoden. Allerdings wurde die Qualität der Extraktion nicht durch einen Ringversuch oder Vergleich mit einer unabhängigen Methode überprüft. Vor einem Routineeinsatz der entwickelten Methoden müsste daher noch eine intensivere Validierung erfolgen.

Der ermittelte Nonylphenolgehalt in der untersuchten Folie ist im Vergleich zu Literaturwerten als eher gering einzustufen. Um die mögliche Aufnahme von Nonylphenol aus dieser Folie durch die Migration in Lebensmittel quantifizieren zu können, müssten aber in Zukunft detaillierte Migrationsstudien mit echten Lebensmitteln oder zumindest mit Ersatzlösungen (wie *n*-Heptan für fettige Lebensmittel) erfolgen.

## 9 ALKYLPHENOLE IN ENTSCHEFELTEN HEIZÖLEN

Alkylphenole sind wie in Kapitel 3.2 beschrieben wichtige Spurenbestandteile von Kraftstoffen, welche Schmierfähigkeit und Lagerstabilität sowohl positiv wie auch negativ beeinflussen können. Durch Entschwefelungsverfahren werden Phenole als Nebenreaktion teilweise aus dem Kraftstoff entfernt, wobei aber kaum bekannt ist, wie Phenolgehalte und Phenolmuster in Abhängigkeit von den Entschwefelungsbedingungen verändert werden. Besonders interessant ist die Analyse von Phenolen in modernen Kraftstoffen mit zugesetztem Biodiesel. Dieser enthält ungesättigte Fettsäureester, die leicht oxidiert werden können, so dass die antioxidative Wirkung von Phenolen besonders wichtig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Analysenmethode von Rolfes [54] und Wasinski [3] modifiziert, um Phenole in verschiedenen entschwefelten Heizölen und Dieselmotorkraftstoffen zu bestimmen, darunter auch in mit Biodiesel versetzten Heizölen. Sowohl GC-AED als auch GC-MS wurden eingesetzt, um quantitative und qualitative Daten sowohl über Gehalte einzelner Phenole als auch über Summenparameter zu erhalten. Damit wurde die Auswirkung zweier verschiedener Entschwefelungsmethoden auf Alkylphenole teilweise aufgeklärt. Diese Daten sollen dazu beitragen, den Mechanismus der Entschwefelung besser zu verstehen. Gegebenenfalls können dann die Parameter des Entschwefelungsprozesses so angepasst werden, dass Schmierfähigkeit und Lagerstabilität des Kraftstoffes günstig beeinflusst werden.

Phenole in Erdöl und Kraftstoffen werden meistens mittels Gaschromatographie mit Flammenionisations- oder massenspektrometrischer Detektion [25-28, 30, 47, 48, 87, 88] oder mittels Flüssigchromatographie und UV- oder elektrochemischer Detektion [30, 31, 37, 38] untersucht. HPLC eignet sich aufgrund der geringeren Trennleistung nur für die Bestimmung kleiner Phenole (maximal Dimethylphenole) und für die Bestimmung von Summenparametern. Zur Probenvorbereitung werden die in Spuren auftretenden Phenole üblicherweise aus der Kohlenwasserstoffmatrix mit Hilfe von Flüssig-Flüssig-Extraktion [25, 27, 28, 37, 38, 88], SPE und/oder Flüssigchromatographie [26, 30, 37, 47, 87, 88] isoliert und gleichzeitig aufkonzentriert. Diese Probenvorbereitungsmethoden sind häufig zeitaufwändig und es besteht das Risiko von Analytverlusten, da sie die Differenz der Polarität zwischen Alkylphenolen und Kraftstoffmatrix ausnutzen. Phenole mit großen Alkylgruppen sind aber wesentlich unpolarer als Phenol selbst und werden damit eventuell nicht quantitativ erfasst. In [30] wurden zum Beispiel 2- und 6-substituierte C<sub>3</sub>- bis C<sub>5</sub>-Phenole in der Alkan-/Aromatenfraktion gefunden und damit nicht in der Phenolfraction berücksichtigt. Wiederfindungsraten in der Literatur gelten, wenn sie überhaupt angegeben

wurden, häufig nur für kleinere Phenole und sind mit hohen Phenolkonzentrationen bestimmt worden. Häufig werden überhaupt nur C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole untersucht (z.B. [26, 48, 87, 89]).

**Tabelle 9-1: Literaturüberblick der Analyse von Alkylphenolen in Erdölprodukten**

Erst- autor	Matrix	Methode	Proben- vorbereitung	Zeit- be- darf	Repro- duzier- barkeit	Wieder- findung	Proben- menge
Hughes [28]	Flugzeug- benzin	GC-FID + GC-MS	Alkalische LLE, Rückextraktion	mittel	n.a.	n.a.	100 mL
Balster [30]	Flugzeug- benzin	HPLC- UV	Keine (keine Einzel- bestimmung, nur Summe polarer Substanzen)	gering	n.a.	n.a.	100 µL
„	Flugzeug- benzin	GC-MS	SPE + HPLC	hoch	n.a.	n.a.	10 mL
Link [88]	Flugzeug- benzin	GC-MS	LLE (Methanol), HPLC	hoch	n.a.	52-94%	n.a.
Laespada [31]	Rohöl, Benzin, Diesel	HPLC- ECD /UV	automatische Membran- extraktion	gering	n.a.	n.a.	ca. 25 g
Green [47]	Kraftstoff	GC-MS	IC, HPLC, Deriv. mit TFA	hoch	n.a.	n.a.	n.a.
MacCre- han [37]	Rohöl	HPLC- ECD	alkal. LLE, SPE- Aufreinigung, LLE, Standardaddition	hoch	n.a.	n.a.	0,5 g
Ioppolo [27]	Rohöl	GC-FID + GC-MS	LLE (3x, verschie- dene Lsgm.)	hoch	n.a.	75-95% (10µg, n=6)	2-5 g
Taylor [25]	Rohöl	GC-MS	LLE (3x, versch. Lsgm.), Deriv. mit BSTFA	sehr hoch	RSD 2-27%	66-90% (Phenol 41%)	1 g
Bennett [38]	Rohöl	HPLC- ECD	SPE oder alkal. LLE	mittel	RSD 4-9%	73-94% (n=6)	0,5 mL
Bennett [87]	Rohöl	GC-MS	SPE, Deriv. mit BSTFA	mittel	n.a.	n.a.	100 mg
Bastow [26]	Rohöl	GC-MS	SPE	gering	n.a.	n.a.	80 - 100 mg
Galim- berti [48]	Rohöl	GC-MS (NCI)	Deriv. mit PFBBR	gering	RSD 5%	n.a.	100 mg

Andere Autoren [48, 87] verzichteten aufgrund der beschriebenen Probleme bei der Probenvorbereitung weitgehend auf die Abtrennung der Matrix. Sie setzten selektive Detektoren ein, was allerdings meist zu starker Kontamination des chromatographischen Systems führte, und damit häufige Wartung nach sich zog.

Die Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäurechlorid in Gegenwart der Matrix hat den Vorteil, dass die Hydroxygruppe des Phenols direkt markiert wird und die Kohlenwasserstoffe aufgrund der selektiven Detektion (GC-AED im eisenselektiven Modus) eigentlich nicht abgetrennt werden müssen. Allerdings besteht dann, wie beschrieben, die Gefahr der Kontamination des chromatographischen Systems, so dass ein Mittelweg gewählt wurde. Nach der Derivatisierung werden zwei kurze Aluminiumoxidsäulen eingesetzt, um auf der ersten Säule überschüssige Reagenzien und auf der zweiten Säule den Großteil der Kohlenwasserstoffe abzutrennen. Eine quantitative Abtrennung ist nicht nötig, so dass Analytverluste im Grenzbereich der Polarität vermieden werden. Polare, aggressive Bestandteile von Öl und Kraftstoff werden ebenso entfernt.

Bezüglich der Derivatisierung ist zu beachten, dass sterisch stark gehinderte Phenole (wie synthetische Antioxidantien mit *tert*-Butylgruppen in *ortho*-Stellung) nicht quantitativ derivatisiert werden. Lange Alkylketten an *p*- oder *m*-Position stellen dagegen kein Problem für die Derivatisierung dar. Sie können also quantitativ erfasst werden, was ein Vorteil gegenüber anderen Verfahren ist, bei denen diese Phenole bei der Aufreinigung verloren gehen.

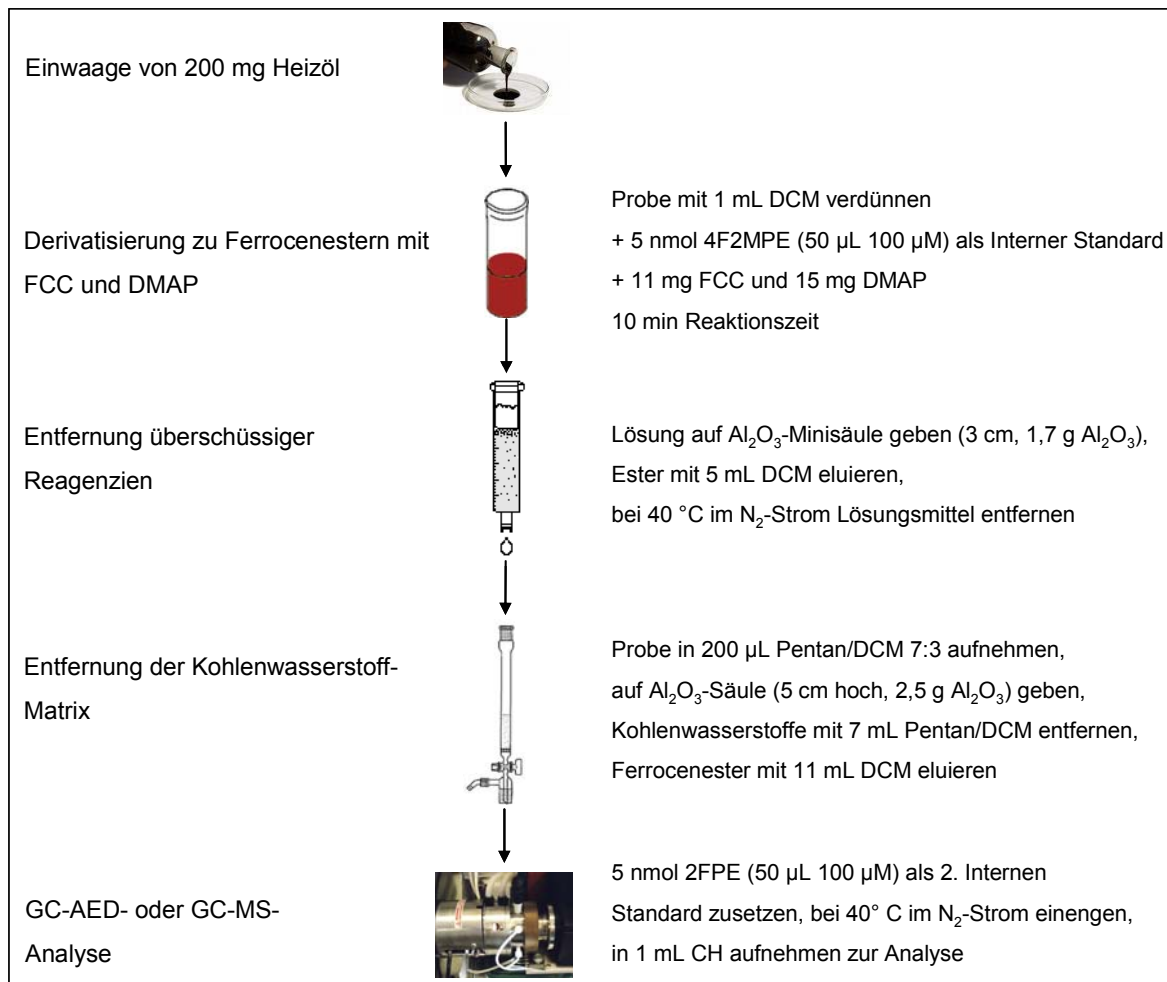
## 9.1 Probenvorbereitung

Da sowohl die quantitative Analyse mittels GC-AED als auch die qualitative Analyse größerer Alkylphenole mittels GC-MS beabsichtigt waren, wurden größere Probenmengen von etwa 200 mg aufgearbeitet. 50  $\mu$ L einer 100  $\mu$ M-Lösung von 4F2MPE in Toluol wurden als erster interner Standard eingesetzt. Zur Derivatisierung wurden wie in Kapitel 5 11 mg FCC und 15 mg DMAP verwendet, die hier allerdings in 1 mL Dichlormethan gelöst zu der unverdünnten Probe zugegeben wurden.

Eine Aluminiumoxid-Minisäule (1,7 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in einer SPE-Glaskartusche) bewährte sich zur Entfernung überschüssiger Reagenzien nach 10 Minuten Reaktionszeit. Analyten und Heizölmatrix wurden mit 5 mL Dichlormethan quantitativ eluiert. Eine zweite gleichartige Aluminiumoxidsäule erwies sich als nicht ausreichend, um die großen Kohlenwasserstoffmengen der Probe von den Ferrocenestern abzutrennen. So wurde stattdessen eine



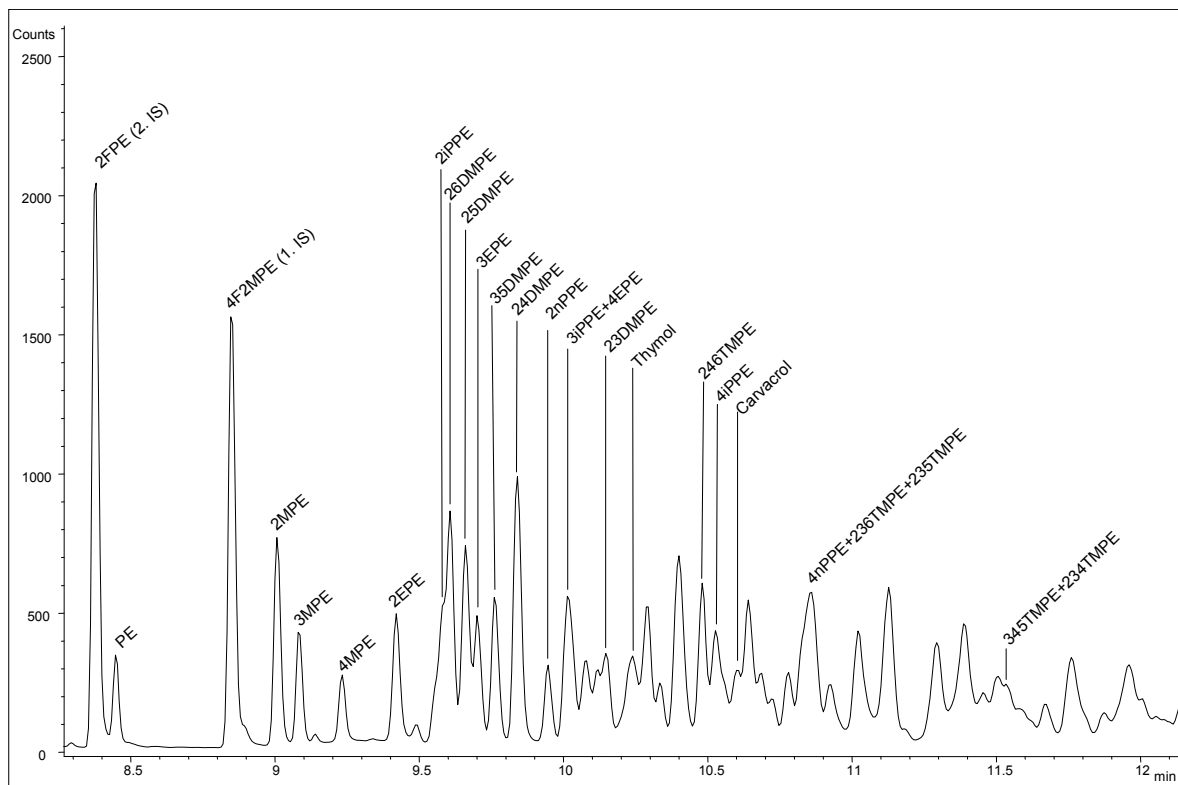
Schwerkraftsäule mit einem Durchmesser von 1 cm und einem 5 cm hohen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Bett eingesetzt (2,5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Mit 7 mL Pentan/Dichlormethan 7:3 (v:v) konnte der Großteil der Aliphaten und Aromaten von der Säule entfernt werden, ohne dass Ferrocenester eluierten. Die Ester wurden anschließend mit 11 mL Dichlormethan eluiert. Diese Elutionsvolumina von Kohlenwasserstoffen und Ferrocenestern wurden durch Analyse kleiner, von der Säule eluierter Fraktionen sowohl mittels GC-FID als auch mittels eisenselektiver GC-AED kontrolliert. Danach wurde 2FPE als zweiter interner Standard zugesetzt. Für die GC-AED-Analyse wurde bei Phenolgehalten von über 100  $\mu\text{g/g}$  etwa 1 mL der derivatisierten Probe entnommen, zur Trockene im Stickstoffstrom eingedunstet und in 1,5 mL Cyclohexan aufgenommen. Bei kleineren Gehalten wurde die gesamte Probe verwendet und nach Entfernen des Dichlormethans in 1,5 mL Cyclohexan aufgenommen, während die Probe für die GC-MS-Analyse in 100 – 200  $\mu\text{L}$  Cyclohexan aufgenommen wurde. Das Injektionsvolumen betrug 1  $\mu\text{L}$ .



**Abbildung 9-1: Analysenschema für Phenole in Heizöl**

## 9.2 Quantitative Analyse mittels GC-AED

Durch Vergleich der Retentionszeiten mit Phenolesterstandards und teilweise durch gemeinsame Injektion von Standards mit derivatisiertem Öl konnten fast alle C<sub>0</sub>- bis C<sub>2</sub>-Phenole sowie einige C<sub>3</sub>-Phenole und die C<sub>4</sub>-Phenole Thymol (2-Isopropyl-5-methylphenol) und Carvacrol (2-Methyl-5-isopropylphenol) identifiziert werden (siehe Abbildung 9-2). Das kommerziell nicht erhältliche 2,3,4-Trimethylphenol (234TMP) wurde als Retentionsstandard synthetisiert. Die Synthesevorschrift dazu, inklusive analytischer Daten, ist im Anhang 13.2.3 beschrieben. Aufgrund unvollständiger Trennung konnte 234TMP nur als Summe mit 345TMP bestimmt werden, ebenso wie 3-*i*-Propylphenol (3iPP) mit 4-Ethylphenol (4EP) und 4-*n*-Propylphenol (4nPP) mit 235- und 236TMP.



**Abbildung 9-2: Eisenselektives GC-AED-Chromatogramm des Öls HDS50 - beschriftete C<sub>0</sub>- bis C<sub>4</sub>-Phenole wurden durch Koinjektion der derivatisierten Probe mit Retentionsstandards identifiziert**

Quantifiziert wurde mit Hilfe des internen Standards 4F2MPE. Überprüft wurde die Quantifizierung durch mehrfache Derivatisierung und Analyse eines Standardphenolgemisches (je 50 µL 100 µM 4MP, 23DMP, 246TMP und OPP) parallel zu den Ölproben, wobei Derivatisierungsausbeuten von 92 bis 100% gefunden wurden. Die Integration erfolgte in diesen komplexen Gemischen automatisch. Dabei wurde die Basislinie durch Extrapolation ab einer Retentionszeit von 8 Minuten (direkt vor Elution der Phenolferrocenester)

definiert. Eine anschließende manuelle Kontrolle der Integrationsgrenzen der nicht vollständig getrennten Peaks wurde durchgeführt. Die Quantifizierung war bei später eluierenden Phenolestern aufgrund von (partiellen) Koelutionen stärker fehlerbehaftet, wie in Abbildung 9-2 zu sehen ist. Es sollten aber für einen aussagekräftigen Mustervergleich aus verschiedenen Ölen möglichst viele Phenole bestimmt werden, so dass alle identifizierten Phenole auch quantifiziert wurden.

Die Angabe einer Nachweisgrenze für Phenole in Öl ist schwierig, da diese für verschiedene Phenole von Störungen aus der Matrix und von Koelutionen abhängig ist. Aufgrund der hohen Zahl der Alkylphenole konnten hierzu keine detaillierten Untersuchungen für jedes Isomer erfolgen. Abgeschätzt liegen die Nachweisgrenzen im Konzentrationsbereich von <10 ng/g Öl.

Zusätzlich zur Bestimmung der einzelnen Phenole sollte ein Gesamtphenolgehalt durch Integration über das gesamte Chromatogramm ab der Retentionszeit von Phenolferrocen-ester bestimmt werden (als Summe aller automatisch integrierter Peaks). Dieses ist möglich, weil der Response des AED proportional zur Zahl der Eisenatome und damit zur Stoffmenge der derivatisierten Phenole ist (siehe auch Kapitel 5). Über den internen Standard 4F2MPE kann dann die Stoffmenge der Phenole bestimmt werden.

Schwefelgehalte werden üblicherweise durch Elementaranalyse bestimmt und dann in  $\mu\text{g}$  Schwefel/g Öl angegeben. Um einen Vergleich der Heizöle bezüglich der Auswirkung der Entschwefelung sowohl auf Schwefelverbindungen als auch auf Phenole zu ermöglichen, sollte der Phenolgehalt in einer vergleichbaren Einheit angegeben werden. So wurde aus der Stoffmenge der Phenole mit der molaren Masse von Sauerstoff ein phenolischer Sauerstoffgehalt in  $\mu\text{g/g}$  Öl berechnet.

Weiterhin sollten Gesamtphenolgehalte auch mit der Summe der bestimmten Einzelkonzentrationen der Phenole vergleichbar sein und daher als  $\mu\text{g}$  Phenole/g Öl angegeben werden. Für diese Berechnung wird die durchschnittliche molare Masse der Phenole in der Probe benötigt. Dazu wurde der Retentionszeitschwerpunkt  $r$  des Chromatogramms nach Gleichung 9-1 (vergleiche [3]) bestimmt.

**Gleichung 9-1: Definition des Retentionsschwerpunktes r**

$$r = \frac{\sum_i t_i * A_i}{\sum_i A_i} \quad (i: \text{laufende Peaknummer, } t: \text{Retentionszeit, } A: \text{Peakfläche})$$

Anschließend wurde diesem Retentionsschwerpunkt eine durchschnittliche molare Masse zugeordnet. Die Zuordnung der Masse geschieht über Vergleich mit GC-MS-Chromatogrammen, in denen man die m/z-Verhältnisse der M<sup>+</sup>-Ionen zu der gegebenen Retentionszeit r im Massenspektrum ablesen kann (wobei hier aufgrund der Koelution verschiedener Alkylierungsgrade und der etwas unterschiedlichen Retentionszeiten auf dem GC-AED- und dem GC-MS-System die Angabe auf +/- 1 CH<sub>2</sub>-Gruppe genau ist). Mit der erhaltenen molaren Masse als Bezug ist so ein Gesamtphenolgehalt berechenbar. Dieser ist nur als halbquantitativ anzusehen, da aufgrund der beschriebenen Fehlerquellen und durch Abweichungen vom molaren Response des AED der Fehler von Wasinski auf 45% geschätzt wurde [3]. In dieser Arbeit wurde ein Vergleich verschiedener Ölproben zur Aufdeckung von Trends des Phenolgehaltes in Abhängigkeit vom Entschwefelungsprozess durchgeführt, weshalb die Reproduzierbarkeit wichtiger war als die absoluten Werte. Für Öle mit höheren Phenolgehalten war der berechnete Gehalt recht gut reproduzierbar mit relativen Standardabweichungen von unter 10%. Bei geringen Phenolgehalten betrugen die relativen Standardabweichungen bis zu 35%, was aber ausreichend war, um signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von den Entschwefelungsbedingungen festzustellen.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse von quantitativen Phenolanalysen in verschieden stark entschwefelten Heizölen und Dieselproben vorgestellt und diskutiert. Die analysierten Proben wurden teilweise durch die neu entwickelte Aachener Adsorptionsentschwefelung, teilweise aber auch durch die klassische Hydrodesulfurierung entschwefelt. Die Auswirkungen dieser beiden Entschwefelungsverfahren auf den Phenolgehalt sollen abschließend verglichen werden.

**9.2.1 Phenole in Heizöl EL nach OWI-Entschwefelung**

Kommerzielles Heizöl EL wurde vom Aachener Oel-Waerme-Institut (OWI) mit Hilfe des Adsorptionsverfahrens an einem Nickelkatalysator entschwefelt (im folgenden OWI-Entschwefelung genannt). Die „Nullprobe“ (S850) stellt dabei das Heizöl vor der Entschwefelung dar. Die restlichen Proben S16 bis S605 wurden nach ansteigender Benutzungsdauer

des Katalysators entnommen (siehe Zeitangaben in Tabelle 9-2) und wiesen steigende Restschwefelgehalte aufgrund der zunehmenden Belegung des Katalysators mit Nickelsulfid auf.

**Tabelle 9-2: Übersicht Heizöle 1, nach OWI-Verfahren entschwefelt (Versuchsbedingungen: T = 200°, p = 5 bar)**

Probenbezeichnung	Bezeichnung OWI + Probeneingangsdatum	Beschreibung	Schwefelgehalt <sup>10</sup>
S850	"Nullprobe" 16.10.06	P7 Heizöl EL unbehandelt	850 ppm
S605	SC-6 / 105h, 9.11.06	Entschwefelt aus S850	605 ppm
S410	SC-24 / 96h, 9.11.06	Entschwefelt aus S850	410 ppm
S210	SC-24 / 72h, 21.12.06	Entschwefelt aus S850	210 ppm
S60	"Entschwefelt", 16.10.06	Entschwefelt aus S850	60 ppm
S16	SC-9, 9.11.06	Entschwefelt aus S850	16 ppm

Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme der Heizölproben sind in Abbildung 9-3 dargestellt. Man erkennt bei allen Proben eine sehr komplexe Verteilung verschieden alkylierter Phenolferrocenester, wobei die Peaks bis zu Retentionszeiten von etwa 10 bis 11 Minuten gut chromatographisch getrennt werden konnten. Bei späteren Retentionszeiten reichte die chromatographische Auflösung dagegen nicht mehr zur Trennung aus. Wie man in Abbildung 9-3 erkennen kann, änderte sich das Phenolmuster durch die Entschwefelung kaum. Nur im Heizöl S16 erscheint die Intensität der später eluierenden größeren Phenol-ester im Vergleich zu den kleineren Phenolestern erhöht zu sein. Dieser optische Eindruck aus dem Chromatogramm konnte durch quantitative Analysen bestätigt werden.

Alle Heizöle wurden jeweils mindestens drei Mal derivatisiert und analysiert. Die daraus bestimmten Mittelwerte der Phenolgehalte sind in µg/g Öl angegeben. Summenparameter sind mit ihren relativen Standardabweichungen in Tabelle 9-3 zusammengefasst. Die Analysenmethode ist mit relativen Standardabweichungen von 2 bis 15% gut reproduzierbar, so dass Unterschiede zwischen den Proben als signifikant anzusehen sind. Gehalte einzelner, identifizierter Phenole sind dagegen in Tabelle 9-4 aufgelistet und beispielhaft mit ihren Standardabweichungen in Abbildung 9-5 dargestellt. Sie werden später diskutiert.

<sup>10</sup> Angabe des OWI Aachen

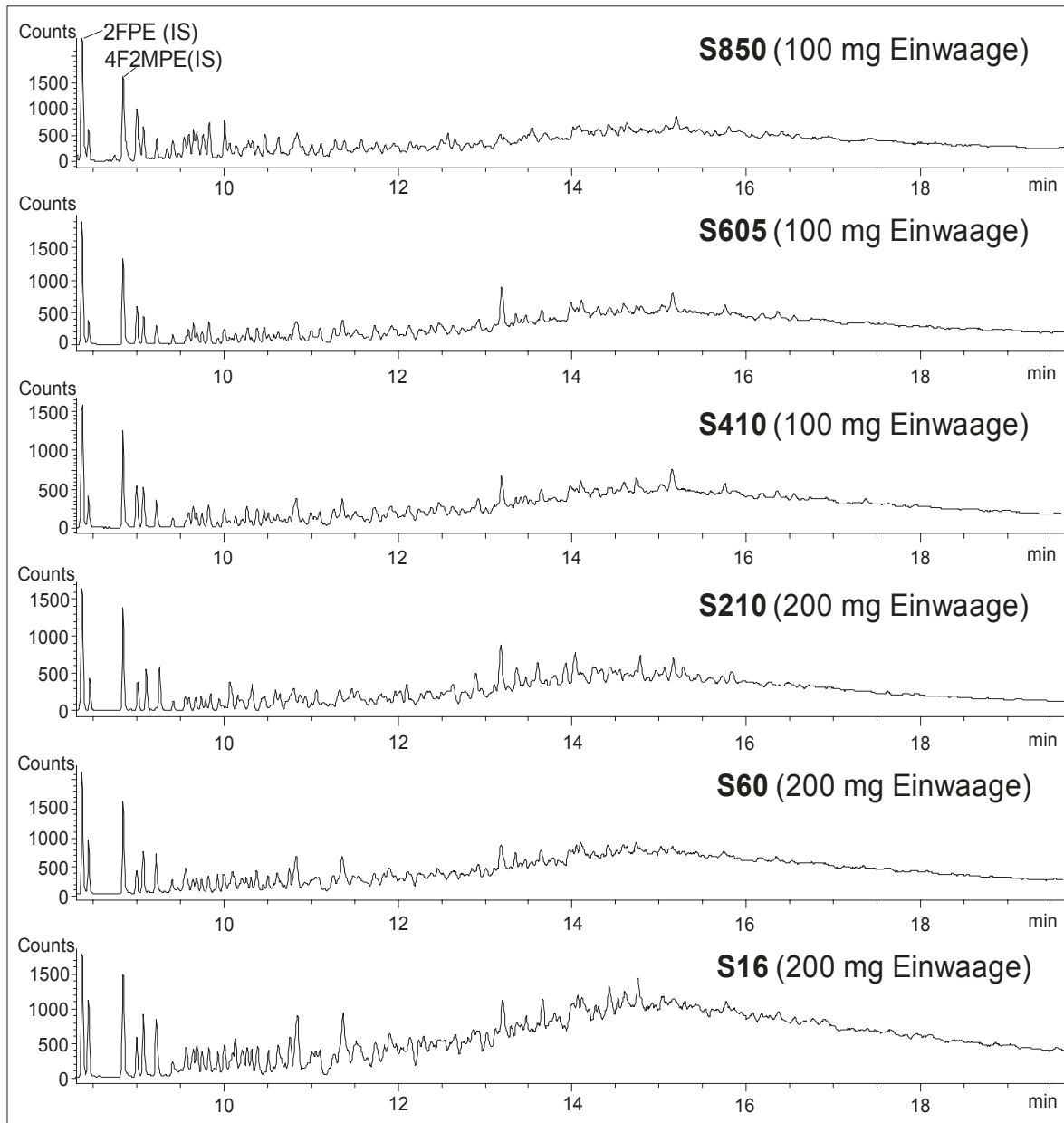
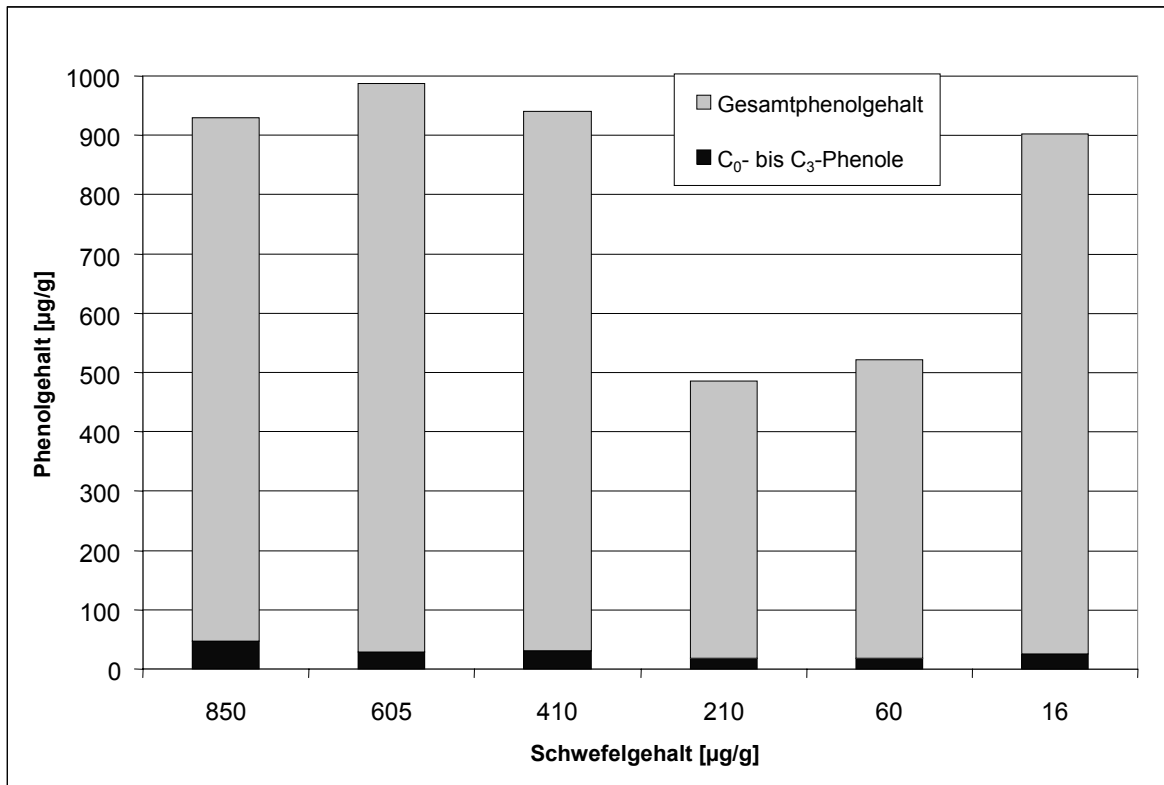


Abbildung 9-3: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme Heizöle S850 bis S16

Tabelle 9-3: **Summenparameter nach OWI-Verfahren entschwefelter Heizöle**  
(Angaben in  $\mu\text{g/g}$  Öl, RSD in Klammern)

	<b>S850</b>	<b>S605</b>	<b>S410</b>	<b>S210</b>	<b>S60</b>	<b>S16</b>
Summe C <sub>0</sub> - bis C <sub>3</sub> -Phenole (RSD)	48 (15%)	29 (5%)	30 (3%)	19 (15%)	19 (4%)	25 (2%)
Phenolischer Sauerstoffgehalt (RSD)	68 (9%)	72 (9%)	68 (5%)	36 (6%)	38 (5%)	66 (1%)
Gesamtphenolgehalt (RSD)	929 (9%)	988 (9%)	941 (5%)	485 (6%)	522 (5%)	903 (1%)



**Abbildung 9-4: Gesamtphenolgehalte und Summe C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole der entschwefelten Heizöle 1**

Die OWI-Entschwefelung verändert den Gesamtphenolgehalt nur geringfügig (abgesehen von den Proben S60 und S210, welche später diskutiert werden). Bei den Heizölen S850, S605, S410 und S16 ist der Phenolgehalt (ausgedrückt als phenolischer Sauerstoff) mit etwa 70 µg/g ähnlich, obwohl der Schwefelgehalt um 98% sinkt (siehe Tabelle 9-3).

Der Gehalt an C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenolen, bestimmt durch Summierung der identifizierten Phenole, sinkt im Gegensatz zum Gesamtphenolgehalt leicht mit fortschreitender Entschwefelung in der Reihe S850 bis S16 von fast 50 auf etwa 20 µg/g. Dass bei der Aachener Entschwefelung generell eher die gering alkylierten Phenole abgebaut werden, die größeren aber praktisch komplett erhalten bleiben, passt auch zum optischen Vergleich der abgebildeten Chromatogramme (siehe Abbildung 9-3).

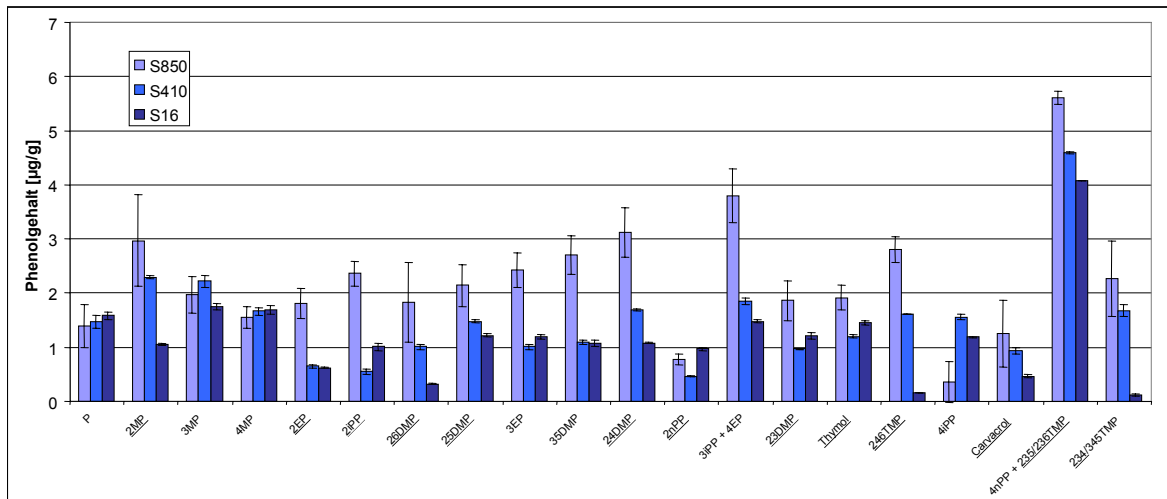
Tabelle 9-4: Phenolgehalte in nach OWI-Verfahren entschwefelten Heizölen (in µg/g Öl)

Phenol	S850	S605	S410	S210	S60	S16
P	1,39	1,19	1,48	0,65	1,21	1,58
2MP	2,97	2,21	2,29	0,74	0,64	1,05
3MP	1,97	1,75	2,22	1,09	1,26	1,76
4MP	1,56	1,17	1,66	1,19	1,38	1,69
2EP	1,81	0,67	0,65	0,34	0,68	0,62
2iPr	2,36	0,57	0,55	0,54	0,52	1,01
26DMP	1,82	1,09	1,01	0,44	1,06	0,33
25DMP	2,14	1,57	1,48	0,51	0,59	1,22
3EP	2,43	0,88	1,01	0,46	0,62	1,20
35DMP	2,71	1,00	1,10	0,41	0,62	1,07
24DMP	3,12	1,80	1,68	0,63	0,73	1,08
2nPP	0,77	0,57	0,46	0,50	0,70	0,97
3iPP + 4EP	3,79	1,60	1,85	1,57	1,08	1,48
23DMP	1,86	0,97	0,97	0,64	0,55	1,22
Thymol	1,92	1,39	1,20	0,59	0,90	1,45
34DMP	1,96	n.b. <sup>11</sup>	n.b.	1,00	n.b.	n.b.
246TMP	2,80	1,69	1,60	0,70	0,46	0,16
4iPP (+Carvacrol)	0,35	1,23	1,56	1,13	0,95	1,19
Carvacrol	1,25	1,04	0,94	n.b.	0,70	0,46
4nPP + 235/236TMP	5,62	4,42	4,59	3,40	2,94	4,08
234/345TMP	2,26	1,79	1,67	1,99	1,40	1,58

Einzelne Phenolgehalte dreier Heizöle aus Tabelle 9-4 sind als Beispiel in Abbildung 9-5 dargestellt, um einen einfacheren Vergleich der Gehalte zu ermöglichen. Hierzu wurden die Nullprobe, ein gering entschwefeltes Öl (S410) und ein stark entschwefeltes Öl (S16) ausgewählt.

<sup>11</sup> n.b.: nicht bestimmt



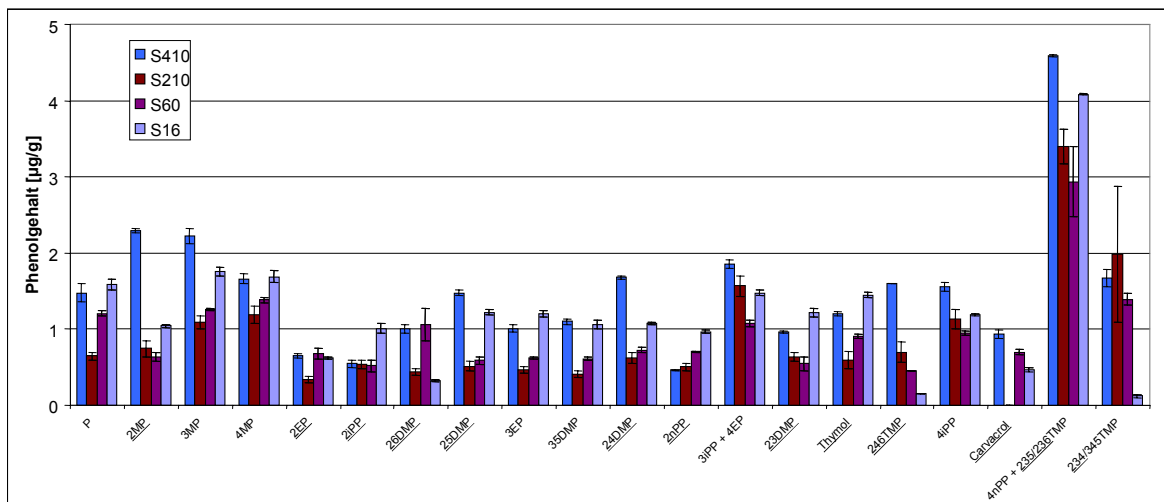


**Abbildung 9-5: Vergleich der Einzelphenolgehalte verschiedener Heizöle (*ortho*-Verbindungen unterstrichen)**

Alle drei Proben wurden am selben Tag entnommen und in kurzen Abständen analysiert, so dass unterschiedliche Phenolgehalte nicht auf Veränderungen durch unterschiedliche Lagerung zurückzuführen sein können. Beim detaillierteren Vergleich der einzelnen Phenole in Abbildung 9-5 erkennt man, dass *ortho*-substituierte Phenole (2MPE, 26DMPE, 24DMPE und 246TMPE) bei der Aachener Entschwefelung teilweise abgebaut worden sind, andere Alkylphenole dagegen weniger. Einige Phenolkonzentrationen erschienen in den stärker entschwefelten Heizölen dagegen sogar erhöht zu sein (P, 4MP, 2nPP, 4iPP). Teilweise liegt die Abweichung im Bereich der Standardabweichung des Gehalts in S850, so dass wahrscheinlich Messfehler vorlagen. Die Ursache für die Erhöhung bei 4iPP konnte nicht geklärt werden.

Die Heizöle S60 und S210 wiesen einen Phenolgehalt von etwas mehr als der Hälfte im Vergleich zu den oben genannten Ölen auf und passten nicht in die Reihe der Heizöle S850 bis S16. Beide Proben sind zu anderen Zeiten entnommen und analysiert worden als der Rest der Reihe, so dass unklar ist, ob diese Proben sich durch unterschiedliche Lagerung verändert haben könnten. Die Lagerungsbedingungen von der Probennahme bis zur Analyse in Münster sind nicht im Detail bekannt und konnten nicht beeinflusst werden. Generell wurden die Proben in verschlossenen braunen Kunststoffschraubflaschen gelagert, teilweise allerdings bei Raumtemperatur und teilweise im Kühlschrank. Zur Entnahme von Teilproben (auch zur Schwefelaromatenanalyse) wurden die Flaschen mehrmals geöffnet. Bastow et al. zeigten in [90], dass Alkylphenole in Erdölen unter Licht- und Luft einfluss leicht photooxidiert werden, wobei besonders *ortho*-alkylierte Phenole abgebaut werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Gehalte von S60

und S210 schon durch oxidativen Abbau verringert waren, obwohl hier kein Trend zur verstärkten Reduzierung der *ortho*-Isomere zu erkennen war (siehe Abbildung 9-6).



**Abbildung 9-6: Einzelne Phenolgehalte in eventuell durch Oxidation veränderten Heizölen (rot/violett) und unveränderten Heizölen (blau), sortiert nach absinkendem Schwefelgehalt (*ortho*-Verbindungen unterstrichen)**

Wie sich später zeigt, war aber der Unterschied zwischen den durch Hydrodesulfurierung entschwefelten Proben (siehe Kapitel 9.2.2) und den ausschließlich durch das OWI-Verfahren entschwefelten Proben bezüglich des Gesamtphenolgehaltes so groß, dass die Unsicherheit durch eventuelle Veränderung der Proben für die generelle Aussage keine Rolle spielt.

### 9.2.2 Phenole in Heizöl EL schwefelarm nach OWI-Entschwefelung

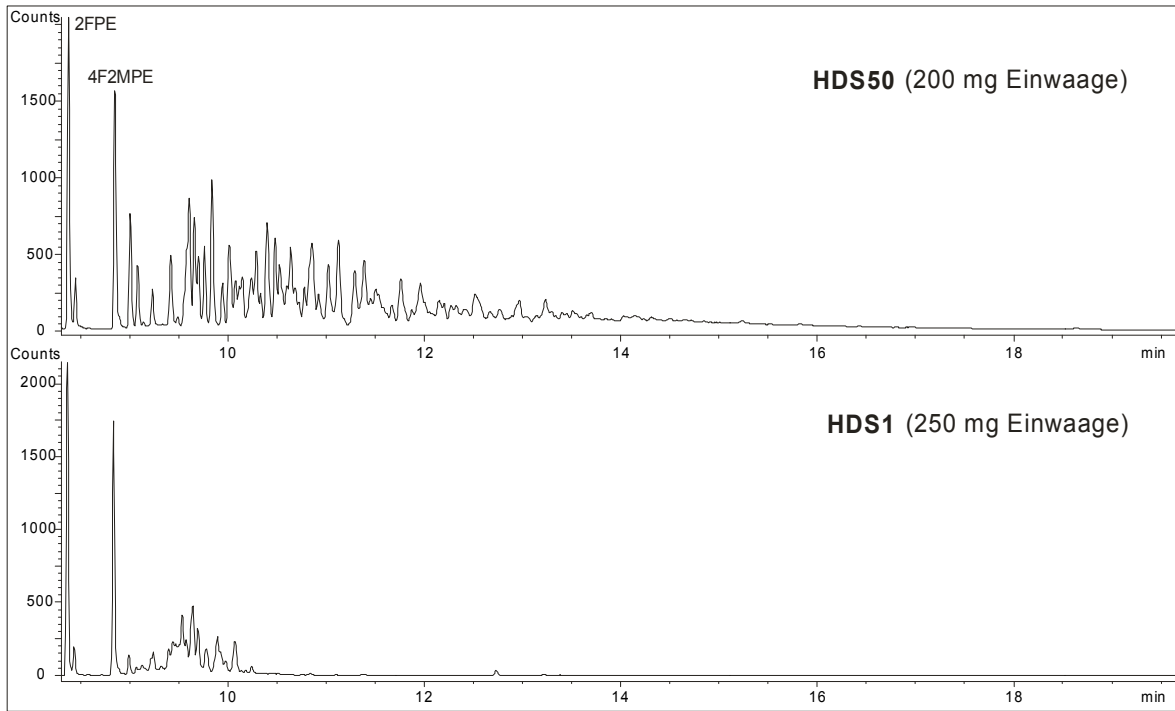
Das OWI Aachen verwendete auch kommerzielles, schwefelarmes Heizöl EL und entschwefelte dieses weiter mittels der entwickelten Adsorptionsentschwefelung. Diese Heizöle wurden also sowohl durch Hydrodesulfurierung als auch durch das OWI-Verfahren entschwefelt. Zwei Chargen dieser Heizöle wurden auf Phenole untersucht, wobei Angaben zu den Proben sind in Tabelle 9-5 zusammengefasst sind. Zunächst wurde das kommerzielle, schwefelarme Heizöl als Nullprobe untersucht (HDS50 mit 50ppm Schwefel), sowie eine aus diesem Heizöl nach OWI-Verfahren tiefentschwefelte Probe (HDS1 mit 0,9 ppm Schwefel). Vier weiterhin untersuchte Heizöle stammten aus einer späteren Versuchsreihe des OWI Aachen, waren aber ebenfalls aus dem Heizöl EL schwefelarm entstanden. Sie wurden nach unterschiedlich langer Benutzungsdauer des Katalysators entnommen (siehe Zeitangaben in Tabelle 9-5). Analog zu den in Abschnitt

9.2.1 untersuchten Proben stieg der verbleibende Schwefelgehalt durch zunehmende Ablagerungen auf der Katalysatoroberfläche von 1 auf 18 ppm an (N4-1 bis N1-18).

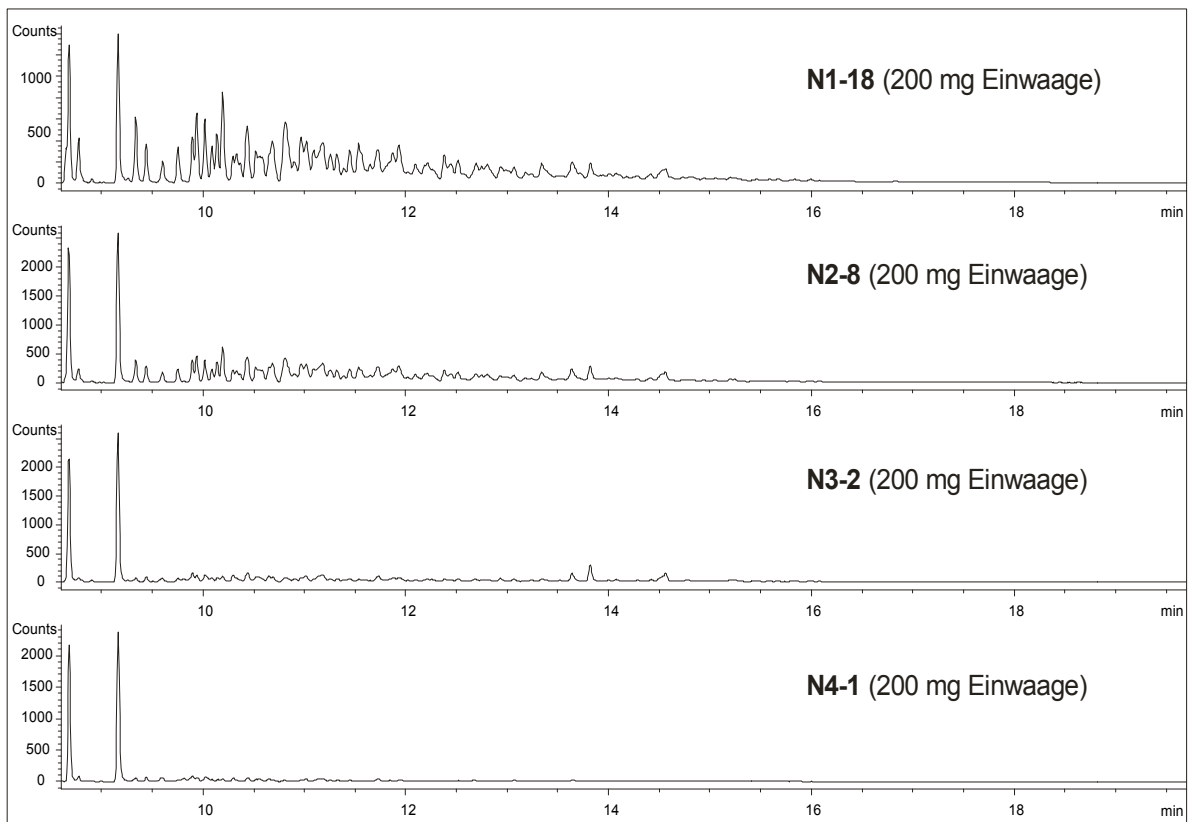
**Tabelle 9-5: Übersicht Heizöle EL schwefelarm, nach OWI-Verfahren tiefentschwefelt (Versuchsbedingungen: T = 200°C, p = 5 bar)**

Probenbezeichnung	Bezeichnung OWI + Probeneingangsdatum	Beschreibung	Schwefelgehalt
HDS50	“Nullprobe” schwefelarm, 29.8.06	P7 Heizöl EL schwefelarm	50 ppm
HDS1	Entschwefelt, 31.8.06 LHSV = 0,2	Entschwefelt aus HDS50	0,9 ppm
N4-1	P7/D200/24h, 7.9.07	Entschwefelt aus Heizöl EL schwefelarm	1 ppm
N3-2	P7/D200/170h, 7.9.07	Entschwefelt aus Heizöl EL schwefelarm	2,4 ppm
N2-8	P7/D200/531h, 7.9.07	Entschwefelt aus Heizöl EL schwefelarm	8 ppm
N1-18	P7/D200/980h, 7.9.07	Entschwefelt aus Heizöl EL schwefelarm	18 ppm

Die eisenselektiven GC-AED-Chromatogramme dieser hydrodesulfurierten Heizöle weisen ein komplett anderes Phenolmuster auf als die ausschließlich durch OWI-Verfahren entschwefelten Heizöle, welche in Abschnitt 9.2.1 vorgestellt wurden. Wie in Abbildung 9-7 und 9-7 zu erkennen ist, wird das Alkylphenolmuster durch niedrig alkylierte Phenole im frühen Retentionsbereich des Chromatogramms dominiert. Höher alkylierte Phenole sind schon in HDS50 praktisch komplett abgebaut. Zu erkennen ist aber auch, dass die OWI-Entschwefelung nach HDS im Gegensatz zur reinen OWI-Entschwefelung einen deutlichen Einfluss auf die Phenolgehalte hat. Bei sehr tiefer Entschwefelung (Proben HDS1, N4-1) werden anscheinend auch vermehrt Phenole abgebaut, wie durch quantitative Analysen bestätigt werden konnte.



**Abbildung 9-7: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme der ersten Charge schwefelarmer Heizöle (Nullprobe kommerzielles Heizöl oben, entschwefelte Probe unten)**

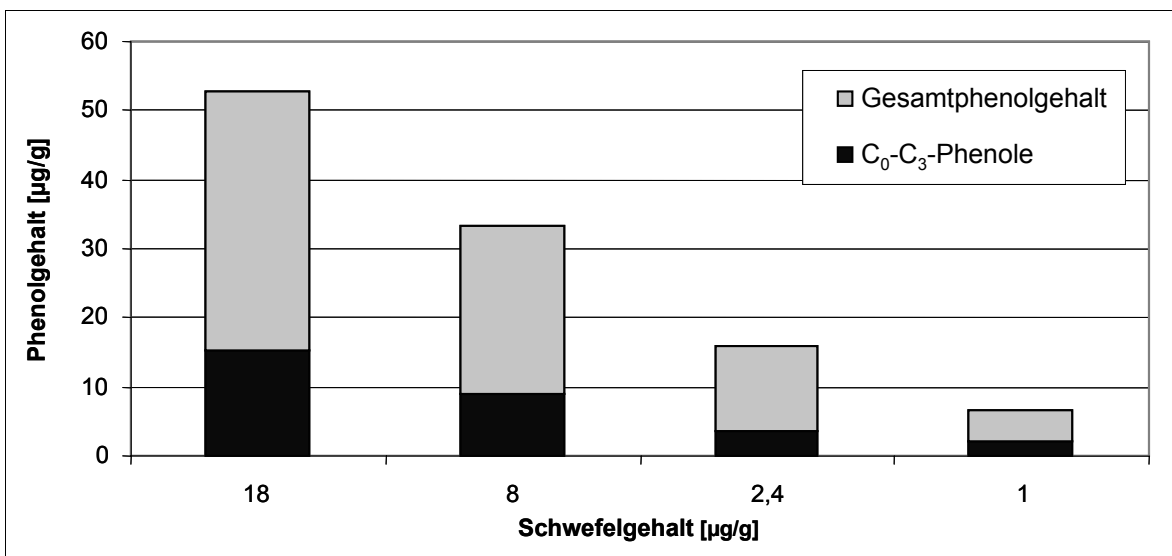


**Abbildung 9-8: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme der zweiten Charge schwefelarmer Heizöle, N1-18 bis N4-1 (von unten nach oben zunehmende Benutzungsdauer des Katalysators)**

Die Gesamtphenolgehalte und Summen der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole aller aus schwefelarmem Heizöl entstandenen Proben sind in Tabelle 9-6 und in Abbildung 9-9 dargestellt, während die Gehalte einzelner Phenole in Tabelle 9-7 aufgelistet sind. Die Proben HDS50, HDS1 und N1-18 wurden je drei Mal derivatisiert und analysiert, so dass Standardabweichungen der Summenparameter bestimmt werden konnten. Aufgrund der geringeren Gehalte konnten die Summenparameter nur mit größeren Standardabweichungen zwischen 8 und 34% bestimmt werden. Die Gehalte wurden bei N2-8 und N3-2 nur als Mittelwert von zwei unabhängigen Derivatisierungen bestimmt, die aber jeweils drei Mal mittels GC-AED analysiert wurden. Hier wurden daher keine Standardabweichungen für das Gesamtverfahren berechnet, sondern nur für die GC-AED-Analyse samt Integration. Diese lag bei maximal 6%, meistens jedoch bei 1-2% (n = 3). N4-1 konnte nur ein Mal derivatisiert werden, weil in einem zweiten und dritten Analysenversuch eine zuvor nicht feststellbare Decanol-kontamination auftrat. Die Ergebnisse von N4-1 sind daher nicht abgesichert.

**Tabelle 9-6: Phenolgehalte schwefelarmer Heizöle (Angaben in µg/g Öl, RSD in Klammern)**

	HDS50	HDS1	N1-18	N2-8	N3-2	N4-1
Summe C <sub>0</sub> - bis C <sub>3</sub> -Phenole (RSD)	20 (17%)	4 (13%)	15 (15%)	8,9	3,7	2,0
Phenolischer Sauerstoffgehalt (RSD)	6 (33%)	1 (34%)	5,6 (8%)	3,5	1,7	0,7
Gesamtphenolgehalt (RSD)	51 (33%)	10 (34%)	53 (8%)	33	16	7



**Abbildung 9-9: Gesamtphenolgehalte und Summe C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole der Heizöle N1-18 bis N4-1**

Tabelle 9-7: Gehalte einzelner Phenole Aachener Heizöle 2 (Angaben in µg/g)

Phenol	HDS50	HDS1	N1-18	N2-8	N3-2	N4-1
P	0,47	0,30	0,51	0,20	0,09	0,11
2MP	1,17	0,16	0,83	0,40	0,14	0,11
3MP	0,65	0,07	0,52	0,29	0,13	0,11
4MP	0,47	0,10	0,36	0,20	0,13	0,16
2EP	0,84	0,25	0,56	0,28	0,12	0,07
2iPr	0,83	0,50	0,74	0,46	0,27	0,19
26DMP	1,37	0,38	1,09	0,53	0,22	0,12
25DMP	1,30	0,91	1,03	0,48	0,36	0,22
3EP	0,85	0,45	0,56	0,26	0,14	0,06
35DMP	1,01	n.b.	0,77	0,39	0,15	0,07
24DMP	1,95	0,03	1,50	0,75	0,21	0,10
2nPP	0,55	0,25	0,48	0,29	0,28	0,13
3iPP + 4EP	1,32	0,18	1,30	0,75	0,36	0,15
23DMP	0,66	n.b.	0,59	0,36	0,16	0,07
Thymol	1,01	n.b.	0,47	0,28	0,19	0,08
34DMP	n.b. <sup>12</sup>	n.b.	0,32	0,34	0,16	0,07
246TMP	0,98	n.b.	1,08	0,58	0,14	0,05
3nPP	n.b.	n.b.	0,53	0,25	0,08	0,03
4iPP + Carvacrol	1,79	n.b.	1,07	0,51	0,13	0,05
4nPP + 235/236TMP	1,94	0,10	0,72	0,35	0,14	0,06
234/345TMP	0,44	n.b.	0,31	0,17	0,08	0,04

Wie schon in den GC-AED-Chromatogrammen (Abbildung 9-7 und 9-8) zu sehen war, entfernt HDS die Phenole viel stärker als das OWI-Entschwefelungsverfahren. Das Heizöl EL schwefelarm enthielt schon vor der OWI-Entschwefelung nur 6 µg/g phenolischen Sauerstoff (HDS50), was durch die Adsorptionsentschwefelung noch einmal auf 1 µg/g abgesenkt wurde (HDS1). Dagegen wiesen die in Abschnitt 9.2.1 untersuchten Proben S850 bis S16 zwischen 36 und 72 µg/g phenolischem Sauerstoff auf. Die etwa ein Jahr nach HDS50 und HDS1 entschwefelten und analysierten Proben N1-18 bis N4-1 wiesen bei ähnlichem Schwefelgehalt auch ähnliche Phenolgehalte wie HDS50 und HDS1 auf,

<sup>12</sup> n.b. = nicht bestimmt

was die Reproduzierbarkeit des OWI-Entschwefelungsverfahrens bezüglich seines Einflusses auf den Phenolgehalt bestätigte.

Die Summe der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole war in den aus hydrodesulfuriertem Heizöl entstandenen Proben mit 2 bis 20 µg/g ebenfalls niedriger als in den ausschließlich nach OWI-Verfahren entschwefelten Ölen in Abschnitt 9.2.1 (19 bis 48 µg/g), allerdings war der Unterschied deutlich kleiner als bei den Gesamtphenolgehalten.

Überraschend nach den Ergebnissen aus Abschnitt 9.2.1 war, dass in den Proben N1-18 bis N4-1 die Phenolgehalte weitgehend gleichmäßig reduziert wurden. Im Gegensatz zu den nur durch das OWI-Verfahren entschwefelten Proben S850, S605, S410 und auch S16, bei denen die Gesamtphenolgehalte durch die Entschwefelung kaum verringert wurden, wurden die Phenole bei Adsorptionsentschwefelung nach vorheriger HDS in größerem Maße abgebaut. Man konnte bei den Proben N1-18 bis N4-1 im Gegensatz zu den in Abschnitt 9.2.1 untersuchten Proben keine stärkere Verringerung der kleineren Phenole gegenüber den Großen feststellen: Der Anteil der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole betrug bei allen Proben knapp 30% des Gesamtphenolgehaltes. Auch ein relativer Konzentrationsunterschied zwischen den verschiedenen Positionsisomeren, wie der in Abschnitt 9.2.1 festgestellte Abbau von *ortho*-Isomeren, konnte nicht abgeleitet werden. Die Ursache dieser unterschiedlichen Phenolentfernung abhängig davon, ob zuvor eine HDS erfolgte, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 9.2.3 Phenole in hydrodesulfuriertem spanischen Diesel

Um zu überprüfen, ob Phenolmuster und -gehalte in Kraftstoffen durch Hydrodesulfurierung immer in gleicher Art und Weise verändert werden, wurden Phenole zusätzlich in klassisch entschwefelte Dieselproben untersucht. Hier wurden spanische Dieselproben aus dem Jahr 2000 analysiert, welche aus verschiedenen Stufen der sukzessiven Entschwefelung durch HDS stammten. Die Probe B328/99 stellte dabei die Nullprobe vor der Entschwefelung dar und wies einen sehr hohen Schwefelgehalt auf, während die weiteren Proben in der Reihe 997\_6G bis 997\_6A immer stärker entschwefelt wurden.

Wasinski hatte bei diesen Proben bereits Gesamtphenolgehalte bestimmt [3] und herausgefunden, dass der Gesamtphenolgehalt in ähnlichem Maße wie der Schwefelgehalt bei der sukzessiven Entschwefelung verringert wurde. Jetzt sollten einzelne C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole quantifiziert werden, um einen Vergleich der Phenolmuster mit dem ebenfalls durch HDS entschwefelten Heizöl durchführen zu können.

Tabelle 9-8: Übersicht der spanischen Dieselproben

Probenbezeichnung	Schwefelgehalt
B328/99 (Nullprobe)	18600 ppm
997_6G	550 ppm
997_6D	145 ppm
997_6A	26 ppm

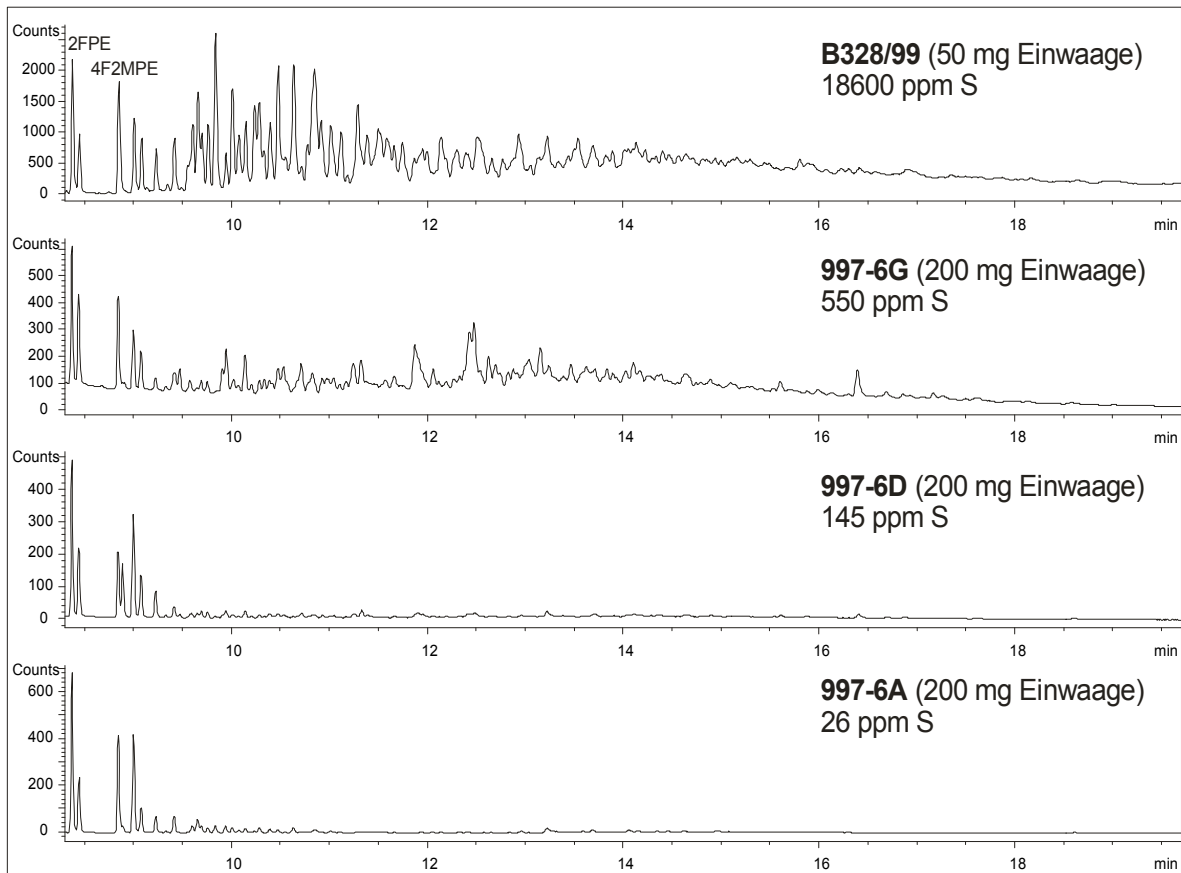


Abbildung 9-10: Eisenselektive GC-AED-Chromatogramme spanische Dieselproben

Generell enthielten die Diesel 997\_6G bis \_6A deutlich weniger Phenole als die untersuchten Heizölproben, wie in Tabelle 9-9 dargestellt ist. Nur im Diesel B328/99 mit dem höchsten Schwefelgehalt waren auch die Phenolgehalte hoch. In den entschwefelten Proben waren besonders höhere Phenole kaum vorhanden, wie in Abbildung 9-10 zu sehen ist. Während die hohen Phenolgehalte in B328/99 zu gut reproduzierbaren Analysen mit relativen Standardabweichungen von 2 bis 11% führten ( $n = 3$ ), war die Bestimmung in 997\_6A bis 997\_6G deutlich schwieriger. Zusätzlich zu den geringen Gehalten erschwer-

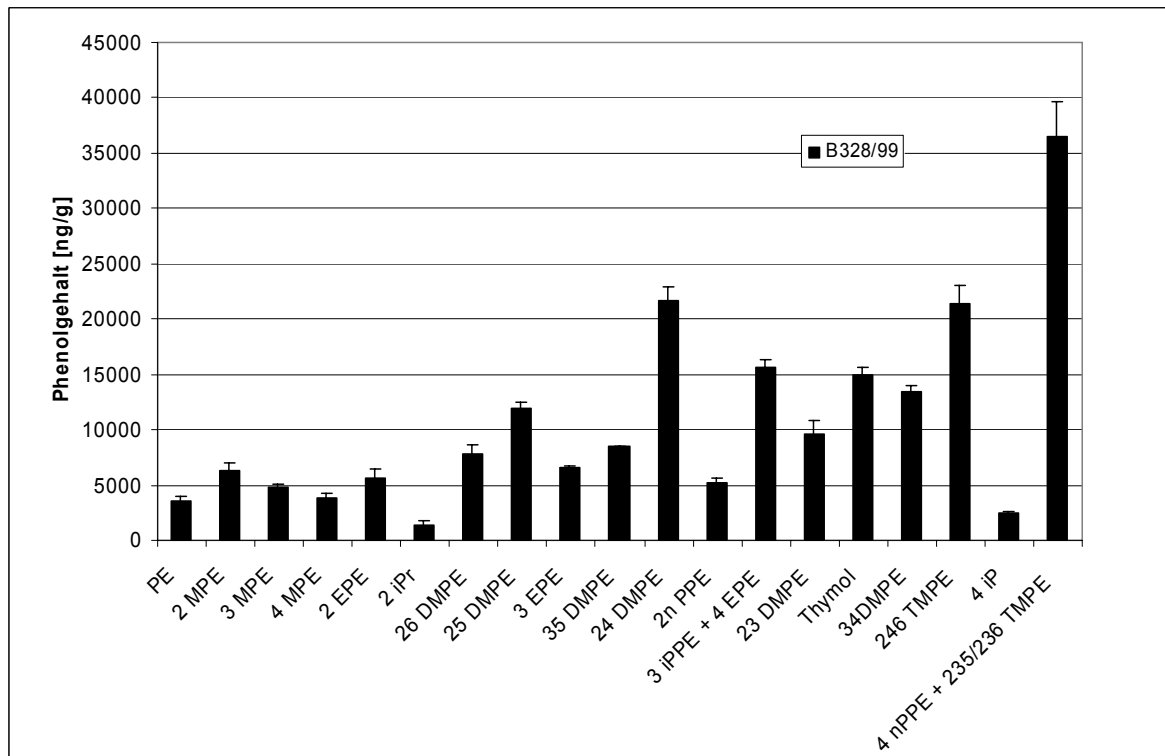
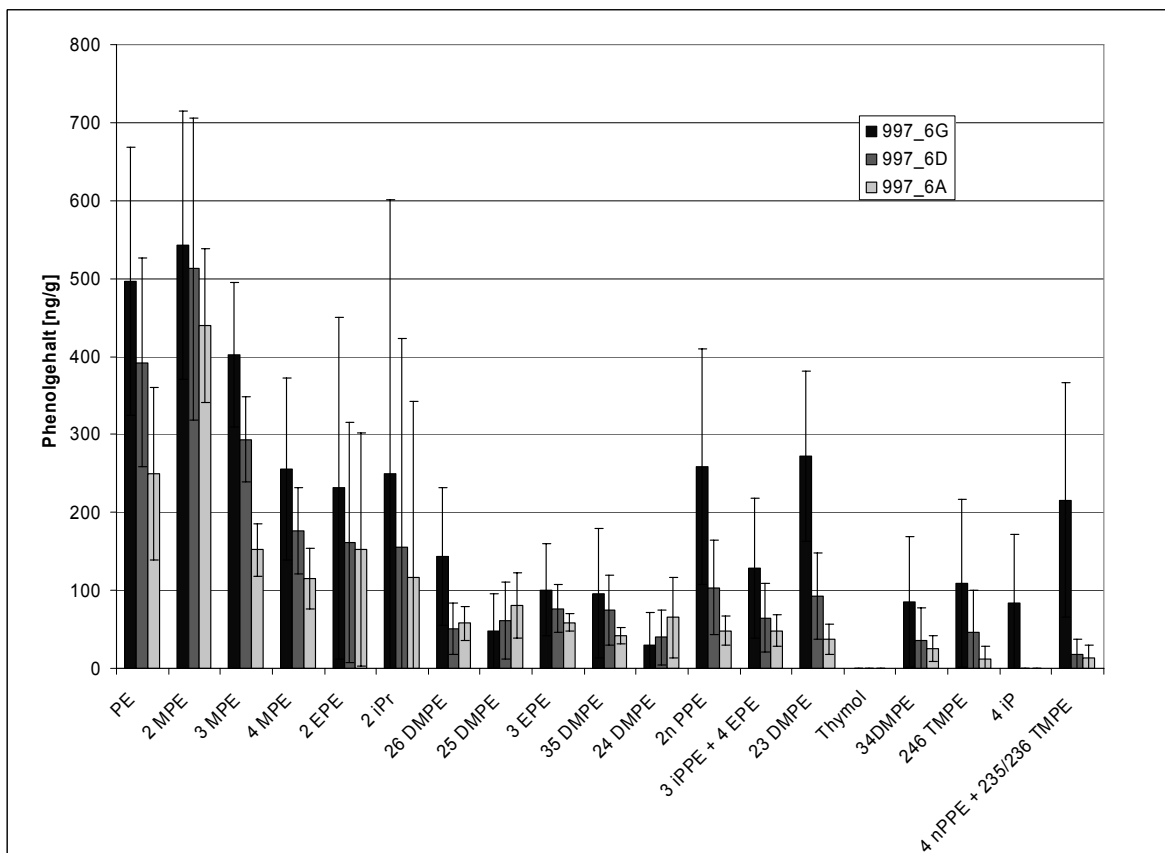


ten unbekannte Störsubstanzen die Analyse sowohl einzelner Phenole als auch der Gesamtgehalte. Die Substanzen konnten aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht am GC-MS identifiziert werden und waren verantwortlich für hohe Standardabweichungen der GC-AED-Analysen von bis zu 39%. Zum Einen verursachten diese Verbindungen eine erhöhte Basislinie über breite Retentionsbereiche im GC-AED-Chromatogramm und erschwerten damit die Definition der Basislinie. Zum Anderen war die Störung in verschiedenen Analysen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die störenden Substanzen schienen also polarer zu sein als die Alkylphenolferrocenester, weshalb sie nicht quantitativ von der Aluminiumoxidsäule eluiert wurden und damit kleine Schwankungen im Elutionsvolumen schlecht reproduzierbare Ergebnisse verursachten. Eventuell ist diese Interferenz auf Oxidationsprodukte der Phenole zurück zu führen, da die Dieselproben über sechs Jahre hinweg in Glasflaschen aufbewahrt und durch häufiges Öffnen mit Luft in Kontakt kamen. Ein Vergleich der Proben untereinander sollte aber trotzdem möglich sein, da alle Diesel ähnlich gelagert wurden.

**Tabelle 9-9: Phenolgehalte hydrodesulfurierter spanischer Dieselproben (Angaben in µg/g)**

	<b>B328/99</b>	<b>997_6G</b>	<b>997_6D</b>	<b>997_6A</b>
Gesamtphenolgehalt (RSD)	2243 (2%)	41 (26%)	7 (27%)	3 (15%)
Phenolischer Sauerstoffgehalt (RSD)	163 (2%)	3 (26%)	0,7 (21%)	0,4 (11%)
Summe C <sub>0</sub> - bis C <sub>3</sub> -Phenole (RSD)	174 (11%)	3,5 (36%)	2,3 (39%)	1,6 (38%)

Die Phenolgehalte wurden also schon während der ersten Stufe der Entschwefelung drastisch reduziert, wobei sowohl der Gesamtphenolgehalt als auch die Summe der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole in 997\_6G nur noch knapp 2% des Gehaltes in der Nullprobe betrug. Bei weiterer Entschwefelung wurden dann die Gesamtphenolgehalte stärker abgebaut als die gering alkylierten Phenole. In 997\_6A waren nur noch 7% der Gesamtphenolgehalte von 997\_6G zu finden, während noch etwa die Hälfte der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenolgehalte erhalten blieb. Es wurden also wie bei den hydrodesulfurierten Heizölen (Abschnitt 9.2.2) verstärkt die höher alkylierten Phenole entfernt.

Abbildung 9-11: C<sub>0</sub>- C<sub>3</sub>-Phenolgehalte spanischer Diesel vor EntschwefelungAbbildung 9-12: C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenolgehalte spanischer Diesel nach sukzessiver Entschwefelung

Betrachtet man die einzelnen C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole (siehe Abbildung 9-11 und 9-12), fällt auf, dass im Diesel vor der Entschwefelung die C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Phenole dominierten, während in den entschwefelten Proben die Konzentrationen an Phenol und Methylphenolen relativ höher waren. Besonders *ortho*-substituierte C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Phenole wie 2nPPE, 23DMPE und 235/236TMPE waren in 997\_6G noch in relativ hohen Konzentrationen vorhanden und werden bei stärkerer Entschwefelung vermehrt abgebaut. Eigentlich dominierten in B328/99 noch höhere Phenole (die aber nicht identifiziert werden konnten), was auch daran zu sehen ist, dass der Anteil der C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole mit 174 µg/g in B328/99 nur etwa 8% des Gesamtphenolgehaltes betrug.

### 9.3 Qualitative Analyse mittels GC-MS

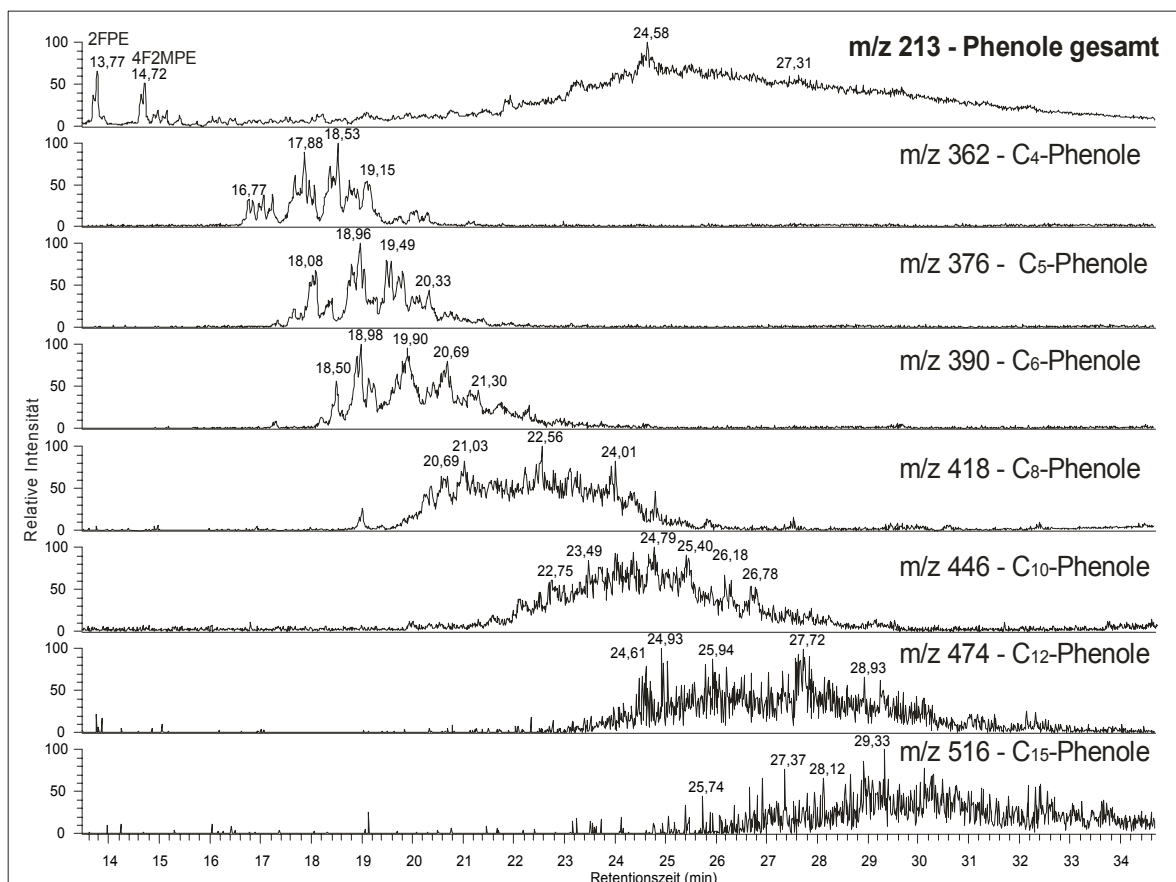
Alkylphenole mit mehreren oder längeren Alkylketten konnten chromatographisch nicht aufgelöst werden und erschienen im GC-AED-Chromatogramm als sogenannte „unresolved complex mixture“ (UCM). Häufig wurden aufgrund der limitierten Trennleistung der Chromatographie in der Literatur nur C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole in Erdöl und Erdölprodukten untersucht (z.B. in [24, 27, 54]). Mittels GC-MS konnten im Rahmen dieser Arbeit über die zusätzliche Dimension des Masse/Ladungs-Verhältnisses und den daraus ablesbaren Molekülmassen Informationen über das komplexe Gemisch größerer Phenole in den untersuchten Heizölen gewonnen werden. Zusätzlich konnte mittels GC-MS eine Kontamination einzelner Heizölproben aufgedeckt werden, welche eine quantitative Bestimmung der Phenole in diesen Proben mittels GC-AED verhinderte.

#### 9.3.1 Große Alkylphenole in zwei entschwefelten Heizölen

In diesem Abschnitt werden qualitative Daten zu höher alkylierten Phenolen in Heizölen anhand von zwei schon in Kapitel 9.2 untersuchten Beispielen vorgestellt und diskutiert. Dabei steht die Probe S605 stellvertretend für alle mittels OWI-Verfahren gering entschwefelte Heizölproben. Die Probe N1-18 wurde dagegen sowohl mittels HDS als auch mittels OWI-Verfahren entschwefelt und dient daher als Beispiel für tiefer entschwefelte Heizöle.

Im Heizöl mit 605 ppm Schwefel konnten bis zu C<sub>15</sub>-alkylierte Phenole nachgewiesen werden, wie in Abbildung 9-13 dargestellt ist. Diese erreichen als Ferrocenester die Grenze der GC-Gängigkeit unter üblichen Bedingungen (Elution nach 5 bis 10 Minuten Haltezeit bei 300°C). Das Gemisch ist so komplex, dass es auch in zwei Dimensionen nur teilweise aufgetrennt werden konnte. In jedem massenselektiven Chromatogramm erkennt

man in Abbildung 9-13 eine sehr hohe Anzahl an Isomeren. Diese weisen unterschiedliche Anzahlen an Alkylsubstituenten sowie unterschiedlich stark verzweigte Seitenketten auf.



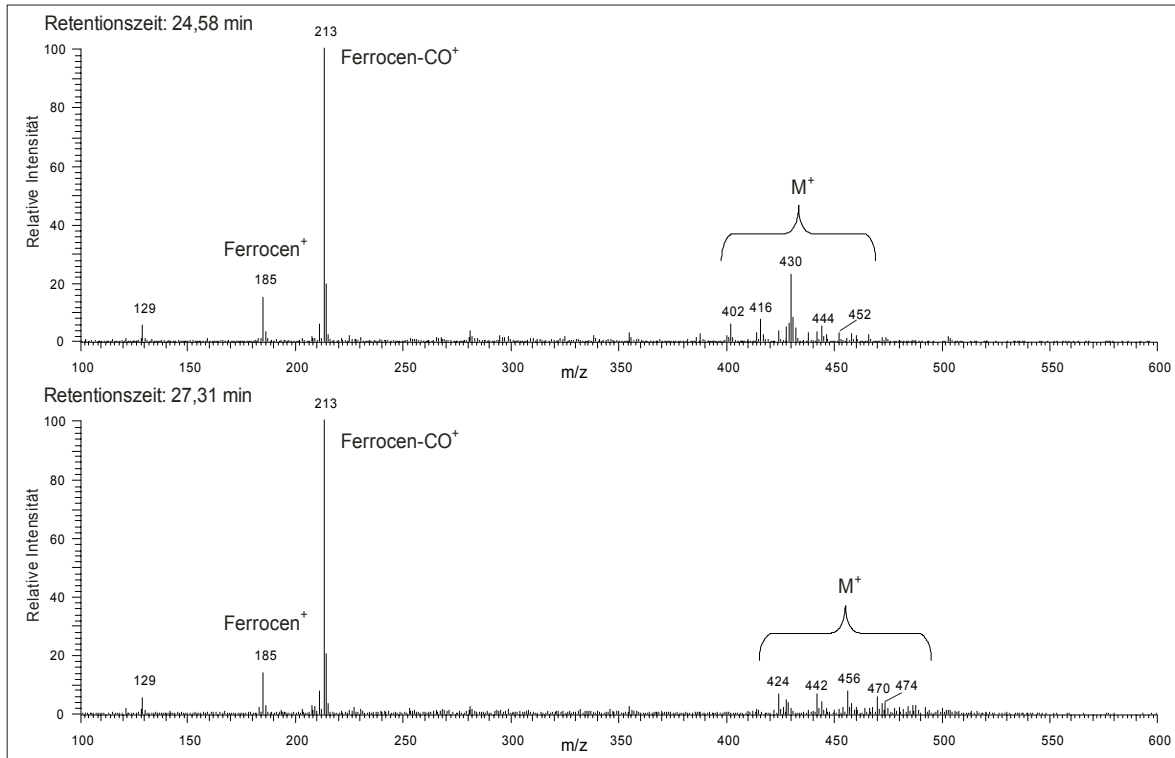
**Abbildung 9-13: GC-MS-Chromatogramm Heizöl S605, ausgewählte Massenspuren**

Massenspektren im Bereich des UCM zeigen im Massenbereich bis 400 praktisch ausschließlich die charakteristischen Fragmente für Phenolferrocenester ( $m/z$  213, 185 und  $129^{13}$ ) sowie eine Verteilung der  $M^+$ -Peaks im Bereich 400 bis 520, wobei viele Phenolester mit weiteren Doppelbindungsäquivalenten (DBE) nachgewiesen wurden. Ein DBE bedeutet eine um zwei amu verringerte Molekülmasse gegenüber Verbindungen mit gesättigten, nicht zyklischen Alkylseitenketten. Es zeigt daher den Verlust von zwei Wasserstoffatomen an. Das kann entweder die Anwesenheit einer Doppelbindung oder eines Ringes bedeuten, wobei isolierte Doppelbindungen aufgrund ihrer Reaktivität allerdings selten sind. Verbindungen mit 4 DBE weisen in Ölen häufig einen Phenylring auf.

In Abbildung 9-14 sind beispielhaft die Massenspektren bei zwei Retentionszeiten dargestellt. Bei der Retentionszeit 24,55 min dominierten  $C_7$ - bis  $C_{10}$ -Phenole mit je einem

<sup>13</sup>  $m/z$  213: Ferrocencarbonylkation,  $m/z$  185: Ferrocen<sup>+</sup>,  $m/z$  129: vermutlich Dicyclopentadienylkation

zusätzlichen DBE, während bei 27,32 min C<sub>9</sub>- bis C<sub>12</sub>-Phenole mit zwei zusätzlichen DBE am häufigsten waren. Wie schon in Abbildung 9-13 zu sehen, überlappen die Retentionsbereiche verschieden alkylierter Phenolester stark. Daher koeluiieren zu einer gegebenen Retentionszeit niedriger alkylierte Phenolester, welche eine gestreckte Molekülform aufweisen, mit größeren, stark verzweigten Phenolestern.

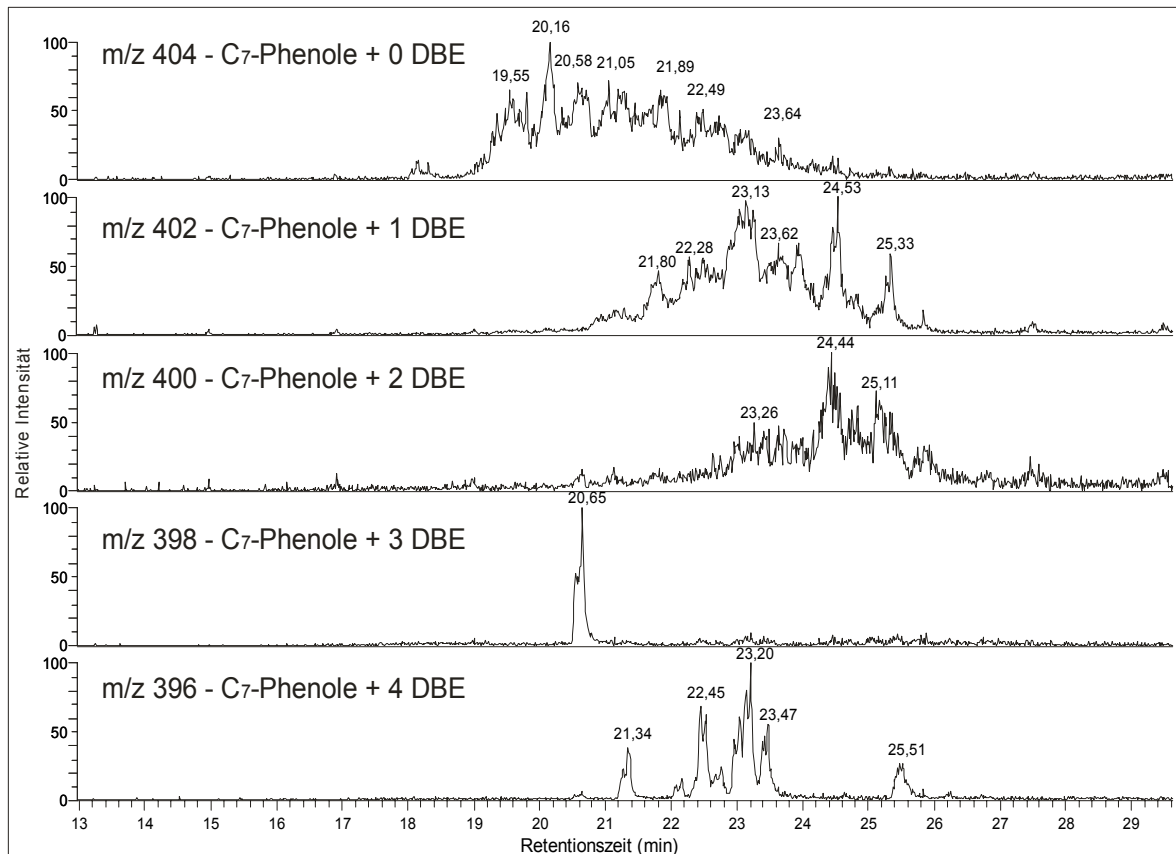


**Abbildung 9-14: Massenspektren aus GC-MS-Chromatogramm von S605**

Weitere Doppelbindungsäquivalente in den Seitenketten enthaltende C<sub>6</sub>-Phenole ließen sich im Heizöl S605 nur mit 1 oder 4 DBE (Phenylphenole) nachweisen, während ab C<sub>7</sub>-Phenol durchgängig 1, 2 und 4 zusätzliche DBE (sowie eine Verbindung C<sub>7</sub> + 3 DBE) gefunden wurden, wie in Abbildung 9-15 zu sehen ist. Bei großen Phenolen (z.B. C<sub>14</sub>) konnten auch Phenole mit 3 und 5 zusätzlichen DBE nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß wurde bei größeren Phenolen eine gleichmäßigere Verteilung gefunden, was durch eine steigende Anzahl an Isomeren bedingt ist.

Auch die chromatographischen Eigenschaften veränderten sich in Abhängigkeit von der Anzahl der DBE. Auffällig war, dass sich die Retentionszeiten bei Phenolestern mit 0 → 1 → 2 DBE in den Seitenketten zu größeren Zeiten hin verschoben, während 4 DBE-Phenolester sowie kleinere 3 DBE-Phenolester deutlich kürzere Retentionszeiten aufwiesen (vergleichbar mit 0 bis 1 zusätzlichen DBE). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf einen weiteren Phenylring bei 4 DBE-Phenolen zurückzuführen, beziehungsweise auf

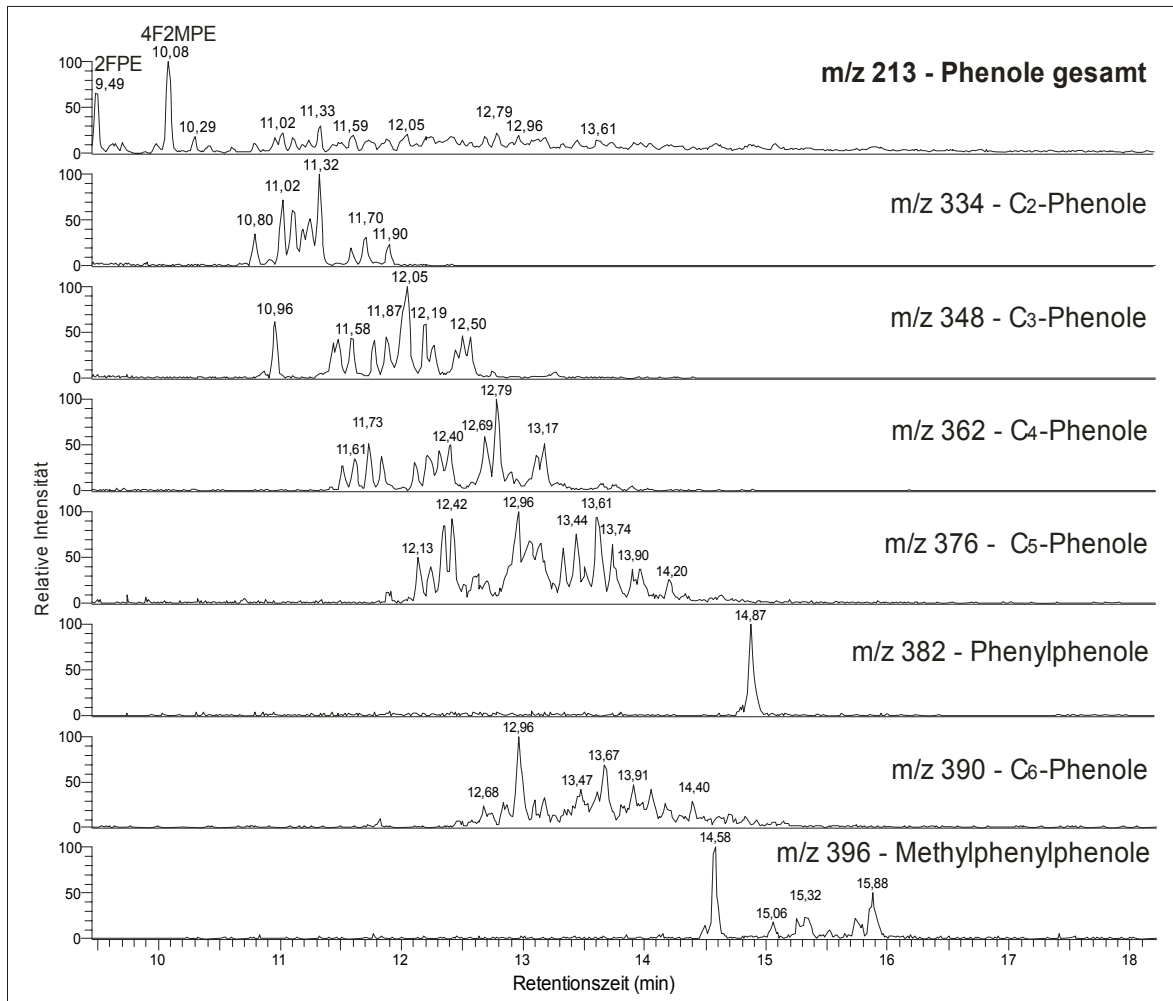
einen kondensierten Ring in Naphtholderivaten mit 3 DBE. Phenole mit 1 oder 2 DBE in Seitenketten können dagegen nur aliphatische Ringe aufweisen. Verbindungen mit aliphatischen Ringstrukturen schienen auf der verwendeten GC-Säule DB-5ms (mit 95% Methyl- und 5% Phenylgruppen) stärker retardiert zu werden als Verbindungen mit entsprechend langen Alkylketten. Diese Retentionszeitenverschiebung war bei kleineren Phenolen mit ein bis zwei Minuten pro zusätzlicher DBE besonders stark ausgeprägt, während bei größeren Phenolen die Verschiebung eine halbe bis eine Minute betrug.



**Abbildung 9-15: GC-MS Chromatogramm Heizöl S605, ausgewählte Massenspuren von C<sub>7</sub>-Phenolestern**

Im Heizöl N1-18 wurde das GC-MS-Chromatogramm dagegen durch eine Verteilung von C<sub>2</sub>- bis C<sub>5</sub>-Phenolen ohne zusätzliche DBE dominiert, wie in Abbildung 9-16 zu sehen ist. Phenole mit bis zu C<sub>9</sub>-Alkylketten konnten nachgewiesen werden. Phenole mit zusätzlichen DBE waren in geringerem Maße als in S605 vertreten. Nur Phenole mit weiteren Phenylringen (ein Phenylphenol und Phenylphenole mit weiterer Methylgruppe) konnten in recht hohen Intensitäten nachgewiesen werden. Dabei eluierte das Phenylphenol hier im Gegensatz zum oben diskutierten Retentionsverhalten erst spät von der GC-Säule, so dass es sich wahrscheinlich um *p*-Phenylphenol mit seiner gestreckten Molekülform handelte. Beim Vergleich mit den stärker entschwefelten Heizölen N2-8 und N3-2 wurde

kein Unterschied in den Phenolmustern festgestellt, sondern nur eine generelle Abnahme der Konzentrationen.



**Abbildung 9-16: GC-MS-Chromatogramme des Heizöls N1-18 (ausgewählte Massenspuren)**

Die Phenolgehalte der ersten Charge des nach OWI-Verfahren entschwefelten Heizöls am Beispiel von S605 unterschieden sich also auch in den GC-MS-Chromatogrammen deutlich von der zuvor durch HDS entschwefelten neueren Charge am Beispiel von N1-18. Die Phenolverteilung wurde bei N1-18 durch deutlich kleinere Phenole dominiert als in S605, weshalb in der tiefer entschwefelten Probe N1-18 nicht so komplexe Isomerenverteilungen nachweisbar waren wie in S605. Qualitativ konnten mittels GC-MS die Ergebnisse der GC-AED-Analysen in Kapitel 9.2 also bestätigt werden. Zusätzlich wurden durch die GC-MS-Analysen einige strukturelle Informationen über größere Phenole gewonnen, welche chromatographisch nicht aufgetrennt werden konnten.

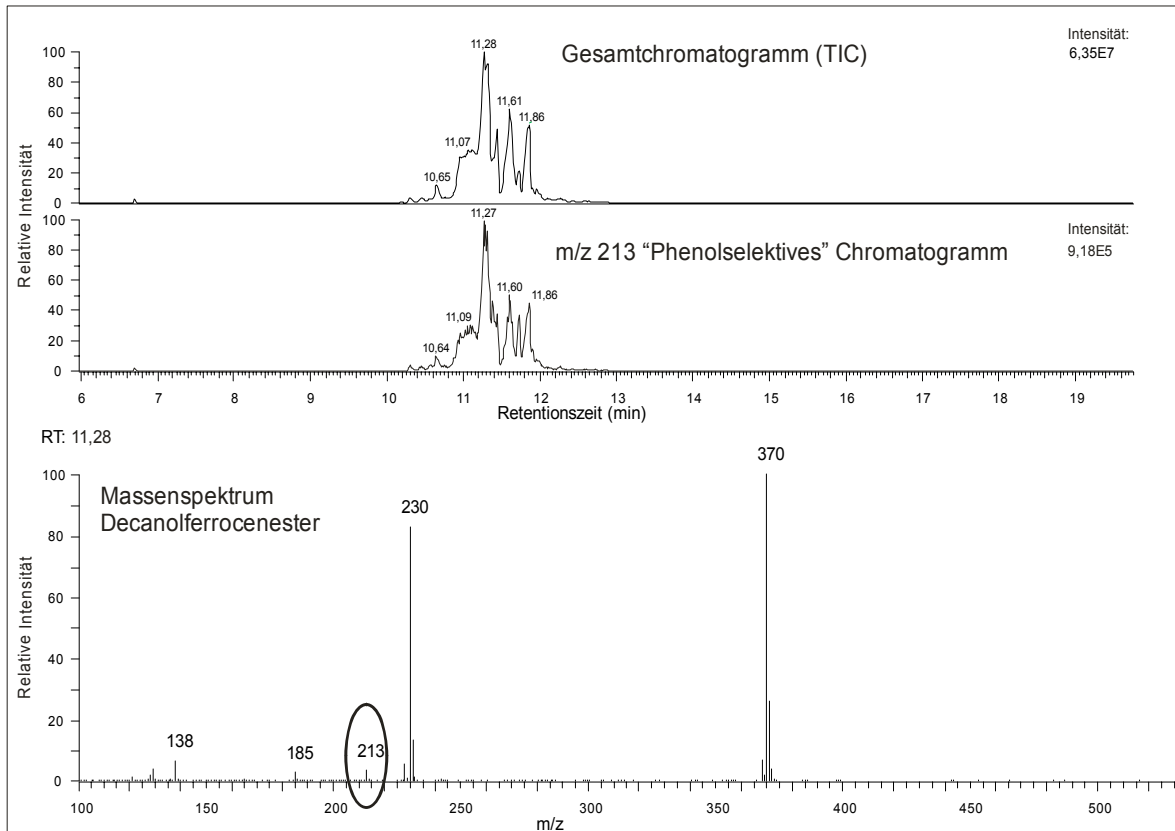
### 9.3.2 Heizöle mit Decanolkontamination

Weitere entschwefelte Heizölproben vom OWI Aachen mit 477 beziehungsweise 94 ppm Schwefel zeigten im GC-AED-Chromatogramm nach Derivatisierung überraschenderweise ein Isomergemisch unbekannter Ferrocenester in sehr hoher Konzentration. Mittels GC-MS konnten diese Peaks aufgrund ihres Molekülionenpeaks von  $m/z$  370 und des für Alkoholester charakteristischen Fragments mit  $m/z$  230 ( $\text{FcCOOH}^+$ ) als technisches Gemisch an Decanolferrocenestern identifiziert werden (siehe Abbildung 9-17).

Dabei war die Konzentration so hoch, dass selbst das eigentlich phenolselektive Chromatogramm der Massenspur  $m/z$  213 ( $\text{FcCO}^+$ ) komplett durch die Decanolester dominiert war, obwohl das Fragment mit  $m/z$  213 im Massenspektrum der Decanolester nur mit einer Intensität von etwa 4% auftrat. Die Proben konnten nicht soweit aufkonzentriert werden, dass Phenole im Chromatogramm über ausgewählte Massenspuren identifizierbar gewesen wären. Auch reichte der Reagenzienüberschuss nicht für eine quantitative Derivatisierung aller Hydroxylverbindungen aus, wie durch eine Aufhellung der eigentlich tiefroten Derivatisierungsmischung angezeigt wurde. Eine Analyse der Phenole in diesen Heizölproben war somit nicht möglich.

Die Kontamination der Proben konnte auf den Hersteller des Nickel-Katalysators zurückgeführt werden. Der Entschwefelungskatalysator wurde vom Hersteller in einem technischen Gemisch von *iso*-Decanol gelagert, um eine Selbstzündung des pyrophoren Nickels zu verhindern. Das Decanol wurde in dieser Versuchsreihe im OWI nicht sachgemäß entfernt, wie sich später heraus stellte.

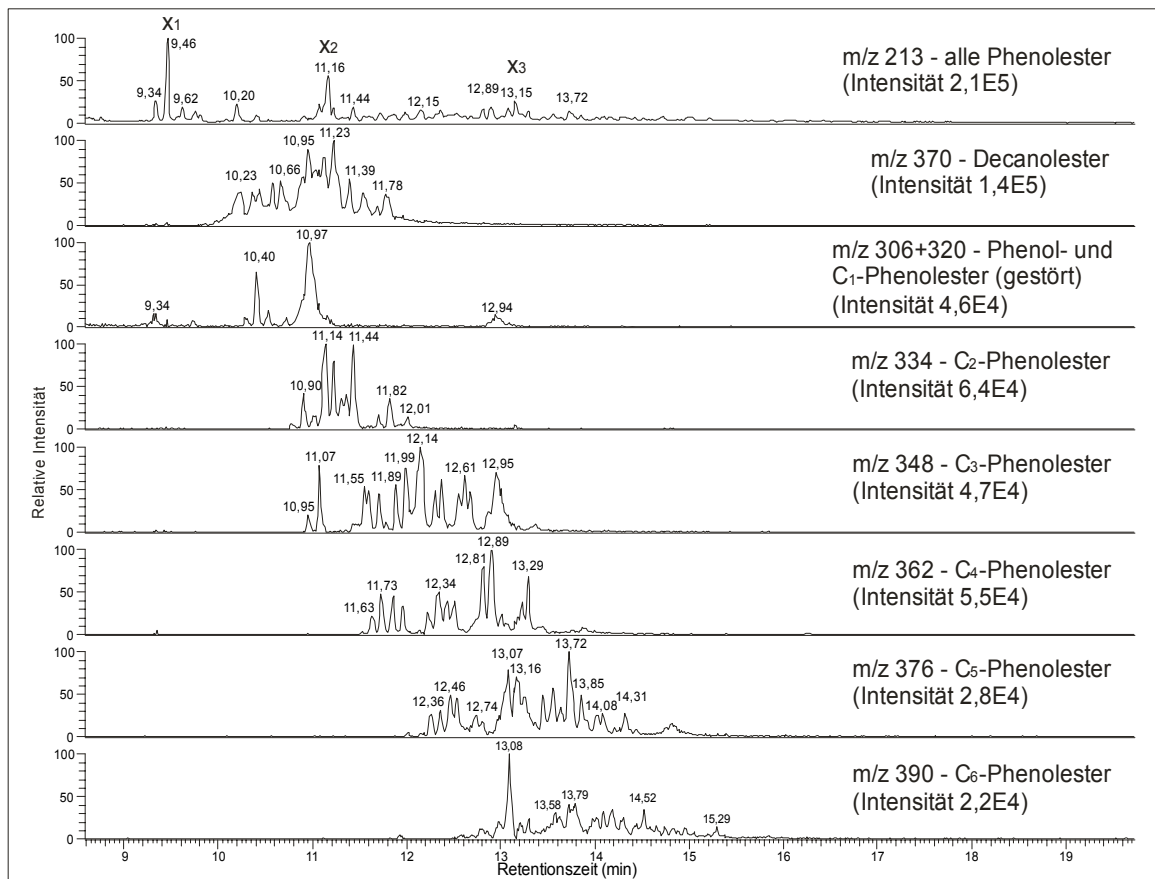




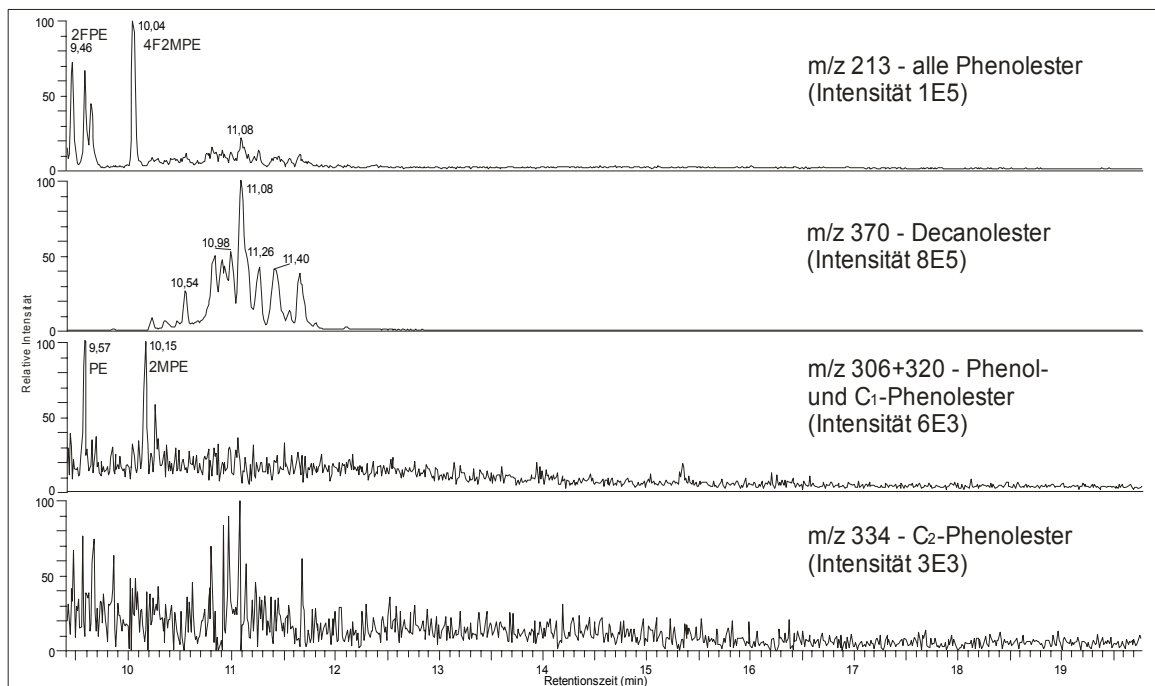
**Abbildung 9-17: GC-MS Chromatogramme (ausgewählte Massenspuren, oben) und repräsentatives Massenspektrum (unten) des Heizöls mit 477 ppm Schwefel - selbst phenolselektives Chromatogramm ist durch Decanole dominiert (verantwortliches Fragment mit  $m/z$  213 markiert)**

### 9.3.3 Phenole in Heizöl mit Zusatz von Biodiesel

Einige Proben des Heizöls EL wurden am OWI Aachen mit Biodiesel versetzt und anschließend entschwefelt. Auch diese Heizöle und die zugehörigen Vergleichsproben ohne Biodiesel waren mit Decanol kontaminiert, wenn auch nicht ganz so stark wie die in 9.3.2 untersuchten Proben. Eine Bestimmung mittels GC-AED war auch hier nicht möglich, da die Retentionsbereiche der  $C_0$ - bis  $C_4$ -Phenolester mit denen der Decanolester überlappten. Mittels GC-MS konnten aber neben den Decanolen einige Phenole identifiziert werden, wie in den Abbildungen 9-18 und 9-19 zu sehen ist.



**Abbildung 9-18: GC-MS-Chromatogramme (ausgewählte Massenspuren) Heizöl mit Biodiesel mit Decanolkontamination (t: 10 bis 12 min) und FAME (x<sub>1</sub>: Eicosäuremethylester, x<sub>2</sub>: Docosäuremethylester, x<sub>3</sub>: Tetracosäuremethylester)**



**Abbildung 9-19: GC-MS-Chromatogramme Heizöl ohne Biodiesel mit Decanolkontamination (ausgewählte Massenspuren); praktisch keine Phenole nachweisbar**

Im Heizöl mit Biodiesel<sup>14</sup>, welches 17 ppm Restschwefel enthielt, waren C<sub>2</sub>- bis C<sub>6</sub>-Phenole nachweisbar, wobei C<sub>2</sub>- bis C<sub>4</sub>-Phenole das Chromatogramm dominierten (siehe Abbildung 9-18). In der eigentlich phenolselektiven Massenspur mit m/z 213 waren einige zusätzliche Peaks zu erkennen, welche in Abbildung 9-18 mit x bezeichnet sind. Diese konnten anhand ihres Massenspektrums als Fettsäuremethylester (FAME) aus dem Biodiesel identifiziert werden, welche durch Abspaltung von Methylengruppen ebenfalls m/z 213 als Docecansäuremethylesterfragment produzieren. Hauptbestandteil des Biodiesels war Octadecansäuremethylester, welcher aber bereits vor dem dargestellten Retentionsbereich von der GC-Säule eluierte. Langkettige FAME waren in geringeren Mengen enthalten, wovon Eicosansäuremethylester (x<sub>1</sub>), Docosansäuremethylester (x<sub>2</sub>) und Tetraecosansäuremethylester (x<sub>3</sub>) identifiziert werden konnten. In eisenselektiven GC-AED-Analysen erscheinen Fettsäuremethylester nicht, da sie nicht derivatisierbar sind.

In den analogen Proben ohne Biodiesel mit 4,5 ppm Restschwefel waren im Gegensatz zu den Proben mit Biodiesel kaum Phenole nachweisbar (siehe Abbildung 9-19). Nur Spuren an Phenol und 2-Methylphenol konnten identifiziert werden. Anscheinend erschwerte zugesetzter Biodiesel nicht nur die Entschwefelung, sondern auch die Entfernung der Phenole. Für eine quantitative Aussage zum Einfluss von Biodiesel auf die Phenolentfernung während der Entschwefelung müssten aber weitere Analysen mittels GC-AED an Heizölen ohne Decanolkontamination erfolgen.

## 9.4 Vergleich der Phenolanalysen in Heizölen mit Kohlenwasserstoff- und Schwefelaromatenanalysen

Die in Kapitel 9.2 und 9.3 untersuchten Heizöle wurden zusätzlich von Schade [35] auf ihr Aromaten- und Schwefelaromatenmuster untersucht. Die polyzyklischen Schwefelaromaten wurden erwartungsgemäß durch die Entschwefelung reduziert. Wurde in S850 noch ein komplexes Muster aus alkylierten Benzothiophenen (BT) und vielen Dibenzothiophenen (DBT) gefunden, waren in S16 nur noch Spuren an 4,6-Dimethyl-DBT und 3 C<sub>3</sub>-DBT-Isomeren vorhanden. Das Schwefelaromatenmuster in S850 entsprach einem typischen reifen Erdöl, bei dem die thermodynamisch stabileren 4- und 6-substituierten Isomere dominierten. Bei fortschreitender Entschwefelung wurden die geringer alkylierten

<sup>14</sup> Die Heizöle wurden entweder bei 100 oder bei 150 °C mittels des OWI-Verfahrens entschwefelt. Da sich die Phenolgehalte aber in den bei unterschiedlichen Temperaturen behandelten Heizölen qualitativ nicht unterschieden, werden hier nur die bei 150 °C entschwefelten Proben diskutiert.

Schwefelaromaten schneller abgebaut als die höher alkylierten. Die 4,6-substituierten Isomere waren außerdem aufgrund ihrer sterischen Hinderung entschwefelungsresistenter als andere Isomere. So war der DBT-Gehalt schon in S410 stark verringert, während die Methyl-DBTs erst in S60 merklich reduziert waren. Bei den Kohlenwasserstoffen konnte Schade mit sinkendem Schwefelgehalt eine leichte Verringerung an gering alkylierten Naphthalenen und Phenanthrenen feststellen, während die Aliphatenfraktion praktisch unverändert blieb.

Die mit Decanol kontaminierten Proben mit 477 und 94 ppm Schwefel (Kapitel 9.3.2) konnten ohne Störung auf aromatische Kohlenwasserstoffe und Schwefelaromaten untersucht werden, da Alkohole durch eine Aluminiumoxidsäule zur Trennung der Aliphaten und Aromaten entfernt wurden. Diese Proben bestätigten die Analyse der ersten Heizöle S850 bis S16 (Kapitel 9.2.1). Auch das Heizöl mit 477 ppm Restschwefelgehalt wies ein sehr komplexes Schwefelaromatenmuster mit C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-BTs und C<sub>0</sub>- bis C<sub>6</sub>-DBTs auf. Die Benzothiophene und DBT, sowie die Methyl-DBTs (außer 4-MDBT) waren im ebenfalls decanolkontaminierten Öl mit 94 ppm Restschwefel weitgehend entfernt. Auch der Gehalt an C<sub>2</sub>-DBTs war verringert, während die höher alkylierten DBTs erhalten blieben.

Insgesamt wurde durch die OWI-Entschwefelung eine erwartungsgemäße Entfernung der Schwefelaromaten erreicht, wobei als entschwefelungsresistent bekannte Verbindungen weniger reduziert wurden als der Rest der Schwefelaromaten-Fraktion. Ein qualitativer Unterschied der OWI-Entschwefelung zur klassischen HDS konnte von Schade nicht festgestellt werden. Die Phenolanalysen der Kapitel 9.2 und 9.3 ergaben dagegen deutliche Unterschiede der Phenolgehalte je nach Entschwefelungsverfahren. Die unterschiedlichen Mechanismen bezüglich der Entfernung dieser zwei Stoffklassen sind bisher ungeklärt und sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 9.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden GC-AED- und GC-MS-Analysen nach Derivatisierung zu Ferrocenestern komplementär eingesetzt, um das Verhalten von Phenolen bei der Entschwefelung von Heizöl und Diesel unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen. Anders als in vielen Analysenverfahren aus der Literatur (siehe Tabelle 9-1) wurden nicht nur kleine Phenole analysiert, sondern es konnte nach schneller Probenvorbereitung eine

große Bandbreite an Alkylphenolen untersucht werden. Mittels GC-AED wurden sowohl einzelne C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole identifiziert und quantifiziert, als auch Summenparameter und (halbquantitative) Gesamtphenolgehalte bestimmt.

Mittels GC-MS wurden zusätzlich qualitative Informationen über die Muster großer, alkylierter Phenole gewonnen. Über diese sind kaum Informationen in der Literatur vorhanden, da sie ein chromatographisch nicht auflösbares, komplexes Gemisch darstellen. Dieses Gemisch konnte teilweise über die zweite Dimension der Molekülmasse aufgetrennt werden. Dabei wurden in einem untersuchten Heizöl Phenole mit bis zu C<sub>15</sub>-Alkylgruppen nachgewiesen. Es wurden viele Phenole mit aliphatischen Ringstrukturen gefunden, deren Konzentration bei hohen Massen die der normal alkylierten Phenole überstieg. Zusätzlich wurden strukturbedingte Trends der Retentionseigenschaften großer Phenolferrocenester aufgezeigt, welche bei unbekanntem Proben Hinweise auf Molekülstrukturen bei nicht identifizierten Verbindungen geben könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrodesulfurierung Phenole wesentlich stärker abbaut als ein neuartiges Entschwefelungsverfahren des OWI Aachen. Sowohl in durch HDS sukzessive entschwefeltem Diesel als auch in hydrodesulfurierten Heizölen konnte ein ähnliches Phenolmuster festgestellt werden. In beiden Fällen wurden höher alkylierte Phenole durch die Entschwefelung fast vollständig entfernt. Beim OWI-Verfahren blieben dagegen größere Phenole bis zu Schwefelgehalten von etwa 20 ppm praktisch komplett erhalten und nur kleinere Phenole wurden in geringem Ausmaß abgebaut. Erst bei kombinierter Entschwefelung mit beiden Verfahren wurden alle Phenole gleichermaßen abgebaut. Diese gegensätzliche Tendenz zum Abbau der Phenole legt einen unterschiedlichen Reaktionsmechanismus des OWI-Verfahrens im Vergleich zur HDS nahe, obwohl Schwefelaromaten gleichermaßen abgebaut werden. Die Ursachen für diese unterschiedliche Wirkung auf den Phenolgehalt sind noch ungeklärt. Phenole sind aber als Schmiermittel und Antioxidantien wichtig für die Qualität des Kraftstoffes, besonders nach Zusatz von Biodiesel. Daher sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um zu klären, welches Entschwefelungsverfahren geeigneter ist, um optimale Eigenschaften des Kraftstoffes bezüglich Schmierfähigkeit und Lagerstabilität zu erhalten.

## 10 ZUSAMMENFASSUNG

Die Leistungsfähigkeit der gaschromatographischen Analyse von Phenolen nach Derivatisierung zu Ferrocenestern konnte im Rahmen dieser Arbeit eindrucksvoll gezeigt werden. Es wurden neue Methoden zur Analyse des Pestizids *o*-Phenylphenol auf Zitrusfruchtschalen und für die Bestimmung von Nonylphenolen in Verpackungsmaterialien entwickelt und erfolgreich angewendet. Zudem wurden durch Analyse von Phenolmustern in entschwefelten Heizölen neue Informationen über die Abhängigkeit des Phenolgehaltes von den Entschwefelungsbedingungen gewonnen.

Ausgangspunkt der Methodenentwicklung war die von Rolfes [2], Wasinski [3] und Andersson entwickelte Derivatisierungsmethode mit Ferrocencarbonsäurechlorid (FCC) zur Analyse von Phenolen in Erdöl und dessen Produkten mittels Gaschromatographie und Atomemissionsdetektion (GC-AED) oder massenspektrometrischer Detektion (GC-MS). Die Ferrocenmarkierung der Hydroxylgruppe konnte im Rahmen dieser Arbeit in einem breiteren Anwendungsbereich eingesetzt werden. Dabei wurde die hohe Empfindlichkeit und Selektivität des AED gegenüber Eisen zur Bestimmung verschiedener Alkyl- und Arylphenole ausgenutzt. Ohne aufwändige Probenvorbereitung wurden gute Nachweisgrenzen erreicht.

Trotz großer Vorteile der beschriebenen Derivatisierung im Vergleich zu üblichen Analysemethoden hat die Methode von Rolfes bislang kaum Verbreitung in analytischen Laboren gefunden. Ein Grund dafür ist, dass FCC nicht kommerziell erhältlich und daher Routinelaboren ohne Synthesemöglichkeit nicht zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zusätzlich verschiedene Möglichkeiten der Kupplung von Ferrocencarbonsäure mit Alkoholen und Phenolen mittels eines kommerziell erhältlichen Kupplungsreagenzes untersucht und auf ihre Eignung zur analytischen Derivatisierung überprüft.

Unter den evaluierten Kupplungsreagenzien erwies sich 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino)propano)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) als am besten geeignet. Die Ausbeuten an Estern von Modellverbindungen im analytischen Maßstab waren bei Verwendung von EDC und Ferrocencarbonsäure sehr gut, wobei Phenole quantitativ verestert wurden und die Ausbeuten an Alkoholestern vergleichbar mit denen nach FCC-Derivatisierung waren. Die Reaktion wurde durch Einsatz einer Mikrowelle beschleunigt und war dann ebenso einfach und schnell durchzuführen wie mit FCC. Die Eignung für Realproben konnte anhand der Derivatisierung der Alkylphenole in einem Heizöl gezeigt werden. In dieser komplexen

Mischung unterschiedlich alkylierter Phenole ergaben die Bestimmungen einzelner Phenole und des Gesamtphenolgehalts nach beiden Derivatisierungsmethoden im Rahmen der Standardabweichung der Analyse vergleichbare Gehalte.

Die Vermutung, dass ein Derivatisierungsreagenz mit einer Ethanogruppe zwischen Ferrocen und Säurefunktion als „Spacer“ im Molekül die quantitative Umsetzung sterisch gehinderter Phenole und Alkohole ermöglichen könnte, wurde nicht bestätigt. Ferrocenpropionsäurechlorid und Ferrocenpropionsäureanhydrid konnten im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden, zeigten aber nicht die erhofften Derivatisierungsausbeuten und waren zudem aufgrund ihrer Instabilität schwieriger darzustellen und zu handhaben als FCC.

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Anwendungsbereich der Derivatisierung mit FCC auf die Analyse von toxischen und endokrin wirksamen Phenolen in Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen zu erweitern, was an den Beispielen des Pestizids *o*-Phenylphenol und der endokrin wirksamen Nonylphenole gelang.

*o*-Phenylphenol (OPP) wird für die Behandlung von Zitrusfruchtschalen nach der Ernte eingesetzt, steht aber im Verdacht, Krebs zu erregen. Es besteht daher eine Kennzeichnungspflicht und ein gesetzlicher Grenzwert des Rückstands von 12 µg/g Frucht. Für die Bestimmung dieses Pestizids auf Zitrusfruchtschalen wurde eine empfindliche Methode entwickelt und validiert. Als Extraktionsmethode bewährte sich die Ultraschall-extraktion aufgrund quantitativer Extraktion und einfacher Durchführbarkeit. Unter den untersuchten möglichen internen Standards erwies sich *o*-Benzylphenol aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit OPP als sehr gut geeignet. Die Derivatisierung konnte wie in Ölproben durchgeführt werden, wobei aber nur eine Aluminiumoxidsäule zur Abtrennung sowohl der Probenmatrix als auch der überschüssigen Reagenzien nötig war. Die Wiederfindungsrate von beaufschlagtem OPP in Zitronenschalen war quantitativ und mit einer relativen Standardabweichung von unter 10% reproduzierbar. Die Methode war sehr empfindlich mit einer Nachweisgrenze von nur etwa 2 ng/g Frucht in Realproben.

Mit der entwickelten Analysenmethode wurden verschiedene Zitrusfrüchte (Zitronen, Orangen, Grapefruits) auf OPP-Rückstände untersucht. In den meisten untersuchten Proben wurden Rückstände gefunden, die aber mit Gehalten zwischen 0,06 und 0,37 µg/g weit unterhalb des gesetzlichen Grenzwertes lagen. Die Reproduzierbarkeit war mit 8 bis 13% relativer Standardabweichung hoch. Die Analysenergebnisse der Realproben wurden sowohl mittels GC-MS-Analyse als auch durch Vergleich mit HPLC-FLD verifiziert und stimmten mit einer maximalen Abweichung von 20% bei einer gering belasteten Probe gut

überein. Die HPLC-Analyse erfolgte ohne Derivatisierung und nach einer anderen Extraktion und Probenvorbereitung. Somit wurde die entwickelte Methode gegen eine unabhängige Analysenmethode validiert. Bei der Analyse eines Tiefenprofils einer belasteten Orangenschale wurde festgestellt, dass OPP größtenteils auf den äußeren Schichten der Schale verbleibt. Im Fruchtfleisch konnten nur Spuren an OPP im Bereich der Nachweisgrenze festgestellt werden, so dass der Verzehr behandelter Früchte nach dem Schälen als unbedenklich angesehen werden kann. Zusätzlich zur Analyse von OPP konnten mittels GC-MS-Analyse nach Derivatisierung aufgrund der charakteristischen Fragmentierung der Ferrocenester viele natürlich vorkommende Alkohole in Zitrusfruchtschalen identifiziert werden. Dabei wurde eine Reihe an *n*-Alkoholen sowie Citronellol nachgewiesen.

Nonylphenole als endokrine Disruptoren in Frischhaltefolien konnten ebenfalls nach Ultraschallextraktion mit Dichlormethan und Derivatisierung mit FCC nachgewiesen werden. Hier traten bei der quantitativen Bestimmung mittels GC-AED allerdings Probleme auf. Die sehr schwer flüchtigen Nonylphenolferrocenester zeigten konzentrationsabhängige Reproduzierbarkeitsschwierigkeiten, was vermutlich auf kalte oder aktive Stellen im System zurückzuführen war. Eine Erhöhung der Temperaturen verschiedener Systemteile sowie das Auswechseln von Säule, Injektorliner und Plasmaröhrchen konnten das Problem nicht nachhaltig lösen. Durch Überprüfung des Peakflächenverhältnisses verschiedener zugesetzter Standards, die sich in ihrer Flüchtigkeit unterschieden, als Qualitätssicherungsmaßnahme konnten aber Analysen erfolgen. Der bestimmte Nonylphenolgehalt betrug 4 µg/g Folie. Mittels HPLC-UV-Analyse der derivatisierten Frischhaltefolienextrakte konnte gezeigt werden, dass die durchgeführte Extraktion und die Derivatisierung reproduzierbar funktionierten. Der Nonylphenolgehalt in sechs Extrakten einer Folie wurde mittels HPLC auf 2,9 µg/g mit einer relativen Standardabweichung von unter 9% reproduzierbar bestimmt und war vergleichbar zum mittels GC-AED bestimmten Gehalt.

Ein weiteres Ziel war die Analyse von Heizölen auf ihre Alkylphenolgehalte und -muster, um die Auswirkung verschiedener Entschwefelungsverfahren auf Phenole zu untersuchen, da Phenole die Schmierfähigkeit und die Lagerstabilität des Öls beeinflussen. Bisher war bekannt, dass Phenole während der Entschwefelung teilweise abgebaut werden, nicht aber, in welchem Maße dieses von den Entschwefelungsbedingungen abhängt und welche Phenole bevorzugt abgebaut werden. Nach Derivatisierung mit FCC erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die GC-AED-Analyse der Ölproben zur Bestimmung einzelner Phenole (mit bis zu C<sub>3</sub>-Seitenketten) und zur Bestimmung von Gesamtphenolgehalten. Für letzteres wurde der weitgehend molekülunabhängige Response des AED im eisen-selektiven Modus ausgenutzt.



Bei der Untersuchung wurde festgestellt, dass die klassische Hydrodesulfurierung Phenole wesentlich stärker abbaut als eine neuartige Adsorptionsentschwefelung des Aachener Oel-Waerme-Instituts (OWI). Bei der Hydrodesulfurierung werden hauptsächlich höher alkylierte Phenole entfernt, wobei sich zeigte, dass Phenole bei der OWI-Entschwefelung bis zu Schwefelgehalten von etwa 20 ppm fast komplett erhalten blieben. Gesamtphenolgehalte in adsorptionsentschwefeltem Heizöl betragen 400 bis 1000 µg/g und wiesen eine relative Standardabweichung von maximal 9% auf, wozu die einzeln quantifizierten C<sub>0</sub> bis C<sub>3</sub>-Phenole nur 20 bis 50 µg/g (relative Standardabweichung <15%) beitrugen. Durch Hydrodesulfurierung entschwefeltes Heizöl enthielt dagegen nur 51 µg/g Alkylphenole, worin 20 µg/g C<sub>0</sub>- bis C<sub>3</sub>-Phenole enthalten waren. Die höher alkylierten Phenole im adsorptionsentschwefelten Heizöl konnten aufgrund der großen Zahl an Isomeren chromatographisch nicht aufgelöst werden. Mittels GC-MS gelang es aber, über die Molekülmasse einige strukturelle Informationen über die Phenole zu erhalten. So wurden bis zu C<sub>15</sub>-alkylierte Phenole mit einer sehr komplexen Isomerenverteilung nachgewiesen, darunter viele Phenole mit weiteren Ringen in den Seitenketten. Diese höher alkylierten Phenole wurden im durch Hydrodesulfurierung entschwefelten Heizöl nicht gefunden. Welche Auswirkung die beschriebenen Unterschiede der Entschwefelungsverfahren bezüglich der Phenolgehalte auf die Qualität des Kraftstoffes haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden und bleibt so ein Ziel zukünftiger, interdisziplinärer Forschung.

Die entwickelte Methode ist also gut dazu geeignet, toxikologisch bedenkliche und technologisch interessante Alkyl- und Arylphenole in unterschiedlichen Matrices empfindlich und schnell zu bestimmen. Die gaschromatographische Analyse der unpolaren Ferrocenderivate weist eine hohe Trennleistung auf, welche von HPLC-Methoden nicht erreicht werden kann, für die Analyse einzelner Isomere in komplexen Gemischen aber notwendig ist. Die hervorragende Empfindlichkeit und Selektivität des AED im eisenselektiven Modus ermöglicht eine Analyse ohne zeitaufwändige Probenvorbereitung ohne Aufkonzentration oder Isolierung der Phenole aus der Matrix, wie sie in der Literatur oft beschrieben ist. GC-MS ist eine gute Ergänzung zur GC-AED-Analyse und wurde erfolgreich für die schnelle qualitative Analyse benutzt. Da Alkohol- und Phenolferrocenester eine charakteristische Fragmentierung aufweisen, können alkohol- und phenolselektive Chromatogramme aus einem „full scan“ GC-MS-Lauf generiert werden. Außerdem zeigt der Molekularionenpeak eine hohe Intensität, weshalb die Molekülmasse der Ferrocenester benutzt werden konnte, um sehr komplexe Gemische hoch alkylierter Phenole in zwei Dimensionen aufzutrennen.

Die Kombination der GC-AED-Analyse mit ihrem Potential zur quantitativen Spurenanalyse und der GC-MS-Analyse mit ihren Möglichkeiten zur Identifizierung von Substanzen ergibt also eine sehr vielseitig einsetzbare und leistungsfähige Phenolanalysenmethode. Bezüglich der Empfindlichkeit, der Selektivität und der Analysenzeit ist diese Methode vielen in der Literatur beschriebenen Methoden überlegen. Die Erweiterung der Analysenmethode auf die Bestimmung von anderen umweltrelevanten Phenolen, wie zum Beispiel von Chlor- und Nitrophenolen aus Wasser, sollte ebenfalls erfolgversprechend sein. Hier müssten allerdings effektive Extraktionsmethoden, beispielsweise basierend auf Festphasenextraktion, entwickelt werden, was ein Ziel für zukünftige Forschung ist.

## 11 SUMMARY

In this work, the substantial potential of the analysis of phenols as ferrocene esters by gas chromatography and atomic emission detection or mass spectrometric detection was demonstrated. New methods for the analysis of the pesticide *o*-phenylphenol on citrus fruit peels and for the determination of endocrine disrupting nonylphenols in packaging material were developed and successfully applied to real world samples. Additionally, the analysis of phenol patterns in desulfurized heating oil was performed and provided new insights into the dependence of phenol content on the conditions of the desulfurization process, having an effect on fuel quality.

The presented method development was based on a method introduced by Rolfes [54], Wasinski [57], and Andersson. Ferrocenecarboxylic acid chloride (FCC) was used as derivatizing agent for phenols in crude oils and products thereof, followed by analysis using gas chromatography. Atomic emission detection (GC-AED) in iron selective mode was applied because of its excellent sensitivity and selectivity versus carbon, whereas mass spectrometric detection (GC-MS) was ideal for qualitative analysis using the characteristic fragmentation of ferrocene esters. In this work, the concept of ferrocene labeling of the hydroxyl group was utilized in a wider field of application, benefitting of the excellent detection characteristics of ferrocene esters permitting trace analysis of phenols with little tedious sample preparation.

In spite of its advantages, the described derivatization method of Rolfes was not extensively adapted by other laboratories so far. One reason was the lack of commercial availability of FCC, which made the method difficult to use by routine laboratories without synthesis capabilities. Therefore in this work, different methods for the coupling of ferrocenecarboxylic acid with phenols and alcohols using commercially available reagents were evaluated concerning their usability for analytical derivatization. Among the investigated coupling reagents, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimide hydrochloride (EDC) proved to be best suited for the derivatization. Using EDC and ferrocenecarboxylic acid, the yields of esters of certain model compounds were very good even in trace analysis scale. Phenols were derivatized quantitatively, while alcohols showed similar conversion rates to ferrocene esters as found with FCC. The reaction with EDC as coupling reagent could be accelerated by microwave energy and was then completed as fast and as easy as the original derivatization reaction with FCC. Usability for real world samples was demonstrated by analysis of alkyl phenols in heating oil. In this complex

mixture of differently alkylated phenols, the results for both individual isomer and total phenol content were in agreement with results after FCC derivatization. The deviations were in the range of the standard deviation of the analysis.

A derivatization reagent incorporating an ethano bridge as spacer between ferrocene moiety and carboxylic acid function was thought to lead to better yields of esters of sterically hindered phenols and alcohols. Ferrocenepropionic acid chloride and ferrocenepropionic acid anhydride were therefore synthesized in the course of this work, but they did not show the desired yields of esters. Besides, they were more difficult to synthesize and to handle than FCC.

An aim of this work was to use the derivatization with FCC in a wider area of application. The analysis of toxic and endocrine disrupting phenols in food and food contact materials was accomplished by developing methods for the analysis of the pesticide *o*-phenylphenol and for the determination of endocrine disrupting nonylphenols.

*o*-Phenylphenol (OPP) is a widely used fungicide for the protection of citrus fruits after harvest. However, it is suspected to be carcinogenic and it induced different other adverse effects in animal experiments. The residue of OPP on fruits is therefore restricted to a tolerance level of 12 µg/g fruit and the treatment has to be indicated. A sensitive method was developed and validated for the determination of residues of this pesticide on citrus peels. Ultrasonication with dichloromethane provided quantitative extraction yields of OPP in a short time. *o*-Benzylphenol was chosen as internal standard because of its chemical similarity to OPP. The derivatization reaction could be carried out in the same way as in crude oil, except that only one alumina column was needed after derivatization for removal of both matrix and excess reagents. Recovery of OPP from spiked lemon peels was quantitative and reproducible with a relative standard deviation of less than 10%. The limit of detection was only 2 ng/g fruit in real world samples.

Different citrus fruits were analyzed for OPP residues, including lemons, oranges, and grapefruits. Most of the samples contained OPP at levels between 0.06 and 0.37 µg/g, which was far below the tolerance level of 12 µg/g. The method was reproducible with a relative standard deviation between 8 and 13%. GC-AED results of these citrus fruit samples were in good agreement with results from both GC-MS analysis and HPLC-FLD analysis, showing a maximum difference of 20% for one sample containing low levels of OPP. HPLC was performed after a different extraction technique without derivatization and therefore was established as an independent method of analysis. The penetration of OPP

into the peel of an orange was shown to be minimal. Only traces of OPP near the detection limit could be found in the pulp. It can thus be concluded that the consumption of peeled fruit treated with OPP does not lead to a significant intake of this pesticide. Additionally to the analysis of OPP, different alcohols could be identified in citrus peels by GC-MS analysis of the derivatized extracts. A series of *n*-alcohols and citronellol could be detected.

The endocrine disrupting nonylphenols were analyzed in cling film after ultrasonic extraction with dichloromethane and derivatization with FCC. The quantitative analysis by GC-AED was difficult due to the low volatility of nonylphenol ferrocene esters. Reproducibility problems were encountered, which were depending on the concentration of the analyte. Cold or active spots in the chromatographic system were probably responsible for this behaviour. The problem could only be solved for limited time periods by increasing the temperature of different parts of the system or by changing the GC column, injector liner, or plasma discharge tube of the AED. However, the problem could be overcome by monitoring the peak area ratio of two internal standards of different volatility as a quality control measure. Using this procedure, the nonylphenol content in a cling film sample was determined to be 4 µg/g. Six separately extracted and derivatized aliquots of the cling film were also analyzed by HPLC-UV with good reproducibility (relative standard deviation under 9%) and a comparable result of 3 µg/g nonylphenols. Thus, the extraction and derivatization procedure were shown to be reproducible.

Another aim was the determination of alkyl phenol contents and patterns in heating oils, in order to examine the extent of phenol removal by different desulfurization procedures. Phenols contribute to the lubricity of fuels and have an effect on storage stability due to their antioxidant properties. A depletion of phenols was known to occur during desulfurization, but little detailed information was available concerning neither the effect of desulfurization conditions nor preferences for removal of certain phenols. Therefore, both individual concentrations of C<sub>0</sub>- to C<sub>3</sub>-alkylated phenols and total phenol contents of differently desulfurized heating oils were studied in the course of this work, utilizing the largely compound independent response of the AED for the total phenols analysis.

Classical hydrodesulfurization was found to deplete phenols much more thoroughly than a newly developed adsorption desulfurization method (developed by "Oel-Waerme-Institut Aachen, OWI). While especially larger phenols remained in the heating oil after desulfurization by OWI down to residual sulfur contents of 20 ppm, hydrodesulfurization removed those phenols almost completely. The total phenol content of the heating oils

desulfurized by OWI was determined to be between 400 and 1000  $\mu\text{g/g}$  (with a relative standard deviation of less than 9%). Small phenols up to  $\text{C}_3$ -alkylation contributed only 20 to 50  $\mu\text{g/g}$  (RSD < 15%) to the phenol content. In contrast to that, one hydrodesulfurized oil contained only 51  $\mu\text{g/g}$  phenols, including 20  $\mu\text{g/g}$   $\text{C}_0$ - to  $\text{C}_3$ -alkylated phenols.

Larger phenols could not be resolved chromatographically due to the large number of isomers. Structural insights into this complex mixture could be gained by GC-MS analysis. Up to  $\text{C}_{15}$ -alkylated phenols could be detected, including a wide range of isomers with additional rings in the side chains. These highly alkylated phenols could not be found in hydrodesulfurized heating oils. The significance of these differences in phenol depletion between the two desulfurization procedures concerning lubricity and storage stability of the desulfurized fuel, however, has to be investigated in future interdisciplinary research.

The developed methods are well suited for the fast and sensitive analysis of both toxic and technologically interesting alkyl and aryl phenols in different matrices. Gas chromatography of the unpolar ferrocene derivatives provides good resolution of isomers in complex mixtures, which cannot be accomplished by HPLC. The excellent selectivity and sensitivity of atomic emission detection in iron selective mode permits analysis without tedious analyte preconcentration and isolation procedures, as reported in literature. Mass spectrometric detection complements atomic emission detection and was used successfully for qualitative analysis and for screening purposes. Alcohol and phenol esters can easily be distinguished by their characteristic fragmentation patterns, making both alcohol and phenol selective chromatograms accessible from one full scan GC-MS run. Besides, the molecular ion of ferrocene esters is prominent and could be used to resolve very complex mixtures of large alkyl phenols according to their molecular mass.

By combining atomic emission detection with its high potential for quantitative trace analysis and mass spectrometric detection with excellent characteristics for qualitative analysis, a very versatile analysis method for phenols was established, which is superior to most previously published methods in terms of sensitivity, selectivity and speed of analysis. In future, the derivatization to ferrocene esters should also be used with advantage in further interesting fields of phenol analysis - like the analysis of chlorophenols in water - when effective extraction methods, e.g. based on solid phase extraction, have been developed.

## 12 LITERATURVERZEICHNIS

1. *Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (ZZuV), Anlage 5C*, online verfügbar: [http://bundesrecht.juris.de/zzulv\\_1998/](http://bundesrecht.juris.de/zzulv_1998/) (zitiert am 26.1.2006), **1998**.
2. J. Rolfes, *Bestimmung von Alkylphenolen in Rohölen*. Dissertation, Universität Münster, **2000**.
3. F.A.H. Wasinski, *Ferrocencarbonsäurechlorid als hochselektives Derivatisierungsmittel für Hydroxyverbindungen zur Analyse mittels GC-AED und GC-MS*. Dissertation, Universität Münster, **2004**.
4. G. Böhmler und U. Borowski, *Nachweis estrogener Wirksamkeit mit einem biologischen Testsystem - Teil 1: Etablierung in der amtlichen Lebensmittelüberwachung*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **2004**, 100 (1), 1-5.
5. E.J. Routledge und J.P. Sumpter, *Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity*. Journal of Biological Chemistry, **1997**, 272 (6), 3280-3288.
6. Y. Tabira, M. Nakai, D. Asai, Y. Yakabe, Y. Tahara, T. Shinmyozu, M. Noguchi, M. Takatsuki und Y. Shimohigashi, *Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor*. European Journal of Biochemistry, **1999**, 262 (1), 240-245.
7. T.G. Preuss, J. Gehrhardt, K. Schirmer, A. Coors, M. Rubach, A. Russ, P.D. Jones, J.P. Giesy und H.T. Ratte, *Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity*. Environmental Science & Technology, **2006**, 40 (16), 5147-5153.
8. *European Union Risk Assessment Report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol*, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, online verfügbar: [http://ecb.jrc.it/home.php?CONTENU=/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK\\_ASSESSMENT/REPORT/](http://ecb.jrc.it/home.php?CONTENU=/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/) (zitiert am 20.2.2008), **2002**.
9. *National Toxicology Program: Final report on the reproductive toxicity of nonylphenol administered in diet to Sprague-Dawley rats*, Study No. 8989-30, National Institute of Environmental Health Sciences, USA, **1997**.
10. *Chemical study on alkylphenols*, Directoraat-General Rijkswaterstaat, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Niederlande, online verfügbar: <http://www.rikz.nl/thema/ikc/rapport2001/rikz2001029.pdf> (zitiert am 20.2.2008), **2001**.
11. D.T. Lerner, B.T. Bjornsson und S.D. McCormick, *Larval exposure to 4-nonylphenol and 17 beta-estradiol affects physiological and behavioral development of seawater adaptation in atlantic salmon smolts*. Environmental Science & Technology, **2007**, 41 (12), 4479-4485.
12. K.E. Appel, *The carcinogenicity of the biocide ortho-phenylphenol*. Archives of Toxicology, **2000**, 74 (2), 61-71.

13. D. Brusick, *Analysis of genotoxicity and the carcinogenic mode of action for ortho-phenylphenol*. Environmental and Molecular Mutagenesis, **2005**, 45 (5), 460-481.
14. *RICHTLINIE 2003/53/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES zur 26. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates über Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Nonylphenol, Nonylphenoethoxylat und Zement)*. Amtsblatt der Europäischen Union, **2003**, 178, 24-27.
15. *Annual Pesticide Use Report 2006*, California Department of Pesticide Regulation, USA, online verfügbar: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur06rep/chmrpt06.pdf> (zitiert am 20.2.2008), **2006**.
16. R.A. Rudel, D.E. Camann, J.D. Spengler, L.R. Korn und J.G. Brody, *Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust*. Environmental Science & Technology, **2003**, 37 (20), 4543-4553.
17. A. Wenzel, W. Bohmer, J. Muller, H. Rudel und C. Schroter-Kermani, *Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German Environmental Specimen Bank*. Environmental Science & Technology, **2004**, 38 (6), 1654-1661.
18. K. Guenther, V. Heinke, B. Thiele, E. Kleist, H. Prast und T. Raecker, *Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food*. Environmental Science & Technology, **2002**, 36 (8), 1676-1680.
19. J.V. Brian, C.A. Harris, M. Scholze, A. Kortenkamp, P. Booy, M. Lamoree, G. Pojana, N. Jonkers, A. Marcomini und J.P. Sumpter, *Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish*. Environmental Science & Technology, **2007**, 41 (1), 337-344.
20. J.J. Heindel, *Endocrine disruptors and the obesity epidemic*. Toxicological Sciences, **2003**, 76 (2), 247-249.
21. T.P. Bastow, B.G.K. van Aarssen, R. Alexander und R.I. Kagi, *Origins of alkylphenols in crude oils: Hydroxylation of alkylbenzenes*. Organic Geochemistry, **2005**, 36 (7), 991-1001.
22. M. Balogh und P. Laszlo, *Organic chemistry using clays*. Springer-Verlag, Berlin, **1993**.
23. B.R.T. Simoneit, R.N. Leif und R. Ishiwatari, *Phenols in hydrothermal petroleum and sediment bitumen from Guaymas Basin, Gulf of California*. Organic Geochemistry, **1996**, 24 (3), 377-388.
24. S.O. Lucach, B.F.J. Bowler, N. Frewin und S.R. Larter, *Variation in alkylphenol distributions in a homogenous oil suite from the Dhahaban petroleum system of Oman*. Organic Geochemistry, **2002**, 33 (5), 581-594.
25. P. Taylor, S. Larter, M. Jones, J. Dale und I. Horstad, *The effect of oil-water-rock partitioning on the occurrence of alkylphenols in petroleum systems*. Geochimica et Cosmochimica Acta, **1997**, 61 (9), 1899-1910.



26. T.P. Bastow, B.G.K. van Aarssen, G.E. Chidlow, R. Alexander und R.I. Kagi, *Small-scale and rapid quantitative analysis of phenols and carbazoles in sedimentary matter*. Organic Geochemistry, **2003**, 34 (8), 1113-1127.
27. M. Ioppolo, R. Alexander und R.I. Kagi, *Identification and analysis of C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> phenols in some Australian crude oils*. Organic Geochemistry, **1992**, 18 (5), 603-609.
28. J.M. Hughes, G.W. Mushrush und D.R. Hardy, *The relationship between the base extractable species found in middle distillate fuel and lubricity*. Energy & Fuels, **2003**, 17 (2), 444-449.
29. E.G. Jones und L.M. Balster, *Interaction of a synthetic hindered-phenol with natural fuel antioxidants in the autoxidation of paraffins*. Energy & Fuels, **2000**, 14 (3), 640-645.
30. L.M. Balster, S. Zabarnick, R.C. Striebich, L.M. Shafer und Z.J. West, *Analysis of polar species in jet fuel and determination of their role in autoxidative deposit formation*. Energy & Fuels, **2006**, 20 (6), 2564-2571.
31. M.E.F. Laespada, J.L.P. Pavon und B.M. Cordero, *Automated on-line membrane extraction liquid chromatographic determination of phenols in crude oils, gasolines and diesel fuels*. Journal of Chromatography A, **1999**, 852 (2), 395-406.
32. T. Schade, *Analytik von alkylierten Dibenzothiophenen in tiefentschwefelten Dieselölen*. Dissertation, Universität Münster, **2004**.
33. D. Leckel, *Catalytic hydroprocessing of coal-derived gasification residues to fuel blending stocks: Effect of reaction variables and catalyst on hydrodeoxygenation (HDO), hydrodenitrogenation (HDN), and hydrodesulfurization (HDS)*. Energy & Fuels, **2006**, 20 (5), 1761-1766.
34. O. van Rheinberg, K. Lucka und H. Köhne, *Entschwefelung flüssiger Brennstoffe via Adsorption*. Aachen-Erlangener Kolloquium, Aachen, **2006**.
35. T. Schade, *Analysenprotokoll zu den Heizölproben vom Oel-Waerme-Institut Aachen*. **2007**.
36. I. Rodriguez, M.P. Llompарт und R. Cela, *Solid-phase extraction of phenols*. Journal of Chromatography A, **2000**, 885 (1-2), 291-304.
37. W.A. MacCrehan und J.M. Brown-Thomas, *Determination of phenols in petroleum crude oils using liquid-chromatography with electrochemical detection*. Analytical Chemistry, **1987**, 59 (3), 477-479.
38. B. Bennett, B.F.J. Bowler und S.R. Larter, *Determination of C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> alkylphenols in crude oils and waters*. Analytical Chemistry, **1996**, 68 (20), 3697-3702.
39. Y. Yamazaki und T. Ninomiya, *Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography*. Journal of AOAC International, **1999**, 82 (6), 1474-1478.
40. R. Rodriguez, J. Manes und Y. Pico, *Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits*. Analytical Chemistry, **2003**, 75 (3), 452-459.

41. K.D. Buchholz und J. Pawliszyn, *Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols*. Analytical Chemistry, **1994**, 66 (1), 160-167.
42. T. Ieda, Y. Horii, G. Petrick, N. Yamashita, N. Ochiai und K. Kannan, *Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry*. Environmental Science & Technology, **2005**, 39 (18), 7202-7207.
43. C. Blasco, Y. Pico und G. Font, *Monitoring of five postharvest fungicides in fruit and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of AOAC International, **2002**, 85 (3), 704-711.
44. L. Renberg und K. Lindstrom, *C<sub>18</sub> Reversed-phase trace enrichment of chlorinated phenols, guaiacols and catechols in water*. Journal of Chromatography, **1981**, 214 (3), 327-334.
45. T.J. Boyd, *Identification and quantification of monohydroxybenzenes, dihydroxybenzenes and trihydroxybenzenes (phenols) at trace concentrations in seawater by aqueous acetylation and gas-chromatographic mass-spectrometric analysis*. Journal of Chromatography A, **1994**, 662 (2), 281-292.
46. J. Olejniczak, J. Staniewski und J. Szymanowski, *Extraction of phenols and phenyl acetates with diethyl carbonate*. Analytica Chimica Acta, **2005**, 535 (1-2), 251-257.
47. J.B. Green, S.K.T. Yu und R.P. Vrana, *GC-MS analysis of phenolic compounds in fuels after conversion to trifluoroacetate esters*. Journal of High Resolution Chromatography, **1994**, 17 (6), 439-451.
48. R. Galimberti, C. Ghiselli und M.A. Chiaramonte, *Acidic polar compounds in petroleum: a new analytical methodology and applications as molecular migration indices*. Organic Geochemistry, **2000**, 31 (12), 1375-1386.
49. S. Boitsov, S. Meier, J. Klungsoyr und A. Svoldal, *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in produced water from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives*. Journal of Chromatography A, **2004**, 1059 (1-2), 131-141.
50. S. Meier, J. Klungsoyr, S. Boitsov, T. Eide und A. Svoldal, *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in cod (Gadus morhua) tissues as pentafluorobenzoate derivatives*. Journal of Chromatography A, **2005**, 1062 (2), 255-268.
51. M. Kojima, S. Tsunoi und M. Tanaka, *High performance solid-phase analytical derivatization of phenols for gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **2004**, 1042 (1-2), 1-7.
52. B. Seiwert und U. Karst, *Ferrocene-based derivatization in analytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2008**, 390 (1), 181-200.
53. J. Rolfes und J.T. Andersson, *Determination of trace amounts of alcohols and phenols in complex mixtures as ferrocenecarboxylic acid esters with gas chromatography-atomic emission detection*. Analytical Communications, **1996**, 33, 429-432.

54. J. Rolfes und J.T. Andersson, *Determination of alkylphenols after derivatization to ferrocenecarboxylic acid esters with gas chromatography-atomic emission detection*. Analytical Chemistry, **2001**, 73 (13), 3073-3082.
55. B.D. Quimby, P.A. Larson und P.C. Dryden, *A comparison of the HP G2350A AED vs. HP 5921A AED for average values of MDL and selectivity for selected elements*. HP Application Note, **1996**, 228-363.
56. AgilentTechnologies, *Sensitive and selective universal element detection for routine or research analyses*. **2000**.
57. F.A.H. Wasinski und J.T. Andersson, *Qualitative analysis of phenols and alcohols in complex samples after derivatization to esters of ferrocene carboxylic acid by gas chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, **2007**, 1157, 376-385.
58. H. Eckert und M. Koller, *Derivatizing reagents to analyze peptides and proteins by HPLC-ECD based on ferrocene - Synthesis and reaction with H-Phe-otBu to test their suitability*. Zeitschrift für Naturforschung, Section B-A Journal of Chemical Sciences, **1990**, 45 (12), 1709-1714.
59. I. Shiina, R. Ibuka und M. Kubota, *A new condensation reaction for the synthesis of carboxylic esters from nearly equimolar amounts of carboxylic acids and alcohols using 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride*. Chemistry Letters, **2002**, (3), 286-287.
60. B. Neises und W. Steglich, *4-Dialkylaminopyridines as acylation catalysts.5. Simple method for esterification of carboxylic-acids*. Angewandte Chemie-International Edition, **1978**, 17 (7), 522-524.
61. R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jimenez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro und., *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water*. Trends in Analytical Chemistry, **2008**, doi:10.1016/j.trac.2007.10.011.
62. A. Werwein, *Bestimmung von östrogenen Phenolen mit Hilfe von Ferrocencarbonsäurechlorid*. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Münster, **2007**.
63. M. Anastassiades und E. Scherbaum, *Multiresidue method for determination of pesticide residues in citrus fruits by GC-MSD*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **1997**, 93 (10), 316-327.
64. *Bestimmung von o-Phenylphenol, Diphenylamin, Biphenyl und Thiabendazol in pflanzlichen Lebensmitteln mittels HPLC*. Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Münster. **2005**, S. 1-10.
65. U. Gieger, *Zur Bestimmung von Rückständen an fungiciden Konservierungsstoffen und Antioxidationsmitteln auf Frischobst mit Hilfe der HPLC und automatischer Säulenschaltung*. Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie, **1986**, 40, 25-28.
66. P. Mock und E. Scherbaum, *Supercritical fluid carbon dioxide extraction of fungicides in fruits*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **1995**, 91 (12), 385-390.
67. N. Motohashi, H. Nagashima und R. Meyer, *High-performance liquid-chromatography of fungicides in citrus-fruits*. Journal of Liquid Chromatography, **1991**, 14 (19), 3591-3602.

68. B. Saad, N.H. Haniff, M. Idiris Saleh, N. Hasani Hashim, A. Abu und N. Ali, *Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection*. Food Chemistry, **2003**, 84 (2), 313-317.
69. T. Zamora, C. Hidalgo, F.J. Lopez und F. Hernandez, *Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography*. Journal of Separation Science, **2004**, 27 (9), 645-652.
70. L. Yang, A. Kotani, H. Hakamata und F. Kusu, *Determination of ortho-phenylphenol residues in lemon rind by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a microbore column*. Analytical Sciences, **2004**, 20 (1), 199-203.
71. R. Wood, *MAFF validated methods for the analysis of foodstuffs. No. V4. Biphenyl and 2-hydroxybiphenyl in citrus fruits*. Journal of the Association of Public Analysts, **1992**, 28 (1), 43-49.
72. G.D. Johnson, S.G. Harsy, J. Geronimo und J.M. Wise, *ortho-Phenylphenol and phenylhydroquinone residues in citrus fruit and processed citrus products after postharvest fungicidal treatments with sodium ortho-phenylphenate in California and Florida*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2001**, 49 (5), 2497-2502.
73. L. Yu, R. Schoen, A. Dunkin, M. Firman, H. Cushman und A. Fontanilla, *Determination of o-phenylphenol, diphenylamine, and propargite pesticide residues in selected fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of AOAC International, **1997**, 80 (3), 651-656.
74. N. Kolbe und J.T. Andersson, *Simple and sensitive determination of o-phenylphenol in citrus fruits using gas chromatography with atomic emission or mass spectrometric detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2006**, 54 (16), 5736-5741.
75. *Reporting of Gas Chromatographic Methods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1973**, 21 (1), 7A.
76. K. Umamo, Y. Hagi und T. Shibamoto, *Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2002**, 50 (19), 5355-5359.
77. M.L. Lota, D.D. Serra, F. Tomi, C. Jacquemond und J. Casanova, *Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2002**, 50 (4), 796-805.
78. K. Inoue, S. Kondo, Y. Yoshie, K. Kato, Y. Yoshimura, M. Horie und H. Nakazawa, *Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods*. Food Additives and Contaminants, **2001**, 18 (2), 157-164.
79. H. Kataoka, M. Ise und S. Narimatsu, *Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics*. Journal of Separation Science, **2002**, 25 (1-2), 77-85.
80. A. Ozaki und T. Baba, *Alkylphenol and bisphenol A levels in rubber products*. Food Additives and Contaminants, **2003**, 20 (1), 92-98.

81. A.R. Fernandes, C.T. Costley und M. Rose, *Determination of 4-octylphenol and 4-nonylphenol congeners in composite foods*. Food Additives and Contaminants, **2003**, 20 (9), 846-852.
82. J.E. Loyo-Rosales, G.C. Rosales-Rivera, A.M. Lynch, C.P. Rice und A. Torrents, *Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52 (7), 2016-2020.
83. C.M. Lye, C.L.J. Frid, M.E. Gill, D.W. Cooper und D.M. Jones, *Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries*. Environmental Science & Technology, **1999**, 33 (7), 1009-1014.
84. M. Ahel und W. Giger, *Determination of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylate and diethoxylate in environmental samples by High-Performance Liquid-Chromatography*. Analytical Chemistry, **1985**, 57 (8), 1577-1583.
85. L. Nunez, E. Turiel und J.L. Tadeo, *Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, **2007**, 1146 (2), 157-163.
86. T.F. Wheeler, J.R. Heim, M.R. LaTorre und A.B. Janes, *Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS*. Journal of Chromatographic Science, **1997**, 35 (1), 19-30.
87. B. Bennett, K.J. Noke, B.F.J. Bowler und S.R. Larter, *The accurate determination of C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> alkylphenol concentrations in crude oils*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, **2007**, 87 (5), 307-320.
88. D.D. Link, J.P. Baltrus, P. Zandhuis und D.C. Hreha, *Extraction, separation, and identification of polar oxygen species in jet fuel*. Energy & Fuels, **2005**, 19 (4), 1693-1698.
89. P. Taylor, B. Bennett, M. Jones und S. Larter, *The effect of biodegradation and water washing on the occurrence of alkylphenols in crude oils*. Organic Geochemistry, **2001**, 32 (2), 341-358.
90. T.P. Bastow, B.G.K. van Aarssen, R. Herman, R. Alexander und R.I. Kagi, *The effect of oxidation on the distribution of alkylphenols in crude oils*. Organic Geochemistry, **2003**, 34 (8), 1103-1111.
91. N. Kolbe, *Methodenentwicklung zur Analyse von Alkylphenolen aus Erdöleinschlüssen in Gestein*. Diplomarbeit, Universität Münster, **2004**.
92. T. Banwell, C.S. Morse, P.C. Myhre und A. Vollmar, *Consequences of ipso attack in aromatic nitration - Studies of solvolytic behavior of 4-nitro-3,4,5-trimethylcyclohexa-2,5-dienyl acetate*. Journal of the American Chemical Society, **1977**, 99 (9), 3042-3051.
93. U. Karst, *Immunchemische Untersuchungen zur Bestimmung von Herbiziden in Wässern*. Dissertation, Universität Münster, **1992**.

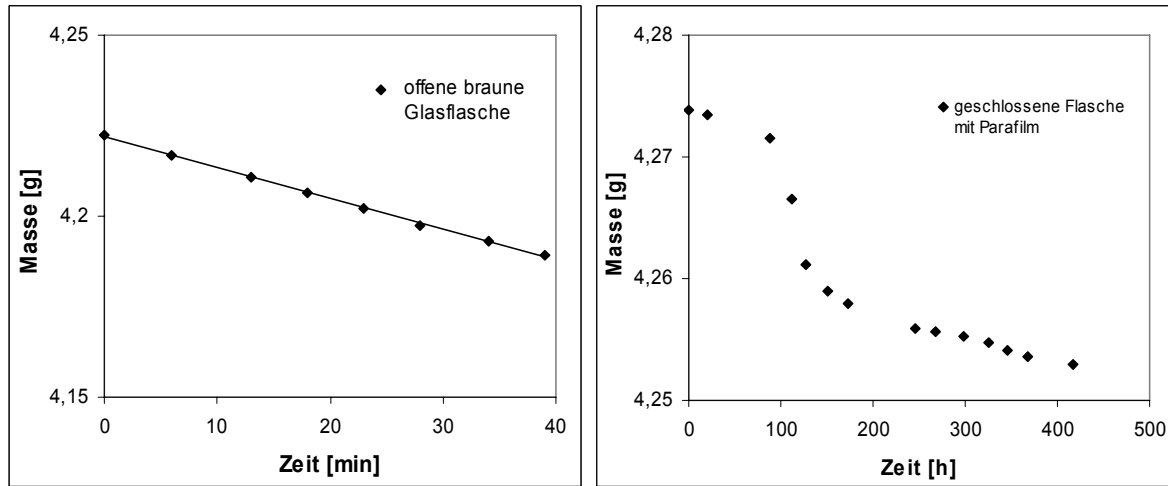
## 13 ANHANG

### 13.1 Ergänzende Untersuchungen

#### 13.1.1 Qualitätssicherung der Standards

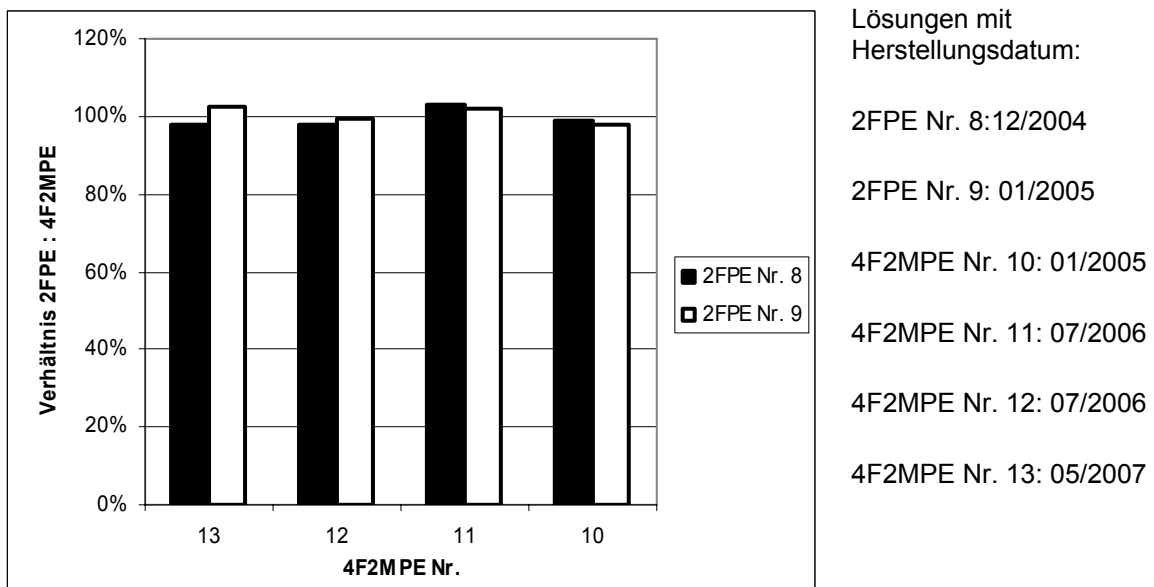
Zu Beginn dieser Arbeit wurden in Cyclohexan gelöste Fluorphenolferrocenester (2FPE, 4F2MPE) als interne Standards verwendet. Cyclohexan besitzt aber bei Raumtemperatur einen merklichen Dampfdruck (104 hPa bei 20°C). So trat das Problem auf, dass sich ältere Lösungen aus der Diplomarbeitszeit, welche häufig geöffnet wurden, um Teilmengen zu entnehmen, um bis zu 50% gegenüber frisch angesetzten Lösungen aufkonzentriert hatten.

Zur Überprüfung wurden zwei braune 10 mL-Glasflaschen, die üblicherweise für die Aufbewahrung von Standardlösungen benutzt wurden, mit Cyclohexan gefüllt und in regelmäßigen Abständen gewogen. Dabei wurde eine Flasche offen im Raum stehen gelassen, während die andere mit einem Schraubdeckel und mit Parafilm umwickelt verschlossen wurde, was der üblichen Aufbewahrung der Standardlösungen entspricht. Aus der geöffneten Flasche entwichen konstant etwa 0,9 mg Cyclohexan/min, so dass bei häufigem Öffnen der Flasche für jeweils einige Minuten eine merkliche Aufkonzentration auftreten kann. Unter der Annahme, dass die Flasche 50 Mal für je 5 min geöffnet wird, um jeweils 100 µL (ca. 80 µg) zu entnehmen, wobei jeweils etwa 4 mg verdunsten, würde sich eine anfangs etwa halbvolle Standardlösung insgesamt um 20% aufkonzentrieren. Die Verdunstung aus einer verschlossenen Flasche ist erwartungsgemäß deutlich geringer und über längere Zeiträume auch nicht konstant. Durchschnittlich betrug die Verdunstungsrate etwa 0,05 mg/h oder 1,2 mg/Tag. Damit trat in verschlossenen Flaschen, die monatelang aufbewahrt wurden, ebenfalls eine Aufkonzentration auf. Berücksichtigt man die Verdampfung aus der geschlossenen Flasche zusätzlich zu den obigen Annahmen über einen Zeitraum von 100 Tagen, ergibt sich ein zusätzlicher Cyclohexanverlust von 12%. Die real gefundene Aufkonzentration war zwar noch größer, ließe sich aber durch größere Verdunstungsverluste bei Bewegung der Flasche im Gegensatz zu ruhigem Stehen der offenen Flasche auf der Waage unter den Messbedingungen erklären.



**Abbildung 13-1: Verdunstungsverluste Cyclohexan aus Glasflaschen (links: offen, rechts: mit Schraubdeckel verschlossen)**

Mit Toluol als Lösungsmittel für Standards konnte dieses Problem gelöst werden. Toluol weist einen um 30 °C höheren Siedepunkt (111 °C im Vergleich zu 81 °C) und einen deutlich niedrigeren Dampfdruck (29 hPa bei 20 °C) auf. Im Mai 2007 wurde eine neue 100 µM 4F2MPE-Standardlösung in Toluol aus Feststoff hergestellt und mit bis zu 2,5 Jahre alten 100µM 2FPE-Lösungen in Toluol verglichen. Zusätzlich wurden alte 4F2MPE-Lösungen (alle 100 µM) gegen dieselben 2FPE-Lösungen getestet. Für die Überprüfung wurden jeweils 100µL der jeweiligen 2FPE- und 4F2MPE-Lösung mit 800 µL Cyclohexan aufgefüllt und am GC-AED mit einem Splitverhältnis von 50:1 gemessen.



**Abbildung 13-2: Standardtest verschiedene 2FPE- und 4F2MPE-Lösungen**

Alle Standardlösungen wiesen untereinander eine Abweichung von höchstens 2,8% auf (Mittelwert 99,9%, relative Standardabweichung 2,1%). Da die alten Lösungen nicht höher konzentriert waren als die frisch angesetzte Lösung 4F2MPE 13, kann man davon ausgehen, dass die Lösungen bei Verwendung von Toluol als Lösungsmittel auch nach 2,5 Jahren noch ihre Nennkonzentration hatten.

### 13.1.2 Nachweisgrenze und linearer Bereich des GC-AED im eisenselektiven Modus

Zur Optimierung der Empfindlichkeit des AED im eisenselektiven Modus wurde im Rahmen dieser Arbeit die Messfrequenz von 5 auf 2,5 Herz abgesenkt. Eine geringere Messfrequenz bedeutet, dass mehr Lichtintensität pro Messpunkt gesammelt wird und damit ein höheres Signal erhalten wird. Allerdings verringert sich die zeitliche Auflösung, so dass bei zu geringer Frequenz die Peakform nicht mehr realitätsgetreu abgebildet wird. Als Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und guter Charakterisierung der Peakform wird allgemein die Aufnahme von 6 bis 10 Messpunkten pro Peak empfohlen, was bei einer Frequenz von 2,5 Herz auch bei schmalen, früh eluierenden Peaks noch gegeben ist.

Die Nachweisgrenze (charakterisiert durch ein  $S/N = 3$ ) lag so bei Injektion von 2  $\mu\text{L}$  bei einer Konzentration von 1 nM des *o*-Phenylphenolferrocenesterstandards (OPPE), wie in Abbildung 13-2 zu sehen ist. Das entspricht 2 fmol injizierter Eisenverbindung oder 25 fg Fe/s (Peakbreite 4,5 s) und ist damit um Faktor 4 niedriger als die Herstellerangabe für das verwendete Gerät [55].

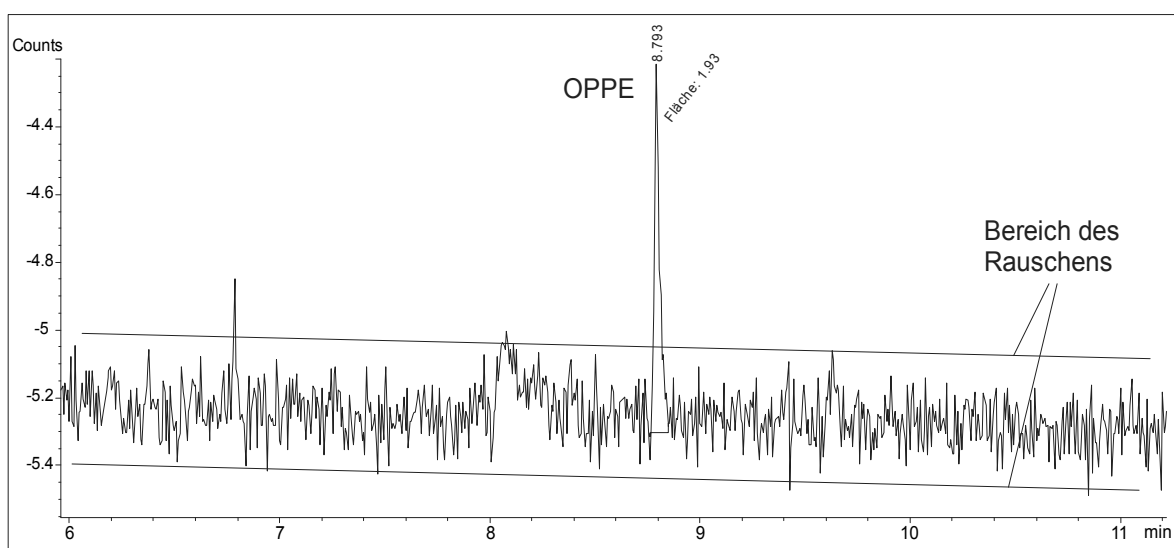
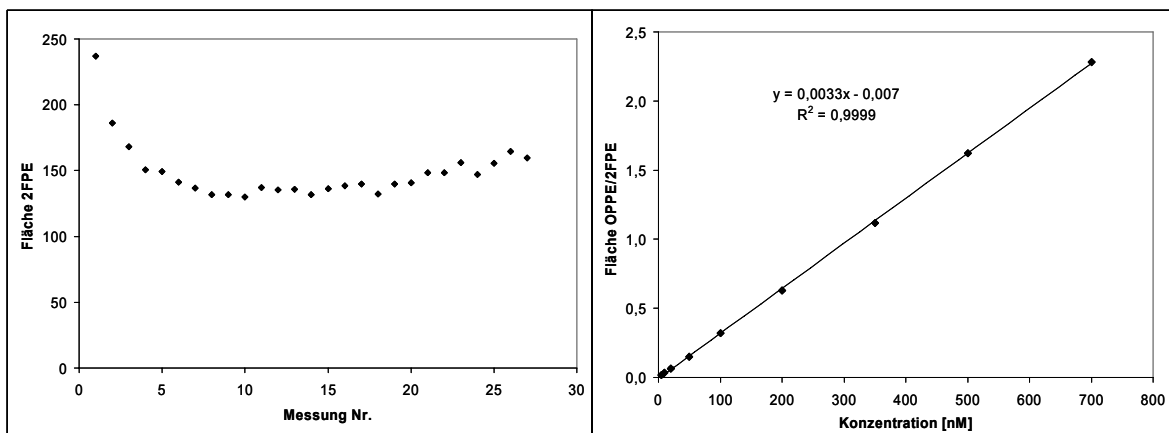


Abbildung 13-2: Eisenselektives GC-AED-Chromatogramm einer Standardlösung von 1 nM OPPE, 2  $\mu\text{L}$  injiziert



Der Response des AED schwankte von Injektion zu Injektion, wie in Abbildung 13-3 (links) zu sehen ist. Unter anderem deshalb wurde grundsätzlich über einen internen Standard quantifiziert. Auch bei Linearitätsuntersuchungen wurden nie absolute Peakflächen gegen die Konzentration aufgetragen, sondern es wurde immer eine Normierung auf die Peakfläche eines in konstanter Menge zugesetzten internen Standards durchgeführt. Nach dieser Normierung zeigt der Response auch im Konzentrationsbereich nahe der Nachweisgrenze eine sehr gute Linearität. In Abbildung 13-3 (rechts) ist eine Messreihe dargestellt, bei der 10 Standardlösungen von OPPE im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 700 nM jeweils dreifach injiziert wurden. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrationsgerade betrug nach Normierung auf 100 nM 2FPE 0,9999.



**Abbildung 13-3: Intensitätsschwankungen bei wiederholter Injektion eines 100 nM 2FPE-Standards (links) und Kalibrationsreihe OPPE von 1 - 700 nM (rechts), Flächen normiert auf 2FPE als interner Standard**

### 13.1.3 Empfindlichkeitssteigerung GC-MS

Die vergleichende Untersuchung von derivatisierten Phenolen und Alkoholen mittels GC-AED und GC-MS wurde im Spurenbereich durch den Empfindlichkeitsunterschied der Instrumente erschwert. Das GC-AED-Instrument im eisenselektiven Modus war um Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  empfindlicher als das verwendete Ionenfallen-GC-MS-Instrument, so dass Spuren an Phenolen mittels GC-MS nicht untersucht werden konnten. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wird häufig der „Selected Ion Monitoring“ Modus (SIM) eines GC-MS verwendet (und auch im Handbuch des in dieser Arbeit verwendeten GC-MS empfohlen), wobei nur bestimmte  $m/z$  aufgenommen werden, für die dann mehr Messzeit zur Verfügung steht.

Bei genauerer Betrachtung stellte sich aber der SIM-Modus bei einer Ionenfalle als prinzipiell wenig sinnvoll heraus, da zunächst alle Ionen in die Falle eingelassen werden müssen und deshalb im SIM für die betrachteten Massen keine größere Kapazität in der Ionenfalle vorhanden ist als im „full scan“. Allerdings kann durch Addition von sogenannten Microscans zu einem Messpunkt eine Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden, wobei aber eine ausreichende zeitliche Auflösung gewährleistet bleiben muss. So bietet sich zur Optimierung eine Verkürzung der Scandauer an. Es erwies daher als sinnvoll, den „full scan“ Modus mit auf die erwarteten Massen eingegrenztem Massenbereich zu benutzen (hier auf  $m/z$  100-600) und dann die Anzahl der Microscans zu maximieren. Bei breiteren Peaks wie z.B. der spät eluierende *o*-Phenylphenolester reichte eine zeitliche Auflösung von 1 sec aus, um noch >6 Messpunkte pro Peak zu erhalten, so dass 7 Microscans addiert werden konnten. Für früher eluierende, schmalere Peaks war aber eine Addition von nur 4 Microscans sinnvoller.

Bei Wiederholung der GC-MS Messung eines derivatisierten Rohöls aus dem alten Vial konnte nach Optimierung der Messparameter (allerdings auch anderer Instrumentenkonfiguration, z.B. andere Säule) mit der alten Messlösung eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der alten Messung erreicht werden. Jetzt konnten noch  $C_9$ -Phenole im Öl nachgewiesen werden, während in der alten Messung schon  $C_5$ - und  $C_6$ -Phenole ein sehr schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwiesen.

#### 13.1.4 Massenspektrometrie der Ethylphenolferrocenester

In der Massenspektrometrie werden Benzylgruppen nach der Ionisierung leicht abgespalten, da diese umgelagert werden können zu einem durch seine Aromatizität energetisch günstigen Tropyliumkation. Ethylphenolferrocenesterkationen könnten nach Abspaltung eines neutralen Methylradikals Tropyliumionen bilden, weshalb ein Fragment mit  $m/z$  ( $M^+ - 15$ ), also 319, erwartet würde. Dieses ist aber im Massenspektrum von Ethylphenolestern nicht vorhanden, wie in Abbildung 13-4 zu sehen ist. Das Massenspektrum zeigt keine Unterschiede zu den Spektren anderer Phenolferrocenester mit dem Molekularion als Basispeak und den Fragmenten  $m/z$  213 (Ferrocencarbonylkation), 185 (Ferrocenkation) und 129 (vermutlich Dicyclopentadienylkation). Diese übliche Fragmentierung ist ebenso wie die einheitliche Fragmentierung aller Nonylphenolferrocenesterisomere ein Hinweis darauf, dass bei Ferrocenestern durch EI-Ionisierung das Eisen zu Fe(III) oxidiert wird. Durch die Lokalisation der Ladung am Ferrocen wird das Fragmentierungsverhalten der Ester deshalb durch räumlich weit entfernte Substituenten am Phenolring kaum noch beeinflusst.

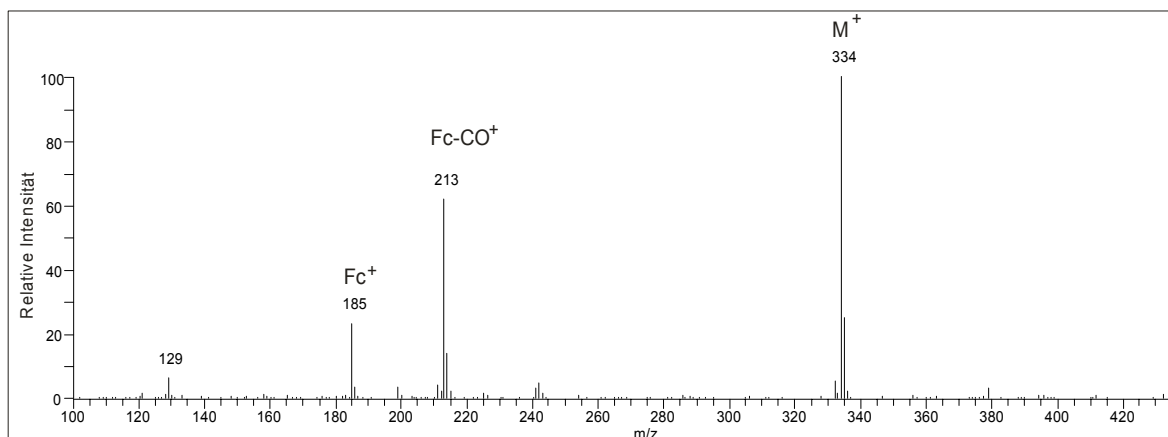


Abbildung 13-4: Massenspektrum von 3-Ethylphenolferrocenester

## 13.2 Allgemeine Synthesevorschriften

### 13.2.1 Synthese von Ferrocencarbonsäurechlorid

FCC wird in einer einstufigen Reaktion aus Ferrocencarbonsäure und Oxalylchlorid nach Vorschrift von Jürgen Rolfes [53] synthetisiert, wobei aber das krebserzeugende Benzen als Lösungsmittel durch Cyclohexan ersetzt wurde. Eine ausführliche Vorschrift findet sich auch in meiner Diplomarbeit [91]. Die verwendete Ferrocencarbonsäure wird drei Mal mit je 20 mL Pentan gewaschen, um eventuell vorhandene Ferrocencarbonsäureester zu entfernen. Nach Abdampfen des restlichen Pentans übergießt man 4,10 g (17,8 mmol) Ferrocencarbonsäure in einem 250 mL Rundkolben mit 50 mL Cyclohexan und versetzt die Suspension mit einer Lösung aus 2,89 g (22,7 mmol) Oxalylchlorid in 40 mL Cyclohexan sowie 1 mg DMAP als Katalysator. Die Suspension wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, langsam erhitzt und dann 20 Minuten unter Rückfluss gekocht, wobei eine rote Lösung entsteht. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Aus dem dunkelroten, öligen Rückstand wird das FCC bei 30°C mit einmal 20 mL und einmal 10 mL Pentan herausgelöst und noch warm über einen Glasfiltertiegel D1 in einen Rundkolben filtriert. Dieser wird zur langsamen Kristallisation fest verschlossen und zunächst einige Stunden bei Raumtemperatur, dann einen Tag im Kühlschrank und anschließend einen Tag im Gefrierschrank aufbewahrt. Das umkristallisierte FCC erhält man durch Entfernen der Mutterlauge in der Kälte mit einer Pasteurpipette und Trocknen der kubischen, dunkelroten Kristalle im Vakuum. Das FCC wird im Gefrierschrank unter Argon aufbewahrt und ist mehrere Monate lagerfähig. Die Ausbeute beträgt etwa 70%.

### 13.2.2 Synthese von Phenolferrocenestern

Etwa 150  $\mu\text{mol}$  Phenol (z.B. 25,5 mg OPP; 27,6 mg OBP) werden genau eingewogen und in etwa 0,5 mL Dichlormethan gelöst. Dazu werden 42 mg FCC (0,17  $\mu\text{mol}$ ) und 43 mg DMAP (0,35  $\mu\text{mol}$ ), je in 0,5 mL Dichlormethan gelöst, zugegeben. Nach 10 min wird die Lösung auf eine Aluminiumoxid-Glaskartuschensäule (1,7 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) gegeben und die Ferrocenester (orange Fraktion) werden mit 2,5 mL Dichlormethan eluiert. Nach dem Einengen im Stickstoffstrom bei 40°C bis zur Trockne werden Reinheit und Ausbeute bestimmt.

### 13.2.3 Synthese von 2,3,4-Trimethylphenol

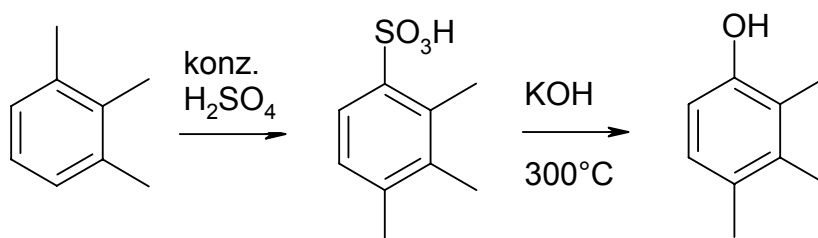


Abbildung 13-5: zweistufige Synthese von 2,3,4-Trimethylphenol

Das kommerziell nicht erhältliche 2,3,4-Trimethylphenol (234TMP) wurde als Retentionsstandard nach einer modifizierten Vorschrift von Banwell [92] dargestellt. In der 1. Stufe wurden 8,01 g Hemellit (1,2,3-Trimethylbenzen) mit 6 mL konz. Schwefelsäure bei 75°C für 15 Minuten unter Rühren umgesetzt. Nach Zugabe von Wasser (ca. 30 mL) fiel weißer Feststoff aus, der abgesaugt wurde. Das Produkt war in Ether nicht löslich, so dass es nicht wie in [92] umkristallisiert, sondern nur mit Ether gewaschen und anschließend getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 12,62 g (106%) weißen Feststoff, was auf eine nicht vollständige Trocknung bzw. Schwefelsäurereste schließen lässt.

NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 2,28 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 2,65 (s, 3H), 7,20 (d, 1H,  $J_{\text{AB}} = 8,1$  Hz), 7,75 (d, 1H,  $J_{\text{AB}} = 8,1$  Hz) in Übereinstimmung mit [92]<sup>15</sup>, Hydroxyl-H ist wahrscheinlich durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Reste bei 5 ppm überlagert.

5,00 g der Sulfonsäure wurden dann auf eine Schmelze aus 11,54 g KOH-Plätzchen im Nickeltiegel bei 250°C gegeben. Anschließend wurde die Schmelze für 30 min auf 300°C erhitzt und dann 15 min auf 315°C. Der Schmelzkuchen wurde in ca. 250 mL Wasser ausgelaugt, mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert und durch Wasserdampfdestillation gereinigt. Die

<sup>15</sup> ppm-Werte sind um ca. 0,2 ppm gegenüber Lit. verschoben, allerdings ist Skala hier nicht kalibriert wegen fehlenden TMS.

wässrige Lösung und im Kühler ausgefallener Feststoff wurden mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Ausbeute betrug 480 mg (16%) braunen Feststoff.

NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,17 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 4,2 (s, br, 1H), 6,54 (d, 1H, J<sub>AB</sub> = 8,1 Hz), 6,84 (d, 1H, J<sub>AB</sub> = 8,1 Hz) in Übereinstimmung mit [92], allerdings sind außerdem ca. 20% 345TMP als Nebenprodukt entstanden (2,08 (s, 3H), 2,22 (s, 6H), 6,49 (s, 2H).

GC-MS: großer Peak 234TMP bei 6,54 min (Massenspektrum 136 (80, M<sup>+</sup>), 121 (100, M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), 91 (40, M<sup>+</sup> - 3xCH<sub>3</sub>), 77 (25, Ph<sup>+</sup>) und kleiner Peak 345TMP bei 6,68 min (gleiches Massenspektrum), ca. 22% der Fläche des großen Peaks.

### 13.2.4 Synthese von Ferrocenpropionsäurechlorid

Ferrocenpropionsäure wurde in Kooperation mit Bettina Seiwert und der Forschungspraktikantin Marion Schmolke in zwei Stufen aus Ferrocenaldehyd und Malonsäure hergestellt. Zur Darstellung der Ferrocenacrylsäure wurden 3,21 g (15 mmol) Ferrocenaldehyd und 1,55 g (16 mmol) Malonsäure in 5 mL trockenem Pyridin gelöst, mit 0,5 mL Pyridin versetzt und 3 h bei 100°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf etwa 120 mL Eis / halbkonzentrierte Salzsäure gegeben, wobei ein tief dunkelroter Feststoff ausfiel. Dieser wurde durch einen D4-Glasfiltertiegel filtriert und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 2,55 g (66%) dunkelroter Feststoff (Lit. [93]: 63%).

Die Ferrocenacrylsäure wurde für mehrere Stunden in Ethanol mit Palladium/Aktivkohle als Katalysator (10% w/w) hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat eingeeengt und mit Eiswasser versetzt, wobei das Produkt fast quantitativ als gelb-brauner Feststoff ausfiel. Die Ferrocenpropionsäure stellte sich allerdings als mit einer unbekanntem Substanz verunreinigt heraus, so dass aus Toluol/Pentan (ca. 5:1) umkristallisiert wurde. Die Reinheitskontrolle erfolgte nach Methylierung mit Trimethylsilyldiazomethan mittels GC-MS, GC-FID und GC-AED. Die Verunreinigung wurde durch die Umkristallisation fast vollständig entfernt.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,65 (tt, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 4,10 (s, 4H, Cp), 4,14 (s, 5H, Cp).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 24,55 (CH<sub>2</sub>), 35,42 (CH<sub>2</sub>), 67,47 (Cp), 67,95 (Cp), 68,59 (Cp), 87,18 (subst. Cp), 179,58 (C=O).

MS (ESI): M<sup>+</sup> = 258

Die anschließende Chlorierung zum Säurechlorid wurde analog zur FCC-Herstellung mit 30% Überschuss an Oxalylchlorid in Cyclohexan durchgeführt. 263,4 mg Ferrocenpropionsäure (1,02 mmol) wurden mit 180 mg Oxalylchlorid (1,4 mmol) nach Vorschrift 13.2.1 in Cyclohexan chloriert. Ferrocenpropionsäure erwies sich dabei als reaktiver als Ferrocencarbonsäure: schon bei Raumtemperatur war eine leichte Gasentwicklung zu beobachten und die Lösung färbte sich gelb. Das entstandene braune Öl wurde aus Pentan umkristallisiert, wobei ein gelber Feststoff erhalten wurde mit einer Ausbeute von 48%.

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 25,65 ( $\text{CH}_2$ ), 49,00 ( $\text{CH}_2$ ), 68,19 (Cp), 68,47 (Cp), 69,11 (Cp), 86,10 (Cp subst.), 173,70 (C=O).

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,73 (t, 2H, 2-H,  $J_{\text{AB}} = 7,5$  Hz), 3,10 (t, 2H, 1-H,  $J_{\text{AB}} = 7,5$  Hz), 4,08 (s, br, 4H, 3-H+4-H), 4,12 (s, 5H, 5-H)

### 13.3 Geräte

#### Verwendeter GC-AED:

Gaschromatograph:	Agilent 6890N
Atomemissionsdetektor:	Agilent G2350A
Autosampler:	Gerstel MPS2
Injektor:	Gerstel KAS, splitless
Injektortemperatur:	Temperaturprogramm 60°C -12 °C/s – 300 °C oder isotherm 300° C
Kapillarsäule:	Supelco SLB5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (oder vergleichbare Säulen anderer Hersteller)
Trägergas:	Helium 6.0 (BIP), 40 cm/s (konstanter Fluss)
Transferlinientemperatur:	300 °C (bei NK_NON.M: 320 °C)
Cavitytemperatur:	300 °C (bei NK_NON.M: 320 °C)
Helium Make Up Gas:	240 mL/min
Wasserstoff Reagenzgas:	15 psi
Sauerstoff Reagenzgas:	20 psi
Solvent Vent:	0 – 5 min
Temperaturprogramme:	NK_FCE1: 60 °C – 1,5 min – 45 °C/min – 250 °C - 1 min – 4 °C/min - 270 °C - 0 min - 10 °C/min - 300°C - 5 min

NK\_Z7: 60 °C - 0,5 min – 45 °C/min – 295 °C – 0 min – 2 °C/min – 300 °C – 3 min

NK\_NON: 60 °C – 1 min – 45 °C/min – 295 °C – 1 min – 10 °C/min – 320 °C – 4 min

Injektionsvolumen: 1 µL

#### Verwendetes Ionenfallen-GC-MS:

Gaschromatograph: Finnigan MAT GCQ  
Massenspektrometer: Finnigan MAT GCQ MS  
Autosampler: CTC A200S Liquid Sampler  
Injektor: split / splitless (splitless), 270 °C  
Kapillarsäule: Supelco SLB5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm  
(oder vergleichbare Säulen anderer Hersteller)  
Trägergas: Helium 6.0 (BIP), 40 cm/s  
Transferline: 275 °C  
Ionisierungsbedingungen: EI, 70 eV, Ion source 200 °C  
Modus: Full Scan (100-500 amu), Filament-Delay: 5 min  
Temperaturprogramme: 60 °C – 1,5 min – 40 °C/min – 250 °C - 1 min – 4 °C/min - 270 °C - 0 min - 10 °C/min - 300°C - 5 min  
oder NK\_Z7 bzw. NK\_NON siehe oben  
Injektionsvolumen: 2 µL

#### Verwendetes Quadrupol-GC-MS:

Gaschromatograph: Agilent 6890  
Massenspektrometer: Waters Micromass Quattro Micro  
Injektor: split / splitless (splitless), 270 °C  
Kapillarsäule: Agilent HP5, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm  
Trägergas: Helium 6.0 (BIP), 40 cm/s  
Ionisierungsbedingungen: EI, 70 eV  
Modus: SIM Modus (213 amu)  
Temperaturprogramm: 60 °C - 0,5 min – 45 °C/min – 295 °C – 0 min – 2 °C/min – 300 °C – 3 min  
Injektionsvolumen: 2 µL

**Verwendetes HPLC-FLD:**

HPLC:	Hewlett-Packard 1100 mit DAD und FLD Detektoren
Säule:	Merck LiChrospher 60 RP-select B, 125x4 mm, 5 µm Partikel
Temperatur:	25 °C
Mobile Phase:	A: Phosphatpuffer, pH 7,0 (352 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 726 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O in 1 L bidestilliertem Wasser) B: Methanol
Gradientenprogramm:	45% B bei 0 min, 73% B bei 20 min, 85% B bei 24 - 34 min, 45% B bei 40 min
Flussrate:	1,1 ml/min
Detektionswellenlängen:	FLD $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ . $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ , UV 245 nm
Injektionsvolumen:	10 µL

**Verwendetes HPLC-UV und -MS:**

HPLC:	Shimadzu LC-10AD mit UV-Detektor SPD10AV
Massenspektrometer:	Applied Biosystems QTrap LC/MS/MS System
Autosampler:	Shimadzu SIL-HT
Säule:	Supelco Discovery Bio Wide Pore C <sub>18</sub> , 150 x 2,1 mm, 5 µm Partikel
Temperatur:	25 °C
Mobile Phase:	A: Wasser mit 0,1% Ameisensäure B: Acetonitril
Gradientenprogramm:	60% B bei 0 min bis 90% B bei 11,6 – 12,6 min, zurück auf 60% B bis 15 min
Flussrate:	0,3 ml/min
Detektionswellenlänge UV:	254 nm
Modus Massenspektrometer:	SIM (348, 349, 376, 377, 432, 433 amu), Q1 Multiple Ions
Injektionsvolumen:	10 µL



## 13.4 Chemikalien

Phenolstandards	Reinheit	Hersteller
Phenol	99%	Aldrich
4-Methylphenol	99%	Aldrich
2-Methylphenol	99,5%	Fluka
3-Methylphenol	97%	Aldrich
2-Fluorphenol	98%	Aldrich
4-Fluor-2-methylphenol	99%	Aldrich
2,3-Dimethylphenol	99%	Aldrich
2,4-Dimethylphenol	98%	Aldrich
2,5-Dimethylphenol	99%	Aldrich
2,6-Dimethylphenol	98%	Fluka
3,4-Dimethylphenol	unbekannt	Fluka
3,5-Dimethylphenol	99%	Aldrich
2-Ethylphenol	99%	Aldrich
3-Ethylphenol	99%	Aldrich
4-Ethylphenol	97%	Fluka
2,3,5-Trimethylphenol	98%	Lancaster
2,3,6-Trimethylphenol	97%	Fluka
2,4,6-Trimethylphenol	97%	Aldrich
3,4,5-Trimethylphenol	97%	Aldrich
2-Isopropylphenol	98%	Aldrich
2-n-Propylphenol	97%	Lancaster
3-Isopropylphenol	99%	Aldrich
3-n-Propylphenol	98%	Avocado
4-Isopropylphenol	98%	Aldrich
4-n-Propylphenol	98%	Lancaster
2-tert-Butyl-4-methylphenol	99%	Aldrich
4-n-Pentylphenol	99%	Fluka
2-Methyl-5-isopropylphenol	unbekannt	Laborbestand
2-Isopropyl-5-methylphenol	unbekannt	Laborbestand
2-tert-Butyl-4-methylphenol	99%	Aldrich
4-Phenylphenol	98%	Fluka
2-Phenylphenol	99%	Merck
2-Benzylphenol	99%	Aldrich
9-Phenanthrol	techn.	Aldrich
4-tert-Octylphenol	97%	Aldrich
4-n-Nonylphenol	98%	Lancaster
4-Nonylphenole	technisch	Riedel-de Haen

<b>Alkoholstandards</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>
Cyclohexanol	99%	Fluka
2-Ethylcyclohexanol	99%	Aldrich
1-Nonanol	98%	Aldrich
1-Phenyl-2-propanol	99%	Acros
2-Undecanol	98%	Fluka
6-Undecanol	99%	ABCR

<b>Sonstige Chemikalien</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>
Ferrocencarbonsäure	98%	ABCR
Dimethylaminopyridin (DMAP)	99%	Aldrich
Oxalychlorid	99%	Fluka
2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid	unbekannt	TCI
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	98%	Fluka
N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	99%	Aldrich
Triethylamin	99%	Merck
Hemellitol (1,2,3-Trimethylbenzen)	90%	Aldrich
Kaliumhydroxid	85%	Grüssing
Natriumsulfat	99%	Fluka
Aluminiumoxid, 50 – 200 µm	unbekannt	Acros

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>
Dichlormethan	“for residue and pesticide analysis”	Acros
Cyclohexan	“ECD tested for pesticide analysis”	Acros
Toluen	“Pestanal”	Riedel-de Haen
Pentan	p.a., 99%	Fluka
Methanol	p.a.	Acros
Diethylether	p.a.	Riedel-de Haen
Ethylacetat	„für die Rückstandsanalyse“	Riedel-de Haen
Acetonitril	„HPLC grade“	Fluka

### 13.5 Abkürzungsverzeichnis

1C <sub>9</sub> ol(-E)	1-Nonanol(ferrocenester), andere Alkohole analog
26DMP(E)	2,6-Dimethylphenol(ferrocenester), andere Alkylphenole analog
4NP(E)	4-Nonylphenol(ferrocenester), Isomerengemisch
4nNP(E)	4- <i>n</i> -Nonylphenol(ferrocenester)
4F2MPE	4-Fluor-2-methylphenolferrocenester, interner Standard
AED	Atomemissionsdetektor
ASE	engl.: Accelerated Solvent Extraction
BCF	engl.: Bio Concentration Factor, Biokonzentrationsfaktor
Best.	Bestimmung
BG	Bestimmungsgrenze
Blindw.	Blindwert
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BT	Benzothiophen
C <sub>3</sub> -Phenol	Phenol mit 3 C-Atomen in Seitenkette (3 Methyl-, 1 Ethyl- + 1 Methyl- oder 1 Propylgruppe), andere Indices analog
CE	engl.: Capillary Electrophoresis, Kapillarelektrophorese
CH	Cyclohexan
DB5	GC-Säule: stationäre Phase mit 5% Phenyl- + 95% Methylgruppen
DB17	GC-Säule: stationäre Phase mit je 50% Phenyl- + Methylgruppen
DBT	Dibenzothiophen
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Deriv.	Derivatisierung
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
ECD	engl.: Electron Capture Detector, Elektroneneinfangdetektor (GC) oder: Electrochemischer Detektor (HPLC)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropano)carbodiimid Hydrochlorid
EE	Essigsäureethylester oder Ethylacetat
EL	Heizöl extra leicht = in Haushaltsheizungen verwendetes Heizöl
engl.	englisch
ER	engl.: Estrogen receptor, Östrogenrezeptor
ESI	Elektronensprayionisierung (Massenspektrometrie)
FCC	Ferrocencarbonsäurechlorid
FcCOOH	Ferrocencarbonsäure
FLD	Fluoreszenzdetektion, Fluoreszenzdetektor
FID	Flammenionisationsdetektor
FPC	Ferrocenpropionsäurechlorid
GC	Gaschromatographie oder Gaschromatograph
GPC	Gelpermeationschromatographie

HDS	Hydrodesulfurierung (katalytische hydrierende Entschwefelung)
HPLC	engl.: High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Ionenchromatographie
IS	Interner Standard
LD <sub>50</sub>	lethale Dosis für 50% der Versuchstiere
LLE	engl.: Liquid-Liquid Extraction, Flüssig-flüssig-Extraktion
log K <sub>ow</sub>	Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
LOQ	engl.: Limit Of Quantification, Quantifizierungsgrenze
Lsgm.	Lösungsmittel
<i>m-</i>	<i>meta-</i>
M <sup>+</sup>	Molekülionenpeak (Massenspektrometrie)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MSPD	engl.: Matrix Solid Phase Dispersion
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N-tert</i> -butyldimethylsilyltrifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis (Massenspektrometrie)
n.a.	nicht angegeben
NaAC	Natriumacetat
NCI	Negative Chemische Ionisierung (Massenspektrometrie)
n.n.	nicht nachgewiesen
NPEO <sub>x</sub>	Nonylphenoethoxylate
<i>o-</i>	<i>ortho-</i>
OBP(E), OPP(E)	<i>o</i> -Benzylphenol- bzw. <i>o</i> -Phenylphenol(ferrocenester)
OWI	Oel-Wärme-Institut Aachen
<i>p-</i>	<i>para-</i>
PFBBBr	Pentafluorbenzylbromid
PFBC	Pentafluorbenzoylchlorid
ppm	engl.: parts per million, z.B. µg/g
RSD	engl.: Relative Standard Deviation, relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
SBSE	engl.: Stir Bar Solid Phase Extraction
SFE	engl.: Supercritical Fluid Extraction, überkritische Flüssigextraktion
SIM	engl.: Selected Ion Monitoring (Massenspektrometrie)
S/N	engl.: Signal-to-Noise-Ratio, Signal-zu-Rauschen-Verhältnis
SPME	engl.: Solid Phase Microextraction, Festphasenmikroextraktion
SPE	engl.: Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
TFA	Trifluoracetanhydrid (Acetylierungsreagenz)
TNPP	Tris-(4-nonylphenol)phosphit
TOF	engl.: Time Of Flight, Flugzeitmassenspektrometrie
Wasserdampfdest.	Wasserdampfdestillation
ZZuIV	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

## DANKSAGUNG

Viele Leute haben mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt und auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt:

- Prof. Jan Andersson für das interessante Promotionsthema, für viele hilfreiche Diskussionen und Ideen, für die gute Betreuung allgemein ... und für die alljährliche Ausrichtung einer tollen Weihnachtsfeier.
- Meinen Laborkollegen Ansgar Japes (für die große allgemeine Hilfsbereitschaft), Markus Penassa (für's Instandhalten des GC-MS und der Computer), Magdalena Ulman (für die weibliche Verstärkung), Thies Nolte (für lustige Geschichten nebenbei und die Verbreitung guter Laune), Anna Werwein (für die gute Zusammenarbeit und den Einsatz für das Nonylphenol-Thema), Dr. Benedikte Roberz (für Tipps und Tricks zum AED und allgemeine Organisation), Dr. Thomas Schade (für sein hilfreiches Wissen zu allen möglichen chemischen Problemen), Dr. Saroj Kumar Panda und Dr. Kishore Sripada (für ihren indischen Beitrag zum multikulturellen AK mit Chicken Curry, Schriftlektionen und englisch-deutschen Diskussionen), Daniel Plothe, Jens Künne-meyer (der netteste „Überläufer“ :-)), Dr. Hendrik Müller, Dr. Frank Wasinski, Dr. Eiman Fathalla und Dr. Abdelrahman Hegazi.

Allgemein danke ich euch für wissenschaftliche Diskussionen, die mir häufig sehr weiter geholfen haben! Aber auch abseits der Forschung, zum Beispiel beim Klettern, hat es viel Spaß mit euch gemacht!

- Meinen fleißigen und kritischen Korrekturlesern Dr. Eike Kleine-Benne, Dr. Andy Scheffer, Ansgar Japes und Markus Penassa.
- Dem Arbeitskreis Karst für die „gute Nachbarschaft“ in 2.17 und auf der 2. Etage insgesamt und für die nette „Reisebegleitung“ nach Chicago und Jena, außerdem besonders Susanne Bomke für die Einführung in die LC-MS sowie die Hilfe bei den Messungen und Dr. Bettina Seiwert für die Zusammenarbeit bei der Synthese von Derivatisierungsreagenzien und für ihre Ferrocenbegeisterung.
- Meinen ehemaligen Forschungspraktis Wiebke Lohmann, Britta Zehnpfennig, Martin Thämer, Christian Johanns, Ludger Busch, Dennis Heitmann, Thies Nolte, Marion Schmolke und Benjamin Schinor – ihr habt mir ebenfalls sehr geholfen mit eurer Arbeit!

- Dr. Heinrich Luftmann (Institut für Organische Chemie) für die GC-MS- und TOF-MS-Messungen, Michael Scherges (Landesinstitut für Gesundheit und Arbeit NRW) für die Bereitstellung des HPLC-FLD-Geräts und die Hilfe bei den Messungen, Oliver van Rheinberg (OWI Aachen) für die Bereitstellung der Heizölproben, der Feinmechanischen Werkstatt für manche schnelle und unkomplizierte Problemlösung, dem Glasbläser für die Anfertigung des Clevenger-Extraktors, sowie Karin Weißenhorn für die nette Atmosphäre und die Frühstückseier.
- Allen meinen Freunden aus Witten und Münster (wo ihr inzwischen auch seid!), allen Paddlern und Kletterern, für die schöne Zeit außerhalb des Labors. Ihr habt mitgeholfen, den Kopf frei zu kriegen und neue Motivation für die Arbeit zu finden!
- Meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung in allen Lebenslagen und dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt – und Maren zusätzlich für die kleine Zeichenhilfe.
- Eike danke ich für ... mehr, als in eine Danksagung passt!

## LEBENS LAUF

Name: **Nina Kolbe**  
Geburtsdatum: 18. 12. 1979  
Geburtsort: Herdecke  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Dr. Bärbel Kolbe (geb. Fiedler) und Dietrich Kolbe

### Schul Ausbildung

1986 – 1990: Brenschenschule, Witten  
1990 – 1999: Ruhrgymnasium, Witten  
08 – 12.1996: Amherst Central High School, Buffalo, USA  
20.05.1999: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10 / 1999 – 08 / 2004: Studium der Chemie (Diplom) an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
08.08.2001: Diplom-Vorprüfung  
06 – 10.2003: Studienpraktikum bei CSIRO Petroleum, Sydney, Australien  
01 – 08.2004: Diplomarbeit in Analytischer Chemie bei Prof. Jan T. Andersson zum Thema: „*Methodenentwicklung zur Analyse von Alkylphenolen aus Erdöleinschlüssen in Gestein*“  
13.08.2004: Diplomprüfung

### Promotionsstudium

01.10.2004: Beginn der Dissertation am Institut für Anorganische und Analytische Chemie unter Betreuung von Prof. Jan T. Andersson

### Berufstätigkeit

01.10.2004 – heute: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

Münster, den 20. Februar 2008