

CHROM. 10,022

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES GEHALTES AN POLYCYCLISCHEN AROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN IN MAIS MIT HILFE DER KAPILLARGASCHROMATOGRAPHIE

EKHARD WINKLER, ALFRED BUCHELE und OTTO MÜLLER

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 55, 7000 Stuttgart 80 (B.R.D.)

(Eingegangen am 11. Februar 1977)

SUMMARY

Method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in maize by capillary-column gas-liquid chromatography

A complete method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) with three to seven rings in wet and directly dried maize is described. After several clean-up steps, the PAH are determined qualitatively and quantitatively by gas-liquid chromatography using glass capillary columns with injection by the splitless mode. The grinded maize is extracted in a Soxhlet apparatus with acetone and the extract is then hydrolyzed. The polar impurities are removed by filtration over silica gel. After a second clean-up step, a chromatographic separation on Sephadex LH-20-chloroform, the PAH are separated in two groups on Sephadex LH 20-methanol. The glass capillary column (50 m; SE-54), which is used in routine analysis, allows a minimal detectable amount of 0.25 ng for benzo[a]pyrene.

EINLEITUNG

Einige der hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen entstehenden polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) zeigen im Tierversuch carcinogene Wirkung. Aus diesem Grunde wird von vielen Seiten die Entstehung und Verbreitung der PAH analytisch verfolgt, um einen Überblick über Emissionsquellen und die davon herrührenden Ablagerungen zu erhalten.

So tritt bei der direkten Trocknung von Körnerfrüchten mit einem Rauchgas-Luft-Gemisch aus einem Heizöl-Brenner eine Kontamination des Trocknungsgutes mit verschiedenen Pyrolyseprodukten, unter anderen PAH, auf. Darüber wurde schon in früheren Arbeiten berichtet¹⁻⁴. In einigen der dort analysierten Proben, meist Weizen, aber auch Gerste, Roggen und Hafer, die aus industriellen Trockneranlagen stammten, konnte eine deutliche Zunahme des PAH-Gehaltes durch die direkte Trocknung festgestellt werden. Oft beschränkte sich die Analyse jedoch auf das besonders stark carcinogene Benzo[a]pyren.

Die vorliegende Arbeit ist nun Teil eines Versuchsprogrammes, mit dessen Hilfe festgestellt werden soll, in welchem Masse Körnerfrüchte bei einer direkten Trocknung mit dem Rauchgas-Luft-Gemisch einer mit Heizöl EL betriebenen Versuchs-Trocknungsanlage mit anorganischen Schadstoffen und verschiedenen PAH kontaminiert werden. Dabei werden die Trocknungsbedingungen, wie Brennereinstellung, Luftmenge, Zeit und Temperaturen genau kontrolliert und variiert.

Über die technischen Einzelheiten des Versuchsaufbaues sowie über Analysen des Rauchgas-Luft-Gemisches und des Trocknungsgutes auf anorganische Spurenelemente, NO_x und SO_2 bzw. NO_2^- und NO_3^- wurde aus diesem Arbeitskreis schon an anderer Stelle berichtet⁵.

Die Untersuchungen wurden zunächst auf die Trocknung von Futtermais konzentriert. Im folgenden wird deshalb ein Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an PAH in Maiskörnern beschrieben.

Das Analysenverfahren gliedert sich in folgende Schritte: Extraktion der zerkleinerten Maiskörner. Verseifung des Extraktes zur Entfernung von Fetten, Ölen und Wachsen. Filtration über Silicagel definierter Aktivitätsstufe zur Entfernung polarer Begleitstoffe. Chromatographie an Sephadex LH-20-Chloroform zur Abtrennung restlicher Verunreinigungen von der geschlossen eluierenden PAH-Gruppe. Auftrennung der PAH in zwei Gruppen an Sephadex LH-20-Methanol. Dieses System weist selbst bei hohen Elutionsgeschwindigkeiten sehr gute Trenneigenschaften auf. Qualitative und quantitative Bestimmung der PAH durch Gaschromatographie an einer 50-m-Glaskapillarsäule SE-54, die neben ausgezeichneten Trenneigenschaften (Anzahl der theoretischen Trennstufen 221 000) eine hohe Haltbarkeitsdauer besitzt, sodass sie für den routinemässigen Einsatz geeignet ist. Die jetzt im Betrieb befindliche Säule wird seit einem Jahr im Dauereinsatz für PAH-Analysen bis 250° betrieben, ohne Trennleistungsverluste zu zeigen. Ihre Vorgängerin, eine 50-m-Säule belegt mit OV-101, hatte eine Lebensdauer von 1.5 Jahren.

Folgende PAH werden bestimmt: Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren, Benz[*a*]anthracen, Chrysen, Benzo[*e*]pyren, Benzo[*a*]pyren, Perylen, Dibenz[*a,h*]anthracen, Benzo[*g,h,i*]perylen, Anthanthren, Coronen. Als innere Standardsubstanzen, die in den Analysenproben nicht vorkommen, dienen 3,6-Dimethylphenanthren, 1-Methylpyren und Picen (Benzo[*a*]chrysen).

Die Nachweisgrenze der gaschromatographischen Bestimmung liegt bei 0.1 ng für Phenanthren, 0.25 ng für Benzo[*a*]pyren und 0.4 ng für Picen.

EXPERIMENTELLES

Geräte und Materialien

Gaschromatograph: Carlo Erba 2300 AC mit linearem Temperaturprogramm und Doppelsplitter mit Septumspülung zur splitlosen Injektion auf Kapillarsäulen (Erba Science, Lorsch/Taunus, B.R.D.). Glaskapillarsäule: 50 m × 0.38 mm, SE-54 (Jaeggi, Trogen, Schweiz). Integrator: Modell 3370 B, Hewlett-Packard (Böblingen, Wttbg, B.R.D.). Schreiber: Hewlett-Packard Modell 7123 A. Fraktionensammler: Golden Retriever (ISCO) (Vertrieb: Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Wttbg, B.R.D.). Absorptionsmonitor: UA 5 (ISCO). Pumpen: ISCO Modell 312 (ProMinent) (Chemie und Filter GmbH, Heidelberg, B.R.D.). Chromatographiesäulen: Quickfit Laborglas GmbH (Wiesbaden, B.R.D.); Fertigsäulen-Ausrüstung (Merck, Darm-

stadt, B.R.D.). Soxhlet-Extraktor: Bühler (Tübingen, Wttbg, B.R.D.). Lösungsmittel: Aceton, chem. rein (handelsübliche EG-Ware); Cyclohexan (Nanograde), *n*-Hexan (Nanograde), Chloroform (Nanograde), Methanol (CP) jeweils von Byk-Mallinckrodt (ehemalig), jetzt Promochem (Wesel, B.R.D.). Die Lösungsmittel wurden jeweils über Kolonnen destilliert. Gele: Sephadex LH-20 (Deutsche Pharmacia, Freiburg i. Br., B.R.D.); Silicagel Woelm für die Adsorption Akt. I (ICN, Eschwege, B.R.D.).

Extraktion und Verseifung

Es werden 400 g Mais zerkleinert (Starmix), in eine Extraktionshülse aus Glas (300 mm × 55 mm I.D., mit Glasfiltereinsatz P 2) gefüllt und in einem 1000-ml-Soxhlet-Extraktor (Bühler) mit 2-l-Kolben, der mit 1.5 l Aceton gefüllt ist, unter Rühren 16 h (über Nacht) extrahiert.

Nach Abkühlung des Extraktes werden als innere Standards je 1 µg 3,6-Dimethylphenanthren, 1-Methylpyren und Picen aus genau eingewogenen Testlösungen (6–7 mg in 500 ml Cyclohexan) zugegeben. Anschliessend wird das Aceton am Rotationsverdampfer (Badtemperatur 30–35°) abgezogen. Dabei bleibt das aus der Probe mitextrahierte Wasser zurück, aus dem die öligen und wachsartigen Bestandteile des Extraktes zum Teil in fester Form ausfallen.

Durch Zugabe von 500 ml 2 N methanolischer KOH werden diese wieder in Lösung gebracht und durch einstündiges Sieden am Rückfluss verseift.

Die abgekühlte Lösung wird mit 150 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 250 ml *n*-Hexan im Schütteltrichter extrahiert. Die *n*-Hexan-Phase wird zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat abfiltriert (Büchnertrichter mit Glasfilterplatte). Das *n*-Hexan wird am Rotationsverdampfer (Badtemperatur 30–35°) bis auf wenige Tropfen abgezogen und der Rest aus dem offenen Kolben abdampfen gelassen.

Auf diese Weise werden auch sämtliche nachfolgenden Einengungen durchgeführt, um Verluste weitgehend zu vermeiden. Der Rückstand wird in 2–3 ml Cyclohexan aufgenommen.

Filtration über Silicagel

Silicagel (7 g) (Woelm, Akt. I) wird über Nacht im Trockenschrank bei 120° getrocknet, im Exsiccator abgekühlt, dann mit 10% Wasser versetzt (0.7 ml), klumpenfrei geschüttelt und 2–3 h stehengelassen. Danach werden ca. 30 ml Cyclohexan zugegeben, die Aufschlammung in eine Chromatographiesäule (250 × 10 mm, mit Glasfiltereinsatz und PTFE-Ventil) unter Durchlauf eingefüllt und anschliessend mit 100–150 ml Cyclohexan gespült.

Nach Aufgabe der Probe wird zweimal mit je 2 ml Cyclohexan nachgespült, dann mit demselben Lösungsmittel eluiert. In der Fraktion von 20–120 ml sind die PAH von Phenanthren bis Coronen enthalten.

Vom gelbgefärbten Eluat wird das Cyclohexan abgezogen und der Rückstand in 2 ml Chloroform aufgenommen.

Trennung an Sephadex LH-20-Chloroform

Sephadex LH 20 (50 g) wird in Chloroform einige Stunden quellen gelassen. Da die Dichte des Gels jedoch geringer ist als die des Chloroforms, ist das Packen des Gelbettes etwas erschwert. Einfacher ist es, die Gelsuspension mit soviel Cyclohexan

zu versetzen, dass das Gel darin absinkt⁶. Dazu werden etwa 30 Vol% Cyclohexan zugesetzt, wobei das Gel eine (reversible) Kontraktion erfährt. Die Chromatographiesäule (1000 × 15 mm, Gelbetthöhe 930 mm) kann dann in der üblichen Weise gepackt werden. Nach der Fixierung des Gelbettes mit dem verstellbaren Kolben am oberen Ende der Säule wird sie mit mindestens 200 ml Chloroform durchgespült, um das zugesetzte Cyclohexan zu entfernen.

Über einen Dreiweghahn (Fertigsäulen-Chromatographie-Ausrüstung) wird nun die Probe aufgegeben, zweimal mit je 2 ml Chloroform nachgespült und unter Druck eluiert (Pumpe ProMinent). Zur Pulsationsdämpfung zwischen Pumpe und Säule dienen *ca.* 1-m-Stahlkapillarrohr als Strömungswiderstand und die verschlossene Probenaufgabespritze als Kapazität. Das Eluat (Durchflussgeschwindigkeit 65 ml/h) wird von einem Fraktionensammler in 5-ml-Fraktionen aufgenommen und mit einem UV-Monitor durch Absorption bei 254 nm registriert (siehe Fig. 1). Die Gruppe der PAH eluiert zwischen 70 und 100 ml. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, das Chloroform abgezogen und der Rückstand in 2 ml Methanol (gegebenenfalls unter leichtem Erwärmen) aufgenommen.

Vortrennung an Sephadex LH-20-Methanol

Sephadex LH-20 (20 g) wird einige Stunden in Methanol quellen gelassen. Mit der Gelsuspension wird anschliessend eine Chromatographiesäule (400 × 25 mm, Gelbetthöhe 155 mm) gepackt, das Gelbett mit den verstellbaren Kolben in seiner Lage fixiert und mit Methanol durchgespült.

Die Probenaufgabe erfolgt wie beim vorhergehenden Schritt beschrieben. Um die an sich schon geringe Pulsation der Elutionspumpe vollends zu glätten, wird zwischen Pumpe und Säule ein verschlossenes, zur Hälfte mit Methanol gefülltes Kühlmantelgefäss (Volumen *ca.* 50 ml) mit bis fast auf den Boden reichenden Ein- und Auslaufrohren geschaltet. Gefäss und Säule können gegebenenfalls thermostatiert werden (20°).

Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 100 ml/h, das Fraktionsvolumen 5 ml, Registrierung bei 254 nm.

Wegen der deutlichen Basislinienauftrennung zwischen Chrysen und Benzo[*a*]pyren (siehe Fig. 2, Peak 3 und 4) werden als Fraktion I die PAH von Phenanthren bis Chrysen abgenommen, die von 80 bis 130 ml eluieren, als Fraktion II Benzo[*a*]pyren bis Coronen mit Elutionsvolumina von 134 bis 255 ml.

Die vereinigten Fraktionen werden im Falle der Gruppe I mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und dem doppelten Volumen *n*-Hexan extrahiert (Methanol-Wasser-*n*-Hexan, 1:1:2), wogegen die Gruppe II wegen ihres grösseren Volumens zuerst am Rotationsverdampfer auf *ca.* 1/3 ihres Ausgangsvolumens eingeeengt wird, bevor sie in derselben Weise wie Gruppe I extrahiert wird. Dadurch werden Verluste an PAH vermieden, die bei vollständigem Abziehen des Methanols aufträten.

Gaschromatographische Bestimmung

Von den Fraktionen I und II wird das *n*-Hexan abgezogen, wobei wiederum sorgfältig darauf zu achten ist, dass beim Einengen noch 1–2 Tropfen *n*-Hexan im Kolben zurückbleiben, um Verluste zu vermeiden. Nach dem offenen Abdampfen des Hexan-Restes wird die Probe in Cyclohexan aufgenommen, dessen Menge sich nach der Konzentration der PAH in der zu bestimmenden Probe richtet. Bei den hier auf-

tretenden geringen Konzentrationen wird die Fraktion I in 0.5 ml, die Fraktion II in 0.2 ml aufgenommen. Diese Mengen können gegebenenfalls noch halbiert werden, sollten aber wegen der Menge der in der Probe noch enthaltenen Begleitsubstanzen nicht wesentlich weiter unterschritten werden.

Um die Säulenbelegung weitgehendst zu schonen, wurde Cyclohexan als Lösungsmittel gewählt. Trotz seiner geringen Polarität besitzt es für die hier ausreichenden maximalen Konzentrationen an PAH ein genügendes Lösungsvermögen (Konzentrationen im Testgemisch um $2 \mu\text{g/ml}$ je Komponente).

Der Gaschromatograph ist mit einem Doppelsplitter mit Septumspülung für die splitlose Injektion auf Kapillarsäulen nach Grob und Grob⁷ und Grob und Jaeggi⁸ ausgestattet. Als Trennsäule dient eine Glaskapillarsäule ($50 \text{ m} \times 0.38 \text{ mm}$) mit der Belegung SE-54.

Zur Erhaltung eines Chromatogramms von Testsubstanzen wurde folgendermaßen verfahren: Von einer Lösung der Substanzen in Cyclohexan mit Konzentrationen von $1.6\text{--}2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ wurden $1.6 \mu\text{l}$ ($2.5\text{--}3.2 \text{ ng}$ pro Substanz) bei geschlossenem Splitter auf die kalte Säule gespritzt. Bei Erscheinen des Lösungsmittelpeaks wurde der Splitter geöffnet und das Temperaturprogramm gestartet (letzteres geschieht automatisch). Ebenso wurde mit den Fraktionen I und II verfahren. Die Daten sind im Einzelnen Fig. 3 und 4 zu entnehmen.

Die Identifikation der einzelnen Substanzen erfolgt durch Vergleich der relativen Retentionszeiten bezüglich der zugesetzten inneren Standards mit der entsprechenden Reinsubstanz.

Die quantitative Auswertung wird durch den Vergleich der Peakflächen mit denen genau eingewogener Originalsubstanzen vorgenommen. Die Verlustfaktoren können durch die eingesetzten inneren Standards bestimmt werden.

Retentionszeiten und Peakflächen werden von einem elektronischen Integrator erfasst.

DISKUSSION UND ERGEBNISSE

Extraktion

Grimmer und Hildebrandt² sowie Rohrlich und Suckow⁴ berichteten von einer quantitativ ausreichenden Extraktion der PAH aus Weizen, Roggen und Gerste in unvermahlenem Zustand. Rohrlich stellte durch Schälen des Korns fest, dass sich bei Weizen etwa 60% des Gehaltes an Benzo[a]pyren auf der Schale befinden, während durch ein Entspelzen des sehr fettreichen Hafers nur 35–40% des Gesamtgehaltes an Benzo[a]pyren entfernt werden konnten. Das fettlösliche Benzo[a]pyren muss also offensichtlich von den fettreicheren Haferkernen in grösserer Masse als vom fettärmeren Weizenkorninnern absorbiert worden sein.

Ein ähnliches Verhalten konnte beim Mais beobachtet werden. Vergleichende Versuche ergaben, dass durch die Vermahlung der Körner etwa die doppelte bis dreifache Menge an PAH gegenüber dem ganzen Korn extrahiert werden konnte.

Für die Extraktion wurde aus einer Reihe untersuchter Lösungsmittel Aceton ausgewählt, da es auf Grund seiner polaren Eigenschaften ein gutes Lösungsvermögen für PAH aufweist. Chloroform zeigt zwar ähnlich gute Lösungseigenschaften, ist aber, abgesehen vom höheren Preis und der leichteren Zersetzlichkeit, wegen seines fehlenden Mischungsvermögens mit Wasser für die Extraktion der feuchteren Mais-

proben weniger geeignet. Die meist angewandte Methode der diskontinuierlichen Extraktion (mehrmaliges Kochen am Rückfluss und Absaugen über eine Glasfritte) zeigte erst nach mindestens fünf Schritten quantitativ befriedigende Ablösung. Ähnliche Ausbeuten wurden mit verseifenden Extraktionen (methanolische KOH) nach Grimmer *et al.*⁹ erzielt, wobei jedoch eine sehr hohe Menge an Begleitstoffen herausgelöst wurde.

Als besonders günstig erwies sich die 16stündige Behandlung (über Nacht) in einem Soxhlet-Extraktor mit Aceton, da hiermit bei geringerer Arbeitszeit- und Lösungsmittelaufwand gleich hohe Ausbeuten an PAH erhalten wurden.

Aufarbeitung des Extraktes

Das durch Abziehen des Lösungsmittels nach der Extraktion erhaltene Konzentrat enthält beträchtliche Mengen öliker und wachsartiger Bestandteile, die jedoch nach der anschliessenden Verseifung in 2 *N* methanolischer KOH in der alkalischen, wässrig-methanolischen Phase zurückbleiben, wogegen die PAH daraus mit *n*-Hexan vollständig extrahiert werden können. Aus dem von der *n*-Hexan-Phase verbleibenden Extrakt werden nun die polaren, gelb bis rotbraun gefärbten Bestandteile durch eine Filtration über Silicagel⁹ entfernt. Um eine gute Reproduzierbarkeit der Elutionsvolumina der PAH zu erhalten, muss die Aktivitätsstufe des Silicagels genau eingestellt werden. Die Stufe II (10% Wassergehalt) erwies sich hier als am besten geeignet.

Weniger polare, ebenfalls gelb gefärbte Substanzen werden von der Silicagel-Säule jedoch zusammen mit den PAH eluiert.

Während bei einem Extrakt aus unvermahlenem Mais ihre Menge so gering ist, dass sofort die anschliessende Gruppentrennung durchgeführt werden kann, bei der der grösste Teil dieser Begleitstoffe die Trennsäule vor den PAH verlässt, muss bei Extrakten aus vermahlenem Mais ein zusätzlicher Reinigungsschritt, die chromatographische Trennung am System Sephadex LH-20-Chloroform, durchgeführt werden.

Das Verhalten von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen an hydroxipropyliertem Sephadex-Dextrangel (Sephadex LH-20) und anderen Gelen ähnlicher Art mit protischen Elutionsmitteln ist ausführlich untersucht worden^{6,10-13}.

Die PAH-Grundkörper zeigen bei dieser Trennung kein gelchromatographisches, sondern ein adsorptionschromatographisches Verhalten, das durch energetische Wechselwirkungen zwischen der Gelmatrix und den PAH zustandekommt, das heisst sie eluieren in der Reihenfolge zunehmender Ringgrösse.

Dagegen wurde mit Chloroform als Elutionsmittel eine normale Molekularsiebtrennung mit allerdings sehr geringem Trenneffekt beobachtet⁶. Dies bedeutet, dass die Gruppe der PAH praktisch nicht in ihre Komponenten aufgetrennt wird.

Es zeigte sich jedoch, dass die im Silicagelsäuleneluat zusammen mit den PAH befindlichen gelben Bestandteile sehr gut von den PAH abgetrennt werden. Auch eine Gruppe farbloser, unter UV-Licht von 360 nm schwach hellblau fluoreszierender Substanzen eluiert vor den PAH (Fig. 1), sodass diese als geschlossene Gruppe mit einem nur noch sehr geringen Anteil an Verunreinigungen erhalten werden.

Vortrennung in Gruppen

Da die niederkondensierten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in wesentlich höheren Konzentrationen als die hochkondensierten vorkommen, ist

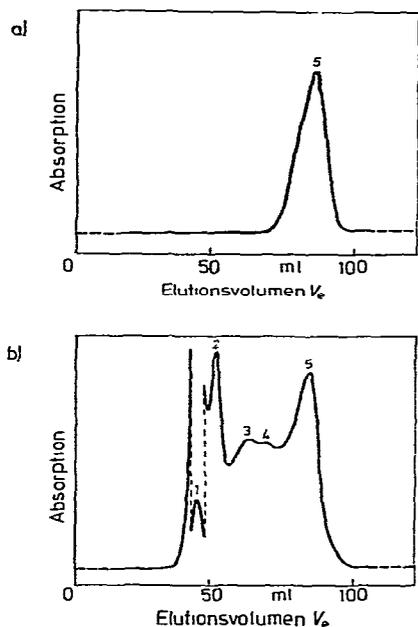


Fig. 1. (a) Trennung eines Gemisches von PAH (wie Fig. 2) an einer Sephadex LH-20-Säule in Chloroform (Säule 1000 × 15 mm; 50 g Sephadex LH-20, Gelbetthöhe 930 mm). Absorption bei 254 nm. (b) Trennung eines Mais-Extraktes an derselben Säule. 1, 2 = Gelb gefärbte Zone; 3, 4 = schwach hellblau fluoreszierende Zone (360 nm); 5 = PAH.

die Auftrennung des PAH-Gemisches in zwei Gruppen notwendig. Hierzu eignet sich das System Sephadex LH-20-Alkohol, in dem, wie schon erwähnt, die PAH ein adsorptionschromatographisches Elutionsverhalten zeigen. Als Alkohol wurde Methanol gewählt, weil festgestellt werden konnte, dass es gegenüber dem meist für diesen Zweck verwendeten 2-Propanol^{9,10} bei annähernd gleichem Druck die fünffache Elutionsgeschwindigkeit ohne Verlust an Trennleistung der Säule zulässt. Die etwas höheren Elutionsvolumina der PAH in Methanol gegenüber 2-Propanol¹² werden dadurch zeitlich weit überkompensiert (Fig. 2).

Bei der verwendeten Säule (25 mm I.D., Gelbetthöhe 155 mm) wurde, bezogen auf Phenanthren, bei 20° und einer Elutionsgeschwindigkeit von 100 ml/h eine theoretische Bodenzahl von 6700 m^{-1} erreicht (vergleiche hierzu Oelert¹⁰).

Kapillargaschromatographie

Für die Trennung komplexer Substanzgemische bietet eine Glaskapillarsäule eine Reihe von Vorteilen: Ihre hohe Trennleistung ermöglicht eine Analyse in relativ kurzer Zeit bei vollständiger Trennung der zu untersuchenden Isomerenpaare und hoher Nachweisempfindlichkeit durch sehr schmale Peaks. Gegenüber Stahlkapillarsäulen hat sie den Vorteil eines chemisch inerten Säulenmaterials. Die hier verwendete Glaskapillarsäule besitzt dazu selbst beim routinemässigen Einsatz mit hochsiedenden Gemischen eine Lebensdauer von 1–2 Jahren¹⁴ (die erste 50-m-Säule, Belegung OV 101, war 1.5 Jahre im Gebrauch). Die für die beschriebenen Analysen verwendete Säule (50 m × 0.38 mm, Belegung SE-54) ist in Trennleistung und Adsorptionsver-

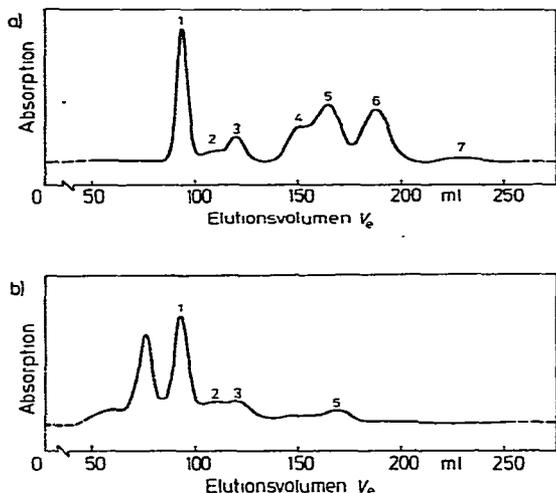


Fig. 2. (a) Trennung eines Gemisches von PAH an einer Sephadex LH-20-Säule in Methanol (Säule 400×25 mm; 20 g Sephadex LH-20, Gelbetthöhe 155 mm). Absorption bei 254 nm. 1 = Phenanthren, Anthracen, 3,6-Dimethylphenanthren; 2 = Fluoranthren, Pyren, 1-Methylpyren; 3 = Benzo[*a*]anthracen, Chrysen; 4 = Benzo[*a*]pyren, Perylen; 5 = Perylen, Dibenz[*a,h*]anthracen; 6 = Benzo[*g,h,i*]perylene, Anthanthren; 7 = Coronen. (b) Trennung eines Mais-Extraktes an derselben Säule.

mögen gegenüber den PAH noch vorteilhafter als die zuvor eingesetzte OV-101. Auch sie ist jetzt schon 1 Jahr in routinemässigem Einsatz, ohne einen Verlust an Trennleistung zu zeigen. Sie wird in einem Gaschromatographen betrieben, der mit einem Doppelsplitter mit Septumspülung zur splitlosen Injection auf Kapillarsäulen (nach Grob und Grob⁷ und Grob und Jaeggi⁸) ausgestattet ist. Bei dieser Einspritztechnik wird auf die kalte Säule injiziert und die Ofenheizung erst bei Erscheinen des Lösungsmittelpeaks eingeschaltet. Die dadurch erreichte Aufkonzentration der Substanzbanden gestattet Einspritzungen von mehreren Mikrolitern Lösung direkt auf die Säule (zur Bedeutung des Lösungsmittels bei dieser Einspritztechnik siehe Grob und Grob¹⁵). Damit entfallen bei dieser Methode die Unsicherheiten, die bei der Stromteilung von Gemischen und Substanzen stark unterschiedlicher Dampfdrücke auftreten und eine genaue quantitative Auswertung in Frage stellen⁸.

Da der in diesem Gaschromatographen eingesetzte Flammenionisationsdetektor sehr empfindlich ist, kann die Substanzbelastung der Säule niedrig gehalten werden.

Die Trennqualität ist aus den Fig. 3 und 4 zu ersehen. Bei der ersten Substanzgruppe (Phenanthren bis Chrysen) konnte bei den kritischen Paaren Phenanthren–Anthracen sowie Benz[*a*]anthracen–Chrysen eine Basislinienauftrennung erzielt werden. In der Gruppe Benzo[*a*]pyren bis Coronen werden die Isomeren Benzo[*e*]pyren–Benzo[*a*]pyren und Picen–Benzo[*g,h,i*]perylene vollständig aufgetrennt (Benzo[*e*]pyren stand als Reinsubstanz nicht zur Verfügung, konnte in den Analysen jedoch anhand vorhandener Retentionsdaten⁹ identifiziert werden). Auch eine Auftrennung isomerer Benzofluoranthene konnte beobachtet werden; nähere Untersuchungen waren allerdings bisher aus Mangel an Reinsubstanzen nicht möglich.

Erwähnenswert sind die vergleichsweise kurzen Retentionszeiten der höher-

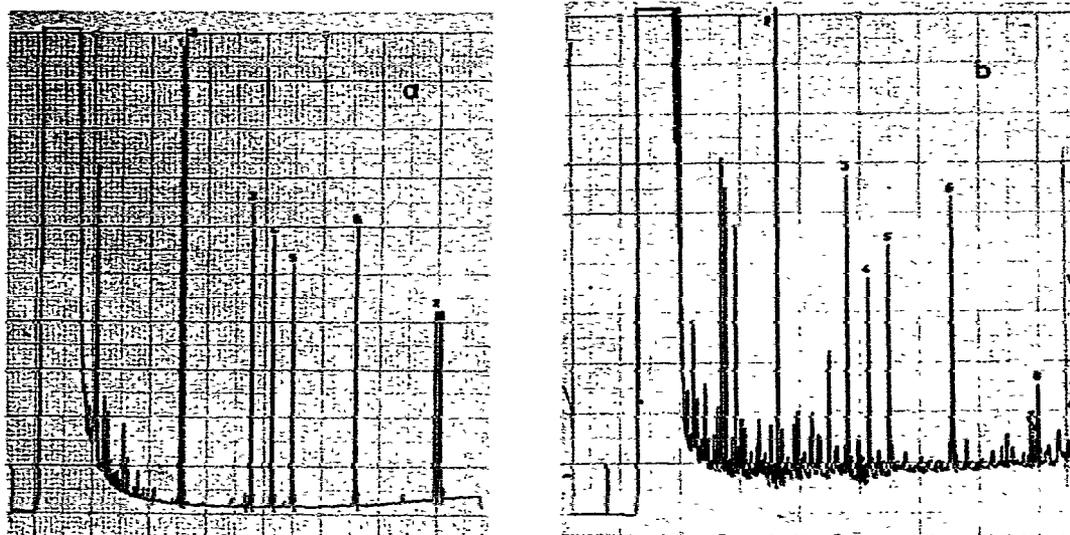


Fig. 3. Gaschromatogramme unter gleichen Bedingungen. Lösungsmittel: Cyclohexan; Einspritzmenge: 1.6 μ l; Säule: SE-54, 50 m \times 0.38 mm; Direkteinspritzung bei 40°; Temperaturprogramm: 180°, 3 min; 180° bis 250° mit 2.5°/min; Injektor- und Detektortemperatur: 250°; Trägergas: H₂, 4 ml/min; Detektor: FID, 1 \times 16. (a) PAH-Reinsubstanzengemisch, 2.5–3.2 ng pro Substanz. 1 = Phenanthren; 2 = Anthracen; 3 = 3,6-Dimethylphenanthren; 4 = Fluoranthren; 5 = Pyren; 6 = 1-Methylpyren; 7 = Benz[a]anthracen; 8 = Chrysen. Retentionszeit Chrysen: ca. 29 min. (b) Fraktion I der Sphadex LH-20-Methanol-Säule einer Maisanalyse in 0.5 ml Cyclohexan.

kondensierten Aromaten. Mit einer Retentionszeit von ca. 1.5 h für Coronen ergibt sich gegenüber vergleichbaren gepackten Säulen eine beträchtliche Reduzierung der Analysendauer. Wie im Chromatogramm der Substanzgruppe II zu erkennen ist, wäre eine Auftrennung der einzelnen PAH auch mit einer kürzeren Säule dieses Typs in ausreichender Qualität zu erhalten. Die damit verbundenen geringeren Retentionszeiten stellen für Routineanalysen eine entscheidende weitere Zeitersparnis dar.

Ergebnisse

Die Nachweisgrenze der gaschromatographischen Bestimmung liegt bei 0.1 ng für Phenanthren, 0.25 ng für Benzo[a]pyren und 0.4 ng für Picen in der eingespritzten Menge (1.6 μ l). Damit ergeben sich in den Proben bei 0.25 bzw. 0.1 ml Probenvolumen Nachweisgrenzen von 15 bis 25 ng.

Die Trennzahl (nach Kaiser¹⁶) der verwendeten SE-54-Säule ($l = 50$ m, $d = 0.38$ mm) beträgt $n_{sep} = 46$ bzw. $n_{sep}/l = 0.92$ m⁻¹ für n -Nonan und n -Decan. Daraus errechnet sich die Anzahl der theoretischen Trennstufen auf $n = 221$ 000 bzw. $n/l = 4420$ m⁻¹, die HETP beträgt 0.226 mm. Die Totzeit, bestimmt an den n -Alkanen Nonan, Decan, Undecan, beträgt 100 sec. Daraus errechnet sich das Kapazitätsverhältnis (k) für Decan: $k = t_r/t_d = 8.27$ (t_r = Nettoretentionszeit, t_d = Totzeit). Die Belastbarkeit (B) für n -Decan beträgt somit:

$$B = 0.05 \cdot M \cdot d^3 \cdot (1 + k) \cdot 10^{-6} \text{ g (nach Kaiser}^{16}\text{)}$$

$$= 3.61 \cdot 10^{-6} \text{ g.}$$

(M = Molmasse n -Decan, d = innerer Durchmesser der Kapillarsäule).

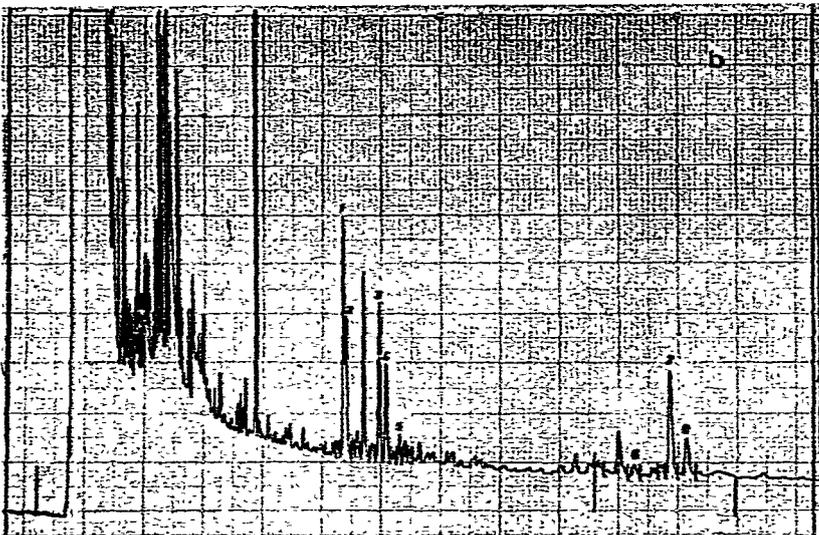
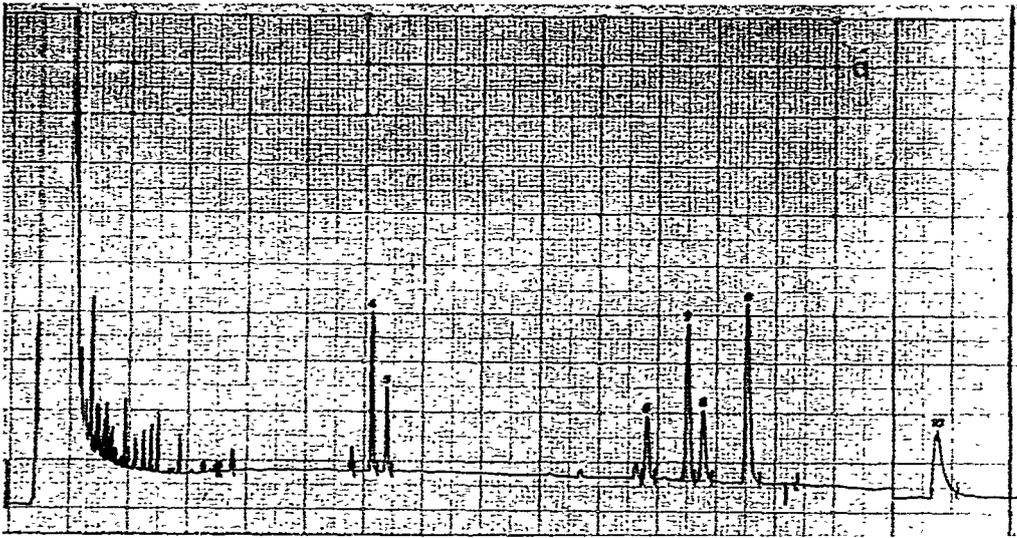


Fig. 4. Gaschromatogramme isothermer Analysen bei 250°, sonstige Bedingungen wie Fig. 3. (a) PAH-Reinsubstanzengemisch, 2,5–8,7 ng pro Substanz. 4 = Benzo[*a*]pyren; 5 = Perylen; 6 = Dibenz[*a,h*]anthracen; 7 = Picen; 8 = Benzo[*g,h,i*]perylen; 9 = Anthanthren; 10 = Coronen. Retentionszeit Anthanthren: *ca.* 46 min, Coronen: *ca.* 93 min. (b) Fraktion II der Sephadex LH-20-Methanol-Säule einer Mais-Analyse in 0,2 ml Cyclohexan. 1, 2 = Benzofluoranthene; 3 = Benzo[*e*]pyren, sonst wie (a).

Die Standardabweichung der relativen Retentionszeit bezüglich des jeweiligen inneren Standards beträgt im Mittel 0,1%. Unterstützt durch den Vergleich der Profile ist damit eine sichere Identifikation der einzelnen PAH gewährleistet. Die Standardabweichung der Peakflächen bei fünfzehn wiederholt aus den Testlösungen neu angesetzten Gemischen der drei Standardsubstanzen beträgt im Mittel 4,3%.

Zur Ermittlung des PAH-Gehaltes der Maisproben wurden zweimal 400 g Mais hintereinander in derselben Lösung im Soxhlet extrahiert und der Extrakt nach der Verseifung getrennt. (Eine Trennung des Aceton-Extraktes selbst ist wegen der ausgefallenen festen Bestandteile, die eventuell PAH adsorbieren oder einschliessen, nicht möglich.) Die weitere Aufarbeitung erfolgt als Doppelbestimmung, um den Streubereich des Aufbereitungs- und Endbestimmungsverfahrens zu erfassen.

Dabei betragen in zehn Analysen die durchschnittlichen Abweichungen zwischen beiden Bestimmungen 2,6% bei Phenanthren, 9% bei Pyren, 12% bei Benzo[e]pyren und 19% bei Benzo[g,h,i]perylen. Bei der Diskussion dieser Werte ist zu berücksichtigen, dass die Absolutwerte, vor allem der höherkondensierten PAH, sehr niedrig liegen (Tabelle I). Der mittlere Gehalt von Benzo[g,h,i]perylen z.B. lag bei 0.1 μg in den analysierten Proben von 400 g Mais.

Die Mittelwerte der Ausbeuten von 20 Bestimmungen lagen, gemessen an den inneren Standards, bei 80% für 3,6-Dimethylphenanthren, 78% für 1-Methylpyren und 87% für Picen. Dabei diente die Ausbeute an 3,6-Dimethylphenanthren für die Bestimmung des Verlustfaktors für Phenanthren und Anthracen, 1-Methylpyren für Fluoranthren bis Chrysen und Picen für Benzo[e]pyren bis Coronen (Reihenfolge der Substanzen nach Fig. 3 und 4).

Analyseergebnisse

Im Verlauf der Maisernte 1975 wurden Trocknungsversuche mit verschiedenen Brennereinstellungen durchgeführt. Die genauen Versuchsdaten wurden veröffentlicht⁵.

Analysiert wurden Proben ungetrockneter Maiskörner sowie getrockneter aus der untersten, mittleren und obersten Schicht eines Satztrockners. Die Trocknungszeit betrug jeweils 6 h, die Temperatur der Trocknungsluft um 80°. Im unverdünnten Rauchgas wurde die Russzahl (RZ) nach DIN 51 402 (Bacharach-Test) gemessen und mit Werten von 1 bis 9 Versuche durchgeführt. Dabei wurde aus dem Rauchgas-Luft-Gemisch der mit Heizöl EL betriebenen Anlage isokinetisch ein Teilstrom entnommen und durch eine Auffang-Apparatur für PAH geleitet, wie sie von Grimmer *et al.*¹⁷ für den Europa-Abgastest für Kraftfahrzeuge entwickelt wurde. Die Probenaufbereitung erfolgte ebenfalls ähnlich dem dort beschriebenen Verfahren, die Endbestimmung der PAH kapillargaschromatographisch wie bei den eben beschriebenen Mais-Analysen. Bei diesen Untersuchungen konnte von den Russzahlen 1 bis 7 nur eine geringe, bei RZ 9 erst eine deutliche Zunahme des PAH-Gehaltes festgestellt werden. Über die Ergebnisse dieser und anderer Versuchsreihen wird zu einem späteren Zeitpunkt an anderer Stelle berichtet werden¹⁸.

Als Beispiele für die Gehalte an PAH in ungetrocknetem und getrocknetem Mais sind die Werte von drei Trocknungsversuchen mit den Russzahlen 3, 5 und 7 aufgeführt (Tabelle I). In dieser Tabelle sind nur die tatsächlich gefundenen PAH angegeben. Anthanthren und Coronen lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Eine gleichbleibende, deutliche Abhängigkeit der PAH-Gehalte von der Schichthöhe im Trockner konnte nicht festgestellt werden. Bei den meisten PAH wurde eine Zunahme des Gehaltes in den unteren Schichten mit steigender Russzahl beobachtet, wobei jedoch die Werte der niedrigsiedenden PAH gegenüber den Nassproben nur geringe Veränderungen erfuhren.

Weiterhin sind in Tabelle I die Ergebnisse der Analysen einer aus einer in-

dustriellen Direkttrocknungsanlage stammenden Probe (I) sowie einer Probe, die der untersten Schicht des Trocknungswagens eines anderen landwirtschaftlichen Betriebes entnommen wurde (II) mit den jeweiligen Werten für das ungetrocknete Gut aufgeführt. Beim Vergleich der letztgenannten Werte zeigt sich zwischen den Proben I und II ein deutlicher Unterschied in den Ausgangsgehalten des feuchten Maises an PAH. Trotzdem ist jeweils eine eindeutige Zunahme der Werte mit der Trocknung festzustellen. Während Probe I in der Grössenordnung der in der Versuchsanlage gefundenen Werte bleibt, treten in Probe II bei einer Zunahme der Gehalte um die Faktoren 3 (Benzo[*a*]pyren) bis 8 (Phenanthren, Pyren) deutlich höhere Mengen an PAH auf. Die Trocknungsbedingungen (Zeit, Temperatur, Brenneinstellung) waren hier jedoch nicht genau kontrolliert worden.

Beim Vergleich der PAH-Gehalte des in der Versuchsanlage getrockneten Maises mit Werten, die in der Literatur für Untersuchungen von industriell direktgetrocknetem Brotgetreide (Weizen, Gerste, Hafer) veröffentlicht wurden¹⁻⁴ fällt auf, dass die hier gefundenen Werte meist niedriger liegen. Weitere Analysen industriell getrockneter Proben sowie Untersuchungen mit anderen Getreidesorten, verschiedenen Brennertypen und Trocknungsbedingungen sollen daher zeigen, inwieweit die bisherigen Beobachtungen für die Praxis ausgewertet werden können.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieses Forschungsvorhabens, das innerhalb des Sonderforschungsbereiches 140 der Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart 70, durchgeführt wird. Unser Dank gilt auch Fräulein Hildenbrand, die uns mit der Durchführung der Analysen tatkräftig unterstützte. Die trocknungstechnischen Untersuchungen wurden am Institut für Agrartechnik der Universität Hohenheim unter Leitung von Dipl.-Ing. Hutt durchgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein vollständiges Analysenverfahren mit mehreren Probenaufbereitungsschritten und der anschliessenden qualitativen und quantitativen Bestimmung der in feuchtem und direktgetrocknetem Mais enthaltenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) mit drei bis sieben Ringen durch Gaschromatographie an einer Glaskapillarsäule mit splitloser Injektion beschrieben. Dazu werden die zerkleinerten Maiskörner in einem Soxhlet-Extraktor mit Aceton behandelt, der Extrakt verseift und die polaren Bestandteile durch Filtration über Silicagel entfernt. Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch Chromatographie an Sephadex LH-20-Chloroform erfolgt die Vortrennung der PAH in zwei Gruppen an Sephadex LH-20-Methanol. Die Erfassungsgrenze mit der im Routinebetrieb eingesetzten 50-m-Glaskapillarsäule (Belegung SE-54) liegt bei 0.25 ng für Benzo[*a*]pyren.

LITERATUR

- 1 H. Bolling, *Mühle*, 101 (1964) 759.
- 2 G. Grimmer und A. Hildebrandt, *Z. Krebsforsch.*, 67 (1965) 272.
- 3 S. W. Souci, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 64 (1968) 235.
- 4 M. Röhrlich und P. Suckow, *Getreide Mehl*, 20 (1970) 90.

- 5 W. Hutt und W. Oelschläger, *Grundl. Landtechnik*, 26 (1976) 134.
- 6 M. Wilk, J. Rochlitz und H. Bende, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 414.
- 7 K. Grob und G. Grob, *Chromatographia*, 5 (1972) 1.
- 8 K. Grob und H. J. Jaeggi, *Chromatographia*, 5 (1972) 11.
- 9 G. Grimmer, A. Hildebrandt und H. Böhnke, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 71 (1975) 93.
- 10 H. H. Oelert, *Z. Anal. Chem.*, 244 (1969) 91.
- 11 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 219.
- 12 H.-J. Klimisch und D. Reese, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 266.
- 13 H.-J. Klimisch und D. Ambrosius, *J. Chromatogr.*, 94 (1974) 311.
- 14 K. Grob, *Chromatographia*, 8 (1975) 423.
- 15 K. Grob und K. Grob, Jr., *J. Chromatogr.*, 94 (1974) 53.
- 16 R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. I-IV, Bibliographisches Institut, Mannheim, 2. und 3. Aufl., 1969-1975.
- 17 G. Grimmer, A. Hildebrandt und H. Böhnke, *Erdöl Kohle*, 25 (1972) 442.
- 18 W. Hutt und E. Winkler, *Grundl. Landtechnik*, in Vorbereitung.