

CORESTA-Methode Nr. 2

(September 1974)

Methode für die Bestimmung von Rückständen an Organochlor-Pestiziden in Tabak*

empfohlen vom

Unterausschuß für Pestizidrückstände der CORESTA**

1. ANWENDUNGSBEREICH

Im Prinzip ist diese Methode auf eine sehr große Anzahl von Organochlor-Pestiziden anwendbar. Genaugenommen kann sie jedoch nur für die folgenden 17 Substanzen empfohlen werden:

Name	Nachweisgrenze
α -HCH	0,05 ppm
β -HCH	0,05 ppm
γ -HCH	0,05 ppm
δ -HCH	0,05 ppm
Heptachlor	0,1 ppm
Aldrin	0,1 ppm
Heptachlorepoxyd	0,1 ppm
p,p'-DDE	0,1 ppm
Dieldrin	0,1 ppm
o,p'-TDE	0,1 ppm
Endrin	0,1 ppm
o,p'-DDT	0,1 ppm
p,p'-TDE	0,1 ppm
p,p'-DDT	0,1 ppm
α -Endosulfan	0,1 ppm
β -Endosulfan	0,1 ppm
Endosulfansulfat	0,2 ppm

Polychlorierte Biphenyle (PCB) und Toxaphen können die gaschromatographische Bestimmung stören.

Mit dem beschriebenen Extraktionsverfahren wird eine Rückgewinnung von mindestens 95% erzielt.

2. APPARATUR UND GLASGERÄTE

Es ist erforderlich, daß weder Plastikgeräte noch Schliff Fett benutzt wird, da sonst Verunreinigungen in die Lösungsmittel geraten können. Es ist weiterhin unbedingt notwendig, alle Glasgeräte sehr gründlich zu reinigen.

* Als Grundlage dient die Methode der „Association of Official Analytical Chemists“ (AOAC) für die Bestimmung von Rückständen in Nahrungsmitteln.

Der Text entspricht demjenigen der Veröffentlichung, die in englischer und französischer Sprache in der Ausgabe 1974-2 (S. 23—30) der Zeitschrift „Information Bulletin“ der CORESTA erschienen ist.

** Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, Paris.

2.1 Liste

- Erlenmeyer-Kolben mit Schliffstopfen (500 ml).
 - Meßzylinder (250 ml).
 - Rotationsverdampfer mit Kolben verschiedener Volumina oder Kuderna-Danish-Verdampfer.
 - Chromatographiesäulen (innerer Durchmesser: 10 mm) mit Teflon-Stopfen und Sinterglasscheibe (Porosität: G2).
 - Meßkolben (25 ml).
 - Scheidetrichter mit Teflon-Hahn.
 - Pipetten.
 - Pasteurpipetten.
 - Mikroliterspritze mit Druckfeder.
 - Gaschromatograph, ausgerüstet mit einem Elektroneneinfangdetektor. Dieses Instrument muß getrennte Heizeinheiten für den Einspritzblock, den Säulenteil und den Detektor haben.
- Die Einspritzungen müssen direkt auf die Säule erfolgen.
- Das Totvolumen des Instrumentes muß so klein wie möglich sein und sollte auf keinen Fall mehr als 5% des gesamten Detektordurchflusses je Minute ausmachen.

3. REAGENZIEN

3.1 Liste

Die folgenden Chemikalien müssen analysenrein sein (die Lösungsmittel sollten „Nanograde“ oder gleichwertig sein).

- Acetonitril⁺,
- n-Hexan,
- Benzol⁺,
- Natriumsulfat (wasserfrei),
- Natriumchlorid,
- Florisil (60–100 mesh).

3.2 Reinheitskontrolle der Lösungsmittel

Die Reinheit der Lösungsmittel muß im Blindversuch geprüft werden, indem genau die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt werden wie während der Tabak-

⁺ Es wird gegenwärtig daran gearbeitet, weniger giftige Lösungsmittel zu finden, um Acetonitril und Benzol zu ersetzen.

analyse (Extraktion, Konzentration, Vorreinigung, Gaschromatographie). Das Chromatogramm der Lösungsmittel muß eine Grundlinie ohne sichtbare Stör-Peaks haben, welche sich mit denjenigen der Pestizide überlagern könnten.

3.3 Vorbehandlung des Florisils

Die Aktivität des Florisils muß so beschaffen sein, daß Verunreinigungen zur Genüge zurückgehalten werden, während die Pestizide quantitativ passieren können. (Die Ausbeute muß über 95% liegen.)

Einer der wichtigsten Parameter der Methode ist die Qualität des Florisils. Deshalb werden die Verfahren zur Vorbehandlung und zur Prüfung der Desaktivierung im folgenden im einzelnen beschrieben.

Man erhitzt das Florisil 5 Stunden lang in einem Muffelofen bei 500–550° C und läßt in einem fest verschlossenen Behälter, der kein Trocknungsmittel enthalten darf, abkühlen. Dann gibt man schnell tropfenweise und unter ständigem Rühren 5 ml Wasser zu 100 g Florisil und homogenisiert die Mischung durch halbstündiges Drehen in einem Rundkolben. Vor Gebrauch läßt man das Florisil in einem fest verschlossenen Gefäß mindestens 48 Stunden lang sich vollständig ausgleichen.

Die Desaktivierung des Florisils wird überprüft, indem man (unter den in Abschnitt 6.1 aufgeführten Bedingungen) eine Eichlösung durchlaufen läßt, die alle zu untersuchenden Pestizide enthält. Die Konzentration dieser Lösung soll dem 10fachen der unteren Nachweisgrenze jedes einzelnen Pestizides entsprechen. (Diese Konzentration basiert auf der Annahme einer 95%igen Ausbeute und gewährleistet mindestens das Zweifache der Konzentration der unteren Nachweisgrenze für die folgende Gaschromatographie-Prüfung.) Die Aktivität des Florisils ist ausreichend, wenn die Ausbeute jedes Pestizides höher als 95% ist.

4. EICHLÖSUNGEN

Eichsubstanzen sollten in fester Form vorliegen. Zur Herstellung der Vorratslösungen werden mindestens 10 mg Substanz mit einer Mindestgenauigkeit von 1% (10 mg ± 0,1 mg) eingewogen. Die Lösungen werden im Kühlschrank aufbewahrt.

5. VORBEREITUNG DER TABAKPROBEN

5.1 Mit besonderer Aufmerksamkeit muß sichergestellt sein, daß eine repräsentative Probe entnommen wird.

5.2 Der Tabak wird vorzugsweise geschnitten oder gemahlen eingesetzt; beim Mahlen ist aber jedes Erhitzen zu vermeiden.

5.3 Die Tabakfeuchte wird mit der entsprechenden empfohlenen *Coresta*-Methode bestimmt.

6. EXTRAKTION

Die Extraktion wird mit Acetonitril durchgeführt. Da diese Substanz giftig ist, ist es nötig, strenge Vorsichtsmaßnahmen zum Schutze des Personals zu ergreifen.

Man versetzt 20 g Tabak mit 280 ml eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (5:2 Volumenteile) und schüttelt eine Stunde lang.

Danach wird das Gemisch filtriert.

50 ml des Filtrats werden im Scheidetrichter mit 25 ml n-Hexan versetzt. Dann fügt man 150 ml einer wässrigen 2%igen Natriumchloridlösung hinzu und schüttelt vorsichtig eine Minute lang. Man wartet, bis sich die Phasen getrennt haben, überführt die wässrige Phase in einen zweiten Scheidetrichter und schüttelt nochmals mit 25 ml n-Hexan eine Minute lang aus.

Wenn sich die Phasen getrennt haben, wird die wässrige Phase verworfen, und die beiden Hexanfraktionen werden vereinigt.

Die kombinierte n-Hexan-Fraktion wird mittels Durchlauf durch eine mit wasserfreiem Natriumsulfat beschichteten Säule (2 cm × 2 cm) getrocknet. Zum Nachwaschen wird wieder n-Hexan verwendet.

Der getrocknete n-Hexan-Extrakt wird in einem Rotationsverdampfer (Wasserbad: 40° C / Vakuum: 400 mm Hg) oder in einem über einem Dampfbad erhitzten Kuderna-Danish-Verdampfer auf ungefähr 1 ml eingedampft.

6.1 Vorreinigung

Eine Chromatographie-Säule wird 5 bis 6 cm hoch mit n-Hexan gefüllt. Darauf wird mit 2 g Florisil (vorbehandelt wie in 3.3), gefolgt von wasserfreiem Natriumsulfat bis zu einer Dicke von ungefähr 2 cm beschickt. Man läßt das n-Hexan aus der Säule ablaufen, bis der n-Hexan-Spiegel auf der gleichen Höhe wie der obere Rand der Säulenpackung liegt.

Der eingedampfte Extrakt wird quantitativ auf die Säule gegeben, wobei der Kolben mit Hexan nachgespült wird.

Die Säule wird zunächst mit n-Hexan eluiert, indem man gerade so viel n-Hexan auf die Säule gibt, daß 25 ml Eluat in einem Meßkolben erhalten werden (= Fraktion I).

Danach wird Benzol auf die Säule gegeben und ein zweites 25-ml-Eluat in einem anderen Meßkolben gesammelt (= Fraktion II).

Von jeder Fraktion (I und II) wird 1 µl getrennt in den Gaschromatographen eingespritzt.

7. GASCHROMATOGRAPHIE

Die gaschromatographischen Bedingungen sind dem jeweiligen Geräte- und Detektortyp anzupassen und zu optimieren. Notwendig ist eine Glassäule von geeigneter Länge (ungefähr 2 bis 4 Meter), damit eine ausreichende Trennung der zu untersuchenden Substanzen gewährleistet ist.

7.1 Stationäre Phase

1,5% SP-2250 + 1,95% SP-2400 auf Supelcon 100/120 oder

1,5% OV-17 + 1,95% QF-1 auf Aeropack 30 oder einem gleichwertigen Material.

7.2 Trägergas

Es kann reiner Stickstoff, Helium oder Argon-Methan (90/10 oder 95/5) verwendet werden.

Falls der Gasfluß durch die Säule weniger als 25 ml/min beträgt, ist es ratsam, zusätzliches Trägergas am Säulenausgang einzuleiten (Spülgas), um sicherzustellen, daß der Gasfluß durch den Elektroneneinfangdetektor genügend stark ist.

7.3 Einspritzung

Falls kein automatisches System benutzt werden soll, wird die Verwendung einer Mikroliterspritze mit Druckfeder empfohlen.

Vor und nach jeder Einspritzung wird die Spritze 10mal mit reinem Lösungsmittel ausgewaschen. Ebenso müssen vor jeder Probenaufnahme mit der Probelösung 10 Spülungen vorgenommen werden.

7.4 Temperatur

Die Temperatur des Einspritzblockes sollte um 30° höher sein als die Säulentemperatur (z. B. Säulentemperatur: 210° C, Temperatur des Einspritzblockes: 240° C).

Je höher die Detektortemperatur ist, desto geringer wird die Ablagerung von Verunreinigungen im Detektor sein. Die Detektortemperatur sollte entsprechend der Beschaffenheit des Instrumentes zwischen 180° und 350° C liegen.

7.5 Eichung

Es ist höchst wichtig, Probelösungen und Eichlösung in regelmäßigem Wechsel einzuspritzen und das Detektorsignal nötigenfalls mittels Verdünnung der Probe in den Grenzen der Linearität zu halten.

Als interner Standard wird der Gebrauch von Mirex empfohlen. Diese Maßnahme verbessert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

8. BERECHNUNG UND ANGABE DER ERGEBNISSE

Da die Anzeige des Elektroneneinfangdetektors nicht durchgehend linear verläuft, ist der Gebrauch einer Eichkurve zu empfehlen. Falls jedoch die Konzentration der Pestizide zu hoch ist, so daß die Werte auf den flachen Teil der Eichkurve fallen, ist es unbedingt nötig, den Extrakt zu verdünnen und die chromatographische Analyse zu wiederholen.

Zur Berechnung wird für jedes Pestizid X die Konzentration K_x in der Probelösung aus der Eichkurve abgelesen. Mit Hilfe der folgenden Formel wird aus K_x der Rückstand von X im Tabak (in ppm) berechnet:

$$X \text{ (ppm)} = \frac{K_x \times 280 \times 25}{G \times 50} \times \frac{100}{100 - F}$$

wobei

G = Einwaage des Tabaks (in Gramm),

F = Feuchtigkeitsgehalt (in %),

K_x = Konzentration des Pestizids X in der eingespritzten Lösung (in µg/ml).

Die Ergebnisse werden bis zur ersten Dezimalstelle oder bis zu einer signifikanten Stelle ausgerechnet.