

**Analyse von Cypermethrin aus Holz****HPLC-Verfahren mit UV - Detektor****Allgemeine Grundlagen**

Cypermethrin wird aus Holzspänen mit Methanol im Ultraschallbad extrahiert und mittels HPLC unter Verwendung eines externen Standards quantifiziert.

Im Assessment Report (gemäß Europäischer Biozidverordnung 528/2012) wird HPLC/UV zur Analyse des technischen Wirkstoffs vorgeschlagen. Zur Bestimmung von Cypermethrin in Rückständen wird GC/MS vorgeschlagen.

Hinweis:  
Das HPLC-Verfahren ist in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 800 mg/kg Holz anwendbar.

Alternativ besteht die Möglichkeit, Cypermethrin aus Holz mittels GC/MS zu bestimmen

**Reagenzien und Geräte**

## Reagenzien

1. Methanol zur Rückstandsanalyse (CAS-Nr. 67-56-1)
2. Acetonitril für HPLC (CAS-Nr. 75-05-8)
3. Phosphorsäure 85%ig, extra pure (CAS-Nr. 7664-38-2)
4. Cypermethrin (CAS-Nr. 52315-07-8)

Hinweis: Die Isomerenzusammensetzung ist zu beachten, sie kann Einfluss auf die korrekte Quantifizierung haben.

## Geräte

1. Labormühle
2. Analysenwaage
3. Ultraschallbad
4. Verschließbare Glasgefäße
5. Glasvollpipetten
6. Kolbenhubpipetten
7. 0,45 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter, einschließlich Einwegspritzen
8. HPLC mit UV-Detektor

**Extraktion von Cypermethrin aus behandeltem Holz unter Verwendung von Methanol**

Zur Probenahme für Holz siehe DIN EN 212: 2003-09

1. Das zu untersuchende Holz wird mittels einer Labormühle auf eine Partikelgröße < 1 mm zerkleinert.
2. Etwa 2 g des gemahlene Holz werden in ein verschließbares Glasgefäß auf 2 Nachkommastellen genau eingewogen.
3. Anschließend werden 40 ml Methanol zugegeben. Das Verhältnis von Holzeinwaage zum Methanolvolumen von ca. 1:20 ist einzuhalten.
4. Die erhaltene Suspension wird abgedeckt und für zwei Stunden im Ultraschallbad extrahiert.
5. Nach Absetzen der Holzpartikel wird ein Teil der überstehenden Extraktionslösung über einen 0,45 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert.
6. Die filtrierte Lösung kann i.d.R. ohne weitere Bearbeitungsschritte für die HPLC-Analyse verwendet werden. In Abhängigkeit von dem zu erwartenden Wirkstoff-Gehalt sind die Lösungen gegebenenfalls zu verdünnen oder anzureichern.

Hinweise:

Die Holzfeuchte wird parallel an gesondertem Material bestimmt (DIN EN 212).

Die Untersuchung von unbehandeltem, naturbelassenem Holz gleicher Art ermöglicht die Bestimmung eines Blindwertes. Daneben ist die Untersuchung von Holz mit definiertem Wirkstoff-Gehalt zur Ermittlung einer internen Wiederfindungsrate empfehlenswert.

**Quantitative Bestimmung von Cypermethrin im Extrakt****Durchführung / Probenvorbereitung**Reinigung der Geräte

Die Reinigung der Glasgeräte erfolgt durch Waschen mit reinigungsmittelhaltigem Wasser. Danach werden die Glasgeräte mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Herstellung der Stammlösung

Die Stammlösungen werden durch Einwaage fester Substanz höchster Reinheit hergestellt. Die Lösungen sind im Kühlschrank maximal ein halbes Jahr lagerfähig.  
Konzentration der Stammlösung: 1000 mg/l Cypermethrin in Methanol

Konzentration der Kalibrierlösungen

Aus der Stammlösung werden Kalibrierlösungen unterschiedlicher Konzentrationen in Abhängigkeit vom zu erwartenden Messwert in einem Bereich zwischen 5 und 100 mg/l Cypermethrin hergestellt.

Kalibrierung

Es erfolgt eine Mehrpunkt-Kalibrierung mit mindestens 3 Konzentrationen.

**Analyse mittels HPLC**

Als HPLC-Säulen-Trägermaterial eignen sich unterschiedliche RP-Materialien. Zur Auftrennung haben sich verschiedene Gradienten aus Wasser und Acetonitril, 0,1 % Phosphorsäure, Acetonitril und Methanol bzw. 0,1 % Ammoniak in Wasser und Acetonitril bewährt. Die 8 Isomere werden je nach Trennbedingungen unterschiedlich scharf voneinander getrennt. Üblicherweise erhält man mit den vorgeschlagenen Methoden 2(bis zu 4) Peaks.

**HPLC-Bedingungen (Beispiel)**

Instrument: HPLC  
 Säule: Kinetex, 2,6 µm C18 100A, 150 \* 4,6 mm  
 Laufmittel A: Wasser + 0,1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in demineralisiertem Wasser  
 Laufmittel B: Acetonitril  
 Laufmittel C: Methanol

Elution: Gradient

Zeit (min)	0	2	8	11	12	16
% A	40	40	5	5	40	40
% C	20	20	0	0	20	20

Injektionsvolumen: 10 µl  
 Flussrate: 1,3 ml/min  
 UV- Detektor: 225 nm  
 Retentionszeit: 8,8-9,0 min  
 Temperatur: 40 °C

Folgende Messungen sind durchzuführen:

- Blindwert: Cypermethrin-freies Holz / Methanolextrakt
- Kalibrierlösungen
- Probenextrakte

**Auswertung**

Es wird eine Mehrpunkt-Kalibriergerade mit den Standardlösungen erstellt und anschließend der Cypermethringehalt der Probenextrakte mit dieser Kalibriergeraden bestimmt.

Berechnung des Gehaltes an Cypermethrin:

$$c = \frac{a \times V}{m_H} \times F \quad [\text{mg/kg}]$$

c	Massekonzentration an Cypermethrin im Holz	[mg/kg]
a	gemessene Konzentration im Analysenextrakt	[µg/ml]
V	Extraktionsvolumen [ml]	
m <sub>H</sub>	Einwaage an Holzspänen (berechnete Trockenmasse)	[g]
F	Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsfaktor	

**Diese Version des Analysenblattes wurde erstellt durch**

Bornkessel, C., MPA Eberswalde, Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, Eberswalde  
Drescher, P., Rütgers Organics GmbH, Mannheim  
Fischer, M., Institut für Holztechnologie (IHD), Dresden  
Fürhapper, C., Holzforschung Austria, Wien  
Gunschera, J., Fraunhofer-Institut für Holzforschung, Wilhelm-Klauditz-Institut (WKI), Braunschweig  
Hill, R., Staatliche Materialprüfungsanstalt Darmstadt, TU Darmstadt  
Melcher, E., Thünen-Institut für Holzforschung, Hamburg  
Schoknecht, U., BAM Bundesanstalt für Materialforschung u. -prüfung, Berlin  
Wegner, R., MPA Eberswalde, Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, Eberswalde  
Wilken, U., Bernhard Remmers Institut für Analytik (BRIfA), Lönigen  
Witzenzellner, J., BASF Wolman GmbH, Sinzheim  
Wobst, M., Materialprüfanstalt für das Bauwesen, Braunschweig



<b>Analysenblatt</b>	<b>Cypermethrin</b>	Stand 05/2017 Seite 5 von 8
----------------------	---------------------	--------------------------------

CAS-Nr. : 52315-07-8	
Summenformel : C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	
M : 416,3 g/mol	

### Allgemeine Information

<b>Chemische Bezeichnung</b>	
IUPAC	: (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl-(1RS)-cis, trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate
CA	: cyano(3-phenoxyphenyl)methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane carboxylate
Synonyme	: Cypermethrin
Wirkung	: Insektizid
übliche Anwendungskonzentrationen	: 0,065 % bis 1,2 % in lösemittelhaltigen Systemen bzw. in wasserverdünnbaren Konzentrat
Kennzeichnung (GHS)	: Achtung
Gefahrenpiktogramme:	



### Chemisch-physikalische Daten

Schmelzpunkt:	47,3 °C (Beginn: 41,2 °C)
Siedepunkt:	nicht messbar, Zerfall
Dampfdruck:	2,3 * 10 <sup>-7</sup> Pa (20 °C), 6 * 10 <sup>-7</sup> Pa (25 °C)
Löslichkeit bei RT:	< 9 µg/l in Wasser (20 °C) 248 g/l in Methanol (20 °C) 57 g/l in Heptan (20 °C)
Hydrolysestabilität:	bei 50 °C pH 4: DT <sub>50</sub> > 1 Jahr pH 7: DT <sub>50</sub> = 4.73 d pH 9: DT <sub>50</sub> = 1,9 h bei 12 °C pH 4: DT <sub>50</sub> = 7630 d pH 7: DT <sub>50</sub> = 98,9 d

Daten aus dem Assessment Report zur Biozidproduktenverordnung

**Literaturangaben**

- DIN EN 212: 2003-09: Holzschutzmittel – Allgemeine Anleitung für die Probenahme und Proben-  
vorbereitung von Holzschutzmitteln und von behandeltem Holz für die Analyse; Deutsche  
Fassung EN 212:2003.
- E DIN 38407-36:2013-10: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-  
untersuchung - Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) – Teil 36: Bestimmung  
ausgewählter Pflanzenschutzmittelwirkstoffe und andere organische Stoffe in Wasser -  
Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer  
Detektion (HPLC-MS/MS) nach Direktinjektion
- Assessment Report Cypermethrin cis:trans/40:60 Product-type 8 (Wood Preservatives) dated 12 July  
2013 <https://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/biocidal-active-substances>
- Hladik ML, Kuivila KM (2012): Pyrethroid insecticides in bed sediments from urban and agricultural  
streams across the United States. *Journal of Environmental Monitoring* 14/7, 1838-1845
- Liu X, Shen Z, Wang P, Liu C, Yao G, He J, Liu D, Zhou Z (2016): Minimizing geometric isomerization  
of  $\alpha$ -cypermethrin in the residue analysis. *Food Chemistry* 196, 828-832
- Mbaye M, Gaye Seye, MD, Aaron JJ, Coly A, Tine A (2011): Application of flow injection analysis –  
photo-induced fluorescence (FIA-PIF) for the determination of  $\alpha$ -cypermethrin pesticide  
residues in natural waters
- Rafique N, Tariq SR (2015): Photodegradation of alpha-cypermethrin in soil in the presence of trace  
metals ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ). *Environmental Science: Processes & Impacts* 17/1, 166-  
176
- Tapin-Lingua S, Ruel K, Joseleau, J-P, Jequel M, Petit-Conil M (2016): Assessing cypermethrin  
penetration in *Pinus sylvestris* wood products by immune-electron microscopy. *Wood Sci  
Technol.* 50, 349-364
- Trask JP, Harbout CM, Miller P, Cox M, Jones R, Hendley P, Lam C (2014): Washoff of cypermethrin  
residues from slabs of external building material surfaces using simulated rainfall.  
*Environmental Toxicology and Chemistry* 33/2, 302-307

**Ergebnisse von Vergleichsuntersuchungen**

Zeitraum: März bis September 2016

Untersuchungsmaterial: dotiertes Kiefernspiltholz

Sollwert: 546 mg/kg

Tabelle: Übersicht über die durchgeführten LC-Analysen (HPLC und UPLC)

Für den Versuch festgelegte Parameter: Extraktion mit Methanol mittels Ultraschall bei ca. 40 - 50 °C, Extrakt über PTFE (0,2 bzw. 0,45 µm) filtrieren, Detektion mittels UV bzw. DAD, Abweichungen sind dargestellt

Labor	Einwaage	Extraktionsdauer	Detektion	Ergebnis in mg/kg*
Nr.	Holz in Methanol	h	nm	mg/kg*
L1	1 g / 20 ml	2	225	595
L2	1,25 g / 25 ml	2	223	600
L3	1,5 g / 30 ml	2	225	549
L4	2 g / 40 ml	2**	190	546
L5	2 g / 20 ml	2	225	558
L6	1 g / 20 ml	2	225	571
L7	2 g / 20 ml	2	240	614
L8	1 g / 20 ml	2	230	555
L9	1 g / 20 ml	2	230	560
L10	2 g / 40 ml	2 h	225	614
L11	0,5 g / 20 ml	3 * 0,25	225 und 245	510
Mittelwert in mg/kg				<b>570</b>
Mittelwert in % vom Sollwert				<b>104</b>
Standardabweichung in mg/kg				32
Standardabweichung in %				6

\*Mind. Doppelbestimmung

\*\* zusätzlich Schütteln über Nacht und anschließend 0,5 h Ultraschall



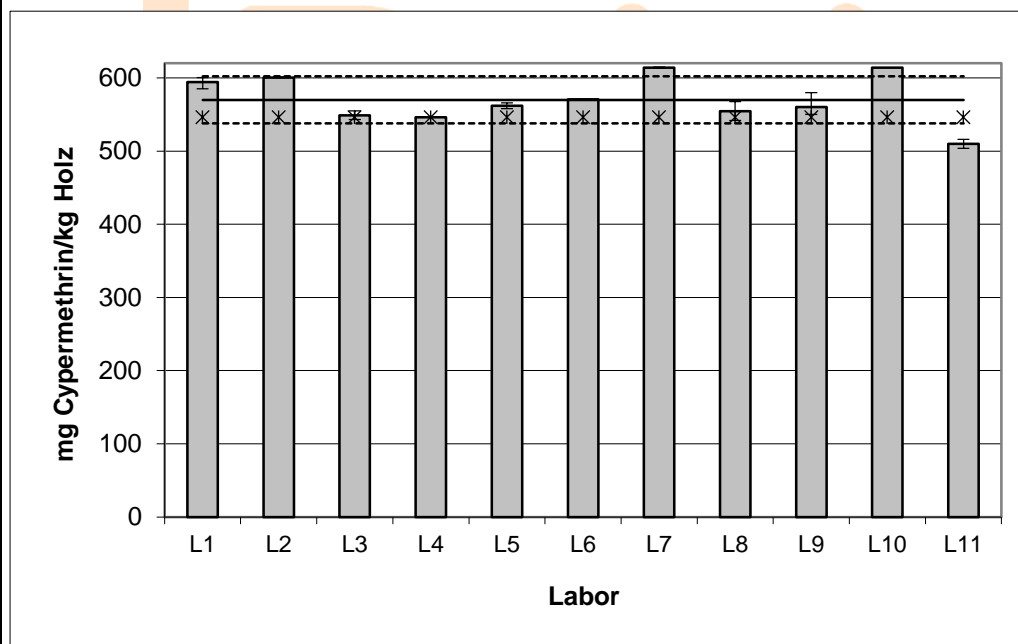


Abbildung: Analysenergebnisse der beteiligten Laboratorien. Die Säulen zeigen die Ergebnisse der HPLC-Analysen der einzelnen Laboratorien, die durchgezogene Linie zeigt den Mittelwert aller Ergebnisse, die gestrichelten Linien kennzeichnen die einfache Standardabweichung. Der aus der Schutzmittelaufnahme berechnete Sollwert ist mit \* dargestellt.

#### Teilnehmer

Bornkessel, C., MPA Eberswalde, Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, Eberswalde  
Drescher, P., Rütgers Organics GmbH, Mannheim  
Fischer, M., Institut für Holztechnologie (IHD), Dresden  
Fürhapper, C, Holzforschung Austria, Wien  
Gunschera, J., Fraunhofer-Institut für Holzforschung, Wilhelm-Klauditz-Institut (WKI), Braunschweig  
Hill, R., Staatliche Materialprüfungsanstalt Darmstadt, TU Darmstadt  
Melcher, E., Thünen-Institut für Holzforschung, Hamburg  
Schoknecht, U., BAM Bundesanstalt für Materialforschung u. -prüfung, Berlin  
Wegner, R., MPA Eberswalde, Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, Eberswalde  
Wilken, U., Bernhard Remmers Institut für Analytik (BRIfA), Lönigen  
Witzenzellner, J., BASF Wolman GmbH, Sinzheim  
Wobst, M., Materialprüfanstalt für das Bauwesen, Braunschweig