

**Aus dem Institut für Tierernährung**

**Karl-Heinz Ueberschär  
Sven Dänicke  
Joachim Wolff**

**Gaschromatographische Bestimmung von Chlormequat  
in Silogetreide und Kleien**

Manuskript, zu finden in [www.fal.de](http://www.fal.de)

Published in: Landbauforschung Völkenrode 53(2003)1,  
pp. 37-42

**Braunschweig  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)  
2003**

## Gaschromatographische Bestimmung von Chlormequat in Silogetreide und Kleien<sup>1</sup>

Karl-Heinz Ueberschär<sup>2</sup>, Sven Dänicke<sup>3</sup> und Joachim Wolff<sup>4</sup>

### Zusammenfassung

Im Rahmen des vom BMVEL initiierten „Mühlenstaub-Projektes“ wurden von April 2000 bis März 2001 neben Mühlenstäuben etwa 100 Weizen- Roggen- und Kleieproben aus 16 Getreidemöhlen von der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (Detmold) gesammelt. Zur Messung des Gehaltes des im Getreideanbau verwendeten Wachstumsreglers Chlormequat (CCC) in den Proben wurde die gaschromatographische Methode von Allender (1992) modifiziert. Die Probenextrakte wurden nach Brüggemann und Ocker (1986a) gereinigt und die Messdaten nach dem „upper boundary“ Prinzip unter Einrechnung der vollen Nachweisgrenze von 0,06 mg CCC/kg ausgewertet.

Das zur Umwandlung des CCC in ein flüchtiges Produkt verwendete Derivatisierungsreagenz Pentafluorothiophenol ist nicht spezifisch und reagiert auch mit anderen Substanzen mit methylierenden Eigenschaften. Das in Pflanzen vorkommende Cholinchlorid und die Pflanzenschutzmittel Pirimiphos-methyl, Parathion-methyl, Dichlorvos und Malathion bildeten das gleiche Produkt wie CCC und reagierten etwa in gleichem Umfang, während O- und N-Methylcarbamate wie Carbendazim und Carbofuran und andere alkylierende Verbindungen wie das Begasungsmittel Methylbromid und Methyljodid nicht oder fast nicht reagierten. Cholinchlorid und die in Getreide und Reinigungsanfällen von Getreidemöhlen nachgewiesenen Rückstände von Pirimiphos-methyl, Malathion und Chlorpyrifos-methyl ließen sich durch die Probenreinigung mittels Chromatographie an Aluminiumoxid abtrennen.

Die Mediane von Weizen und der Roggenproben betragen 0,17 und 0,26 mg CCC/kg. CCC konzentriert sich in den Randschichten des Getreidekorns. Deshalb hatte Weizenkleie mit CCC-Gehalten von 0,57 mg/kg mehr als 3-fach höhere Werte, während Roggenkleie mit 0,38 mg/kg weniger belastet war. Die geringere Kontamination der Roggenkleie ließ sich mit der schlechteren Abtrennung der Randschichten des Roggens im Vergleich zum Weizen durch die Reinigungsvorgänge in der Mühle erklären.

*Schlüsselworte: Chlormequat, CCC, Bestimmung, Spezifität, Weizen, Roggen, Kleie*

### Abstract

#### Gaschromatic determination of Chlormequat in silo cereals and bran

In the frame of the project “dusts from cereal mills” initiated by the ministry of consumer protection, food and agriculture (BMVEL) which lasted from April 2000 to March 2001 besides byproducts from cereal mills approximately 100 wheat, rye and bran samples out of 16 mills were collected by the federal centre of cereal, potatoes and fat research (Detmold). The GC-method of Allender (1992) was modified to measure the concentration of the plant growth regulator chlormequat (CCC) in the samples. The sample extracts were cleaned according to the method of Brüggemann und Ocker (1986a). The data were evaluated with a limit of detection of 0,06 mg CCC/kg using the “upper boundary” principle.

The reagent pentafluorothiophenol which has been used for derivatisation of CCC into a volatile product reacts in a non-specific manner. Other substances with methylating properties react also. The naturally in plants occurring choline chloride and the plant protecting agents pirimiphos-methyl, parathion-methyl, dichlorvos and malathion formed the same product and reacted about to the same degree as CCC, whereas of the O- and N-methyl carbamates as carbendazim and carbofuran and other alkylating compounds as the fumigant methyl bromide and methyl iodide no or small amounts of products were formed. Cholin chloride and the residues of pirimiphos-methyl, malathion and chlorpyrifos-methyl analysed in the byproducts of cereal mills could be separated by the cleaning method for the samples using chromatography on alumina oxide.

The medians of wheat and of the 8 rye samples amounted to 0.17 and 0.26 mg CCC/kg. CCC is concentrated in the outer layers of the grain. Therefore wheat bran with CCC concentrations of 0.57 mg/kg has threefold higher values, whereas rye bran with 0.38 mg/kg is contaminated relatively less. The lower contamination of rye bran can be explained with the inferior separation of the outer layers of rye in relation to wheat at the separation processes in the mill.

*Keywords: chlormequat, CCC, determination, specificity, wheat, rye, bran*

<sup>1</sup> Nach einem Poster anlässlich des 114. VDLUA-Kongresses vom 16.-20.09.2002 in Leipzig

<sup>2</sup> Institut für Tierschutz und Tierhaltung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Dörnbergstr. 25-27, 29223 Celle

<sup>3</sup> Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

<sup>4</sup> Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF), Schützenberg 12, 32756 Detmold

## 1 Einleitung

Die quartäre Ammoniumverbindung Chormequat (Chlorcholin-chlorid, CCC) wird als Wachstumsregulator im Getreideanbau und zur Förderung der Fruchtentwicklung im Obst- und Gemüseanbau verwendet. In der Bundesrepublik ist das Mittel nur im Getreideanbau zugelassen und durch Höchstmengen gesetzlich geregelt (BMVEL, 2002). Es wird zur Halmfestigung in beträchtlichen Mengen hauptsächlich beim Anbau von Weizen, Roggen und Hafer verwendet. Durch die Verkürzung und Verdickung der Halme wird eine höhere Standfestigkeit erzielt und dem Umknicken und Lagern des Getreides mit seinen negativen Folgen (Erschwerung der Ernte, Aufnahme von Feuchtigkeit durch Bodenkontakt, Befall mit Schadorganismen) entgegengewirkt.

Das Mittel hatte Aufmerksamkeit erlangt durch dessen Nachweis in Birnen und Haferflocken von Babynahrung (BgVV, 2002). Der Mensch kommt vor allem über die Nahrung, z. B. durch Rückstände im Getreide, mit CCC in Kontakt. Indirekt können die Nahrungsmittel z. B. durch die Verwendung von kontaminiertem Stroh, das bei der Zucht von Speisepilzen verwendet wird, belastet werden (Siebers et al., 1991). Negative Auswirkungen der Chormequat-Rückstände in Futtermitteln und der Stroheinstreu auf die Fruchtbarkeit von Sauen wurde von Danielsen und Larsen (1992) berichtet. Bei höheren Gehalten im Futter wurden Rückstände in der Milch von Kühen gefunden und die Produktionsleistung von Legehennen sank (Tamir et al., 1995).

In dem vom BMVEL initiierten Projekt wurde untersucht, inwieweit Reinigungsanfälle, Nebenprodukte aus Getreidemöhlen und gereinigtes Getreide mit Chormequat kontaminiert sind. Dazu war eine einfach zu handhabende und empfindliche Analysenmethode erforderlich, um die zahlreichen Proben ohne größeren Aufwand bestimmen zu können.

CCC ist ein nicht flüchtiges, stark polares, kationisches Molekül ohne chromophore Gruppen, was seine Detektion erschwert. Die zur CCC-Bestimmung verwendeten Methoden sind die Photometrie (Sachse, 1977), die Dünnschicht-Chromatographie (Stijve, 1980; Brüggemann und Ocker, 1986a; Macht-Hansmann und Rexilius, 1991), die pyrolytische head-space GC (Greve und Hogendoorn, 1987; Pfeilsticker und Marx, 1978) und die GC nach Derivatisierung zur Umwandlung des Wirkstoffes in ein flüchtiges Produkt (Tafari et al., 1970; Allender, 1992). Diese Methoden haben jedoch den Nachteil unspezifisch zu sein und erfordern vor allem die sorgfältige Abtrennung der Störsubstanzen wie andere Ammoniumverbindungen, um falsch positive Resultate auszuschließen. Die in jüngerer Zeit publizierten LC-MS Verfahren (Juhler und Vahl, 1999; Mol et al., 2000; Hau et al., 2000; Riedicker et al., 2002) kombinierten die Abtrennung der Störsubstanzen durch LC mit der hochspezifischen und sensitiven Detek-

tion für nichtflüchtige Verbindungen durch MS. Der Nachteil liegt bei dem instabilen Messsignal und den hohen Kosten, weil neben der Ausrüstung z. B. deuteriertes CCC als interner Standard verwendet wird. Daher sind die MS-Verfahren eher als Bestätigungsmethode und nicht für die Routineanalytik mit zahlreichen Proben geeignet. Von den beschriebenen GC-Methoden schien die von Allender (1992) praktikabel für die erforderliche größere Probenzahl zu sein. Sie benötigt dazu keine speziellen Apparaturen oder Reagenzien und sollte wegen der Verwendung des empfindlichen EC-Detektors empfindlich genug sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Methode auf ihre Eignung zur Bestimmung von Chormequat in Getreide und Reinigungsanfällen aus Getreidemöhlen zu prüfen.

## 2 Material und Methoden

Die Proben stammten von 12-16 an den Untersuchungen beteiligten Getreidemöhlen aus ganz Deutschland und wurden bei vier Probeziehungen vom April 2000 bis März 2001 gewonnen. Das gelieferte Material wurde von der Bundesanstalt in Detmold gemahlen und homogenisiert und an die an dem Projekt beteiligten Anstalten verschickt. Es wurden 48 Proben Siloweizen, d. h. in der Getreidemühle gereinigter Weizen, der als Nahrungsmittel verwendet wird, und die gleiche Anzahl Weizenkleie analysiert, einem Nebenprodukt, das bei der Vermahlung des Siloweizens anfällt. Der Anteil Siloroggen und Roggenkleie war mit jeweils 8 Proben wesentlich niedriger.

Chormequat (CCC) wurde nach der Vorschrift von Brüggemann und Ocker (1986a) aus den Proben extrahiert. Die Reinigung des Probenextraktes wurde bis auf geringe Änderungen beibehalten. Die Derivatisierung des Messlösung erfolgte im wesentlichen nach den Vorschriften von Allender (1992) und Mortimer und Weber (1994).

5 g Probeneinwaage wurden mit dem Ultraturax homogenisiert (außer bei sehr feinkörnigen Proben), mit 60 ml Methanol über Nacht geschüttelt und dann vom Rückstand abfiltriert. Ein Extrakt-Aliquot wurde vorsichtig zur Trockne abgedampft und mit etwa 0,1 ml Wasser und 3 ml Dichlormethan aufgenommen. Anschließend wurden 3 g Aluminiumoxid (ICN, Alumina A, sauer mit 1,5 % Wasser) zugegeben. Das Gemisch bildete die obere Schicht einer mit 15 g Aluminiumoxid (Typ A mit 3 % Wasser) gefüllten Säule. Nach dem Waschen mit Dichlormethan-Aceton (1+1) wurde der Wirkstoff mit 120 ml Aceton-Methanol (95+5) eluiert. Cholinchlorid verblieb auf der Säule, was bei jeder neuen Charge des Füllmaterials kontrolliert wurde.

Das den Wirkstoff (1- 10 µg) enthaltene Eluat wurde bis fast zur Trockne eingeengt und das restliche Lösungsmittel vorsichtig mit Stickstoff entfernt. Der Rückstand wurde in 1950 µl Aceton gelöst und wurde nach Zugabe von 50 µl Pentafluorthiophenol (PFTP)-Lösung (20 mg

PFTP/ml Aceton, täglich frisch hergestellt) und 10 mg Kaliumcarbonat unter Stickstoff 60 min bei 100 °C in einem 10 ml Schraubdeckelgefäß mit Teflonseptum erhitzt. 50 µl des Reaktionsgemisches wurden in 1 ml n-Hexan ausgeschüttelt und danach zur Entfernung des überschüssigen Reagenzes mit 1ml methanolischer Natronlauge (wässrige NaOH/methanol. NaOH, 1+1, jeweils 1mol/l) erneut geschüttelt. 1µl der mit n-Hexan z. B. 1:6 verdünnten Hexanphase wurde gaschromatographisch (GC 3400 der Firma Varian) unter folgenden Bedingungen gemessen:

40 m Optima 1701 + 10 m DB5 Säule mit H<sub>2</sub> als Trägergas; Injektortemperatur: 230 °C; EC-Detektortemperatur: 320 °C; Temperaturprogramm: 65 °C 1 min; -180 °C mit 35 °C/min; -213 °C mit 3 °C/min; -270 °C mit 10 °C/min; 270 °C 3 min. Es wurde darauf geachtet, dass die zu jedem Derivatisierungsansatz bestimmten Reagenzblindwerte möglichst niedrig waren. Sie wurden zusammen mit den Eichkurven, die im Bereich 1-10 µg linear verliefen, zur Berechnung der Resultate verwendet.

Die Wiederfindung wurde durch 2,5-20 µg Zusätze zu unkontaminierten Proben ermittelt und betrug im Mittel 75 %. Die Analysenergebnisse sind auf Frischsubstanz bezogen und wurden nicht um die Wiederfindung korrigiert. Die Nachweisgrenze betrug bei 5 g Probeneinwaage 0,06 mg/kg, die aus einem 3-fachen Signal-/Rauschverhältnis geschätzt wurde. Probengehalte unterhalb der Nachweisgrenze wurden unter Einbeziehung der vollen Nachweisgrenze gerechnet. Der Sollwert von dem Labor nicht bekannten Proben wurde im Mittel bestätigt. Die hohe prozentuale Standardabweichung von etwa 30 % erforderte die mehrmalige Messung der Proben.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die in der Literatur beschriebenen GC-Methoden basieren z. B. auf der Bestimmung des aus Chlormequat pyrolytisch gebildeten Methylchlorids (Pfeilsticker und Marx, 1978) bzw. Acetylen (Greve und Hogendoorn, 1987) und erfordern spezielle Apparaturen. Außerdem wird das Pyrolyseprodukt Methylchlorid nicht nur von CCC, sondern auch von vielen anderen natürlich vorkommenden Stoffen und den stets anwesenden Chloridionen gebildet, wie Greve und Hogendoorn (1987) herausfanden. Dazu war die Pyrolyseausbeute niedrig und unzuverlässlich. Die Autoren schlagen die pyrolytische Bestimmung von Acetylen aus CCC im head-space GC-Verfahren vor, das bisher allerdings nur bei Birnen ausprobiert wurde und eine aufwendige Probenreinigung erforderte.

Ein weiteres GC-Verfahren erforderte zur Umsetzung des CCC in ein flüchtiges Derivat ein Reagenz, das kommerziell nicht erhältlich ist (Tafari et al., 1970). Deshalb erschien die GC-Bestimmung von Allender (1992) mit den von Mortimer und Weber (1994) angegebenen Änderungen geeignet, weil das käuflich erhältliche PFTP zur

Derivatisierung des CCC verwendet wurde, das die Erfassung durch den empfindlichen EC-Detektor gestattet und somit eine niedrige Nachweisgrenze des Wirkstoffs versprach. Der Einfluss der Reaktionszeit, der Temperatur und des Reagenzüberschusses auf die Fläche des CCC-Peaks sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:  
Derivatisierung von Chlormequat mit Pentafluorothiophenol (PFTP)

Zeit (min)	Rel. Fläche	Temp. (° C)	Rel. Fläche	PFTP/CCC	Rel. Fläche
10	0	60	2,3	0	0
20	6,9	70	1,1	5	0
30	25	80	9,1	10	2,8
40	51	90	95	20	7,0
50	66	100	81	40	68
60	80	110	93	60	98
70	100	120	100	200	85
80	97			400	89
90	94			1000	100
100	94				
90 °C; 60µg CCC; 2400 µg PFTP		70 min; 60 µg CCC; 2400 µg PFTP		70 min; 100 °C; 6 µg CCC	

Die verwendeten Derivatisierungsbedingungen unterschieden sich von den in der Literatur angegebenen vor allem in der um 15 Minuten verlängerten Reaktionszeit und einen mindestens 80-fachen PFTP-Überschuss zur CCC-Menge, die auf 10 µg begrenzt wurde. Notwendig war auch die Entfernung des überschüssigen Reagenzes durch das Natronlauge-Gemisch, um ein von störenden Nebenprodukten freies Chromatogramm zu erhalten.

Abbildung 1 zeigt die Chromatogramme einer Blindprobe und des CCC-Derivates. Bei dem Derivat dürfte es sich um einen dimeren Methylthioether handeln, wie aus den Angaben in der Literatur geschlossen wurde (Mortimer und Weber, 1994). Mit halbierten Retentionszeiten lässt sich das CCC-Derivat auch auf einer kürzeren Trennsäule wie z. B. einer 15 m Kapillarsäule Typ ZB-5 mit ausreichend Trennleistung bestimmen. Die Kalibrierungskurve des CCC-Standards verlief zwar linear im Bereich 1-10 µg, die Ordinate wurde aber im positiven Bereich geschnitten. Die Größe des Ordinatenabschnitts entsprach dem Blindwert, der sich in der Kontrolle als kleiner Peak in Abbildung 1 zu erkennen gibt. Der Blindwert wurde täglich bestimmt und in der Berechnung berücksichtigt. Verschmutzungen des Injektors könnten z. B. die Ursache einer Verschleppung und variabler Blindwerte gewesen sein. Die Korngröße und die Menge des zugegebenen Kaliumcarbonats beeinflussten die Reaktion nicht, während das Rühren des Gemisches, wie in der Vorschrift von den Autoren angegeben, die Menge an Nebenprodukten stark erhöhte.

Die hier angewandte gaschromatographische Methode erwies sich im Gegensatz zu den von Allender (1992) mit-

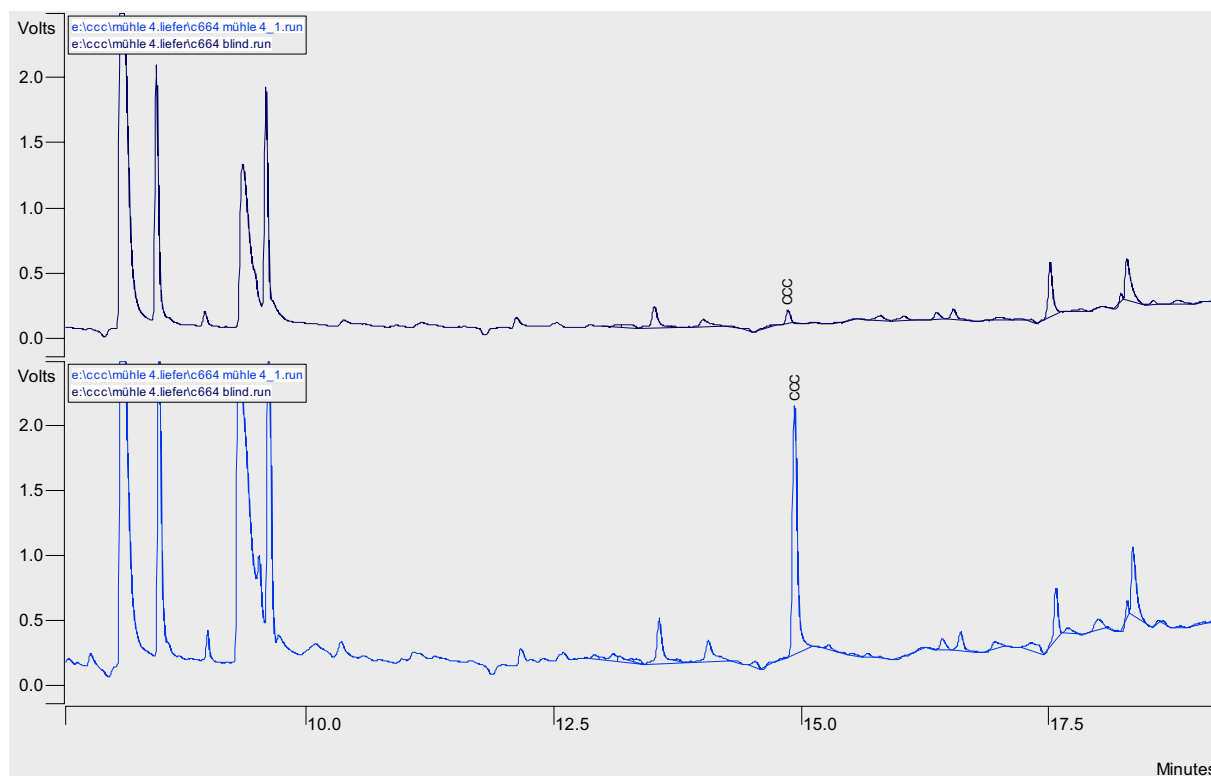


Abbildung 1:  
Gaschromatogramme des Pentafluorthiophenol-Derivates einer Blindprobe und einer Chlormequat-haltigen Getreideprobe

geteilten Ergebnissen nach den Untersuchungen von Mortimer und Weber (1994) als nicht spezifisch für Chlormequat. Die Bestimmung beruht auf einer allgemeinen Methylierungsreaktion des Derivatisierungsreagenzes Pentafluorthiophenol durch den Wirkstoff. Auch andere Verbindungen mit methylierenden Eigenschaften wie Tetramethylammoniumbromid und Parathionmethyl reagierten mit dem Reagenz und bildeten das gleiche Produkt. Von Chlormequat wurden neben dem monomeren Methylthioether durch Reaktion eines bzw. zweier weiterer PFTP-Moleküle das Dimer und das Trimer gebildet. Das Dimer war bei diesem Substrat das Hauptprodukt, das nach 15 Minuten detektiert und für die CCC-Bestimmung verwendet wurde (Abbildung 1). Der einfache Methylthioether war nicht nachweisbar und das Trimer eluierte als deutliches Maximum erst sehr spät von der Säule, wie durch Zusatzversuche und durch Vergleich mit den von Mortimer und Weber (1994) mitgeteilten GC-Daten geschlossen wurde.

In unseren Untersuchungen wurde die Reaktionsspezifität des Derivatisierungsreagenzes PFTP mit verschiedenen Substanzen bestimmt. Eine besondere Bedeutung kommt dem Cholin zu, das als quartäre Ammoniumverbindung dem CCC chemisch sehr ähnlich ist und in den pflanzlichen Proben als natürlicher Inhaltsstoff (Stiive, 1980; Greve und Hogendoorn, 1987) vorkommt. Dazu wurden Pflanzenschutzmittel aus der Gruppe der Phosphorsäure-,

der Thiophosphorsäuremethylester und der Methylcarbamate mit vermuteten alkylierenden Eigenschaften geprüft. In Tabelle 2 sind die gerundeten Werte der Messungen aus zwei Messreihen mit jeweils drei Substratkonzentrationen im Bereich 0,006-0,06  $\mu\text{mol}/2\text{ml}$  angegeben und auf Chlormequat = 100 % bezogen. Chlormequat und Cholin wurden als quartäre Trimethylammoniumverbindungen durch das Reagenz demethyliert. Tertiäre Dimethylamine wie Dimethylaminoethylchlorid reagieren nicht. Die Methylgruppe der meisten untersuchten Phosphorsäure- und Thiophosphorsäureester wurde im Vergleich zu Chlormequat gleich gut auf das Reagenz übertragen. Methamidophos und Chlorpyrifosmethyl reagierten wesentlich schlechter. Auch bei 10-fach höherer Konzentration reagierten Methylbromid und die O- und N-Methylcarbamate nicht mit PFTP. Eine Ausnahme machte Methyljodid, das in geringen Mengen umgesetzt wurde. Dimethylaminoethylchlorid, das bei der Derivatisierung mit PFTP durch Demethylierung aus Chlormequat entstand, wird nicht in einer folgenden Substitution des Chloratoms mit PFTP umgesetzt, was die spezifische Reaktion des Chlormequat ausmachen sollte, wie Allender (1992) fälschlich das Massenspektrum des Peaks des CCC-Derivates interpretiert hatte. Die Untersuchungen von Mortimer und Weber (1994) widerlegten den von Allender (1992) vorgeschlagenen für CCC spezifischen Reaktionsweg mit PFTP und zeigten, dass CCC durch

Tabelle 2:

Reaktionsspezifität von Pentafluorthiophenol (PFTP) mit methylierenden Verbindungen (Substanz: 0,006-0,06 µmole/2ml; PFTP: 5 µmole/2ml; 60 min, 100 °C in Aceton)

Substanz	Substanzklasse	Formel	Reaktion mit PFTP (%) Chlormequat = 100 %
Chlormequat	Trimethylammonium	Cl-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	100
Cholinchlorid	Trimethylammonium	OH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	40-60
Pirimiphos-methyl	O,O-Dimethylthiophosphat	RO-P=(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	80-110
Parathion-methyl	O,O-Dimethylthiophosphat	RO-P=(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	80-100
Dichlorvos	Dimethylphosphat	RO-P=(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O	70-90
Methamidophos	O,S-Dimethylthiophosphor- säureamid	H <sub>2</sub> N-P - (OCH <sub>3</sub> ) O \ (S CH <sub>3</sub> )	10-20
Malathion	O,O-Dimethyldithiophosphat	R S-P=(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	90-120
Chlorpyrifos-methyl	O,O-Dimethylthiophosphat	RO-P=(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	6
Methyljodid	Methylhalogen	J-CH <sub>3</sub>	< 5 *
Methylbromid	Methylhalogen	Br-CH <sub>3</sub>	0 *
Carbendazim	O-Methylcarbamate	R-NH-C=O (-OCH <sub>3</sub> )	0 *
Carbofuran	N-Methylcarbamate	R-O-C=O (-NH-CH <sub>3</sub> )	0 *
Dimethylaminoethyl-Cl	Tert.-Dimethylamin	Cl-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0 *

\* Substanz: 0,06-0,6 µmol/2ml Reaktionsgemisch

Abgabe der Methylgruppe mit PFTP reagierte. Die Autoren schlossen daraus, dass ebenso Verbindungen mit methylierenden Eigenschaften reagieren sollten. Die Messergebnisse in Tabelle 2 bestätigen diese Aussage für zahlreiche andere Phosphorsäure- und Thiophosphorsäuremethylester, wobei der Einfluss des weiteren Substituenten auf die Reaktion deutlich zu erkennen ist. O- und N-Methylcarbamate wurden unter den Bedingungen nicht demethyliert.

Von den in Tabelle 2 mit PFTP reagierenden Pflanzenschutzmitteln waren in Getreide und deren Nebenprodukten vor allem Rückstände von Pirimiphos-methyl, Malathion, Chlorpyrifos und Chlorpyrifos-methyl von Rabe (2002) nachgewiesen worden. Chlorpyrifos bildet als O,O-Diethylthiophosphat-Verbindung keine Methylether mit PFTP. Die störenden Verbindungen konnten durch Chromatographie an Aluminiumoxid (Brüggemann und Ocker, 1986,a) entfernt werden. Dazu wurde das Elutionsverhalten auf der Aluminiumoxidsäule mit 5 und 25 µg der genannten Verbindungen gemessen. Chlorpyrifos und Chlorpyrifos-methyl wurden ohne Derivatisierung gaschromatographisch bestimmt. Cholinchlorid konnte zu 100 %, Pirimiphos-methyl zu 80-90 %, Malathion zu 90-95 % und Chlorpyrifos-methyl wurde zu 80-90 % entfernt, so dass die Analytik nicht beeinträchtigt war.

Die GC-Methode von Allender (1992) wurde leicht modifiziert und zur Bestimmung von CCC in 48 bzw. 8 gereinigten Weizen- und Roggenproben und der gleichen Anzahl Kleieproben verwendet. Die Proben stammten aus

16 Getreidemöhlen von vier Probebeziehungen der Jahre April 200 bis März 2001. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der vier Probebeziehungen zusammengefasst. Angegeben ist die Zahl positiver Proben ( $n_{\text{pos}}$ ) d. h. oberhalb der Nachweisgrenze zur Gesamtzahl der Proben ( $n$ ). Der Anteil positiver Weizenproben ist mit 81 % etwa vergleichbar mit Angaben von 57 % für Proben mit Gehalten größer 0,05 mg/kg (Brüggemann und Ocker, 1986a; Juhler und Vahl, 1999). 83 % der Proben lagen nach den Angaben von Macht-Hansmann und Rexilius (1991) oberhalb von 0,1 mg/kg. Die Mediane und Mittelwerte der Getreide- und Kleieproben entsprachen den in der Literatur genannten CCC-Gehalten. Brüggemann und Ocker (1986a) gaben den durchschnittlichen Gehalt von 67 bzw. 118 Weizenproben aus den Jahren 1983 und 1984 mit 0,15 bzw. 0,08 mg/kg an. Auch die Mittelwerte von 33 bzw. 35 Weizenproben lagen mit 0,19 (Juler und Vahl, 1999) bzw. 0,3 mg/kg (Macht-Hansmann und Rexilius, 1991; nur pos. Proben) im gleichen Bereich.

Sowohl die Kleien von Weizen als auch die von Roggen waren im Vergleich zum Getreide 2-3 fach bzw. 1-2 fach höher mit CCC belastet. Das kann mit der Anreicherung des Wirkstoffs in den Randschichten des Getreidekorns erklärt werden, die beim Mahlvorgang entfernt werden und sich in den Kleien konzentrieren, wie auch Mahlvorversuche von Brüggemann und Ocker (1986b) ergeben hatten. Die Autoren fanden 70 % des Wirkstoffs in den Kleien und 30 % im Mehl wieder. Die geringere Anreicherung in Roggenkleie kann mit der schlechteren Entfer-

Tabelle 3:  
CCC-Gehalte in Getreide und Kleien der Jahre 2000 und 2001

	Weizen	Weizenkleie	Roggen	Roggenkleie
	mg/kg		mg/kg	
Min	0,06	0,06	0,06	0,17
Max	1,81	2,44	1,68	2,36
Median	0,17	0,57	0,26	0,38
Mittel	0,35	0,66	0,50	0,65
n* <sub>pos/n</sub>	39/48	46/48	7/8	8/8
* Nachweisgrenze von CCC: 0,06 mg/kg				

nung der Randschichten von Roggen in der Getreidemühle erklärt werden.

#### 4 Schlussfolgerungen

Die gaschromatographische Bestimmung von Chlormequat durch Derivatisierung mit Pentafluorthiophenol ist nicht spezifisch für CCC. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass neben der von Mortimer und Weber (1994) beschriebenen Reaktion mit Pirimiphos-methyl zahlreiche weitere Pflanzenschutzmittel aus der Gruppe der Phosphorsäure- und der Thiophosphorsäuremethylester mit dem Derivatisierungs-Reagenz reagierten. Die Wirkstoffe bildeten alle das gleiche Reaktionsprodukt, wahrscheinlich einen dimeren Methylthioether, der als Peak mit gleicher Retentionszeit wie das von CCC gebildete Derivat detektiert wurde. Gleiches gilt für Trimethylammoniumverbindungen. Methylbromid und die untersuchten O- und N-Methylcarbamate reagierten nicht. Diese die Analyse von CCC störenden Substanzen ließen sich durch die Reinigungsmethode nach Brüggemann und Ocker (1986a) entfernen.

Die Nachweisgrenze der gaschromatographischen Methode zur Analyse von Chlormequat betrug 0,06 mg/kg bei einer Probeneinwaage von 5 g und einer mittleren Wiederfindung von 75 %. Die Analysenmethode wurde zur Bestimmung von Chlormequat in etwa 100 Weizen-, Roggen- und Kleiprüfungen angewendet. Die mitgeteilten Resultate stimmten mit Angaben in der Literatur überein.

#### Danksagung

Herrn Karl-Heinz Kiemann und Frau Elke Albrecht wird sehr für ihre gewissenhafte Durchführung der Experimente und der Analysen gedankt.

Die CCC-Bestimmung in Mühlenprodukten ist Bestandteil des vom BMVEL geförderten Projektes „Untersuchungen an Nebenprodukten der Müllerei auf unerwünschte Stoffe“

#### Literatur

- Allender WJ (1992) Determination of chlormequat residues in cotton seed by gas chromatography. *Pest Sci* 35(3):265-269
- BgVV (2002) Chlormequat-Rückstände in Babynahrung : Stellungnahmen des BgVV vom Februar und Juli 2002 [online] . zu finden in < www.bgvv.de > / Pflanzenschutzmittel
- BMVEL (2002) Neunzehnte Verordnung zur Änderung der Futtermittelverordnung vom 21.01.2002. *Bundesgesetzblatt : Teil 1 2002:437-455*
- Brüggemann J, Ocker HD (1986a) Zur quantitativen dünnstichtchromatographischen Bestimmung des Wachstumsregulators Chlorcholinchlorid (CCC) in Getreide und Getreideerzeugnissen. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 10:113-119
- Brüggemann J, Ocker HD (1986b) Rückstandsverhalten des Wachstumsregulators CCC bei der Getreideverarbeitung. *VDLUFASchrR* 20:765-777
- Danielsen V, Larsen AE (1992) The influence of cereals treated with CCC, Cerone or Roundup on reproduction in pigs. In: 43. Annual Meeting EAAP : Madrid, Spain, 14.-17.9.1992 ; proceedings. Madrid : EAAP, pp P4.9
- Greve PA, Hogendoorn EA (1987) Determination of residues of chlormequat in pear after pyrolysis to acetylene. *Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent* 52:695-698
- Hau J, Riediker S, Varga N, Stadler RH (2000) Determination of the plant regulator chlormequat in food by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromat A* 878:77-86
- Juhler RK, Vahl M (1999) Residues of chlormequat and mepiquat in grain : results from the Danish national pesticide survey. *J AOAC Intern* 82:331-335
- Macht-Hansmann M, Rexilius L (1991) Occurrence of chlormequat residues in winter-wheat grains after application of registered plant growth regulators : results from Schleswig-Holstein (Harvest 1986). In: Baltes W, Eklund T (eds) *Strategies for food quality control and analytical methods in Europe : Vol 2*. Frankfurt a M : Lebensmittelchemische Gesellschaft, pp 866-872
- Mol HGJ, VanDam RCJ, Vreeken RJ, Steijger OD (2000) Determination of chlormequat in pears by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Intern* 83(3):742-747
- Mortimer RD, Weber DF (1994) Some comments on a recently proposed method of determining chlormequat residues by derivatization with pentafluorthiophenol. *Pestic Sci* 40(1):31-35
- Pfeilsticker K, Marx F (1978) Pyrolytisch-gaschromatographische Bestimmung von Chlorcholinchlorid. *Getreide, Mehl Brot* 32(10):268-272
- Rabe E (2002) Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, Detmold, persönliche Mitteilung
- Riediker S, Obrist H, Varga N, Stadler RH (2002) Determination of chlormequat and mepiquat in pear, tomato, and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromat A*, 966:15-23
- Sachse J (1977) Über die Bestimmung von Chlorcholinchlorid (CCC) in Getreide. *Z Lebensm-Unters -Forsch* 163(4):274-277
- Siebers J, Wulf A, Lundejn JR (1991) Untersuchungen zum Übergang von Pflanzenschutzmittelrückständen aus Getreidestroh in Pilze. *Nachrichtenbl Dtsch Pflanzenschutzdienstes* 43(5):95-97
- Stijve T (1980) Thin-layer chromatographic determination of chlormequat residues in various substrates. *Dtsch Lebensm-Rundsch* 76:234-237
- Tafari F, Businelli M, Giusquiani PL (1970) Gas-chromatographic determination of chlorcholine chloride residues in natural tomato juice. *Analyst* 95:675-679
- Tamir B, Azem E, Ter Meulen U (1995) Untersuchungen zum Einfluss von Chlorcholinchlorid im Futter (5ppm) auf die Legeleistung brauner Hybridleghennen. *Göttinger Beiträge zur Land- u. Forstwirtschaft in den Tropen-Subtropen*: 269-276