

CHROM. 10,369

## EINE METHODE ZUR EINHEITLICHEN REINIGUNG UND BESTIMMUNG VON CHLORKOHLLENWASSERSTOFFINSEKTIZIDRÜCKSTÄNDEN IN VERSCHIEDENEN GETREIDEARTEN

G. WOLFF und W. EBING

*Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D-1000 Berlin (B.R.D.)*

(Eingegangen am 10. Juni 1977)

---

### SUMMARY

*Method for the uniform clean-up and determination of organochlorine insecticide residues in several cereals*

Gel filtration on Sephadex LH-20 in ethanol was shown to be a suitable method for the clean-up of aldrin, hexachlorobenzene,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane at a residue level of 0.01 mg/kg, and *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT at a residue level of 0.02 mg/kg from barley, maize, rice, rye and wheat. This clean-up procedure includes a step involving sulphuric acid treatment. Insecticide recoveries were checked simultaneously by gas chromatography using a  $^{63}\text{Ni}$  electron-capture detector. The recovery of the insecticides ranged from 73 to 99%. The method described may be applicable to the routine determination of the above organochlorine insecticides in these cereals.

---

### EINLEITUNG

Die bisher für die Bestimmung der Konzentrationen von Chlorkohlenwasserstoffinsektizidrückständen in Getreidearten entwickelten Methoden lassen sich u.a. nach ihren jeweils speziellen Anwendungsmöglichkeiten gliedern: (a) die Bestimmung eines Insektizids<sup>1-5</sup> oder (b) mehrerer Insektizide<sup>6-9</sup> auf einer Getreideart bzw. (c) die Bestimmung mehrerer Insektizide auf verschiedenen Getreidearten<sup>10-12</sup>.

Bei den Methoden unter (a) ist eine Arbeit hervorzuheben, mit der Hexachlorbenzol auf Weizen noch bei einer Konzentration von nur 0.01 mg/kg nachgewiesen werden kann<sup>1</sup>. Die übrigen Arbeiten liegen mit ihrer unteren Nachweisgrenze für Hexachlorbenzol auf Weizen<sup>2</sup> bei 0.04 mg/kg, für Methoxychlor auf Roggen<sup>3</sup> bei 0.05 mg/kg, für Lindan auf Reis<sup>4</sup> bei 0.2 mg/kg und auf Weizen<sup>5</sup> bei 0.3 mg/kg.

Auch unter den Bestimmungsmethoden in der Gruppe (b) befindet sich eine Publikation, in der von einer besonders niedrigen Nachweisempfindlichkeit berichtet wird<sup>6</sup>. Danach können Chlorkohlenwasserstoffinsektizide auf Weizen in einer Konzentration von 0.005 mg/kg gemessen werden. Ebenfalls auf Weizen lassen sich nach einer anderen Methode Hexachlorcyclohexanisomere und DDT<sup>7</sup> in einer Konzentra-

tion von 0.01–0.05 mg/kg sowie Hexachlorcyclohexanisomere, DDT und DDE auf Mais in einer Konzentration von weniger als 0.01–0.05 mg/kg nachweisen<sup>6</sup>. Nach einer weiteren Methode können z.B. Lindan, *p,p'*-DDE und *p,p'*-DDT auf Gerste<sup>8</sup> in einem Konzentrationsbereich von 0.2–0.5 mg/kg bzw. neun verschiedene Chlorkohlenwasserstoffinsektizide auf Weizen<sup>9</sup> im Bereich von 0.5–1.0 mg/kg bestimmt werden.

Die Gruppe (c) betrifft Veröffentlichungen, bei denen zwar schon mehrere Wirkstoffe nebeneinander in verschiedenen Getreidearten bestimmt wurden, jedoch mit heute nicht mehr ausreichender Nachweisempfindlichkeit. Nach einem dieser Verfahren mit breiterer Anwendung können einige Chlorkohlenwasserstoffinsektizide auf Gerste, Reis und Weizen im Bereich von 0.1–2 µg/kg erfasst werden<sup>10</sup>. Aus Experimenten zur Ermittlung der Reinigungswirkung des Gels Sephadex LH-20 wurde eine Methode abgeleitet, mit der Chlorkohlenwasserstoffinsektizide auf Gerste, Mais und Weizen im Bereich von 0.1–1.0 mg/kg bestimmt werden können<sup>11</sup>. Nach einer anderen Methode gelingt es, allerdings nicht ohne Störpeaks, verschiedene Chlorkohlenwasserstoffinsektizide auf Gerste, Hafer, Mais, Reis und Weizen im Konzentrationsbereich von 0.1–0.25 mg/kg nachzuweisen<sup>12</sup>.

Bei der Entwicklung der vorliegenden Arbeit wurde von vornherein angestrebt, einerseits den Anwendungsbereich der Methode so umfassend wie möglich zu gestalten und andererseits die Größenordnung der Nachweisempfindlichkeit für die Chlorkohlenwasserstoffinsektizide mit den Werten in der deutschen Höchstmengenverordnung abzustimmen. Bezüglich des gelchromatographischen Abschnitts ist die Methode unter Ausnutzung des ausgeprägten Selbstreinigungsvermögens des verwendeten Gels für ein weitgehend automatisierbares clean-up Verfahren geeignet.

Mit der Methode können die Rückstände der Chlorkohlenwasserstoffinsektizide Aldrin, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -HCH in den Getreidearten Gerste, Mais, Reis, Roggen und Weizen nach einem einheitlichen Aufarbeitsverfahren gereinigt und anschliessend mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) (Elektroneneinfangdetektor) gleichzeitig und quantitativ bestimmt werden. Die vergleichsweise hohe Nachweisempfindlichkeit dieser Methode für jedes der aufgeführten Chlorkohlenwasserstoffinsektizide liegt für Aldrin, HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -HCH bzw. für *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT und *p,p'*-DDT bei einer Insektizidkonzentration von 0.01 bzw. 0.02 mg/kg Getreide.

Für den Reinigungsschritt im dem Verfahren wurde das gelchromatographische System Sephadex LH-20 in Äthanol verwendet und im Anschluss daran zur Nachreinigung der insektizidhaltigen Getreideextrakte eine Celite-Schwefelsäure-Behandlung durchgeführt<sup>13</sup>. Im Unterschied zu den bisherigen Verfahren ist die hier beschriebene Methode neben ihrer hohen Empfindlichkeit durch die kontinuierliche Arbeitsweise bei der Gelchromatographie und durch die wenigen Nebenarbeiten während der eigentlichen Analyse sowohl im Materialverbrauch als auch im Zeitaufwand kostensparend.

## EXPERIMENTELLES

### Materialien

*n*-Hexan, zur Rückstandsanalyse (Merck, Darmstadt, B.R.D.); Äthanol, absolut, unvergällt; Petroläther, Siedebereich 30–60° (Merck); Schwefelsäure, konz. bzw. rauchend (Merck); Natriumsulfat, wasserfrei, p.a. (Merck); Celite 545 (Roth,

Karlsruhe, B.R.D.). Träger- und Spülgas bei der Gaschromatographie: Argon-Methan (90:10) (Linde, Berlin, B.R.D.).

Die verwendeten Insektizide und der innere Standard für die gaschromatographische Bestimmung besaßen einen Reinheitsgrad zwischen 98 und 99.9% (Riedel-de Haën, Seelze, B.R.D.). Als Verdampfungsinhibitor wurde *n*-Hexadecan (Merck) eingesetzt.

### Geräte

Schrotmühle, Modell A 10 (Tekmar, Cincinnati, Ohio, U.S.A.).

Schüttelmaschine, Typ B1 (Bühler, Tübingen, B.R.D.).

Chromatographierrohr, 16 cm Länge, 9 mm I.D., Glas.

Flüssigkeitschromatograph Modell 4100 (Varian, Palo Alto, Calif., U.S.A.).

Injektionssystem, Aufgabeschleife Modell 8031 (Chromatronix, Berkeley, Calif., U.S.A.).

Gelchromatographiesäule, 1 m, 15 mm I.D. (Glas; Quickfit, Wiesbaden, B.R.D.). Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gequollen in Äthanol.

Detektor: Spektralphotometer Modell PM 2D (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) mit Schreiber Modell A 25 (Varian).

Gaschromatograph: Serie 5730 (Hewlett-Packard, Böblingen, B.R.D.) mit Einspritzautomatik und Schreiber Modell 7123A (Hewlett-Packard).

Detektor: 15-mCi <sup>63</sup>Ni Elektroneneinfangdetektor mit servogesteuerter Pulsfrequenz (Modell 18713 A, Hewlett-Packard).

GC-Säule: 2.66 m, 2 mm I.D., 1.5% SP-2250 (50% Phenyl-, 50% Methylpolysiloxan)-1.95% SP-2401 (50% Trifluorpropyl-, 50% Methylpolysiloxan) auf Chromosorb W HP (0.13–0.16 mm, Chrompack, Middelburg, Niederlande).

GC-Auswertungssystem: Varian Datensystem vom Typ 620 L.

### Ermittlung der Elutionsvolumina

Zur Ermittlung der gelchromatographischen Elutionsvolumina wurden mit Hilfe einer Probenaufgabeschleife jeweils 0.5 ml einer Lösung des betreffenden reinen Insektizids in *n*-Hexan in einer Konzentration von 50 ng/μl (Aldrin, HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -HCH) bzw. 100 ng/μl (*p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT und *p,p'*-DDT) auf die Gelchromatographiesäule gegeben und mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 45 ml Äthanol/h chromatographiert. Das aus der Säule ausfließende Eluat wurde bei einer Wellenlänge von 237 nm in üblicher Weise durch einen UV-Detektor geleitet. Die Absorption wurde mit Hilfe eines Kompensationsschreibers aufgezeichnet. Die HCH-Isomeren absorbierten im UV-Bereich bei den hier erforderlichen Konzentrationen nicht. Ihre Elutionsvolumina wurden ermittelt, indem das Säulenuat in 5-ml Fraktionen aufgefangen und diese anschließend gaschromatographisch gemessen wurden.

### Extrakterstellung

Die in *n*-Hexan gelösten Wirkstoffe (0.5–1.0 μg je nach Wirkstoff) wurden auf 50 g des 1 min lang mit einer Schrotmühle zerkleinerten, wirkstoffunbehandelten Getreidematerials verteilt. Nach einer Einwirkzeit von 60 min. wurden zu diesem in einem 500-ml Rundkolben befindlichen Getreideschrot 200 ml *n*-Hexan und 15 g wasserfreies Natriumsulfat hinzugefügt. Anschließend wurde der Kolbeninhalt auf einer Schüttelmaschine 60 min lang bei Raumtemperatur extrahiert und danach

filtriert. Die Hälfte des Filtratvolumens wurde in einen Kuderna-Danish-Kolben pipettiert, nach Zusatz von 0.2 ml des Verdampfungsinhibitors am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingengt, in einen 1-ml-Messkolben übergespült und mit *n*-Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

#### *Gaschromatographische Reinigung des Rohextraktes*

0.5 ml eines Rohextraktes, entsprechend einem Probenanteil von 12.5 g Getreidematerial, wurden über die Probenaufgabeschleife auf die Säule gegeben und analog wie bei der Elutionsvolumenermittlung chromatographiert. Die durch die relativen Elutionsvolumina 0.92 und 1.52 eingegrenzte Fraktion wurde gesondert aufgefangen, am Kuderna-Danish-Verdampfer nach Zugabe von 0.2 ml *n*-Hexadecan bis fast zur Trockne eingengt und mit *n*-Hexan auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt.

#### *Extraktbehandlung mit Celite-Schwefelsäure*

40 g Celite 545 wurden in einem Porzellanmörser zusammen mit 10 ml konz. Schwefelsäure und 10 ml rauchender Schwefelsäure innig durchmischt. Dieses Material wurde als Petroläthersuspension in eine Glassäule gefüllt, vor deren Ausgang eine Schicht Quarzwolle gestopft wurde. Das Säulenfüllmaterial wurde mit 100 ml Petroläther vorgespült. Anschliessend wurde der in 5 ml *n*-Hexan gelöste, gelchromatographisch vorgereinigte Extrakt auf die Celitesäule aufgegeben und mit insgesamt 100 ml *n*-Hexan von der Säule chromatographiert. Das Eluat wurde nach Zugabe von 0.2 ml *n*-Hexadecan am Kuderna-Danish-Verdampfer eingengt, in einen 1-ml Messkolben übergespült und mit *n*-Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

#### *Gaschromatographische Bestimmung*

Jeder Lösung der gereinigten Extrakte wurde als innerer Standard das Akarizid Tetradifon in einer Menge zugesetzt, dass dessen Konzentration jeweils 200 oder 500 pg/ $\mu$ l *n*-Hexan betrug.

Die Bestimmung erfolgte unter den folgenden GC-Bedingungen: Temperaturprogramm der Trennsäule: 212° (16 min) bis 240° (2 min) mit 2°/min, Einspritzblocktemperatur 250°, Detektorblocktemperatur 300°. Für eine GC-Analyse wurden jeweils 2  $\mu$ l von den zu untersuchenden Probenlösungen in *n*-Hexan eingespritzt.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Ausarbeitung der Methodik sollte ein Verfahren entwickelt werden, das eine vielseitige Anwendung ermöglichen und zudem für Routineanalysen geeignet sein sollte. Aus diesem Grunde war von vornherein der Einsatz der Gelchromatographie vorgesehen, zumal damit schon erfolgreich Erfahrungen bei anderen Erntegütern gemacht worden waren<sup>14</sup>. Der besondere Vorzug einer gelchromatographischen Trennsäule besteht darin, dass diese für eine grosse Anzahl von Trennungen verwendet werden kann. Eine solche Reinigungsmethodik eignet sich also hervorragend für eine kontinuierliche Arbeitsweise, die bei der Anwendung adsorptions- oder verteilungschromatographischer Reinigungsschritte (wie z.B. bei einem Florisil-clean up-Verfahren) nicht möglich ist.

Die auf Benzol bezogenen Werte der an dem Gelsystem Sephadex LH-20 in Äthanol ermittelten Elutionsvolumina der untersuchten Chlorkohlenwasserstoffin-

TABELLE I

AUF BENZOL RELATIVIERTE ELUTIONSVOLUMINA DER UNTERSUCHTEN CHLOR-KOHLLENWASSERSTOFFINSEKTIZIDE AN SEPHADEX LH-20-ÄTHANOL

<i>Wirkstoff</i>	<i>Relatives Elutionsvolumen (bezogen auf Benzol)</i>
Aldrin	0.97
<i>p,p'</i> -DDE	1.03
<i>o,p'</i> -DDT	1.05
<i>p,p'</i> -DDT	1.07
HCB	1.08
$\alpha$ -HCH	1.16
$\beta$ -HCH	1.21
$\gamma$ -HCH	1.23
$\delta$ -HCH	1.23

sektizide wurden in Tabelle I wiedergegeben. Der relative Fehler der Elutionsvolumina lag bei Werten unterhalb von 1 %.

Fig. 1 zeigt die Elutionsprofile der Rohextrakte der untersuchten Getreidearten, die beim Elutionsvorgang in kleinen Fraktionen unterteilt, gewichtsmässig bestimmt und auf die Menge des Gesamtextraktes bezogen worden sind. Aus Fig. 1 kann entnommen werden, dass die im insektizidhaltigen Extrakt verbliebenen Getreidebestandteile, die bei der gelchromatographischen Trennung im Bereich der Insektizide unvermeidlich miteluiert wurden, mengenmässig gering erscheinen. Bei der Elektroneneinfang-GC im 0.01 mg/kg-Bereich treten sie jedoch noch als Störsignale in Erscheinung. Aus diesem Grunde muss eine Nachbehandlung der gelchromatographisch vorgereinigten Eluatfraktionen durch Celite-Schwefelsäure erfolgen. Bei der Behandlung mit Schwefelsäure wurden zwar die Wirkstoffe Dieldrin und Methoxychlor gänzlich bzw. teilweise zerstört und konnten daher auf diese Weise nicht bestimmt werden; sie sind jedoch ohnehin heute kaum mehr im Getreide zu erwarten.

Die Verwendung anderer Gelsysteme wurde aus dem geschilderten Grunde gleichfalls untersucht. Wir machten jedoch bei breit angelegten Versuchen mit verschiedenartigsten Substraten die Erfahrung, dass das System Sephadex LH-20-

TABELLE II

MITTELWERTE DER PROZENTUALEN WIEDERFINDENS RATEN (RELATIVE STANDARDABWEICHUNG VOM MITTELWERT; ANZAHL DER MESSUNGEN)

<i>Wirkstoff</i>	<i>Getreide</i>				
	<i>Gerste</i>	<i>Mais</i>	<i>Reis</i>	<i>Roggen</i>	<i>Weizen</i>
Aldrin	74.1 ( $\pm 7.2$ ; 4)	77.7 ( $\pm 5.1$ ; 4)	80.5 ( $\pm 5.9$ ; 4)	89.1 ( $\pm 6.4$ ; 5)	73.3 ( $\pm 3.0$ ; 4)
<i>p,p'</i> -DDE	99.5 ( $\pm 2.8$ ; 5)	78.1 ( $\pm 3.4$ ; 4)	86.8 ( $\pm 6.3$ ; 4)	99.7 ( $\pm 2.4$ ; 5)	83.0 ( $\pm 6.0$ ; 4)
<i>o,p'</i> -DDT	93.4 ( $\pm 1.5$ ; 4)	88.3 ( $\pm 4.4$ ; 4)	81.5 ( $\pm 3.0$ ; 4)	99.2 ( $\pm 2.6$ ; 5)	88.7 ( $\pm 4.9$ ; 4)
<i>p,p'</i> -DDT	99.0 ( $\pm 1.7$ ; 5)	86.7 ( $\pm 2.2$ ; 4)	80.5 ( $\pm 2.0$ ; 4)	99.5 ( $\pm 1.5$ ; 6)	86.0 ( $\pm 6.1$ ; 5)
HCB	99.8 ( $\pm 1.1$ ; 5)	77.6 ( $\pm 3.1$ ; 4)	84.0 ( $\pm 4.2$ ; 4)	91.5 ( $\pm 2.9$ ; 5)	80.0 ( $\pm 3.3$ ; 5)
$\alpha$ -HCH	86.3 ( $\pm 4.0$ ; 5)	88.7 ( $\pm 3.5$ ; 4)	85.0 ( $\pm 3.8$ ; 5)	94.5 ( $\pm 3.6$ ; 5)	80.8 ( $\pm 4.2$ ; 4)
$\beta$ -HCH	86.8 ( $\pm 3.8$ ; 5)	83.0 ( $\pm 2.1$ ; 4)	77.3 ( $\pm 4.3$ ; 4)	76.0 ( $\pm 4.0$ ; 5)	76.7 ( $\pm 3.5$ ; 4)
$\gamma$ -HCH	99.8 ( $\pm 2.5$ ; 5)	86.7 ( $\pm 3.0$ ; 4)	89.8 ( $\pm 3.1$ ; 6)	90.0 ( $\pm 3.6$ ; 5)	92.5 ( $\pm 3.3$ ; 5)
$\delta$ -HCH	97.0 ( $\pm 1.8$ ; 4)	81.3 ( $\pm 4.5$ ; 5)	86.5 ( $\pm 3.0$ ; 5)	81.0 ( $\pm 2.8$ ; 4)	87.0 ( $\pm 5.7$ ; 6)

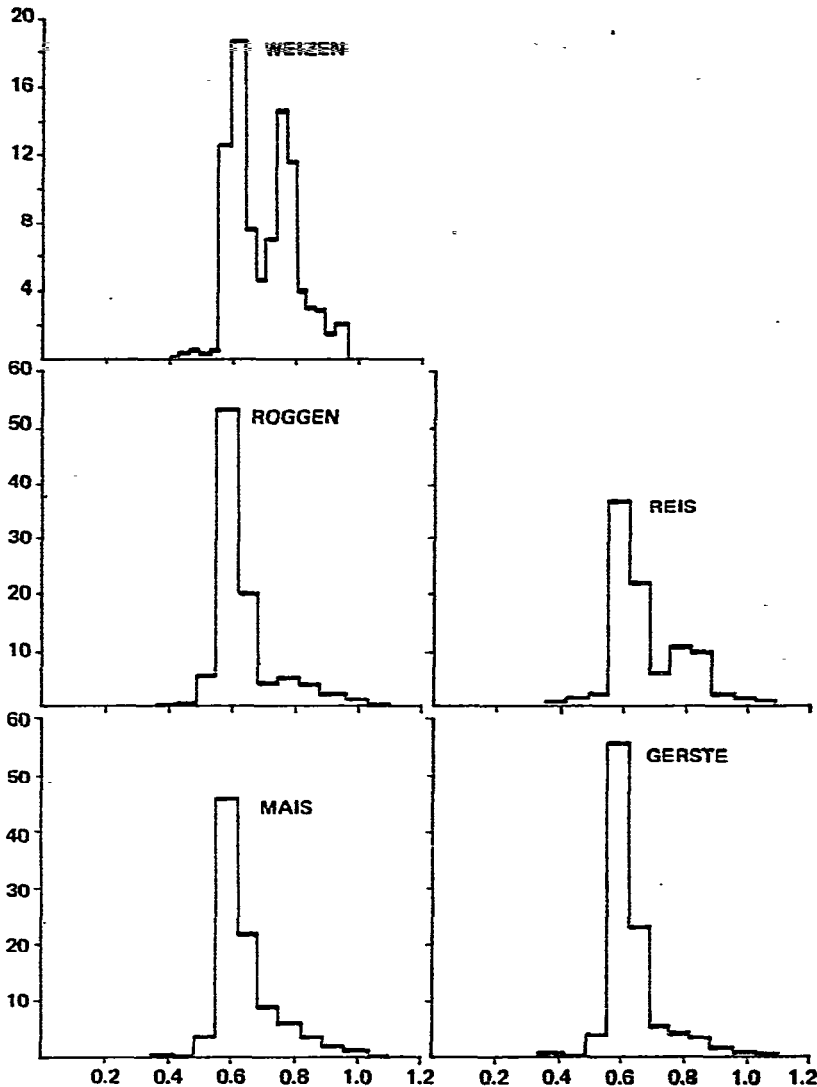


Fig. 1. Elutionsprofile von Getreideextrakten an Sephadex LH-20 in Äthanol. Aufgetragen ist Gewichtsprozent (Ordinate) über rel. Elutionsvolumen (Abszisse). Bereich der rel. Elutionsvolumina der untersuchten Chlorkohlenwasserstoffinsektizide: 0.92-1.52.

Äthanol für Pflanzenschutzmittelrückstandsmethoden die besten Trenneigenschaften aufweist.

Die mit der hier beschriebenen Methode im Konzentrationsbereich von 0.01 bzw. 0.02 mg/kg ermittelten Wiederfindensraten sind in Tabelle II zusammengefasst. Die Zahlenangaben in der Tabelle II stellen Mittelwerte dar, die aus vier bis sechs Einzelbestimmungen jedes einzelnen Insektizids auf jeweils einem der untersuchten Getreidearten errechnet wurden. Für jedes Insektizid wurde in Klammern die relative

Standardabweichung vom Mittelwert und die Anzahl der Messungen je Getreideart angegeben.

#### DANK

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie wird für die Förderung des Forschungsvorhabens gedankt. Frau Bettina van Nes danken wir für die experimentelle Mitarbeit.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine für die Routineuntersuchung von Getreideproben geeignete, einheitlich anwendbare Methode beschrieben, mit der unter Verwendung der Gelchromatographie an dem System Sephadex LH-20 in Äthanol und von Celite-Schwefelsäure zur Nachreinigung des gel chromatographisch vorbehandelten Getreideextraktes die Chlorkohlenwasserstoffinsektizide Aldrin, HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -HCH in einer Konzentration von 0.01 mg/kg sowie *p,p'*-DDE und *p,p'*-DDT in einer Konzentration von 0.02 mg/kg in den Getreidearten Gerste, Mais, Reis, Roggen und Weizen gereinigt und anschliessend gleichzeitig und quantitativ gaschromatographisch (Elektroneneinfangdetektor) bestimmt werden können. Die mittleren prozentualen Wiederfindensraten der Insektizide lagen bei Werten zwischen 73 und 99 %.

#### LITERATUR

- 1 T. Stijve, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 62 (1968) 229.
- 2 I. S. Taylor und F. P. Keenan, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 1293.
- 3 M. E. Alessandrini, L. Angelelli und L. Boniforti, *Boll. Lab. Chim. Prov.*, 16 (1965) 355.
- 4 H. Y. Young, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2 (1967) 243.
- 5 M. Röhrlich, P. Suckow und W. Hertel, *Getreide Mehl*, 21 (1971) 109.
- 6 J. G. Saba, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 49 (1966) 768.
- 7 R. H. Thompson, E. G. Hill und F. B. Fishwick, *Pestic. Sci.*, 1 (1970) 93.
- 8 J. Zerbe, K. Kurasiak und A. Ciesliczak, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 16 (1971) 1071.
- 9 I. Levi, P. B. Mazur und T. W. Nowicki, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 794.
- 10 S. H. Park, *Korean J. Plant Protect.*, 13 (1974) 235.
- 11 D. F. Horler, *J. Sci. Food Agr.*, 19 (1968) 229.
- 12 E. S. Goodwin, R. Goulden, und J. P. Reynolds, *Analyst (London)*, 86 (1961) 697.
- 13 R. L. Stanley und H. T. le Favouere, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 48 (1965) 666.
- 14 J. Pflugmacher und W. Ebing, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 457.