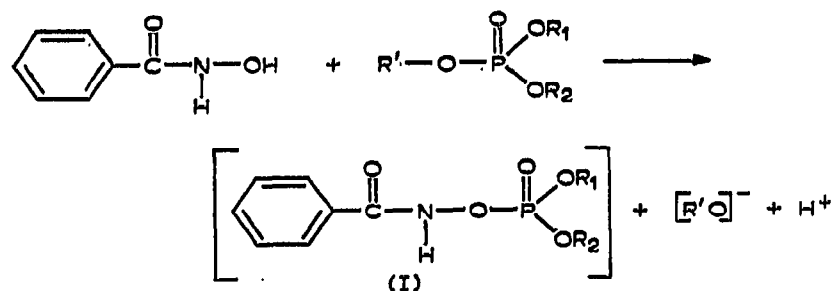


CHROM. 4063

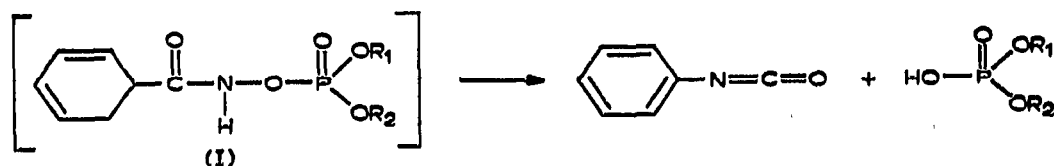
Über ein Sprühreagens zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis Cholinesterase hemmender Insektizide

EPSTEIN UND DEMEK¹ beschrieben eine analytische Reaktion, deren Kinetik sie *in vitro* spektrophotometrisch untersuchten. Bei dieser Methode sollte das bevorzugte Reagieren von Cholinesterase hemmenden Phosphorsäurederivaten mit Hydroxamsäuren ausgenutzt und der Reaktion dieser Verbindungen mit dem Enzym selbst vergleichend gegenüber gestellt werden.

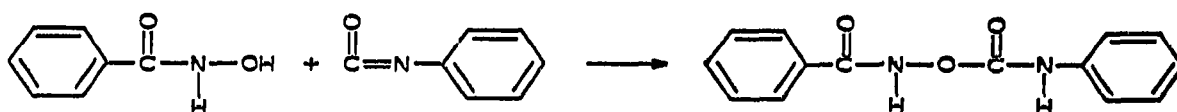
Wir untersuchten, inwieweit sich diese Reaktion für den dünn-schichtchromatographischen Nachweis Cholinesterase hemmender Insektizidwirkstoffe einsetzen lässt. Der Nachweis beruht auf der bevorzugten Reaktion der Cholinesterasehemmer, z.B. insektizider Phosphorsäureester, mit Benzhydroxamsäure (vgl. Lit. 1).



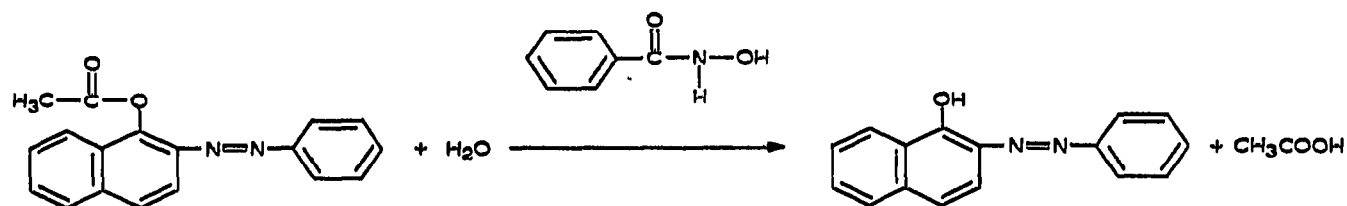
Das Zwischenprodukt I zerfällt spontan bei gleichzeitiger Lossenscher Umlagerung im Benzhydroxamsäureteil.



Mit überschüssiger Benzhydroxamsäure reagiert das Phenylisocyanat wie folgt:



Die Anwesenheit des Cholinesterasehemmers verhindert so die von der Hydroxamsäure katalysierte alkalische Hydrolyse des 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetats zum roten 2-Azobenzolnaphthol-(1):



Die mit Cholinesterasehemmern bedeckten Flächen müssen sich also weiss vom roten Untergrund der besprühten Dünnschicht abheben.

Experimentelles

Die getesteten Wirkstoffe (in analytischer Standardqualität) wurden auf handgegossene Kieselgel H-Platten aufgetragen (3.5 g Kieselgel H wurden in 15 ml Wasser suspendiert auf eine Glasplatte vom Format 20 × 20 cm verteilt). Fließmittel: Cyclohexan-Dioxan (7:3). Sandwich-Verfahren (zwei beschichtete Platten im Abstand 2 mm eingestellt), Laufstrecke 10 cm.

Als günstigstes Nachweisverfahren erweist sich nachstehende Methode: Zuerst wird mit 0.001 M Natriumtetraboratpuffer, pH 9, deutlich nass gesprüht. Nach leicht-

TABELLE I

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER PHOSPHORSÄUREESTER

	Nachweis- grenze (μg)
Chlorfenvinphos	3 (3)
Dibrom	0.5 (0.5)
Dichlorphos	0.5 (0.5)
Mevinphos	3 (3)
Paraoxon	3 (3)
Phosphamidon	0.5 (0.5)
Schradan	3 (3)

tem Antrocknen erfolgt mässig starkes Sprühen einer $2 \cdot 10^{-3}$ M Lösung von Benzhydroxamsäure (Schuchardt, 99%ig) in Wasser. Nach abermals leichtem Antrocknen wird schliesslich mässig mit einer $2.5 \cdot 10^{-3}$ M Lösung von 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetat in Aceton nachgesprüht. Die Platten werden sofort 10 Min. lang einer Temperatur von 80° ausgesetzt. Die Herstellung des 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetats erfolgte wie bei EPSTEIN UND DEMEK¹ beschrieben.

Resultate und Diskussion

In den Tabellen I–IV sind die unteren Nachweisgrenzen für die Wirkstoffe angegeben, die aufgrund der ihnen zugeschriebenen Cholinesterase hemmenden Wir-

TABELLE II

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER MONOTHIOPHOSPHORSÄUREESTER

	Nachweis- grenze (μg)		Nachweis- grenze (μg)
Bromophos	— (3)	E 838	100 (5)
Bromphos-äthyl	— (3)	Endothion	10 (5)
Chlorthion	50 (50)	Fenchlorphos	— (3)
Coumaphos	10 (10)	Fenitrothion	50 (50)
Cumithoat	— (10)	Fenthion	50 (3)
Demeton-O	— (3)	Oxydemeton-methyl	10 (10)
Demeton-O-methyl	10 (10)	Parathion	25 (25)
Demeton-S	— (5)	Parathion-methyl	25 (25)
Demeton-S-methyl	5 (5)	Vamidothion	3 (0.5)
Diazinon	50 (3)	Zinophos	100 (0.5)

TABELLE III

UNTERE NACHWEISGRENZE DER DITHIOPHOSPHORSÄUREESTER

	Nachweis- grenze (μg)		Nachweis- grenze (μg)
Azinphos-äthyl	— (3)	Formothion	3 (0.5)
Azinphos-methyl	— (3)	Malathion	100 (0.5)
Carbophenothion	— (5)	Menazon	— (3)
Carbophenothion-methyl	100 (10)	Methiadathion	— (3)
Dimethoat	— (3)	Morphothion	— (3)
Dioxathion	10 (10)	Phenkapton	— (25)
Disulfoton	— (3)	Phenthoat	100 (25)
Disulfotonsulfon	100 (5)	Phorat	— (25)
Ethion	— (10)	Thiometon	100 (10)

kung die Farbstoffbildung unterbinden, das heisst einen weissen Fleck auf rotem Grund verursachen sollten. Die Ergebnisse in Klammern wurden erhalten, nachdem die Dünnschichtplatte vor dem Besprühen 15 Min. mit ungefiltertem U.V.-Licht bestrahlt worden war.

Bekanntlich erfolgt die Cholinesterasehemmung vornehmlich durch die schwefelfreien Phosphorsäureester. Deshalb wird der Nachweis der Verbindungen der Tabelle I nach U.V.-Bestrahlung auch nicht empfindlicher. Bei vielen schwefelhaltigen Phosphorsäureestern der Tabellen II und III wird der Nachweis nach U.V.-Behandlung deutlich empfindlicher oder überhaupt erst möglich. Für einige dieser Substanzen, bei denen dies nicht erzielt wurde, kann angenommen werden, dass eine

TABELLE IV

UNTERE NACHWEISGRENZEN INSEKTIZIDER CARBAMATE

<i>N</i> -Monomethyl- carbamate	Nachweis- grenze (μg)	<i>N,N</i> -Dimethyl- carbamate	Nachweis- grenze (μg)
Carbaryl	3 (3)	Dimetan	0.5 (—)
Methiocarb	10 (10)	Dimetilan	0.5 (—)
Minacide	— (—)	Isolan	— (—)
Zectran	10 (10)	Pyramat	— (—)
		Pyrolan	— (—)

weitergehende Oxydation einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit entgegenwirkt. Die Ergebnisse beim Parathion und Parathion-methyl bleiben uns allerdings unverständlich*.

Mit besonderem Interesse erwarteten wir das Resultat bei den insektiziden Carbamaten (Tabelle IV). Dass die Cholinesterase hemmende Wirkung der Carbamate von den unveränderten Wirkstoffen ausgeübt wird, scheint mit der Unbeeinflussbar-

* Inzwischen gelang es uns, die Nachweisempfindlichkeit bei den Nitrogruppen tragenden Wirkstoffen Parathion, Parathion-methyl, Chlorthion und Fenitrothion durch *einstündige* Bestrahlung mit ungefiltertem U.V.-Licht auf durchweg 5 μg herunterzudrücken. Offenbar ist zur Umwandlung der durch die aromatische Nitrosubstitution resonanzstabilisierten Wirkstoffen in die reaktionsfähige Form ein höherer Energieaufwand erforderlich.

TABELLE V

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER N-PHENYLCARBAMATE

	<i>Nachweis- grenze (μg)</i>
Barban	10 (1)
CEPC	25 (25)
Chlorbufam	25 (25)
Chlorpropham	25 (25)
CPPC	25 (25)
Phenmedipham	25 (25)
Propham	10 (5)

keit der Ergebnisse durch U.V.-Einwirkung bestätigt zu werden. In der ansonsten sehr unterschiedlichen Reaktivität dieser Carbamate gegenüber Benzhydroxamsäure vermögen wir keine Gesetzmässigkeit zu erkennen.

Tabelle V zeigt, dass auch die herbizidwirksamen N-Phenylcarbamate mit

TABELLE VI

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER HERBIZIDEN THIOLCARBAMATE

	<i>Nachweis- grenze (μg)</i>
Diallat	— (1)
Eptam	— (25)
Pebulate	— (3)
Triallat	— (1)
Vernolate	— (25)

Benzhydroxamsäure reagieren und den Nachweis verfälschen können. Ähnliches gilt für die herbiziden Thiolcarbamate (Tabelle VI). Hier zeigt sich deutlich, dass offenbar nur die O-Analogen, vermutlich die freien N,N-Dialkylcarbaminsäuren, zu reagieren vermögen.

TABELLE VII

STÖRUNG DES NACHWEISES DURCH INSEKTIZIDE CHLORKOHLLENWASSERSTOFFE

	<i>Nachweis- grenze (μg)</i>		<i>Nachweis- grenze (μg)</i>
Aldrin	[25] (10)	Heptachlor	[50] (50)
Chlordan	[50] (50)	Heptachlorepoxyd	— —
DDD	[25] (25)	Hexachlorbenzol	— —
DDE	— —	Isobenzan	— (3)
DDT	— —	Isodrin	[50] (50)
Dicofol	[25] (3)	Lindan	— —
Dieldrin	— (25)	Methoxychlor	— (3)
Endosulfan	— (1)	Perthan	[50] (50)
Endrin	[100] (3)	Toxaphen	[50] (50)

Besonders bedauerlich ist die Feststellung, dass eine Reihe insektizider Chlor-kohlenwasserstoffe (Tabelle VII) nach U.V.-Bestrahlung gleichfalls Produkte liefern, die mit Benzhydroxamsäure reagieren, einige unverständlicherweise in recht empfindlicher Grössenordnung. Etliche dieser Wirkstoffe verursachen in den in eckige Klammern gesetzten Mengen auch ohne U.V.-Belichtung zunächst helle Flecken. Diese Flecken verschwinden jedoch nach mehreren Stunden völlig. Alle "echten" Farbstoffbildungshemmflecken der anderen Verbindungsklassen sind dagegen mehrere Tage lang sichtbar.

Aufgrund des Gesamtergebnisses kann ausgesagt werden, dass die Benzhydroxamsäurereaktion nur mässig spezifisch auf die sogenannten Cholinesterasehemmer angewendet werden kann. Das allgemeine Empfindlichkeitsniveau liegt wesentlich über dem des enzymatisch-dünnschichtchromatographischen Nachweises der insektiziden Phosphorsäureester (vgl. Lit. 2). Dagegen ist die Sicherheit und Reproduzierbarkeit des beschriebenen Verfahrens sehr gut. Für eine Reihe definierter Fragestellungen, besonders für den Nachweis der schwefelfreien Phosphorsäureester sowie von Varnidithion, Formothion, Carbaryl, Dimetan und Dimetilan ohne U.V.-Behandlung dürfte das Sprühagens von Nutzen sein.

Dank

Für sorgfältige Mitarbeit bei der Untersuchung des umfangreichen Materials wird Frau A.-M. TURGAY besonders gedankt. Den Firmen Aglukon, American Cyanamid, Badische Anilin- und Sodafabrik, Bayer, Cela, Chemische Fabrik Mark-tredwitz, Deutsche Ortho, Dow Chemicals, Geigy, Hercules Powder, Merck, Monsanto, Montecatini, Rhône-Poulenc, Riedel de Haen, Rohm & Haas, Sandoz, Schering, Shell, Spiess & Sohn, Stauffer Chemical Corp., Union Carbide, Velsicol wird für die freundlicher Weise überlassenen Wirkstoffe gedankt.

*Institut für Pflanzenschutzmittelforschung der
Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
D 1 Berlin 33 (B.R.D.)*

W. EBING

1 J. EPSTEIN UND M. M. DEMEK, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1136.

2 H. ACKERMANN, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 309.

Eingegangen am 5. März 1969

J. Chromatog., 42 (1969) 140-144

CHROM. 4070

Thin-layer chromatographic separation of the products of the reaction between *p*-chloro- or *p*-bromonitrobenzene and sodium methoxide by spot transfer

When dealing with the reduction and substitution products of a reaction between *p*-chloro- or *p*-bromonitrobenzene and sodium methoxide, the resulting mixture of products contains, among others, the following compounds: *p*-methoxy-

J. Chromatog., 42 (1969) 144-145