

Einführung der Keilstreifen-Papierchromatographie in die Analytik von Insektiziden oder deren Rück- ständen an Pflanzenmaterial

Von E. HEINISCH und P. NEUBERT

Mit 4 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Vier Systeme mit unpolarer stationärer Phase (Sojaöl, Sonnenblumenöl, Paraffinöl und Silikonöl) und polarer mobiler Phase (Aceton-Wasser), sowie vier Systeme mit polarer stationärer Phase (N,N-Dimethylformamid, 2-Phenoxyäthanol und Äther in verschiedenen Konzentrationen) und unpolarer mobiler Phase (n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan und 2,2,4-Trimethylpentan) wurden auf ihre papierchromatographische Trennwirkung für die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide DDT, Lindan, Chlordan und die Isomeren des technischen Hexachlorcyclohexan auf Blättern und auf Keilstreifen untersucht. Die relativ günstigsten Ergebnisse in bezug auf die Trennwirkung und die Laufzeit wurden mit der Kombination DMF : 2-Phenoxyäthanol : Äther = 40 : 5 : 55 (zusätzlich 3 g Silbernitrat je 1 l) als stationäre und n-Hexan als mobile Phase erreicht. Die Trennwirkung der Keilstreifen war in allen Fällen der der Blätter überlegen. Die saubere Auftrennung der Isomeren des technischen Hexachlorcyclohexan, die eine Voraussetzung für die spätere quantitative Auswertung in dem Gerät ERI-10 des VEB Zeiss Jena ist, gelang nur mit Hilfe der Keilstreifen-papierchromatographie. Die erarbeiteten Methoden sind geeignet zur Analyse von Handelspräparaten, vor allem wenn diese aus Wirkstoffkombinationen (z. B. DDT-Lindan oder Lindan-Chlordan) bestehen, oder Emulsionskonzentrate sind, die kolorimetrisch nicht analysiert werden können, sowie zur quantitativen Bestimmung toxischer Rückstände dieser Insektizide an Pflanzenmaterial.

Einleitung

Nur wenige Jahre, nachdem die Bedeutung der toxischen Rückstände von Pflanzenschutzmitteln an Lebens- und Futtermitteln für die Volksgesundheit und die damit verbundene Notwendigkeit einer systematischen Kontrolle der Nahrung auf Restmengen dieser Präparate erkannt worden war, versuchte man bereits, die Papierchromatographie für diese Zwecke einzusetzen. Eine ganze Reihe von Forschern berichteten über grundsätzliche Möglichkeiten der Papierchromatographie, Erfassungsgrenzen, Trennleistungen verschiedener Systeme, R_F -Werte, Detektionsmöglichkeiten usw.

vor allem von den insektiziden Chlorkohlenwasserstoffen und Thiophosphorsäureestern¹⁻¹¹).

Bereits die ersten Arbeiten zeigten, daß die Papierchromatographie gegenüber den auch in der Pflanzenschutzmittel- bzw. Rückstandsanalytik angewandten Methoden der Kolorimetrie bzw. Spektralphotometrie und der Volumetrie einige Vorteile aufzuweisen hat, und zwar:

a) Mischpräparate, die im praktischen Pflanzenschutz häufig zum Einsatz kommen, bzw. die Rückstände mehrerer nachfolgender Behandlungen mit verschiedenen Präparaten können in einem Arbeitsgang nachgewiesen werden;

b) Ab- und Umbauprodukte der Pflanzenschutzmittel, die auf biochemischem Wege vor allem in der Pflanze gebildet werden (Metabolite) und zumeist ganz andere toxische Eigenschaften haben als die ursprünglich applizierten Präparate, können im Optimalfalle nebeneinander identifiziert werden und

c) bei der Analyse von Handelspräparaten zur Gütekontrolle können gleichfalls neben dem Hauptprodukt auch die Isomeren sowie die nicht umgesetzten Ausgangs- und Zwischenstoffe ermittelt werden.

Diese Vorteile der Papierchromatographie verloren nicht an Gewicht, als die ersten Versuche zur Einführung der IR-Spektrographie und der Gaschromatographie in die Pflanzenschutzmittelanalyse unternommen wurden. Zweifellos leistet die IR-Spektrographie hervorragende Dienste bei der Gütekontrolle von Handelspräparaten; bei der Analyse von Pflanzenschutz-

1) R. L. METCALF u. R. B. MARCH, *Science* **117**, 527 (1953).

2) J. W. COOK, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **37**, 984 (1954a).

3) J. W. COOK, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **37**, 987 (1954b).

4) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **35**, 928 (1952). — Ref.: *Chem. Abstr.* **47**, 5063 (1953).

5) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **37**, 530 (1954a). — Ref.: *Z. anal. Chemie* **145**, 152 (1955) u. *Chem. Abstr.* **49**, 559 (1955).

6) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **37**, 996 (1954b). — Ref.: *Z. anal. Chemie* **147**, 385 (1955) u. *Chem. Abstr.* **49**, 2665 (1955).

7) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **39**, 891 (1955). — Ref.: *Chem. Zbl.* **128**, 5101 (1957); *Z. anal. Chemie* **157**, 68 (1957); *Chem. Abstr.* **51**, 4631 (1957).

8) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **40**, 294 (1957). — Ref.: *Chem. Abstr.* **51**, 5349 (1957); *Z. anal. Chemie* **160**, 77 (1958).

9) L. C. MITCHELL, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **41**, 781 (1958). — Ref.: *Z. anal. Chemie* **171**, 312 (1959).

10) V. BATORA, *Papierchromatographie von Phosphororganischen Insektiziden* (Orig. slowakisch), Forschungsbericht am Institut für agrochemische Technologie, Bratislava 1957 (unveröffentlicht).

11) R. MÜLLER, G. ERNST u. H. SCHOCH, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. (Bern)* **48**, 152 (1957).

mittelrückständen auf Probegut unbekannter Herkunft (und demnach auch unbekannter Behandlungsgeschichte) ist sie jedoch überfordert. Die Gaschromatographie versagt bei den außerordentlich temperaturempfindlichen organischen, Phosphor enthaltenden Verbindungen und den Carbamaten völlig, ist allerdings zur Analytik der Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide sehr gut geeignet.

Jedoch stehen der Anwendung der Papierchromatographie, vor allem zur Analyse von Rückständen in Lebens- und Futtermitteln, noch einige Schwierigkeiten im Wege, und zwar:

a) Die Pflanzenextrakte, die durchweg als Lösungen in einem organischen Solvens vorliegen, müssen peinlich genau durch ein oder mehrere Vorreinigungsverfahren („clean up“) von den mitextrahierten Pflanzeninhaltsstoffen, den Pigmenten, Lipoiden, Kohlenhydraten, Proteinen und vor allem von den Hauptstörstoffen, den Wachsen, befreit werden;

b) das quantitative Auftragen der vorgereinigten und eingengten Extrakte ist gleichfalls ein noch nicht befriedigend gelöstes technisches Problem und

c) die Trennwirkungen der bisher eingesetzten auf- und absteigenden bzw. ein- und zweidimensionalen Verfahren sind — vor allem wenn eine quantitative Auswertung erfolgen soll — in vielen Fällen nicht scharf genug.

Ein für die meisten Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide generell anwendbares Vorreinigungsverfahren — basierend auf einer Behandlung der Petroläther-Extrakte mit Chromschwefelsäure und Ausfrieren der Wachse in einer Kältemischung — wurde von uns bereits erarbeitet¹²⁻¹³). An der Behebung der zweiten Schwierigkeit wird noch gearbeitet.

Die Verbesserung der Auftrennung der Substanzen am Chromatogramm in der Weise, daß eine spätere quantitative Auswertung mit dem Gerät ERI-10 vom VEB Zeiss Jena ermöglicht wird, war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Zu diesem Zwecke sollte der Einsatz der von MATTHIAS¹⁴) entwickelten Keilstreifenmethode an den Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden DDT, technisches Hexachlorcylohexan (HCH techn.), Lindan und Chlordan überprüft und eine entsprechende, standardisierungsfähige Methode erarbeitet werden.

Die Auswahl der Präparate erfolgte nach dem Gesichtspunkt ihrer Anwendung in der DDR; DDT, HCH techn. und Lindan sind Wirkstoffe zahlreicher insektizider Kombinationen (allein und in Mischung miteinander),

¹²) E. HEINISCH, Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst N. F. (Berlin) **13**, 161 (1959).

¹³) E. HAHN u. E. HEINISCH, Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst N. F. (Berlin) **17**, 45 (1963).

¹⁴) W. MATTHIAS, Naturwissenschaften **43**, 35 (1956).

der Einsatz von Chlordan wird gegenwärtig vorbereitet. Leider konnte das Toxaphen („Melipax“ vom VEB Fahlberg-List bzw. „Delicia-Fribal-Staub“ von der Chemischen Fabrik Delitia) nicht in den Kreis der zu untersuchenden Präparate mit einbezogen werden, da das Präparat, ein chloriertes Camphen mit etwa 66–67% Chlor-Gehalt ein uneinheitliches Gemisch von einer unbekannt Anzahl von Verbindungen nicht genau bekannter Struktur, bisher papierchromatographisch nicht erfaßbar ist.

Wirkstoffe

1. DDT: Gemisch aus etwa 85% 1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2,2-trichloräthan; F: 108,5–109 °C und 15% 1-(4-Chlorphenyl)-1-(2-Chlorphenyl)-2,2,2-trichloräthan; F: 76 °C.

2. Technisches Hexachlorcyclohexan: Das technische Rohprodukt von 1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan enthält — je nach den Reaktionsbedingungen — wechselnde Mengen der folgenden Isomeren:

α -Isomeres, F: 157,8–158,3 °C

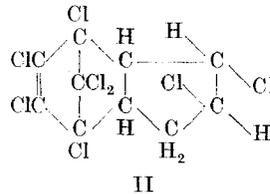
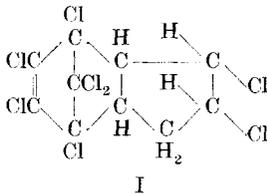
β -Isomeres, F: 309,5 °C

γ -Isomeres, F: 113,0–113,5 °C

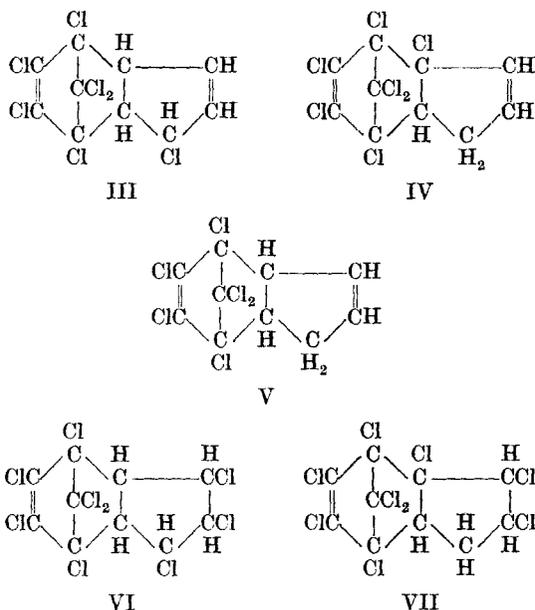
δ -Isomeres, F: 137,2–137,9 °C

ϵ -Isomeres, F: 218–219,0 °C.

3. Chlordan: Rohprodukt. Bereitgestellt vom Wiss. Techn. Zentrum für Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel beim VEB Fahlberg-List, Magdeburg. Die technischen Rohprodukte sind durchweg Gemische von mehreren Isomeren, Zwischenprodukten und nicht umgesetzten Ausgangsprodukten. Eine international verbindliche Norm (ähnlich den WHO-Normen, die für einige Insektizide bereits formuliert wurden, über die Zusammensetzung von Chlordan existiert nicht. Bisher wurden in Chlordan-Präparaten verschiedener Herkunft die folgenden Verbindungen isoliert:¹⁵⁾



¹⁵⁾ E. HEINISCH u. M. S. EL RAFIE, Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst N. F. (Berlin) **16**, 225 (1962).



I: α -Chlordan: cis-2,3,4,5,6,7,8,8-Octachlor-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methanoinden; F: 106,5–108 °C

II: β -Chlordan: trans-2,3,4,5,6,7,8,8-Octachlor-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methanoinden; F: 104–106 °C

III und IV: Heptachlor: 1,(oder 3a),4,5,6,7,8,8-Heptachlor-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoinden; F: 92–93 °C

V: Chlorden: Hexachlor oder Compound 237: 4,5,6,7,8,8-Hexachlor-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoinden; F: 155–185 °C (unter Zersetzung)

VI und VII: Enneachlor oder Nonachlor: 1, (oder 3a),2,3,4,5,6,7,8,8-Enneachlor-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methanoinden; F: 122–123 °C.

In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch möglichst keine Auftrennung des Chlordan erreicht werden, es war vielmehr das Ziel, eine Lösungsmittelkombination zu finden, die das Chlordan als einen Fleck oder Streifen erscheinen läßt.

Reagenzien

1. Aceton p. a.
2. Silbernitrat p. a.
3. N,N-Dimethylformamid; gereinigt durch Vakuumdestillation, einen Tag vor der Verwendung. Kp.₁₃: 46–46,5 °C (im folgenden DMF genannt)
4. 1,4-Dioxan Kp.₇₆₀: 101 °C
5. n-Hexan Kp.₇₆₀: 68–69 °C
6. n-Heptan Kp.₇₆₀: 97–98 °C
7. 2,2,4-Trimethylpentan (i-Octan) Kp.₇₆₀: 98–99 °C
8. n-Pentan Kp.₇₆₀: 34–35,5 °C

9. Petroläther Kp.₇₆₀: 30–50 °C; wie folgt gereinigt: 500 ml Petroläther werden mit 50 ml konz. Schwefelsäure 5 Minuten geschüttelt, die dunkelbraun gefärbte Schwefelsäureschicht abgetrennt und diese Prozedur, stets mit neuer Schwefelsäure so oft wiederholt, bis die Schwefelsäure farblos bleibt (etwa 3–5mal). Nunmehr wäscht man die Petrolätherphase

Tabelle 1

	Dichte	Viskosität cP
Nr. 3000	0,984	5413
Nr. 500	0,893	968
Nr. 2000	0,988	2747

(Messung bei 20 °C, Schubspannung 100)

zweimal mit etwa dem gleichen Volumen Wasser, sodann mit 50–75 ml 4proz. Kaliumpermanganatlösung und nochmals mit Wasser, hierauf mit einer Lösung aus 4proz. wäßrigem Kaliumpermanganat und 30 ml 5proz.

Natronlauge und schließlich noch 3–4mal mit Wasser. Der so vorbereitete Petroläther wird mit wasserfr. Natriumsulfat getrocknet und zuletzt über Kaliumcarbonat oder Natriumsulfat wasserfr. destilliert.

10. 2-Phenoxyäthanol (Äthylenglykol-monophenyläther) p. a. (Fa. Schuchardt, München)
 11. Pflanzliche Öle: im Handel befindliches Sonnenblumen- und Sojaöl, ohne zusätzliche Reinigung.
 12. Silikonöl OE 4818 (VEB Chemiewerk Münchritz).
 13. Wasserstoffperoxyd p. a. 30%.

Format und Reinigung der Papiere

Das verwendete Papier war durchweg Schleicher & Schüll Nr. 2043b; von der Benutzung anderer Papiere aus der Inlandproduktion sahen wir zunächst ab. Die Bögen wurden entweder zu Keilstreifen (4 × 28 cm) gestanzt oder zu Blättern des Formats 14 × 28 cm zurechtgeschnitten.

Zur Entfernung der Chloridionen müssen die Papiere 4–5mal mit destilliertem Wasser gewaschen werden. Hierzu legt man sie in 4–5 Lagen in einer Emailleschale auf eine durchlöchernte Aluminiumplatte (zwischen jeder Lage befindet sich ein Bogen einfaches Filtrierpapier), überstaut mit Wasser und saugt dieses über einen in der Mitte angebrachten Stutzen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe scharf ab. Anschließend werden die einzelnen Lagen vorsichtig von der Filterpapierbögen abgehoben und zunächst bei Zimmertemperatur lufttrocken gemacht, sowie schließlich im Trockenschrank bei 105–110 °C (2–3 Stunden) die letzten Wasserreste entfernt. Das Papier muß frei von Wasserresten sein, da sonst die Imprägnierung nicht gleichmäßig gelingt und es zu verzerrten Laufmittelfronten kommt. Die leicht gewellten Papiere werden zwischen 5 mm dicken Glasplatten gepreßt und trocken aufbewahrt. Es ist unerlässlich, bei allen Arbeiten Gummihandschuhe zu tragen.

Lösungsmittelsysteme

Aus den in der Literatur beschriebenen Kombinationen von stationärer und mobiler Phase (Imprägnier- und Laufmittel), wurden nach entsprechen-

den Vorversuchen mit der herkömmlichen aufsteigenden Papierchromatographie und der Cylinder-Technik, die in Tab. 2 festgehaltenen Systeme für unsere Untersuchungen ausgewählt.

Tabelle 2
Lösungsmittelkombinationen für die Papierchromatographie von DDT, technischem HCH und Chlordan

Stationäre Phase	mobile Phase	Literatur- zitat
2–5% Paraffinöl in Äther (vol.)	Methanol: Wasser	¹⁶⁾
	Aceton: Wasser 75 : 25 (vol.)	¹⁷⁾
1% Sojaöl in Äther	Aceton: Wasser 75 : 25 (vol.)	^{5) 6)}
7,5% Silikonöl in Äther (vol.)		
N,N-Dimethylformamid: Äther 20 : 80 (vol.)	n-Hexan n-Pentan n-Heptan	
N,N-Dimethylformamid: Äther 25 : 75 (vol.)	2, 2, 4-Trimethyl- pentan	¹⁸⁾
N,N-Dimethylformamid: 2-Phenoxyäthanol: Äther 40 : 5 : 55 oder 50 : 5 : 45 (vol.) je 1 l des Lösungsmittels ent- hält 3 g AgNO ₃	n-Hexan	¹⁹⁾

Die Detektion

Das ausschließlich angewandte Prinzip der Sichtbarmachung von Chlorkohlenwasserstoffen am Chromatogramm beruht auf der Freisetzung des Chlors, Reaktion mit Silbernitrat zu Silberchlorid und Bildung von grauschwarzen Flecken von abgeschiedenem Silber. Mehrere Autoren benutzen zu diesem Zwecke Kombinationen mehrerer Sprühreagenzien (z. B. Monoäthanolamin und Silbernitrat in Salpetersäure oder wäßrige Silbernitratlösung, Formaldehydlösung, Kalilauge und schließlich Salpetersäure u. a. m.).

¹⁶⁾ R. G. BRIDGES, A. HARRISON u. F. P. W. WINTERINGHAM, *Nature* **177**, 86 (1956). — Ref.: *Chem. Zbl.* **127**, 12651 (1956); *Chem. Abstr.* **50**, 10332 (1956).

¹⁷⁾ A. DENES, *Die Nahrung* **6**, 48 (1962a).

¹⁸⁾ P. A. MILLS, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **42**, 734 (1959).

¹⁹⁾ J. P. SAN ANTONIO, *J. Assoc. off. agr. Chemists* **43**, 721 (1960).

Die besten Ergebnisse in bezug auf die Empfindlichkeit des Nachweises einerseits und den geringen Aufwand an Arbeitszeit andererseits erzielten wir mit einem von MITCHELL⁷⁾ entwickelten Reagens, dessen Zubereitung im Folgenden beschrieben wird:

1,7 g AgNO_3 werden in 5 ml Wasser gelöst, mit 20 ml 2-Phenoxyäthanol versetzt und mit Aceton auf 200 ml aufgefüllt. Zuletzt gibt man 2 Tropfen 30proz. H_2O_2 zu.

Das Reagens muß täglich, am besten möglichst kurz vor der Detektion, frisch bereitet werden. Der Detektionsvorgang selbst verläuft in der folgenden Weise:

Das lufttrockene Papier wird mit dem Detektionsreagens besprüht, etwa eine Stunde bei etwa 20 °C getrocknet, 20 Minuten in eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre gehängt, 5 Minuten auf der Rück- und schließlich 50 Minuten auf der Vorderseite mit einer UV-Quelle in 30 cm Abstand angestrahlt.

Die Bestrahlungszeit spielt bei dem Detektionsvorgang eine entscheidende Rolle insofern, als die Zeitspanne zwischen der Entwicklung des Farbmaximums der Flecke einerseits und dem Nachdunkeln des Untergrundes ermittelt werden muß.

Wir haben systematische Untersuchungen dieser Zusammenhänge angestellt, deren Ergebnisse in einer späteren Arbeit zusammengetragen werden.

Als Vervollkommnung dieses Verfahrens kann die in Tab. 1 verzeichnete Lösungsmittelkombination von SAN ANTONIO¹⁹⁾ bezeichnet werden, bei der das MITCHELL-Detektionsreagens bereits in der stationären Phase enthalten ist. Die Sichtbarmachung der Flecke (bzw. der Streifen) erfolgt nach dem Chromatographieprozess und dem Trocknen des Chromatogrammes durch einfaches Bestrahlen der Papiere mit einer UV-Quelle.

Auftragen der Wirkstoffe

Zum Auftragen der Wirkstoff-Lösungen (je 100 mg Wirkstoff in 100 ml Aceton), sowie der Boden- und Pflanzenextrakte benutzten wir das CHROPA-Auftragegerät mit einer zusätzlichen Halterung, die das ermüdende Aufsetzen der Pipette übernimmt und nach jedem Berühren der Pipettenspitze mit dem Papier diese in die Rücklage zurückfedert. Auf diese Weise gelingt es, mit 0,1 ml-Meßpipetten (bei 20 °C geeicht) innerhalb des zulässigen Fehlers von 0,5% zu bleiben. Eine bei anderen Auftragegeräten zusätzlich eingebaute Heizung darf beim Auftragen von Lindan, technischem HCH und DDT nicht eingeschaltet werden, da sonst Verluste bis zu 60% auftreten können.

Imprägnieren und Entwickeln

Die Imprägnierung der Papiere mit den ätherischen Lösungen von Paraffin-, Silikon-, Soja- und Sonnenblumenöl erfolgt in einer Emailleschale mit dichtschließender Glasplatte vor dem Auftragen der Wirkstoffe. Die Keilstreifen oder Blätter müssen schnell völlig eingetaucht und die Schale abgedeckt werden. Unter leichtem Bewegen der Schale läßt man die stationäre Phase 5 Minuten einwirken. Im auf 20 °C temperierten Chromatographie-raum trocknen die Papiere über Nacht.

Entgegen den Angaben von MITCHELL⁵⁾⁶⁾ und SAN ANTONIO¹⁹⁾ ist eine Imprägnierung mit der ätherischen Lösung von N,N-Dimethylformamid und 2-Phenoxyäthanol nach dem Auftragen der Wirkstoffe vorteilhafter:

es braucht kein Auftragekasten für die Papiere angefertigt zu werden, um Verluste des leicht-flüchtigen DMF zu vermeiden,

die Auftrageplatte wird nicht verunreinigt und die Imprägnierung wird gleichmäßiger, da im Gegensatz zur Imprägnierung mit dem schwerflüchtigen Ölen (Paraffinöl u. a.) genaue Trockenzeiten eingehalten werden müssen (der Äthergeruch darf eben nicht mehr wahrgenommen werden).

Die Keilstreifen oder Blätter werden sofort bis etwa 4 cm vor dem Startpunkt eingetaucht und 1 Minute in der stationären Phase belassen. In dieser Zeit wird der Startpunkt von der Lösungsmittelfront nicht erreicht (etwa 10 mm Zwischenraum), so daß kein Wirkstoff eluiert wird. Die anschließende Trockenzeit von 5 Minuten muß möglichst genau eingehalten werden. Wir variierten die Trockenzeit von 3–8 Minuten mit den folgenden Ergebnissen. Bei 3 Minuten entstanden ungleich-

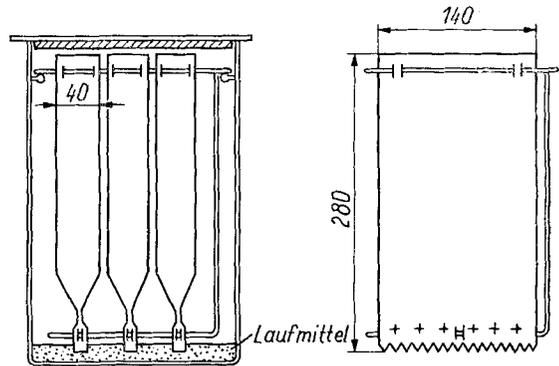


Abb. 1. Chromatographiekammer

mäßige Laufstrecken, da der Äther noch nicht vollständig verdunstet war, von 4–7 Minuten war kein Unterschied festzustellen, ab 8 Minuten muß bei 20 °C Raumtemperatur mit Verlusten an DMF gerechnet werden. In der Regel wird man die Arbeiten so kontinuierlich einrichten können, daß innerhalb von 4–7 Minuten die Blätter und Keilstreifen in die Glaskästen zur Entwicklung gehängt werden können. Entsprechend dem Vorschlag von MATTHIAS¹⁴⁾ wurden die Keilstreifen auf Glasstabbügel aufgezogen.

Es wurde anschließend aufsteigend entwickelt.

Soja- und Sonnenblumenöl als stationäre Phase

Die von MITCHELL⁵⁾ empfohlene Verwendung von pflanzlichen Ölen als unpolare stationäre Phase ergab vor allem bei den Keilstreifen ungleichmäßige Trennungen und leicht marmorierte Streifen. Das mag in erster Linie an der wechselnden Zusammensetzung und der unbekanntenen Raffination der im Handel befindlichen Speiseöle liegen. Es wurden Sonnenblumen- und Sojaöl in den folgenden Konzentrationen verwendet:

Stationäre Phase: Öl: Äther	=	1 : 99 (vol.)
	=	2 : 98 (vol.)
	=	5 : 95 (vol.)
Mobile Phase: Aceton : Wasser	=	75 : 25 (vol.)

Weitere Versuche mit den genannten Systemen unterblieben, da andere, chemisch definierbare Öle zur Verfügung standen.

2. Paraffinöl als stationäre Phase

Nach Angaben von BRIDGES u. Mitarb.¹⁶⁾ und DENES¹⁷⁾ gelingt eine Trennung der HCH-Isomeren, sowie von DDT und Lindan im Bereich von 1–20 μg bei Verwendung von Paraffinöl als stationäre und Methanol-Wasser bzw. Aceton-Wasser als mobile Phase. DENES¹⁷⁾ konnte durch Vergleich mit gleichzeitig aufgetragenen Standardsubstanzen auf Blättern eine semiquantitative Bestimmung von DDT und Lindan erreichen.

Tabelle 3
R_F-Werte von DDT und Lindan
stationäre Phase: Paraffinöl : Äther = 5 : 95 (vol.)
mobile Phase: Aceton : Wasser = 75 : 25 (vol.)
Mittel von 12 Chromatogrammen, entwickelt bei
20 °C
Wirkstoff: DDT und Lindan in Mengen von 2–15 μg

Methode	Wirkstoff	R _F -Wert
Keilstreifen	DDT	0,47
	Lindan	0,71
Blätter	DDT	0,22
	Lindan	0,38

In unseren Versuchen mit Keilstreifen und Blättern war die Trennung der HCH-Isomeren unbefriedigend, dagegen gelang diese für DDT-Lindan. In Tab. 3 sind die R_F-Werte angegeben.

Die Verwendung von weniger Paraffinöl in der Imprägnierungslösung ergab etwas schlechtere Trennungen.

Die Differenzen der R_F-Werte der HCH-Isomeren auf Keilstreifen betragen 0,06–0,08. Eine Abgrenzung der Streifen ist demnach möglich, nicht jedoch die angestrebte quantitative Auswertung im Gerät ERI-10. Hierfür muß der Unterschied in den-R_F Werten mindestens 0,12 betragen

3. Silikonöl als stationäre Phase

Über die Verwendung von Silikonöl als Imprägnierung liegen wenig Angaben vor. MITCHELL⁵⁾⁶⁾ hat bei seinen umfangreichen Arbeiten auch Silikonöl verwendet, jedoch später nur noch Sojaöl empfohlen. Auf der Suche nach weiteren geeigneten unpolaren Imprägnierungsmitteln prüften wir 3 Silikonöle vom VEB Chemiewerk Nünchritz, mit den Firmenbezeichnungen „Silikonöl 500, 2000 bzw. 3000“. Die R_F -Werte der Isomeren im technischen Hexachlorcyclohexan sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

R_F -Werte der Isomeren des HCH. Mittelwerte von 4 Keilstreifen, die mit je 25 μ g des α -, β -, γ -, und δ -Isomeren beschickt worden waren, bei 20°C entwickelt

stationäre Phase 5% Silikonöl in Äther	mobile Phase	R_F -Werte der Isomeren				Laufzeit (min)
		β	δ	γ	α	
2000	DMF : Wasser	0,14	0,22	0,29	0,37	1050
500	= 1 : 1 (vol.)	0,13	0,20	0,28	0,37	
3000		0,13	0,22	0,30	0,39	
2000	Aceton : Wasser	0,31	0,40	0,48	0,54	1040
500	= 75 : 25 (vol.)	0,30	0,39	0,47	0,55	
3000		0,32	0,41	0,48	0,54	
2000	Dioxan : Wasser	0,61	0,72	0,78	0,86	1030
500	= 75 : 25 (vol.)	0,60	0,70	0,77	0,85	
3000		0,61	0,71	0,79	0,88	

Die Trennung der einzelnen Isomeren reicht auch bei diesen Ölen nicht aus. Lediglich das Silikonöl 3000 mit Aceton/Wasser als Laufmittel schien durch gut begrenzte Streifen einer weiteren Prüfung wert.

Tabelle 5

R_F -Werte der Isomeren des HCH

Stationäre Phase: 0,5–5% Silikonöl 3000 in Äther; mobile Phase: Aceton : Wasser = 75 zu 20 (vol.); Mittelwerte von 4 Keilstreifen, die mit je 25 μ g des α -, β -, γ - und δ -Isomeren beschickt worden waren, bei 20°C entwickelt

% Silikonöl in Äther	R_F -Werte der Isomeren				Laufzeit (min)
	β	δ	γ	α	
0,5	0,58	0,66	0,70	0,74	925
1,0	0,50	0,56	0,63	0,68	
2,5	0,44	0,50	0,57	0,61	
5,0	0,32	0,41	0,48	0,54	

Die Veränderung der Konzentration des Silikonöls hatte zwar einen deutlichen Einfluß auf die Position der R_F -Werte; der erhobenen Forderung nach Differenzen der R_F -Werte von 0,12 konnte aber nicht entsprochen werden.

2-Phenoxyäthanol und N,N-Dimethylformamid als stationäre Phase

Äther-Lösungen von DMF als stationäre Phase in verschiedenen Konzentrationen wurden bereits von MITCHELL⁵⁾⁶⁾ und später von MILLS¹⁸⁾ in Kombination mit n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan und 2, 2, 4-Trimethylpentan zur Auftrennung fast aller Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide angewandt. 2-Phenoxyäthanol ist Bestandteil eines von MITCHELL⁷⁾ entwickelten Detektionsreagens, das sich gut bewährt hat und heute fast allgemein zur Detektion von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden am Papierchromatogramm in den Einsatz gelangt. Die spezifische Rolle, die das 2-Phenoxyäthanol bei diesem Prozeß übernimmt, konnten wir weder durch das Studium der Originalabhandlungen von MITCHELL bzw. der Nacharbeitungen anderer Autoren, noch durch Gespräche mit Kollegen, die an ähnlichen Problemen arbeiten²⁰⁾²¹⁾ klären. Die hervorragenden Lösungsmitelegenschaften können die besondere Eignung kaum hinreichend erklären. Es ist uns leider, trotz vieler Bemühungen, nicht gelungen, diese ziemlich teure Substanz durch andere billigere zu ersetzen und den notwendigen Import einzusparen.

SAN ANTONIO¹⁹⁾ kombinierte erstmalig das DMF mit dem 2-Phenoxyäthanol unter Zusatz von Silbernitrat in der stationären Phase. Der Autor gibt für die wichtigsten Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide die in Tab. 6 festgehaltenen Konzentrationen für das DMF an.

Tabelle 6
Zusammensetzung der stationären Phase nach
SAN ANTONIO¹⁹⁾ zur Auftrennung einiger Chlorkohlen-
wasserstoff-Insektizide

Wanderungs- geschwindigkeit	Präparate	Vol.-% an:		
		DMF	2-Pheno- xylätha- nol	Äther
langsam	Lindan	25	5	70
mittel	Heptachlor DDT Dieldrin	40	5	55
schnell	Aldrin Chlordan	60	5	35

²⁰⁾ V. BATORA, Institut für agrochemische Technologie, Bratislava ČSSR, Pers. Mittlg. 1962.

²¹⁾ A. DENES, Institut für Ernährung, Budapest, VR Ungarn, Pers. Mittlg. 1962b.

Zur Darstellung der stationären Phase werden 3 g Silbernitrat in der vorgesehenen Menge DMF (300—600 ml) gelöst, die Lösung mit 50 ml 2-Phenoxyäthanol versetzt und mit Äther auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung muß unmittelbar vor Beginn der Versuche angesetzt werden und ist nicht haltbar. In Vorversuchen mit Blättern stellten wir für dieses System neben dem bereits erwähnten Vorteil des Wegfallens einer Detektion durch Besprühen noch den weiteren Vorteil wesentlich geringerer Laufzeiten fest. Allerdings war die Trennschärfe, vor allem bei den Isomeren des technischen HCH nur gering, die Flecke liefen z. T. ineinander über und waren demnach in dem ERI-10 nicht auswertbar. Demgegenüber zeigten die Keilstreifen scharfe Auftrennungen, die eine quantitative Bestimmung im ERI-10 gut gestatteten. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Verfahren ist aus den Abb. 2, 3 und 4 ersichtlich.

Da von SAN ANTONIO¹⁾ nicht die Auftrennung der Insektizide DDT, Lindan und Chlordan bzw. der Isomeren des technischen HCH beabsichtigt war und demnach auch keine Kombination für diese Präparate an-

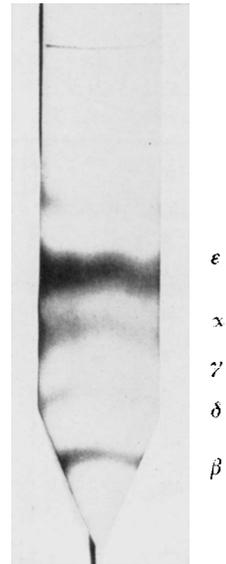


Abb. 2. Technisches HCH. Trennung auf Keilstreifen. System: DMF/n-Hexan

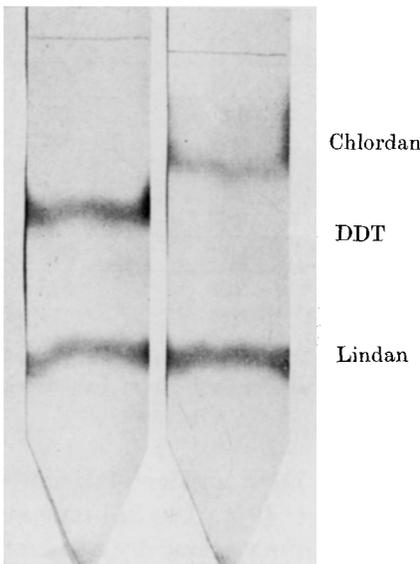


Abb. 3. Lindan, DDT, Chlordan. Trennung auf Keilstreifen. System: DMF/n-Hexan

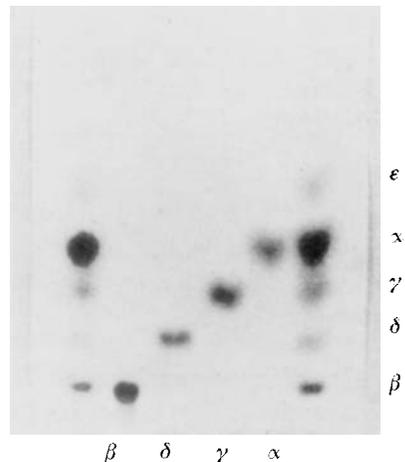


Abb. 4. Technisches HCH Trennung auf Blättern. System: DMF/n-Hexan

geführt ist, mußte zunächst die günstigste Konzentration an DMF in der stationären Phase, sowie das geeignetste Laufmittel gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Tabelle 7

Einfluß des DMF-Anteils in der stationären Phase und des Laufmittels auf die R_F -Werte von Lindan, DDT und Chlordan auf Keilstreifen. Mittel von 4 Chromatogrammen, bei 20°C entwickelt

mobile Phase	stationäre Phase %-Anteil an DMF	R_F -Werte			Laufzeit min
		Lindan	DDT	Chlordan	
Pentan	20	0,48	0,67	0,80	358
	30	0,40	0,61	0,74	371
	40	0,38	0,58	0,70	419
	50	0,35	0,54	0,69	732
	60	0,36	0,54	0,69	790
Hexan	20	0,60	0,82	0,92	313
	30	0,50	0,66	0,78	308
	40	0,45	0,58	0,73	336
	50	0,38	0,53	0,68	431
	60	0,35	0,52	0,65	1266
Heptan	20	0,49	0,67	0,76	264
	30	0,46	0,65	0,74	250
	40	0,41	0,59	0,69	325
	50	0,39	0,59	0,68	426
	60	0,39	0,57	0,68	1304
2,2,4-Trime- methylpentan	20	0,47	0,68	0,80	271
	30	0,42	0,61	0,73	273
	40	0,39	0,55	0,71	368
	50	0,30	0,52	0,68	619
	60	0,30	0,51	0,67	1214

Die stationäre Phase enthielt jeweils 5% 2-Phenoxyäthanol, 3g Silbernitrat je 1l und wurde mit Äther auf 1l aufgefüllt. Die Laufzeiten wurden auf 20 cm Laufstrecke bezogen.

Als erfolgversprechendste Konzentration an DMF in der stationären Phase erwies sich, wie aus der Tab. 7 ersichtlich ist, 40%. Das in bezug auf die Laufzeit, Auftrennung und Preis günstigste Laufmittel war das n-Hexan. Die gleiche Kombination leistete auch für die Auftrennung des technischen HCH-Isomeren-Gemisches die besten Dienste, die entsprechenden R_F -Werte,

die von 0,28–0,81 reichen und sich somit in optimaler Weise über den Keilstreifen verteilen, sind in Tab. 8 festgehalten. Das Ende des Keiles wird zu meist vom β -HCH erreicht. Dies ist für eine Auswertung im ERI-10 erwünscht, damit Streifen gleicher Breite von der Photozelle abgetastet werden.

Tabelle 8

R_F -Werte der HCH-Isomeren
auf Keilstreifen

stationäre Phase: DMF: 2-Phenoxy-
äthanol: Äther = 40:5:55 (vol.)
mobile Phase: n-Hexan; Wirkstoff
100g HCH-techn. (VEB EK Bitter-
feld); Werte von 12 Chromatogram-
men, bei 20 °C entwickelt

HCH-Isomere	R_F -Wertbereich
β	0,28–0,32
δ	0,40–0,44
γ	0,59–0,62
α	0,71–0,73
ϵ	0,78–0,81

Tabelle 9

R_F -Werte von DDT, Lindan und
Chlordan auf Blättern

stationäre Phase: DMF: 2-Phenoxy-
äthanol: Äther = 40:5:55 (vol.)
mobile Phase: n-Hexan; Wirkstoff
10–60 μ g DDT, Lindan und Chlordan
Mittel von 24 Chromatogrammen bei
20 °C entwickelt

Präparat	R_F -Wertbereich
Lindan	0,44–0,46
DDT	0,80–0,84
Chlordan	0,87–0,90

Die Isomeren wurden durch Zusatz bekannter Lösungen und Beobachten der Verstärkung der Streifen identifiziert.

Die Verwendung von Blättern führte nur zu unbefriedigenden Trennungen der HCH-Isomeren, dagegen liegen die R_F -Werte der Kombinationen DDT-Lindan und Lindan-Chlordan für eine Auswertung im Gerät ERI-10 hinreichend auseinander (s. Tab. 9).

Für die stets saubere Durchführung der technischen Arbeiten danken wir unseren Mitarbeiterinnen G. LINDNER und E. GOTTSCHALCH.

Kleinmachnow, Biologische Zentralanstalt Berlin der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 30. April 1963.