

CHROM. 3618

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS
PHOSPHORORGANISCHER INSEKTIZIDE

AKTIVIERUNG SCHWACHER ESTERASEHEMMER

H. ACKERMANN

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke (D.D.R.)

(Eingegangen den 24. Mai 1968)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic-enzymatic identification of organophosphorus insecticides. Activation of weak esterase inhibitors.

1. R_F values of 20 insecticide esterase inhibitors, determined in solvent systems consisting of benzene and acetone in various ratios, are presented.
2. Employment of different activation techniques considerably improves the detection sensitivity of the initially not, or only weakly, inhibiting thiono- or dithiophosphoric acid esters, as well as of the phosphonic acid ester trichlorphon.
3. For the thionophosphoric acid esters parathion, methylparathion and bromophos, oxidation with an aqueous bromine solution proved superior to the hitherto commonly used treatment with bromine vapour.
4. An increased detection sensitivity of dimethoate can only be achieved by means of ultraviolet irradiation. The other thionophosphoric acid esters can also be detected with high sensitivity in this way.
5. Treatment with ammonium hydroxide improves the detection sensitivity of trichlorphon, whereby it is converted into DDVP.

EINLEITUNG

Die Kombination des enzymatischen Hemmtestes mit chromatographischen Verfahren dürfte für die Analytik esteraseshemmender Verbindungen wie der insektiziden Organophosphate und Carbaminsäureester neben der Gaschromatographie grösste Bedeutung erlangen. Die gegenüber chemischen Nachweisreaktionen höhere Empfindlichkeit des enzymatischen Hemmtestes auf dem Dünnschichtchromatogramm konnte bereits durch mehrere Publikationen belegt werden¹⁻⁷. Während bei den direkt hemmenden Organophosphaten und Carbaminsäureestern die Nachweisgrenzen lediglich von den jeweiligen methodischen Bedingungen (Trägermaterial, Enzympräparat, Substrat) abhängen und der Nachweis von Nanogramm-Mengen, teilweise auch Picogramm-Mengen, möglich ist, liegen die erfassbaren Mengen bei den

Thiono- bzw. Dithiophosphorsäureestern nach der bisher üblichen Oxydation mit Bromdampf⁸ um Zehnerpotenzen höher. Beträchtliche Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit bestehen auch zwischen dem Phosphonsäureester Trichlorphon und dem daraus herstellbaren Phosphorsäureester DDVP (Dichlorphos).

Ziel der Arbeit war, durch Anwendung verbesserter bzw. neuer Aktivierungsverfahren die Nachweisempfindlichkeit der Thionophosphate sowie des Trichlorphons zu steigern, diese Verfahren mit der bisher üblichen Bromdampfxydation zu vergleichen und das Verhalten der direkt hemmenden Phosphate gegenüber den Aktivierungsverfahren zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODIK

Reagenzien

Kieselgel G nach STAHL mit ca. 13 % CaSO_4 (Merck), mittlere Korngrösse 10–40 μ .

Benzol, Aceton, Chloroform zur Anal., destilliert; 0.1 M Natriumthiosulfatlösung.

Enzymlösung

1 Teil Rinderleber wird mit 9 Teilen dest. Wasser in einem Ganzglas-Homogenisator nach Elvehjem-Potter homogenisiert und zur Abtrennung der festen Zellbestandteile 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der enzymhaltige Überstand wird nochmals 1:4 mit dest. Wasser verdünnt. Die Leber und auch das zentrifugierte Homogenat sind in tiefgefrorenem Zustand mehrere Monate ohne wesentliche Aktivitätsverluste haltbar.

Substratlösung

4 ml einer äthanolischen β -Naphthylacetat-Stammlösung mit 125 mg β -Naphthylacetat (naphtholfrei) in 100 ml absol. Äthanol werden mit 16 ml einer frisch bereiteten wässrigen Diazoniumsalzlösung (ca. 20 mg bisdiazotiertes *o*-Dianisidin, "Echtblausalz B", "Fast Blue Salt B" in 16 ml dest. Wasser) vermischt. Die Substratlösung muss jeweils unmittelbar vor dem Besprühen hergestellt werden.

Pestizidlösungen

Die Stammlösungen der in Tabelle I aufgeführten Verbindungen enthalten 1 mg Pestizid/ml Chloroform. Durch Verdünnen mit Chloroform werden die jeweiligen Endkonzentrationen hergestellt. Die Pestizide wurden in reiner Form (Reinheitsgrad zwischen 95 und 100 %) verwendet.

Herstellung der Dünnschichtplatten

Die Glasplatten (Fotoplatten 9 × 12 cm) werden mit einem Reinigungsmittel eingeweicht, anschliessend in heissem Wasser gewaschen, mit dest. Wasser und Äthanol gespült und getrocknet. Für 4 Platten werden 10 g Kieselgel G mit 20 ml dest. Wasser in einem Porzellanmörser angerührt und in einer Schichtdicke von 250 μ gleichmässig auf die Glasplatten aufgetragen. Die Platten lässt man über Nacht bei Zimmertemperatur trocknen. Die Verwendung von Pufferlösungen zum Anrühren des Kieselgels, hat sich nach unseren langjährigen Erfahrungen als nicht erforderlich erwiesen.

TABELLE I

IN DIE UNTERSUCHUNG EINBEZOGENE ESTERASE-INHIBITOREN

<i>Trivial-Name</i>	<i>Chemische Bezeichnung</i>
Bromophos	O,O-Dimethyl-O-(4-brom-2,5-dichlorphenyl)-thionophosphat
Bromoxon	O,O-Dimethyl-O-(4-brom-2,5-dichlorphenyl)-phosphat
Dibrom	O,O-Dimethyl-O-(1,2-dibrom-2,2-dichloräthyl)-phosphat
Dichlorphos (DDVP)	O,O-Dimethyl-O-(2,2-dichlorvinyl)-phosphat
Dimethoat	O,O-Dimethyl-S-(N-monomethyl)-carbanylmethylthiophosphat
PO-Dimethoat	O,O-Dimethyl-S-(N-monomethyl)-carbanylmethylthiophosphat
Methylparathion	O,O-Dimethyl-O-(<i>p</i> -nitrophenyl)-thionophosphat
Methylparaoxon	O,O-Dimethyl-O-(<i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat
Parathion	O,O-Diäthyl-O-(<i>p</i> -nitrophenyl)-thionophosphat
Paraoxon	O,O-Diäthyl-O-(<i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat
Systox	O,O-Diäthyl-O-2-(äthylmercapto)-äthylthionophosphat
(Demeton-O)	
Isosystox	O,O-Diäthyl-S-2-(äthylmercapto)-äthylthiophosphat
(Demeton-S)	
Isosystoxsulfoxid	O,O-Diäthyl-S-2-(äthylsulfinyl)-äthylthiophosphat
Isosystoxsulfon	O,O-Diäthyl-S-2-(äthylsulfonyl)-äthylthiophosphat
Tinox (Methyl-demeton-O-methyl)	O,O-Dimethyl-O-2-(methylmercapto)-äthylthionophosphat
Isotinox (Methyl-demeton-S-methyl)	O,O-Dimethyl-S-2-(methylmercapto)-äthylthiophosphat
Isotinoxsulfoxid	O,O-Dimethyl-S-2-(methylsulfinyl)-äthylthiophosphat
Isotinoxsulfon	O,O-Dimethyl-S-2-(methylsulfonyl)-äthylthiophosphat
Trichlorphon	O,O-Dimethyl-(1-hydroxy-2,2,2-trichloräthyl)-phosphonat
Carbaryl	1-Naphthyl-N-methylcarbamat

TABELLE II

R_F-WERTE VON 20 WIRKSTOFFEN IN VERSCHIEDENEN LAUFMITTELSYSTEMEN

<i>Wirkstoff</i>	<i>Laufmittel</i>			
	<i>Benzol</i>	<i>Benzol-Aceton</i>		
		<i>19:1</i>	<i>9:1</i>	<i>2:1</i>
Bromophos	0.88	0.92	0.95	0.95
Bromoxon	0.06	0.49	0.63	0.78
Dibrom	0.19	0.42	0.70	0.82
DDVP	0.12	0.35	0.56	0.76
Dimethoat	0.00	0.13	0.35	0.60
PO-Dimethoat	0.00	0.00	0.05	0.18
Methylparathion	0.57	0.63	0.72	0.92
Methylparaoxon	0.00	0.28	0.45	0.71
Parathion	0.82	0.83	0.86	0.93
Paraoxon	0.04	0.53	0.66	0.78
Systox	0.00	0.27	0.53	0.82
Isosystox	0.00	0.26	0.52	0.82
Isosystoxsulfoxid	0.00	0.27	0.53	0.82
Isosystoxsulfon	0.00	0.00	0.17	0.60
Tinox	0.02	0.16	0.38	0.79
Isotinox	0.00	0.00	0.37	0.42
Isotinoxsulfoxid	0.00	0.00	0.00	0.04
Isotinoxsulfon	0.00	0.18	0.07	0.27
Trichlorphon	0.00	0.05	0.08	0.29
Carbaryl	0.06	0.43	0.56	0.75

Fliessmittelsysteme

Zur Trennung der Pestizide werden als Fliessmittel Benzol bzw. Gemische von Benzol-Aceton (19:1, 9:1 und 2:1) verwendet. Die damit zu erzielenden mittleren R_F -Werte sind in Tabelle II zusammengestellt. In speziellen Fällen werden Fliessmittelgemische von *n*-Hexan-Aceton (z.B. Bromophos) oder Methylenchlorid-Aceton (z.B. Dimethoat) verwendet. Die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit erfolgt, soweit möglich, im für die Fleckenform optimalen R_F -Bereich von 0.20 bis 0.60.

Aktivierungsverfahren

Bromdampf: Gesättigte Lösung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff. Die Oxydationskammer wird durch Einstellen der Lösung mit Bromdampf gesättigt.

Bromwasser: Zum Besprühen der Platten wird eine frisch bereitete gesättigte, wässrige Bromlösung benutzt.

U.V.-Licht: U.V.-Analysenlampe, "S 375" ohne Filter; Abstand Strahler-Platte ca. 30 cm.

Ammoniaklösung: 1 Teil konz. Ammoniak wird mit 4 Teilen Wasser verdünnt.

Durchführung des enzymatischen Hemmtestes

Nach der Chromatographie und dem Abdunsten der organischen Lösungsmittel werden die Platten entweder sofort oder nach Aktivierung der schwachen Esterasehemmer bis zum Auftreten einer schwachen Befeuchtung mit der Enzymlösung unter Verwendung von Druckluft gleichmässig besprüht. Zur Durchführung der Hemmreaktion werden die Platten anschliessend 30 bis 60 min in einem feuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei einer Temperatur von 38° inkubiert. Anschliessend wird, falls erforderlich, nach oberflächlichem Antrocknen der Schicht auf gleiche Weise die Substratlösung aufgesprüht. Nach einigen Minuten färben sich die Platten durch die enzymatische Substratspaltung und Kupplung des dabei entstehenden β -Naphthols mit dem Diazoniumsalz rosa bis rot. Die Inhibitoren werden infolge Ausbleibens der Substratspaltung durch helle Flecke angezeigt. Zur Erzielung einer maximalen Nachweisempfindlichkeit muss eine Überdosierung des Enzympräparates, angezeigt durch eine sehr rasche und intensiv blaurote Färbung der Platten, vermieden werden, da zu hohe Enzymkonzentrationen bei sehr kleinen Inhibitormengen nur zu einer teilweisen Enzymhemmung und damit zu einem Ablauf der enzymatischen Substratspaltung auch bei Anwesenheit von Inhibitoren führen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aktivierung von Thionophosphorsäureestern mit Bromdampf

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen werden die Thionophosphate nach der chromatographischen Auftrennung zunächst in Anlehnung an MCKINLEY UND READ⁸ mit Bromdampf durch Einstellen der lösungsmittelfreien Platten in eine mit Bromdampf gesättigte Kammer (30 sec) oxydiert. Bei der anschliessenden Erwärmung auf 60° (20 min) wird überschüssiges, adsorbiertes Brom entfernt. Nach Abkühlen der Platten auf annähernd Zimmertemperatur erfolgt der enzymatische Nachweis der Inhibitoren wie vorstehend beschrieben. Mit diesem Oxydationsverfahren können die Thionophosphorsäureester Parathion, Methylparathion und Bromophos in Konzentrationen von 0.2 bis 1 ng/Fleck erfasst werden (vgl. Tabelle III).

TABELLE III

NACHWEISGRENZE FÜR ORGANOPHOSPHATE OHNE UND MIT AKTIVIERUNG (ng)

Wirkstoff	Ohne Aktivierung	Bromdampf (30 sec)	Aktivierung mit wässr. Bromlösung (15 min)	U.V.-Bestrahlung (20 min)	Wässrige Ammoniaklösung (15 min)
Bromophos	k.N.*	1.0	0.010	1.0	k.N.
Bromoxon	0.010	0.5	0.010	0.010	0.010
Dibrom	1.0	k.N.	1.0	1-5	1.0
DDVP	0.2	k.N.	0.5	1-5	0.2
Dimethoat	k.N.	500	500	10	k.N.
PO-Dimethoat	5-10	10-20	5-10	5-10	10
Methylparathion	k.N.	0.5-1.0	0.010	0.050	k.N.
Methylparaaxon	0.002	0.5-1.0	0.002	0.002	0.005
Parathion	k.N.	0.2	0.005	0.010	k.N.
Paraaxon	0.001	0.01	0.001	0.001	0.002
Systox	10	10	1.0	1.0	10
Isosystox	5	5	1.0	1.0	10
Isosystoxsulfoxid	10	10	1.0	10	10
Isosystoxsulfon	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tinox	50	50	30	20	50
Isotinox	10	10	10	5	10
Isotinoxsulfoxid	10	10	10	5	10
Isotinoxsulfon	10	10	10	5	10
Trichlorphos	50-100	50-100	50-100	50-100	0.2-0.5
Carbaryl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

* k.N. = kein Nachweis.

Dimethoat lässt sich dagegen mit diesem Oxydationsverfahren nur in Mengen von > 500 ng/Fleck nachweisen. Durch die nach der Bromoxydation notwendige Erwärmung der Platten werden die direkt hemmenden Verbindungen in ihrer Nachweisempfindlichkeit wenig beeinflusst. Dies gilt jedoch nur, wenn Mengen in Nanogramm-bereich und mehr pro Fleck vorliegen. DDVP sowie Dibrom gehen während dieser Manipulation, wahrscheinlich infolge Verdampfung, vollständig verloren (Fig. 1 und 2). Neben dem R_F -Wert kann dieses typische Verhalten zur Identifizierung dieser beiden Verbindungen herangezogen werden. Ähnliche Ergebnisse werden bei der Oxydation mit N-Bromsuccinimid⁹ erzielt.

Im Verlaufe der Untersuchungen erfolgte die Beobachtung, dass die Nachweisempfindlichkeit der mit Bromdampf oxydierbaren Thionophosphate wesentlich von der jeweils herrschenden Luftfeuchtigkeit beeinflusst wird und zwar in dem Sinne, dass eine hohe Luftfeuchtigkeit eine höhere Nachweisempfindlichkeit bewirkt. Demgegenüber hat die Einwirkungsdauer des Bromdampfes (30 sec bis 5 min) bei vergleichbaren äusseren Bedingungen keinen grundsätzlichen Einfluss auf den Nachweis.

Aktivierung von Thionophosphorsäureestern mit wässriger Bromlösung

Die nicht befriedigenden Ergebnisse bei der Aktivierung der Thionophosphate mit Bromdampf und die o.a. Beobachtungen hinsichtlich der Beziehung Luftfeuchtigkeit-Nachweisempfindlichkeit, veranlassten uns daraufhin, die Oxydation mit gesättigter wässriger Bromlösung vorzunehmen. Dazu werden die entwickelten und von organischen Lösungsmitteln befreiten Platten bis zum Auftreten einer schwachen oberflächlichen Befeuchtung mit der frisch bereiteten Bromlösung gleichmässig

besprüht. Nach einer Einwirkungsdauer von 15 min bei Zimmertemperatur wird das überschüssige Brom durch leichtes Besprühen mit einer 0.1 M Natriumthiosulfat-Lösung beseitigt. Zu beachten ist hierbei, dass die Trägerschicht durch das mehrmalige Besprühen nicht zu stark befeuchtet wird; evtl. muss vor dem folgenden Aufsprühen der Enzymlösung mit einem kühlen Luftstrom die Oberfläche leicht angetrocknet werden. Der Nachweis der Inhibitoren wird dann wiederum, wie eingangs beschrieben, vorgenommen. Mit diesem Oxydationsverfahren ist beim Parathion, Methylparathion und Bromophos, im Vergleich zur Bromdampfbehandlung, eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um etwa 2 Zehnerpotenzen zu erzielen. Auch beim Systox und Isosystoxsulfoxid ist eine sichtbare Steigerung der Anzeigeempfindlichkeit, offenbar durch die Bildung des Sulfons, festzustellen. Beim Dimethoat hingegen führt auch dieses Verfahren zu keiner Steigerung der Hemmintensität (vgl. Tabelle III).

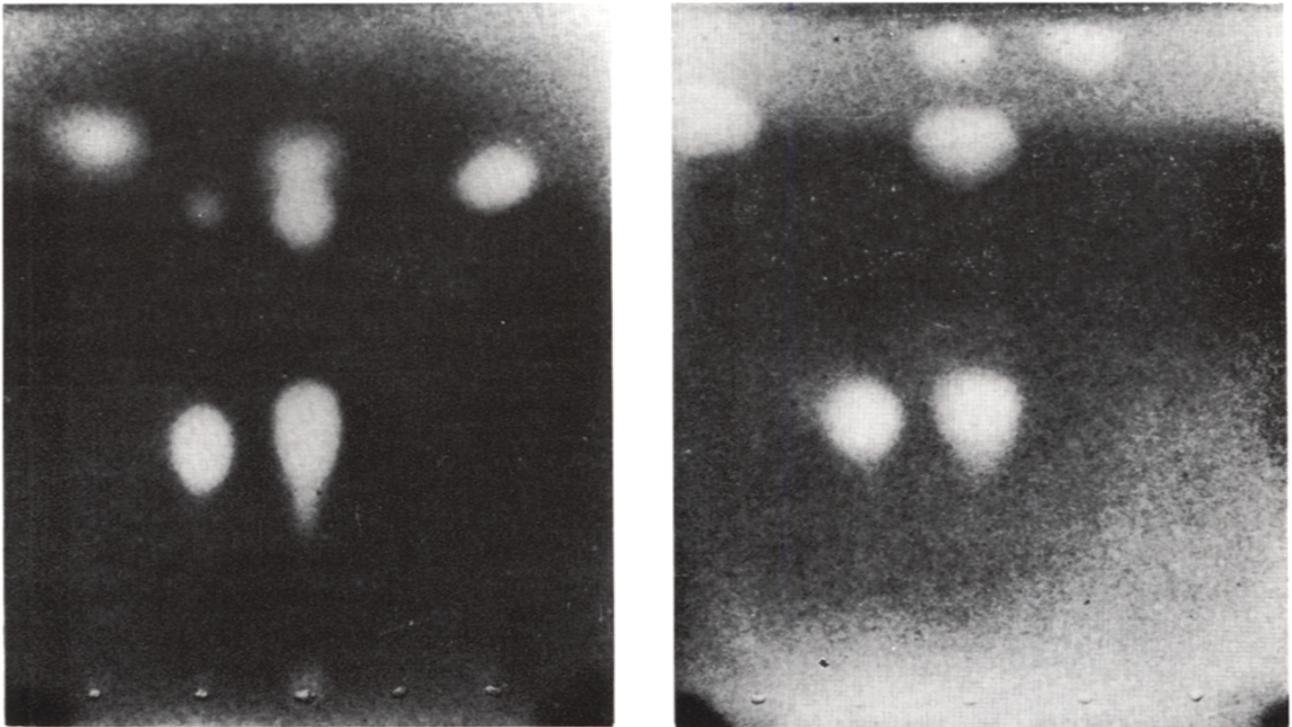


Fig. 1. Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis von Esteraseinhibitoren. Aufgetragen von links nach rechts: Carbaryl 50 ng, Trichlorphon 100 ng, Gemisch, Methylparathion 10 ng, DDVP 10 ng. Ohne Oxydation; Laufmittel: Benzol-Aceton (2:1).

Fig. 2. Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis von Esteraseinhibitoren. Aufgetragen von links nach rechts: Carbaryl 50 ng, Trichlorphon 100 ng, Gemisch, Methylparathion 10 ng, DDVP 10 ng. Mit Bromdampfxydation; Laufmittel: Benzol-Aceton (2:1).

Zu bemerken ist, dass durch die Verwendung von Natriumthiosulfat zur Entfernung des Bromüberschusses und die damit verbundene Ausschaltung der Erwärmung DDVP und Dibron, wie auch alle anderen direkt hemmenden Verbindungen, ohne Empfindlichkeitseinbuße nachzuweisen sind.

Aktivierung von Thionophosphorsäureestern durch U.V.-Bestrahlung

Von verschiedenen Autoren¹⁰⁻¹⁴ wurde eine Isomerisierung der Thionophosphate unter Einwirkung von U.V.-Strahlen festgestellt. Im Verlaufe dieser Bestrahlung

steigt die Anticholinesterase-Aktivität beträchtlich an. Neben der Isomerisierung ist dabei auch eine Oxydation zum Phosphorsäureester infolge der Ozonwirkung nicht auszuschliessen.

In unseren Untersuchungen bestrahlen wir die Platten unter einer U.V.-Analysenlampe "S 375". Die Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeit von der Bestrahlungsdauer geht aus Tabelle IV hervor. Dabei hat sich für die Bestrahlung eine Dauer von 15 min nach vorausgehender leichter Befeuchtung der Trägerschicht mit Wasser als günstig erwiesen (Tabelle IV).

TABELLE IV

EINFLUSS DER DAUER DER U.V.-BESTRAHLUNG AUF DIE ANTIENZYMAKTIVITÄT VON DIMETHOAT

Bestrahlungsdauer (min)	Beschaffenheit der Schicht	
	Trocken (ng)	Befeuchtet (ng)
10	50-100	50
20	10-50	10-30
30	50-100	10-50

Bei der Bestrahlung von Methylparathion und Dimethoat auf der Dünnschichtplatte vor der chromatographischen Trennung konnte als Hauptbestrahlungsprodukt des Methylparathions neben zwei nicht näher untersuchten Verbindungen sein PO-Analoges, das Methylparaoxon, nachgewiesen werden. Auch beim Dimethoat tritt als Bestrahlungsprodukt das PO-Analoge (Fig. 3). Die PO-Analogen als Vergleichssubstanzen wurden nach der Bestrahlung aufgetragen.

Ausser Dimethoat lassen sich die anderen untersuchten Thionophosphate nach der Bestrahlung ebenfalls mit hoher Empfindlichkeit nachweisen. Die Antienzymaktivität direkthemmender Verbindungen wird, wie aus Fig. 4 sowie aus Tabelle III hervorgeht, nicht beeinträchtigt.

Aktivierung von Trichlorphon durch Umlagerung zum DDVP

In neutraler und alkalischer Lösung findet eine Umlagerung des Phosphorsäureesters Trichlorphon in den Phosphorsäureester DDVP statt¹⁵⁻¹⁹. Diese Umwandlung wird in Serum bzw. Organhomogenaten wesentlich beschleunigt, wobei jedoch gleichzeitig eine verstärkte Hydrolyse des gebildeten DDVP zu verzeichnen ist. Aus eigenen Untersuchungen über die Kinetik der Enzymhemmung mit DDVP und Trichlorphon kann geschlossen werden, dass für die Enzymhemmung durch Trichlorphon die Bildung des DDVP Voraussetzung ist⁷.

Aus diesem Verhalten war zu folgern, dass eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Trichlorphons durch eine beschleunigte Umlagerung in das DDVP zu erzielen sein müsste. Als ein geeignetes Verfahren hat sich das Besprühen der Platte nach der Chromatographie mit einer verdünnten wässrigen Ammoniaklösung (1 Teil konz. Ammoniak + 4 Teile Wasser) oder das kurzfristige Einstellen der leicht angefeuchteten Platte in eine mit Ammoniakdampf gesättigte Kammer erwiesen. Die damit erreichbaren Aktivitätssteigerungen in Abhängigkeit von der Einwirkungs-dauer gehen aus Tabelle V hervor.

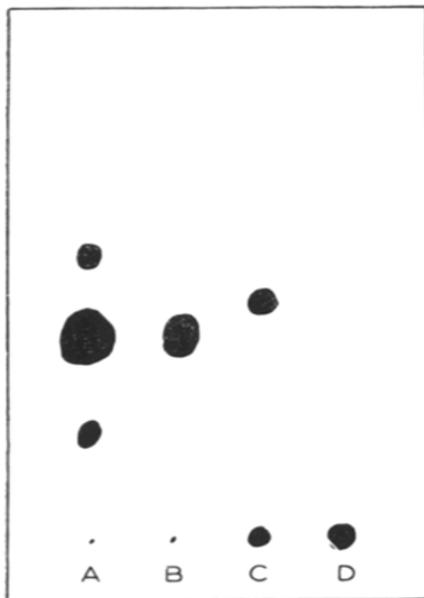


Fig. 3. Bestrahlung von Methylparathion und Dimethoat auf der Dünnschichtplatte vor chromatographischer Trennung. (A) = Methylparathion 50 ng; (B) = Methylparaaxon 1 ng; (C) = Dimethoat 500 ng; (D) = PO-Dimethoat 100 ng. Bestrahlungsdauer 15 min; Laufmittel Benzol-Aceton (9:1).

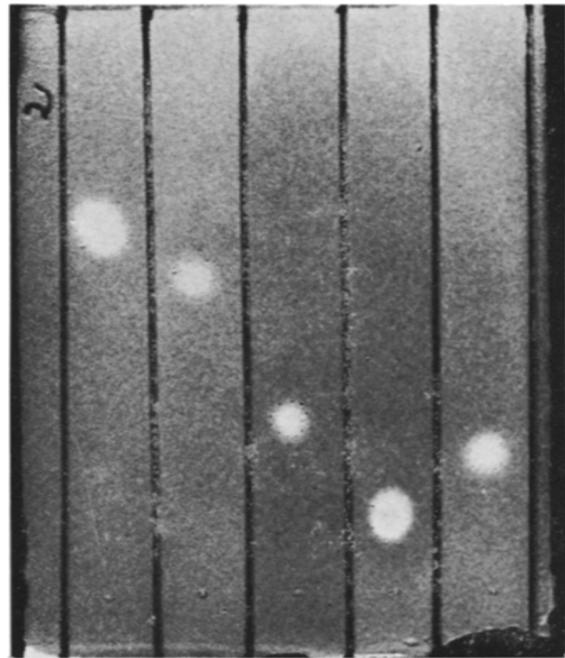


Fig. 4. Bestrahlung der Dünnschichtplatte nach chromatographischer Trennung. (Aufgetragen von links nach rechts: Parathion 1 ng, Methylparathion 1 ng, Carbaryl 10 ng, Methylparaaxon 1 ng, DDVP 10 ng. Bestrahlungsdauer 15 min; Laufmittel Benzol-Aceton 19:1).

Die Einführung verschiedener Aktivierungsverfahren, speziell für die Thionophosphorsäure- und den Phosphonsäureester Trichlorphon, schafft die Voraussetzungen für einen empfindlichen Nachweis aller in Tabelle I ausgeführten insektiziden Esterasehemmer. Die Bestimmung derartig kleiner Mengen macht es möglich, die Aufarbeitung und Reinigung von Extrakten biologischer Materialien pflanzlicher und tierischer Herkunft auf ein Mindestmass zu beschränken, da Störungen von seiten mitextrahierter natürlicher Stoffe weitgehend ausgeschlossen werden können^{20,21}. Durch Variieren der Fließmittelsysteme kann aus den R_F -Werten der Wirkstoffe und evtl.

TABELLE V

STEIGERUNG DER ANTIENZYMAKTIVITÄT VON TRICHLORPHON DURCH WÄSSRIGE AMMONIAKLÖSUNG BZW. AMMONIAKDAMPF

Behandlung der Platten mit			
Wässriger Ammoniaklösung		Ammoniakdampf	
Inkubationsdauer (min)	Nachweisgrenze (ng)	Einwirkungsdauer (min)	Nachweisgrenze (ng)
10	0.5-1	0.5	1
20	0.5-1	1.0	1
30	1-5	2.0	1
—	50-100	—	—

vorhandener toxischer Metabolite sowie aus dem Verhalten einzelner Wirkstoffe gegenüber den verschiedenen Aktivierungsverfahren eine Identifizierung der Esteraseinhibitoren vorgenommen werden. In bestimmten, von der Nachweisempfindlichkeit der jeweiligen Wirkstoffe bzw. Wirkstoffmetaboliten abhängigen Konzentrationsbereichen ist durch visuellen Fleckenvergleich eine semiquantitative Bestimmung möglich.

DANK

Für zuverlässige Mitarbeit danke ich Frau B. LEXOW, Fräulein C. KOHNERT, Fräulein B. EBERT und Fräulein E. PLEWKA.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es werden für 20 insektizide Esteraseinhibitoren die R_F -Werte im Fließmittelsystem Benzol-Aceton unterschiedlicher Mischungsverhältnisse angeführt.

2. Durch Anwendung unterschiedlicher Aktivierungsverfahren kann die Nachweisempfindlichkeit der primär nicht oder nur schwachhemmenden Thiono- bzw. Dithiophosphorsäureester sowie die des Phosphorsäureesters Trichlorphon beträchtlich gesteigert werden.

3. Für die Thionophosphorsäureester Parathion, Methylparathion und Bromophos erweist sich die Oxydation mit wässriger Bromlösung der bisher üblichen Behandlung mit Bromdampf stark überlegen.

4. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Dimethoats ist nur durch Einwirkung von U.V.-Strahlen zu erzielen. Die anderen Thionophosphorsäureester lassen sich dabei ebenfalls mit hoher Empfindlichkeit nachweisen.

5. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Trichlorphons ist durch Behandlung mit Ammoniak unter Umwandlung zum DDVP möglich.

LITERATUR

- 1 H. ACKERMANN, *Mitteilungsbl. GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.*, 19 (1965) 261.
- 2 H. ACKERMANN, *Nahrung*, 10 (1966) 273.
- 3 A. ELREFAI UND T. L. HOPKINS, *J. Agr. Food Chem.*, 13 (1965) 477.
- 4 P. J. BUNYAN, *Analyst*, 89 (1964) 615.
- 5 C. E. MENDOZA, P. J. WALES, H. A. MCLEOD UND W. P. MCKINLEY, *Analyst*, 93 (1968) 34.
- 6 J. J. MENN UND J. B. MCBAIN, 6. *Intern. Pflanzenschutz-Kongress Wien*, 30.8-6.9, 1967.
- 7 H. ACKERMAN, *Habilitationsschrift*, Humboldt-Universität, Berlin, 1967.
- 8 W. P. MCKINLEY UND S. J. READ, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 45 (1962) 467.
- 9 J. W. COOK, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 38 (1955) 826.
- 10 J. C. GAGE, *Biochem. J.*, 54 (1953) 426.
- 11 P. A. GIANG UND M. S. SCHECHTER, *J. Agr. Food Chem.*, 8 (1960) 51.
- 12 J. E. CASIDA, *Science*, 122 (1955) 597.
- 13 J. W. COOK, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 38 (1955) 664.
- 14 L. C. MITCHELL, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 44 (1961) 643.
- 15 H. SOHR UND K.-H. LOHS, *Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin*, 7 (1965) 708.
- 16 R. L. METCALF, I. R. FUKUTO UND R. B. MARCH, *J. Econ. Entomol.*, 52 (1959) 44.
- 17 W. LORENZ, *D. B. P.* 1003720, Farbenfabriken Bayer (1954).
- 18 W. F. BARTHEL, B. H. ALEXANDER, P. A. GIANG UND S. A. HALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2424.
- 19 R. MÜHLMANN UND G. SCHRADER, *Z. Naturforsch.*, 12b (1957) 196.
- 20 H. ACKERMANN, Unveröffentlichte Untersuchungen.
- 21 H. ACKERMANN, R. ENGST UND G. FECHNER, *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.*, im Druck.