

CHROM. 11,115

DIE REINIGUNG VON PFLANZENEXTRAKTEN ZUR BESTIMMUNG VON PFLANZENSCHUTZMITTELRÜCKSTÄNDEN MIT HILFE EINES AUTOMATISCHEN GELCHROMATOGRAPHEN

J. PFLUGMACHER und W. EBING

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

(Eingegangen am 19. April 1978)

SUMMARY

Purification of plant extracts for determination of pesticide residues by means of an automatic gel chromatograph

An automatic gel chromatograph is described enabling the analyst unattended by even a few general methods, to solve various clean-up problems in pesticide residue analysis. Although analysis time is relatively long, labour is saved and a 24-h day is at the disposal of the analyst. Two general methods for clean-up and residue determination of organophosphorus and carbamate compounds in several crop plants are described. Recovery values range between 82 and 104% and are similar or better than results obtained manually.

EINLEITUNG

Für die Spurenanalyse organischer Biozidwirkstoffrückstände in biologischem Material sind eine Fülle sehr mühe- und zeitaufwendiger Extraktreinigungsoperationen im Gebrauch, die meistens den verschiedenartigen Aufgabenstellungen speziell angepasst werden können. Mit der Gelchromatographie, die von der Polymeren-, Naturstoff- und klinischen Chemie bereits sehr nutzbringend in Anspruch genommen wird, eröffnet sich die Möglichkeit der Entwicklung einheitlicher Sammelmethode für die Ermittlung jeweils grösserer Gruppen von Wirkstoffrückständen.

Die bisher in der Literatur berichteten Anwendungen der Gelchromatographie hinsichtlich der Pflanzenschutzmittelrückstandsanalyse wurden von den Autoren dieser Arbeit kürzlich¹ zitiert. Dabei handelte es sich meist um die Lösung engebrenzter Aufgabenstellungen. Zur Einführung in das Thema dieser Arbeit seien folgende Publikationen besonders hervorgehoben, in denen Methoden für Gruppenanalysen beschrieben werden: Stalling *et al.*² berichteten über die Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden und polychlorierten Biphenylen aus Fischextrakten. Die Rückstände verschiedener Wirkstoffklassen wurden von pflanzlichen und tierischen Fetten durch Johnson *et al.*³ abgetrennt. Stalling *et al.*⁴ trennten Dioxin-, Dibenzofuranderivate und Polychlorbiphenyle von Fetten und schliesslich berichteten

die Autoren⁵ schon vor geraumer Zeit über die Reinigung von Gemüseextrakten zur Bestimmung von Phosphorsäureesterinsektiziden.

Wegen der Fülle der Untersuchungsaufgaben in der Pflanzenschutzmittelrückstandsanalytik wird die Entwicklung auf diesem Gebiet in zunehmendem Masse auf die Anwendung weniger universell geeigneter Sammelmethode gerichtet sein. Bisher dominieren allerdings noch herkömmliche Reinigungstechniken, wie Flüssig-Flüssig-Verteilung und Adsorptionschromatographie an Kieselgel, Kohle, Florisil usw. Dagegen eignet sich die Gelchromatographie sehr gut für eine breite Anwendung bei der Extraktreinigung und lässt sich auch ohne weiteres automatisieren. Das ist wichtig, da bei dem Einsatz der Gelchromatographie als Sammelmethode auf relativ lange Säulen zurückgegriffen werden muss, wodurch lange Analysenzeiten unvermeidlich sind.

Tindle und Stalling⁶ konstruierten bereits vor einiger Zeit aus grösstenteils kommerziell erhältlichen Teilen einen automatischen Gelchromatographen speziell für die Abtrennung von Chlorkohlenwasserstoffen aus Fetten. In der hier vorgelegten Arbeit wird über die Einbeziehung gelchromatographischer Reinigungstechniken in allgemein anwendbare Sammelmethode zur Rückstandsbestimmung ein oder mehrerer Wirkstoffklassen mit Hilfe eines automatischen Gelchromatographen berichtet, der zusammen mit Bender & Hobein (München, B.R.D.), zu diesem Zweck vor zwei Jahren entwickelt worden war.

EXPERIMENTELLES

Automatischer Gelchromatograph

Die Fig. 1 zeigt das Funktionsschema der Konstruktion. Mit Hilfe eines im Bereich von 0.1–0.5 bar einstellbaren Vordruckes wird das Eluens aus dem Reservoir R über einen Feinfilter, eine Blasenfalle mit Niveauregelung BN zur Saugseite der Dosierpumpe P gefördert. Auf der Druckseite der Pumpe fliesst das Eluens über den eingebauten Pulsationsdämpfer zur Dosierung DOS. Vor der Dosierung DOS wird ein Teilstrom des Eluens abgezweigt und über die Referenzseite des Detektors DE zum zentralen Ablaufgefäss W geleitet. Der Hauptteil des Eluens fliesst von der Dosierung DOS durch das Ventil G in das Trennsystem. Dieses besteht aus ein bis zu drei Trennsäulen und den Umschaltventilen E und F. Aus dem Trennsystem fliesst das Eluens durch den Detektor DE in das Ventil N und gelangt je nach Stellung des Ventils entweder in das zentrale Ablaufgefäss W oder durch das Achtfach-Verteilerventil K in die Probensammelgefässe FS.

Beschreibung der Einzelbausteine

Versorgungseinheit. Das Reservoirgefäss R besitzt ein Volumen von 1 l und wird über das Ventil B ständig mit Stickstoff gespült. Der Stickstoffdruck wird mittels eines Nadelventils eingestellt und ist an einem Manometer, welches mit einem Sicherheitsventil kombiniert ist, ablesbar.

Die Niveauregelung der Blasenfalle BN, die durch kurzzeitiges Öffnen des Ventils C gefüllt wird, verhindert das Eindringen von Gasblasen in den Förderkopf der Pumpe und in den nachfolgenden Trennteil. Fällt das Lösungsmittel unter ein bestimmtes Niveau, so wird mittels einer Fotozelle ein Kontakt ausgelöst, der die Förderpumpe ausschaltet.

ventile E und F ist es möglich, die Mehrsäulentechnik bzw. ein Recycling des Eluats durchzuführen.

Beispielsweise ergibt sich für die Zweisäulentechnik folgender Programmablauf:

(1) Die Säule S1 wird konditioniert. Das Eluens fließt über die Säule S1, die Ventile F und E direkt zum Detektor.

(2) Durch Umschaltung des Ventils G wird die jeweilige Probe in der Achtfach-Schleifendosierung durch den Eluensstrom zur Säule S1 geführt und auf der Säule chromatographiert.

(3) Fraktionierung. Die gewünschte Eluatsfraktion der Säule S1 wird durch Betätigung des Ventils E auf die Säule S2 gegeben.

(4) Analyse auf der Säule S2. Das Eluens wird durch Schaltung des Ventils F direkt auf die Säule S2 geführt. Das Eluat wird über das Ventil N und das Achtfach-Verteilerventil gesammelt.

(5) Leerspülung der Säule S1. Durch erneutes Schalten der Ventile E und F werden die in der Trennsäule S1 verbliebenen Stoffe eluiert und über den Detektor durch Umschaltung des Ventils N in die zentrale Sammelflasche W geleitet.

Detektion. Das Gerät ist zur Zeit mit einem Doppelstrahl-UV-Festwellenlängen-Detektor der Firma Varian (Darmstadt, B.R.D.) ausgerüstet, dessen Durchflusszellen ein Volumen von $8 \mu\text{l}$ aufweisen. Der Detektor kann alternativ bei 254 oder 280 nm Wellenlänge betrieben werden.

Fraktionierungseinheit. Die Fraktionierungseinheit besteht aus dem Umschaltventil N und dem Achtfach-Verteilerventil K. Bei Betätigung von Ventil N fließt das Säuleneluat bzw. das Lösungsmittel durch das Ventil N in einen Flussmesser. Der Flussmesser besteht im wesentlichen aus einem graduierten Rohr und einem Septuminjektionskopf. Durch Messung der Laufzeit von durch den Septuminjektor eingebrachten Luftblasen zwischen zwei Marken kann die Flussgeschwindigkeit bestimmt werden.

Aus dem Flussmesser gelangt das Eluat in das zentrale Sammelgefäße W. Ist das Ventil N ausgeschaltet, fließt das Eluat in das Achtfach-Verteilerventil K, welches das Eluat auf die entsprechenden Sammelgefäße verteilt. Ausserdem kann ein Fraktionssammler über einen Schaltkontakt der Steuereinheit angeschlossen werden, wenn eine weitere Fraktionierung des Eluats erwünscht ist.

Steuereinheit. Die Steuerung des Gelchromatographen erfolgt über einen Programmer der Firma Bender & Hobein, der auch bei anderen Messgeräten dieser Firma Verwendung findet. Der Programmer gestattet es, sämtliche Ventilfunktionen manuell oder automatisch zu steuern. Bei automatischem Betrieb sind je nachdem, ob die Trennungen auf einer oder auf zwei Säulen durchgeführt werden sollen, mehrere Programmabläufe wählbar. Die Anzahl der Proben, die vollautomatisch hintereinander chromatographiert werden können, beträgt zur Zeit acht, wobei alle acht Proben nach demselben Programmablauf aufgearbeitet werden.

Sonstige Geräte und Materialien zur Phosphorsäureesterrückstandsanalyse

Als weitere Geräte wurden verwendet: Zerkleinerungsgerät Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Stauffen, B.R.D.); Kuderna-Danish-Verdampferbirne; Rotationsverdampfer Vapsilator KRV 65/30 (Chemophor, Zürich, Schweiz); Gelchromatographiesäule Quickfit (Wiesbaden, B.R.D.). 500 mm \times 15 mm I.D.; Schreiber Servogor

RE 511 (Metrawatt, Nürnberg, B.R.D.); Porzellannutsche, 120 mm I.D.; Scheidetrichter, 1000 ml; Gaschromatograph Hewlett-Packard 7620 A (Frankfurt/Main, B.R.D.) oder Varian 2800 mit thermionischen Detektoren; Integration mit Varian Computer 620L-100; Gaschromatographiesäule 1.93 m \times 2.0 mm I.D. Glas, 10% QF-1 auf Gas-Chrom Q (0.12–0.15 mm).

Weitere Materialien waren: Aceton, p.a. (Merck, Darmstadt, B.R.D.); Dichlormethan, p.a. (Merck); Äthanol, absolut, unvergällt, Monopolverwaltung; Celit 545 (Roth, Karlsruhe, B.R.D.); Natriumsulfat zum Trocknen (Merck); Natriumchlorid, p.a. (Merck); Gel: Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 24 h gequollen, vor dem Packen im Ultraschallbad entgast; Stickstoff, nachgereinigt (Linde, Berlin, B.R.D.); Faltenfilter, 240 mm D., Nr. 1450 1/2 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.); Rundfilter, 120 mm D., Nr. 602 (Schleicher & Schüll).

Zusätzliche sonstige Geräte und Materialien zur Carbamatrückstandsanalyse

Hochdruckflüssigkeitschromatograph 3520 (Spectra Physics, Santa Clara, Calif., V.S.); Probenaufgabesystem, Schleifenventil mit 20 μ l-Schleife (Spectra Physics); angeschlossener Detektor, UV-Monitor Variscan 635 mit 8- μ l Durchflussküvette, Varian (Palo Alto, Calif., V.S.); Rechner-Integrator (Spectra Physics) System 1; Flüssigkeitschromatographiesäule, Mikro-Pak CN 10, Teilchengröße 10⁻⁶ cm, in 200 mm \times 2.1 mm I.D.; n-Hexan, zur Rückstandsanalyse (Merck); Isopropyläther, p.a. (Merck).

Methode zur Rückstandsanalyse von insektiziden Phosphorsäureestern bzw. deren Metaboliten in pflanzlichen Proben

100 g des vorzerkleinerten Probenmaterials werden mit 200 ml Aceton 3 min am Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wird mit 5 g Celit 545 vermischt und auf einer Porzellannutsche abgesaugt. Ultra Turrax und Filtrerrückstand werden zweimal mit je 25 ml Aceton nachgespült. Ein Fünftel des Filtratvolumens wird in einen Scheidetrichter von 1000 ml Inhalt gebracht. Dieser aliquote Teil des Acetonextraktes wird mit 250 ml dest. Wasser und 25 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt. Nach Zugabe von 60 ml Dichlormethan wird 2 min lang kräftig durchgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wird abgetrennt, die wässrige Phase nochmals mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und dann verworfen. Die vereinigten Dichlormethanphasen werden mit dem Gemisch aus 250 ml dest. Wasser und 35 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Dichlormethanphase wird abgelassen und mit 10 g Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Na₂SO₄ wird der Filtrerrückstand mit dreimal 10 ml Dichlormethan nachgespült. Anschliessend wird die Lösung am Rotationsverdampfer auf 1–2 ml eingengt, mit 5 ml Äthanol versetzt und erneut eingengt. Nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur wird der Extrakt in einen 1 ml fassenden Messkolben überführt und unter einem Stickstoffstrom auf die 1-ml Marke eingestellt.

0.5 ml des Rohextraktes wird mit Hilfe einer Spritze in eine Schleife des Probenaufgabeventils gesaugt und mit Äthanol als Elutionsmittel chromatographiert. Durchflussgeschwindigkeit: 60 ml/h. Der UV-Detektor ist auf 254 nm eingestellt. Die Fraktion vom relativen Elutionsvolumen 0.64–1.38 (bezogen auf den Benzolwert) wird nach entsprechender Einprogrammierung automatisch in einer Kuderna-Danish-Birne aufgefangen und anschliessend auf 0.5 ml eingengt.

2.5 μ l des gereinigten Extraktes werden bei 250° injiziert und temperaturprogrammiert von 100°–210° bei einer Temperaturanstiegsrate von 8°/min gaschromatographiert. Detektortemperatur, 360°; Trägergasdurchflussmenge, 63 ml Stickstoff pro min.

Methode zur Rückstandsanalyse insektizider bzw. herbizider Carbamate in pflanzlichen Proben

Die Herstellung des Rohextraktes erfolgt wie bei der vorstehend beschriebenen Methode. Der acetonisch-wässrige Auszug wird jedoch nicht in Dichlormethan, sondern in *n*-Hexan aufgenommen und nach dem Trocknen eingengt.

In analoger Weise wird die automatische gelchromatographische Reinigung durchgeführt. Hier wird die Eluatfraktion mit den relativen Elutionswerten 0.70–1.60 aufgefangen und —auf 0.5 ml eingengt— der hochdruckflüssigchromatographischen Bestimmung zugeführt.

20 μ l werden mit einem Gemisch aus Isopropyläther-*n*-Hexan (1:9) bei einem Säuleneingangsdruck von $33.4 \cdot 10^5$ Pa in einer Geschwindigkeit von 1.6 ml/min chromatographiert. Detektionswellenlänge, 240 nm (bzw. 254 nm für Zectran).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Tabelle I sind als Beispiele einige Ergebnisse aus Zusatzversuchen für die Rückstandsanalyse von Phosphorsäureesterinsektiziden oder deren Metabolite enthaltenden Erntegutproben zusammengestellt. Die Wiederfindensprozente sind Mittelwerte aus 3–5 Einzelbestimmungen. Man erkennt, dass die einheitlich automatisch ausgeführte Gelchromatographie für recht unterschiedliche Substrattypen und unterschiedliche Substanzen innerhalb dieser Wirkstoffklasse zu verlässlichen Ergebnissen führt. Ein Vergleich der Resultate (Mittelwerte aus 4–6 Einzelbestimmungen) aus jeweils gleichen analytischen Aufgabenstellungen sowohl auf automatische als auch auf manuelle Weise belegt die präzise Arbeit des automatischen Gelchromatographen (Tabelle II). Die manuelle gelchromatographische Reinigung wurde so vorgenommen,

TABELLE I

WIEDERFINDENSERGEBNISSE VON PHOSPHORSÄUREESTERINSEKTIZID-RÜCKSTANDSANALYSEN NACH AUTOMATISCHER GELCHROMATOGRAPHISCHER REINIGUNG

| Wirkstoff | Substrat | | | | | | | | | |
|------------------|----------|------|--------------|-------|--------|------|--------|------|-----------|-------|
| | Äpfel | | Grüne Bohnen | | Möhren | | Spinat | | Weisskohl | |
| | mg/kg | % | mg/kg | % | mg/kg | % | mg/kg | % | mg/kg | % |
| Bromophosäthyl | | | 0.4 | 102.1 | 0.4 | 97.5 | | | 0.1 | 104.3 |
| Diazinon | | | 0.1 | 103.2 | | | | | 0.2 | 104.3 |
| Diazoxon | | | 0.05 | 102.3 | | | | | 0.05 | 82.3 |
| Dimethoat | | | | | 0.3 | 99.8 | | | 0.4 | 102.1 |
| Disulfotonsulfon | 0.05 | 98.2 | 0.05 | 94.7 | | | | | | |
| Malaaxon | 0.4 | 93.2 | | | | | 0.4 | 96.2 | 0.4 | 91.3 |
| Omethoat | | | | | 0.3 | 96.7 | | | | |
| Parathion | | | | | 0.1 | 96.5 | | | 0.1 | 98.4 |
| Parathionmethyl | | | | | 0.1 | 91.6 | | | 0.1 | 90.1 |

TABELLE II

WIEDERFINDENSERGEBNISSE VON PHOSPHORINSEKTIZIDRÜCKSTÄNDEN NACH MANUELLER UND AUTOMATISCHER GELCHROMATOGRAPHIE

a = Automatisch, m = manuell.

| Wirkstoff | Grüne Bohnen | | | Möhren | | | Weisskohl | | |
|-----------------|--------------|-------|-------|--------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | mg/kg | a (%) | m (%) | mg/kg | a (%) | m (%) | mg/kg | a (%) | m (%) |
| Bromophosäthyl | 0.4 | 102.1 | 95.5 | 0.4 | 97.5 | 95.8 | 0.1 | 104.3 | 79.3 |
| Diazinon | 0.1 | 103.2 | 98.3 | | | | 0.2 | 104.3 | 79.5 |
| Dimethoat | | | | 0.3 | 99.8 | 89.0 | 0.4 | 102.1 | 97.3 |
| Parathion | | | | 0.1 | 96.5 | 91.6 | 0.1 | 98.4 | 97.5 |
| Parathionmethyl | | | | 0.1 | 91.6 | 92.7 | 0.1 | 90.1 | 86.7 |

dass ein Lösungsmittelreservoir über ein Handprobenaufgabeventil mit einer entsprechenden Gelsäule und einem UV-Detektor verbunden worden waren. Mit einer üblichen Laborförderpumpe wurde der erforderliche Lösungsmittelstrom eingestellt; Probenaufgabe und Eluatentnahme erfolgten manuell. Die Gegenüberstellung lässt erkennen, dass mit dem Automaten ebenbürtige, zuweilen sogar bessere Werte erreicht werden.

Zusätzliche Bedeutung gewinnt die Gelchromatographie als Reinigungs-, ggf. sogar als Gesamtanalysenmethode in Fällen der Rückstandsuntersuchung wenig stabiler, infolgedessen ohne Derivatisierung nicht gaschromatographierbarer Wirkstoffe. Die Carbamat-Rückstandsanalysemethode stellt ein Beispiel für solche Fälle dar. Einige solche Werte, die in der Kombination gelchromatographische Reinigung-hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung erhalten wurden (Mittelwerte aus 3-5 Einzelbestimmungen), sind in Tabelle III eingetragen worden. Ähnliche Resultate lassen sich auch z.B. mit Chlorbufam, Methiocarb, Promecarb, Pyramat, Pyrolan, Pebulate, Vernolate u.a.m. erzielen.

Die beschriebenen Methoden stellen lediglich erste Anwendungsbeispiele für die Einsatzmöglichkeiten der automatischen Gelchromatographie in der Pflanzenschutzmittelrückstandsanalytik dar. Durch entsprechende Wahl des Gels bzw. der Elutionsmittel und durch die Möglichkeit, eine oder mehrere Säulen gleicher oder unterschiedlicher Packungen hintereinander zu schalten, entsteht für den automatischen Gelchromatographen ein breites Spektrum weiterer Anwendungen, beispielsweise auch auf dem Gebiet der Abtrennung und Anreicherung von Pflanzenschutzmittel-Metaboliten zu deren Identifizierung. Zur Zeit wird im Laboratorium der Autoren der Einsatz der automatischen Gelchromatographie für die Rückstandsanalyse anderer, wirtschaftlich bedeutender Pflanzenbehandlungsmittelklassen geprüft. Die relativ lange Analysendauer von 3-5 h bei den beschriebenen Reinigungs-

TABELLE III

WIEDERFINDENS-RATEN (%) VON CARBAMATRÜCKSTÄNDEN IN GEMÜSE

| Gemüse | Barban (0.3 mg/kg) | Chlorpropham (0.2 mg/kg) | Phenmedipham (0.1 mg/kg) | Zectran (0.5 mg/kg) |
|---------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Tomaten | 95.6 | 96.8 | 90.1 | 89.7 |
| Spinat | 97.3 | 94.5 | 94.3 | 92.5 |

methoden, die ihre Ursache in der Verwendung langer Säulen hat, wird dann notwendig, wenn es sich um einheitlich durchzuführende Sammelmethode handelt, mit denen die Abtrennung einer grösseren Anzahl verschiedener Wirkstoffe von unterschiedlichen Substraten erreicht werden soll. Der automatische Betrieb rund um die Uhr gleicht diesen Nachteil jedoch wieder einigermaßen aus.

Kürzere Analysenzeiten sind erreichbar, wenn die Methodik auf nur ein Substrat, z.B. Fett, oder auf die Bestimmung von einem oder von zwei Wirkstoffen auf verschiedenen Substraten optimiert wird.

DANK

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Gemeinschaftsforschungsprogrammes "Automatisierung von Untersuchungsverfahren über Vorkommen und Wirkungen von Umweltchemikalien und Bioziden" vom Bundesministerium für Forschung und Technologie finanziell unterstützt. Wir danken für diese Förderung, besonders aber Frau I. Grabowski und Frau G. Wernitz für die intensive technische Mitarbeit. Ausserordentlich zu Dank verpflichtet sind wir Herrn Dr. Weber, Bender & Hobein, München, durch dessen Einsatz die Konstruktion des automatischen Gelchromatographen überhaupt erst realisiert werden konnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein automatisch arbeitender Gelchromatograph beschrieben, mit dem es möglich wird, viele einzelne Fälle der Probenvorbereitung für die Pflanzenschutzmittelrückstandsanalyse mit nur wenigen Generalverfahren einheitlich und unbeaufsichtigt durchzuführen. Für phosphororganoinsektizid- und für wenig stabile carbamathaltige pflanzliche Erntegutproben werden je eine Sammelmethode vollständig beschrieben und mit Wiederfindensraten zwischen 82 und 104% belegt. Die auf automatischem Wege erzielten Ergebnisse sind gleich gut oder besser als vergleichbare manuell erhaltene.

LITERATUR

- 1 J. Pflugmacher und W. Ebing, *J. Chromatogr.*, 151 (1978) 171.
- 2 D. L. Stalling, R. C. Tindle und J. L. Johnson, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 32.
- 3 L. D. Johnson, R. H. Waltz, J. P. Ussary und F. E. Kaiser, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 59 (1976) 174.
- 4 D. L. Stalling, J. Johnson und J. N. Huckins, in F. Coulston und F. Korte (Herausgeber), *Third International Congress of Pesticide Chemistry, Helsinki, 3-9 July 1974*, G. Thieme, Stuttgart, 1975.
- 5 J. Pflugmacher und W. Ebing, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 457.
- 6 R. C. Tindle und D. L. Stalling, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1768.