

# Gaschromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gelchromatographie und Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie

## 1. Mitteilung: Organochlor-Pflanzenbehandlungsmittel in Tabak und Tabakerzeugnissen\*

von W. Specht und M. Tillkes

Handelslabor Dr. Körl und Dr. Specht,  
Laboratorium für Rückstandsanalytik, Hamburg

### EINLEITUNG UND BESCHREIBUNG DER METHODE

Die ständig steigende Zahl der Höchstmengenregelungen verschiedener Länder für Pflanzenbehandlungsmittel erfordert Rückstandsmethoden, die möglichst viele unterschiedlich polare Wirkstoffe in einem Arbeitsgang bei vertretbarem Zeit- und Materialaufwand mit ausreichender Sicherheit und Genauigkeit erfassen.

Die Brauchbarkeit solcher Methoden ist wesentlich davon abhängig, ob sowohl unpolare als auch polare Wirkstoffe mit einem Extraktionsschritt erfaßt werden können und ob die Wirkstoffe durch möglichst verlustfreie Reinigungsschritte so weit von Pflanzeninhaltsstoffen abgetrennt werden können, daß die gaschromatographische Bestimmung auch bei problematischen Substraten wie Salat, Kohlarten oder Tabak störungsfrei erfolgen kann.

Methoden dieser Art basieren meist auf Säulenchromatographie an Florisil, Aluminiumoxid usw. [zum Beispiel die Methoden in (1–5)]. Wir haben versucht, dem Ziel einer vielseitigen Anwendbarkeit mit Hilfe der Gelchromatographie näherzukommen.

Angeregt durch eine Arbeit von *Luke* (6) wurde ein Extraktionsverfahren mit konstantem Aceton/Wasser-Verhältnis ausgearbeitet, mit dem sowohl lipophile als auch hydrophile Wirkstoffe gut extrahierbar sind. In einem aliquoten Teil des Extraktes wird nach Zugabe von Dichlormethan die vorhandene Wassermenge mit Natriumchlorid gesättigt. Dadurch gehen auch die hydrophilen Wirkstoffe in die Aceton/Dichlormethan-Phase über.

Die Wirkstoffe werden gelchromatographisch von der Hauptmenge der Pflanzeninhaltsstoffe abgetrennt. Bei der

Ausarbeitung der Methode wurde ein Gelchromatograph vom Typ GPC AUTOPREP 1001 verwendet, der die automatische Aufarbeitung von 23 Proben in einem Zyklus erlaubt.

Nach den guten Ergebnissen bei der Untersuchung von tierischen Fetten entschieden wir uns für die Gelchromatographie an Polystyrolgel vom Typ Bio-Beads S-X3. Die bisher bei diesem Gel angewandten Elutionsgemische Toluol/Essigsäureethylester (1/3) und Dichlormethan/Cyclohexan (15/85) (7–9) ergaben unbefriedigende Ergebnisse für das angestrebte Ziel, weil entweder die Abtrennung der Wirkstoffe von den Pflanzeninhaltsstoffen und die Elutionsvolumina nicht optimal oder die Lösungseigenschaften für den Extraktionsrückstand nicht ausreichend waren. Es wurden weitere Elutionsgemische getestet, wobei sich Essigsäureethylester/Cyclohexan (1/1) als geeignet erwies.

Eine einfache säulenchromatographische Nachreinigung an Kieselgel wird dem gelchromatographischen Clean-up nachgeschaltet. Dadurch wird eine praktisch störungsfreie Bestimmung der Wirkstoffe erreicht und eine Verschmutzung von GC-Trennsäulen und GC-Detektoren auch im Dauerbetrieb vermieden. Lösungsmittelverbrauch und Zeitaufwand sind gegenüber herkömmlichen Säulenchromatographie-Methoden erheblich vermindert.

In dieser 1. Mitteilung wird die Anwendbarkeit der Methode für die Rückstandsbestimmung von Organochlor-Pestiziden in Tabak und Tabakerzeugnissen beschrieben.

Über die Bestimmung von Organophosphor-Pestiziden und anderen Wirkstoffen unterschiedlicher Polarität mit der beschriebenen Methode wird später berichtet. Hier können bei Anwendung elementspezifischer GC-Detektoren die Wirkstoffe meist direkt im eingengten Gelchromatographie-Eluat bestimmt werden.

\* Eingegangen: 5. März 1979 – angenommen: 26. April 1979.

## DURCHFÜHRUNG DER METHODE

### Geräte

- Hochtouriges Mixgerät (z. B. Waring-Blendor).  
Rundkolben mit Schliff (250 und 500 ml).  
Langhalsrundkolben mit Schliff (100 ml).  
Meßzylinder (250 und 500 ml).  
Büchner-Trichter (135 mm Durchmesser).  
Scheidetrichter (500 ml) mit Schliffstopfen und Teflonküken.  
Vakuum-Rotationsverdampfer mit Wasserbad.  
Glastrichter (100 mm Durchmesser).  
Erlenmeyer-Kolben mit Schliff (300 ml).  
Reagenzgläser (12 bis 15 ml) mit Schliffstopfen und Meßmarken bei 2,5 ml, 5,0 ml und 10,0 ml.

Gelchromatograph GPC AUTOPREP 1001 (Analytical Bio Chemistry Laboratories, Inc., Columbia, Mo., U.S.A.\*).

Chromatographiesäule: 25 mm innerer Durchmesser, 400 mm Länge, gefüllt mit 25 × 320 mm Bio-Beads S-X3, 200 bis 400 mesh, vorgequollen in Essigsäureethylester/Cyclohexan (1/1).

Elutionsgeschwindigkeit: 5,0 ml/min.

Die Gelchromatographie kann mit der beschriebenen Säule auch manuell unter Verwendung einer Pumpe bei Einhaltung der Durchflußgeschwindigkeit von 5,0 ml/min durchgeführt werden.

Für die Verwendung eines automatischen Gelchromatographierätes spricht jedoch die wesentliche Einsparung an Personalkosten. Bei der automatischen Gelchromatographie am GPC AUTOPREP 1001 können 23 Proben innerhalb von 40 bis 50 min in die 5-ml-Probenschleifen eingegeben und dann ohne Beaufsichtigung — eventuell über Nacht — automatisch aufgearbeitet werden.

Glasrohr für Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie, 7 bis 7,5 mm innerer Durchmesser, 230 mm Länge, ausgezogener Auslauf.

Gaschromatograph, Hewlett-Packard 5710A, mit Elektroneneinfangdetektor, <sup>63</sup>Ni, pulsfrequenzmoduliert.

a) Glassäule, 1,8 m Länge, 4 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit 5% OV 210 auf GasChrom Q, 80 bis 100 mesh; Trägergas: 80 ml/min Argon/Methan (90/10); Betriebstemperaturen: Ofen 220 °C, Detektor und Einspritzblock 250 °C.

b) Glassäule, 1,8 m Länge, 4 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit 3% OV 61 / 7,5% QF 1 / 3% XE 60 auf Chromosorb W-HP, 100 bis 120 mesh; Trägergas: 50 ml/min Argon/Methan (90/10); Betriebstemperaturen: Ofen 230 °C, Detektor und Einspritzblock 250 °C.

c) Glassäule, 1,2 m Länge, 4 mm innerer Durchmesser, ge-

füllt mit 2,5% XE 60 auf Chromosorb G (AW-DMCS), 80 bis 100 mesh; Trägergas: 80 ml/min Argon/Methan (90/10); Betriebstemperaturen: Ofen 200 °C, Detektor und Einspritzblock 250 °C.

### Reagenzien

- Aceton, für Rückstandsanalyse  
Benzol, für Rückstandsanalyse  
Cyclohexan, für Rückstandsanalyse  
Dichlormethan, für Rückstandsanalyse  
Essigsäureethylester, für Rückstandsanalyse  
Hexan, für Rückstandsanalyse  
Isooctan, für Rückstandsanalyse  
Wasser, destilliert in Glasapparatur  
Celite 545

Kieselgel, getrocknet: Kieselgel 60 (Merck Nr. 7734), 70 bis 230 mesh, mindestens 5 Stunden auf 130 °C erhitzen, im Exsikkator abkühlen lassen und in dicht schließendem Gefäß im Exsikkator aufbewahren.

Kieselgel, desaktiviert mit 1,5% Wasser: In einen 300-ml-Erlenmeyer-Kolben werden zu 98,5 g Kieselgel (getrocknet) tropfenweise 1,5 ml Wasser unter Umschwenken gegeben. 5 Minuten kräftig schütteln, bis keine Klumpen mehr sichtbar sind, und danach 2 Stunden auf Schüttelmaschine schütteln. In dicht schließendem Gefäß aufbewahren (mit Tesakrepp zusätzlich abdichten).

Vor Verwendung Aktivität mit folgender Fraktionierung (in Hexan) prüfen: 0,10 µg/ml HCB, 0,20 µg/ml Lindan, 0,40 µg/ml Heptachlorepoxyd, 0,50 µg/ml α-Endosulfan, 0,50 µg/ml Dieldrin, 2,50 µg/ml Endosulfansulfat.

1 ml der Fraktionierung auf die mit Hexan vorgewaschene Minisäule geben und wie unter 3. beschrieben eluieren. Bei richtig eingestellter Aktivität sind die Wirkstoffe bei der gaschromatographischen Bestimmung mit Elektroneneinfangdetektor wie folgt verteilt: im Eluat 1 HCB (100%), Lindan (100%), Heptachlorepoxyd (ca. 20–40%), α-Endosulfan (ca. 20–40%), im Eluat 2 Heptachlorepoxyd (Restmenge), α-Endosulfan (Restmenge), Dieldrin (100%), Endosulfansulfat (95–100%).

Natriumchlorid, p. a.

Natriumsulfat (mindestens 2 Stunden auf 550 °C erhitzt)

Watte (mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert)

Filterpapier (Schwarzband, mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert).

### 1. Extraktion und Flüssig-Flüssig-Verteilung

#### 1.1 Extraktion

15 g zerkleinerte, lufttrockene Tabakprobe mit einem Wassergehalt von x% werden im Becher des Mixgeräts mit

$$100 - \frac{S \cdot x}{100} \text{ g Wasser}$$

(S = Probeneinwaage in g)

\* Vertrieb: N. Foss Electric A/S GmbH., Waidmannstraße 12b, D-2000 Hamburg 19.

versetzt, mit einem Glasstab gut durchgemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen.

Nach Zugabe von 200 ml Aceton wird 3 min intensiv gemixt. Dann gibt man 10 g Celite zu und mixt nochmals 10 Sekunden.

Bei erntefrischen Tabakblättern mit einem Wassergehalt von  $x\%$  wird 100 g zerkleinertes Probenmaterial mit  $(100 - x)$  g Wasser und 200 ml Aceton 3 min gemixt, dann 10 g Celite zugegeben und nochmals 10 s gemixt.

### 1.2 Aceton/Wasser/Dichlormethan-Verteilung

Das Homogenisat aus 1.1 wird unter schwachem Wasserstrahlvakuum über einen mit Schwarzbandfilter belegten Büchner-Trichter filtriert. Das Volumen des Filtrats [AV] wird in ml gemessen und im Scheidetrichter mit  $\frac{AV}{10}$  g Natriumchlorid 3 min kräftig geschüttelt.

Nach Zugabe von 100 ml Dichlormethan schüttelt man nochmals 2 min und läßt 10 min absetzen. Die untere wäßrige Phase wird verworfen (s. Anmerkung).

Die organische Phase [CV] wird in ml gemessen, über ca. 25 g Natriumsulfat 10 bis 15 min getrocknet und über eine 3-cm-Schicht Natriumsulfat in einen 500-ml-Rundkolben filtriert. Kolben und Filter werden zweimal mit je 20 ml Essigsäureethylester nachgespült. Man engt am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 30 bis 40 °C Badtemperatur auf ca. 2 ml ein. Restliches Lösungsmittel wird durch Aufblasen von Stickstoff vorsichtig entfernt.

Berechnung der im Extrakt CV enthaltenen Probenmenge:

$$\frac{S \cdot AV}{295} = \text{g Probenmaterial in CV.}$$

*Anmerkung:* Bei manchen Probenaufbereitungen setzen sich die beiden Phasen auch nach 30 min Stehzeit nicht klar voneinander ab. In diesen Fällen wird die Emulsionsschicht mit der wäßrigen Phase abgelassen und der klare Anteil der organischen Phase vor der Filtration gemessen (= CV<sub>aliquot</sub>) und wie für CV beschrieben weiterverarbeitet. Die Berechnung der in CV<sub>aliquot</sub> enthaltenen Probenmenge erfolgt nach

$$\frac{S \cdot AV \cdot CV_{aliquot}}{295 \cdot CV_{theoretisch}} = \text{g Probenmaterial in CV}_{aliquot},$$

wobei

$$CV_{theoretisch} = AV - \frac{AV \cdot W_{total}}{295} + 100 \cdot$$

$W_{total}$  = Summe des zugesetzten Wassers  $W$  und des in der Probeneinwaage  $S$  enthaltenen Wassers.

Der Nenner 295 ergibt sich aus dem Gesamtvolumen von Aceton und  $W_{total}$ , vermindert um eine Volumenkontraktion von 5 ml (empirisch).

### 2. Gelchromatographie

Zum Rückstand aus 1.2 werden genau 7,5 ml Essigsäureethylester gegeben; der Rückstand wird durch Umschwen-

ken in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 2 g Natriumsulfat schwenkt man nochmals um und gibt genau 7,5 ml Cyclohexan zu. Man schüttelt 2 min und filtriert über ein Faltenfilter. Das Filtrat gibt man mit einer Injektionspritze in die 5,00-ml-Probenschleife des Gelchromatographen.

Am Gelchromatographen werden folgende Bedingungen eingestellt:

dump : 21 min (= 105 ml),  
collect : 13 min (= 65 ml),  
wash : 0 min.

Für die Rückstandsbestimmungen einzelner Wirkstoffe kann das collect-Volumen enger gewählt werden (s. Tab. 1).

Eluiert wird mit dem Lösungsmittelgemisch Essigsäureethylester/Cyclohexan (1/1). Elutionsgeschwindigkeit: 5,0 ml/min.

Das dump-Volumen wird verworfen und das collect-Volumen in einem 100-ml-Langhalsrundkolben aufgefangen. Nach Zugabe von 5 ml Isooctan engt man am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 30 bis 40 °C Badtemperatur (langsame Rotation, geringe Eintauchtiefe des Kolbens) auf ca. 1 ml (nicht zur Trockne!) ein. Die Lösung muß frei von Essigsäureethylester sein. Eventuell muß nochmals nach Zugabe von 5 ml Isooctan auf ca. 1 ml eingengt werden.

### 3. Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie

Die Lösung wird mittels Pipette auf die mit Hexan vorgewaschene Mini-Kieselgel-Säule überführt. Man läßt die Lösung in die Säule einfließen und stellt ein Schlifffmeßreagenzglas mit Marke bei 10,0 ml als Vorlage unter die Säule.

Dann gibt man 2 ml Elutionslösung 1 (Benzol/Hexan 25/75) in den Kolben, schwenkt um und überführt verlustlos mittels Pipette auf die Minisäule. Der Kolben wird zum Ausspülen mit Elutionslösung 2 zur Seite gestellt.

Sobald die Lösung in die Säule eingeflossen ist, gibt man 6 ml Elutionslösung 1 auf die Minisäule und läßt vollständig einfließen. Die Vorlage wird mit Elutionslösung 1 auf 10,0 ml aufgefüllt (= Eluat 1).

Nach Wechseln der Vorlage wird die Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie fortgesetzt. Man gibt 2 ml Elutionslösung 2 (Benzol/Hexan 75/25) in den zurückgestellten Kolben, schwenkt um und überführt mittels Pipette verlustlos auf die Minisäule. Nachdem die Lösung eingeflossen ist, gibt man 6 ml Elutionslösung 2 auf die Säule und läßt wieder vollständig einfließen.

Die Vorlage wird mit Elutionslösung 2 auf 10,0 ml aufgefüllt (= Eluat 2).

In den beiden Eluaten können die in Tab. 2 aufgeführten Wirkstoffe gaschromatographisch mit dem Elektroneneinfangdetektor bestimmt werden.

Reicht die Nachweisempfindlichkeit unter diesen Bedingungen nicht aus, so sammelt man die Eluate in Langhalsrundkolben, engt vorsichtig auf ca. 1 ml ein, überführt unter Nachspülen mit Elutionslösung in ein Schlifffmeßreagenzglas und füllt zur 2,5-ml-Marke auf.

**Tabelle 1. Wirkstoff-Elution mit GPC AUTOPREP 1001.**

Bio-Beads S-X3, 60 g, 25 x 320 mm Füllhöhe / Elutionsgemisch: Essigsäureethylester/Cyclohexan (1/1), 5,0 ml/min

Wirkstoff	Wirkstoff im Elutionsvolumen (ml)								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Aldrin	-	-	-	+	++	+	(+)	-	-
Campechlor (Toxaphen)	-	-	(+)	+	++	+	-	-	-
$\alpha$ -Chlordan	-	-	(+)	++	++	(+)	-	-	-
$\gamma$ -Chlordan	-	-	+	++	(+)	-	-	-	-
Chlorfenson	-	-	-	(+)	++	++	-	-	-
o,p'-DDD	-	-	(+)	++	+	-	-	-	-
p,p'-DDD	-	-	(+)	++	+	(+)	-	-	-
o,p'-DDE	-	-	(+)	++	++	(+)	-	-	-
p,p'-DDE	-	-	-	+	++	+	-	-	-
o,p'-DDT	-	-	(+)	++	+	(+)	-	-	-
p,p'-DDT	-	-	-	++	++	-	-	-	-
Dicofol (Kelthan)	-	(+)	+	++	+	(+)	-	-	-
Dieldrin	-	-	-	-	++	++	(+)	-	-
$\alpha$ -Endosulfan	-	-	(+)	+	++	(+)	-	-	-
$\beta$ -Endosulfan	-	-	(+)	+	++	(+)	-	-	-
Endosulfansulfat	-	-	+	++	(+)	-	-	-	-
Endrin	-	-	-	-	+	++	+	-	-
Fenson	-	-	-	-	+	++	(+)	-	-
$\alpha$ -HCH	-	-	-	+	++	+	(+)	-	-
$\beta$ -HCH	-	(+)	++	+	-	-	-	-	-
$\gamma$ -HCH (Lindan)	-	-	-	+	++	(+)	(+)	-	-
$\delta$ -HCH	-	(+)	++	++	-	-	-	-	-
Heptachlor	-	-	-	+	++	(+)	-	-	-
Heptachlorepoxyd	-	-	-	+	++	(+)	-	-	-
Hexachlorbenzol	-	-	-	-	-	+	++	+	-
Isodrin	-	-	-	(+)	++	++	(+)	-	-
Methoxychlor	-	-	-	-	+	++	(+)	-	-
Oxychlordan	-	(+)	+	++	+	(+)	(+)	-	-
Quintocen	-	-	-	-	-	-	++	(+)	-
Tecnacen	-	-	-	-	(+)	++	++	-	-
Tetrasul	-	-	-	-	+	++	(+)	-	-
Polychlorierte Biphenyle:									
Clophen A 30	-	-	-	(+)	++	++	(+)	-	-
Clophen A 60	-	-	-	+	++	+	-	-	-

++ : über 30 %, + : 10 bis 30 %, (+) : unter 10 %

#### 4. Gaschromatographische Bestimmung

Die gaschromatographischen Bedingungen sind der jeweiligen Aufgabenstellung anzupassen.

Für Routineuntersuchungen sollte die Empfindlichkeit des Elektroneneinfangdetektors so hoch gewählt werden, daß sich beim Einspritzen von 5  $\mu$ l einer Standardlösung mit 0,05  $\mu$ g/ml Aldrin und 0,25  $\mu$ g/ml p,p'-DDT Peakhöhen von mindestens einer halben Schreiberbreite ergeben. Nach jeder zweiten Analysenlösung wird die Standardlösung eingespritzt, damit etwaige Änderungen des gaschromatographischen Systems erkannt werden können (z. B. Umwandlung von p,p'-DDT in p,p'-DDD).

Spritzt man 5  $\mu$ l Probenlösung ein, so lassen sich bei 15 g Tabakeinwaage und 10-ml-Auffüllung der Mini-Kieselgel-Eluate untere Bestimmungsgrenzen von zum Beispiel

0,002 mg/kg für  $\alpha$ -HCH, 0,004 mg/kg für  $\beta$ -HCH und 0,02 mg/kg für p,p'-DDT erreichen.

#### 5. Berechnung

Die Berechnung der Rückstandsmengen erfolgt unter Berücksichtigung der tatsächlich eingesetzten Probenmenge, der Auffüllungen für Gelchromatographie und Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie und der im eigenen Laboratorium an Tabakproben ermittelten Wiederauffindungsraten für die einzelnen Wirkstoffe.

#### 6. Ausbeute und Bestimmungsgrenzen

Bei Zusatzversuchen an Tabak ergaben sich die in Tab. 3 aufgeführten Ausbeuten. Die verwendeten Tabakproben waren luftgetrocknete Rohtabake (Burley und Virginia)

**Tabelle 2. Wirkstoffverteilung bei der Mini-Kieselgel-Säulenchromatographie.**

Wirkstoff	Eluat 1 (Benzol/Hexan 25/75)	Eluat 2 (Benzol/Hexan 75/25)
Aldrin	+++	-
Camphechlor (Toxaphen)	+++	-
$\alpha$ -Chlordan	+++	-
$\gamma$ -Chlordan	+++	-
Chlorfenson	-	+++
o,p'-DDD	+++	-
p,p'-DDD	+++	-
o,p'-DDE	+++	-
p,p'-DDE	+++	-
o,p'-DDT	+++	-
p,p'-DDT	+++	-
Dicofol (Kelthan)	+	++
Dieldrin	-	+++
$\alpha$ -Endosulfan	+(+)	++
$\beta$ -Endosulfan	-	+++
Endosulfansulfat	-	+++
Endrin	-	+++
Fenson	-	+++
$\alpha$ -HCH	+++	-
$\beta$ -HCH	+++	-
$\gamma$ -HCH (Lindan)	+++	-
$\delta$ -HCH	+++	-
Heptachlor	+++	-
Heptachlorepoxyd	++	++
Hexachlorbenzol	+++	-
Isodrin	+++	-
Methoxychlor	-	+++
Oxychlordan	+++	-
Quintocen	+++	-
Tecnacen	+++	-
Tétrasul	+++	-
Polychlorierte Biphenyle:		
Clophen A 30	+++	-
Clophen A 60	+++	-

+++ : praktisch vollständig (über 90 %)  
 ++ : teilweise (über 30 %)  
 + : teilweise (10 bis 30 %)  
 (+) : teilweise (unter 10 %)

mit Rückstandsmengen der einzelnen Wirkstoffe unter 0,01 mg/kg.

Die Wirkstoffe wurden dem zerkleinerten Tabak vor der Analyse zugemischt. Dabei wurde ein Teil der zur Extraktion verwendeten 200 ml Aceton durch Acetonlösungen der Wirkstoffe ersetzt.

Für die beiden Clean-up-Schritte (Gelchromatographie und Mini-Kieselgel-Chromatographie) ergab sich bei reinen Wirkstofflösungen eine innerhalb der Fehlergrenze der GC-Bestimmung liegende quantitative Ausbeute.

Unter den beschriebenen Bedingungen liegen die Bestimmungsgrenzen zum Beispiel für  $\alpha$ -HCH bei 0,002 mg/kg und für p,p'-DDT bei 0,02 mg/kg. Durch Wahl anderer Verdünnungen und anderer GC-Bedingungen können die

**Tabelle 3. Ausbeuten in % bei Zusatzversuchen an Roh-tabakproben (Burley und Virginia).**

Aldrin	94 - 97
Camphechlor (Toxaphen)	92 - 96
$\alpha$ -Chlordan	95 - 97
$\gamma$ -Chlordan	94 - 96
o,p'-DDD	93 - 97
p,p'-DDD	93 - 98
o,p'-DDE	95 - 101
p,p'-DDE	95 - 102
o,p'-DDT	98 - 100
p,p'-DDT	95 - 98
Dieldrin	98 - 100
$\alpha$ -Endosulfan	96 - 98
$\beta$ -Endosulfan	94 - 96
Endosulfansulfat	94 - 99
Endrin	98 - 100
$\alpha$ -HCH	97 - 100
$\beta$ -HCH	93 - 95
$\gamma$ -HCH (Lindan)	93 - 98
$\delta$ -HCH	92 - 94
Heptachlor	97 - 102
Heptachlorepoxyd	95 - 96
Hexachlorbenzol	90 - 93
Isodrin	95 - 96
Methoxychlor	87 - 91
Quintocen	98 - 103
Tecnacen	94 - 98

Die Zusatzmenge betrug das 10- bis 20fache der unteren Bestimmungsgrenze des jeweiligen Wirkstoffs.

Bestimmungsgrenzen bei Bedarf noch weiter gesenkt werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Gleichbleibende Extraktionsbedingungen auch bei Proben unterschiedlichen Wassergehalts werden bei der beschriebenen Methode dadurch erreicht, daß unter Einbeziehung des Wasseranteils der eingesetzten Probenmenge und durch Zugabe von Wasser bei getrockneten Proben mit einem konstanten Aceton/Wasser-Verhältnis von 2:1 extrahiert wird. Aceton wurde aus toxikologischen Gründen dem bisher häufig verwendeten Acetonitril vorgezogen.

Der gelchromatographischen Abtrennung der Hauptmenge mitextrahierter Pflanzeninhaltsstoffe wurde der Vorzug gegenüber herkömmlichem Clean-up durch Säulenchromatographie an Florisil, Aluminiumoxid und anderen Adsorbentien gegeben, weil einerseits die Gelchromatographie praktisch zerstörungsfrei für die Wirkstoffe verläuft und sich andererseits erhebliche Einsparungen an Säulenmaterial und Lösungsmitteln ergeben. So können mit einer Gelsäulenfüllung mehrere hundert Aufarbeitungen durchgeführt werden.

Als Elutionslösungen für das Gelchromatographie-Clean-up von Fetten und auch von Pflanzenmaterial an Bio-Beads S-X3 wurden bisher hauptsächlich Toluol/Essigester

(1/3) und Dichlormethan/Cyclohexan (15/85) verwendet (7–9). Bei beiden Lösungsmittelgemischen ergaben sich bei der Ausarbeitung der Multirückstandsmethode teils methodische, teils stoffliche Schwierigkeiten. So störte Toluol wegen seines relativ hohen Siedepunkts bei der Weiterverarbeitung des GPC-Eluats. Beim Elutionsgemisch Dichlormethan/Cyclohexan (15/85) und (20/80) war ein collect-Volumen von mehr als 150 ml zur Erfassung der untersuchten Wirkstoffe notwendig. Für eine Routinemethode war der damit verbundene Zeitaufwand hinderlich. Außerdem ließ sich der Extraktionsrückstand bei extraktreichen Proben wie Tabak nicht vollständig in Dichlormethan/Cyclohexan lösen.

Bei Versuchen mit Essigsäureethylester als Elutionsmittel (10) waren noch erhebliche Mengen störender Probeninhaltsstoffe im Elutionsvolumen der Wirkstoffe vorhanden.

Wir testeten weitere Elutionsgemische und entschieden uns für Essigsäureethylester/Cyclohexan (1/1). Mit diesem Gemisch werden Pflanzeninhaltsstoffe und Fette in einem Elutionsvolumen von 105 ml weitgehend abgetrennt und alle bisher untersuchten Wirkstoffe im Elutionsvolumen von 105 bis 170 ml wiedergefunden.

Von 74 mg Tabakextraktstoffen in 5 ml GPC-Einspritzlösung befinden sich unter den beschriebenen gelchromatographischen Bedingungen 68 mg im dump-Volumen von 0 bis 105 ml.

Bei Fraktionierung des collect-Volumens verteilte sich die Restmenge an Tabakextraktstoffen mit

- 2–3 mg auf die collect-Fraktion 105–110 ml,
- 1–2 mg auf die collect-Fraktion 110–115 ml,
- 0,5–1 mg auf die collect-Fraktion 115–120 ml,
- < 0,5 mg auf die collect-Fraktion 120–145 ml,
- 0 mg auf die collect-Fraktion 145–170 ml.

Wichtig ist, daß der Extraktionsrückstand aus 1.2 vor der Gelchromatographie vollständig in Lösung gebracht wird, was mit dem Elutionsgemisch in manchen Fällen schwierig ist. Deshalb wird der Rückstand zuerst in 7,5 ml Essigsäureethylester gelöst. Das erforderliche Mischungsverhältnis wird dann durch Zugabe des gleichen Volumens Cyclohexan hergestellt.

Da im Elutionsvolumen 105 bis 170 ml neben geringen Mengen an Pflanzeninhaltsstoffen auch alle bisher untersuchten Organophosphor- und Organostickstoff-Pestizide sowie Wirkstoffe anderer Art (Pyrethrine, Resmethrin und Piperonylbutoxid) aufgefunden werden, ist für die Bestimmung der Organochlor-Pestizide mittels Elektroneneinfangdetektor meist eine einfache Nachreinigung erforderlich.

Diese Nachreinigung erfolgt über eine Mini-Kieselgel-Säule mit 1 g Kieselgel, deaktiviert mit 1,5% Wasser. Wir hatten diese Mini-Säule bei der Säulenchromatographie der Pentafluorbenzylester von Phenolen und Säuren nach Coburn (11) schätzen gelernt. Die Mini-Säule zeigte mit 10-ml-Eluaten von Hexan, Benzol/Hexan-Gemischen (5/95, 25/75, 75/25), Benzol, Aceton/Benzol-Gemischen (2/98, 5/95, 20/80, 40/60) sowie Aceton eine sehr gute Trennleistung bei Wirkstoffen unterschiedlicher Polarität. Es ergab sich, daß für Routineuntersuchungen an Tabak-

(erzeugnissen) auf Organochlor-Pestizide und polychlorierte Biphenyle eine solche aufwendige Fraktionierung nicht notwendig ist. Hier erwies sich die unter 3. beschriebene Arbeitsweise mit nur zwei 10-ml-Fractionen als ausreichend. Bei Wahl geeigneter GC-Trennsäulen sind die Wirkstoffe gaschromatographisch mit dem Elektroneneinfangdetektor ohne Störungen durch Probeninhaltsstoffe bestimmbar.

Von bisher untersuchten Organophosphor-Pestiziden wird in Eluat 1 Fenchlorvos teilweise eluiert. Im Eluat 2 werden neben der Restmenge Fenchlorvos zum Beispiel auch (teilweise) Parathion-ethyl, Parathion-methyl, Ethion, Sulfotepp aufgefunden. Über die Fraktionierung dieser und anderer Wirkstoffe in den Eluaten 1 und 2 sowie in nachfolgenden Eluaten mit Benzol, Aceton/Benzol (5/95), Aceton/Benzol (40/60) und Aceton wird in einer späteren Mitteilung berichtet.

## ZUSAMMENFASSUNG

Als erste Mitteilung einer Methode zur Multirückstandsbestimmung von Pflanzenbehandlungsmitteln in pflanzlichen Produkten wird die Bestimmung von Organochlor-Pestiziden in Tabak und Tabakerzeugnissen beschrieben. Die Wirkstoffe werden aus dem mit Wasser versetzten Probenmaterial mit Aceton unter Einhaltung eines konstanten Aceton/Wasser-Verhältnisses von 2:1 extrahiert. Ein wesentlicher Bestandteil der Methode ist die wirksame Abtrennung von Probeninhaltsstoffen durch Gelchromatographie an Polystyrolgel Bio-Beads S-X3, wobei die Wirkstoffe in einem Elutionsvolumen von 65 ml verlustfrei wiedergefunden werden. Nach einer sehr einfachen Säulenchromatographie an 1 g desaktiviertem Kieselgel können die Organochlor-Pestizide in zwei 10-ml-Eluaten gaschromatographisch bei unteren Bestimmungsgrenzen von beispielsweise 0,002 mg/kg für  $\alpha$ -HCH bzw. 0,02 mg/kg für  $p,p'$ -DDT störungsfrei und sicher bestimmt werden. Die Wiederauffindungsraten liegen im Bereich von 90 bis 100%.

Das beschriebene Aufarbeitungsverfahren kann auch für die Bestimmung polarer Wirkstoffe angewandt werden, so daß mit einer Probenaufarbeitung eine große Anzahl unterschiedlicher Wirkstoffe gaschromatographisch bestimmt werden kann. Darüber wird in einer weiteren Mitteilung berichtet werden.

## SUMMARY

This report contains the first description of a method for pesticide residue determination using automated gel permeation chromatographic clean-up. The example of organochlorine pesticides in tobacco and tobacco products has been taken here to illustrate this method. Water is added to the sample which is then extracted with acetone such that the ratio of the volume of acetone used to the total volume of water is 2:1. The key step in the method is the efficient removal of co-extracted plant constituents, by gel permeation chromatography on a polystyrene gel (Bio-Beads S-X3). The pesticides are recovered, without

loss, in 65 ml of eluate. This eluate is further purified by very simple chromatography on a 1 g column of deactivated silica gel, two 10 ml fractions being collected. No interfering substances are present in these fractions and the pesticides may be identified and quantified without ambiguity. The limit of detection was, for example, for  $\alpha$ -BHC 0.002 mg/kg and for p,p'-DDT 0.02 mg/kg. The recoveries of pesticides from spiked samples lay between 90 and 100%. The method is also suitable for the extraction and purification of polar pesticides so that with a single sample processing a large number of different pesticides may be determined by GLC. This will be described in a forthcoming paper.

#### RÉSUMÉ

La première d'une série de communications sur une méthode de détermination de résidus multiples de produits phytosanitaires dans différents produits traités de la détermination des pesticides organochlorés dans le tabac et les produits tabagiques. Les substances actives sont extraites au moyen d'acétone des échantillons mélangés à de l'eau, en observant une proportion constante acétone : eau de 2:1. Un élément essentiel de la méthode est la séparation efficace des substances actives de composants de plantes par chromatographie sur gel de polystyrène Bio-Beads S-X3, par laquelle les substances actives ont été retrouvées intégralement dans un volume d'élution de 65 ml. Après une chromatographie très simple sur colonne sur 1 g de gel de silice désactivé, les pesticides organochlorés peuvent être déterminés sans interférence et avec exactitude par chromatographie en phase gazeuse dans deux éluats de 10 ml. Les limites de détermination inférieures sont, par exemple, de 0,002 mg/kg pour le  $\alpha$ -HCH et de 0,02 mg/kg pour le p,p'-DDT. Les taux de récupération se situent entre 90 et 100%. Le procédé de travail décrit peut être utilisé également pour la détermination de pesticides polaires, si bien qu'il est possible, en une seule opération, de déterminer par chromatographie en phase gazeuse un grand nombre de substances actives diverses. Cette application de la méthode fera l'objet d'une communication ultérieure.

#### LITERATUR

1. Ass. of Off. Anal. Chem., Washington, D. C.: Official methods of analysis (1975), 12th ed., Abschnitte 29.001–29.017.
2. Becker, G.: Dtsch. Lebensm. Rundsch. 67 (1971) 125 bis 126.
3. Blaß, W., und W. Ebing: Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln (Methode S5); Verlag Chemie, Weinheim – New York, 1972.
4. Neseemann, E., und F. Seehofer: Beitr. Tabakforsch. 7 (1974) 251–262.
5. Specht, W.: Pflanzenschutz-Nachrichten BAYER 30 (1977) 55–71.
6. Luke, M. A., J. E. Froberg, H. T. Masumoto: J. Ass. Off. Anal. Chem. 58 (1975) 1020–1026.
7. Johnson, L. D., R. H. Waltz, J. P. Ussary und F. E. Kaiser: J. Ass. Off. Anal. Chem. 59 (1976) 174–187.
8. Stalling, D. L.: 3rd Intern. Conf. on Pesticide Chemistry, Helsinki, 1974.
9. Leicht, R., M. Schofield, L. D. Johnson und R. Waltz: Firmenschrift von Analytical Bio Chemistry Laboratories, Inc., P. O. Box 1097, Columbia, Missouri, 65201, U.S.A.
10. Gorbach, S. G., S. Winkler und E. Gaudernack: Z. Anal. Chem. 267 (1973) 173–181.
11. Coburn, J. A., B. D. Ripley und A. S. Y. Chau: J. Ass. Off. Anal. Chem. 59 (1976) 188–196.

*Für die gewissenhafte Mitarbeit bei der Ausarbeitung dieser Methode danken wir Frau S. Pelz, Frau A. Bergmann und Frau M. Wrage*

*Anschrift der Autoren:*

*Handelslabor Dr. Körl und Dr. Specht,  
Institut für Rückstandsanalytik,  
St. Anscharplatz 10,  
D-2000 Hamburg 36.*