

Gaschromatographische Bestimmung der Rückstände der Isomere von 1,2,3,4,5,6-Hexachlorzyklohexan im Milchfett

J. UHNÁK, M. SACKMAUEROVÁ, A. SZOKOLAY und A. MAĎARIČ

*Forschungsinstitut für Hygiene,
882 01 Bratislava*

Eingegangen am 1. Oktober 1971

Zur Publikation angenommen am 22. Mai 1972

Gewidmet dem Professor Ing. S. Stankoviánsky zu seinem 65. Geburtstag

Es wurde eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von α -, β -, γ - und δ -HCH-Isomeren nach einem Vergleich ihrer Trennung auf stationären Phasen von Silikonölen bzw. Fetten XE-60, DOW-11, OV-17 und QF-1 ausgearbeitet. Die beste Trennung wurde auf einer Mischsäule von 1,5% OV-17 mit 2,0% QF-1 auf Chromosorb W erreicht, auf welcher sich die genannten HCH-Isomere und auch DDT und seine Metabolite trennen lassen.

Die Genauigkeit der Methode ausgedrückt durch die Standardabweichung wurde im Bereich von $\pm 0,017$ bis $\pm 0,004$ mg/kg und der Variationskoeffizient — von 3,00 bis 10,42% bewertet.

Es wurde ein Einfluß von verschiedenen Arten der Abdampfung von Extrakten und Eluaten bei der Reinigung der Proben auf die Ausbeute für alle vier HCH-Isomere festgestellt. Mit der standardisierten Art der Abdampfung kann bei einzelnen Isomeren eine Ausbeute von 85,6 bis 98,5% erreicht werden.

A method has been developed for the estimation of the α , β , γ , and δ isomers of hexachlorocyclohexane by gas chromatography. This method is based on the separation of these substances on stationary phases: XE-60, DOW-11, OV-17, and QF-1. The best separation was obtained on a column containing the mixed filling: 1.5% OV-17 with 2.0% QF-1 on Chromosorb W. In this column the above isomers of hexachlorocyclohexane as well as DDT and its metabolites can be separated.

The accuracy of this method expressed by standard deviation ranges from ± 0.017 to ± 0.004 mg/kg, the variation coefficient varies between 3.00 and 10.42%.

The effect of various condensation procedures applied to the extracts and eluates obtained after the purification of samples on yield has been established for all four isomers of hexachlorocyclohexane. The standard condensation method allows to attain the yield of 85.6—98.5% for each isomer.

Von den chlorierten Kohlenwasserstoffen wird außer dem DDT das γ -Isomer des 1,2,3,4,5,6-Hexachlorzyklohexans (γ -HCH, γ -BHC oder Lindan) am meisten als Insektizid verwendet. Es besitzt eine geringere Persistenz im Boden als DDT [1] und nach einigen Literaturangaben auch eine kleinere Kumulationsfähigkeit im Körper von hö-

heren Organismen [2]. Seine Anwendung als Insektizid in der Landwirtschaft und im Haushalt hat nach der Verwendungsbeschränkung bzw. dem Verbot von DDT in mehreren Ländern nicht aufgehört.

Für insektizide Zwecke werden bei uns mehrere Präparate verwendet und zwar mit Lindangehalt und in beschränktem Maße mit Gehalt von technischem HCH, welches vor allem folgende Stereoisomere enthält [3]: α (55–70%), β (5–16%), γ (10–15%), δ (6–10%), ϵ (3–5%). Die stärkste insektizide Wirkung hat das γ -Isomer, welches zum Unterschied von den anderen Isomeren und den Nebenprodukten geruchlos ist. Nach der Behandlung geht der Geruch von HCH sehr oft in die landwirtschaftlichen Produkte über.

Aus den angeführten Gründen geht es klar hervor, daß das Interesse der Analytiker nicht nur auf die Rückständebestimmung des gesamten HCH, sondern auch auf seine Isomere gerichtet ist. In der Literatur haben wir nur wenige Arbeiten gefunden, die sich mit dieser Problematik befassen [4–6].

Über die Probleme der Extraktion und Reinigung der Proben und der Bestimmung mittels Gaschromatographie in Kombination mit der Dünnschichtchromatographie haben wir in früheren Arbeiten [5, 7, 8] berichtet. Dabei haben wir auf die Schwierigkeit hingewiesen, die HCH-Isomere neben anderen chlorierten Insektiziden gaschromatographisch zu bestimmen.

Nach *Gaul* [6] besitzen die Isomere α , γ und δ ungefähr die gleiche Elektronenaffinität zum Unterschied vom β -Isomer, welches deswegen eine niedrigere chromatographische Welle auf dem Elektroneneinfangsdetektor zeigt. *Rasmussen* [9] hatte nur die Isomere γ und α im Milchfett auf zwei Säulen bestimmt. Mit der gaschromatographischen Bestimmung von Lindan in Lebensmitteln befaßten sich auch *Knoll* und *Engst* [10], aber über die übrigen Isomere haben sie in ihrer Arbeit nichts erwähnt. *Thompson* u. Mitarb. [11] haben gefunden, daß Mischsäulen mit verschiedenen polaren stationären Phasen eine gute Trennungsfähigkeit für Isomere haben. Auf die Wichtigkeit des Abdampfungsverfahrens der Extrakte bei der Lindanbestimmung wiesen *Chiba* und *Morley* hin [12].

In der vorliegenden Arbeit haben wir beabsichtigt die Rückstände von einzelnen HCH-Isomeren im Milchfett gaschromatographisch zu trennen und zu bestimmen. Die Proben wurden nach dem von uns beschriebenen einstufigen Arbeitsgang der Extraktion und Reinigung [7] vorbereitet.

Experimenteller Teil

Die Beschreibung der Methode, Chemikalien und Lösungsmittel, Einrichtung und Apparate sieh *Szokolay* u. Mitarb. [7]. Ferner:

Glassäulen $180 \times 0,3$ cm.

Füllung: stationäre Phasen (in Chloroform)

a) 2-Gew% Silikonfett SE-30.

b) 2-Gew% Silikonöl XE-60.

c) 5-Gew% Silikonöl XE-60.

d) Gemisch von 1,5-Gew% Silikonfett OV-17 mit 2% Trifluorsilikonfett QF-1 (in Azeton) werden auf den Träger Chromosorb W (80/100 Mesh) aufgetragen.

e) 5-Gew% Silikonfett DOW-11 auf Aeropack-30 (80/100 Mesh) nach der Fa. Varian AG.

— Säulentemperatur 160°C (bei der Füllung d 200°C).

— Detektortemperatur 160°C (bei der Füllung d 200°C).

— Einspritzraumtemperatur 180°C (bei der Füllung d 220°C).

- Durchfluß des N₂ 60 ml/min (bei der Füllung *d* 100 ml/min).
- Spannung im Detektor 70 V.
- Geschwindigkeit des Registriergeräts 0,5 cm/min.

Arbeitsgang

Die Extraktion und die Reinigung der Milchfettproben wurden schon ausführlich beschrieben [7]. Hier geben wir nur das Bestimmungsverfahren für HCH-Isomere an.

Aus einer auf 1–5 ml eingedampften Probe (je nach dem vorausgesetzten Insektizidgehalt) spritzen wir 1 μ l unter oben angeführten Bedingungen in den Apparat ein.

Den Rückstandsgehalt berechnet man durch Vergleichung von Peakhöhen mit einer Kalibrationslinie; diese wird wegen der linearen Abhängigkeit mindestens aus drei Konzentrationen (für α -, γ - und δ -HCH im Bereich 0,18–0,03 μ g/ml; für β -HCH 0,6–0,15 μ g/ml) von Standardmischungen verfertigt.

Die Genauigkeit und die Ausbeute der Methode wurden nach dem beschriebenen Verfahren [7] bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die gaschromatographische Methode eignet sich bei der Verwendung der stationären Phase 2% SE-30 für die Trennung und Bestimmung von DDT und seiner Metaboliten, aber die HCH-Isomere lassen sich auf diese Weise nicht trennen [7]. Auch andere Autoren

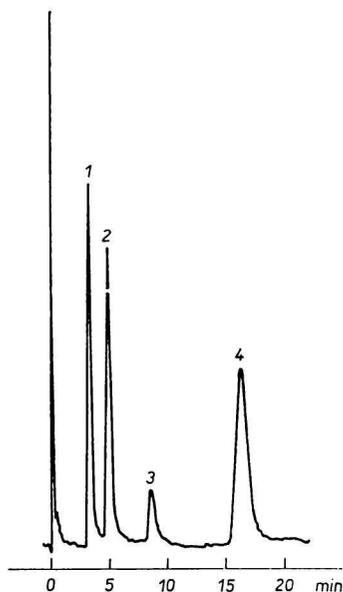


Abb. 1. Trennung der Standards von HCH-Isomeren auf einer Säule mit stationärer Phase 2% XE-60.

1. α -HCH; 2. γ -HCH; 3. nicht identifizierter Peak; 4. β + δ -HCH.

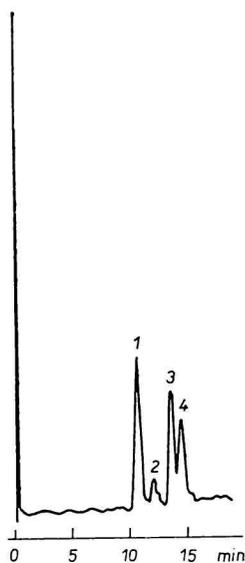


Abb. 2. Trennung der Standards von HCH-Isomeren auf einer Säule mit stationärer Phase 5% DOW-11.

1. α -HCH; 2. β -HCH; 3. γ -HCH; 4. δ -HCH.

haben sich mit diesem Problem beschäftigt [6, 9, 10], doch eine optimale Trennung aller Isomere wurde dabei nicht erreicht.

Wir haben versucht die HCH-Isomere durch Verwendung von mehreren stationären Phasen zu trennen; für Modellversuche wurde dabei das Butterfett benutzt. Auf der Säule mit dem Silikonöl XE-60 wurden die Isomere α und γ gut getrennt, während die

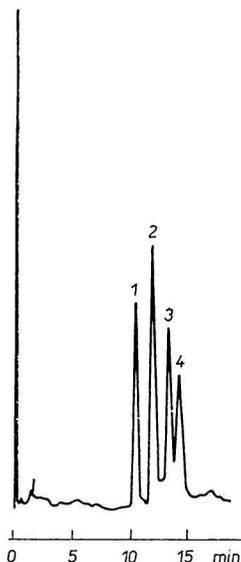


Abb. 3. Trennung der HCH-Isomere nach Zugabe (1 $\mu\text{g/g}$) zum Milchfett auf einer Säule mit stationärer Phase 5% DOW-11.
1. α -HCH; 2. β -HCH (zusammen mit einem unbekanntem Koextrakt);
3. γ -HCH; 4. δ -HCH.

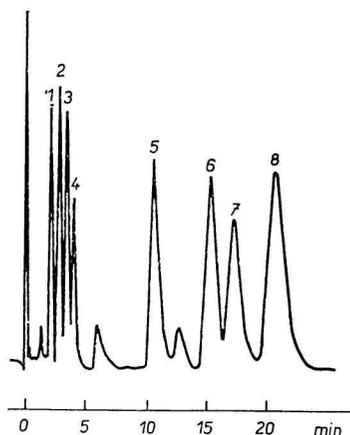


Abb. 4. Trennung der Standards von HCH-Isomeren in Gegenwart von DDT und seiner Metaboliten auf einer Säule mit stationärer Phase — einem Gemisch von 1,5% OV-17 mit 2% QF-1.

Die Menge der Insektizide in $\mu\text{g/ml}$:
1. α -HCH 0,12; 2. γ -HCH 0,18; 3. β -HCH 0,60; 4. δ -HCH 0,12; 5. *p,p'*-DDE 0,60; 6. *o,p'*-DDT; 7. *p,p'*-DDD; 8. *p,p'*-DDT für alle 1,20.

Isomere β und δ einen gemeinsamen chromatographischen Peak gaben (Abb. 1). Es gelang uns nicht alle vier Isomere weder durch Temperatur noch durch Druckänderung des Trägergases zu trennen. Dies gelang auf der Säule mit 5% Silikonfett DOW-11 (Abb. 2), aber in Milchfettproben konnte man das β -Isomer wegen Koinzidenz mit einem unbekanntem Koextrakt nicht quantitativ bewerten (Abb. 3).

Vom praktischen Standpunkt kann man diese Trennung als genügend betrachten, da nach unseren Erfahrungen die Isomere β und δ im Milchfett nur in kleinen Mengen enthalten sind. In anderen biologischen Materialien gewinnen auch diese Isomere eine Bedeutung [13]. Aus diesem Grunde haben wir eine Mischsäule von Fluorsilikon — Silikonfett (1,5% OV-17 mit 2,0% QF-1) verwendet, welche sich für die Trennung von vier HCH-Isomeren als die geeignetste erwies hatte. Das auf Abb. 4 dargestellte Chromatogramm wurde um die gleiche Peakhöhe zu erreichen mit verschiedenen Mengen einzelner Substanzen, ihrer Elektronenaffinität am angewandten Detektor entsprechend, verfertigt. Dabei wurde bewiesen, daß die Trennung auch in Anwesenheit von DDT und seiner Metaboliten im Milchfett sehr gut war (Abb. 5).

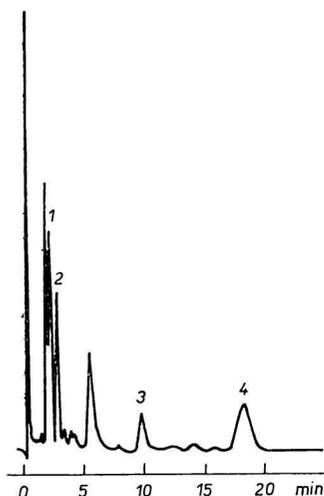


Abb. 5. Trennung der anwesenden Rückstände von HCH-Isomeren, DDT und DDE im Milchfett auf einer Säule mit stationärer Phase – einem Gemisch von 1,5% OV-17 mit 2% QF-1.

1. α -HCH; 2. γ -HCH; 3. p,p' -DDE; 4. p,p' -DDT.

Mit Hilfe unserer Methode haben wir *Gaul's* Angaben [6] über die Elektronenaffinität von HCH-Isomeren ergänzt. Die Isomere gaben nach unseren Messungen die gleiche Peakhöhe auf dem Elektroneneinfangsdetektor bei den folgenden Konzentrationen in $\mu\text{g/ml}$: α – 0,030, β – 0,150, γ – 0,045 und δ – 0,060. Demzufolge sinkt die Elektronenaffinität in folgendem Verhältnis ab

$$\alpha > \gamma > \delta > \beta \quad (1 : 1,5 : 2 : 5).$$

In der für uns erreichbaren Literatur haben wir Angaben über objektive Kriterien für die HCH-Bestimmung im Milchfett nur für das γ -Isomer gefunden [9]. Deswegen haben wir für vier Isomere die Empfindlichkeit der Messung, die Genauigkeit und die Ausbeute der benutzten Methode bestimmt.

Für die Bestimmung der Empfindlichkeit der Messung benutzten wir einen Extrakt aus einer 0,3 g Einwaage von Milchfett, welchen wir auf ein Volumen von 1 ml einengten. Bei allmählicher Verdünnung der ursprünglichen Lösung fanden wir, daß es bei den Isomeren α und γ möglich war bei einer Wellenlänge von 3 cm (12% Ausschlag des Registriergeräts) noch 0,0001 mg/kg, d. h. $3 \cdot 10^{-11}$ g in einer 0,3 g Einwaage mit einer Genauigkeit der Methode nach Tabelle 1 zu bestimmen.

Tabelle 1

Fehler der Bestimmungsmethode von HCH-Isomeren im Milchfett

Insektizid	Zahl der Messungen n	Arithmetisches Mittel \bar{x} (mg/kg)	Standardabweichung S_x (mg/kg)	Standardfehler S_z (mg/kg)	Variationskoeffizient (%)
α -HCH	10	0,3330	$\pm 0,0100$	$\pm 0,0041$	$\pm 3,00$
β -HCH	10	0,0960	$\pm 0,0100$	$\pm 0,0018$	$\pm 10,42$
γ -HCH	10	0,1088	$\pm 0,0044$	$\pm 0,0041$	$\pm 4,04$
δ -HCH	10	0,4850	$\pm 0,0173$	$\pm 0,0071$	$\pm 3,57$

Tabelle 2

Ausbeute der Methode

Insektizid	Zahl der Messungen <i>n</i>	Gehalt von Insektiziden in mg/kg		Ausbeute (%)
		Butter ohne Standard	Butter + 0,3 µg Standard	
α-HCH	10	0,334	1,190	85,6
β-HCH	10	0,109	0,987	87,6
γ-HCH	10	0,097	1,010	91,3
δ-HCH	10	0,048	1,033	98,5

Tabelle 3

Verluste von HCH-Isomeren bei verschiedenen Arten der Abdampfung des Lösungsmittels

Insektizid	Verluste (%)		
	1	2	3
α-HCH	11,0	41,5	38,0
β-HCH	7,0	30,0	42,0
γ-HCH	3,5	8,0	31,5
δ-HCH	2,5	10,0	35,0

1. Abdampfen in einem Rotationsvakuumabdampfer „genau zur Trockne“ bei 50°C.
2. Abdampfen laut 1, weitere Erwärmung 3 Minuten des trockenen Rückstands.
3. Abdampfen in einem Stickstoffstrom.

Die Ergebnisse der Ausbeute für vier HCH-Isomere sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Art der Einengung der Extrakte beeinflusst die Ausbeute der Methode beträchtlich [7, 12], aber wir hatten für die vier HCH-Isomere noch keine Angaben zur Verfügung. Diese haben eine höhere Dampftension, als andere chlorierte Insektizide, z. B. α — $1,5 \cdot 10^{-5}$, γ — $9,4 \cdot 10^{-6}$ mmHg bei 20°C, im Vergleich mit DDT — $1,9 \cdot 10^{-7}$ mmHg bei 20°C [15]. Deswegen haben wir die drei allgemein angewandten Abdampfungsarten überprüft (Tabelle 3). Die Resultate bewiesen, daß es außerordentlich wichtig war die Extrakte bei allen vier HCH-Isomeren mittels eines Vakuumabdampfers „genau zur Trockne“ einzudampfen. Eine Verlängerung der Abdampfung sogar schon um 3 Minuten, und hauptsächlich die Abdampfung in einem Stickstoffstrom, können große Verluste bei allen vier Isomeren verursachen. Damit erreicht man eine Standardisierung der Bedingungen für die Verdünnung kleiner Volumen, was bei der Mikroanalytik der Insektizidrückstände sehr wichtig ist. Dieses Abdampfverfahren haben wir auch bei der Bestimmung der Ausbeute dieser Methode verwendet.

Unsere Erfahrungen [7], ebenso wie die Erkenntnisse anderer Autoren [14, 15] beweisen, daß die gaschromatographische Identifizierung der Rückstände von chlorierten Insektiziden auch dünn-schichtchromatographisch kontrolliert werden muß. Dies ist wegen der Koinzidenz von Artefakten aus Koextrakten und Verunreinigung mit poly-chlorierten Biphenylen und Naphthalinen aus der Umwelt nötig.

Für die Ermöglichung einiger Versuche danken wir Herrn Doz. Ing. J. Kováč, CSc.

Literatur

1. Nash, R. G. und Woolson, E. A., *Science* **157**, 925 (1967).
2. Maréchal, G. und Demozay, D., *Deut. Milchwirtschaft* **21** (33) (1970).
3. Daasch, J., *Anal. Chem.* **19**, 779 (1947).
4. Kovács, M. F., *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* **46**, 884 (1963).
5. Szokolay, A. und Mađarič, A., *J. Chromatogr.* **42**, 509 (1969).
6. Gaul, J. A., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **49**, 389 (1966).
7. Szokolay, A., Uhnák, J. und Mađarič, A., *Chem. Zvesti* **25**, 453 (1971).
8. Szokolay, A., Uhnák, J., Mađarič, A. und Sackmauerová, M., *Průmysl Potravin* **11**, 349 (1971).
9. Bro-Rasmussen, F., Rodin, F. und Voldum-Clausen, K., *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **138**, 276 (1968).
10. Knoll, R. und Engst, R., *Z. Anal. Chem.* **227**, 424 (1967).
11. Thompson, J. F., Walker, A. und Mosemann, R. F., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **52**, 1263 (1969).
12. Chiba, M. und Morley, H. V., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **51**, 55 (1968).
13. Rosival, L., Szokolay, A., Uhnák, J., Arbetová, D., Mađarič, A., Sackmauerová, M. und Mahelová, H., *Referat auf der Konferenz über die epidemiologische Toxikologie der Pflanzenschutzmittel*, Jan Swammerdam Institute, Amsterdam, 8.—10. September 1971.
14. Bátora, V., persönliche Mitteilung, 1970.
15. Acker, L., *Referat auf dem Symposium über fremdartige Stoffe*, Zentralinstitut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke, 16.—17. Juni, 1971.

Übersetzt von A. Igumnová