

CHROM. 5010

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS
VON CARBAMATENI. NACHWEIS INSEKTIZIDER CARBAMATE MIT
RINDERLEBER-ESTERASE

F. GEIKE

*Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutzmittelforschung,
DI Berlin 33 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 24. August 1970)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic-enzymatic identification of carbamates. I. Identification of carbamate insecticides with bovine liver esterase

The thin-layer chromatographic-enzymatic inhibition technique is used to detect nine carbamate insecticides. The minimum quantities detected under normal conditions were: Minacide 6 ng; Methiocarb 400 ng; Zectran 80 ng; Carbaryl 3 ng; Pyramat 200 ng; Dimetan 80 ng; Isolan 10 ng; Dimetilan 60 ng; and Pyrolan 40 ng. After bromine treatment some carbamates (Carbaryl, Dimetan, and Dimetilan) show stronger inhibition activity against bovine liver esterase while the other show no difference or were weaker inhibitors. After ultraviolet irradiation all carbamates studied lost most of their antiesterase activity.

Unsatisfactory results were obtained when studying the resolution of the carbamates in thirteen solvent systems.

EINLEITUNG

Arbeiten über Carbamat-Insektizide begannen Ende der 40-iger Jahre und führten zur Entwicklung einiger bekannter Wirkstoffe, bei denen es sich fast ausschliesslich um Heterocyclen und aufgrund des beschrittenen Syntheseverfahrens ausnahmslos um N-Dimethylcarbamate handelte. In der zweiten Hälfte der 50-iger Jahre wurde Carbaryl (Sevin), das wohl bekannteste Carbamat-Insektizid entwickelt. Mit diesem wie auch den meisten später entwickelten Wirkstoffen erfolgte der Übergang zu aromatischen Verbindungen und vor allem zu den wesentlich wirksameren N-Monomethylverbindungen, welche die früheren Substanzen fast völlig verdrängten. Da der Trend heute zu den weniger persistenten Verbindungen geht, dürfte dieser Insektizidgruppe eine grosse Zukunft bevorstehen.

Die Carbamate stellen einigermaßen kräftige Cholinesterase-Hemmer dar, hemmen daneben jedoch auch wahrscheinlich ausnahmslos die Aliesterasen der Insekten¹. Trotz ihrer allgemein guten Anticholinesterase-Wirkung konnte keine generelle Korrelation zwischen der Cholinesterase-Hemmung und der insektiziden Wirkung festgestellt werden: Verbindungen mit sehr guten Anticholinesterase-Eigenschaften waren gegenüber Stubenfliegen praktisch ungiftig und solche mit geringer Hemmwirkung zeigten starke Toxizität². Der Grund für diese Diskrepanzen lässt sich nicht eindeutig angeben; er könnte einerseits in einem verstärkten Stoffwechsel der starken Antiesterase-Substanzen zu suchen sein, andererseits darin liegen, dass der Wirkstoff den Wirkungsort nicht erreicht. Da die Cholinesterasen—selbst von nahe verwandten Arten—ziemlich unterschiedlich durch einen Wirkstoff gehemmt werden, wie mit Organophosphaten gezeigt wurde³, besteht auch die Möglichkeit, dass die Diskrepanzen zwischen Cholinesterase-Hemmung und Toxizität auf Unterschieden in der Hemmbarkeit der Enzyme beruhen, da für den Esterase-Test seinerzeit eine Enzympräparation aus Zitterraalen (*Gymnotus electricus*) verwendet wurde². Trotz dieser Widersprüche besteht in der allgemeinen Lehrmeinung kein Zweifel daran, dass die Carbamate durch eine Hemmung der Acetylcholinesterase wirken.

Die Esterase-Hemmung kann bei Carbamaten ebenso wie bei Phosphorsäureestern zum recht empfindlichen dünnschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis ausgenutzt werden, dennoch wurde von dieser Möglichkeit nur bei den Organophosphaten in grösserem Umfange Gebrauch gemacht. Aus der Gruppe der Carbamat-Insektizide hingegen wurden höchstens einige der bekanntesten in Untersuchungen über Methoden zum dünnschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis von Phosphorsäureestern eingeschlossen⁴⁻⁸. Lediglich eine Arbeit befasste sich intensiver mit dem dünnschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis einiger besonders verbreiteter Carbamat-Insektizide⁹. Vorliegende Arbeit soll auf diesem Gebiet eine Lücke schliessen und einerseits die Nachweisgrenzen von insektiziden Carbamaten nach verschiedenen Vorbehandlungen, andererseits Möglichkeiten für ihre dünnschichtchromatographische Trennung untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien waren analysenrein und stammten von der Firma Merck, Darmstadt. Zur Plattenbeschichtung wurde Kieselgel G nach Stahl mit ca. 13% CaSO₄ und einer mittleren Korngrösse von 10–40 μ genommen.

Enzym- und Substratlösung

Die Herstellung der Enzympräparation und Substratlösung erfolgte nach ACKERMANN¹⁰, wurde jedoch, wie an anderer Stelle beschrieben¹¹, modifiziert. Insgesamt wird das Enzym etwa 1:40 verdünnt.

Insektizidlösungen und Dünnschichtchromatographie

Die untersuchten Wirkstoffe in analytischer Standardqualität (Tabelle I) wurden in Aceton gelöst, auf handgegossene Kieselgel G-Platten¹¹ aufgetragen und in verschiedenen Systemen (Tabelle II) chromatographiert.

TABELLE I

NAME UND STRUKTUR DER UNTERSUCHTEN CARBAMAT-INSEKTIZIDE

| <i>Trivial-Name</i> | <i>Chemische Bezeichnung</i> | <i>Strukturformel</i> |
|-------------------------|--|-----------------------|
| Minacide (Promecarb) | 3-Methyl-5-isopropylphenyl-N-methylcarbamate | |
| Methiocarb (Mesurol) | 4-(Methylthio)-3,5-xyllyl-N-methylcarbamate | |
| Zectran | 4-(Dimethylamino)-3,5-xyllyl-N-methylcarbamate | |
| Carbaryl (Sevin) | 1-Naphthyl-N-methylcarbamate | |
| Pyramat | 2-n-Propyl-4-methylpyrimidyl-(6)-N,N-dimethylcarbamate | |
| Dimetan | 5,5-Dimethyl-1-oxocyclohex-2-enyl-(3)-N,N-Dimethylcarbamate | |
| Isolan | 1-Isopropyl-3-methylpyrazolyl-(5)-N,N-dimethylcarbamate | |
| Dimetilan | 2-Dimethylcarbamyl-3-methylpyrazolyl-(5)-N,N-dimethylcarbamate | |
| Pyrolan | 1-Phenyl-3-methylpyrazolyl-(5)-N,N-dimethylcarbamate | |

TABELLE II

VERWENDETE LAUFMITTELSYSTEME (v/v) ZUR TRENNUNG DER UNTERSUCHTEN CARBAMATE

Nr. Laufmittelsysteme

| | |
|----|--|
| 1 | Cyclohexan |
| 2 | Äthylmethylketon |
| 3 | Benzol-Aceton (95:5) |
| 4 | Benzol-Aceton (66:34) |
| 5 | Benzol-Dichlormethan (30:120) |
| 6 | Benzol-Chloroform (30:120) |
| 7 | Chloroform-Acetonitril (20:10) |
| 8 | Chloroform-Wasser (untere Phase) (90:50) |
| 9 | Cyclohexan-Dioxan (70:30) |
| 10 | Cyclohexan-Äthyläther (10:90) |
| 11 | Cyclohexan-Aceton (80:20) |
| 12 | Cyclohexan-Aceton-Toluol (50:10:10) |
| 13 | Cyclohexan-Aceton-Toluol-Äthylacetat (20:20:10:10) |

Durchführung des enzymatischen Hemmtestes

Die Platten wurden nach dem Entwickeln entweder sofort oder nach halbstündiger Bestrahlung mit ungefiltertem UV-Licht¹¹ zunächst leicht mit Puffer, anschliessend mit Enzymlösung besprüht und nach halbstündiger Inkubation bei 37° in der von ACKERMANN¹⁰ beschriebenen Weise weiterbehandelt. Im Falle der Brombehandlung werden die Platten nach dem Entwickeln mit einer gesättigten wässrigen Bromlösung besprüht und erst mit Puffer und Enzymlösung behandelt, wenn auf der Platte kein Bromgeruch mehr wahrzunehmen war und nochmals kurz mit Warmluft nachbehandelt wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der hier angewandten Methode erscheinen die untersuchten Carbamate als helle Flecke auf violetterm Untergrund. Zur Festlegung der unteren Nachweisgrenze der Insektizide wurden nur die aufgetragenen Mengen gewertet, die gerade noch sichtbare permanente Hemmflecke auf den DC-Platten hervorriefen. Die Ergebnisse in Tabelle III zeigen recht unterschiedliche Nachweisgrenzen, wobei Carbaryl mit 3 ng als stärkster und Methiocarb mit 400 ng als schwächster Esterase-Hemmer erscheint. Die relativ grossen Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit dürften sich weniger aus der allgemein schwächeren Antiesterase-Wirkung der entsprechenden Wirkstoffe als vielmehr aus der vielfach beobachteten unterschiedlichen Empfindlichkeit der Esterasen verschiedener Herkunft^{3,6,7} herleiten lassen. Sofern keine anderen Faktoren für eine Resistenz verantwortlich sind, dürften diese Unterschiede in der Empfindlichkeit der Acetylcholinesterase auch die Selektivität von Carbamaten bedingen.

Die hier ermittelte Grenzkonzentration für Carbaryl (3 ng) stimmt bei in etwa vergleichbarer Methode zum Teil recht gut (5 ng) (Lit. 5), zum Teil weniger gut (100 ng) (Lit. 9) mit anderen Arbeiten überein. Wie entscheidend die Methodik bei den verschiedenen Arbeiten ist, zeigt ein Vergleich zwischen Arbeiten von WINTERLIN *et al.*⁶ und MENN UND MCBAIN⁴, wo die Nachweisgrenzen für Carbaryl bei 25 ng bzw. 200 ng liegen, obwohl die gleiche Enzymquelle (Humanserum) benutzt wurde. Am empfind-

lichsten scheint jedoch der Nachweis mit Insektenhirn-Esterase zu sein, da Carbaryl mit Bienenhirn-Cholinesterase bis zu einer Konzentration von 1 pg nachzuweisen ist⁶. Allerdings dürfte sich diese Methode kaum für einen Routinenachweis eignen.

Auch für einige andere untersuchte Wirkstoffe liegen Vergleichszahlen aus anderen Arbeiten vor. Methiocarb (Mesurol) schneidet gegenüber den Werten von WALES *et al.*⁹ (100 ng) wesentlich schlechter ab, während Zectran gegenüber jenen Werten (500 ng) erheblich empfindlicher nachgewiesen wurde. Obwohl die Ergebnisse von MENN UND MCBAIN⁴ aufgrund der verschiedenen Methodik nicht unmittelbar mit den hier gefundenen Grenzkonzentrationen vergleichbar sind, erscheint ein Vergleich dennoch interessant. Auch hier zeigt sich erneut, dass die Nachweisgrenze für Methiocarb (200 ng) im Vergleich mit den hier gefundenen 400 ng bei MENN UND MCBAIN erheblich günstiger liegt, während vorliegende Arbeit Zectran und Carbaryl (beide 200 ng) erheblich empfindlicher nachweist (Tabelle III). Nimmt man die für

TABELLE III

UNTERE NACHWEISGRENZEN VON NEUN CARBAMAT-INSEKTIZIDEN NACH VERSCHIEDENEN VORBEHANDLUNGEN INFOLGE HEMMUNG DER RINDERLEBER-ESTERASE

Nachweisgrenze in ng; Laufmittelsystem Benzol-Aceton (95:5); () Flecke etwa 5 min sichtbar.

| Wirkstoff | Ohne Vorbehandlung | Nach Brombehandlung | Nach UV-Bestrahlung |
|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Minacide | 6 (4) | 6 (4) | 80 |
| Methiocarb | 400 (200) | 700 (300) | 800 |
| Zectran | 80 (60) | 500 (400) | 1000 |
| Carbaryl | 3 (1) | 0.9 (0.3) | 60 |
| Pyramat | 200 (100) | 400 (200) | 900 |
| Dimetan | 80 (40) | 60 (50) | 100 |
| Isolan | 10 (8) | 50 (30) | 900 |
| Dimetilan | 60 (20) | 40 (30) | 900 |
| Pyrolan | 40 (30) | 40 (20) | 600 |

kurze Zeit erscheinenden und im Laufe der fortschreitenden Ausfärbung der Platte wieder verschwindenden Flecke, so gestaltet sich der Nachweis zum Teil noch erheblich empfindlicher (Tabelle III).

Allgemein ist festzustellen, dass der dünnschichtchromatographisch-enzymatische Nachweis durch Arbeiten mit stark verdünntem Enzym erheblich empfindlicher gestaltet werden kann. Die hier mitgeteilten Ergebnisse sind mit mittleren Verdünnungen des Enzyms erhalten worden. In diesem Zusammenhang wäre es eventuell günstiger, wenn man sich allgemein darauf einigen könnte, statt der bisher üblichen Verdünnungen den verwendeten Enzymgehalt in Einheiten pro ml anzugeben.

Nach Behandlung der Wirkstoffe mit Bromwasser zeigt sich lediglich bei Carbaryl, Dimetan und Dimetilan eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, während Minacide und Pyrolan nicht beeinflusst werden. Alle übrigen untersuchten Wirkstoffe zeigen zum Teil eine drastische Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit (Tabelle III). In den Fällen, wo ein Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren möglich ist, stimmen sie grössenordnungsmässig weitgehend überein. WALES *et al.*⁹ finden für Carbaryl eine Verbesserung um den Faktor 10 und können Methiocarb und Zectran nach Brombehandlung nicht mehr nachweisen,

während hier für Carbaryl etwa eine Verbesserung um den Faktor 3 und für Methiocarb und Zectran eine Verschlechterung um den Faktor 1.75 bzw. 6.25 festzustellen ist. Interessant ist, dass mit Humanplasma-Esterase und Bienenhirn-Esterase nach Brombehandlung kein Carbaryl mehr nachgewiesen wurde⁶, obwohl vorliegende Ergebnisse und die von MENDOZA *et al.*⁷ und WALES *et al.*⁹ eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit zeigen.

Eine Bestrahlung der Wirkstoffe mit ungefiltertem UV-Licht nach dem Entwickeln führt, wie aus Tabelle III hervorgeht, zu einer erheblichen Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit. Dieses Ergebnis stimmt—zumindest teilweise—mit dem von MENDOZA *et al.*⁸ überein, die mit Rinderleber-Esterase nach Brombehandlung 1 ng Carbaryl nachweisen konnten, während nach UV-Bestrahlung dieser Nachweis nicht mehr möglich war. Mit einem Enzymextrakt aus Schaf-, Schweine- oder Affenleber hingegen war dieser Nachweis noch möglich, so dass auch hier wieder Unterschiede in der Empfindlichkeit bei den Enzymen verschiedener Herkunft deutlich zutage treten. Damit verhalten sich die Carbamat-Insektizide beim Nachweis mit Rinderleber-Esterase völlig anders als beispielsweise die Phosphorsäureester¹⁰ und Chlorkohlenwasserstoffe¹¹, die durch die UV-Bestrahlung in zum Teil kräftige Esterase-Hemmer übergehen.

Eine intensive UV-Bestrahlung der Wirkstoffe dürfte unter anderem zu einer Hydroxylierung oder Epoxid-Bildung führen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass einige hydroxylierte Metaboliten erhebliche Anticholinesterase-Aktivität besitzen¹², dass eine Hydroxylierung also nicht unbedingt die Hemmwirkung zerstören muss, wenn sie sie zweifelsohne auch vielfach vermindert. Sicher ist, dass Carbamate einen durch Licht katalysierten Abbau erleiden¹³. Eine Bestrahlung von sechs Methylcarbamaten mit Sonnenlicht und UV führte zu zahlreichen unbekanntem Abbauprodukten, von denen viele ebenfalls Anticholinesterase-Aktivität zeigten¹³. Eine ältere Arbeit über Zectran weist ebenfalls eine Photozersetzung nach, wobei es zu erheblicher Toxizitätsabnahme kam¹⁴. Welche Photozersetzungsprodukte entstanden, wurde hier nicht untersucht. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen jedoch Carbaryl und Minacide am stabilsten zu sein oder in relativ starke Antiesterase-Substanzen überzugehen.

Neben dem reinen Nachweis der Carbamat-Insektizide und der Untersuchung des Einflusses von Brom und UV auf denselben sollte versucht werden, die Wirkstoffe dünnschichtchromatographisch zu trennen. Die in Tabelle IV wiedergegebenen hR_F -Werte stellen Mittelwerte aus grösseren Versuchsreihen dar. Allgemein kann man mittlere Schwankungen der hR_F -Werte beobachten. Diese sind wahrscheinlich auf Witterungseinflüsse zurückzuführen, da die Arbeiten in normalen Laborräumen ohne jede Klimatisierung durchgeführt wurden. Nimmt man jedoch einen Wirkstoff (z.B. Minacide) als Bezugssubstanz, so halten sich die Schwankungen in wesentlich engeren Grenzen. Auffallend ist, dass bei Carbaryl, Zectran, Isolan und in geringerem Masse auch bei Minacide oft ein schwacher Nebenleck auftrat. Ob es sich bei dieser Antiesterase-Substanz um eine Verunreinigung des Wirkstoffes handelt, konnte nicht festgestellt werden. Wie aus Tabelle IV weiter hervorgeht, ist mit den dreizehn intensiver untersuchten Laufmitteln eine Trennung und Identifizierung einzelner Wirkstoffe durchaus möglich, sofern bekannt ist, um welche es sich handelt. Für die Analyse eines Wirkstoffgemisches unbekannter Zusammensetzung mit eindimensionaler Chromatographie eignet sich jedoch kaum eines der Laufmittel, da stets eine Reihe

TABELLE IV

hR_F-WERTE DER UNTERSUCHTEN CARBAMAT-INSEKTIZIDE IN VERSCHIEDENEN LAUFMITTELSYSTEMEN (AUFTRAGMENGE 1 µg)

| Carbamat- Insektizide | Laufmittel | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------|----|----------|---------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Minacide | 0 | 98 | 39 | 85 | 30 | 30 | 95 | 25 | 59 | 80 (69) | 39 (31) | 33 (23) | 79 |
| Methiocarb | 0 | 98 | 31 | 79 | 9.2 | 10.8 | 90 | 7.7 | 52 | 72 | 31 | 24 | 74 |
| Zectran | 0 | 98 | 37 | 85 (78) | 15 (27) | 22 (3.8) | 95 (65) | 20 (0) | 58 (39) | 79 | 39 (31) | 32 (22) | 80 (73) |
| Carbaryl | 0 | 98 | 32 (8.5) | 79 (66) | 23 | 22 (5.4) | 92 (79) | 17 (0) | 48 (22) | 67 (38) | 30 (15) | 24 (5.4) | 73 (61) |
| Pyramat | 0 | 85 | 12 | 69 | 1.5 | 5.4 | 73 | 1.5 | 54 | 39 | 35 | 24 | 68 |
| Dimetan | 0 | 92 | 18 | 73 | 2.3 | 10 | 84 | 3.1 | 49 | 49 | 32 | 22 | 69 |
| Isolan | 0 | 91 | 19 (9.2) | 72 (61) | 3.1 | 6.9 | 76 (68) | 2.3 | 49 (39) | 51 (26) | 34 (25) | 25 (15) | 68 (58) |
| Dimetilan | 0 | 82 | 9.2 | 62 | 1.5 | 5.4 | 68 | 1.5 | 35 | 19 | 20 | 12 | 55 |
| Pyrolan | 0 | 98 | 30 | 84 | 4.6 | 11.6 | 89 | 5.4 | 55 | 65 | 37 | 30 | 76 |

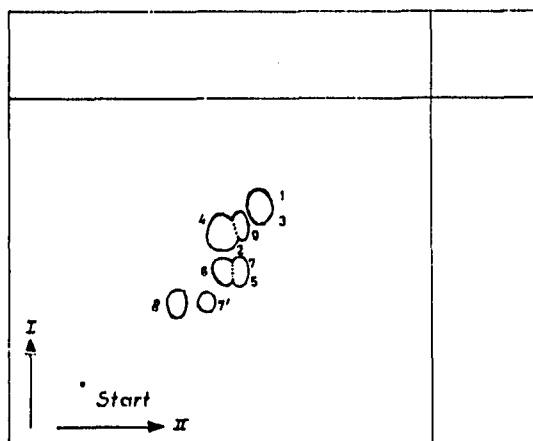


Fig. 1. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der untersuchten Carbamate. Laufmittel: (I) Benzol-Aceton (90:10); (II) Cyclohexan-Aceton (75:25).

von Wirkstoffen ähnliche R_F -Werte aufweist. Lediglich die zweidimensionale Chromatographie mit beispielsweise Laufmittel 3 und 5 oder 3 und 11 führt zu einer gewissen Auftrennung der Wirkstoffe, doch wurden auch hier einige Substanzen nicht getrennt. Abbildung I zeigt den Versuch einer zweidimensionalen Chromatographie der Wirkstoffe mit den modifizierten Laufmittelsystemen 3 und 11.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Nachweis mit Rinderleber-Esterase zu recht zufriedenstellenden Ergebnissen führt und nur zwei der untersuchten Wirkstoffe in ihrer Nachweisempfindlichkeit aus dem Rahmen fallen. UV-Bestrahlung führt zu einer kräftigen Verminderung der Nachweisempfindlichkeit, während sie von Brom recht unterschiedlich beeinflusst wird. Eine chromatographische Identifizierung der Wirkstoffe stösst mit den untersuchten Laufmitteln auf gewisse Schwierigkeiten, da eine Reihe von Substanzen eindimensional nicht zu trennen ist. Bei zweidimensionaler Chromatographie finden sich erste Ansätze zu einer Auftrennung der Wirkstoffe, doch sind die Ergebnisse noch nicht voll befriedigend.

DANK

Mein besonderer Dank gilt Fräulein I. BLEICH für die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

ZUSAMMENFASSUNG

Die DC-Enzymhemmungs-Methode wird zum Nachweis einiger Carbamat-Insektizide angewandt. Unter Normalbedingungen beträgt die untere Nachweisgrenze: Minacide 6 ng; Methiocarb 400 ng; Zectran 80 ng; Carbaryl 3 ng; Pyramat 200 ng; Dimetan 80 ng; Isolan 10 ng; Dimetilan 60 ng und Pyrolan 40 ng. Nach Brombehandlung zeigen einige Carbamate (Carbaryl, Dimetan und Dimetilan) eine stärkere Hemmung der Rinderleber-Esterase, während die anderen keinen Unterschied zeigten oder in schwächere Inhibitoren übergingen. Nach UV-Bestrahlung verlieren alle untersuchten Carbamate den grössten Teil ihrer Antiesterase-Aktivität.

Die Ergebnisse bei Trennversuchen der Carbamate in dreizehn Laufmittelsystemen waren unbefriedigend.

LITERATUR

- 1 F. W. PLAPP UND W. S. BIGLEY, *J. Econ. Entomol.*, 54 (1961) 793.
- 2 J. E. CASIDA, K. B. AUGUSTINSSON UND G. JONSSON, *J. Econ. Entomol.*, 53 (1960) 205.
- 3 S. D. MURPHY, R. R. LAUWERGS UND K. L. CHEEVER, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12 (1968) 22.
- 4 J. J. MENN UND J. B. MCBAIN, *Nature*, 209 (1966) 1351.
- 5 C. E. MENDOZA, P. J. WALES, H. A. MCLEOD UND W. P. MCKINLEY, *Analyst*, 93 (1968) 34.
- 6 W. WINTERLIN, G. WALKER UND H. FRANK, *J. Agr. Food Chem.*, 16 (1968) 809.
- 7 C. E. MENDOZA, D. L. GRANT, B. BRACELAND UND K. A. MCCULLY, *Analyst*, 94 (1969) 805.
- 8 C. E. MENDOZA, P. J. WALES, D. L. GRANT UND K. A. MCCULLY, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 1196.
- 9 P. J. WALES, H. A. MCLEOD UND W. P. MCKINLEY, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 51 (1968) 1239.
- 10 H. ACKERMANN, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 309.
- 11 F. GEIKE, *J. Chromatog.*, 44 (1969) 95.
- 12 H. W. DOROUGH UND J. E. CASIDA, *J. Agr. Food Chem.*, 12 (1964) 244.
- 13 D. G. CROSBY, E. LEITIS UND W. L. WINTERLIN, *J. Agr. Food Chem.*, 13 (1965) 204.
- 14 E. E. KENAGA, A. E. DOTY UND J. L. HARDY, *J. Econ. Entomol.*, 55 (1962) 466.

J. Chromatog., 53 (1970) 269-277