

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

**Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)**

Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest) (T 1)

**DIN****38415-1**

ICS 13.060.40

Deskriptoren: Wasseruntersuchung, Einheitsverfahren, Pestizid, Prüfung, Wasser

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge — Sub-animal testing (group T) — Part 1: Determination of cholinesterase inhibiting organophosphorus and carbamate pesticides (cholinesterase inhibition test) (T 1)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues — Testes sous-animaux (groupe T) — Partie 1: Dosage des pesticides du type organophosphate et carbamate inhibitant l'activité de cholinesterase (test de l'inhibition du cholinesterase) (T 1)

**Vorwort**

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Anhang B).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

**1 Allgemeine Angaben**

Zur Bestimmung von Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. In dieser Norm wird ein Screening-Test als Farbtest zur Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden im Wasser beschrieben. Die Konzentration der Pestizide in der Wasserprobe wird in Paraoxonethyl-Äquivalenten (POÄ) in µg/l angegeben.

**2 Anwendungsbereich**

Das in dieser Norm beschriebene Verfahren ist geeignet zur Bestimmung von Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden in Wasser. Bei der Anwendung des Verfahrens auf Trinkwasserproben wird der in der Trinkwasserverordnung [1] angegebene Konzentrationsbereich nicht erreicht.

Die Nachweisgrenze der Paraoxonethyl-Äquivalente beträgt nach diesem Verfahren etwa 0,5 µg/l.

Fortsetzung Seite 2 bis 15

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

### 3 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 12036

Laborgeräte aus Glas — Enghals-Standflaschen mit Kegelschliff und Stopfen

DIN 12331

Laborgeräte aus Glas — Becher

DIN 12348

Laborgeräte aus Glas — Rundkolben und Stehkolben mit Kegelhülse, Kegel 1 : 10

DIN 12380

Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyerkolben, enghalsig

DIN 12664-1

Laborgeräte aus Glas — Meßkolben mit einer Marke — Meßkolben mit Bördelrand, Kegelhülse und Kegelschliffverbindung

DIN 12680-1

Laborgeräte aus Glas — Meßzylinder mit Strichteilung

DIN 12691

Laborgeräte aus Glas — Vollpipetten mit einer Marke, schnellablaufend, Wartezeit 15 Sekunden, Klasse AS

- [1] Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung-TrinkwV) vom 5. Dezember 1990 (BGBl. I, S. 2612<sup>1)</sup>)
- [2] Beutler, H. O.: Der Cholinesterase-Hemmtest zum Nachweis von Insektiziden in Wasser. Z. Wasser-, Abwasser-Forschung 24 (1991), S. 26–29

### 4 Grundlage des Verfahrens

Thiophosphorsäureester aus der Gruppe der Pestizide werden durch N-Bromsuccinimid (NBS) zu den Sauerstoff-Analogen ( $P = 0$ ) oxidiert; sie werden dadurch zu Hemmstoffen gegenüber Acetylcholinesterase (AcChE), aus Rinder-Erythrozyten [2].

Der Überschuß am Oxidationsmittel NBS wird durch Ascorbinsäure reduziert, wobei Dehydroascorbinsäure entsteht.

---

<sup>1)</sup> Zu beziehen durch: Deutsches Informationszentrum für Technische Regeln (DITR) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin)

Carbamate und P-O-Verbindungen organischer Phosphorsäureester in einer Wasserprobe hemmen die AcChE. Aus dem Vergleich der Aktivitäten von ungehemmter AcChE (reines Wasser als Probe) und gehemmter AcChE (durch Anwesenheit von Hemmstoffen in einer Wasserprobe) wird die Gesamthemmwirkung, die in Paraaxonethyl-Äquivalenten (*POÄ*) ausgedrückt wird, berechnet. Es wird die Hydrolyse von Acetylthiocholin durch AcChE gemessen.

Das freigesetzte Thiocholin reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat unter Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoat; dieses wird im schwach alkalischen Bereich (pH = 7,2) bei 412 nm (Hg 405 nm) photometrisch gemessen.

## 5 Störungen

Die bei der Messung der Paraaxonethyl-Äquivalenten in Wasser möglichen Störungen sind jeweils bei der Angabe der Ergebnisse zu berücksichtigen. Querempfindlichkeiten durch Störsubstanzen sind möglich, wenn diese nach der Extraktion und nach der Oxidation im Rückstand verbleiben. Querempfindlichkeiten durch Huminstoffe, durch einige ionische Detergenzien oder durch Schwermetalle können auftreten, wenn diese in höheren Konzentrationen vorliegen.

Falsch positive Ergebnisse werden erzielt, wenn Dichlormethan nicht frisch aufbereitet worden ist.

Falsch negative Ergebnisse treten auf, wenn aus der Wasserprobe reduzierbare Substanzen in höheren Konzentrationen extrahiert werden, die die Oxidationskapazität von NBS belasten, hierdurch werden die Pestizide unvollständig oxidiert.

In Anwesenheit von Schwebstoffen können die Pestizide aus der Wasserprobe nur unvollständig extrahiert werden, da die Pestizide an Schwebstoffe adsorbiert werden.

## 6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (T 1):

Verfahren DIN 38415 — T 1

## 7 Geräte

Geräte oder Geräteteile, die mit der Wasserprobe oder dem Extrakt in Berührung kommen, müssen frei von Rückständen sein, die Querempfindlichkeiten verursachen können. Vorzugsweise werden Geräte aus Glas verwendet.

- Meßkolben, Nennvolumen 10, 100 und 500 ml,  
z. B. Meßkolben DIN 12664 — MSA 10
- Meßzylinder, Nennvolumen 25 und 100 ml,  
z. B. Meßzylinder DIN 12680 — ME 25

- Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 25 ml, z. B. Kolben DIN 12380 — EE 25
- Becher, 50 und 250 ml, z. B. Becher DIN 12331 — H 50
- Enzymtest-Meßpipetten, Volumen 0,1, 0,5, 3,0 und 5,0 ml
- Vollpipette, Nennvolumen 20 ml, z. B. Pipette DIN 12691 — VPAS 20
- Kolbenhub-Pipetten 50, 100 und 1000 µl
- Rotationsverdampfer mit Wasserbad und Vakuumanschluß  
(keine Wasserstrahlpumpe)
- Rundkolben, Nennvolumen 250 ml, mit Kegelschliffhülse, z. B. nach DIN 12348, aus Borosilicatglas
- Spitzkolben, 25 ml, mit Kegelschliffhülse aus Borosilicatglas
- Glassäule, Länge etwa 40 cm, Innendurchmesser 2 cm
- Ultraschallbad
- Meßfühler zur Messung der Temperatur in der Küvette, Thermometer
- Stoppuhr
- Spektralphotometer, geeignet zum Messen bei 412 nm, bzw. Spektrallinien-Filterphotometer, Hg 405 nm, mit temperierbarem Küvettenhalter
- Küvetten, Schichtdicke 1 cm
- Wasserbad
- Gasversorgung mit Stickstoff, Massenkonzentration N<sub>2</sub>: 99,99 %
- Reagenzglasschüttler
- Standflaschen, Nennvolumen 50 und 1000 ml, aus braunem Glas, z. B. Standflasche DIN 12036 — E 50 G

## 8 Chemikalien, Herstellen der Lösungen

Als Chemikalien werden, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades "zur Rückstandsanalyse", als Wasser wird bidestilliertes oder Wasser gleichen Reinheitsgrades verwendet. Der Gehalt der Chemikalien und des Wassers an Verunreinigungen, die den Test stören, soll vernachlässigbar klein sein. Der Reagenzien-Blindwert muß regelmäßig und vor allem bei Verwendung einer neuen Charge geprüft werden.

### 8.1 Dichlormethan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zur Rückstandsanalyse; Reinigung des Dichlormethans:

- Eine Säule (Länge 40 cm, Innendurchmesser 2 cm) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> füllen.
- Dichlormethan mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 2 Tropfen je s perkolieren lassen.
- Das aufgefangene Lösemittel stets frisch bereiten.

### 8.2 Aluminiumoxid 90 aktiv, basisch, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Aktivitätsstufe I, für die Säulenchromatographie

- 8.3** N-Bromsuccinimid (NBS),  $C_4H_4BrNO_2$   
— Im Kühlschrank aufbewahren.
- 8.4** Ascorbinsäure,  $C_6H_8O_6$
- 8.5** Kaliumdihydrogenphosphat,  $KH_2PO_4$
- 8.6** di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat,  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$
- 8.7** Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten, AcChE, etwa 2 Einheiten je mg (U/mg); Lyophilisat
- 8.8** Albumin aus Rinderserum, lyophilisiert, rein, Massenanteil > 98 %
- 8.9** Glycerin,  $C_3H_8O_3$ , reinst, Massenanteil etwa 87 %
- 8.10** S-Acetylthiocholiniodid,  $C_7H_{16}INOS$
- 8.11** 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure), DTNB,  $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ , Ellman's Reagenz
- 8.12** Natriumhydrogencarbonat,  $NaHCO_3$
- 8.13** Paraoxonethyl,  $C_{10}H_{14}NO_6P$
- 8.14** Methanol,  $CH_3OH$
- 8.15** Kieselgur\*), hochrein, Oberfläche  $2 m^2/g$ , mittlere Porenweite 2,5 bis  $3,5 \mu g$ ; mit etwa 13,3 g Kieselgur, Fertigsäulen oder Nachfüllpackungen
- 8.16** Poly(oxyethylen)<sub>20</sub> (POE<sub>20</sub>) — sorbitanmonolaurat\*);  $C_{58}H_{114}O_{26}$
- 8.17** Aceton,  $C_3H_6O$
- 8.18** Natriumchlorid,  $NaCl$

**8.19 Lösungen der Einzelsubstanzen**

**8.19.1 N-Bromsuccinimid-Lösung,  $\rho = 400 \text{ mg/l}$**

— 40 mg N-Bromsuccinimid in 100 ml Wasser lösen.

Sowohl die Lösung als auch die feste Substanz sind nur begrenzt haltbar. Die Lösung ist, in einer braunen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt, 1 Woche haltbar.

---

\*) Geeignete Produkte sind im Handel erhältlich. Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, 10772 Berlin