

Eine Methode zur Bestimmung der Rückstände von Organochlor- und Organophosphor-Pestiziden auf Tabak* / A Method for the Determination of Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues on Tobacco**

von/by

H. Reif, Austria Tabakwerke AG, Wien, Österreich

und/and

F. Moser, Philip Morris Europe SA, Research and Development, Neuchâtel, Switzerland

Deutsche Fassung / German Version***

1. EINLEITUNG

In dem Ausmaß, in dem die Landwirtschaft mehr und mehr Chemikalien zur Kontrolle von Insektenpopulationen, Pilzen oder Unkraut verwendet, kämpfen die Chemiker in den Laboratorien mit der schwierigen Aufgabe, Rückstände einer steigenden Anzahl verschiedener Chemikalien auf einer steigenden Anzahl von Proben zu analysieren. Diese Rückstände gehören den verschiedensten chemischen Verbindungsklassen an und haben nur gemeinsam, daß sie in winzigen Mengen von einigen Mikrogrammen auf Materialien zu finden sind, die der Aufreinigung Probleme entgegenstellen. Verschiedenster Druck wird auf die Analytiker ausgeübt, sei es von den Tabakeinkäufern des eigenen Unternehmens, die die Resultate so schnell wie möglich für einen Kaufentscheid benötigen, sei es durch die Regierung, die ihre Vorschriften immer strenger formuliert und sich auf exakte Analysen stützen möchte.

Diese Forderungen führten zu zwei hauptsächlichen Forschungsrichtungen auf diesem Gebiet. Sie können charakterisiert werden als eine theoretische Richtung, die höchste Präzision und allgemeine Anwendungsmöglichkeiten um den Preis einer langen und mühevollen Analyse erzielt. Die praktische Richtung hingegen erstrebt in erster Linie hohe Effizienz und eine große Analysenzahl je Tag um den Preis, daß die Methode nicht gleichzeitig alle Klassen von Pestiziden erfaßt.

2. VERGLEICH DER METHODEN

Um einen Überblick über die gegenwärtig üblichen Methoden für die Analytik der Rückstände zu geben, ist es nicht nötig, die einzelnen Methoden zu referieren, son-

dern es genügt, die hauptsächlichen Klassen zu beschreiben. Alle diese Methoden stehen schon viele Jahre in Verwendung, sie wurden abgeändert und verfeinert, und von jedem Autor kamen wertvolle Beiträge, speziell von den amerikanischen Chemikern, die mit Rückstandsproblemen schon viele Jahre beschäftigt sind. Die hauptsächlichen Methodentypen sind:

- a. Kaltextraktion von Tabak durch Schütteln mit wäbrigem Acetonitril, Flüssig-Flüssig-Verteilung in Petroläther für die Organochlor- und in Dichlormethan für die Organophosphor-Pestizide. Anschließend Reinigungsschritte mit Florisilsäulen und Elution mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität (1).
- b. Wärmeextraktion des Tabaks in einem Soxhletapparat. Diese Methode erwies sich als wirkungsvoller als Mixen, Schütteln oder Kochen am Rückfluß. Das beste Lösungsmittel war die Mischung Chloroform/Methanol (9+1). Die Reinigungsschritte sind ähnlich den gerade erwähnten (2).
- c. Kaltextraktion des gepulverten Tabaks direkt auf einer Florisilsäule, wobei das Tabakpulver mit Florisil vermischt wird, um die Benetzbarkeit zu erhöhen. Die Extraktion wird mit 600 ml einer Mischung aus Petroläther und Dichlormethan durchgeführt. Nach Entfernen des Dichlormethans wird die Lösung ohne weitere Reinigungsschritte verwendet (3).
- d. Gemischte Methoden, bei denen warme Extraktion und Reinigung in einem Schritt vereinigt sind. Hierzu zählen die in dieser Arbeit beschriebene Methode und ähnliche Versuche einer rhodesischen Arbeitsgruppe (4). Nach den letztgenannten Autoren scheint das System jedoch für eine schnelle, überslagsmäßige Erfassung einiger Rückstandskomponenten nur begrenzt anwendbar zu sein.

3. BESCHREIBUNG DER METHODE REIF/MOSER*

Bei der Entwicklung dieser Methode war es das Ziel, die Nachteile der vier aufgeführten Methodentypen zu vermeiden und die Vorteile zu kombinieren. Daher vereint diese Methode eine warme Soxhletextraktion, die die besten Extraktionsergebnisse liefert, mit einem Clean-

* Vortrag anlässlich der 30. Tobacco Chemists' Research Conference, Nashville, Tennessee, U.S.A., Oktober 1976.

** Presented at the 30th Tobacco Chemists' Research Conference held in Nashville, Tennessee, U.S.A., in October 1976.

*** Englische Fassung / English version siehe/see S./p. 171.

* Die Abb. und Tab. des Aufsatzes befinden sich auf S. 174 und 175.

up-Schritt über eine Florisilsäule, die bis jetzt das effektivste Mittel zur Reinigung des Extrakts zu sein scheint. Um Kosten und Zeit zu sparen, werden keine großen Elutionsvolumina verwendet, die nachher zurückgewonnen werden müssen, sondern Säulenreinigung und Soxhletextraktion werden in einem Schritt kombiniert (Abb. 1): Das Lösungsmittel muß den gepulverten Tabak und das Florisil durchströmen, bevor es im Soxhletapparat zirkulieren kann. Jener Teil des Extraktionsgefäßes, in dem sich normalerweise die Extraktionshülse befindet, wurde in eine chromatographische Säule mit einer Sinterglasscheibe am Boden und einem Teflonhahn zur Kontrolle der Zirkulationsgeschwindigkeit umgestaltet. Mit diesem Aufbau ist es möglich, die Funktion einer Reinigungssäule exakt zu imitieren, wobei das Elutionsmittel mehrere Male verwendet werden kann. Das ist der hauptsächlichste Unterschied zur Methode von Toet und Toet (4), die auch eine Mischung aus Tabakpulver und einem Reinigungsmittel (Silicagel) benutzten, jedoch einen normalen Soxhlet-Extraktor mit Syphon verwendeten. Die Silicagelteilchen, die ein Tabakpartikel umgeben, dienen auch dem Clean-up; der Tabakextrakt hat jedoch nicht die Möglichkeit, eine normale Trennsäule zu passieren.

Um so viele verunreinigende Begleitstoffe wie möglich in unserem Extrakt zu vermeiden, wählten wir eines der schlechteren Lösungsmittel für die Extraktion von Pestiziden — Hexan — und kompensierten diesen Umstand mit einer vier Stunden dauernden Laufzeit des kombinierten Extraktions-/Reinigungs-Schrittes. Während dieser Zeit wird die kurze Säule (5 g gepulverter Tabak gemischt mit 5 g Florisil auf 5 g reinem Florisil) von ca. 1000 ml Lösungsmittel passiert, wenn für diese Berechnung eine Destillationsgeschwindigkeit von 2 bis 3 Tropfen je Sekunde angenommen wird. Die Berechnung zeigt, daß die eingesetzten 100 ml Lösungsmittel zehnmal zirkulieren. Da die Wachse, Fette und gefärbten Verbindungen im Tabak aus der Säule nicht ausgewaschen werden, wenn Hexan als Lösungsmittel verwendet wird, stellen die empfohlenen vier Stunden nur die untere Grenze dar, wenn alle Pestizide extrahiert werden sollen. Wenn man die Extraktion noch eine weitere Stunde laufen läßt, werden noch keine Verunreinigungen eluiert. Es wurde sowohl die Reproduzierbarkeit dieser Methode untersucht (Tab. 1) als auch ein Vergleich mit der *Coresta**-Referenzmethode (5) durchgeführt (Tab. 2). Die Referenzmethode gehört zu dem unter 2a genannten Methodentyp. Beide Untersuchungen ergaben mit Organochlorverbindungen sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Bei den Organophosphorverbindungen erwies sich die Hexanextraktion als unwirksam. Für diese Verbindungen ist es nötig, mit Dichlormethan zu extrahieren. Da dieses Lösungsmittel weit mehr verunreinigende Verbindungen aus dem Florisil entfernt, wird eine dritte Säulenschicht zwischen dem Tabak und dem Florisil empfohlen, die aus einer Mischung aus Florisil und Aktivkohle besteht. Nach drei Stunden — der Extraktionszeit in diesem Fall — resultiert eine saubere und farblose

Lösung. Diese Lösung kann sofort in den Gaschromatographen injiziert werden; jedoch ist es angezeigt, das Dichlormethan zu entfernen und in Hexan/Äthanol (9+1) aufzunehmen, um die gaschromatographische Säule und den Detektor zu schonen.

4. ANALYSENVORSCHRIFT

4.1 Reagenzien

Die folgenden Chemikalien werden „rein“ benötigt:

Dichlormethan,

Hexan,

Florisil (60/100 mesh),

Aktivkohle (Darco G 60).

Vor der Verwendung werden alle Lösungsmittel zweimal destilliert (Rotavapor). Nach der Destillation werden sie denselben Operationen wie später mit den Tabakproben unterworfen. Die resultierenden Blindwertchromatogramme sollten keine Peaks aufweisen. Die Aktivität und Qualität des Florisils sind die wichtigsten Parameter; daher wird die Methode der Vorbehandlung im Detail angeführt: Man erhitzt Florisil über Nacht in einem Muffelofen bei 500–550 °C; hierauf läßt man es in einem geschlossenen Gefäß, jedoch ohne Trockenmittel, abkühlen. Zur Desaktivierung wird das Florisil in einen Rundkolben gegeben, der an einen Rotationsverdampfer angeschlossen wird. Unter ständiger Bewegung werden 5 Gew.-% Wasser hinzugefügt. Die Rotation wird vier Stunden beibehalten, wonach man das Produkt weitere 48 Stunden sich ausgleichen läßt. Die Desaktivierung wird durch einen Extraktionsschritt mit Dieltrin überprüft, wobei die Probelösung diejenige Konzentration aufweisen sollte, die einem Tabakextrakt von einer Tabakprobe mit 0,1 ppm Dieltrin äquivalent ist. Die Aktivität ist dann korrekt, wenn die Wiederauffindungsrate über 95 % liegt.

4.2 Probenvorbereitung

Spezielle Aufmerksamkeit muß dem Umstand zugewendet werden, daß eine repräsentative Probe gezogen wird. Die Probe sollte bis auf einen Restfeuchtigkeitsgehalt von ca. 5 % abgetrocknet werden. Zur Vermahlung sollte eine Mühle Verwendung finden, die schnell ohne nennenswerte Wärmeentwicklung ein feines Pulver produzieren kann.

4.3 Extraktion von Organochlor-Pestiziden

Für die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Verbindungen wird die Extraktion mit Hexan ausgeführt. Das Extraktionsgefäß wird wie folgt gefüllt:

5 g Florisil (untere Schicht),

5 g Florisil, vermischt mit 5 g gepulvertem Tabak (obere Schicht).

In den 250-ml-Kolben werden 100 ml Hexan eingefüllt. Das Heizelement wird so eingestellt, daß eine Destillationsgeschwindigkeit von ca. 250 ml/Stunde resultiert (Extraktionszeit: 4 Stunden). Der erhaltene Extrakt wird in einem Rotationsverdampfer auf 10 ml einge-

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

engt. Aus dieser Lösung können bei Bedarf Verdünnungen gemacht werden.

4.4 Extraktion von Organophosphor-Pestiziden

Hier muß Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet werden. Die Prozedur wurde für sieben Verbindungen, nämlich Dichlorvos, Mevinphos, Dimethoat, Diazinon, Methylparathion, Malathion und Äthylparathion, erprobt. Das Extraktionsgefäß wird wie folgt gefüllt:

4 g Florisil (untere Schicht),

4 g Florisil, vermischt mit 3 g Darco G 60 (mittlere Schicht),

4 g Florisil, vermischt mit 5 g gepulvertem Tabak (obere Schicht).

In den 250-ml-Kolben werden 100 ml Dichlormethan eingefüllt. Die Destillationsgeschwindigkeit ist die gleiche wie bei den Organochlorverbindungen, die Extraktionsdauer beträgt jedoch nur 3 Stunden. Der Extrakt wird zweimal auf 0,5 ml eingengt und quantitativ in Hexan/Äthanol (9+1) aufgenommen, um Dichlormethan zu entfernen. Das Endvolumen sollte 10 ml betragen. Bei der Extraktion beider Verbindungstypen sollte der Lösungsmittelpegel gerade über der Tabakfüllhöhe liegen. Dies wird erreicht durch Einstellen der Destillationsgeschwindigkeit über das Heizelement einerseits und Einstellen der Zirkulationsgeschwindigkeit über das Teflonventil andererseits.

4.5 Instrumentelle Analyse

Die aus der Kombination Extraktion/Reinigung resultierenden Lösungen können direkt für die GC-Analyse verwendet werden. Die Einstellparameter der Gaschromatographen müssen der entsprechenden Gerätetype und den verwendeten Detektoren optimal angepaßt werden. Die folgenden Einstellungsparameter für die gaschromatographische Analyse werden empfohlen:

für Organochlor-Pestizide

Säule:	4,5 m, Pyrexglas, innerer Durchmesser: 3 mm
Säulenfüllung:	1,5 % SP-2250 1,95 % SP-2401
Trärgas:	Argon/Methan (95+5), 40 ml/min
Ofentemperatur:	215–220 °C
Injektor-temperatur:	250 °C
Detektor:	Ni-63 ECD, 350 °C

für Organophosphor-Pestizide

Säule:	4 m, Pyrexglas, innerer Durchmesser: 3 mm
Säulenfüllung:	3 % DC-200 (12.500 cSt) auf Gas-Chrom (100/120)
Trärgas:	Stickstoff (50 ml/min)
Ofentemperatur:	195 °C

Injektor-temperatur:	200 °C
Detektor:	FPD

Die Probeneingabe wurde mit einem automatischen System durchgeführt, das einerseits sehr reproduzierbar arbeitete und andererseits den durchlaufenden Betrieb über Nacht ermöglichte. Die Kalibrierung sollte wegen der Nichtlinearität der beiden erwähnten Detektoren bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden. Die Chromatogramme wurden mit Integratoren ausgewertet, wobei entweder interne Standards (Mirex für die Organochlor- und Ronnel für die Organophosphorverbindungen) gebraucht wurden oder zwischen die Proben externe Kalibrationsläufe eingefügt wurden. Im letztgenannten Fall sollte das Integratorsystem die Fähigkeit haben, sich auf den jeweils letzten Standardlauf zu rekalisieren.

5. DISKUSSION

Da dieser kombinierte Extraktions- und Reinigungsprozeß wenig oder keine Überwachung erfordert, kann das Personal in der Zwischenzeit die nächsten Proben vorbereiten (Trocknen und Mahlen von Tabak, Einstellen der Volumina der Extrakte, usw.). Daher hängt die Gesamteffizienz zum Großteil von der Zahl der Extraktionsgefäße ab. Eine Batterie von zehn Gefäßen ist sehr leicht zu installieren und erlaubt zwanzig Extraktionen je Tag. Das ist ebenfalls die Obergrenze der GC-Kapazität, wenn für ein Chromatogramm eine Stunde benötigt wird und einige Zeit für Einstellung, Reparaturen, etc. aufgeht. Wenngleich diese Methode für eine große Anzahl von Pestiziden verwendet werden kann, wurden die experimentellen Arbeiten bis jetzt mit 18 Verbindungen des Organochlortyps durchgeführt (Abb. 2) sowie mit sieben Verbindungen des Organophosphortyps im Bereich zwischen Dichlorvos und Äthylparathion. Die natürliche Grenze dieser Methode liegt dort, wo man zur Extraktion der Rückstände sehr polare Lösungsmittel verwenden muß. In diesem Fall ist die Kontamination des Extraktes zu stark und läßt eine ordnungsgemäße Analyse im Gaschromatographen nicht zu. Es werden eine unruhige Grundlinie sowie undefinierte Peaks erhalten, und man muß mit der Gefahr rechnen, daß empfindliche Verbindungen auf der Säule katalytisch abgebaut werden. In diesem Fall müssen verfeinerte Clean-up-Methoden angewandt werden, die natürlich mehrstufig aufgebaut sind. Verbindungen, die über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Temperatur von 69 °C (Siedepunkt des Hexans) oder 40 °C (Siedepunkt des Dichlormethans) nicht aushalten, sind von dieser Analysenmethode ausgeschlossen. Die hauptsächlichen Vorteile dieser neuen Möglichkeit der Lösung von Clean-up-Problemen sind:

a. Starke Verkürzung der Analysenzeit bei dringlichen Proben sowie hohe Steigerung der Effektivität und der Arbeitsleistung eines Pestizidrückstandslabors. Da es keine Analysenschritte gibt, die speziell ausgebildetes Personal benötigen, hängt die Zahl der Analysen je Tag

nur von der Zahl der Extraktionsgefäße und der Gaschromatographen ab.

b. Ersparnis bei teuren Lösungsmitteln, wie Acetonitril, Diäthyläther und Dioxan, die für die Rückstandsanalysen in einem speziellen Reinheitsgrad gekauft werden müssen.

c. Längere Lebensdauer der gaschromatographischen Trennsäulen und bessere Auswertungsmöglichkeit für die schnellen Peaks, da der Lösungsmittelpeak bei Verwendung dieser Extraktionstypen beträchtlich schmaler wird.

English Version / Englische Fassung*

1. INTRODUCTION

To the same extent as the agricultural world becomes more familiar with the use of chemicals to control insect populations, fungi or weeds, the chemists in the laboratories struggle with the onerous duty of analyzing residues of an increasing number of different chemicals on an increasing number of samples. The residues belong to very different chemical families and have in common merely the fact of being present in tiny amounts of some micrograms on materials which present problems in clean-up steps. Various pressures are exerted on these analysts, either by the tobacco experts of their own enterprises to obtain the results as quickly as possible for a buying decision, or by the governments which formulate requirements more and more stringently and want to be able to rely on accurate analyses.

These demands led to two main directions of research in this field, which can be characterized as a theoretical one, seeking highest precision and general applicability at the price of tedious and cumbersome analysis, and a practical one which looks primarily for high efficiency and a large number of analyses to be handled daily, taking into account the fact that the method is not applicable to all classes of pesticides simultaneously.

2. COMPARISON OF METHODS

To give a review of residue analysis methods which are used today, it is not necessary to report on the special methods themselves, but it seems to be sufficient to describe the main classes of methods. All these methods have been used for many years, modified and refined, and each author has made very valuable contributions, especially the American chemists, who have had to deal with residue problems for many years. The main types of methods are:

a. Cold extraction of tobacco by shaking with aqueous acetonitrile, liquid-liquid distribution in petroleum ether for the organochlorine and in dichloromethane for the organophosphorus pesticides. Afterwards, clean-up steps with Florisil columns and elution with solvents of differing polarities (1).

b. Warm extraction of tobacco in a Soxhlet apparatus, which was found to be more efficient than mixing, shaking or refluxing. The best solvent proved to be a mixture of chloroform and methanol (9+1). The clean-up steps are similar to those just mentioned (2).

c. Cold extraction of powdered tobacco directly on the top of a Florisil column, where the tobacco powder is mixed with Florisil to improve wettability. Extraction is effectuated with 600 ml of a mixture of petroleum ether and dichloromethane. After the dichloromethane is removed the extract is used as it is with no further purification (3).

d. Mixed methods, where warm extraction and clean-up are combined into one step. These methods include the one described here and similar experiments performed by a Rhodesian team (4). According to these authors, however, their system seems to be of only limited applicability for quick, rough monitoring of a limited number of residue compounds.

3. DESCRIPTION OF THE REIF/MOSER METHOD*

During the development of this method the aim was to avoid all drawbacks of the four types of methods and to combine their advantages. Therefore, this method combines a warm Soxhlet extraction, which has proved to give the highest results, with a Florisil column clean-up step, which seems to be — up to now — the most effective means of purification. To save costs and time, we did not use large elution volumes, which have to be recovered afterwards, but combined the column purification and the Soxhlet extraction into one step (Figure 1): The solvent has to pass the powdered tobacco and the Florisil before it circulates in the Soxhlet apparatus. That part of the extraction vessel where normally the extraction thimble is placed, is altered into a chromatographic column with a sintered glass disc at the bottom and a teflon stopcock for controlling the speed of circulation. With this arrangement, it is possible to exactly imitate the function of a clean-up column with the possibility of re-using the solvent several times. This is the main difference to the method of the Rhodesian team of Toet and Toet (4), who used also a mixture of tobacco powder with a cleaning agent (silica gel), but in a normal Soxhlet vessel with siphoning. The silica gel particles surrounding a tobacco particle also serve for purification, but the tobacco extract is not able to pass through a normal column.

To avoid as many contaminating compounds in our extract as possible, we chose one of the poorer solvents for pesticide extraction — hexane — and compensated that fact with a four hours' duration of the combined extraction/purification step. During this time, about 1000 ml of solvent pass through the short column (5 g of powdered tobacco mixed with 5 g of Florisil, on top of 5 g of pure Florisil) using for calculation purposes a distillation speed of 2 to 3 drops a second. This calculation shows that the 100 ml of solvent used circu-

* German version / deutsche Fassung see/siehe p./S. 168.

* Figures and tables of the article are shown on pages 174 and 175.

late ten times. As the tobacco waxes, fats and coloured compounds by no means pass through the Florisil column when hexane is used, the recommended time of four hours is only the lower limit of getting the pesticides completely extracted. No contamination is eluted from the column if extraction is continued for another hour. The reproducibility of this method was checked (Table 1) and a comparison with the *Coresta** reference method (5), which belongs to those mentioned under 2a, was made (Table 2). Both trials gave very satisfying results with organochlorine pesticides. Concerning the organophosphorus types, the hexane extraction proved to be ineffective. For those compounds it is necessary to extract with dichloromethane. As this solvent removes far more contaminating material from the Florisil, a third layer between the tobacco and the Florisil is recommended, which consists of a mixture of Florisil and activated charcoal. After three hours, when this extraction is completed, a clean and colourless solution results. This solution can be injected into the gas chromatograph as it is, but it is recommended to remove the dichloromethane and change over to hexane/ethanol (9+1) to spare the column and the detector.

4. ANALYSIS DIRECTIONS

4.1 Reagents

The following chemicals are required "pure":
dichloromethane,
hexane,
Florisil (60/100 mesh),
decolorizing carbon (Darco G 60).

Before use, all solvents are distilled twice (Rotavapor). After distillation, the solvents are subjected to the same operations as they are subsequently with the tobacco samples without any noticeable peaks occurring on the resulting blank chromatogram. The activity and quality of the Florisil are the most important parameters. The method of pre-treatment is therefore given in detail: Heat the Florisil overnight in a muffle furnace at 500-550 °C. Allow to cool in a tightly sealed container (without desiccant). For de-activation, the Florisil is placed in a round flask, which is connected to a rotary evaporator. With constant agitation, 5 weight-% of water is added. Rotation is sustained for 4 hours, then the product is left for equilibration for another 48 hours. The de-activation is checked by an extraction step with dieldrin, the trial solution of which must have a concentration equivalent to that of an extract from tobacco containing 0.1 ppm of this pesticide. The activity is correct when the recovery of the dieldrin is greater than 95 %.

4.2 Sample Preparation

Particular attention must be paid to ensuring that a representative sample is taken. The sample should be dried to a residual moisture of about 5 %. The tobacco

should be ground by a mill which quickly produces a fine powder without producing any heat.

4.3 Extraction of Organochlorine Pesticides

Extraction is carried out using hexane for the listed compounds (Tables 1 and 2). The extraction vessel is filled as follows:

5 g Florisil (lower layer),

5 g Florisil, mixed with 5 g powdered tobacco (upper layer).

100 ml hexane is placed in the 250 ml flask. The heating element is regulated to give a distillation rate of about 250 ml/hour (extraction time: 4 hours). The extract obtained is concentrated using a rotary evaporator to a final volume of 10 ml, from which the adequate dilutions can be made.

4.4 Extraction of Organophosphorus Pesticides

Dichloromethane must be used as solvent. The procedure was proved for seven compounds, namely dichlorvos, mevinphos, dimethoate, diazinon, methyl parathion, malathion and ethyl parathion. The extraction vessel is filled as follows:

4 g Florisil (lower layer),

4 g Florisil, mixed with 3 g activated carbon (Darco G 60) (middle layer),

4 g Florisil, mixed with 5 g powdered tobacco (upper layer).

100 ml dichloromethane is placed in the 250 ml flask. Same distillation rate as with organochlorine compounds, but the extraction time is 3 hours. The extract is concentrated twice to 0.5 ml and collected quantitatively in hexane/ethanol (9+1) in order to remove dichloromethane. The final volume should be 10 ml. In both extraction cases the level of solvent should be kept just above the tobacco filling height. This is achieved by adjusting the distillation speed via the heating element and the speed of circulation via the teflon valve.

4.5 Instrumental Analysis

The solution which results from the combined extraction/clean-up step can be used directly in the GC analysis. The parameters of the chromatographs must be optimized to suit the individual makes of instruments and detectors used. The following GC conditions are recommended:

for organochlorine pesticides

column:	4.5 m, Pyrex glass, inside diameter: 3 mm
filling:	1.5 % SP-2250 { on Supelcon 1.95 % SP-2401 { AW-DMCS (100/120)
carrier gas:	argon/methane (95+5), 40 ml/min
oven temperature:	215-220 °C
injector temperature:	250 °C
detector:	Ni-63 ECD, 350 °C

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

for organophosphorus pesticides

column:	4 m, Pyrex glass, inside diameter: 3 mm
filling:	3% DC-200 (12,500 cSt) on Gas-Chrom (100/120)
carrier gas:	nitrogen (50 ml/min)
oven temperature:	195 °C
injector temperature:	200 °C
detector:	FPD

The injections were performed with the aid of an automatic sampling system, which on the one hand gives a very high reproducibility and on the other hand allows the GC to be kept running overnight. Calibration should be made at different concentrations because of the non-linearity of the two mentioned detectors. The chromatograms were evaluated with the aid of integrators, either using internal standards (Mirex for the organochlorine and Ronnel for the organophosphorus compounds) or sandwiching the samples between calibration runs. In the latter case, the integrator system ought to be capable of recalibrating itself to the last standard run in each case.

5. DISCUSSION

As this combined extraction/purification process requires little or no supervision, the personnel can prepare the next samples in the meantime, which means drying and grinding tobacco, adjusting the volume of the extracts, and so on. Therefore, the overall efficiency depends largely on the number of extraction vessels. A battery of ten is easy to install and allows twenty extractions a day. This is also the upper limit for the GC capacity, calculating one hour for one chromatogram and allowing some time for adjusting, repairing, etc. Even though this method can be used for a large number of pesticides, experimental work has been done up to now with 18 compounds of the organochlorine type (Figure 2) and 7 organophosphorus compounds, ranging from dichlorvos to ethyl parathion. The natural barrier for this one-step method is encountered when very polar solvents have to be used to extract the residues. In that case the contamination of the extract is too severe to permit of normal analysis in a GC. It produces an unsteady baseline and undefined peaks, and entails the danger that sensitive compounds are destroyed catalytically on the column. In that case, more refined clean-up methods have to be used, which, of course, are multi-stage. Compounds which do not tolerate a temperature of 69 °C (boiling point of hexane) or 40 °C (boiling point of dichloromethane) for four hours, are excluded from this analysis. The major advantages of this new approach to the clean-up problems are:

a. Great acceleration of urgent analyses and a high increase of the efficiency and the output of a pesticide laboratory. As there are no analysis steps requiring specially trained personnel, the number of analyses a day depends only on the number of extraction vessels and gas chromatographs.

b. Saving of costly solvents such as acetonitrile, diethyl ether, dioxane, which have to be purchased in a specially pure grade for residue analysis.

c. Longer life of the GC column and easier evaluation of peaks occurring early as the solvent peak is narrowed down considerably using this type of extraction.

SUMMARY

The methods currently used for the determination of pesticide residues on tobacco are compared to one another, and a new method is described which results from a combination of extraction and clean-up of the extract. For that purpose, a modified Soxhlet extractor is used which serves at the same time as clean-up column. The comparison to other methods shows clear advantages as regards saving of analysis time and consumption of solvents.

ZUSAMMENFASSUNG

Die gegenwärtig üblichen Methoden für die Analytik der Rückstände von Pestiziden auf Tabak werden miteinander verglichen, und eine neuartige Methode, die eine Kombination von Extraktion und Reinigung des Extraktes darstellt, wird beschrieben. Bei dem neuen Verfahren wird ein umgebauter Soxhlet-Extraktor verwendet, der gleichzeitig als Reinigungssäule dient. Im Vergleich zu anderen Methoden ergeben sich deutlich Vorteile hinsichtlich der Ersparnis an Analysenzeit und Lösungsmittelverbrauch.

RÉSUMÉ

On a comparé entre elles les méthodes employées couramment pour la détermination des résidus de pesticides sur le tabac, et une nouvelle méthode a été expérimentée, basée sur une combinaison d'extraction et de purification de l'extrait. À cet effet, on emploie un extracteur Soxhlet modifié, qui sert en même temps de colonne de purification. En comparant avec d'autres méthodes, celle-ci offre des avantages certains en ce qui concerne gain de temps d'analyse et consommation de solvants.

LITERATUR / REFERENCES

1. Nesemann, E., und/and F. Seehofer: Beitr. Tabakforsch. 5 (1970) 207.
2. Skrentny, R., und/and H. Dorough: Tob. Sci. XV (1971) 111.
3. Schmid, K., und/and A. Rastetter: Beitr. Tabakforsch. 5 (1970) 201.
4. Toet, L., und/and M. Toet: Beitr. Tabakforsch. 7 (1973) 93.
5. Coresta Recommended Method No. 2; Coresta Information Bulletin 1974-2, 27.

Anschrift der Autoren / Addresses of authors:

Austria Tabakwerke AG, Postfach 14, Porzellangasse 51, A-1091 Wien, Österreich.

Philip Morris Europe SA, Research and Development, P.O. Box 11, CH-2003 Neuchâtel, Switzerland.

Abbildung 1. Extraktionsgefäß. / Figure 1. Extraction vessel.

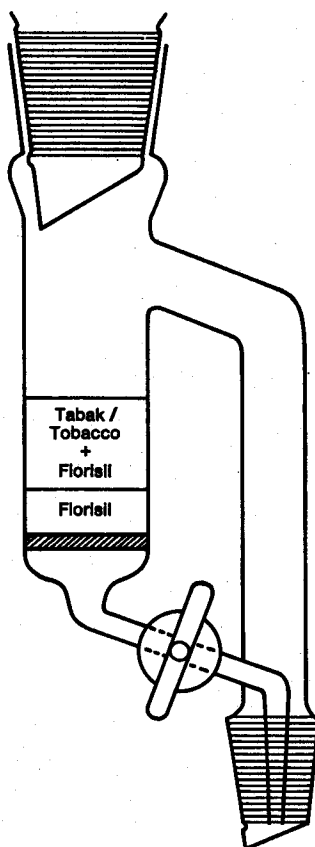


Abbildung 2. Chromatogramm der Organochlor-Pestizide. Die Nummern der Peaks entsprechen denen der Tab. 1 und 2.

Figure 2. Chromatogram of organochlorine pesticides. The numbers of the peaks correspond to those of Tables 1 and 2.

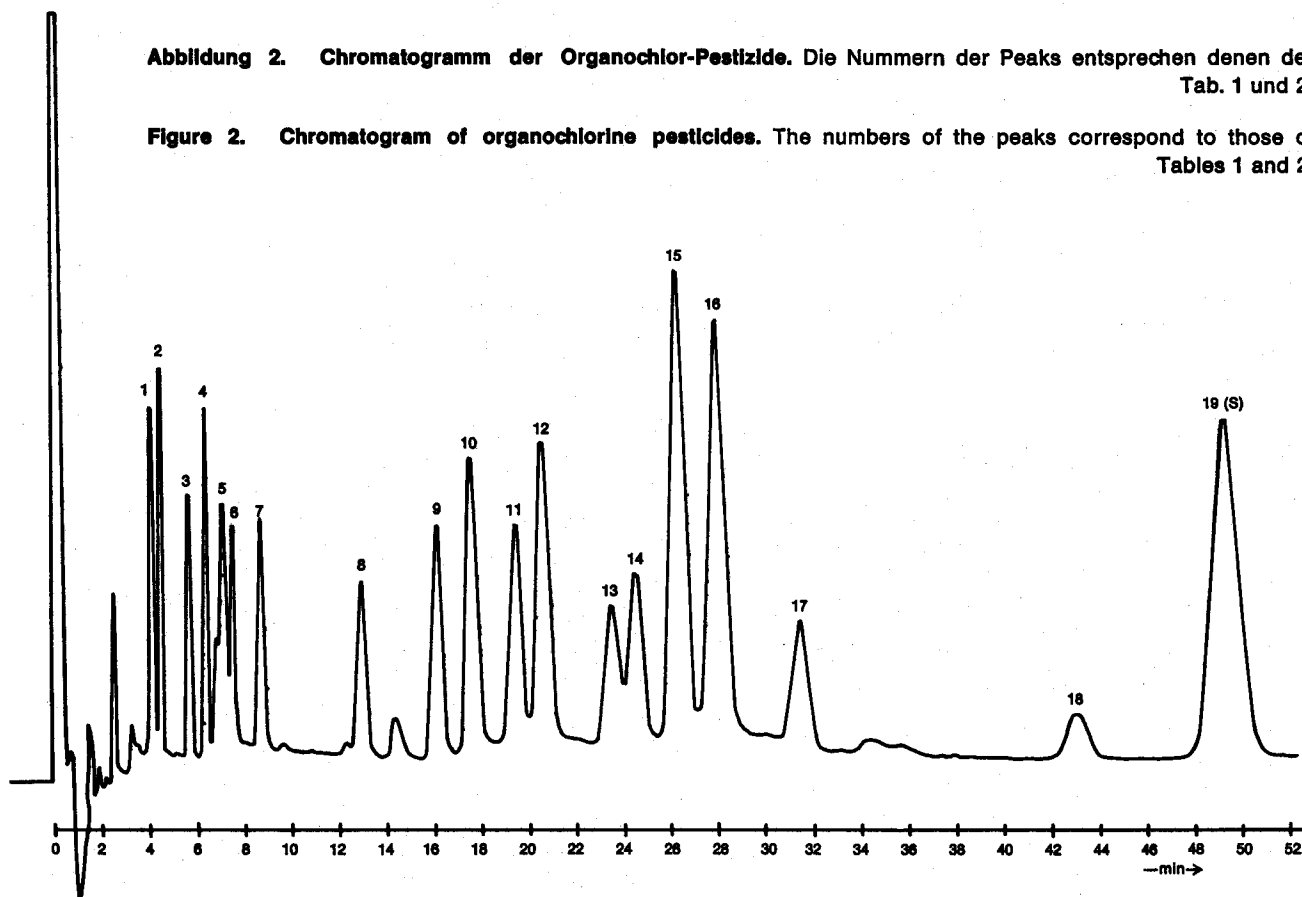


Tabelle 1. Reproduzierbarkeit der Methode Reif/Moser.

Table 1. Reproducibility of the Reif/Moser method.

Nr. No.	Pestizid Pesticide	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction
		1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)	4 (ppm)	5 (ppm)	6 (ppm)	7 (ppm)
1	HCB	n.n./n.f.*	n.n./n.f.	0.01	n.n./n.f.	n.n./n.f.	0.01	n.n./n.f.
2	α -HCH / α -BHC	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
3	γ -HCH (Lindan) / γ -BHC (lindane)	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
4	β -HCH / β -BHC	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.10	n.n./n.f.
5	Heptachlor	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
6	δ -HCH / δ -BHC	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
7	Aldrin	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
8	Heptachlorepoxyd/heptachlor epoxide	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
9	α -Endosulfan	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05
10	p,p-DDE	0.12	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.14
11	Dieldrin	0.08	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
12	o,p-TDE	0.37	0.38	0.38	0.38	0.39	0.37	0.37
13	Endrin	0.06	0.08	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07
14	o,p-DDT	0.18	0.23	0.22	0.21	0.21	0.21	0.20
15	p,p-TDE	1.83	1.85	1.98	1.92	1.96	1.85	1.72
16	β -Endosulfan	0.21	0.23	0.23	0.21	0.21	0.21	0.21
17	p,p-DDT	0.81	1.02	0.83	0.90	0.81	0.86	1.03
18	Endosulfansulfat/endosulfan sulfate	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.

Der Versuch wurde mit einer Tabakprobe durchgeführt.
The experiment was performed with one tobacco sample.

* n.n./n.f. = nicht nachgewiesen / not found.

Tabelle 2. Vergleich der Methode Reif/Moser mit der Coresta-Referenzmethode.

Table 2. Comparison of the Reif/Moser method with the Coresta reference method.

Nr. No.	Pestizid Pesticide	Tabakprobe / Tobacco sample I				Tabakprobe / Tobacco sample II			
		Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction	Extraktion Extraction
		1 (ppm)	2 (ppm)	1 (ppm)	2 (ppm)	1 (ppm)	2 (ppm)	1 (ppm)	2 (ppm)
1	HCB	n.n./n.f.*	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
2	α -HCH / α -BHC	0.12	0.11	0.12	0.12	0.67	0.66	0.80	0.70
3	γ -HCH (Lindan) / γ -BHC (lindane)	0.19	0.17	0.18	0.18	0.25	0.25	0.30	0.25
4	β -HCH / β -BHC	0.23	0.20	0.06	0.07	1.36	1.34	1.82	1.62
5	Heptachlor	0.03	0.01	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
6	δ -HCH / δ -BHC	0.03	0.03	0.04	0.04	0.21	0.22	0.30	0.26
7	Aldrin	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
8	Heptachlorepoxyd/heptachlor epoxide	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
9	α -Endosulfan	0.03	0.03	0.02	0.03	1.47	1.47	1.71	1.50
10	p,p-DDE	0.15	0.15	0.18	0.16	0.22	0.27	0.25	0.22
11	Dieldrin	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
12	o,p-TDE	0.05	0.04	0.06	0.05	0.10	0.09	0.12	0.10
13	Endrin	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.	n.n./n.f.
14	o,p-DDT	0.39	0.37	0.48	0.47	0.66	0.67	0.86	0.78
15	p,p-TDE	0.47	0.38	0.41	0.43	0.85	0.83	0.56	0.57
16	β -Endosulfan	0.20	0.18	0.10	0.14	5.15	4.25	4.45	3.47
17	p,p-DDT	2.77	2.65	3.31	3.34	5.22	5.21	6.88	6.15
18	Endosulfansulfat/endosulfan sulfate	0.29	0.25	0.34	0.42	1.74	1.78	2.39	2.04
		Coresta reference method		Reif/Moser method		Coresta reference method		Reif/Moser method	

* n.n./n.f. = nicht nachgewiesen / not found.