

The chromatograms were routinely developed twice in the same solvent up to 16 cm above the start line. The plates were dried with warm air before the second development. Each run lasted about 3½ h. For documentation the plates were stained with naphthoresorcinol<sup>4</sup> and photographed on orthochromatic films.

Figs. 1 and 2 show the separations obtained using solvents A and B, respectively; in addition they illustrate the effect of multiple developments in one dimension using a single solvent. As can be seen solvent A is the most efficient for the separation of fructose, glucose, sucrose and FS\*, while solvent B is more convenient for separation of the S, FS, F<sub>2</sub>S . . . F<sub>7</sub>S series.

As already mentioned the plates were coated with suspensions of cellulose in 33 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Cellulose plates prepared without phosphate gave a similar separation pattern, but severe tailing was usually observed. An evaluation of the effect of varying the phosphate concentration revealed that minimal tailing was obtained when the phosphate concentration was kept between 25 and 60 mM. Higher phosphate concentrations resulted in decreased R<sub>F</sub> values.

The author wishes to thank Dr. JAN NEUHARD and Dr. A. MUNCH-PETERSEN for their continued interest, and Mr. K. ERIKSEN for taking the photographs.

*Institute of Biological Chemistry B,  
University of Copenhagen (Denmark)*

GERT KARLSSON

- 1 H. G. PONTIS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 116 (1966) 416.
- 2 J. EDELMAN AND T. G. JEFFORD, *Biochem. J.*, 93 (1964) 148.
- 3 H. G. PONTIS, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 331.
- 4 W. G. C. FORSYTH, *Nature*, 161 (1948) 239.

Received July 7th, 1969

\* Abbreviations used: F = fructose; S = sucrose; FS = 1-fructosylsucrose; F<sub>2</sub>S = (1-fructosyl)<sub>2</sub>sucrose; F<sub>n</sub>S = (1-fructosyl)<sub>n</sub>sucrose.

*J. Chromatog.*, 44 (1969) 413-414

CHROM. 4292

## **Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide**

### **Zum dünnschichtchromatographischen Verhalten einiger weiterer Insektizide**

In einer früheren Arbeit<sup>1</sup> ist über eine empfindliche dünnschichtchromatographisch-enzymatische Methode zum Nachweis insektizider Organophosphate sowie über die Möglichkeiten zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit schwacher bzw. indirekt hemmender Cholinesteraseinhibitoren durch "Aktivierung" berichtet worden. Das insbesondere für Rückstandsuntersuchungen gut geeignete Verfahren kann unter

*J. Chromatog.*, 44 (1969) 414-418

geringfügiger Variation der Arbeitsbedingungen prinzipiell auf alle cholinesterasehemmenden Verbindungen angewendet werden. Über das Verhalten einer Reihe phosphororganischer Insektizide gegenüber verschiedenen Laufmitteln und verschiedenen Aktivierungsverfahren wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

### Material und Methodik

*Pestizide.* An Pestiziden standen die in Tabelle I aufgeführten Thiono- bzw. Dithiophosphorsäureester, an direkt hemmenden Phosphorsäureestern "Phosdrin" und "Metasystox R" in unterschiedlichen Reinheitsgraden (22.2–99 %) als analytische Standards der Firma PolyScience Corporation, Evanston, Ill., sowie der Phosphorsäureester "Butonate" zur Verfügung. Von den Präparaten wurden Stammlösungen mit 1 mg Pestizid/ml Chloroform hergestellt. Die Einstellungen der Endkonzentrationen erfolgten durch entsprechendes Verdünnen mit Chloroform.

TABELLE I

TRIVIALNAME UND CHEMISCHE BEZEICHNUNG DER UNTERSUCHTEN ESTERASEINHIBITOREN

<i>Trivialname</i>	<i>Chemische Bezeichnung</i>
Butonate	O,O-Dimethyl-(1-n-butyryloxy-2,2,2-trichloräthyl)-phosphonat
Co-Ral	O,O-Diäthyl-O-(3-chlor-4-methyl-cumarin-7-yl)-thionophosphat
Coroxon	O,O-Diäthyl-O-(3-chlor-4-methyl-cumarin-7-yl)-phosphat
Disyston	O,O-Diäthyl-S-2-(äthylmercapto)-äthylthiophosphat
Ethion	O,O,O',O'-Tetraäthyl-S,S'-methylen-bis-dithiophosphat
PO-Ethion	O,O,O',O'-Tetraäthyl-S,S'-methylen-bis-thiophosphat
Guthion	O,O-Dimethyl-S-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-methyl)-dithiophosphat
Gutoxon	O,O-Dimethyl-S-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-methyl)-thiophosphat
Malathion	O,O-Dimethyl-S-(1,2-dicarboxyäthyl)-dithiophosphat
Malaaxon	O,O-Dimethyl-S-(1,2-dicarboxyäthyl)-thiophosphat
Metasystox R	O,O-Dimethyl-S-2-(äthylsulfinyl)-äthylthiophosphat
Methyltrithion	O,O-Dimethyl-S-(p-chlorphenyl-thiomethyl)-dithiophosphat
PO-Methyltrithion	O,O-Dimethyl-S-(p-chlorphenyl-thiomethyl)-thiophosphat
Phorate	O,O-Diäthyl-S-(äthylmercaptomethyl)-dithiophosphat
PO-Phoratesulfon	O,O-Diäthyl-S-(äthylsulfonylmethyl)-thiophosphat
Phosdrin	O,O-Dimethyl-O-(1-carbomethoxy-1-propen-2-yl)-phosphat
Ronnel	O,O-Dimethyl-O-(2,4,5-trichlorphenyl)-thionophosphat
Ronnoxon	O,O-Dimethyl-O-(2,4,5-trichlorphenyl)-phosphat

Von den Thiono- und Dithiophosphorsäureestern wurden die PO-Verbindungen durch Oxydation mit Brom nach folgender Vorschrift dargestellt: 1 mmol der Thionoverbindung wird in 5 ml Äthanol gelöst. Unter Schütteln gibt man tropfenweise gesättigte wässrige Bromlösung bis zum Auftreten einer bleibenden schwachen Gelbfärbung zu. Man lässt die Lösung noch ca. 30 min bei Zimmertemperatur stehen und beseitigt danach den Bromüberschuss durch tropfenweise Zugabe von 0.1 M Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung. Die PO-Verbindungen werden durch drei- bis fünfmaliges Ausschütteln mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wird mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Stammlösungen (1 mg Pestizid/ml) und Endkonzentrationen werden durch Verdünnen mit Chloroform hergestellt.

Die Durchführung der chromatographischen Trennung, der Aktivierung sowie des enzymatischen Hemmtestes erfolgte in der früher beschriebenen Weise<sup>1</sup>.

### Ergebnisse und Diskussion

*Chromatographie.* Die geringe Polarität einiger Thiono- und Dithiophosphorsäureester macht es erforderlich, zu den bewährten Fließmittelkombinationen aus Benzol und Aceton noch *n*-Hexan als unpolare Komponente hinzuzuziehen. Die ermittelten  $R_F$ -Richtwerte sind in Tabelle II zusammengefasst.

TABELLE II

$R_F$ -WERTE VON ACHTZEHN PHOSPHORORGANISCHEN WIRKSTOFFEN AUF KIESELGEL G IN VERSCHIEDENEN LAUFMITTELSYSTEMEN

Wirkstoff	Laufmittel						
	Benzol	<i>n</i> -Hexan- Benzol (2:1)	<i>n</i> -Hexan- Benzol-Aceton		Benzol-Aceton		
			15:10:1	10:10:1	19:1	9:1	4:1
Butonate	0.08	0.00	—	—	0.29 <sup>u</sup>	0.40	0.61
Co-Ral	0.15	0.00	0.33 <sup>u</sup>	0.40 <sup>u</sup>	0.70	0.81	0.95
Coroxon	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.13	0.38 <sup>u</sup>
Disyston	0.64 <sup>u</sup>	0.00	0.72	0.77	0.95	1.00	1.00
Ethion	0.69 <sup>u</sup>	0.06	0.88	0.91	0.97	1.00	1.00
PO-Ethion	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.27 <sup>u</sup>	0.52 <sup>u</sup>
Guthion	0.09	0.00	0.07	0.25 <sup>u</sup>	0.40 <sup>u</sup>	0.66	0.88
Gutoxon	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.20 <sup>u</sup>	0.41 <sup>u</sup>
Malathion	0.00	0.00	0.12	0.36 <sup>u</sup>	0.68 <sup>u</sup>	0.82	0.95
Malaaxon	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23 <sup>u</sup>	0.30 <sup>u</sup>	0.53
Metasystox R	0.00	0.00	0.00	0.05	0.20	0.33 <sup>u</sup>	0.60
Methyltrithion	0.80	0.31 <sup>u</sup>	0.74	0.80	0.91	1.00	1.00
PO-Methyltrithion	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.11	0.32 <sup>u</sup>
Phorate	0.71	0.00	0.61 <sup>u</sup>	0.70	0.95	1.00	1.00
PO-Phoratesulfon	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—	—
Phosdrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.34 <sup>u</sup>	0.53 <sup>u</sup>
Ronnel	0.95	0.43 <sup>u</sup>	0.84	0.90	1.00	1.00	1.00
Ronnoxon	0.00	0.18 <sup>u</sup>	0.07	0.18	0.43 <sup>u</sup>	0.52 <sup>u</sup>	0.74

<sup>u</sup> Zum Nachweis besonders geeignete Laufmittelsysteme.

Durch die Kombination *n*-Hexan-Benzol (2:1) ist es u.a. auch möglich, die stark unpolaren Verbindungen wie "Ronnel" und "Methyltrithion" in  $R_F$ -Bereiche zu bringen (0.43 bzw. 0.31), die für die semiquantitative Bestimmung günstig sind.

*Aktivierung von Thionophosphorsäureestern mit Bromdampf.* Wie bereits in den früheren Untersuchungen<sup>1</sup> festgestellt wurde, erweist sich die Oxydation der Thionophosphorsäureester mit Bromdampf auch in dieser Untersuchungsreihe in den meisten Fällen als nicht optimal (Tabelle III). Auch ein Teil der direkthemmenden PO-Verbindungen wird durch die Behandlung mit Bromdampf in seiner Nachweisempfindlichkeit mehr oder weniger beeinträchtigt. Phosdrin lässt sich nach Brombehandlung wie das DDVP und das Dibrom auch in Mengen von  $> 1 \mu\text{g}$  nicht mehr nachweisen. Von diesen beiden Esteraseinhibitoren unterscheidet sich das Phosdrin dahingehend, dass es auch nach Aktivierung mit wässriger Bromlösung nicht mehr

TABELLE III

NACHWEISGRENZEN FÜR PHOSPHORORGANISCHE WIRKSTOFFE OHNE UND MIT AKTIVIERUNG (ng)

Wirkstoff	Ohne Akti- vierung	Aktivierung mit			
		Brom- dampf 30 sec	Brom- wasser 15 min	UV- Bestrahlung 20 min	Ammoniak- lösung 15 min
Butonate	k.N. <sup>a</sup>	k.N.	k.N.	k.N.	5
Co-Ral	k.N.	5	1	1	k.N.
Coroxon	0.05	0.5	0.05	0.05	0.1
Disyston	k.N.	7	5	50	k.N.
Ethion	k.N.	0.5	0.5	0.1	k.N.
PO-Ethion	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
Guthion	k.N.	0.2	0.05	1.0	k.N.
Gutoxon	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
Malathion	k.N.	0.5	0.1	10	k.N.
Malaaxon	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
Metasystox R	10	10	10	10	10
Methyltrithion	k.N.	0.5	0.05	1	k.N.
PO-Methyltrithion	0.5	2	1	0.5	1
Phorate	k.N.	5	5	50	k.N.
PO-Phoratesulfon	1	5	2	1	2
Phosdrin	0.1	k.N.	k.N.	1	1
Ronnel	k.N.	1	0.05	5	k.N.
Ronnoxon	0.05	0.5	0.05	0.05	0.1

<sup>a</sup> k.N. = kein Nachweis

erfasst werden kann. Dieses Verhalten kann neben den  $R_F$ -Werten als typisches Merkmal zur Identifizierung des Phosdrins herangezogen werden.

*Aktivierung von Thionophosphorsäureestern mit wässriger Bromlösung.* Die Aktivierung der Thionophosphorsäureester mit wässriger Bromlösung erweist sich auch in dieser Untersuchungsreihe als das günstigere Verfahren. Alle untersuchten Verbindungen lassen sich nach Aktivierung mit Bromwasser im Pikogramm- bzw. im unteren Nanogrammbereich nachweisen. Direkt hemmende Verbindungen werden, bis auf Phosdrin, in ihrer Nachweisempfindlichkeit nicht beeinflusst.

*Aktivierung von Thionophosphorsäureestern durch UV-Bestrahlung.* Durch UV-Bestrahlung wird bei dem Thionophosphorsäureester "Co-Ral" und dem Dithiophosphat "Ethion" eine gute Aktivierung erzielt. Als weniger geeignet erweist sich die Aktivierung durch UV-Bestrahlung bei Bromphos, Disyston, Guthion, Malathion, Methyltrithion, Phorate und Ronnel (Tabelle III). Aus vergleichenden Untersuchungen, bei denen die entwickelten Chromatogramme vor Durchführung des enzymatischen Testes einmal mit Bromwasser allein und einmal mit UV-Licht bestrahlt und anschliessend mit Bromwasser behandelt worden sind, geht hervor, dass die Dithiophosphorsäureester Guthion, Malathion und Methyltrithion offenbar durch UV-Licht in grösserem Umfange zerstört werden. Nach UV-Bestrahlung werden bei gleichen Konzentrationen und gleichen äusseren Bedingungen kleinere und schwächer ausgebildete Hemmflecken erhalten (Tabelle IV).

*Aktivierung von Butonate mit Ammoniak.* "Butonate", der Buttersäureester des Phosphonats "Trichlorphon", kann durch Behandlung mit verdünnter Ammoniaklösung über das Trichlorphon in den starken Esteraseinhibitor DDVP umge-

TABELLE IV

NACHWEISEMPFINDLICHKEIT VON THIOPHOSPHORSÄUREESTERN NACH AKTIVIERUNG MIT BROMWASSER BZW. UV-BESTRAHLUNG UND ANSCHLIESSENDER BROMWASSERBEHANDLUNG

—, Nachweis negativ; +, Nachweis schwach positiv; ++, Nachweis positiv; + + +, Nachweis stark positiv.

Wirkstoff	ng/Fleck	H <sub>2</sub> O/Br <sub>2</sub>	UV-Bestrahlung + H <sub>2</sub> O/Br <sub>2</sub>	ng/Fleck	H <sub>2</sub> O/Br <sub>2</sub>	UV-Bestrahlung + H <sub>2</sub> O/Br <sub>2</sub>
Dimethoat	10	—	+	100	+	+ +
Ethion	0.1	—	+	0.5	+	+ + +
Disyston	5	+	+	50	+ +	+ +
Methylparathion	0.05	+ +	+ +	2	+ + +	+ + +
Parathion	0.01	+ +	+ +	0.5	+ + +	+ + +
Phorate	5	—	+	50	+ +	+ +
Ronnel	0.05	+ +	+ +	2	+ + +	+ + +
Bromophos	0.05	+ +	—	2	+ + +	+ +
Guthion	0.05	+ +	—	2	+ + +	+
Malathion	0.5	+ +	—	20	+ + +	+
Methyltrithion	5	+ +	—	50	+ + +	+

wandelt werden, wobei sich eine Einwirkungsdauer von 10 bis 15 min in Bezug auf die Nachweisempfindlichkeit des Butonats als optimal erweist.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass insektizide Organophosphate sowie die Thionogruppierung enthaltende Phosphorsäureester und der Phosphonsäureester "Butonate" nach Anwendung optimaler Aktivierungsverfahren mit hoher Empfindlichkeit durch die Kombination der Dünnschicht-Chromatographie mit dem enzymatischen Hemmtest nachgewiesen werden können. Diese Nachweisverfahren ermöglicht unter Einbeziehung des  $R_F$ -Wertes, des Verhaltens einer Verbindung gegenüber verschiedenen Aktivierungsverfahren sowie des Auftretens bestimmter esterasehemmender Hauptmetabolite eine Identifizierung unbekannter Esteraseinhibitoren. Nach Erkennung des Inhibitors ist weiterhin in einem vom jeweiligen Inhibitor abhängigen Konzentrationsbereich—allgemein handelt es sich dabei um den unteren Nachweisbereich—durch visuellen Fleckenvergleich eine semiquantitative Bestimmung der Inhibitormenge möglich.

Für zuverlässige Mitarbeit danke ich Frau B. LEXOW und Frä. M. MESSERSCHMIDT.

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

H. ACKERMANN

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

Eingegangen am 23. Juni 1969

*J. Chromatog.*, 44 (1969) 414-418