Beiträge zur Tabakforschung International · Volume 12 · No. 2 · June 1983

DOI: 10.2478/cttr-2013-0529

Bestimmung von Aldicarb-Rückständen in Tabak*

von A. Guhlmann, J. Hollweg und F. Seehofer

Forschung und Entwicklung, B·A·T Cigaretten-Fabriken GmbH, Hamburg

ZUSAMMENFASSUNG

Als Ergänzung zu bekannten gaschromatographischen Verfahren zur Bestimmung von Rückständen des Pestizids Aldicarb in Tabak haben wir eine Methode entwickelt, die sich der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie bedient. Dies ist insofern von besonderer Wichtigkeit, als die deutsche „Verordnung über Höchstmengen an Pflanzenschutz- und sonstigen Mitteln sowie anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen" eine Höchstmenge für Aldicarb in Tabak vorsieht.

SUMMARY

To supplement known gas chromatographic processes for determining the residues of the aldicarb pesticide in tobacco, we have developed a method which makes use of high-pressure liquid chromatography. This is of particular importance inasmuch as the German Law on Pesticides provides for a maximum amount of aldicarb in tobacco.

RÉSUMÉ

Pour compléter les procédés de chromatographie gazeuse connus, servant à la détermination de résidus du pesticide «aldicarbe» dans le tabac, nous avons mis au point une méthode utilisant la chromatographie liquide haute pression. Cela est d'autant plus important que le décret allemand sur quantité maximale en produits phytosanitaires et autres ainsi qu'en autres anti-parasites dans ou sur les produits alimentaires et tabac, spécifie une quantité maximale admissible pour l'aldicarbe dans le tabac.

* Eingegangen: 23. Juli 1982 – angenommen: 23. 12. 1982.

1. EINLEITUNG

Aldicarb [2-Methyl-2-(methylthio)propionaldehyd-O-(methyl-carbamoyl)oxim] ist aktiver Bestandteil in Formulierungen, die unter dem Handelsnamen „Temik" vertrieben werden. Es wird in vielfältiger Weise zur Kontrolle von Insekten, Milben und Würmern in vielen Ländern verwandt. Haupteinsatzgebiete waren zunächst Baumwolle, Erdnüsse, Kartoffeln sowie Zuckerrüben und Zuckerrohr. In einigen Ländern ist auch die Anwendung bei Hopfen, Bananen, Zitrusfrüchten und Tabak zugelassen oder befindet sich in der Erprobung.

Aldicarb ist ein systemisch wirkendes Pestizid, das cholinesterasehemmend zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt wird. Sein Metabolismus ist weitgehend erforscht (1). Toxisch sind außer Aldicarb selbst seine beiden Oxidationsprodukte Aldicarb-sulfoxid [2-Methyl-2-(methylsulfinyl)propionaldehyd-O-(methyl-carbamoyl)oxim] und Aldicarb-sulfon [2-Methyl-2-(methylsulfonyl)propionaldehyd-O-(methyl-carbamoyl)oxim].

In der deutschen „Verordnung über Höchstmengen an Pflanzenschutz- und sonstigen Mitteln sowie anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung – PHmV)" (2) wird für Tabak in der Anlage 4 eine zulässige Höchstmenge von 10 mg/kg für Aldicarb und die beiden Oxidationsprodukte (insgesamt berechnet als Aldicarb) vorgeschrieben.

In der Literatur sind bisher verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung von Aldicarb beschrieben worden. Darunter sind sowohl spektroskopische als auch chromatographische Verfahren. In Formulierungen kann der Aldicarbgehalt beispielsweise durch Infrarot-

spektroskopie ermittelt werden (3). Nach einer Farbreaktion eignet sich zur Rückstandsbestimmung in Zitrusfrüchten eine spektrophotometrische Methode (4). Die Bestimmung einiger Methylcarbamatpestizide gelingt auch durch Polarographie (5). Unter den chromatographischen Verfahren wird die Dünnschichtchromatographie vorzugsweise mit Enzymhemmung zur Detektion eingesetzt (6, 7). Als Methode der Wahl galt bisher die Gaschromatographie. Sowohl von Union Carbide, dem Aldicarb-Hersteller, als auch von anderen Instituten wurden Verfahren entwickelt (8–11), wobei Union Carbide die Rückstandsanalyse in Tabak beschreibt. Als Detektor wurde zunächst der flammenphotometrische Detektor benutzt. Kürzlich erschien eine Veröffentlichung, in der ein Hall-Leitfähigkeitsdetektor erprobt wurde (11). Wegen der zu geringen Absorption von Aldicarb im längerwelligen UV-Bereich fand die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bisher nur vereinzelt Anwendung bei der Bestimmung von Aldicarb und seinen Metaboliten (12–14).

Wir wollen nun ein Verfahren vorstellen, durch das Rückstände von Aldicarb und seinen beiden toxischen Oxidationsprodukten in Tabak in einem Analysegang bestimmt werden können. Da Aldicarb schon kurz nach seiner Anwendung auf dem Feld oxidiert wird, lassen sich bei Analyse auf jeweils eine der drei Substanzen selten Rückstände des unveränderten Ausgangsprodukts nachweisen. In den meisten Fällen können Aldicarb-sulfoxid und Aldicarb-sulfon in unterschiedlichem Verhältnis in der Gemischzusammensetzung bestimmt werden. Zur Routineuntersuchung empfiehlt sich deshalb eine gemeinsame Analyse nach vorheriger Oxidation von evtl. noch vorhandenem Aldicarb bzw. Aldicarb-sulfoxid zum Aldicarb-sulfon.

2. BESCHREIBUNG DER METHODE

2.1 Reagenzien

Methanol, p.a.; Essigsäure, p.a.; Wasserstoffperoxid (30%ig); Natriumhydrogencarbonat, p.a.; Methylenchlorid, p.a.; Salzsäure (1 mol/l); SEP-PAK-Silikagel-Kartuschen (Waters GmbH); Aldicarb-sulfon (Union Carbide).

Oxidationsgemisch: Essigsäure/H_2O_2 = 1/1 (v/v).

Eichlösung: 10 µg Aldicarb-sulfon / ml Methanol.

Desaktivierung der SEP-PAK-Silikagel-Kartuschen durch Spülen derselben mit

1. 10 ml Methanol/Wasser = 80/20,
2. 10 ml Aceton,
3. 10 ml Methylenchlorid.

Sofort danach wird die Kartusche verwendet.

2.2 HPLC-Geräte und Chromatographiebedingungen

HPLC-Gerät:	SP 8000 (Spectra Physics)
UV-Detektor:	SF 770 (Schoeffel)
Säule:	25 cm (4,6 mm Innendurchmesser)
Vorsäule:	4 cm (4,6 mm Innendurchmesser)
Säulenfüllmaterial:	RP 18 (5 µm Korngröße)
Laufmittelgemische:	A – Methanol/Wasser = 17/83 (v/v) B – Methanol/Wasser = 50/50 (v/v)
Flußgeschwindigkeit:	1,6 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	22 °C
Detektorwellenlänge:	205 nm
Detektorbereich:	0,01 Absorptionseinheiten
Laufmittelprogramm:	15 min – Gemisch A 5 min – Gemisch B 10 min – Gemisch A

2.3 Durchführung der Analyse

Aus einer ausreichend großen Stichprobenmenge von frisch gemahlenem Tabak werden genau 2 g eingewogen. Der Tabak wird mit 20 ml Methanol 30 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt und danach abfiltriert. Von der klaren Lösung werden 10 ml abgenommen und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit 5 ml Oxidationsgemisch 30 min lang bei 70 °C oxidiert. Die Lösung wird abermals filtriert, und der Rückstand wird zuerst mit 10 ml und dann mit 5 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Lösung wird durch portionsweises Zugeben von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Das Aldicarb-sulfon wird zunächst einmal mit 20 ml und danach zweimal mit je 10 ml Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridextrakte werden vereinigt, zweimal mit je 5 ml 1 N Salzsäure gewaschen und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 1 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit einer Spritze auf eine frisch desaktivierte SEP-PAK-Silikagel-Kartusche gegeben. Die Kartusche wird vorsichtig mit 10 ml Methylenchlorid gewaschen und das Aldicarb-sulfon mit 10 ml Aceton eluiert. Die Acetonlösung wird am Rotationsverdampfer vollständig eingeengt. Der Rückstand wird in 1 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wird mindestens dreimal injiziert. Die Analyse erfolgt isokratisch mit Laufmittelgemisch A. Zur Reinigung der Säule wird kurz Gemisch B verwendet und danach mit Gemisch A wieder equilibriert. Zur Eichung wird die Eichlösung dreimal eingespritzt. Der Mittelwert wird zur Ermittlung des Eichfaktors herangezogen. Bei konstanten Retentionszeiten wird die Höhenauswertung der Flächenberechnung vorgezogen.

3. DISKUSSION UND ERGEBNISSE

3.1 Extraktion und Vorreinigung

Die Extraktion erfolgt mit Methanol. Eine Erhöhung der Temperatur sowie eine Verlängerung der Extraktionsdauer erwiesen sich als überflüssig. Bei gemahlenem Untersuchungsgut und einem Gewichtsverhältnis von Lösungsmittel zu Probe, das größer ist als 5 : 1, reicht eine 30minütige Extraktion bei Raumtemperatur vollkommen aus. Die für eine spätere gaschromatographische Bestimmung empfohlene Vorreinigung mit einem Gemisch aus Celite und Natriumsulfat (8) kann hier entfallen.

3.2 Oxidation

Um eventuell auf der Pflanze noch nicht vollständig oxidiertes Material in das Sulfon zu überführen, kann ein Oxidationsschritt notwendig sein. Bisher wurden drei verschiedene Möglichkeiten dazu diskutiert. Ausgangspunkt der Überlegungen war eine Oxidation mit einem Gemisch aus Eisessig und Wasserstoffperoxid (8). Da als wirksames Agens dieser Mischung die intermediär gebildete Peressigsäure angenommen werden kann, wurde diese auch direkt zur Oxidation eingesetzt (9). Eine Vereinfachung wird durch den Zusatz der Peressigsäure zum Extraktionsmittel erreicht (10).
Aus zwei Gründen bevorzugten wir den Einsatz des Oxidationsgemisches aus Essigsäure und Wasserstoffperoxid. In unseren Versuchen mit unbehandelten Tabakproben zeigte es sich, daß einige mitextrahierte Tabakinhaltsstoffe durch Peressigsäure anscheinend besser oxidiert werden als durch das einfache Gemisch. Diese Oxidationsprodukte erschwerten durch vergrößerte Störpeaks im HPLC-Chromatogramm die quantitative Bestimmung. Wie sich in Testversuchen mit und ohne Tabakzusatz zeigte, werden Aldicarb und das Sulfoxid jedoch schon durch das schwächere Oxidationsgemisch vollständig in das Sulfon überführt. Da außerdem die Peressigsäure bei der Herstellung und in der Anwendung nicht als gefahrlos angesehen werden kann, entschieden wir uns nicht zuletzt auch aus Sicherheitsgründen für das sehr einfach und gefahrlos zu handhabende Gemisch aus Eisessig und Wasserstoffperoxid.

3.3 Säulenchromatographie

Zur Vorreinigung lieferte in den meisten Fällen bisher die Flüssigkeitschromatographie auf einer Florisil-Säule die besten Ergebnisse (8). Zur Verringerung des Zeit- und Materialaufwands an dieser Stelle erprobten wir die Verwendung von SEP-PAK-Kartuschen der Firma Waters. Bei kleinen Probemengen können diese Kartuschen gute Ergebnisse und Vortrennungen liefern.
Zunächst wurde der Einsatz der mit Kieselgel gefüllten Silikagel-Kartusche als Vorreinigungsschritt in die Probenaufarbeitung mit einbezogen. Nach der Oxidation der Probe kann Aldicarb-sulfon in einer Methylenchloridlösung gut auf die Kartusche aufgegeben werden. Ein Spülen der Kartusche mit Methylenchlorid entfernt dann einige Tabakinhaltsstoffe, während das Sulfon nahezu vollständig zurückgehalten wird. Eine Elution des Sulfons mit stark polaren Lösungsmitteln wie Methanol und Wasser oder mit Gemischen aus beiden gelingt nicht quantitativ. Als am geeignetsten erwies sich hier Aceton, mit dem das Sulfon vollständig aus der Kartusche eluiert wird.
Einige der Silikagel-Kartuschen zeigten in unseren Versuchen ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten, was wir Produktionsstreuungen bei der Herstellung des Füllmaterials zuschrieben. Um zur Analyse nach Möglichkeit über Kartuschen mit gleicher Aktivität zu verfügen, spülten wir sie mit einem wasserhaltigen Lösungsmittelgemisch aus. Danach entfernten wir überschüssiges Wasser mit anderen Lösungsmitteln, wobei als letztes Lösungsmittel dasjenige Verwendung fand, mit dem die Probe nach dieser Desaktivierung in die Kartusche gegeben wurde.
Da nach dem Oxidationsschritt eine wäßrige Lösung des Aldicarb-sulfons vorliegt, lag es nahe, an dieser Stelle die Möglichkeit einer Vorreinigung mit der SEP-PAK-RP18-Kartusche zu untersuchen. Wie sich an Standardlösungen zeigte, gelingt dabei eine Elution des Sulfons schon mit Wasser, während unpolarere Verbindungen aus der Probenlösung zurückgehalten werden.
Bei Vergleichen mit der Vorreinigung durch Silikagel-Kartuschen ergaben sich eindeutig Vorteile für die letztere. Die Vorreinigung mit RP18-Kartuschen ist bei Tabakextrakten nicht so effektiv. Auch eine Kombination unter Verwendung von beiden Kartuschenarten – jede an der adäquaten Stelle im Probenvorbereitungsgang – zeigte keine deutliche Verbesserung des „clean-up"-Verfahrens gegenüber der anfangs beschriebenen Vorreinigung allein mit der Silikagel-Kartusche.

3.4 Verteilungschromatographie

Allein durch Flüssig/Flüssig-Verteilung ist eine zufriedenstellende Vorreinigung der Probe für die HPLC-Analyse nicht zu erreichen. Als Ergänzung zu der Verwendung der Silikagel-Kartusche erwies es sich bei einigen Tabakproben jedoch als nützlich, die Methylenchloridlösung vor dem Eindampfen und der Aufgabe auf die Kartusche mit stark verdünnter Salzsäure zu waschen. Eine weitere Reduzierung unerwünschter Peaks im Chromatogramm konnte so für diese Tabakproben erreicht werden.

3.5 Chromatographiebedingungen

Entsprechend den in der Literatur beschriebenen Chromatographiebedingungen (12) begannen wir die Methodenentwicklung mit der Analyse der Reinsubstanzen. Wir verwendeten eine 25-cm-Säule mit einer Vorsäule von 4 cm Länge. Beide Säulen waren mit RP18-Material von 10 µm Korngröße gefüllt. Zur Elution des Aldicarb-sulfons wurde Acetonitril/Wasser = 15/85 bei einem Fluß von 2 ml/min gepumpt. Hieraus resultierte jedoch eine extrem kurze Retentionszeit von etwa 4 min

und eine ungenügende Auftrennung von mitextrahierten Tabakinhaltsstoffen. Zur Lösung des Problems wurden die Zusammensetzung und die Flußgeschwindigkeit des Laufmittelgemisches variiert. Bei Flußgeschwindigkeiten zwischen 1,2 ml/min und 2 ml/min wurden Acetonitril/Wasser-Gemische in den Verhältnissen 5/95, 7/93 und 10/90 erprobt. Zur Analyse von Tabakproben erwies sich Acetonitril/Wasser = 7/93 bei einem Fluß von 2 ml/min als geeignet, jedoch war die Trennung der Peaks von Aldicarb-sulfon und mitextrahierten Begleitsubstanzen noch nicht optimal. Deshalb wurde das feinere RP18-Material mit 5 µm Teilchengröße verwandt. Außerdem wurden Methanol/Wasser-Gemische mit 15 %, 17 % und 20 % Methanol bei Flußgeschwindigkeiten zwischen 1,2 ml/min und 2 ml/min erprobt. Insgesamt gesehen ergaben sich die besten Analysebedingungen und Auftrennungen unter Verwendung des 5-µm-Materials und des Laufmittels Methanol/Wasser = 17/83 bei 1,6 ml/min Flußgeschwindigkeit.

3.6 Analysen

Zur Optimierung der Methode wurden unter anderem im Vergleich Proben von unbehandeltem und feldbehandeltem Tabak analysiert (Abb. 1 und 2).* Dabei konnte insbesondere die Effektivität der einzelnen Vorreinigungsschritte an der unbehandelten Probe verglichen und deren Auswirkungen auf den Peak des Aldicarbsulfons der behandelten Probe untersucht werden. Eine Dreifachbestimmung der behandelten Probe ergab als Mittelwert $\bar{x}$ = 9,4 mg/kg und als Standardabweichung s = 0,3 (berechnet als Aldicarb).
Darüber hinaus wurde der Tabak handelsüblicher Cigaretten jeweils unbehandelt und nach Dotierung mit Aldicarb bzw. Aldicarb-sulfoxid oder Aldicarb-sulfon untersucht. Dabei wurden vier handelsübliche Marken mit unterschiedlichen Tabaktypen ausgewählt und mit der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmenge an Aldicarb belegt (Tab. 1). Die Ergebnisse zeigen eine geringfügige Erhöhung der wiedergefundenen Menge, was auf den nicht vollkommen entfernten Einfluß von Tabakinhaltsstoffen zurückzuführen sein dürfte. Aus diesem Grunde sollte die Methode bei Aldicarbgehalten unter 2 mg/kg nicht verwendet werden.

* Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. N. A. Pappas, Tobacco Institute of Greece, im Rahmen des Unterausschusses für Pestizidrückstände der Arbeitsgruppe „Rauch" von *Coresta* zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. Dotierung verschiedener Tabaktypen mit Aldicarb.

Tabaktyp	Dotierung (mg/kg)	Analysenergebnis (mg/kg)
Blend	10	10,3
Flue-cured	10	10,1
Air-cured	10	10,6
Orient	10	10,8

Abbildung 1. Chromatogramm einer auf dem Feld mit Aldicarb behandelten Tabakprobe.

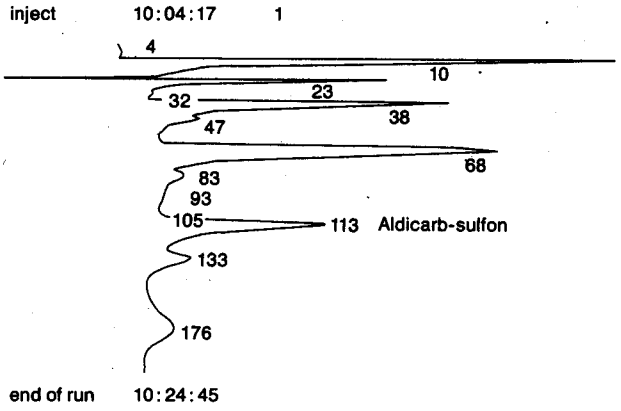
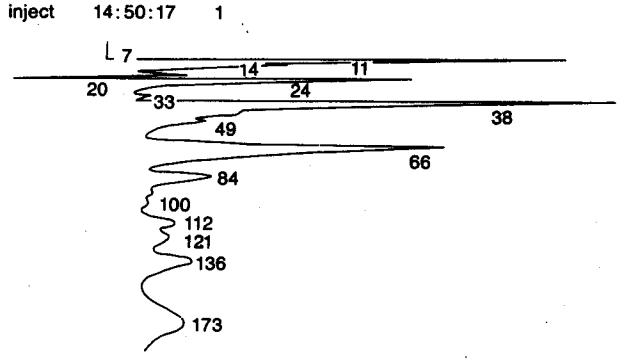


Abbildung 2. Chromatogramm einer unbehandelten Vergleichstabakprobe.



Die Linearität der Eichkurve von Standardlösungen ist sowohl bei Höhenberechnung wie auch bei Flächenauswertung über einen größeren Konzentrationsbereich gegeben (Tab. 2). Für Tabakextrakte wird bei konstanten Retentionszeiten die Höhenauswertung bevorzugt, da durch die Art der Auswertung der störende Einfluß von mitextrahierten Tabakinhaltsstoffen vermindert werden kann. Die Eichung erfolgt mit einer Standardlösung von Aldicarb-sulfon. Die Ergebnisse werden jedoch zur Veröffentlichung auf Aldicarb umgerechnet.

Tabelle 2. Eichreihe (Flächen- bzw. Höhenmittelwerte aus jeweils drei Injektionen).

Konzentration (µg/ml)	Fläche (counts)		Höhe (mm)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	14.377	1.109	5,1	0,6
2	32.015	1.720	10,5	0,7
5	77.437	6.384	25	0
10	163.772	7.323	51	2,0
20	320.757	3.750	101	1,0
40	646.643	5.122		

LITERATUR

1. Union Carbide Corporation: Temik® aldicarb pesticide; Union Carbide Corporation, Salinas, California, 1975.
2. Verordnung über Höchstmengen an Pflanzenschutz- und sonstigen Mitteln sowie anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung – PHmV) vom 24. Juni 1982; Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1982, Teil I, S. 745–783.
3. McDermott, W. H.: Infrared spectrophotometric analysis of aldicarb formulations; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56 (1973) 1091–1092.
4. Meagher, W. R., R. Hendrickson und B. G. Shively: Spectrophotometric determination of Temik residues in citrus; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50 (1967) 1242–1246.
5. Booth, M. D., und B. Fleet: Determination of some methylcarbamate insecticides by a. c. polarography and cyclic voltammetry; Talanta 17 (1970) 491–498.
6. Mendoza, C. E., und J. B. Shields: Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin-layer chromatography and colorimetry; J. Agric. Food Chem. 21 (1973) 178–184.
7. Bajer-Rapic, B., E. R. Schmid, E. Jünger und K. Pollak: Dünnschichtchromatographische Trennung und enzymatischer Nachweis von Carbamatpestiziden in Pflanzenextrakten; Nahrung 19 (1975) 551–555.
8. Maitlen, J. C., L. M. McDonough und M. Beroza: Rapid method for the extraction, cleanup, and GLC determination of toxic residues of Temik; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52 (1969) 786–789.
9. Carey, W. F., und K. Helrich: Improved quantitative method for the determination of aldicarb and its oxidation products in plant materials; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53 (1970) 1296–1299.
10. Union Carbide Corporation: A method for the determination of total toxic aldicarb residues in cured tobacco by gas chromatography; Union Carbide Corporation, South Charleston, West Virginia, 1976.
11. Galoux, M., J. C. van Damme, A. Bernes und J. Potvin: Gas-liquid chromatographic determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in soils and water using a Hall electrolytic conductivity detector; J. Chromatogr. 177 (1979) 245–253.
12. Sparacino, C. M., und J. W. Hines: High-performance liquid chromatography of carbamate pesticides; J. Chromatogr. Sci. 14 (1976) 549.
13. Aten, C. F., und J. B. Bourke: Reverse-phase liquid chromatographic behavior of some carbamate and urea pesticides; J. Agric. Food Chem. 25 (1977) 1428–1430.
14. Blaicher, G., W. Pfannhauser und H. Woidich: Problems encountered with the routine application of HPLC to the analysis of carbamate pesticides; Chromatographia 13 (1980) 438–446.

Den Mitgliedern des Unterausschusses für Pestizidrückstände der Arbeitsgruppe „Rauch" von Coresta *sei an dieser Stelle für viele interessante Diskussionen und Hinweise gedankt.*

Anschrift der Autoren:

B·A·T Cigaretten-Fabriken GmbH,
Forschung und Entwicklung,
Bahrenfelder Chaussee 139,
D-2000 Hamburg 50.