

Note

Methode zur Reinigung und quantitativen Bestimmung von Dicofolrückständen auf pflanzlichen Erntegütern

J. PFLUGMACHER und W. EBING

Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D 1 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 13. Januar 1975)

Dicofol [2,2,2-Trichlor-1,1-bis-(4-chlorphenyl)-äthanol] ist ein Akarizid, also ein Mittel zur Bekämpfung von Spinnmilben, welches in der B.R.D. bei Fruchtgemüse und Obst angewendet wird.

Schon geraume Zeit wurden Versuche unternommen, Dicofolbestimmungsmethoden zu entwickeln. Gunther und Blinn¹ nahmen eine alkalische Hydrolyse des Dicofols vor, wobei *p,p'*-Dichlorbenzophenon und Chloroform als Reaktionsprodukte entstehen. Anschliessend bestimmten sie das *p,p'*-Dichlorbenzophenon oder dessen 2,4-Dinitrophenylhydrazon durch Messung der UV-Absorption. Die unterste Nachweisgrenze betrug nur 10 µg. Rosenthal *et al.*² sowie eine Reihe anderer Autoren bestimmten nach alkalischer Hydrolyse das daraus entstehende Chloroform durch Farbkomplexbildung mit Pyridin-Wasser-Natriumhydroxid (Fujiwara-Reaktion) kolorimetrisch. Die Methoden sind arbeitsaufwendig, mässig sensitiv und werden durch andere Organochlorinsektizide, besonders aus der DDT-Gruppe, sowie von bereits geringen Mengen an Coextraktstoffen gestört. Eine AOAC-Gemeinschaftsuntersuchung (Eiduson³) mit einer solchen Methode im 5 ppm-Bereich (die einen Verteilungsreinigungsschritt verwendete) ergab unbefriedigende Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Dem Mangel der Störung durch Coextraktstoffe begegnete Gunderson⁴, indem er der —leicht modifizierten— oben geschilderten Bestimmung ein wirksames clean-up an Florisil vorschaltete. Die Störmöglichkeit gegenüber verschiedenen Organochlorinsektiziden —besonders im Bereich von 1 ppm— ist aber auch hier gegeben.

In ähnlicher Weise wie die kolorimetrische wird die polarographische Bestimmung (Gajan *et al.*⁵) gestört. Ott *et al.*⁶ versuchten diese Schwierigkeit durch vorgeschaltete Dünnschichtchromatographie zu beheben. Mit Rohextrakten wurde diese Methode aber nicht ausprobiert.

Mit der Entstehung der Gaschromatographie erhoffte man sich damit viel bessere Resultate bei der Rückstandsanalyse des Dicofols. Jedoch liess es sich nicht unzersetzt chromatographieren. Nach Morgan⁷ und Westlake *et al.*⁸ entstehen zwischen 15–85% *p,p'*-Dichlorbenzophenon. Kürzlich fasste Ives⁹ die inzwischen mit widersprüchlichen Ergebnissen aufwartende und zum Teil mit Irrtümern belastete, diesbezügliche Literatur zusammen. Je nach Bedingungen und Milieu kann etwas oder gar kein Dicofol neben *p,p'*-Dichlorbenzophenon gemessen werden. Chromato-

gramme von Ives aus eigenen Untersuchungen beweisen erneut, dass Dicofol nicht quantitativ in *p,p'*-Dichlorbenzophenon umgewandelt wird, selbst nicht nach Füllung des Injektors mit Glaswolle. Trotzdem ist in der Literatur von Rückstandsbestimmungen auf gaschromatographischem Wege mit und ohne modifiziertem Injektor berichtet worden (z.B. Brown *et al.*¹⁰, Morgan¹¹).

Unsere zahlreichen Versuche, solche Rückstandsuntersuchungen erfolgreich nachzuarbeiten, schlugen fehl. Weder gelang es uns, die von Ives⁹ einmal erhaltene, fast unzersetzte Gaschromatographie des Wirkstoffes zu wiederholen, noch führte die genaue Überprüfung der Dicofolumwandlung in *p,p'*-Dichlorbenzophenon jemals zu dem Ergebnis einer reproduzierbar quantitativen Ausbeute. Sie ist vielmehr nicht nur von den kleinen Veränderungen während des Alterns eines Trennsystems, sondern besonders auch vom Extraktmilieu deutlich abhängig. Aus diesen Gründen suchten wir nach neuen Wegen zu einer sicher reproduzierbaren Dicofolbestimmungsmethode, deren Reinigungsschritte möglichst einfach und für einen schnellen Routinebetrieb geeignet sein sollten.

Bei der Suche nach einem geeigneten clean-up-Verfahren machten wir uns die Beständigkeit des Dicofols gegen konzentrierte Schwefelsäure zunutze (vgl. Gordon und Schuckert¹²). Als Methode zur Abtrennung und Bestimmung des Dicofols verwendeten wir die Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die in den letzten Jahren erfolgte Entwicklung von Säulenfüllmaterialien mit Partikelgrößen von 5–10 μ gestattet es nunmehr, Probenvolumina von 100 μ l und mehr aufzugeben, ohne nennenswerte Einbussen in der Trennleistung zu erleiden, wie Arbeiten von Eisenbeiss und Sieper¹³ bzw. Karger *et al.*¹⁴ gezeigt haben. Dadurch kann die im Vergleich mit gaschromatographischen Detektoren etwas niedrigere Empfindlichkeit des an den Säulenausgang angeschlossenen UV-Detektors teilweise ausgeglichen werden, so dass Konzentrationen im Sub-ppm-Bereich, wie sie für die Rückstandsanalyse relevant sind, gemessen werden können.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Aufreinigung von sieben pflanzlichen Erntegütern mit Hilfe von konzentrierter Schwefelsäure und die anschließende Bestimmung der Dicofolrückstände durch Messung der UV-Absorption nach vorheriger flüssigkeitschromatographischer Trennung.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien und Geräte

Zur Extrakterstellung bzw. Reinigung wurden Aceton, *n*-Hexan und konzentrierte Schwefelsäure (alle p.A. Fa. E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) benutzt. Das verwendete Dicofol wies einen Schmelzpunkt von $F = 78.5-79.5^\circ$ auf und hatte nach Angaben des Herstellers (Pestanal-Standard, Riedel de Haen, Seelze bei Hannover, B.R.D.) einen Reinheitsgrad von $\geq 99\%$.

Die folgenden Geräte wurden verwendet: Chromatronix Modell 3520 Flüssigkeitschromatograph, Hewlett-Packard Modell 1032 A UV-Detektor (Küvettengröße 8 μ l, Wellenlänge 254 nm) und Metrawatt Servogor Kompensationsschreiber.

Extrakterstellung

Für Zusatzversuche wird der in Aceton gelöste Wirkstoff (10–50 μ g je nach Substrat) auf 100 g des zerkleinerten Probenmaterials gegeben. Nach einer Wartezeit

von 60 min werden 200 ml Aceton hinzugefügt und die Probe 3 min am Ultra-Turrax homogenisiert. Der Kopf des Mixers wird mit je 25 ml Aceton zweimal abgespült. Das Homogenisat wird mit 5 g Celite 545 vermischt, über eine Filternutsche abgesaugt und mit 50 ml Aceton nachgespült.

Nach Ablesen des Gesamtvolumens werden zwei Fünftel davon am Rotationsverdampfer bis auf ein Volumen von 1–2 ml eingengt. Nach Zugabe von 150 ml Wasser und 10 ml gesättigter Kochsalzlösung wird dreimal mit je 50 ml *n*-Hexan ausgeschüttelt.

Die Hexanphasen werden gesammelt, mit wasserfreiem Na_2SO_4 30 min lang getrocknet und dann über ein Rundfilter abfiltriert, wobei zweimal mit 10 ml Hexan nachgespült wird. Der Hexanextrakt wird im Kuderna–Danish-Kolben am Rotationsverdampfer eingengt, in einen 2 ml-Messkolben übergespült und bis zur Marke aufgefüllt.

Reinigung des Rohextraktes

1 ml des Extraktes, entsprechend einem Probenanteil von 20 g Erntegut, wird mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure und 8 ml *n*-Hexan 30 sec geschüttelt und mehrere Stunden stengelassen. Nach Abtrennung der H_2SO_4 -Phase wird der gereinigte Extrakt durch Überblasen von Stickstoff auf ein Volumen von 0.5 ml eingengt, mit *n*-Hexan in ein 1 ml-Messkölbchen übergespült und dann auf 1 ml aufgefüllt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung

Die Bestimmung der Dicofolrückstände in den gereinigten Extrakten erfolgt mit einem Flüssigkeitschromatographen unter folgenden Bedingungen: Säule, Micro-Pak Si-10 der Fa. Varian (Palo Alto, Calif., U.S.A.); Abmessungen, 50 cm lang \times 2.1 mm I.D.; mobile Phase, *n*-Hexan; Durchflussrate, 48 ml/h; Säuleneingangsdruck, 34 atm; Probenaufgabevolumen, 100 μl ; Retentionszeit, 13.7 min; Wellenlänge der UV-Messung, 254 nm.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Peakflächen, die nach der Methode Höhe \times Halbwertbreite ermittelt werden. Hierfür sind Lösungen des Dicofolstandards in *n*-Hexan mit Konzentrationen zwischen 10–50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gemäss der Vorschrift für die Reinigung der Rohextrakte zu behandeln.

Tabelle I enthält die unter den beschriebenen Bedingungen erzielten Ergebnisse. Die Wiederfindensraten stellen Mittelwerte dar, die aus je sechs Einzelbestimmungen errechnet wurden. In Klammern ist der von den Einzelwerten überdeckte jeweilige Streubereich angegeben. Die Rückstandkonzentration des Dicofols auf den einzelnen Substraten wurden so gewählt, dass sie jeweils etwa 1/5 der in der deutschen Höchstmengenverordnung festgelegten Toleranz betrug.

Die Fig. 1 zeigt das Flüssigkeitschromatogramm eines gereinigten Extraktes von 20 g Mohrrüben, der 0.1 ppm Dicofol enthielt. Störungen durch interferierende Peaks anderer Chlorkohlenwasserstoffe, die gegen konzentriertes H_2SO_4 stabil sind, wie DDT, DDD, Aldrin, α -Chlordan, sind kaum zu erwarten, weil diese Stoffe infolge geringer Polarität erheblich kürzere Retentionszeiten aufweisen.

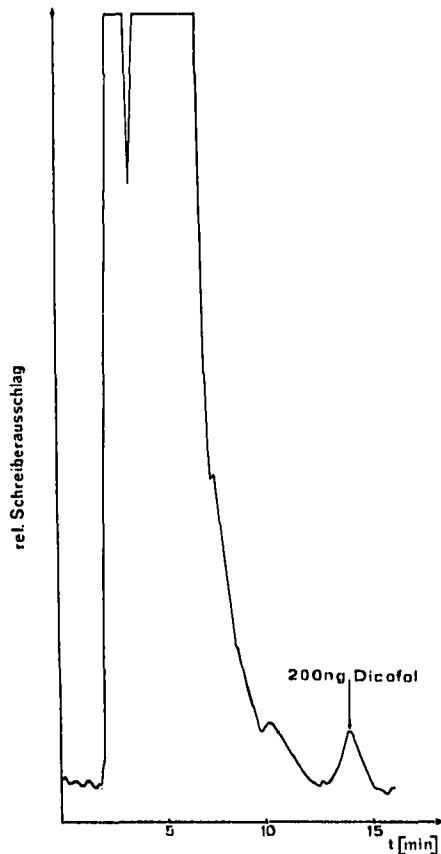


Fig. 1. Mohrrübenextrakt mit 0.1 ppm Dicofol. Mobile Phase, *n*-Hexan; Durchflussrate, 0.8 ml/min; Wellenlänge, 254 nm; Detektorempfindlichkeit, 0.02 O.D. Einheiten; Schreiberempfindlichkeit, 10 mV.

TABELLE I

DICOFOL-WIEDERFINDENS-RATEN BEI VERSCHIEDENEN SUBSTRATEN

Probenmaterial	Anzahl der untersuchten Proben	Wirkstoffzusatz (ppm)	Mittelwert	Näherungsstandardabweichung (%)	Näherungsvertrauensbereich*
Zitrone	6	0.5	81.5 (79.1-82.9)	± 1.3	± 1.4
Grüne Gurke	6	0.1	83.8 (79.2-86.3)	± 2.6	± 2.8
Erdbeeren	6	0.1	98.3 (96.6-104.3)	± 3.1	± 3.3
Mohrrüben	6	0.1	80.6 (77.6-84.1)	± 2.9	± 3.0
Grüner Salat	6	0.1	99.3 (96.6-104.3)	± 2.3	± 2.4
Grüne Bohnen	6	0.1	77.5 (74.7-82.2)	± 2.6	± 4.8
Tomaten	6	0.1	81.9 (79.8-84.4)	± 1.7	± 1.8

* Stat. Sicherheit. $P = 95\%$.

p,p'-Dichlorbenzophenon wird durch die Schwefelsäurebehandlung zersetzt. Für eine gesonderte Bestimmung etwaiger Anteile dieses Abbauproduktes im Erntegut muss nach der von den Autoren a.a.O.¹⁵ beschriebenen gelchromatographischen Methode verfahren werden.

Die UV-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden, weil kein Spektralphotometer zur Verfügung stand, bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Aus dem UV-Spektrum des Dicofols, welches sich z.B. bei Gore *et al.*¹⁶ findet, ist erkennbar, dass sich eine zehn- bis zwanzigfache Steigerung der Empfindlichkeit erreichen lässt, wenn die Messung der UV-Absorption bei einer kürzeren Wellenlänge, etwa im Bereich von 230 nm vorgenommen wird.

DANK

Wir danken Frau I. Grabowski und Frau M. Schmölder für die unermüdliche technische Mitarbeit bei den zahlreichen Versuchen zur Nacharbeit anderer Methoden und Ausarbeitung der beschriebenen Methode. Diese Arbeit wurde als Teil des Gemeinschaftsforschungsprogrammes "Automatisierung von Untersuchungsverfahren über Vorkommen und Wirkungen von Umweltchemikalien und Bioziden" vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert. Für die materielle Unterstützung danken wir dem Ministerium ebenfalls.

LITERATUR

- 1 F. A. Gunther und R. C. Blinn, *J. Agr. Food Chem.*, 5 (1957) 517.
- 2 I. Rosenthal, G. J. Friscone und F. A. Gunther, *J. Agr. Food Chem.*, 5 (1957) 514.
- 3 H. P. Eiduson, *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, 44 (1961) 183.
- 4 E. L. Gunderson, *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, 46 (1963) 186.
- 5 R. J. Gajan und J. Link, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 47 (1964) 1119.
- 6 D. E. Ott, F. E. Hearsh und F. A. Gunther, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1 (1966) 181.
- 7 N. L. Morgan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2 (1967) 306.
- 8 W. E. Westlake, R. T. Murphy und F. A. Gunther, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1 (1966) 29.
- 9 N. F. Ives, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 1335.
- 10 J. R. Brown, H. Hughes und J. Viriyandha, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 15 (1969) 30.
- 11 N. C. Morgan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 3 (1968) 254.
- 12 C. F. Gordon und R. J. Schuckert, in G. Zweig (Editor), *Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulators and Food Additives*, Vol. II, Academic Press, New York, 1964, S. 264.
- 13 F. Eisenbeiss und H. Sieper, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 439.
- 14 B. Karger, M. Martin und G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1640.
- 15 J. Pflugmacher und W. Ebing, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 457.
- 16 R. C. Gore, R. W. Hannah, S. C. Pattacini und T. J. Porro, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 1040.