# Gaschromatographische Bestimmung der Rückstände von chlorierten Insektiziden im Milchfett nach einstufigem Isolationsverfahren

A. SZOKOLAY, J. UHNÁK und A. MAĎARIČ

*Forschungsinstitut für Hygiene, Bratislava 1*

Eingegangen am 28. Januar 1971

*Zum 50-jährigen Geburtstag von Prof. Ing. Dr. F. Görner*

Es wurde eine Methode für die gaschromatographische (mit Elektroneneinfangsdetektor) Bestimmung der Rückstände chlorierter Insektizide im Milchfett beschrieben. Bei dieser Methode wurden Milchfetteinwaagen von 0,3 g benutzt und die Isolierung (Extraktion und Reinigung) wurde in einer Stufe mit Hilfe einer Florisilsäule (15 g) durchgeführt. Die Genauigkeit der Methode wurde für *p,p'*-DDT, DDE und HCH durch eine Standardabweichung von 0,022 bis 0,098 $cm^2$ und einen Variationskoeffizienten von 5,4 bis 15,3% bewertet. Nach der Zugabe von 0,5 mg dieser Insektizide in 1000 g Fett betrug die Ausbeute von ihnen 81,0—91,8%. Die Abdampfungsbedingungen des Lösungsmittels wurden in Anwesenheit von diesen 3 Insektiziden überprüft und standardisiert.

A gas chromatographic method (electron capture detector) for the estimation of chlorinated insecticide residues in milk fat has been developed. This method demanding 0.3 g of weighed milk fat also involves a one-step isolation procedure (extraction and purification on column with 15 g of florisil). The accuracy of the method for *p,p'*-DDT, DDE and HCH has been assessed by standard deviation $s = 0.022-0.098$ $cm^2$ and variation coefficient ranging from 5.4 to 15.3%. The yields for the mentioned insecticides have been 81.0—91.8%. The conditions for the evaporation of solvent in the presence of these 3 insecticides have been examined and characterized.

Die Entwicklung analytischer Methoden zur Bestimmung von Rückständen chlorierter Insektizide hat eine schon mehr als 20-jährige Tradition. Ursprünglich wurden zur Bestimmung von Rückständen einzelner Verbindungen, z. B. DDT, spektralphotometrische Verfahren ausgearbeitet. Beim Anwuchs der Anzahl von Insektizidpräparaten zeigte sich begreiflicherweise die Notwendigkeit des Multidetektionsverfahrens. Dieser Vorderung entsprachen am besten chromatographische, hauptsächlich gaschromatographische analytische Methoden.

Seit dem Jahre 1962, als *Watts* und *Klein* [1] die Bestimmung der Rückstände von chlorierten Insektiziden in der Milch und den Milchprodukten nach der gaschromatographischen Methode mit einem Elektroneneinfangsdetektor (ECD) ausgearbeitet hatten, sind in der Weltliteratur bereits viele Arbeiten erschienen, die sich mit dieser Problematik beschäftigen [2—6]. Große Aufmerksamkeit wird hauptsäch-

lich der Vorbereitung der Proben gewidmet. Die zu bestimmenden fettlöslichen Insektizide sind nämlich in diesen Proben anwesend neben mehrmilionfacher Menge von Fettsubstanzen.

Die Mehrzahl der bekannten analytischen Verfahren benutzt eine mehrstufige Vorbereitung der Proben. Zunächst eine Extraktion der Probe mit nichtpolaren Lösungsmitteln, weiter ein Ausschütteln und Verteilung zwischen zwei unmischbaren Phasen bei Anwendung von Acetonitril, mit nachfolgender Reinigung auf einer chromatographischen Säule [7, 8].

Es ist allgemein bekannt [9], daß für diesen Zweck nur Florisil eine optimale Reinigung aller Kombinationen von chlorierten Insektiziden garantieren kann. Aber sein hoher Preis regt noch immer zum Suchen einiger Ersatzmöglichkeiten, beziehungsweise zur Verminderung seiner Gebrauchsmenge an. Letztere ist gleichzeitig von einer Verkleinerung der Probeneinwaage begleitet, was bei der Untersuchung von biologischem Material, welches nur in minimalen Mengen zur Verfügung steht, sehr erwünscht wäre.

Eine minimale Einwaage (1 g) verwendete *Wood* [10], der 2 Säulen gebrauchte: Zuerst eluierte er durch eine Säule, die aus einer Mischung von Celit und der Probe bestand; dann reinigte er auf einer Florisilsäule und eluierte mit Hexan.

*Langlois* u. Mitarb. [11] veröffentlichten einen einstufigen Arbeitsgang zur Vorbereitung der Proben (Extraktion und Reinigung in einer Operation) von Milchprodukten. Sie gingen wieder von einer 1 g Einwaage von Milchfett aus und reinigten sie auf einer Säule mit 50 g Florisil.

In dieser Arbeit haben wir versucht das Prinzip des Verfahrens nach Langlois u. Mitarb. bei Verwendung der kleinsten Einwaage zu modifizieren und die Ausbeute bzw. Genauigkeit der Methode festzustellen.

## Experimenteller Teil

### *Die Beschreibung der Methode*

#### Chemikalien und Lösungen

*Dichlormethan (Methylenchlorid)* (Lachema) redest. Kp. = 41,6°C.

*Petroläther* (Lachema) redest. Fraktion 30—60°C.

*n-Heptan* (Lachema) redest. Kp. = 98,8°C.

*Äthyläther* (Lachema) redest.

*Natriumsulfat* (Lachema) wasserfrei.

*Insektizidstandards*: Es wird ein Gemisch von vorausgesetzten Insektiziden in *n*-Heptanlösungen von 1,0 und 0,1 μg/ml zubereitet (Polyscience Corp., Evanston, USA).

*Florisil 60/100 Mesh* (Firma Fluka, A. G., Schweiz) wird zur Entfernung von Verunreinigungen mit einem doppelten Volumen von Äthyläther in einer Säule von 2—4 cm Durchmesser gewaschen und durch Erhitzen auf 140°C während mindestens 8 Stunden aktiviert, dann durch Zugabe von 5% Wasser teilweise desaktiviert. Nach einer mindestens 48-stündiger luftdichter Aufbewahrung (nicht länger als nach 7 Tagen) ist das Florisil gut verwendbar. Jede neue Charge des Florisils wird auf ihre Retentionseigenschaften folgenderweise untersucht: Eine Einwaage der Probe mit Zugabe von Insektizidstandards wird nach dem beschriebenen Arbeitsgang auf eine Säule mit Florisil gebracht und mit 20%iger Dichlormethanlösung in Petroläther eluiert. Die Eluate werden

in Mengen von 40 ml aufgefangen und das für eine vollkommene Eluierung des Insektizids notwendige Volumen des Lösungsmittels festgestellt. Die Eluate werden vereinigt, eingeengt und die Restmenge vom Fett gewogen. Ein für Analysen richtig vorbereitetes Florisil darf nicht mehr als 5% Fett aus der Einwaage durchlassen. Mit der Aktivierung und Vorbereitung des Florisils befassen sich ausführlich *Malone* und *Buvee* [12].

## Einrichtung und Apparate

Chromatographische Säulen von 600 mm Länge, mit einem inneren Durchmesser von 11 mm.

Konische Reagenzgläser.

Rotationsvakuumabdampfer.

Mikroinjektionspritzen (Hamilton).

Gaschromatograph (Perkin—Elmer F 7) mit einem Elektroneneinfangsdetektor (Elektronenquelle: Tritium).

Glassäulen 100 × 0,3 cm, gefüllt mit 2-Gew% Silikonfett SE-30 auf Chromosorb W, 80/100 Mesh.

Säulentemperatur 180°C.

Temperatur des Detektors 180°C.

Einspritzraumtemperatur 210°C.

Trägergas $N_2$, Durchfluß 60 ml/min.

Spannung im Detektor 70 V.

## Arbeitsgang

7,5 g eines teilweise desaktivierten Florisils wird in eine mit entfetteter Watte abgedichtete chromatographische Säule gebracht und mit einer Mischung von 15 ml Dichlormethan—Petroläther (1 : 1) durchgespült. Parallel wird 0,3 g Milchfett mit 7,5 g von vorher ähnlich durchgespültem Florisil gründlich gemischt bis sich ein lockeres Pulver bildet. Dieses Gemisch wird weiter in die chromatographische Säule auf das durchgespülte Florisil geschüttelt. Die Insektizide werden mit folgenden Mengen einer 20-Vol%igen Lösung von Dichlormethan in Petroläther eluiert:

| | |
|---|---|
| DDT, DDE, HCH | 50 ml, |
| Heptachlor und Heptachlorepoxid | 80 ml, |
| Dieldrin | 180 ml, |
| Endrin | 220 ml. |

Das Eluat wird in einem Vakuumkolben aufgefangen und auf einem Wasserbad von 50°C mit Hilfe eines Rotationsvakuumabdampfers (bei 300—400 Torr) auf ein Volumen von ca. 5 ml eingeengt. Der Rückstand wird quantitativ in ein konisches Schliffreagenzglas übertragen und wieder mit dem Vakuumabdampfer „gerade zur Trockene" abgedampft. Dieser trockene Rückstand wird in 1 ml *n*-Heptan, das allmählich an den Wänden des Reagenzglases zufließt, aufgelöst. Diese Lösung wird für die gaschromatographische Bestimmung verwendet. In die Säule wird 2—5 µl Extrakt eingespritzt (je nach der Empfindlichkeit des Apparates).

Zur Ausrechnung der Resultate wurden die Peakflächen der Proben mit den Peakflächen der parallel dosierten Standards ähnlicher Konzentrationen verglichen und die Ergebnisse wurden durch Vergleich mit der Kalibrationskurve kontrolliert. Diese hat bei *p,p'*-DDT und DDE von 0,1—0,8 µg/ml und bei HCH von 0,2—1,0 µg/ml Linearität gezeigt.

### *Bestimmung der Genauigkeit der Methode*

Wir haben 10 parallele Einwaagen einer homogenisierten Butterprobe analysiert. Aus den gaschromatographischen Aufzeichnungen haben wir die Peakflächen, welche den jeweiligen Insektiziden entsprachen bestimmt. Aus diesen Werten haben wir die Standardabweichung, den Standardfehler und den Variationskoeffizient berechnet (Tabelle 1).

*Tabelle 1*

Fehler der Methode zur Bestimmung von chlororganischen Insektiziden in dem Butterfett

| Insektizid | Zahl der Messungen $N$ | Arithmetisches Mittel $\bar{x}$ [cm²] | Standard-abweichung $s_x$ [cm²] | Standardfehler $s_{\bar{x}}$ [cm²] | Variations-koeffizient [%] |
|---|---|---|---|---|---|
| *p,p'*-DDT | 10 | 0,189 | ±0,028 | ±0,00916 | ±15,3 |
| *p,p'*-DDE | 10 | 0,408 | ±0,0223 | ±0,00705 | ± 5,4 |
| HCH | 10 | 1,032 | ±0,0985 | ±0,0312 | ± 9,6 |

### *Bestimmung der Ausbeute*

Wir untersuchten je 5 Einwaagen von einer Butterprobe ohne Zugaben und 5 Einwaagen von derselben Butterprobe nach der Zugabe 0,5 mg/kg von nachfolgenden Standardsubstanzen: *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE und ein gleichteiliges Gemisch von 4 HCH-Isomeren.

Die Standards wurden in einer Heptanlösung zum Butterfett zugegeben und dann homogenisiert.

Die Resultate sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Für die Einwaagen mit Zugabe von 0,5 mg/kg Standardsubstanz haben wir die Ausbeuten von 81,0, 91,8 und 83,4% für DDT, DDE und HCH gefunden.

In einem Versuch haben wir festgestellt, wie die Verluste von Insektiziden mit der Art der Abdampfung des Lösungsmittels zusammenhängen. In 50 ml des Eluenten haben

*Tabelle 2*

Ausbeute der Methode

| Insektizid | Zahl der Messungen $N$ | Flächen der chromatographischen Wellen [cm²] | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Standard (0,15 µg/ml) | Butter + + 0,5 mg/kg Standard | Butter ohne Standard | Ausbeute [%] |
| *p,p'*-DDT | 5 | 0,211 | 0,392 | 0,221 | 81,0 |
| *p,p'*-DDE | 5 | 0,696 | 1,080 | 0,441 | 91,8 |
| HCH | 5 | 0,242 | 1,223 | 1,022 | 83,4 |

wir als Standardstoffe *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE und *γ*-HCH in einer Konzentration von 0,4 μg/ml aufgelöst und die Lösung auf drei Arten abgedampft (Tabelle 3). Der trockene Rückstand wurde in 1 ml *n*-Heptan gelöst und der Insektizidgehalt gaschromatographisch

*Tabelle 3*

Verluste der chlororganischen Insektizide bei Abdampfung des Lösungsmittels

| Insektizid | Ausbeute [%] | | |
|---|---|---|---|
| | *1* | *2* | *3* |
| DDT | 98,7 | 97,0 | 96,0 |
| DDE | 98,7 | 95,0 | 101,0 |
| *γ*-HCH | 89,0 | 60,0 | 4,8 |

*1.* Abdampfen in einem Rotationsvakuumabdampfer gerade zur Trockene.
*2.* Abdampfen in einem Rotationsvakuumabdampfer zur Trockene mit weiterer Erwärmung des trockenen Rückstandes 5 Minuten im Vakuum bei 50°C.
*3.* Freies Abdampfen in der Luft bis zur Trockene (24 Stunden).

bestimmt. Aus den erhaltenen Resultaten sieht man, daß die Verluste beim Abdampfen in einem Rotationsvakuumabdampfer am geringsten sind, wenn man nach unserem Verfahren nur eben zur Trockene eindampft. Bei weiterer Erwärmung des Abdampfrück-

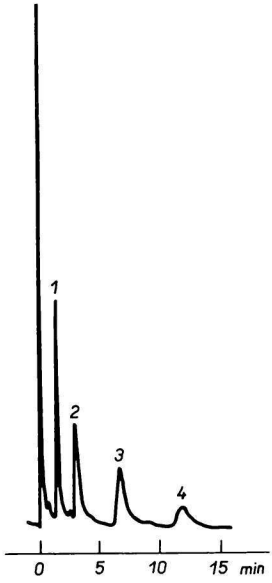


*Abb. 1.* Gaschromatogramm der Standards von Insektiziden (5 . $10^{-9}$ g). *1.* Gemisch von Isomeren HCH; *2.* nicht identifiziertes Peak vom Lösungsmittel; *3.* *p,p'*-DDE; *4.* *p,p'*-DDT.

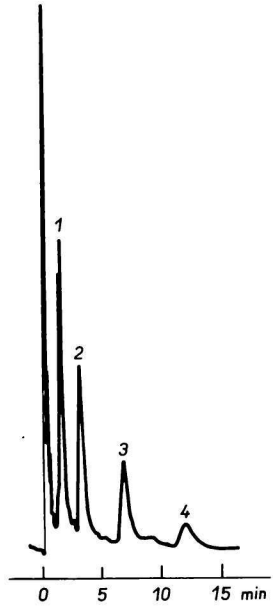


*Abb. 2.* Gaschromatogramm der Rückstände von einer Butterprobe ohne Zugabe von Standards. *1.* Gemisch von Isomeren HCH; *2.* nicht identifiziertes Peak vom Lösungsmittel; *3.* *p,p'*-DDE; *4.* *p,p'*-DDT.

stands vergrößern sich die Verluste an DDT und DDE nur wenig, aber bei $\gamma$-HCH (Lindan) erreichen sie 20% und beim freien Abdampfen in der Luft sind die Verluste an $\gamma$-HCH größer als 90%.

Die gaschromatographischen Aufzeichnungen, welche die Verteilung der Standardsubstanzen und die gefundenen Rückstände in einer Butterprobe ohne Zugabe der Insektizide veranschaulichen, zeigen wir auf Abb. 1 und 2.

## Diskussion

Der methodische Arbeitsgang wurde hauptsächlich mit der Absicht ausgearbeitet aus möglichst kleinsten Einwaagen ein einstufiges Isolationsverfahren der Probe (Extraktion und Reinigung in einer Operation) zustande zu bringen. Zum Unterschied von den bisherigen mehrstufigen Reinigungsmethoden [7, 8, 14], war es in dem von uns ausgearbeiteten Arbeitsgang nicht notwendig, eine weitere Reinigung durch Ausschütteln mit Acetonitril einzuführen. Dabei wurde die große Empfindlichkeit der Gaschromatographie in dem Maß ausgenützt daß die Empfindlichkeit der Insektizidbestimmung den realen Grenzen ihres Vorkommens in biologischem Material entsprach.

Nach vorliegender Methode kann man die Rückstände folgender chlororganischer Insektizide: HCH, DDE, DDD, DDT, Heptachlor, Heptachlorepoxid, Dieldrin und Endrin bestimmen. Außer der hier angeführten Verwendbarkeit eignet sich die Methode auch für die Bestimmung der Rückstände in anderen Fetten und allgemein auch im biologischen Material, wo oft nur kleine Proben zur Verfügung stehen. Dabei garantiert die Anwendung von Florisil, zum Unterschied von anderen Adsorbenten [9], einen guten Reinigungseffekt bei Fetten auch in Gegenwart von verschiedenen Kombinationen der chlorierten Insektiziden.

Die gleiche Wirkung kann man bei der Entfernung von Fetten auch durch Anwendung einer Celitsäule erreichen [13—15], vorausgesetzt, daß die Probe keine gegen saueres Milieu empfindliche Rückstände enthält (Aldrin, Dieldrin, Endrin).

Die Genauigkeit und Ausbeute wurden von uns nur für drei Hauptrepresentanten der Rückstände, die bei uns jetzt in Betracht kommen, und zwar für DDT, DDE und HCH bestimmt.

Zur Orientierung haben wir auch die Empfindlichkeit der Apparatur bei Benützung eines Elektroneneinfangsdetektors untersucht, die für HCH $10^{-11}$ g und für DDT und DDE $10^{-10}$ g betrug. Bei diesen Mengen haben wir Peaks erhalten, die noch höher als 5 mm waren.

Aus der Prüfung der Genauigkeit dieser Methode geht hervor, daß DDT den ungünstigsten Variationskoeffizienten zeigt. Das ist durch die niedrige und breitere Form des Peaks auf den chromatographischen Aufzeichnungen verursacht. Dies trift auch bei der Bestimmung der Ausbeute des DDT zu. Um dieses zu bestätigen, haben wir die Ausbeute auch bei einer größeren Zugabe des Standards (1,0 p. p. m.) bestimmt und dabei erreichten wir die Ausbeute von 92,4%, was wesentlich höher ist, als bei einer Zugabe von 0,5 p. p. m. (81,0%).

Bei der Bestimmung von Rückständen im biologischen Material kann man eine Ausbeute über 75% als gut bezeichnen [16, 19]. In diesem Zusammenhang muß man beim beschriebenen Arbeitsgang erwähnen, daß es sich nur um die zur ganzen Einwaage in der Menge von 0,15 $\mu$g zugegebenen Standardstoffe handelte.

Beim Vergleich verschiedener Abdampfungsverfahren sind die Verluste an Lindan, wahrscheinlich durch seinen hohen Dampfdruck verursacht, der bei 20°C $9{,}4 \cdot 10^{-6}$

Torr beträgt, während er bei *p,p'*-DDT bei 20°C nur 1,9 . $10^{-7}$ Torr erreicht. Ähnliche Resultate hat auch *Burke* [3] bekommen, der aber keinen Vakuumabdampfer benutzte und daher beim Lindan keine kleineren Verluste als 20% erreicht hatte.

Bei HCH kann man nach dieser Methode eine Trennung der Isomere nicht erreichen, deswegen haben wir die analytischen Kriterien für Gesamt-HCH bestimmt. Dieser Umstand ist in Übereinstimmung mit den Arbeiten, welche sich mit der Trennung der HCH-Isomeren befassen [17—19]. Mit dieser Problematik haben wir uns auch beschäftigt [20].

Wir beschäftigten uns auch mit der Regeneration des Florisils und der diesbezügliche Arbeitsgang ist anderswo veröffentlicht worden [21].

Da keine Proportionalität zwischen einer Verminderung der Probeeinwaage für die Analyse und dem Einfluß des Hintergrundes (koextrahierten Ballaststoffen) oder der Verunreinigung (z. B. mit Biphenylen) besteht, empfehlen wir in der Praxis Kontrollanalysen von einem Teil des Extraktes auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie [22] durchzuführen. Mit dieser Methode haben wir auch die hier angeführten Resultate bestätigt.

## Literatur


1. Watts J. O., Klein A. K., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* ***45***, 102 (1962).
2. McCully K. A., McKinley W. P., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* ***47***, 652 (1964).
3. Burke J. A., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* ***49***, 999 (1966).
4. Henly R. S., Supina W. R., *J. Agr. Food Chem.* ***14***, 667 (1966).
5. Johnson Y. L., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* ***48***, 668 (1965).
6. Radomski J. L., Rey A., *J. Chromatogr. Sci.* ***8***, 108 (1970).
7. Mills P. A., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* ***42***, 734 (1959).
8. Dénes A., *Die Nahrung* ***6***, 48 (1962).
9. Samuel B. L., Hodges H. K., *Residue Rev.* ***17***, 35 (1967).
10. Wood F. N., *Analyst* (London) ***94***, 399 (1969).
11. Langlois B. E., Stemp A. R., Liska B. J., *J. Agr. Food Chem.* ***12***, 243 (1964).
12. Malone B., Buvee J. A., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* ***49***, 1003 (1966).
13. Dawidow B., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* ***33***, 130 (1950).
14. Sergeant G. A., Wood R., *Analyst* (London) ***84***, 423 (1959).
15. Dénes A., *Egészségtudomány* ***11***, 158 (1967).
16. Bátora V., persönliche Mitteilung, 1970.
17. Gaul J. A., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* ***49***, 389 (1966).
18. Guillemin C. L., *Anal. Chim. Acta* ***27***, 213 (1962).
19. Bro-Rasmusen F., Rodin F., Voldum-Clausen K., *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* ***138***, 276 (1968).
20. Uhnák J., Sackmauerová M., Szokolay A., Maďarič A., *Chem. Zvesti*, im Druck.
21. Szokolay A., Maďarič A., Uhnák J., Sackmauerová M., *Acta Hygienica* ***18***, die Beilage Nr. 2, 3 (1970).
22. Szokolay A., Maďarič A., *J. Chromatogr.* ***42***, 509 (1969).


Übersetzt von A. Igumnová