

CHROM. 4129

## EINDIMENSIONALE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE CHLORIRTER INSEKTIZIDE AUF FERTIGPLATTEN MIT MEHRFACHER ENTWICKLUNG

A. SZOKOLAY UND A. MADARIČ

*Forschungsinstitut für Hygiene, Bratislava (Tschechoslowakei)*

(Eingegangen am 14. April 1969)

## SUMMARY

*One-dimensional chromatography of chlorinated insecticides on commercial standard thin-layer plates with multiple development*

A one-dimensional, double-development thin-layer chromatographic method is described for the separation of chlorinated insecticides on standardized "Silufol"® plates (0.13 mm silica gel). The plates are rinsed with water and sprayed with a solution of AgNO<sub>3</sub> and 2-phenoxyethanol and a U.V. lamp (254 nm) is used for visualization. By this method thirteen chlorinated insecticides can be separated including the closely related compounds such as heptachlor and DDE, heptachlor epoxide and lindane, endrin and dieldrin, even if the four isomers of HCH are present. For that purpose only two solvent systems are needed. Only one solvent is necessary for the separation of the many mixtures of common insecticides if one-dimensional multiple chromatography is applied. For most insecticides the limit of detection lies between 0.01 and 0.05 µg. The *R<sub>DD</sub>* values for all insecticides are listed and the sensitivity of the various methods of detection is compared with known values.

## EINLEITUNG

Die Dünnschichtchromatographie (DC) fand als einfache und sehr empfindliche Methode sehr rasch Verbreitung für die Analyse chlororganischer Insektizide. Die ersten Schritte dazu haben YAMANURA UND NIWAGUCHI<sup>1</sup>, BÄUMLER UND RIPPSTEIN<sup>2</sup>, PETROWITZ<sup>3</sup> sowie WALKER UND BEROZA<sup>4</sup> getan. Es gelang ihnen, einige chlororganische Insektizide zu trennen. Die erste umfangreiche Studie in dieser Richtung stammt aber von KOVACS<sup>5</sup>; er hat die Trennung von zwölf Insektiziden auf Aluminiumoxid- und Kieselgelschichten beschrieben. Als Lösungsmittel zur Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurde *n*-Heptan verwendet, zur Sichtbarmachung mit AgNO<sub>3</sub>-Lösung in Aceton mit Zusatz von 2-Phenoxyäthanol besprüht und anschliessend unter einer Germizidlampe bestrahlt. Auf diese Weise hat KOVACS je nach Substanz eine Empfindlichkeit des Nachweises zwischen 0.01 und 0.05 µg erreicht. Auch ADAMS UND SCHECHTER<sup>6</sup> haben dem Sprühreagenz 2-Phenoxyäthanol zugesetzt. KATZ<sup>7</sup> gelang es mit neuen Sprühreagenzien (Jod und Diphenylamin und ZnCl<sub>2</sub>) nur eine Empfindlichkeit von 1–3 µg pro Flecken zu erzielen. In

einer weiteren, detaillierten Arbeit haben ABBOT und Mitarbeiter<sup>8</sup> die Trennung von sechzehn Insektiziden mit fünfzehn Trennsystemen an Kieselgel und Aluminiumoxid studiert; sie konnten Flecken nur bis zu  $0.5 \mu\text{g}$  Substanz nachweisen, verwendeten aber zur photochemischen Reaktion des Chlors kein 2-Phenoxyäthanol. In den Versuchen zu den aufgezählten Veröffentlichungen wurde eine sehr breite Skala von Lösungsmittelkombinationen und Adsorbentien erprobt. Es zeigte sich aber, dass man, um eine annehmbare Trennung der Insektizide zu erreichen, entweder eine grosse Zahl von Lösungsmitteln zum Entwickeln der Chromatogramme nebeneinander einsetzen, oder aber mit der Extraktion eine Trennung "screening" kombinieren muss. Wegen ihrer Gründlichkeit haben die genannten Arbeiten als Ausgangsbasis für alle weiteren Studien gedient.

DÉNES und Mitarbeiter<sup>9</sup> haben die Technik von KOVACS weiterentwickelt und im Detail durchgearbeitet. Ein Verfahren zur zweidimensionalen Trennung chlorierter Kohlenwasserstoffe haben EDER und Mitarbeiter<sup>10</sup> entwickelt. WILDBRETT und Mitarbeiter<sup>11</sup> haben die Trennung von fünf Insektiziden mit zweidimensionaler Technik an Kieselgelschichten verbessert, verwendeten jedoch für die photochemische Nachweisreaktion kein 2-Phenoxyäthanol. Auch MOATS<sup>12</sup> hat die Zugabe dieser Substanz zum Sprühreagenz nicht empfohlen. RUDOLPHI<sup>13</sup> hat zur Entdeckung der Insektizide auf den Dünnschichtplatten auch die Fluorescein-Imprägnation statt der photochemischen Reaktion angewandt.

ENGST und Mitarbeiter<sup>14</sup> gelang es, elf Insektizide an Aluminiumoxid- oder Kieselgelplatten mit *n*-Heptan (auch mit Zugabe von Aceton) zu trennen. Nach den Erfahrungen von MORLEY UND CHIBA<sup>15</sup> wurden die chlororganischen Insektizide in ammoniakalischer Silbernitratlösung (ohne 2-Phenoxyäthanol) sichtbar gemacht. ENGST und Mitarbeiter haben auf diese Weise Rückstände auch semiquantitativ bestimmt und eine untere Nachweisbarkeitsgrenze von  $0.1-0.4 \mu\text{g}$  (vereinzelt sogar  $0.05 \mu\text{g}$ ) erzielt.

Wie dieser Literaturüberblick zeigt, sucht man noch immer Wege, die dünn-schichtchromatographische Trennung und Identifizierung chlororganischer Insektizide zu verbessern und zu vereinfachen, nach unserer Meinung deswegen, weil die Bedingungen, die zum Erreichen einer Empfindlichkeit  $< 0.1 \mu\text{g}$  eingehalten werden müssen, bisher nicht genug geklärt worden sind. Ausserdem ist die Trennung der verschiedenen Kombinationen der Insektizide bisher nur durch Einsatz einer grösseren Zahl von Trennsystemen möglich. Insbesondere lassen sich die Paare Heptachlor und DDE und Heptachlorepoxyd und Lindan nur sehr schwer exakt trennen. Ebenso bereitet die Auftrennung von Endrin und Dieldrin sowie der Isomeren von HCH in Anwesenheit einiger insektizider Chlorkohlenwasserstoffe grosse Schwierigkeiten. Wir haben versucht, diese Probleme in optimaler Weise mit Hilfe einfacher Verfahren auf Standard-Dünnschichtplatten mittels eindimensionaler, mehrmaliger Entwicklung<sup>16</sup> zu lösen. Weiterhin haben wir uns mit der Frage des Einsatzes von 2-Phenoxyäthanol zur Sichtbarmachung der Flecken, die bisher noch offen geblieben war, beschäftigt.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Geräte und Reagenzien*

DC-Kieselgelplatten an Aluminium-Reflexfolien mit Stärke als Bindemittel (Csl. Patent Nr. PV4599-66, entspricht etwa den DC-Alufolien-Kieselgel Merck),

20 × 20 cm, mit Schichtdicke 0.130 mm (hergestellt von der Firma Sklářny Kavalír, Votice, Tschechoslowakei, unter der Bezeichnung "Silufol"®).

DC-Entwicklungskammer, 20 × 15 × 20 cm.

Germicidlampe, 15 W, 99 % der Lichtausstrahlung bei Wellenlänge 254 nm.

Auftragspipette 100  $\mu$ l, mit 1  $\mu$ l-Unterteilung.

Sprühvorrichtung.

Sprühreagens: 0.1 g AgNO<sub>3</sub> in 1 ml Wasser lösen, 10 ml 2-Phenoxyäthanol hinzufügen und mit Aceton auf 200 ml auffüllen unter Zugabe eines Tropfens von 30 % igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Fliessmittel: (a) *n*-Heptan p.a.; (b) 0.3 % Äthanol (abs.) in *n*-Heptan.

Insektizidlösungen: 0.1 % Stammlösungen von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -HCH einzeln oder im Gemisch, Dieldrin, Endrin, Aldrin, Heptachlor, Heptachlorepoxyd, DDT, DDE, DDD und Methoxychlor in Äthylacetat, aus denen verdünnte Lösungen mit 50  $\mu$ g/ml Insektizidgehalt vorbereitet wurden.

### Arbeitsgang

*Vorbereitung der Platten.* Mit einem scharfen Messer wurde der Rand der Platten abgeschnitten. Sodann haben wir die Platte in die Entwicklungskammer gestellt, die 5 mm hoch mit dest. Wasser gefüllt war. Dieses wanderte bis zum oberen Rand der Platten und reinigte damit die Adsorptionsschicht von Chloridspuren. Nach dem Herausnehmen der Platten liessen wir das Wasser in Steigrichtung abfließen und 20 min trocknen. Dann wurden die Platten 3–4 min bei 65° im Trockenschrank aktiviert. Nach Abkühlung im Exsiccator sind die Platten zum Auftragen der Insektizidlösungen bereit.

*Entwicklung des Chromatogramms und Sichtbarmachung der Flecken.* Ein Gemisch von Insektiziden wurde in Mengen von 0.05 bis 0.5  $\mu$ g (d.h. 1 – 10  $\mu$ l) auf die Startpunkte der Platten (Entfernung mindestens 20 mm von der Seitenkante und 15 mm von unten) aufgetragen.

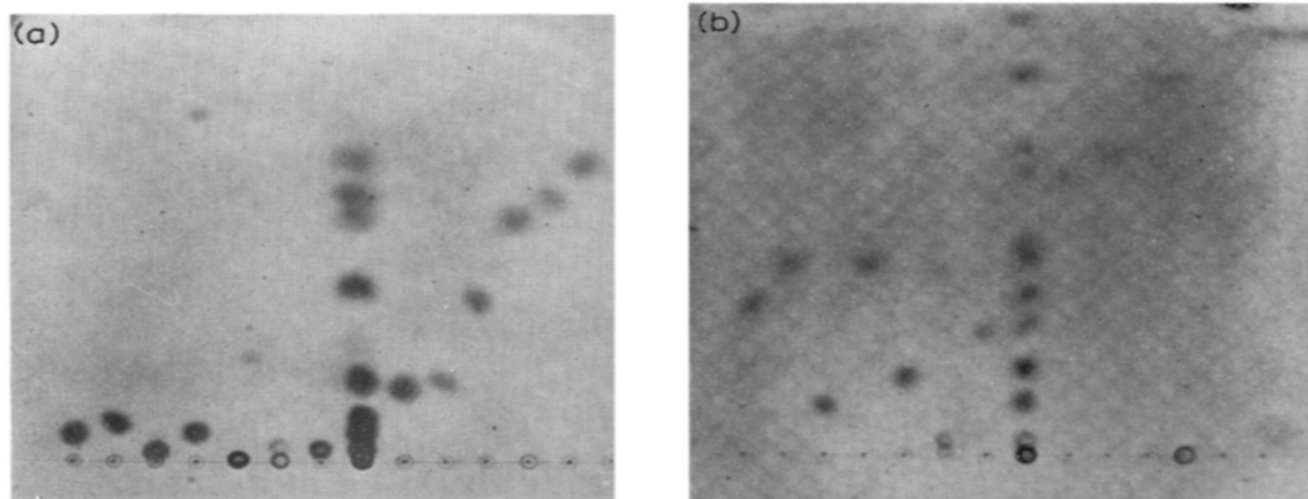


Fig. 1 DC der Insektizide auf der Basis chlorierter Kohlenwasserstoffe einzeln und als Gemisch aufgetragen (Reihenfolge der Insektizide von links nach rechts:  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, Heptachlorepoxyd, Methoxychlor, Endrin, Dieldrin, Gemisch aus allen dreizehn Wirkstoffen,  $\alpha$ -HCH, DDD, *p,p'*-DDT, Heptachlor, DDE, Aldrin.) (a) Einfach entwickelt mit *n*-Heptan. (b) Zweifach, eindimensional entwickelt mit 0.3 % Äthanol in *n*-Heptan. (Der obere Rand der Photographien ist nicht mit der Lösungsmittelfront identisch.)

Dann haben wir die Platten in die Entwicklungskammer, in der sich 100 ml Lösungsmittel befanden, eingetaucht und bis zum oberen Rand der Platten (Winkel:  $60^\circ$ ; Strecke: 135 mm; Dauer: 50 min) entwickelt. Nach 2 min Trocknen bei  $65^\circ$  wurden die Chromatogramme entweder zum zweiten Entwicklungsgang in die Kammer gestellt oder gleich mit 50 ml Sprühreagens besprüht. Nach 10 min Trocknen bei  $65^\circ$  wurden die Chromatogramme mit einer Germicidlampe ( $\lambda = 254$  nm) aus einer Entfernung von 15 cm so lange bestrahlt (ca. 15 min), bis die kleinsten aufgetragenen Mengen von Insektiziden sichtbar hervortraten.

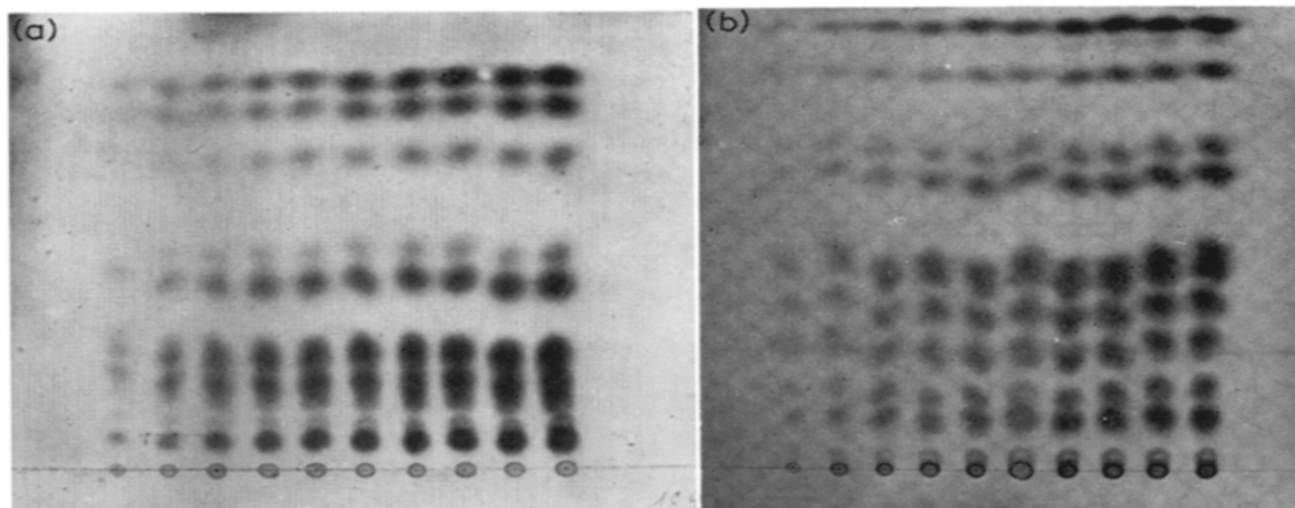


Fig. 2. DC eines Gemisches aus dreizehn insektiziden Chlorkohlenwasserstoffen in steigenden Konzentrationen ( $0.05$ – $0.5 \mu\text{g}$  pro Flecken) nach einfacher bzw. zweifacher, eindimensionaler Entwicklung mit  $0.3\%$  Äthanol in *n*-Heptan (Auftrennung der Insektizide vgl. Fig. 1). (a) Einfach entwickelt. (b) Zweifach, eindimensional entwickelt. (Der obere Rand der Photographien ist nicht mit der Lösungsmittelfront identisch.)

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In unseren Experimenten haben wir dreizehn chlororganische Insektizide getrennt:  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, Heptachlorepoxyd, Methoxychlor, Endrin, Dieldrin,  $\alpha$ -HCH, DDD, *p,p'*-DDT, Heptachlor, DDE und Aldrin. Nach unseren Vorversuchen mit verschiedenen Konzentrationen von Äthanol in *n*-Heptan haben wir festgestellt, dass zur Auftrennung der Insektizide in unserem Falle  $0.3\%$  Äthanol in *n*-Heptan optimal geeignet ist. Ausserdem wurde *n*-Heptan als weiteres Lösungsmittel verwendet.

Fig. 1 zeigt das Ergebnis der DC von dreizehn Insektiziden, einzeln und als Mischung aufgetragen, nach Entwickeln mit Lösungsmitteln, die nach unseren Erfahrungen einen optimalen Trenneffekt geben. In Fig. 2 dokumentieren wir die Auftrennung eines Gemisches aus den dreizehn genannten Insektiziden in steigenden Mengen von  $0.05$ – $0.5 \mu\text{g}$  pro Flecken. Hierfür haben wir in beiden Fällen  $0.3\%$  Äthanol in *n*-Heptan verwendet und zwar für Fig. 2a zur einmaligen, für Fig. 2b zur zweimaligen, eindimensionalen Chromatographie.

Wie man aus Fig. 1b ersehen kann, ist zur Trennung von Mischungen aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -HCH, DDD, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptachlorepoxyd und Methoxychlor die zweimalige Entwicklung mit  $0.3\%$  Äthanol in *n*-Heptan sehr geeignet. Heptachlor,

TABELLE I

$R_{DDD}$ -WERTE UND UNTERE NACHWEISGRENZEN VON DREIZEHN INSEKTIZIDEN CHLORKOHL-  
WASSERSTOFFEN

Mittelwerte berechnet aus je drei  $R_F$ -Werten.

Nr.	Insektizide	$R_{DDD}$ -Werte				Nachweis- grenzen ( $\mu\text{g}$ )
		Einfach entwickelt in		Zweifach entwickelt in		
		0.3 % Äthanol in <i>n</i> -Heptan	<i>n</i> -Heptan	0.3 % Äthanol in <i>n</i> -Heptan	<i>n</i> -Heptan	
1	Endrin	0.01	0.01	0.05	0.01	0.05
2	$\delta$ -HCH	0.13	0.12	0.16	0.08	0.01
3	Methoxychlor	0.13	0.02	0.28	0.03	0.01-0.05
4	Dieldrin	0.24	0.12	0.41	0.21	0.05
5	$\beta$ -HCH	0.50	0.30	0.51	0.31	0.01
6	Heptachlorepoxyd	0.64	0.30	0.68	0.36	0.01-0.05
7	$\gamma$ -HCH	0.53	0.42	0.63	0.50	0.01
8	$\alpha$ -HCH	0.86	0.88	0.90	0.92	0.01
9	DDD	1.00	1.00	1.00	1.00	0.05
10	<i>p,p'</i> -DDT	1.53	1.96	1.26	1.61	0.05
11	Heptachlor	1.87	2.80	1.46	1.94	0.1
12	DDE	2.40	3.09	1.46	2.06	0.1
13	Aldrin	2.40	3.42	1.46	2.16	0.1

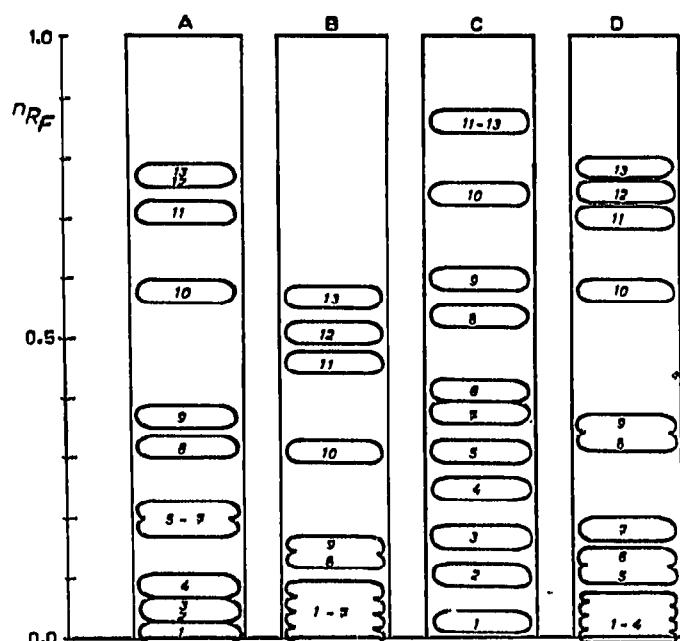


Fig. 3. Schematische Darstellung der Trennungsmöglichkeiten für dreizehn chlororganische Insektizide mittels DC. A und B = einfach entwickelt; C und D = zweifach, eindimensional entwickelt; A und C = 0.3 % Äthanol in *n*-Heptan; B und D = *n*-Heptan; Bezifferung der Insektizidflecken 1-13 entsprechend Tabelle I.

DDE und Aldrin hingegen trennen sich nur gut mit reinem *n*-Heptan als Laufmittel (vgl. Fig. 1a). Wenn von letztgenannten drei Insektiziden sich nur ein in der Mischung befindet, reicht eine zweifache Entwicklung mit 0.3 % Äthanollösung in *n*-Heptan für die Trennung von elf Insektiziden aus.

In Tabelle I haben wir die  $R_{DDD}$ -Werte für alle von uns untersuchten Insektizide in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen angegeben. Ausserdem finden sich dort auch die unteren Nachweisgrenzen für die einzelnen Substanzen. Die Angaben werden, falls man alle beschriebenen Bedingungen einhält, mit routinemässig eingearbeiteten Arbeitskräften immer reproduzierbar sein. Wie aus Tabelle I hervorgeht, kann man bei sechs Insektiziden noch 0.01  $\mu\text{g}$  sichtbar machen; im ungünstigsten Fall, bei drei Substanzen, gelingt es immer noch eine Empfindlichkeit von 0.1  $\mu\text{g}$  pro Flecken zu erzielen.

Fig. 3 zeigt schematisch unter Verwendung der  $R_F$ -Wert-Skala die Trennungsmöglichkeiten für die dreizehn Insektizide in verschiedenen Lösungsmitteln nach einfacher und zweifacher, eindimensionaler Entwicklung der DC. Dieses Schema gestattet es, je nach Art der vorliegenden Insektizidkombination die günstigsten Arbeitsbedingungen auszuwählen. Allgemein ist festzustellen, dass sich die Substanzen mit höheren  $R_F$ -Werten schon durch einfaches Entwickeln in *n*-Heptan gut auftrennen lassen. Durch einen darauf folgenden zweiten Entwicklungsgang in der gleichen Laufrichtung mittels *n*-Heptan, dem eine kleine Menge eines polaren Lösungsmittels — in unserem Fall 0.3 % Äthanol — zugesetzt ist, lassen sich auch die Insektizide mit kleineren  $R_F$ -Werten wesentlich besser trennen. Für bestimmte Kombinationen (z.B. Aldrin, DDE, Heptachlor, *p,p'*-DDT,  $\gamma$ -HCH und Heptachlorepoxyd) ist es wiederum vorteilhafter, zweifach, eindimensional mit reinem *n*-Heptan zu entwickeln.

Schliesslich haben wir auch das Verfahren, Flecken chlororganischer Insektizide sichtbar zu machen, überprüft, um die optimalen Bedingungen für die photochemische Reaktion kennenzulernen und damit möglichst geringe Substanzmengen nachweisen zu können. Bei den Vergleichsversuchen, wie sie in Tabelle II zusammengestellt sind, haben wir stets mit konstanten Arbeitsbedingungen gearbeitet und nur die jeweils

TABELLE II

VERGLEICH EINIGER VERFAHREN ZUR SICHTBARMACHUNG DER FLECKEN CHLORORGANISCHER INSEKTIZIDE AUF DÜNNSCICHTPLATTEN

Art der Sichtbarmachung	Bereich für die semi-quantitative Auswertung ( $\mu\text{g}$ )	
	Minimum	Maximum
(1) Besprühen mit $\text{AgNO}_3$ -Lösung mit 2-Phenoxyäthanol. Bestrahlen bei 254 nm <sup>a</sup> .	0.01	0.50
(2) Besprühung wie unter (1). Bestrahlen mit U.V.-Lampe "Hanau" mit breitem Spektrum.	0.30	2.00
(3) Besprühen wie unter (1) ohne 2-Phenoxyäthanol. Bestrahlen wie unter (1).	0.50	2.00
(4) Imprägnation der Platten mit Fluorescein.	0.50	5.00
(5) Besprühen und Bestrahlen wie unter (1). Entwicklung an Platten ohne Vorreinigung mit Wasser <sup>a</sup> .	1.00	10.00

<sup>a</sup>) vgl. EXPERIMENTELLER TEIL.

angegebenen Faktoren variiert. Bei der Arbeitsweise "ohne 2-Phenoxyäthanol" haben wir nach dem Vorschlag von ABBOT und Mitarbeiter<sup>8</sup> sowie von MORLEY UND CHIBA<sup>15</sup> dem Sprühreagenz Ammoniak zugesetzt.

Wie die Werte in Tabelle II eindeutig belegen, kann man mit der von uns beschriebenen Arbeitsweise die geringsten Mengen chlororganischer Insektizide nachweisen. Demnach hängt die Empfindlichkeit der photochemischen Reaktion zur Sichtbarmachung der Flecken entscheidend von der Wellenlänge (254 nm) des auf die Platte gestrahlten Lichtes ab. Unter dieser Voraussetzung steigert die Zugabe von 2-Phenoxyäthanol zur AgNO<sub>3</sub>-Lösung die Empfindlichkeit des Nachweises deutlich.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In der Arbeit wird eine eindimensionale zweifache dünn-schichtchromatographische Methode beschrieben, die der Auftrennung chlororganischer Insektizide auf standardisierten Platten "Silufol"<sup>®</sup> (Kieselgel, Schichtdicke 0.13 mm) dient. Bei dieser Methode werden die Platten mit Wasser vorgereinigt, zum Besprühen wird AgNO<sub>3</sub>-Lösung mit 2-Phenoxyäthanol und zur Sichtbarmachung eine U.V.-Lampe (254 nm) verwendet. Mit dieser Methode können dreizehn chlororganische Insektizide getrennt werden einschliesslich der schlecht trennbaren Kombinationen von Heptachlor und DDE, Heptachlorepoxyd und Lindan, Endrin und Dieldrin und zwar auch bei Anwesenheit der vier Isomeren von HCH. Dazu werden nur zwei Entwicklungslösungen gebraucht. Bei vielen Mischungen üblicher Insektizide bei Anwendung der zweifachen, eindimensionalen Chromatographie ist sogar nur ein Entwicklungssystem notwendig. Die Nachweisgrenze liegt bei den meisten Insektiziden zwischen 0.01–0.05 µg pro Flecken. Ausserdem sind bei allen Insektiziden die R<sub>DDP</sub>-Werte angegeben. Ebenso wird die Empfindlichkeit der Sichtbarmachung bei verschiedenen Variationen nach den bisher beschriebenen Erfahrungen miteinander verglichen.

#### LITERATUR

- 1 J. YAMANURA UND T. NIWAGUCHI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S. 626.
- 2 J. BÄUMLER UND S. RIPPSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 1162.
- 3 H. J. PETROWITZ, *Chem. Z.*, 85 (1961) 867.
- 4 K. C. WALKER UND M. BEROZA, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 46 (1963) 250.
- 5 M. F. KOVACS, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 46 (1963) 884.
- 6 M. R. ADAMS UND M. S. SCHECHTER, zitiert von H. V. MORLEY UND M. CHIBA, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 47 (1964) 306.
- 7 D. KATZ, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 269.
- 8 D. C. ABBOT, H. EGAN UND J. THOMSON, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 481.
- 9 A. DÉNES UND V. CZIELESZKI, Persönliche Mitteilungen, 1964 und 1968.
- 10 F. EDER, H. SCHÖCH UND R. MÜLLER, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 55 (1964) 98.
- 11 G. WILDBRETT, M. RUDOLPHI UND F. KIERMEIER, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 129 (1966) 290.
- 12 W. A. MOATS, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 49 (1966) 795.
- 13 M. RUDOLPHI, *Zur Methodik und Problematik des Nachweises insektizider Chlorkohlenwasserstoffe in Milch und Milchprodukten*, Thesis, Technische Hochschule München-Weihenstephan, 1966.
- 14 R. ENGST, R. KNOLL UND B. NICKEL, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 130 (1966) 65.
- 15 H. V. MORLEY UND M. CHIBA, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 47 (1964) 306.
- 16 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S.87.