

CHROM. 4489

ZUR BEEINFLUSSUNG DER DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE
INSEKTIZIDER PHOSPHORSÄUREESTER UND DEREN NACHWEIS
MIT DER BENZHYDROXAMSÄURE-REAKTION
DURCH ULTRAVIOLET-STRAHLUNG

W. EBING

Institut für Pflanzenschutzmittelforschung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D 1000 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 31. Oktober 1969)

SUMMARY

Influence of ultraviolet irradiation on the thin-layer chromatography of insecticidal phosphoric acid esters and on their detection by the benzohydroxamic acid reaction

While chromatographing insecticidal phosphates on thin layers and after ultraviolet irradiation, secondary components are produced. The type and amount of these substances may be variable depending on environmental factors. Nitro aromatic substituted phosphates hydrolyse to some extent to their nitro phenols. These should be responsible for the enhancement of their detection by benzohydroxamic acid reagent after ultraviolet irradiation. In the case of parathion, no paraoxon is developed after ultraviolet irradiation.

EINLEITUNG

In einer kürzlich erschienenen Arbeit¹ untersuchten wir die Eignung einer von EPSTEIN UND DEMEK² beschriebenen Reaktion zwischen Hydroxamsäuren und Cholinesterasehemmern. Im Fall der von uns¹ benutzten Benzhydroxamsäure interpretierten wir den Reaktionsablauf in Analogie zu dem Vorschlag von EPSTEIN UND DEMEK². Demzufolge würde Benzhydroxamsäure bevorzugt Phosphorsäureester spalten, wobei sie selbst in Phenylisocyanat umgewandelt wird, das seinerseits weitere Benzhydroxamsäure abfängt. Somit steht an jenen Orten nicht mehr ausreichend Benzhydroxamsäure zur Verfügung, um chromogenes Substrat (2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetat) zum Farbstoff zu spalten. Diese Flecke bleiben also weiss.

Durch 15 Min. währende UV-Bestrahlung der Monothio- und Dithiophosphorsäureester vor der Reaktion konnte der Nachweis in vielen Fällen empfindlicher oder überhaupt erst möglich gemacht werden. Andere Autoren³⁻⁶ berichten Analoges bei der Untersuchung der Hemmaktivität insektizider Phosphorsäureester gegenüber Cholinesterase. Sie deuten diese Erscheinung so, dass nur von der durch UV-Bestrahlung entstehenden O-analogen Verbindung, dem "Oxon", die eigentliche Hemmwirkung ausgeht. Einige wenige bisher veröffentlichte Experimentalarbeiten scheinen dieser Interpretation Recht zu geben (z.B. Lit. 7 und die Sekundärliteratur in Lit. 4).

Bei unseren Resultaten¹ fällt auf, dass die schlechten Nachweisempfindlichkeiten der Monothiophosphorsäure-nitrophenylester Parathion, Parathion-methyl, Fenitrothion und Chlorthion durch 15 Min. UV-Bestrahlung nicht verbessert werden können. Erst nach einstündiger Bestrahlung sind gerade noch 5 μg dieser Wirkstoffe erkennbar.

ERGEBNISSE

Wir untersuchten die Verhältnisse zunächst beim Parathion eingehender. Nach ein- oder zweistündiger UV-Bestrahlung von 5–50 μg des Parathions am Start der Dünnschichtplatte sind nach dem Chromatographieren je nach Probenmenge und Umweltfaktoren maximal drei Flecke mit Rhodamin B sichtbar, von denen derjenige mit dem grössten R_F -Wert auf Grund des Vergleiches mit drei verschiedenen Fließmitteln (vgl. Tabelle I) als Parathion identifiziert wurde. Der R_F -Wert des letzten Fleckes ist in System I und III kleiner, in System II grösser als derjenige des Paraoxons.

TABELLE I

MITTLERE hR_F -WERTE VON 30 μg 1–2 Std. UV-BESTRAHLTEN PARATHION UND VERGLEICHSSUBSTANZEN

	System I	System II	System III
Parathion bestrahlt	64, 49, 24	67, --- ^a , 25	45, 33, 20
Parathion	64	67	45
Paraoxon	36	13	25
<i>p</i> -Nitrophenol	24	25	20

^a Zweiter Fleck nicht sichtbar.

Er stimmt überein mit dem R_F -Wert des *p*-Nitrophenols. Beide Flecke werden mit dem Nitrogruppen-Sprühlreagens⁸ charakteristisch sichtbar, und zwar der erste blaugrün, der andere gelb. Mit dem Thiono-Reagens⁹ und dem Schwefel-Reagens wird der erste Fleck angefärbt. Bei grosser Aufgabemenge ist zuweilen der zweite Fleck mit dem Thiono-Reagens zu erkennen. Mit Benzhydroxamsäure-Reagens erscheinen die Originalsubstanz als weisser sowie *p*-Nitrophenol als gelblicher (wegen des alkalischen pH im Reagens) Fleck. Bei sehr grossen Mengen kann auch die mittlere Komponente sichtbar werden. Wesentlich geringere Mengen *p*-Nitrophenol als Parathion hemmen noch die 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetat-Spaltungsreaktion des Nachweises mit Benzhydroxamsäure-Reagens (vgl. Tabelle II).

TABELLE II

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER NITROARYL-PHOSPHORSÄUREESTER UND IHRER HYDROLYTISCHEN SPALTPRODUKTE MIT DEM BENZHYDROXAMSÄURE-REAGENS

Substanz	μg
Parathion	25
Parathion-methyl	25
<i>p</i> -Nitrophenol	1
Fenitrothion	50
3-Methyl-4-nitrophenol	3
Chlorthion	50
Chlorthionfolgeprod. v. $hR_F' = 22$	ca. 12

TABELLE III

RELATIVE R_F' -WERTE DER KOMponentEN, DIE NACH EINSTÜNDIGER UV-BESTRAHLUNG VON JE 30 μg NITROARYL-PHOSPHORSÄUREESTER MIT VERSCHIEDENEN DETEKTIONSMITTELEN ERKANNT WURDEN

Chromatographie-System IV.

Wirkstoff	Rhodamin-B-Reagens	Benzhydroxamsäure-Reagens	Nitrogruppen-Reagens		Phosphor-Reagens	Thiono-Reagens	Schwefel-Reagens
			Blau	Gelb			
Parathion ^c	120, 68, 30 ^a	118, 32 ^a	116	31 ^a	114, 66, 0	118, 67	118
Parathion-methyl	87, 57, 31 ^a	88, 30 ^a	86	31 ^a	85, 55, 40, 8	88	87
Fenitrothion	90, 64, 32 ^b	94, 30 ^b	91	33 ^b	90, 64, 38, 20, 0	91	91
Chlorthion	86, 22	89, 25	88	25	87, 33, 0	80	87

^a *p*-Nitrophenol ergab im Mittel einen Wert von 30.

^b 3-Methyl-4-nitrophenol ergab im Mittel einen Wert von 34.

^c Paraoxon erscheint hier mit dem Mittelwert 36.

Praktisch analog verhalten sich die anderen Nitrogruppenhaltigen Phosphorsäureester Parathion-methyl, Fenitrothion und Chlorthion (vgl. Tabelle III). Für Fenitrothion war die Vergleichssubstanz 3-Methyl-4-nitrophenol zur Hand.

Schliesslich wurden diejenigen Mono- und Dithiophosphorsäureester, deren Nachweis mittels Benzhydroxamsäure-Reagens sich laut unserer früheren Arbeit¹ durch 15 Min. UV-Bestrahlung wesentlich verbessern liess, mit Rhodamin B untersucht. Nur die Wirkstoffe, deren Chromatogramme nach einstündiger UV-Bestrahlung des Startflecks mehr Flecke als nur die Originalkomponenten aufwiesen, wurden anschliessend dem Test mit den übrigen spezifischen Sprühreagentien unterworfen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt. Es wurde in System IV chromatographiert. Zum besseren Vergleich wurde stets der Farbstoff Sudan III (Schering) als innerer Standard zugegeben. Die R_f -Werte der Komponenten wurden durch den zugehörigen Wert des Standards dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert.

Bei dieser Gruppe fällt auf, dass bei der Detektion durch Benzhydroxamsäure-Reagens nur jeweils eine Komponente — zweifellos die Originalwirkstoffe — sichtbar wurden. Dagegen wurden (bei 30 μg Aufgabemenge) mit den anderen Sprühreagentien im bestrahlten sowie unbestrahlten Falle daneben oft noch weitere Komponenten nachgewiesen.

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen waren die Ergebnisse nicht immer exakt reproduzierbar. In den Tabellen sind die maximal aufgefundenen Komponenten eingetragen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aus den Versuchsergebnissen leiten wir ab, dass sich in vielen Fällen nicht erst nach experimenteller UV-Behandlung teilweise Umwandlungen der Phosphorsäureester abspielen, sondern schon bei der gewöhnlichen Dünnschichtchromatographie. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Feststellung gestützt, dass die Grössenordnungen der dünn-schichtchromatographisch entstandenen Nebenkomponenten wesentlich über denen der gaschromatographisch festgestellten Spurenverunreinigungen liegen.

Bei der Dünnschichtchromatographie der Nitrogruppenhaltigen aromatisch substituierten Insektiziden Phosphorsäureester Parathion, Parathion-methyl, Fenitrothion und Chlorthion entstehen — besonders nach UV-Einwirkung — hauptsächlich die entsprechenden Nitrophenole als hydrolytische Spaltprodukte sowie je ein weiteres Produkt, das wir auf Grund des Verhaltens gegenüber den Nachweisreagentien für einen isomerisierten Ester halten müssen¹⁰. Im Falle des Parathions entstand niemals das O-Analoge, also Paraoxon, in nachweisbarer Mengen, d.h. entsprechend den Detektionsgrenzen nicht über 1,5 % (bezogen auf die Gesamtprobenmenge).

Durch die Entstehung der Nitrophenole kann der Nachweis mit Benzhydroxamsäure-Reagens empfindlicher werden, da noch wesentlich geringere Nitrophenolmengen das zur Hydrolyse des 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetats nötige Alkali binden. Bei den anderen Phosphorsäureestern liessen sich keine Folgeprodukte finden, die beim Nachweis mittels Benzhydroxamsäure-Reagens interferieren. Es entstehen aber auch hier Folgeprodukte, die besonders mit dem sehr empfindlichen Phosphor-Reagens¹¹ entdeckt werden. Speziell bei den mit diesem Sprühmittel nachgewiesenen Komponenten mit geringem hR_f' -Wert dürfte es sich um ein- oder zweibasische Phosphorsäure-

TABELLE IV
RELATIVE hR_f' -WERTE DER KOMPONENTEN, DIE OHNE ODER MIT EINSTÜNDIGER BESTRAHLUNG VON 30 μg PHOSPHORSÄUREESTER MIT VERSCHIEDENEN DETEKTIONSMITTELN ERKANNT WURDEN

Chromatographiesystem IV. b = bestrahlt; u = unbestrahlt.

Wirkstoff	Bestrahlung	Rhodamin B-Reagens	Benzhydroxamsäure-Reagens	Phosphor-Reagens	Thiono-Reagens	Schwefel-Reagens
Fenchlorphos ^a	u	134, 106	140	138	136, 103	141, 110
	b	138, 107	140	140, 122-93, 68, 0	138, 105	140, 108
Fenthion	u	117	120	118, 50, 35, 15, 0	121	120
	b	120, 49, 34, 15	123	117, 48	121, 13	121, 83, 52, 36, 16
E 838	u	63, 15	63	61, 28, 18	60	59, 17-0
	b	62, 15	65	59, 38, 26, 17	60, 37, 14	60, 48, 27, 15
Bromophos	u	140	137	138, 0	142	144
	b	139, 80	139	143, 0	143	145, 82, 60
Bromophos-äthyl	u	161	164	164	162	163
	b	159, 132, 74	159	166, 0	164	165, 58
Carbophenothion ^b	u	144	142	141	145, 118	143
	b	143, 139-57	146	141	144, 132-31	146
Carbophenothion-methyl ^b	u	129	133	131	129	127
	b	127, 103-49	128	134, 0	129, 98-40	134
Phenkapton	u	157	152	158	157	155
	b	155, 131, 118-68	153	158	150, 120-75	151
Thiometon	u	127	128	127, 58	130, 66	132, 64
	b	127, 57	128	129, 58, 8	128, 67, 8	130, 68
Phorat	u	148	148	147, 32, 0	152, 77	149
	b	148, 76, 23	150	145, 30, 0	151, 76, 26	152, 78, 30

^a 2,4,5-Trichlorphenol ergibt den mittleren Wert 90.

^b *p*-Chlorthiophenol, Schuchardt, "ca. 99%, F. 51-52" erscheint in zwei Flecken mit den Werten 198 und 175, von denen der zweite vermutlich die Hauptkomponente darstellt.

alkylester handeln. Der mengenmässige Anteil der Folgeprodukte variiert (von nicht bis deutlich nachweisbar) je nach den Umweltbedingungen (Temperatur, Feuchte, Anzahl katalytisch aktiver Zentren auf dem Schichtmaterial der betreffenden Charge, etc.) bei der Chromatographie und bei der Vorbehandlung. Die oft recht unterschiedlichen Absolutwerte des inneren Standards sind dafür deutlicher Hinweis. Ferner sind Bestrahlungsintensität und -dauer für den jeder Komponente eigenen Verlauf der Konzentration-Zeit-Kurve für die Folgeprodukte von Bedeutung⁷. Mangels eines anderen Hinweises müssen wir vorläufig annehmen, dass durch die vorstehend beschriebenen Faktoren in unterschiedlichem Masse Abbaureaktionen gefördert oder auch gebremst werden. Es ist denkbar, dass die Konzentrationen der die 2-Azobenzolnaphthyl-(1)-acetat-Spaltung fördernden Komponenten durch UV-Behandlung besonders schnell verringert werden.

EXPERIMENTELLES

Die Platten wurden wie in Lit. 1 beschrieben hergestellt. Trennstrecken 10 cm. Chromatographie: System I, Cyclohexan-Dioxan (7:3), Sandwich-Verfahren; System II, Cyclohexan-Essigester (3:1), Sandwich-Verfahren; System III, Heptan-Aceton (8:2), Sandwich-Verfahren; System IV, Cyclohexan-Dioxan (8:2), Normalverfahren in nicht ausgekleidetem Trog.

Die UV-Bestrahlung der aufgegebenen Proben erfolgte am Start mit der Desaga-UV-Lampe (UVIS Best.-Nr. 131 100) mit Licht von 254 und 366 nm in 9.5 cm Abstand.

Reagentien

Rhodamin-B-Reagens: 0.01 %ige wässrige Lösung von Rhodamin B; Betrachtung bei 254 nm.

Benzhydroxamsäure-Reagens: beschrieben in Lit. 1.

Nitrogruppen-Reagens: beschrieben in Lit. 8.

Phosphor-Reagens: beschrieben in Lit. 11.

Thiono-Reagens: 0.5 %ige wässrige Lösung von PdCl₂. Auf 25 ml dieser Lösung wurden 15 Tropfen 25 %ige HCl gegeben.

Schwefel-Reagens: Sprühlösung 1, 1 %ige wässrige Lösung von Tetrabromphenolphthaleinsäureäthylester-Kaliumsalz, vor dem Gebrauch 1:5 mit Aceton verdünnt; Sprühlösung 2, 2 %ige wässrige Lösung von AgNO₃, vor dem Gebrauch 1:3 mit Aceton verdünnt; Sprühlösung 3, 10 %ige wässrige Lösung von Zitronensäure, vor dem Gebrauch 1:2 mit Aceton verdünnt.

DANK

Für experimentelle Mitarbeit bin ich Frau A.-M. TURGAY zu besonderem Dank verpflichtet.

Ferner danke ich den Firmen American Cyanamid, Bayer, Cella, Dow Chemicals, Geigy, Sandoz und Stauffer für die freundlicherweise überlassenen Wirkstoffe.

ZUSAMMENFASSUNG

Während der Dünnschichtchromatographie und nach UV-Bestrahlung insek-

tizider Phosphorsäureester entstehen Sekundärstoffe. Art und Menge dieser Substanzen variieren mit den Umgebungseinflüssen. Bei nitroaromatisch substituierten Phosphorsäureestern erfolgt in gewissem Grade Hydrolyse zu den Nitrophenolen. Auf diese Stoffe wird die Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für nitroaromatische Phosphorsäureester durch länger währende UV-Bestrahlung vor der Benzhydroxamsäure-Reaktion zurückgeführt. Aus Parathion entwickelte sich dabei kein Paraoxon in nachweisbaren Mengen.

LITERATUR

- 1 W. EBING, *J. Chromatog.*, 42 (1969) 140.
- 2 J. EPSTEIN UND M. M. DEMEK, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1136.
- 3 H. ACKERMANN, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 309.
- 4 E. MÖLLHOFF, *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 21 (1968) 401; dort weitere Literaturangaben.
- 5 J. PAYTON, *Nature*, 171 (1953) 355.
- 6 J. W. COOK, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 42 (1959) 211.
- 7 T. H. MITCHELL, J. H. RUZICKA, J. THOMSON UND B. B. WHEALS, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 17.
- 8 W. EBING, *Chimia*, 21 (1967) 132.
- 9 H.-W. RAHN UND G. URBAN, *Pharmazie*, 19 (1964) 597.
- 10 R. L. METCALF UND R. B. MARCH, *J. Econ. Entomol.*, 46 (1953) 288.
- 11 J. STENERSEN, *J. Chromatog.*, 38 (1968) 538.

J. Chromatog., 46 (1970) 180-186