Der Nachweis von Insektizidrückständen auf Pflanzenmaterial (Gemüse und Früchte) und die Trennung einzelner Schädlingsbekämpfungsmittel mit Hilfe der Papierchromatographie

Autor(en): **Müller, R. / Ernst, G. / Schoch, H.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **48 (1957)**

Heft 3

PDF erstellt am: **23.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983776

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Der Nachweis von Insektizidrückständen auf Pflanzenmaterial (Gemüse und Früchte) und die Trennung einzelner Schädlingsbekämpfungsmittel mit Hilfe der Papierchromatographie

Von *R. Müller, G. Ernst* und *H. Schoch*

(Mitteilung aus dem Kantonalen Laboratorium Basel-Stadt)

Die vorliegende Arbeit soll einen zusammenfassenden Ueberblick über die von uns gemachten Erfahrungen auf dem Gebiete des Insektizidnachweises geben. Wir haben uns dabei die spezielle Aufgabe gestellt, kleinste Mengen in der Grössenordnung von 10 bis 200 Gamma, bezogen auf das untersuchte Material, eines oder mehrerer Insektizide aus pflanzlichem Material zu isolieren und diese isolierten Stoffe zu identifizieren.

Im Hinblick auf die ausserordentliche Vielfalt solcher Substanzen haben wir uns dabei auf die beiden, unseres Erachtens zur Zeit wichtigsten Gruppen beschränkt, nämlich auf diejenigen der chlorierten Kohlenwasserstoffe und der Phosphorsäureesterverbindungen. Innerhalb dieser beiden Gruppen konnten wir unser Bestreben wiederum infolge der Vielzahl solcher Verbindungen nur auf einige ihrer bekanntesten Vertreter, die heute auch zu den meist verwendeten zählen dürften, richten.

Unsere Wahl fiel bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen auf

Aldrin
Dieldrin
DDT
Hexachlorcyclohexan

und bei den Phosphorsäureesterverbindungen auf

Parathion
Chlorthion
Diazinon und
Malathion.

In der nachfolgenden kurzen Zusammenstellung soll an den Aufbau bzw. die Struktur der genannten Verbindungen sowie an einige ihrer wichtigsten physikalischen und chemischen Daten erinnert werden.

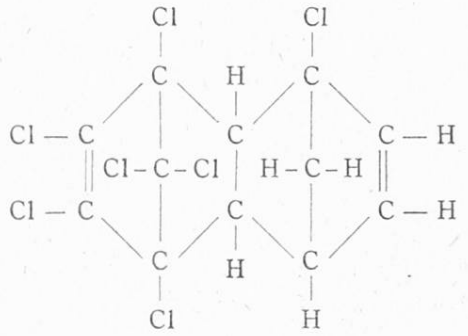
Chlorierte Kohlenwasserstoffe

1. Aldrin $C_{12}H_8Cl_6$

Chemischer Name	1, 2, 3, 4, 10, 10-Hexachlor-1, 4, 4a, 5, 8, 8a-hexahydro-1, 4, 5, 8-diendomethylennaphthalin
Synonyma	Verbindung 118, Octalen, HHDN

Molekulargewicht 365,2
Schmelzpunkt 104—104,5°
Siedepunkt 145° / 2 mm

Strukturformel



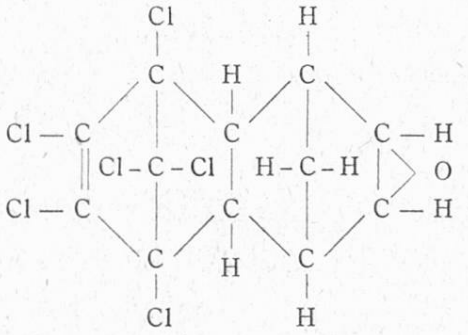
Löslichkeit In Wasser unlöslich, in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich.

Das als Insektizid verwendete Produkt enthält mindestens 95 % obiger Verbindung.

2. *Dieldrin* $C_{12}H_8Cl_6O$

Chemischer Name 1, 2, 3, 4, 10, 10-Hexachlor-6, 7-epoxyl-1,4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-1, 4, 5, 8-diendomethylennaphthalin
Synonyma Verbindung 497, Octalox, HEOD
Molekulargewicht 381,1
Schmelzpunkt 175—176°
Siedepunkt —

Strukturformel



Löslichkeit In Wasser unlöslich, schlecht löslich in den meisten aliphatischen Kohlenwasserstofflösungsmitteln, etwas besser löslich in den gebräuchlichen aromatischen KW-Lösungsmitteln.

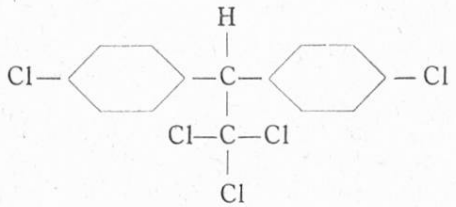
Das technische Produkt enthält mindestens 85 % obiger Verbindung.

3. *DDT* $C_{14}H_9Cl_5$

Chemischer Name 4,4-Dichlordiphenyltrichloräthan
Synonyma Dicophan, Gesarol usw.

Molekulargewicht 354,5
Schmelzpunkt 108,5—109,0°
Siedepunkt —

Strukturformel



Löslichkeit In Wasser unlöslich, in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich.

Die technische Wirksubstanz soll heute einen Erstarrungspunkt von mindestens 89° aufweisen, was einem Gehalt an p,p'-DDT von 74 bis 75 % entspricht.

4. *HCH* $C_6H_6Cl_6$

Chemischer Name der techn. Verbindg. Hexachlorcyclohexan bzw. eine Mischung der Isomeren von ungefähr folgender Zusammensetzung:

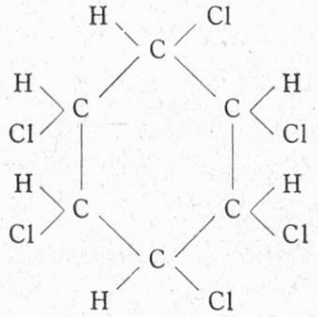
55—70 % α-Isomeres (Smp. 157°)
5—14 % β-Isomeres (Smp. 309°)
10—18 % γ-Isomeres (Smp. 112°)

6— 8 % δ-Isomeres (Smp. 138°)
3— 4 % ε-Isomeres (Smp. 219°)
bis 4 % Heptachlorcyclohexan und Spuren von Octachlorcyclohexan

Synonyma Verbindung 666, Gammexan, HCCH
Molekulargewicht 291,1
Siedepunkte —

Das heute ausschliesslich zur Insektizidbekämpfung verwendete Produkt «*Lindan*» weist einen Gehalt des γ-Isomeren von ca. 99 % auf.

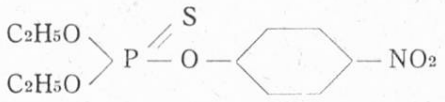
Strukturformel



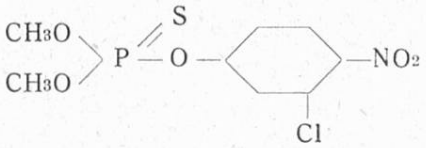
Löslichkeit Hinsichtlich der einzelnen Isomeren unterscheiden sie sich stark in ihrer Löslichkeit. In den meisten organischen Lösungsmitteln sind sie jedoch löslich.

Phosphorsäureesterverbindungen

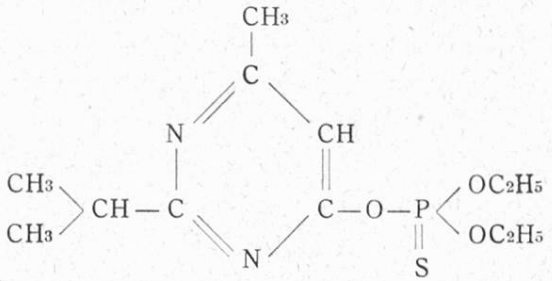
1. *Parathion*

Chemischer Name	0,0-Diäthylthiophosphorsäure-0-p-nitrophenylester bzw. Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat
Synonyma	Verbindung 3422, E-605, SNP, AATP usw.
Molekulargewicht	291,3
Schmelzpunkt	6,0°
Siedepunkt	157—162° / 0,6 mm (Polymerisation)
Strukturformel	
Löslichkeit	In Wasser sehr gering, gut löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln, wenig löslich in Petroläther.

2. *Chlorthion*

Chemischer Name	0,0-Dimethyl-0-(3-chloro-4-nitrophenyl)-thiophosphat
Synonyma	Bayer 22/190
Molekulargewicht	297,7
Schmelzpunkt	—
Siedepunkt	—
Strukturformel	

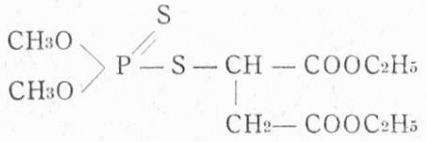
3. *Diazinon*

Chemischer Name	Thiophosphorsäure-(-2-isopropyl-4-methyl-pyrimidyl-(6))-diäthylester
Synonyma	G 24480
Molekulargewicht	304,4
Schmelzpunkt	—
Siedepunkt	83—84° / 0,002 mm
Strukturformel	
Löslichkeit	In Wasser (20°) zu 0,004 %, mit Aether, Alkohol, Benzol und ähnlichen Kohlenwasserstoffen, Spezialpetrol, Cyclohexan und Petroläther dagegen mischbar.

4. *Malathion*

Chemischer Name	S-(1,2-Dicarbäthoxyäthyl)-0,0-dimethyldithiophosphat
Synonyma	Verbindung 4049
Molekulargewicht	330,3
Schmelzpunkt	3^0
Siedepunkt	156^0 / 0,7 mm

Strukturformel



Im Verlaufe unserer Untersuchungen ergab sich die zweckmässige Aufteilung des Arbeitsstoffes in die drei Gebiete wie folgt:

1. Extraktion des Pflanzenmaterials,
2. Reinigung der gewonnenen Extrakte,
3. Nachweis der Insektizidrückstände in den gereinigten Extrakten mittels der Papierchromatographie.

Diese Einteilung wurde auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungsmethoden beibehalten.

Warum wir gerade die Papierchromatographie, die in diesem Zusammenhange bis jetzt eigentlich nur selten Verwendung fand und dann meistens nur für den Nachweis oder die Trennung von Reinsubstanzen, für die Bestimmung von Insektizidrückständen heranzogen, beruht auf folgenden Ueberlegungen:

Die heute gebräuchlichsten und bekanntesten Methoden der Insektizidbestimmung gehen praktisch alle von der Voraussetzung aus, dass der nachzuweisende Stoff bekannt ist.

Im Gegensatz dazu sahen wir unsere Aufgabe darin, eventuell vorhandene Rückstände an Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Pflanzenmaterial auch dann nachweisen zu können, wenn über die Art und Zusammensetzung der angewandten Stoffe nichts bekannt ist.

Deshalb sahen wir uns veranlasst, eine Methode anzuwenden, mit deren Hilfe man in einem Arbeitsgang mehrere Stoffe zugleich erfassen und auch identifizieren kann, die ferner gleichzeitig noch der Bedingung einer genügend grossen Empfindlichkeit Rechnung trägt.

Eine Methode, die diesen Anforderungen möglichst weitgehend entsprach, lieferte die Technik der Papierchromatographie.

Zudem bot sie uns noch einen weiteren, sehr beachtenswerten Vorteil, nämlich den, dass der eigentliche Nachweis der Stoffe in Form ihrer ursprünglichen Verbindungen vorgenommen werden kann und nicht auf Spaltprodukten beruht, wie dies vielfach beim Nachweis von Phosophorsäureesterverbindungen der Fall ist. Auch die Vortäuschung einer gesuchten Verbindung durch einen ähnlichen Stoff wird durch die Anwendung der papierchromatographischen Trennung am ehesten vermieden.

Obwohl wir uns jeweilen nur auf vier Vertreter der beiden Gruppen beschränkt haben, dürfte es auf Grund unseres Nachweisverfahrens möglich sein, zu entscheiden, ob es sich, wenn auch keiner dieser Vertreter selbst anwesend ist, bei einer positiven Nachweisreaktion um den Typus eines chlorierten Kohlenwasserstoffes oder eines Phosphorsäureesters handelt.

Wir möchten in dieser kurzen Einleitung auch nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, dass wir uns der Tatsache bewusst sind, dass die vorgeschlagene Nachweismethode in einzelnen Fällen noch verbessert oder vielleicht vereinfacht werden kann. Jedenfalls liessen sich mit der in der vorliegenden Zusammenfassung angegebenen Arbeitsweise recht gute und brauchbare Resultate erzielen. Es sei hier aber speziell vermerkt, dass die erste Voraussetzung zur Erzielung eines brauchbaren Resultates ein peinlich sauberes Arbeiten ist, dies deshalb, weil nur dann mit einem auswertbaren Chromatogramm gerechnet werden darf. Auf Grund des Chromatogrammes fällen wir letztendlich die Entscheidung, ob überhaupt Insektizidrückstände nachzuweisen sind oder nicht, und wenn ja, welcher Art sie sind.

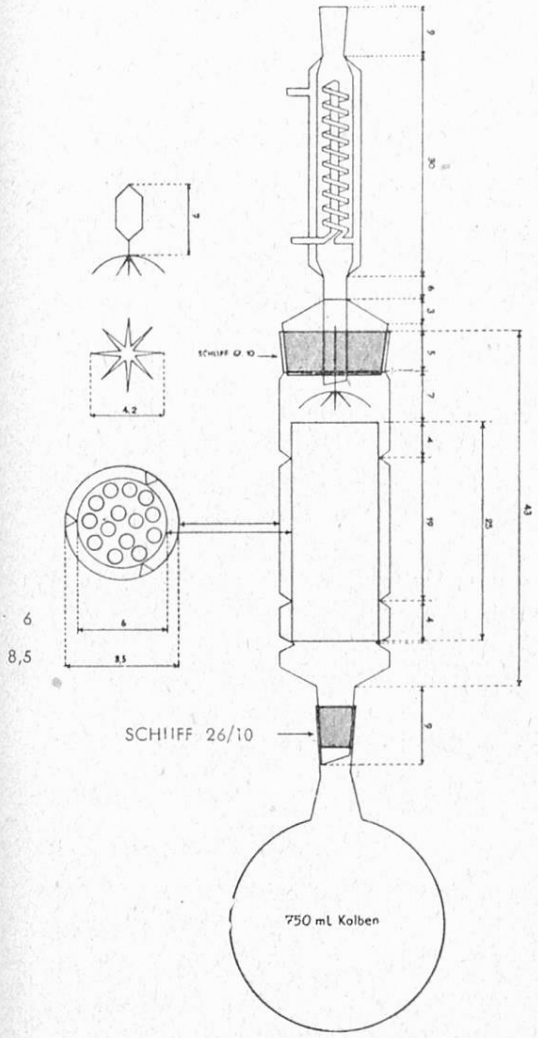


Abbildung 1
Extraktions-Apparatur

1. Extraktion des Pflanzenmateriales

Einleitend möchten wir der Firma J. R. Geigy AG, Basel, für die Anregung und Erlaubnis, eine von ihr schon vielfach verwendete und bewährte Extraktionsapparatur auch für unsere Zwecke benützen zu dürfen, bestens danken.

Die Extraktion geschieht dabei in Form eines kontinuierlichen Abwaschens des Materials mit einem organischen Lösungsmittel.

a) Beschreibung der Extraktionsapparatur Abbildung 1

Abbildung 1 gibt eine genaue Skizze der Gesamtapparatur mit den zugehörigen Masszahlen (in cm) wider. Die Detailabbildungen oben und Mitte zeigen den aus V_2A-Blech angefertigten «Stern», der zur gleichmässigen Verteilung des im Kühler kondensierten Lösungsmittels über das zu extrahierende Gut in die Ausflussöffnung des Kühlers eingeklemmt wird. Die Detailabbildung in der Mitte lässt den «Stern» in der Vorderansicht erkennen, währenddem in der Abbildung oben dieser um 90^0 in senkrechter Richtung gedreht dargestellt ist.

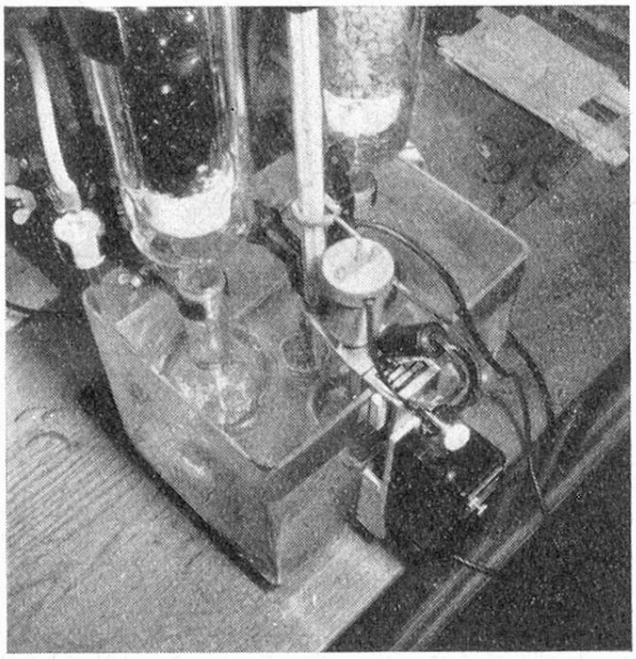


Abbildung 2

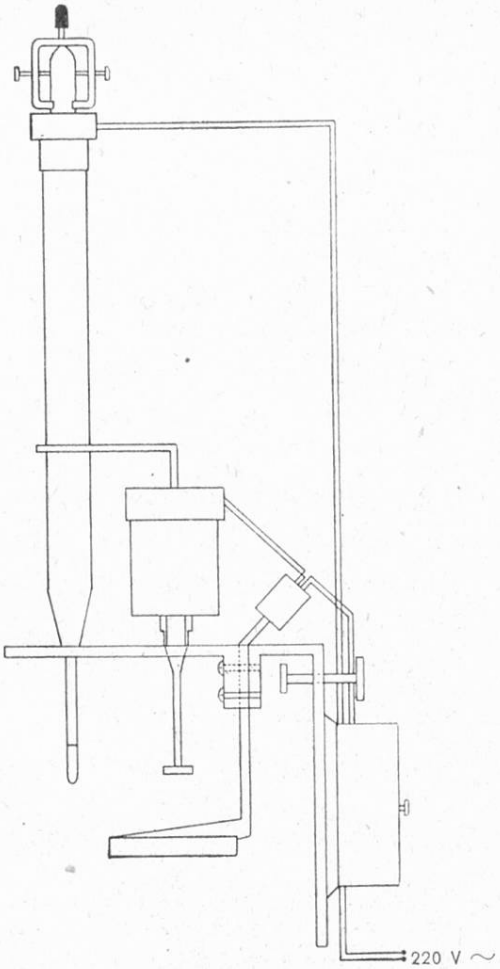


Abbildung 3

Die Detailabbildung unten zeigt den Querschnitt der beiden Hülsen, von denen die innere, welche zur Aufnahme des zerkleinerten Pflanzenmaterials dient, einen durchlochten Boden aufweist, durch welchen das Lösungsmittel in den Verdampfungskolben zurückfliessen kann.

Die äussere Hülse ist an drei senkrecht übereinanderliegenden Stellen mit jeweilen drei Einbuchtungen versehen, die eine zentrale Lagerung der inneren Hülse gestatten, wobei die untersten Einbuchtungen um soviel vertieft sind, dass die innere Hülse auf diese aufzuliegen kommt.

Die von uns verwendeten Extraktionsapparaturen wurden von der Firma Albert Gass & Co., Glastechnische Werkstätte, Basel, angefertigt.

Beschreibung der Abbildungen 2 und 3

Abbildungen 2 und 3: Vor den beiden Verdampfungskolben der Extraktionsapparate ist die Heizeinrichtung zur Konstanthaltung der Wassertemperatur sichtbar. Sie besteht aus einem Elektromotor mit Rührwelle, Kontaktthermometer, zwei Tauchsiedern (mit einer Leistung von zusammen 1400 Watt) und einem Vertikal-Quecksilberrelais zur Ein- und Ausschaltung des Stromes für den Motor und die beiden Tauchsieder.

b) Verwendete Lösungsmittel

Als Lösungsmittel für die Extraktion wurden Petroläther, Hexan und Pentan verwendet. Die meisten Extraktionen wurden schliesslich aber nur noch mit Pentan vorgenommen, da dieses Lösungsmittel etwas weniger Begleitstoffe zu extrahieren schien.

Alle Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch noch mindestens einmal nachdestilliert.

Für die Extraktion selbst wurden *durch den Kühler* jeweilen soviel Lösungsmittel geleert, bis die Verdampfungskolben, in die man zuvor etwas Bimssteinpulver oder kleine Glasperlen gegeben hatte, mindestens zur Hälfte gefüllt waren (pro 750 ml-Kolben 400—500 ml Lösungsmittel).

c) Extraktionsdauer

Die Dauer der Extraktion betrug durchschnittlich 6—8 Stunden.

d) Vorbereitung des Pflanzenmaterials zur Extraktion mit Pentan

Wir versuchten alles Material, so die verschiedenen Früchte und Gemüse, ohne jegliche Vorbehandlung direkt zu extrahieren. Dabei mussten wir natürlich speziell auf den ausserordentlichen Wassergehalt Rücksicht nehmen, damit es einerseits bei zuckerreichen Früchten nicht zu einem Zusammenkleben und Verstopfen in der Hülse führte (wodurch das Pentan nicht mehr durch den gelochten Hülsenboden in den Verdampfungskolben zurückfliessen konnte) und damit anderseits nicht grosse Mengen Wasser (hauptsächlich bei Grüngemüse wie Salat, Spinat usw.) durch die Hülse in den Verdampfungskolben abflossen.

Diesem Umstand sind wir folgendermassen begegnet: In die Extraktionshülse wurde auf den durchlochten Boden ein Rundfilter gelegt und eine etwa 4—5 cm hohe Schicht wasserfreies Natriumsulfat daraufgegeben. Dies genügte bereits, um bei einem grossen Teil des zu extrahierenden Materiales den Hauptteil des abfliessenden Wassers in der Natriumsulfatschicht zurückzuhalten. War trotzdem noch etwas Wasser in den Verdampfungskolben abgeflossen, konnte es nach beendeter Extraktion leicht in einem Scheidetrichter abgetrennt werden.

Bei Material, das nebst einem hohen Wassergehalt noch reichliche Mengen Zucker enthielt, wie Aprikosen, Erdbeeren, Pfirsiche usw., genügte eine einzelne Natriumsulfatschicht nicht mehr, sondern es musste noch eine zweite, ca. 3—4 cm hohe Schicht in der Mitte der Hülse, d.h. zwischen dem eigentlichen Extraktionsgut, eingeschaltet werden, wobei das Natriumsulfat zwischen zwei Rundfilter eingebettet wurde. Mit dieser Anordnung in der Hülse gelang es uns, sämtliches Material reibungslos zu extrahieren, ohne dass diese dabei verstopft wurde.

Mit nur einer Natriumsulfatschicht, direkt auf dem Hülsenboden, kam es vielfach, namentlich bei Früchten, vor, dass das locker eingefüllte Material im

Laufe der Extraktion immer mehr zusammensank und der austretende sirupartige Fruchtsaft das Durchlaufen des Pentans verunmöglichte.

Das Extraktionsgut selbst wurde vor dem Einfüllen in die Hülsen mit einem Messer zerkleinert, wobei folgendermassen vorgegangen wurde:

1. Früchte

Aepfel (1 Na-Sulfatschicht)	Die Aepfel wurden geschält, wobei die Schalen so dick geschnitten wurden, dass ihnen noch ca. 2—3 mm Fruchtfleisch anhaftete. Das gesamte Schalenmaterial wurde alsdann in kleinere Stücke von ca. 0,5—2 cm Kantenlänge zerschnitten.
Birnen	Analog wie Aepfel behandelt.
Aprikosen, Pfirsiche, Zwetschgen, Erdbeeren usw. (2 Schichten)	Die Früchte wurden entzweigeschnitten, sofern sie Steine enthielten diese entfernt, und beide Hälften in würfelförmige Stücke von ca. 1—2 cm Kantenlänge zerschnitten.
Kirschen (2 Schichten)	Die Kirschen wurden so weit eingeschnitten, bis die Steine daraus entfernt werden konnten, sonst aber ohne weitere Zerkleinerung extrahiert.

2. Gemüse

Grünsalat (1 Schicht)	Die grünen Blätter wurden zuerst in feine Streifen und diese nochmals in «Plätzchen» zerschnitten.
Spinat (1 Schicht)	Analog wie Grünsalat behandelt.
Blumenkohl (1 Schicht)	Die einzelnen Köpfchen wurden ohne Stengelmaterial und Blätter mit den Händen zerbröckelt.
Tomaten (2 Schichten)	Die Tomaten wurden entzweigeschnitten, das weiche gallertige und kernenhaltige Fruchtfleisch entfernt und die Schalen in kleine würfelförmige Stücke zerkleinert.
Kartoffeln (1 Schicht)	Die ganzen Kartoffeln wurden in Würfelchen aufgeteilt.

Das nach der vorstehenden Tabelle zerkleinerte Material wurde auf einer Tarierwaage gewogen und mit einer bzw. zwei Natriumsulfatschichten in die Extraktionshülsen eingefüllt.

Bei unseren Testversuchen wurden die einzelnen Insektizide auf das Pflanzenmaterial in der Extraktionshülse gegeben, indem man mit einer Pipette bekannte Mengen der in den verschiedenen Lösungsmitteln gelösten Substanzen auftropfte.

e) Das Problem der Vortrocknung

Die von uns gewählte Extraktionsweise warf unter anderem auch die Frage auf, ob die Extraktion des Pflanzenmateriales ohne irgendeine Vorbehandlung als vollständig angesprochen werden dürfe oder ob eine Vorbehandlung, speziell ein vorheriger Wasserentzug, ein besseres Eindringen des Lösungsmittels in das zu extrahierende Material und damit eine vollkommenere Extraktion gewährleiste.

Ueber das Eindringungsvermögen bzw. die Lokalisationsstellen der untersuchten Insektizide in Pflanzen und Früchte ist bis heute sehr wenig bekannt geworden. Man darf aber nicht von vorneherein annehmen, die Kontaktinsektizide, als nicht ionogene Substanzen, seien nicht imstande, tiefer in die stark wasserhaltigen Pflanzengewebe einzudringen. Geschmacks- und Geruchsbeeinträchtigungen von Ackerfrüchten und Gemüsen, speziell bei Kartoffeln und bei Milch (siehe *P. Kästli* 1956), lassen darauf schliessen, dass die Kontaktinsektizide auch tiefer in die wässerigen Phasen von Früchten und Pflanzengeweben einzudringen vermögen. Auch die Frage des Transportes mit dem Saftstrom ist noch nicht geklärt.

Einem Bericht von *Gunther* und *Blinn* [5]) entnehmen wir in diesem Zusammenhange folgendes:

> «*Gunther, Barnes* und *Carman* («Removal of DDT and Parathion residues from Apples, Pears, Lemons and Oranges», Adv. Chem. Series 1, 137—142 (1950)) geben folgende Definitionen:
> «extrasurface residues» sind Rückstände, die an einer Wachsoberfläche oder Kutikula eines Pflanzenteils anhaften,
> «cuticular residues» sind Rückstände, die in der Wachskutikula eines Pflanzenteiles eingelagert oder gelöst sind,
> «subcuticular residues» sind Rückstände, die in einem Pflanzenteil unter die Kutikularschicht eindringen, wie in das «intracarp» oder «pomace» eines Apfels oder in das «albedo» einer Citrusfrucht.

Die gleichen Autoren definieren weiter:

> «harvest residues» sind Rückstände, die zur normalen Erntezeit vorhanden sind,
> «postharvest residues» sind Rückstände, die sich zu beliebiger Zeit nach der Ernte und vor dem Genuss oder vor einem anderen endgültigen Verbrauch auf oder in der Frucht befinden (z.B. Lageräpfel),
> «terminal residues» sind Rückstände, die zur Zeit des Verbrauches vorhanden sind, unabhängig von der Verarbeitungsform, d.h. ob direkt zum Genuss bereit (wie Tafelobst), ob in Büchsen, getrocknet, gefroren (tiefgekühlt) oder gekocht.

Tabelle 1

Eindringungsgrad von Insektiziden in die Schalen von «gescheuerten» reifen Valencia-Orangen

Insektizid	Approx. Schalenrückstand in p.p.m.			
	1/2 Tag	1 Tag	1 Woche	1 Monat
pp'-DDT	Spur	Spur	1	20
Parathion	3	4	4	2
Aramit	1/2	1/2	2	1
Dieldrin	1/2	1/2	3	2
Systox	Spur	Spur	0,2	0,2
Schradan	3	7	6	5

«In der vorstehend angeführten Tabelle 1 sind zum Vergleich Daten über Versuche des Eindringungsvermögens verschiedener Insektizide in reife Valencia-Orangen zusammengestellt. Diese Zahlen können auf keine Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Insektiziden hinweisen, da Dosierung und Anwendungszeit variierten.

Ueber ähnliche Versuche an einer grossen Anzahl von Pflanzen und Früchten mit wachs- oder ölhaltiger Kutikula oder Fleisch berichten auch andere Autoren, deren Ergebnis die Vermutung, die Insektizide könnten in wesentlichen Mengen in die Früchte eindringen, rechtfertigen. Es lässt sich jedenfalls voraussagen, dass wässerige und dünnhäutige Früchte wie Weintrauben oder Tomaten für diese Art des Eindringens ungünstig sind. Das Eindringen beruht letztlich auf der vorzüglichen Löslichkeit der Insektizide in lipoid- oder wachsähnlichen Komponenten der Kutikular- oder anstossender Schichten. Dies scheint die wahrscheinlichste Erklärung für den Mechanismus zu sein, der den nicht ionisierten Insektiziden das Eindringen und den Transport in die kutikularen und subkutikularen Regionen eines Pflanzenteils gestattet. Die Atmung oder andere denkbare Prozesse ähnlicher Art dürfen als anfängliche Eintrittsmöglichkeiten nicht ausser acht gelassen werden, was z.B. durch Geschmacksbeeinträchtigungen im Fleisch von Aepfeln und Kartoffeln belegt wird, die durch HCH und dessen Verwandte oder durch Wanderung einiger organischer Phosphate mit dem Saftstrom in alle wachsenden Pflanzenteile hervorgerufen wurden.

Diese Ueberlegungen zeigen, dass der Zeitpunkt der Ernte der Früchte für die Rückstandbestimmung von Wichtigkeit sein und deren Zuverlässigkeit begrenzen kann. Zudem ist es wichtig, das Verhalten des Insektizides beim Eindringen genau zu studieren. Wenn nur die Verhältnisse zur Zeit der Ernte (harvest residues), zu beliebiger Zeit nach der Ernte (postharvest residues) oder unmittelbar vor dem Konsum (terminal residues) festgestellt werden, bleiben

die vorstehend gemachten Angaben weitgehend ohne praktischen Wert. Diese Ueberlegungen werden aber dann massgebend, wenn es gilt, die nötige Zeit festzustellen, bis sich ein gegebener Rückstand auf ein unschädliches Mass vermindert hat. Um den Verlauf des Abbaues eines Insektizides feststellen zu können, bleibt bis zu dessen Abklärung die Zeitwahl der Ernte als Kriterium.»

Dem Umstand, dass die Insektizide nicht nur auf der Pflanzenoberfläche lokalisiert sind, sondern auch in das Innere einzudringen vermögen, versuchten wir bei der Extraktion dadurch Rechnung zu tragen, dass wir nach Möglichkeit ganze Früchte verarbeiteten oder, wenn das nicht möglich war, wie z.B. bei Aepfeln oder Birnen, die Früchte schälten, wobei darauf geachtet wurde, nicht nur die Schale, sondern auch das angrenzende Fruchtfleisch etwa 2—3 mm dick zur Extraktion zu bringen (siehe Zerkleinerung des Pflanzenmateriales).

Ob und wie weit dabei das überall im Pflanzengewebe verteilte Wasser gegenüber dem organischen Lösungsmittel eine abstossende Wirkung im Sinne einer unvollständigen Extraktion aller dieser nicht ionogenen Insektizide ausübt, musste durch vergleichende Untersuchungen an zuvor teilweise oder völlig entwässertem Material abgeklärt werden.

Eigene Versuche

Um über die aufgeworfenen Fragen Aufschluss zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, bei denen gleiche Frischmengen von Obst und Gemüsen einerseits frisch und anderseits erst nach einer Vortrocknung extrahiert wurden. Die Rohextraktmengen wurden gewogen und verglichen.

Die Untersuchungen wurden mit Früchten und Gemüsen verschiedenen Wassergehaltes durchgeführt (Tomaten, Bohnen, Salat, Apfelschalen). Die Extraktion geschah nach den vorhin beschriebenen Methoden.

Vorgetrocknet wurde im Labortrockenschrank während 12 Stunden bei 105°. Nur beim Salat konnte in dieser Zeit eine völlige Austrocknung, d.h. das Trockengewicht erreicht werden. Die übrigen Früchte und Gemüse enthielten immer noch geringe Mengen Wasser. Die bei diesem Prozess «abgedampften» Wassermengen gehen aus Tabelle 2 hervor.

Bei der Extraktion des vorgetrockneten Materiales wurde darauf geachtet, die gleichen äusseren Bedingungen einzuhalten wie bei der Extraktion des frischen Materiales, speziell hinsichtlich der Extraktionszeit von 6 Stunden. Auf Grund früherer Versuche durfte angenommen werden, dass eine solche Extraktionszeit zur völligen Extraktion aller im betreffenden Lösungsmittel löslichen Stoffe ausreicht.

Nach der Extraktion wurden die die Rohextrakte enthaltenden Pentanlösungen mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abdestilliert und gewogen.

Auf Grund der am Anfang des Kapitels gemachten Darlegungen könnte man erwarten, dass sich die Extraktmengen wesentlich voneinander unterschei-

Tabelle 2

Durch Vortrocknung bedingter Wasserverlust bei verschiedenen Früchten und Gemüsen

	Wasserverlust in % des Frischgewichtes nach Stunden Vortrocknung				
	2	5	8	10	12
Salat	31,5	64	93,9	95,3	95,3
Tomaten	14	43,2	60,5	69,8	73,3
Bohnen	7,2	41,1	65,2	75,6	80
Apfelschalen	23,6	48	74,8	82	85,2
Apfelschalen	20,7	47,8	68,8	79,6	83,7
Apfelschalen	18,2	45,8	63,7	75	81,2
Apfelschalen	19,6		69,2	78,8	82,5
Apfelschalen	21,2		65,4	75	79,8

den werden, wenn das sich in den Geweben befindliche Wasser das Lösungsmittel wirklich am Eindringen hindert und eine vollständige Extraktion deswegen verunmöglicht. Ist dies hingegen nicht der Fall, muss man darauf schliessen, dass das in den Geweben enthaltene Wasser das Lösungsmittel bei der Extraktion nicht hindert.

Die gewogenen Rohextrakte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

Rohextraktmengen nach Extraktion von frischem und vorgetrocknetem Pflanzenmaterial

	Rohextrakt in mg	
	frisch extrahiert	nach Vortrocknung
Salat	83,1	86,0
Tomaten	17,5	28,8
Bohnen	59,8	57,3
Apfelschalen	382,4	494,0
Apfelschalen	570,6	482,4
Apfelschalen	439,3	397,5
Apfelschalen	534,9	430,0
Apfelschalen	354,6	440,8

Aus den Vergleichszahlen ergibt sich, dass die Unterschiede zwischen den beiden Rohextrakten nicht wesentlich sind, besonders wenn man bei den Werten für die Apfelschalen die durch das Material bedingten grossen Schwankungen

innerhalb einer gleichbehandelten Gruppe in Betracht zieht. Bildet man aus den Werten, die für die Apfelschalen gewonnen wurden, die Mittelwerte, so ergibt sich für die Extraktion von frischem Material 456,3 mg und für vorgetrocknetes Material 448,9 mg bei einer Einwaage von 240 g frischen Apfelschalen. Diese Zahlen deuten nicht darauf hin, dass die Vortrocknung die gewünschte Wirkung hat. Das Lösungsmittel scheint wasserhaltiges Frischgewebe bei genügend langer Extraktionszeit ebensogut zu extrahieren wie vorgetrocknetes Pflanzengewebe.

Eine andere Frage im Zusammenhange mit der Vortrocknung ist das Verhalten der Insektizide bei hohen Temperaturen. Um auch hierüber Klarheit zu erhalten, wurden die acht bearbeiteten Insektizide über mehrere Stunden bei 105° gehalten und zu verschiedenen Zeiten Proben zur Bestimmung genommen. Es zeigte sich dabei, dass durch Hitze allein kaum Verluste durch Verflüchtigung entstehen, so dass bei einer Anfangsmenge von 50 Gamma Insektizid auch nach 12 Stunden noch genügend Substanz vorhanden war, um einen einwandfreien qualitativen Nachweis zu ermöglichen.

2. *Reinigung der gewonnenen Extrakte*

Bevor mit der eigentlichen Aufarbeitung der Extraktlösung begonnen wird, teilt man diese in drei aliquote Teile.

Den ersten und den zweiten Teil der Extraktlösung zieht man zu einer jeweils separaten Reinigung heran, je nachdem, ob anschliessend auf die Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe oder die Gruppe der Phosphorsäureesterverbindungen geprüft werden soll.

Der dritte Teil der Lösung kann entweder als Reservelösung betrachtet werden, auf die man im Falle einer zu wiederholenden Bestimmung zurückgreifen wird, oder aber, sofern das Papierchromatogramm die Anwesenheit eines Insektizidrückstandes zu erkennen gibt, zu einer mehr oder weniger quantitativen Bestimmung desselben mit Hilfe einer spezifischen Methode Verwendung finden.

Hat man genügend Extraktionsapparaturen zur Verfügung, so kann man selbstverständlich auch so vorgehen, dass man an Stelle der Aufteilung der Extrakte drei Extraktlösungen mit Hilfe der entsprechenden Apparaturen herstellt.

Der Vorteil der Anwendung mehrerer Apparaturen für die Extraktion desselben Stoffes ergibt sich ohne weiteres aus der Menge des zu extrahierenden Materiales, bzw. der damit verbundenen Anreicherung eventuell vorhandener Insektizidrückstände.

Die Aufarbeitung der Extrakte im Hinblick auf den anschliessenden Nachweis der beiden Insektizidgruppen wurde wiederum in einzelne Arbeitsgänge unterteilt.

Dabei sind die einzuschlagenden Reinigungsverfahren weitgehend abhängig von dem Gehalt der Extraktionsrückstände an Pflanzenwachsen, Fetten, Oelen, Lipoiden und lipoidähnlichen Substanzen.

Im folgenden ist zuerst eine Zusammenstellung der einzelnen Arbeitsgänge angegeben, die je nach der Art des extrahierten Materiales bzw. des daraus resultierenden Extraktes alle durchlaufen werden müssen oder zum Teil auch weggelassen werden können.

A. Aufarbeitung der Extraktrückstände für den Nachweis chlorierter Kohlenwasserstoffe

Reagentien:

1. *Pentan* (n-Pentanum depuratum), doppelt destilliert, vom Siedepunkt von 32—34°. Es wird beim Nachdestillieren nur die Fraktion von 32—34° aufgefangen.
2. *Aether*, peroxydfrei, doppelt destilliert über trockenem Chlorcalcium unter Verwerfung der letzten Milliliter.
3. *Acetonitril*, Methylcyanid CH_3CN, Sdp. 79,5—81°.
   Lieferant: Fluka AG, Buchs (St.Gallen).
   Die Handelsware wird mindestens zweimal nachdestilliert (aus einem Oelbad), wobei nur die dem angegebenen Siedeintervall entsprechende Fraktion verwendet werden soll.
4. *Aceton*, einmal nachdestilliert unter Verwerfung der letzten Milliliter.
5. *Isopropylalkohol.*
6. *Natriumsulfat*, wasserfrei (gemäss Ph. H. V.), 2 Stunden bei 130° nachgetrocknet.
7. *Aluminiumoxyd* (Merck) zur chromatographischen Adsorptionsanalyse nach Brockmann. (Wenn möglich soll das Aluminium zwecks einer maximalen Aktivierung zusätzlich noch während 24 Stunden bei 130° unter Vakuum, erzeugt durch eine laufend betriebene Wasserstrahlpumpe, erhitzt werden.)
8. *Rauchende konzentrierte Schwefelsäure*, bestehend aus einer Mischung von jeweilen 25 ml Oleum (66 %) und 175 ml konz. Schwefelsäure (d = 1,84). Die Säuremischung wird vor dem Gebrauch zur Extraktreinigung mit Pentan ausgeschüttelt (300 ml Pentan auf 40 ml Säure).
9. *Natronlauge*, 2%ige wässerige Lösung.
10. *Trockeneis.*

Die Nachdestillation der Lösungsmittel 1, 2 und 4 soll mit einem Kolonnenaufsatz (z.B. Spiralkolonne von ca. 40 cm Länge oder mit Raschigringen gefüllte Kolonne) vorgenommen werden. Hingegen wurde für das Lösungsmittel 3 ein gewöhnlicher Destillierkolben ohne Aufsatz verwendet.

Die Nachdestillation der obgenannten Lösungsmittel muss *unbedingt* durchgeführt werden, wenn man von unliebsamen Ueberraschungen verschont bleiben will.

Das Lösungsmittel mit dem gelösten Extrakt, wie es nach dem Extraktionsvorgang anfällt, wird zuerst mit etwas Natriumsulfat durchgeschüttelt und

durch ein Faltenfilter filtriert. Sollte in den Verdampfungskolben trotz der Natriumsulfatschicht (in der Extraktionshülse) etwas Wasser abgeflossen sein, trennt man dieses vorgängig in einem Scheidetrichter ab oder dekantiert das Pentan ab. In einem 200 ml-Rundstehkolben wird das gesamte Lösungsmittel auf einem Wasserbade portionenweise abdestilliert und der Rückstand während einiger Minuten bei 105° getrocknet.

Ia. Reinigung mit Acetonitril

Zu dem Rückstand im Rundstehkolben gibt man mit einem Messzylinder 20 ml Acetonitril und stellt den Kolben erneut auf ein Wasserbad. Wenn das Lösungsmittel anfängt zu sieden, schwenkt man den Kolben so lange um, bis der gesamte Rückstand möglichst in Lösung gegangen ist. Dann wird der Kolben vom Wasserbade entfernt und so lange unter fliessendem kaltem Wasser abgekühlt, bis der Inhalt ungefähr die Wassertemperatur angenommen hat. Ist dies der Fall, filtriert man die Lösung durch ein Faltenfilter in einen zweiten 200 ml-Rundstehkolben. In den ersten Kolben gibt man weitere 15 ml Acetonitril, stellt wiederum auf das Wasserbad, kühlt ab und filtriert. Der ganze Vorgang wird anschliessend nochmals mit weiteren 15 ml und dann 10 ml Acetonitril wiederholt. Nach der Filtration der letzten 10 ml wird das gesamte Acetonitrilfiltrat in einem Oel- oder Glycerinbad destilliert und der Rückstand einige Minuten bei 105° getrocknet.

IIa. Reinigung durch Ausfrieren in einer Kältebadmischung von Trockeneis und Isopropylalkohol

Diese Reinigung ist hauptsächlich dann anzuwenden, wenn viele Pflanzenwachse zugegen sind. Eine dementsprechende Vorprüfung kann folgendermassen gemacht werden:

Die von der Extraktion anfallende Lösung wird nur auf 5—10 ml konzentriert (anstatt alles Lösungsmittel abzudestillieren). Den Kolben mit diesen 5—10 ml kühlt man unter fliessendem, kaltem Wasser ab. Scheidet sich dabei ein grösserer voluminöser Niederschlag ab, sind wesentliche Mengen an Wachsen zugegen, die nach der folgenden Methode abzutrennen sind:

Die Extraktlösung wird mit Pentan auf 20 ml verdünnt und in ein Kältebad, bestehend aus einer Trockeneis-Isopropylalkohol-Mischung, gestellt. Gleichzeitig stellt man in das Kältebad einen mit ca. 50 ml Pentan gefüllten Erlenmeyerkolben. Hat die Extraktlösung eine Temperatur von — 30° (Kontrolle mit einem Thermometer) erreicht, wird sie durch ein Faltenfilter, das zuvor mit ebenfalls auf — 30° gekühltem Pentan ausgewaschen wurde, filtriert. Der Kolben, in dem die Extraktlösung abgekühlt wurde, wird dreimal mit je 5—10 ml gekühlten Pentans nachgespült und dieses Pentan ebenfalls filtriert. Das gesamte Filtrat wird anschliessend auf dem Wasserbad abdestilliert.

Bemerkungen zu den Filtrationen sub Ia und IIa:

Hat sich in dem Faltenfilter ein voluminöser Niederschlag angesammelt (wie dies zum Beispiel bei einem Apfelextrakt der Fall ist), ist nach dem Passieren der letzten Lösungsmittelanteile das Faltenfilter gegen eine Seite hin mit einer Pincette so zusammenzulegen, dass durch Anpressen des Filters mit einem breiten Spatel an die Glaswand des Trichters die Hauptmenge des vom Niederschlag noch eingeschlossenen Lösungsmittels ebenfalls zum Abfliessen gebracht wird.

Der unter IIa angegebene Vorgang soll dabei möglichst schnell geschehen, um eine grössere Erwärmung bei dem Filtrationsprozess durch längeres Stehen zu vermeiden.

IIIa. Reinigung durch Ausschütteln mit rauchender konzentrierter Schwefelsäure

Den Rückstand (Extraktionsrückstand oder Rückstand der Reinigung Ia oder IIa) löst man durch Erwärmen auf einem Wasserbad in insgesamt 300 ml Pentan, welche in einen 1000 ml-Scheidetrichter gegossen werden. Man kühlt ab. Dazu lässt man langsam unter ständigem Umschwenken des Trichters 40 ml der Säuremischung zufliessen, wobei sich das Pentan höchstens ganz wenig erwärmen soll (Kontrolle durch Anfassen des Trichters mit der Hand). Nun verschliesst man den Trichter durch Aufsetzen eines eingeschliffenen Glasstöpsels (keine Gummistopfen verwenden) und schüttelt während 5 Minuten kräftig durch. Um eine saubere Trennung der Schichten zu erhalten, lässt man den Trichter mehrere Stunden stehen (am besten über Nacht). Bei extraktarmen Rückständen kann die Schichtentrennung innerhalb kurzer Zeit erfolgen, was natürlich ein sofortiges Weiterarbeiten erlaubt. Nach erfolgter Trennung der beiden Phasen wird die untere, meist braunrot verfärbte Schicht scharf abgetrennt und die überstehende Pentanlösung zweimal mit 50 ml 2%iger Natronlauge und zweimal mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen. Dann schüttelt man die Pentanlösung noch mit etwas Natriumsulfat durch, filtriert und destilliert das Lösungsmittel auf dem Wasserbade ab.

IVa. Doppelte Säurebehandlung

Konzentrierte, stark eiweisshaltige Extrakte von mengenmässig grossen Proben reagieren so heftig mit der Säure, dass eine Modifikation der Methode IIIa nötig ist.

Der Extrakt wird mit Pentan wiederum auf ein Volumen von 300 ml gebracht und in ein Kältebad von Trockeneis-Isopropylalkohol gestellt. Dann fügt man langsam und tropfenweise 30 ml Säuremischung zu, was einen Zeitraum von ungefähr 5 Minuten beanspruchen soll, und rührt mit Hilfe eines Rührwerkes dauernd um. Die Mischung wird dann vom Kühlbad entfernt und so lange stehen gelassen, bis sie ungefähr die Raumtemperatur angenommen

hat. Dann wird die Lösung in einen 1000 ml-Scheidetrichter umgefüllt. Die Säure wird nach ca. 8 Stunden abgelassen und die Pentanschicht mit weiteren 40 ml Säure behandelt, wie es in der Methode IIIa beschrieben ist.

Va. Reinigung durch Säulenchromatographie mit Pentan und Extraktion der Wirkstoffe mit Aether

Das von uns verwendete Chromatographierohr ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

Zusätzlich wird noch eine Stickstoffbombe mit Reduzierventil benötigt.

Ein mit einem Wassermantel versehenes Chromatographierohr wird ca. 5 cm hoch mit Aluminiumoxyd beschickt, mit Pentan bis zu $^3/_4$ gefüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und so lange hin und her geschüttelt, bis alles Oxyd völlig suspendiert ist. Anschliessend verbindet man den Kühlmantel mit einer Wasserleitung und sorgt durch eine ständige Wasserzirkulation für eine gute Kühlung des eigentlichen Chromatographierohres. Dann presst man das Pentan nach Oeffnung des Glashahnens mit Hilfe von Stickstoffgas so weit durch die Säule hindurch, bis das Lösungsmittel noch einige Millimeter über der Oberfläche des Aluminiumoxyds steht. Den Rückstand der Acetonitrilbehandlung Ia oder einer der Säurebehandlungen IIIa oder IVa löst man in 20 ml Pentan, nötigenfalls durch schwaches Erwärmen, und giesst dieses vorsichtig, ohne das Aluminiumoxyd dabei aufzuwirbeln, in das Rohr. Nach der erneuten Verbindung des Rohres mit der Stickstoffbombe presst man diese 20 ml bei einem Druck von max. 0,1 Atm. so weit durch die Säule, bis das Lösungsmittel noch ca. 1—2 mm über dem Aluminiumoxyd steht. Es werden zweimal je weitere 25 ml Pentan, mit denen zuvor der Kolben, der den Rückstand enthielt, ausgespült wurde, auf dieselbe Art durch die Säule gepresst. Nach Zugabe der letzten 25 ml lässt man die Säule dann völlig auslaufen.

Nun werden 50 ml Aether in die Säule gegeben, diese erneut mit einem Gummistopfen verschlossen und so lange geschüttelt, bis alles Aluminiumoxyd suspendiert ist. Dann wird der Aether mit einem Druck von max. 0,1 Atm. mit Hilfe des Stickstoffgases durch die Säule bis auf deren Oberfläche herab gepresst. Nach Aufgiessen von weiteren 50 ml Aether und Herstellung der Druckverbindung lässt man die Säule auslaufen.

Die Aetherfiltrate werden in einem 200 ml-Rundstehkolben gesammelt und auf dem Wasserbade abdestilliert.

Der nach den angegebenen Reinigungsverfahren behandelte Extrakt ist nun bereit, um für die Papierchromatographie verwendet zu werden.

Bemerkungen zu den Reinigungsverfahren

Ein starres Schema über die von Fall zu Fall anzuwendenden Reinigungsverfahren möchten wir nicht geben. Die besten Resultate werden sicher dann erzielt, wenn alle Stufen der Reinigung (und zwar sowohl bei den chlorierten

Kohlenwasserstoffen als auch bei den Phosphorsäureesterverbindungen) in der Reihenfolge, wie sie in der vorliegenden Arbeit angegeben sind, durchlaufen werden. Besonders dem Ungeübten möchten wir vorschlagen, sich an dieses Rezept zu halten, da es für denjenigen, der auf diesem Gebiete noch keine Erfahrung hat, nicht leicht sein dürfte, auf Grund eines erhaltenen Extraktes abzuschätzen, wie viele und welche der Reinigungsverfahren angewendet werden müssen.

Immerhin kann man sich an eine einfache Faustregel halten, die aussagt: Je mehr Extraktrückstand vorhanden, um so mehr muss gereinigt werden. Ferner sind immer dann alle Reinigungsverfahren anzuwenden, wenn ein Rückstand reich an Fetten, Wachsen, Oelen oder Lipoiden ist, da gerade alle diese Substanzen eine stark störende Wirkung auf die Papierchromatographie ausüben.

Hat man erst einmal einige Versuche vorgenommen, wird man auch bald in der Lage sein, die zweckmässigsten Reinigungsverfahren selbst zusammenstellen zu können. Kommt man dabei zum Schlusse, diese oder jene Stufe wegzulassen, bedenke man doch immer, dass je reiner der Extrakt ist, um so sauberer auch das Papierchromatogramm wird.

Trotz diesen zur Vorsicht mahnenden Ueberlegungen möchten wir zum Schluss erwähnen, dass verschiedene Extrakte auch von uns nur mit einzelnen Reinigungsmethoden aufgearbeitet und dennoch gute Resultate erzielt worden sind. So wurde zum Beispiel ein Kartoffelextrakt, der auf chlorierte Kohlenwasserstoffe geprüft wurde, nur mit Acetonitril vorgereinigt und hierauf noch der Säulenchromatographie unterworfen.

Zusätzliche Versuche im Zusammenhang mit der Reinigung der Extrakte

1.

Ueber das Verhalten der Reinsubstanzen bei der Abkühlung wurden folgende Versuche durchgeführt:

Es wurden jeweilen 10 mg Reinsubstanz DDT, Dieldrin, Aldrin und Hexachlorcyclohexan in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben in 20 ml Pentan gelöst und die Kolben in ein Kältebad, ebenfalls aus einer Trockeneis-Isopropylalkohol-Mischung bestehend, gestellt. Nachdem die Lösungen eine Temperatur von — 35° angenommen hatten, wurden die Erlenmeyerkolben aus dem Kältebad entfernt und daraufhin beobachtet, ob eventuell eine Ausflockung bzw. ein Niederschlag ausgefallener Substanzen sich gebildet habe. Bei allen vier Lösungen konnte jedoch nur eine schwache Opaleszenz festgestellt werden, die sich auch mittels Filtration durch ein Faltenfilter nicht beseitigen liess.

Auf Grund dieses Versuches ist also eine Ausflockung der Reinsubstanzen bei einer auf — 30° abzukühlenden Pentanlösung, wie dies in dem Reinigungsverfahren vorgeschrieben ist, nicht zu befürchten.

2.

Dass die Reinigung mit Acetonitril in gewissen Fällen, so vor allem bei wachsreichen Extrakten, bedeutend weniger wirksam ist als die Reinigung durch Ausfrieren in einem Kältebad von — 30°, mag aus folgendem Beispiel ersichtlich sein:

Der Reinigungseffekt der beiden Methoden wurde an Hand von zwei Apfelextrakten verglichen, von denen der eine mit Acetonitril, der andere durch Ausfrieren bei — 30° gereinigt wurde.

Extrakt A: 414 mg	Extrakt B: 490 mg
Rückstand nach der Reinigung mit Acetonitril: 233 mg oder 56,3 % des ursprünglichen Gewichtes.	Rückstand nach der Reinigung durch Ausfrieren: 208 mg oder 42,6 % des ursprünglichen Gewichtes.

Die Ausfrierung ergibt somit einen um rund 14 % grösseren Reinigungseffekt gegenüber der Acetonitril-Behandlung.

Der Rückstand A von 233 mg wurde alsdann ebenfalls noch ausgefroren, wobei der neue Rückstand nur noch 180 mg betrug, was bezogen auf den Ausgangsextrakt 43,5 % entspricht und ungefähr den gleichen Reinigungseffekt ergibt, wie er nach B erhalten wurde.

Die beiden Rückstände (der filtrierten Lösungen) A und B nach dem ersten Ausfrieren wurden anschliessend wieder in 20 ml Pentan gelöst und auf — 30° abgekühlt. Dabei stellte sich nochmals eine Trübung der Lösungen sowie eine geringe Ausflockung ein.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass es bei stark wachshaltigen Extrakten (wie z.B. Apfelextrakten) sogar vorteilhaft sein dürfte, die Ausfrierung ein zweites Mal zu wiederholen, um möglichst viel dieser unerwünschten Begleitsubstanzen zu entfernen.

Im Falle einer zweiten Ausfrierung ist der Rückstand der ersten allerdings nur noch in 10 ml Pentan zu lösen, auf — 30° abzukühlen und analog wie schon beschrieben weiterzubehandeln. Zum Nachwaschen sollen jeweilen bloss 3—5 ml Pentan (— 30°) verwendet werden.

B. Aufarbeitung der Extraktrückstände für den Nachweis von Phosphorsäureesterverbindungen

Zur Aufarbeitung von phosphorsäureesterhaltigen Rohextrakten wurde eine Methodik entwickelt, die es erlaubt, je nach Natur und Menge der unerwünschten Extraktstoffe, die eine oder andere Stufe wegzulassen. Es ist nämlich zur Vermeidung von durch die Methode bedingten Substanzverlusten sehr wünschenswert, die ganze Aufarbeitung eines Extraktes auf ein Minimum an

Arbeitsgängen zu beschränken. Der am Schluss übrig bleibende Extrakt soll aber auch hier so rein sein, dass er mittels Papierchromatographie einwandfrei bestimmt werden kann.

Reagentien:

1. Die Lösungsmittel *Aether, Acetonitril, Pentan sowie Aluminiumoxyd* und *wasserfreies Natriumsulfat* wurden nach der unter A angegebenen Methode vorbereitet.
2. *Reine konzentrierte Salzsäure*, 25 %.

Ib. Reinigung mit Acetonitril

Die Reinigung mit Acetonitril wird wie bereits unter Ia beschrieben vorgenommen.

IIb. Reinigung durch Ausschütteln mit einem Zweiphasensystem Acetonitril-Pentan

In einen 500 ml-Scheidetrichter werden 250 ml Pentan und in einen 250 ml-Scheidetrichter 100 ml Pentan eingefüllt. Das nach Ib erhaltene und auf 60 ml ergänzte Acetonitrilfiltrat wird in den 250 ml Pentan enthaltenden Scheidetrichter gegeben und etwa 5 Minuten kräftig geschüttelt. Nach Abtrennen der Schichten lässt man die untere Phase (Acetonitril) in den 100 ml Pentan enthaltenden Scheidetrichter ablaufen und schüttelt diesen noch einmal 5 Minuten kräftig durch. Das Acetonitril lässt man nach deutlicher Abtrennung der Schichten in einen 200 ml-Erlenmeyerkolben ablaufen, der bei 150 ml eine Marke trägt.

Bei diesem Vorgang gehen vor allem die pflanzlichen Farbstoffe in das Pentan über. Nach *Jones* und *Riddick* [8]) extrahiert Acetonitril in diesem Zweiphasensystem selektiv organische Insektizide aus einem mit ihm «unmischbaren» Lösungsmittel, sofern das Acetonitril gegenüber dem Insektizid ein besseres Lösungsvermögen aufweist als das andere Lösungsmittel.

Um die im Pentan noch enthaltene Wirksubstanz ebenfalls zu erhalten, werden in den 250 ml Pentan enthaltenden Scheidetrichter erneut 30 ml Acetonitril gegeben und kräftig ausgeschüttelt. Nach Trennung der Schichten lässt man das Acetonitril in den 100 ml Pentan enthaltenden Scheidetrichter ablaufen, schüttelt diesen wiederum aus, lässt die Schichten abtrennen und vereinigt die Acetonitrilfraktionen in dem 200 ml-Erlenmeyerkolben. Das Nachwaschen mit 30 ml Acetonitril muss noch zweimal wiederholt werden, um alle Wirksubstanz möglichst gut aus dem Pentan zu extrahieren.

In den Kolben mit den vereinigten Acetonitrilfraktionen, die noch etwas Pentan enthalten, was aus dem mehr als 150 ml betragenden Volumen hervorgeht, gibt man etwas Bimsstein und dampft das darin enthaltene Pentan auf dem Wasserbade ab, bis die Flüssigkeitsoberfläche die Marke 150 ml erreicht.

IIIb. Reinigung der vereinigten Acetonitrilfraktionen durch Säulenchromatographie

Vorbereitung der Säule: In ein Chromatographierohr ohne Filterplatte (Pyrex, 280 mm lang, Innendurchmesser 20 mm) füllt man nach Einbringen eines kleinen Wattebausches unten ins Rohr etwa 20—30 ml Acetonitril ein und gibt dann langsam in feinem Strahl 10—15 g Aluminiumoxyd zu. Dabei ist darauf zu achten, dass das Aluminiumoxyd möglichst nicht an den Glaswänden des Rohres hängen bleibt, sondern sich fein im Acetonitril verteilt. Sollte doch etwas Aluminiumoxyd an den Wänden haften bleiben, so ist es mit Acetonitril herunterzuwaschen. Ferner muss beim Einfüllen des Oxydes peinlichst vermieden werden, dass sich in der entstehenden Schicht Luftblasen oder Kanäle bilden, welche die Chromatographie stören. Dann lässt man das überschüssige Acetonitril bis 1 mm über die Aluminiumoxydoberfläche ablaufen.

Chromatographie: Auf die so präparierte Säule gibt man nun das abgekühlte Acetonitril aus dem Erlenmeyerkolben und lässt es langsam durchtropfen. Die noch vorhandenen pflanzlichen Farbstoffe, sowie Oel- oder Fettanteile bleiben am Aluminiumoxyd hängen. Es muss bei diesem Vorgang vermieden werden, dass die Säule «trocken» läuft. Das Acetonitril wird in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben aufgefangen. Sobald alles extrakthaltige Acetonitril durchgelaufen ist, d.h. wenn dessen Oberfläche diejenige des Säuleninhaltes erreicht, wird die Säule mit 50 ml Acetonitril nachgewaschen und alles Acetonitril im Erlenmeyerkolben aufgefangen.

IVb. Ueberführung der im Acetonitril gelösten Insektizide in Pentan

In einen 1000 ml-Scheidetrichter gibt man 500 ml destilliertes Wasser, 10 ml konzentrierte Salzsäure, das extrakthaltige Acetonitril aus IIIb und mischt gut durch. Dann fügt man 100 ml Pentan zu und schüttelt kräftig durch. Infolge der besseren Löslichkeit der Insektizide in Pentan im Vergleich zur «Acetonitril-Wasser-Säure-Mischung» gehen diese in die Pentanphase über. Nach Abtrennen der Schichten lässt man die wässerige Phase in einen zweiten 1000 ml-Scheidetrichter laufen und schüttelt nochmals mit 100 ml Pentan aus. Die beiden Pentanfraktionen werden vereinigt, mit etwas wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert.

Vb. Reinigung mit Säulenchromatographie und Pentan und Extraktion der Wirkstoffe mit Aether

Der Rückstand aus IVb wird nach der in Va beschriebenen Methode chromatographiert.

Zusätzliche Versuche

Zur Abklärung der Frage, ob die vorstehend beschriebene Aufarbeitungsmethode auch für eine quantitative Bestimmung geeignet sei, wurden spezielle Versuche durchgeführt. Die verschiedenen Stufen der Methode wurden einzeln

mit je 50 Gamma Substanz geprüft, wobei die im Arbeitsgang verbleibenden und die ausscheidenden Fraktionen abdestilliert und der Rückstand untersucht wurde (Pentan in IIb und Vb, Acetonitril-Wasser-Säure-Mischung in IVb). Es zeigte sich dabei, dass sich in den letztgenannten Lösungsmitteln immer noch gewisse Mengen der Insektizide befanden.

Ebenso blieb nach der Chromatographie mit Acetonitril in IIIb noch Substanz in der Säule hängen, die nur sehr schwer völlig auszuwaschen war, eine Schwierigkeit, auf die auch *Mattson* et al.[11]) hinweisen. Wollte man diese Aufarbeitungsmethode quantitativ auswerten, so müsste man Verluste in Kauf nehmen, deren Menge ungewiss ist, besonders beim Arbeiten mit grösseren Substanzmengen. Auf Grund unserer Erfahrungen liegt ein günstiger Konzentrationsbereich für diese Methode bei etwa 100 Gamma Wirksubstanz. Bei grösseren Mengen (10—100 mal mehr) verändert sich vor allem das Verhalten an der Aluminiumoxydsäule in IIIb und Vb, und es gehen grössere Mengen Substanz verloren, die prozentual nicht den Verlusten bei geringen Mengen entsprechen.

Diese Tatsachen lassen eine quantitative Auswertung der mit unserer Methodik gewonnenen Resultate nur im Sinne einer Abschätzung der Grössenordnung zu.

Zur qualitativen Aufarbeitung mit dem Ziel der papierchromatographischen Substanzbestimmung eignet sich die Methode gut, da die papierchromatographische Bestimmung hochempfindlich ist und deshalb auch einige Verluste an Substanz in Kauf genommen werden können.

Apparatur zum Auftragen von Substanzlösungen auf Papierchromatogramme (Abbildungen 5, 6 und 7)

Der Grund, warum eine sogenannte Auftragungsapparatur geschaffen wurde, geschah aus folgenden Ueberlegungen:

Die gereinigten Extrakte der verschiedenen Pflanzenmaterialien sind nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel jeweils auf eine relativ grosse Oberfläche verteilt. Da aber zum Auftragen auf ein Papierchromatogramm nur sehr kleine Flüssigkeitsmengen von rund 0,01 ml oder weniger angewendet werden dürfen, weil der aufgetragene Flecken wegen des folgenden Trennungseffektes nicht grösser als ca. 10 mm im Durchmesser sein soll, genügen diese Mengen an Lösungsmittel keineswegs, um den gesamten Rückstand in Lösung zu bringen. Da zum Lösen der Extrakte in unserem Falle ferner nur leichtflüchtige organische Lösungsmittel in Frage kommen, sind diese in geringen Mengen meist wieder verdunstet, bevor sie überhaupt zu Papier gebracht worden sind.

Man ist also darauf angewiesen, die Extrakte in einer bedeutend grösseren Menge Lösungsmittel, als dies für die Papierchromatographie üblicherweise der Fall ist, zu lösen und auf den Filterpapierbogen aufzutragen. Dieser Umstand kann höchstens noch dadurch umgangen werden, dass man den Rückstand

portionenweise aufträgt, indem immer wieder kleine Mengen zum Lösen verwendet und diese dann nacheinander aufgetragen werden. Nach diesem Verfahren lassen sich aber Verluste, auch bei sorgfältigem Arbeiten, nicht ganz vermeiden, wobei noch zu bedenken ist, dass man es in den meisten Fällen sowieso nur mit sehr geringen Insektizidrückständen zu tun haben wird. Zudem ist das Verfahren mühsam und zeitraubend, besonders wenn immer wieder Extrakte auf Papierbogen aufgetragen werden müssen.

Aus diesen Ueberlegungen heraus sind wir dazu übergegangen, eine Auftragungsapparatur für relativ grosse Flüssigkeitsmengen zu schaffen.

Die Apparatur kann selbstverständlich nicht nur für den vorliegenden Fall Anwendung finden, sondern auch überall da gebraucht werden, wo die Auftragungsflüssigkeit mit der gelösten Substanz ein mehr oder weniger leichtflüchtiges organisches Medium darstellt, wie dies in vielen ähnlichen Belangen der Fall sein dürfte.

Ob und wie weit diese Apparatur auch für die quantitative Papierchromatographie Verwendung finden kann, müsste im einzelnen Falle noch näher abgeklärt werden.

Uebrigens finden sich auch in dem Einführungswerk von *F. Cramer* über die «Papierchromatographie» (Verlag Chemie, Weinheim 1953) einige analoge Ueberlegungen, wie wir sie ebenfalls gemacht haben.

Der Autor schreibt:

> «Wenn eine Substanzlösung zu verdünnt ist, kann man sie auf dem Papier konzentrieren, indem man in zeitlichen Abständen mehrere Tropfen aufbringt und zwischendurch immer wieder verdunsten lässt.
> Besonders beim quantitativen Nachweis ist es lästig, eine verdünnte Lösung von wenigen ml vor dem Aufbringen noch eindampfen zu müssen. Der einfachste Weg, das Konzentrieren und Aufbringen zu vereinen, ist folgender: man lässt die Lösung aus einer feinen Pipette nach und nach auf das Papier tropfen und bläst gleichzeitig mit einem Heisslufttrockner (Föhn) an.»

Ganz so einfach liess sich in unserem Falle der Auftragungsvorgang nicht gestalten, denn die fein ausgezogene Pipettenspitze war bald einmal verstopft, sei es durch kleinste Verunreinigungen, z.B. in Form eines festen Partikelchens oder etwas ungelöster Substanz (Wachsrückstände von Pflanzenextrakten), sei es, dass durch das langsame Auslaufen das Lösungsmittel zu rasch verdunstete und bereits ein Teil der gelösten Substanz an der Auslaufspitze «auskristallisierte».

Aus diesen Gründen wählten wir ein gewissermassen kontinuierliches System, d.h. ein System, bei dem das Lösungsmittel ohne irgendwelche grössere Unterbrechung (z.B. Tropfenbildung am Pipettenende) auf das Papier fliesst. Bei der gewählten Anordnung kann man ruhig eine Pipette mit genügend grosser Auslaufspitze verwenden, da die Auslaufgeschwindigkeit ja nicht durch den Durchmesser der Spitze bestimmt wird. So muss die Spitze nicht möglichst dünn ausgezogen sein und kann daher praktisch nicht mehr verstopfen.

Der Verdunstungsvorgang findet zur Hauptsache nur gerade da auf dem Papier statt, wo die erwärmte Stelle ist. Durch die getroffene Vorrichtung wird eine umgrenzte Kreisfläche von ca. 8 mm Durchmesser geheizt, was ungefähr der idealen Grösse des aufzubringenden Fleckens entspricht. Gleichzeitig lässt sich durch die unten angebrachte Beleuchtungseinrichtung das Auslaufen des Lösungsmittels auf dem Papier genau verfolgen. Das Blasen mit einem Heisslufttrockner (Föhn) hatte dagegen meistens ein Verblasen bzw. ein Verspritzen der Tropfen auf dem ganzen Papier zur Folge und war zudem mit dem Nachteil behaftet, dass weder Blasdruck noch Temperatur geregelt werden konnten.

Erklärungen zu den Abbildungen 5 und 6

Abbildung 5: Papierbogen mit dem aufgelegten Sperrholzrahmen und den beiden mit Eisenpulver gefüllten Bechergläsern zum Beschweren. Auf dem Papier aufliegend die Kapillare, die von der Ausflussöffnung der Pipette leicht berührt wird. Die Pipette selbst sowie die beiden Hahnen (12 und 13 in Abbildung 7) sind an einem separaten Stativ befestigt, was ein leichtes Entfernen der ersteren für das Aufsaugen der aufzutragenden Flüssigkeit ermöglicht. Für den Auftragungsvorgang wird das Stativ mit den vorderen beiden «Füssen» direkt auf das Holzgehäuse und mit dem hinteren «Fuss» beispielsweise auf einen entsprechend hohen Holzblock aufgelegt. Links oben das Alkoholmanometer, bestehend aus dem U-förmig gebogenen Glasrohr und dem Gummiverbindungsschlauch zu dem Glasrohr mit dem durchbohrten Gummistopfen. Die Millimeterskala besteht aus einem Stück weissen Karton, der mit Hilfe zweier gleicher Gummibändchen am Glasrohr befestigt ist.

Abbildung 6: Einblick in das Innere des Holzgehäuses: links unten die Nähmaschinenlampe mit dem darüber rechtwinklig abgebogenen Pyrexglasrohr, rechts unten der Bunsenbrenner mit Aufsatz, darüber das mit einer Stativklammer befestigte und von einem Drahtnetz umgebene Pyrexrohr, das zudem am Befestigungspunkt der Klammer mit etwas Asbestschnur umwickelt ist. Die in der oberen rechten Hälfte sichtbare, schief befestigte Platte stellt eine Asbestplatte dar, die zur Ableitung der vom Bunsenbrenner erzeugten Wärme dient. Ferner sind alle Holzwände der rechten Gehäuseinnenseite (von hinten gesehen) mit Asbestplatten ausgelegt. Links oben ist das ebenfalls mit einer Stativklammer befestigte und in die Oeffnung der Glasplatte einmündende zweite, kurze Pyrexrohr sichtbar.

Beschreibung, Bedienung und Testierung der Auftragungsapparatur (Abbildungen 7—9)

1. Druckeinstellung

Zuerst wird der Hahn des Wasserstrahlgebläses aufgedreht und mit Hilfe des Quetschhahnens am Wasserablauf des Gebläses (oder auch des Wasserhahnens selbst) und des Alkoholmanometers der gewünschte Druck eingestellt. Die Ablesung des Druckes erfolgt an der in Millimeter eingeteilten Skala (16) nach Aufsetzen des unten mit einem durchbohrten Gummistopfen (17) versehe-

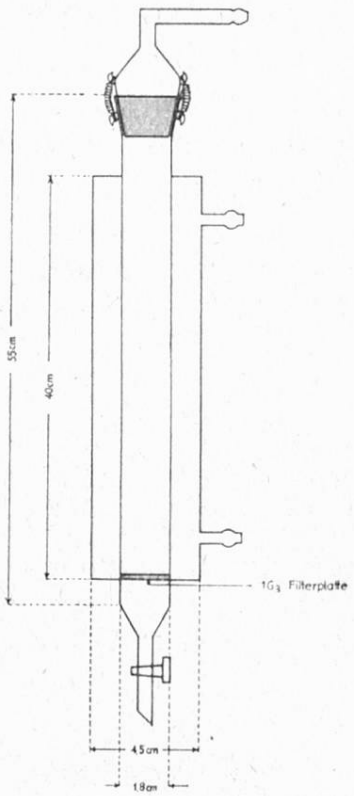


Abbildung 4
Chromatographie-Rohr

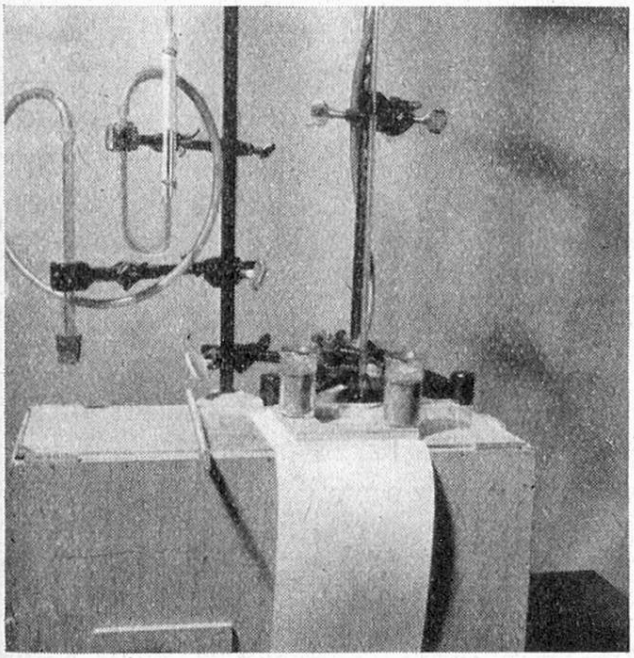


Abbildung 5

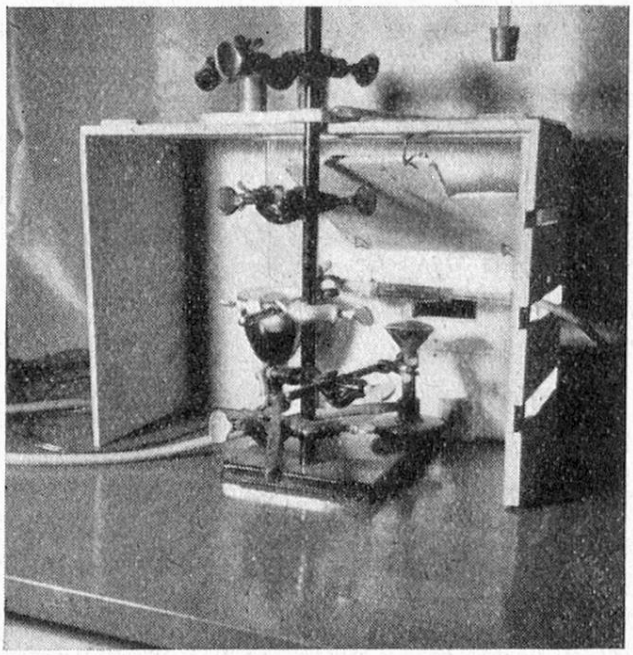


Abbildung 6

nen Glasrohres (15) auf die Oeffnung in der Glasplatte (8). Dann wird der mit einem Aufsatz versehene Bunsenbrenner (4) angezündet (das Zündholz kann durch die an der Vorderseite des Holzgehäuses angebrachte Oeffnung eingeführt werden). Die zu beheizende Strecke des Glasrohres (1) ist zum Zwecke einer besseren Wärmeverteilung mit einem Drahtnetz (2) umgeben; in das Innere des Glasrohres ist ein aufgerolltes Kupferdrahtnetz (3) eingelegt, um der passierenden Luft einen gewissen Widerstand entgegenzusetzen und damit für eine bessere Erwärmung zu sorgen.

2. Temperaturmessung

In den oberen Teil des Glasrohres (5) fügt man genau in die Mitte der Oeffnung ein Thermometer ein, wobei gerade nur der mit der Hauptmenge des Quecksilbers gefüllte Teil sich im Rohr befinden soll. Durch Regulierung des Brenners (4) stellt man die gewünschte Temperatur ein, wobei zu berücksichtigen ist, dass eine Temperaturkonstanz erst nach einigen Minuten erreicht wird. Nun wird nochmals der Druck mit dem Alkoholmanometer kontrolliert.

3. Auftragungsvorgang

Man legt den Filterpapierbogen so auf das Loch in der Glasplatte (8), dass sich der Auftragungspunkt genau in der Mitte über dieser Oeffnung befindet. Durch Einschalten der Lampe (6) (kleine Nähmaschinenlampe) erfolgt die Beleuchtung des Papierbogens derart, dass sich die Oeffnung der Glasplatte auf dem Papier durch eine Schattenwirkung genau abzeichnet und somit zugleich die Zentrierung des Auftragungspunktes erleichtert. Jetzt legt man den kleinen Sperrholzrahmen (9) auf das Papier, so dass der Auftragungspunkt ungefähr in die Mitte der quadratischen Oeffnung des Rahmens zu liegen kommt, und beschwert diesen gleichzeitig mit zwei Gewichten. (Als Gewichte wurden zwei 25 ml-Bechergläser verwendet, die mit Eisenpulver gefüllt und oben mit einer Paraffinschicht abgeschlossen wurden.) Die Kapillare (10) wird dann mit dem vorne zugeschmolzenen und leicht abgebogenen Teil (Abb. 9b) auf den Auftragungspunkt gelegt, und zwar so, dass sie nur schwach gegen das Papier drückt und letzteres durch den Luftdruck etwas gehoben werden kann (siehe Abb. 9a). Die Kapillare selbst ist mit Hilfe eines Korkes (10a), der in der Mitte entzweigeschnitten und zur Führung des Glasröhrchens leicht angekerbt ist, mit einer Stativklammer befestigt.

Das Füllen der Pipette (11, Normalpräzisionspipette von 1,00 ml Inhalt) geschieht durch Aufsaugen der aufzutragenden Flüssigkeit, mit Hilfe eines Gummischlauches (14) bis zur Marke 0, wobei die Hahnen (12a = Glashahn und 13a = Regulierhahn) geöffnet sein müssen. Hat die Flüssigkeit die Marke 0 erreicht, hebt man die Pipette aus der Flüssigkeit heraus und saugt noch etwas weiter, so dass unten in der Pipette ein kleiner, ca. 1—2 cm hoher flüssigkeitsfreier Raum entsteht. Dann schliesst man zuerst den Glashahnen (12a) und anschliessend den Regulierhahnen (13a).

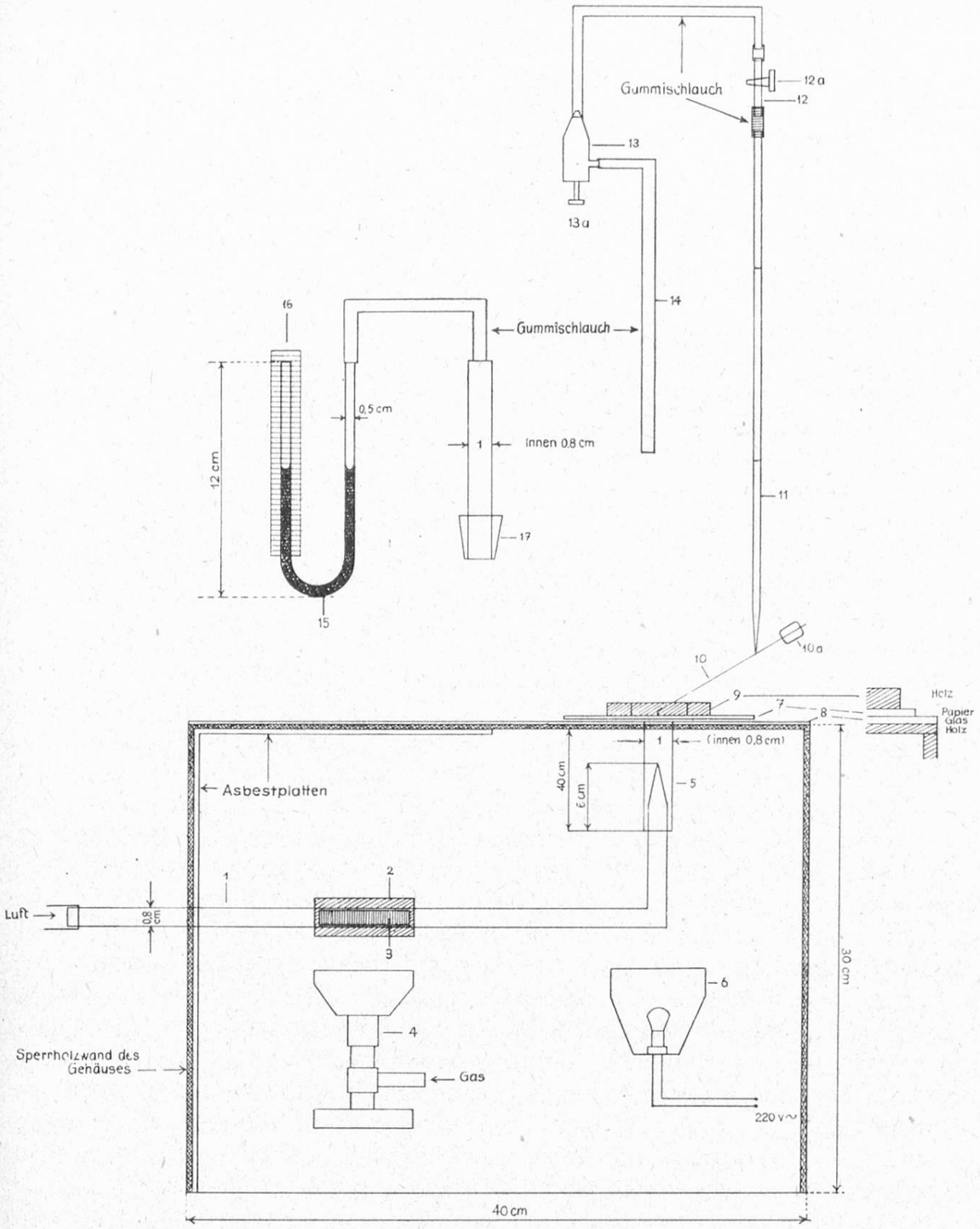


Abbildung 7
Auftragungs-Apparatur

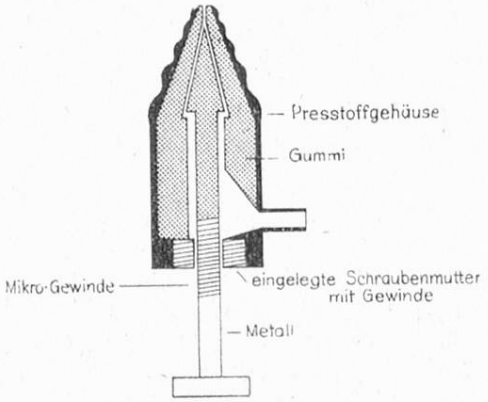


Abbildung 8
Luftregler HW-1
Lieferant: Martin Jaeger, Vésenaz (Genève)

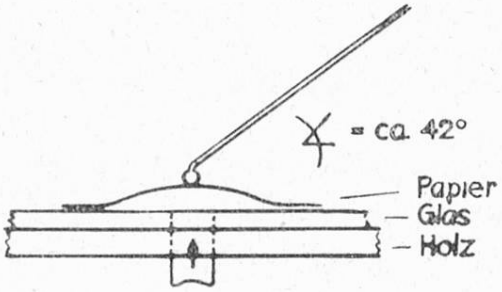


Abbildung 9a

Abbildung 9b

Nun bringt man die Pipette mit ihrer Spitze ganz leicht in Berührung mit der Kapillare (10), öffnet den Glashahnen (12a) und dann vorsichtig den Regulierhahnen (13a), so dass die Flüssigkeit wieder langsam auszulaufen beginnt und der Kapillare entlang bis zum Papier fliesst. (Der flüssigkeitsfreie Raum unten in der Pipette dient als Sicherheitsmassnahme gegen ein plötzliches starkes Auslaufen der Flüssigkeit bei zu schnell geöffnetem Regulierhahnen.) Durch das leicht kugelförmige Ende der Kapillare (siehe Abb. 9b) geschieht das Aufsaugen der Flüssigkeit durch das Papier nicht streng kontinuierlich, sondern gewissermassen «tropfenweise», indem sich die Flüssigkeit zu einem immer grösser werdenden Tropfen ansammelt, um dann, bei einer bestimmten Tropfengrösse, wieder vom Papier aufgesaugt zu werden. Die Fliessgeschwindigkeit soll so reguliert werden, dass, sobald der aufgesogene Tropfen verdunstet ist, der nächstfolgende vom Papier aufgenommen wird.

Hat man die Apparatur nach der vorgeschriebenen Methode eingestellt, so kann sich der Auftragungsvorgang ohne weitere Ueberwachung abwickeln, bis die gewünschte Menge Substanz bzw. Flüssigkeit aufgetragen ist. Wenn dies der Fall ist, so kann durch Schliessen der beiden Hahnen der Auftragungsvorgang unterbrochen werden.

Durch Verschiebung des Papieres kann der nächstfolgende Auftragungspunkt über die Oeffnung in der Glasplatte gebracht werden und nach dem Wechseln bzw. Erneuern der Flüssigkeit in der Pipette der ganze Vorgang wiederholt werden. (Es empfiehlt sich, vorgängig jedem neuen Auftragungsvorgang, die Kapillare und die Pipette zuerst mit einem Lösungsmittel zu reinigen.)

4. Testierung der Apparatur

A. für chlorierte Kohlenwasserstoffe (DDT und HCH)

Vorgängig der Auftragung der einzelnen Extrakte soll die Einstellung der Apparatur mit Reinsubstanzen hinsichtlich Luftdruck und Temperatur in dem Sinne geprüft werden, dass bei einer möglichst kurzen Auftragungszeit durch den Auftragungsvorgang selbst keine oder höchstens nur sehr geringe Verluste entstehen. Dies bedingt wohl eine momentane Mehrarbeit, doch kann nachher die Apparatur jederzeit wieder so eingestellt werden, dass für die Auftragung der einzelnen Substanzen oder Substanzgemische die optimalen Bedingungen erzielt werden.

Für die Reinsubstanzen DDT und HCH (Hexachlorcyclohexan) wurde beispielsweise so vorgegangen, dass zuerst zwei Stammlösungen, enthaltend

a) 500 Gamma DDT + 500 Gamma HCH in 2 ml Aceton und

b) 100 Gamma DDT + 100 Gamma HCH in 1 ml Aceton

hergestellt wurden.

Von diesen Stammlösungen wurden abgestufte Mengen, nämlich von a 0,1, 0,2 und 0,3 ml, entsprechend je 25, 50 und 75 Gamma Substanz, von b 0,3, 0,5 und 0,7 ml, entsprechend je 30, 50 und 70 Gamma Substanz, jeweils bei verschiedenen Temperaturen und Druckverhältnissen aufgetragen, dann chromatographiert und entwickelt.

Dabei hat es sich gezeigt, dass die besten Resultate bei einer Temperatur von max. 45° und einem Druck, gemessen mit der Alkoholsäule, von 11—14 mm erreicht wurden. Unter diesen Bedingungen waren die nach dem Chromatographieren und Entwickeln entstandenen Flecken in ihrer Intensität praktisch ebenso deutlich wie die zum Vergleich mit einer Mikropipette aus konzentrierten Lösungen direkt, d.h. ohne Apparatur, aufgetragenen Substanzen. Bei der direkten Auftragung wurden von einer Stammlösung, die in 1 ml 10 mg DDT + 10 mg HCH enthielt, 0,003, 0,005 und 0,01 ml zu Papier gebracht, entsprechend je 30, 50 und 100 Gamma Reinsubstanz.

Die Unterschiede in der Intensität der entwickelten Flecken zwischen den aus den Stammlösungen a und b aufgetragenen Substanzen waren ebenfalls sehr geringfügig, wobei die Intensität der Flecken, herrührend von der Stammlösung a, etwas deutlicher war. In beiden Fällen liessen sich 25 Gamma noch sehr deutlich erkennen, so dass die Nachweisbarkeitsgrenze noch tiefer liegt (ungefähr bei 10 Gamma). Immerhin dürften beim Auftragen aus sehr ver-

dünnten Lösungen ganz kleine Verluste entstehen, die aber für den qualitativen Nachweis, wie er hier erbracht werden soll, keine Bedeutung haben.

B. für die Phosphorsäureesterverbindungen (Diazinon, Malathion und Parathion)

Die vorstehend erwähnten drei Phosphorsäureester wurden wiederum bei verschiedenen Temperaturen und Druckverhältnissen aufgetragen, wobei die Temperatur zwischen 40 und 54°, der Druck zwischen 10 und 14 mm Alkoholsäule variiert wurden. Zur Auftragung gelangten jeweils 10, 25 und 50 Gamma jeder einzelnen Substanz, gelöst in 1 ml Aceton. Dabei wurde so vorgegangen, dass alle drei 10-, alle drei 25- und alle drei 50-Gamma-Typen auf einen Startpunkt aufgetragen wurden. Auf den vierten Startpunkt wurden jeweils die drei Phosphorsäureester direkt, d.h. ohne Apparatur, aus konzentrierten Lösungen mit einer Mikropipette aufgetragen.

Nach dem Chromatographieren und Entwickeln der Flecken konnten folgende Merkmale festgestellt werden:

Keine Verluste der mit der Apparatur aufgetragenen drei Substanzen gegenüber den direkt aufgetragenen waren bei einer Temperatur von ca. 40—42° und einem Druck von 11—14 mm Alkoholsäule aufgetreten. Mit zunehmender Temperatur, unabhängig von dem eingestellten Druck, waren auch zunehmende Verluste zu bemerken, wobei diese aber äusserst geringfügig und praktisch nur für die Diazinonverbindung von Bedeutung waren.

Selbst bei der höchsten Auftragungstemperatur von 54° liessen sich 10 Gamma Diazinon nach der Entwicklung noch absolut eindeutig erkennen. Die 10-Gamma-Teste der Malathion- und der Parathionverbindung waren von einer solchen Intensität, dass bestimmt auch noch 5 Gamma der beiden Substanzen nachgewiesen werden können.

Die spätere Testierung einer weiteren Phosphorsäureesterverbindung, nämlich des Chlorthions, ergab ebenfalls bei 40—42° und 11—14 mm Druck (gemessen mit der Alkoholsäule) die besten Auftragungsbedingungen. Augenscheinliche Verluste waren auch hier selbst beim 10-Gamma-Test nicht festzustellen. Die Nachweisbarkeit von 5 Gamma kann mit Sicherheit immer noch angenommen werden.

A. Trennung und Identifizierung der chlorierten Kohlenwasserstoffverbindungen durch die Papierchromatographie

(Abbildungen 10 und 11)

I. Geräte und Glaswaren

1. Glastank 60×21×30 cm mit plangeschliffenem Rand und dazu passendem plangeschliffenem Glasdeckel, welcher in der Mitte ein Loch von 2 cm ⌀ besitzt.
2. 1 Pressglasschale (Photoschale 14×19 cm)
   3 Pressglasschalen 10×13 cm
   2 Glasstäbe 13 cm lang, ⌀ 0,8 cm

3. Einsatzgestell für Glastank aus Aluminium.
4. ca. 20 rostfreie Photoklammern (Lieferant Fa. Bittmann & Co., Basel).
5. Filterpapierbogen Whatman Nr. 1, zugeschnitten in Bogen von 47×12 cm. Die Bogen werden mit Bleistift in 4 Bahnen von 3 cm Breite unterteilt (später wurde die Unterteilung in 3 Bahnen von 4 cm Breite vorgenommen). Die Startlinie ist 7 cm vom Rand entfernt aufzutragen.
6. 1 Paar Gummihandschuhe.
7. 4 Spray-Flaschen für das Besprühen der Chromatogramme mit den Indikatorlösungen.
8. Stickstoffbombe (Inhalt 15 kg) mit Reduzierventil (Manometereinteilung: 0—250 kg/cm², 0—1,2 kg/cm²).
9. 2 Bogen Filterpapier Whatman Nr. 1 von 37×13,5 cm. Die eine Schmalseite der Bogen wird durch Anbringen von Kartonstreifen (3×13,5 cm) beidseitig des Papieres mit Hilfe von Heftklammern verstärkt. Die Bogen dienen zur Sättigung der Atmosphäre im Tank mit dem Lösungsmittel.

II. Reagentien

1. Stationäre Phase: Original Silicon DC 550 Fluid in Aether (7,5+92,5 v/v). Lieferant: Ad. Schmid's Erben, Effingerstrasse 17, Bern.
2. Bewegliche Phase (Fliessmittel): Aceton-Wasser-Mischung (75+25 v/v).
3. Reagentien zum Sichtbarmachen:
   a) 0,05n-Silbernitrat in Methanol
   b) Formaldehydlösung ca. 37 %
   c) 2n-KOH in Methanol
   d) HNO_3 conc. (25 %) + H_2O_2 (30 %), 1+1 v/v.
4. Standardlösungen der verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmittel (DDT[1],HCH[1], Dieldrin[2], Aldrin[2]) in Alkohol[1] oder Benzol[2] (je nach der Löslichkeit), enthaltend 10 mg Substanz in 1 ml.

III. Allgemeine Hinweise

Zum Nachweis bzw. zur Trennung und Identifizierung der einzelnen Insektizide werden die gereinigten Pflanzenextrakte (von Früchten, Gemüsen usw.) in Aceton gelöst und wie bereits beschrieben mit der Auftragungsapparatur auf einen zugeschnittenen Bogen Filterpapier Whatman Nr. 1 gebracht. Zugleich trägt man von den gewünschten Standardlösungen mit einer Mikropipette ebenfalls 25—75 Gamma oder mehr, je nach der Nachweisbarkeitsgrenze der einzelnen Substanzen, auf weitere Bahnen des gleichen Filterpapierbogens auf. Dabei ist es nicht unbedingt erforderlich, für jede einzelne Testsubstanz auch eine einzelne Bahn anzuwenden. Je nach dem Trennungseffekt durch das Chromatographieren können auch zwei (bzw. sogar 3 oder 4) Testsubstanzen bei demselben Startpunkt aufgetragen werden (beispielsweise lassen sich DDT und HCH nach der beschriebenen Methode ausgezeichnet trennen, übrigens auch Dieldrin und Aldrin).

Sind die Extrakte und Standardlösungen aufgetragen, so wird der Papierbogen folgendermassen mit der stationären Phase Silicon imprägniert:

100 ml derselben werden in eine Pressglasschale (10×13 cm) gegossen. An dem zu imprägnierenden Filterpapierbogen befestigt man oben und unten jeweilen in der Mitte eine Photoklammer. Der Bogen wird nun, indem man ihn an den beiden Photoklammern mit den Händen festhält, mit der oberen Seite voran relativ schnell durch die Lösung gezogen. Dies geschieht so weit, bis die Lösung noch ca. 2 cm von der Startlinie entfernt ist. Man wartet so lange, bis sich die Lösung allein bis zur Startlinie hinaufgesaugt hat (ohne dabei den Bogen zu bewegen) und zieht ihn dann in der entgegengesetzten Richtung durch die Lösung zurück. Ist der Aether vom Bogen verdunstet, wiederholt man den ganzen Vorgang analog, indem man diesmal aber die untere Seite voran in die Lösung einführt, bis letztere wiederum ca. 2 cm von der Startlinie entfernt ist usw. Nun lässt man den Bogen so lange an der Luft hängen, bis sämtlicher Aether völlig verdunstet ist.

Das Durchziehen des ganzen Bogens durch die Lösung darf deshalb nicht geschehen, weil sonst die aufgetragenen Substanzen durch den Aether herausgewaschen werden könnten (Abb. 10).

IV. Chromatographievorgang

a) Die grosse Pressglasschale wird zu ca. 3/4 mit dem Fliessmittel 2 (Aceton-Wasser-Mischung) gefüllt und auf den Boden des Aluminiumgestelles gebracht. Die beiden Filterpapierbogen von 37×13,5 cm werden durch das Fliessmittel gezogen und mit Hilfe von zwei Photoklammern (an den Kartonstreifen anzubringen) so an den Glasstäben aufgehängt, dass sie ca. 1 cm tief in das Fliessmittel eintauchen. Anschliessend setzt man das Aluminiumgestell in den Glastank ein. Eine kleine Pressglasschale wird nun auf die unteren Verbindungsstreben des Einsatzgestelles gelegt, der Filterpapierbogen mit den aufgetragenen Substanzen bzw. Extrakten mit zwei Photoklammern an dem hintern Breitrand der Schale angehängt und das Papier mit einem Glasstab beschwert, damit es, nachdem jetzt das Fliessmittel 2 eingefüllt wurde, in dieses eintaucht. Damit ferner das Papier selbst während dem Chromatographieren schön senkrecht hängt und nicht mit den Sättigungsbogen in Berührung kommt, wird es durch Anbringen einer weiteren Photoklammer in der Mitte am untern Ende etwas beschwert. Hat man noch einen zweiten Filterpapierbogen mit aufgetragenen Substanzen, wird dieser analog in eine zweite Pressglasschale gebracht und diese auf die oberen Verbindungsstreben des Aluminiumgestelles gelegt.

Jetzt wird der Glasdeckel auf den Tank, dessen oberer geschliffener Rand zuvor gut mit Vaselinfett bestrichen wurde, aufgesetzt und der Gummistopfen mit dem Glasrohr in die Oeffnung in der Mitte des Deckels eingesetzt. Das Ende des Glasrohres taucht ca. 15 cm tief in einen mit dem Fliessmittel gefüllten Messzylinder ein. (Auf den Glasdeckel selbst legt man vorteilhaft, zwecks guter Abdichtung, noch ca. zwei bis drei Gewichte von je 1 kg.)

Ein sogenanntes Gasableitungsrohr wurde deshalb am Deckel des Gefässes angebracht, weil durch den stark ansteigenden Innendruck, hervorgerufen durch die Verdampfung von Fliessmittel, der Deckel vom Tank abgehoben wird, trotz dessen Belastung mit Gewichten. Durch das Einführen des Ableitungsrohres kann nun die Raumluft des Tankes auf einfache Art nach aussen verdrängt werden, wobei das ganze System gleichwohl geschlossen bleibt.

Die Laufzeit des Fliessmittels für eine Strecke von ca. 35 cm beträgt mit dieser Anordnung ungefähr 6 Stunden.

Zu Beginn der Versuche, als am Boden noch keine Schale mit Fliessmittel und keine Filterpapierbogen zur Sättigung der Atmosphäre in den Glastank gebracht wurden, betrug die vom Fliessmittel zurückgelegte Strecke in der gleichen Zeit von 6 Stunden nur ca. 14—16 cm. Um also ein relativ schnelles Laufen der Chromatogramme zu erzielen, ist eine Sättigung der Tankatmosphäre mit dem Fliessmittel, wie dies bei unseren Versuchen vorgenommen wurde, vorzunehmen; es sei denn, dass der ganze Glastank in ein gleichmässig geheiztes Wasserbad gestellt und dadurch die Innentemperatur bedeutend erhöht werden kann, was ebenfalls eine schnelle und gleichmässige Sättigung der Tankatmosphäre mit dem Fliessmittel bewirkt.

Eine Verkürzung der Laufzeit bzw. der Laufstrecke ist nicht angebracht, da gemäss unseren Erfahrungen die Trennung der einzelnen Substanzen nicht mehr einwandfrei ist. Ob durch das Wechseln der stationären und der beweglichen Phase bei verminderter Laufzeit (weniger als 6 Stunden) trotzdem eine einwandfreie Trennung erzielt werden kann, wäre durch weitere Versuche noch näher abzuklären.

Die nach dem Herausnehmen der Papierbogen sich jeweilen noch im Tank befindenden Fliessmitteldämpfe sind vorteilhaft vor jedem neuen Ansetzen eines Chromatogrammes mit Hilfe eines grossen Trichters, der mit einem Schlauch an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, möglichst gut abzusaugen. Dieses «Entlüften» ist speziell immer dann vorzunehmen, wenn ein Wechsel des Fliessmittels für die nächste Chromatographie stattfindet.

Nach Ablauf von 6 Stunden wird das Chromatogramm aus dem Tank herausgenommen und während ca. einer Stunde an der Luft getrocknet.

Nun hängt man dasselbe mit zwei Photoklammern an einen Glasstab, der an einem Stativ befestigt ist. Am unteren Ende des Papierbogens bringt man links und rechts zwei weitere Klammern an, die jeweils mit Hilfe eines Gummibändchens mit einem Glasstab verbunden werden. Durch entsprechendes Herabsetzen des unteren Glasstabes kann der Papierbogen derart gespannt werden, dass er beim Besprühen mit den Reagentien fest bzw. angespannt bleibt und trotzdem kein Ausreissen der Klammern stattfindet.

b) Das trockene Chromatogramm wird *zum Sichtbarmachen* der Flecken folgendermassen behandelt:

1. Man besprüht es mit 0,05n-Silbernitratlösung (Entwicklungsreagens 1) auf der Vorderseite (Auftragungsseite) und trocknet es anschliessend bei 37° in einem Trockenschrank während einer halben Stunde (das Papier nimmt eine bräunliche Färbung an) [1]).
2. Man besprüht wiederum nur die Vorderseite mit Formaldehydlösung (Reagens 2) und lässt ca. 10 Minuten an der Luft hängen (es tritt praktisch keine Farbveränderung ein).
3. Nun wird das Papier beidseitig mit 2n-KOH (Reagens 3) besprüht und in einem Trockenschrank während einer halben Stunde auf 130—133° erhitzt (Farbumschlag nach dunkelbraun bis braunschwarz).
4. Das Chromatogramm wird durch beidseitiges Besprühen mit der Salpetersäure-Wasserstoffsuperoxyd-Mischung (Reagens 4) «gebleicht» und über Nacht trocknen gelassen. Dann setzt man es dem direkten Sonnenlicht aus, bis die Flecken voll entwickelt sind [2]).

Hat man kein direktes Sonnenlicht zur Verfügung, sondern nur das gewöhnliche Tageslicht, so dauert die Entwicklung der Flecken bedeutend länger. Die Entwicklungszeit kann in diesem Falle jedoch ebenfalls wesentlich reduziert werden, wenn man die Chromatogramme beidseitig mit starken Photolampen belichtet.

Das Besprühen der Chromatogramme mit den vier Reagentien zum Sichtbarmachen muss unbedingt in einem gut ventilierten Raume, am besten in einem Abzuge, vorgenommen werden, wobei die Papierbogen während des ganzen Prozesses nur mit Gummihandschuhen anzufassen sind (auch beim Einzeichnen der Laufbahnen).

Der Druck für die Spray-Flaschen bzw. zur Zerstäubung der Reagentien wird einer Stickstoffbombe entnommen, wobei mit einem durchschnittlichen Druck von 0,3 Atm. gespritzt wird. Dies bietet gegenüber dem Spritzen von «Hand» den grossen Vorteil einer gleichmässigen Versprühung und ist zudem gegenüber der Handmethode keineswegs ermüdend, besonders wenn mehrere Chromatogramme entwickelt werden sollen.

Bemerkungen

1. Die anschliessende Erhitzung auf 37° während einer halben Stunde hatte eine wesentliche Intensivierung der Flecken nach dem Entwickeln zur Folge. In weiteren Versuchen wurde die Temperatur noch mehr gesteigert, und es zeigte sich schliesslich, dass bei einer Erhitzungsdauer von 2 Minuten auf ca. 130° die Intensivierung bei zwei Substanzen nochmals wesentlich gesteigert werden konnte, was vor allem hinsichtlich der Nachweisbarkeitsgrenze von Aldrin und Dieldrin eine bedeutende Verbesserung mit sich brachte.

Will man ein Chromatogramm nur auf DDT und HCH prüfen, kann man von einer Hocherhitzung in diesem Sinne absehen, da gegenüber der Erhitzung auf 37° nur mehr eine kleine Verbesserung der Intensivierung eintritt, was aber auf die an und für sich schon grosse Nachweisempfindlichkeit dieser Substanzen keinen merklichen Einfluss mehr ausübt.

Für Aldrin und Dieldrin ist aber immer die Hocherhitzung auf 130° vorzunehmen.

2. Die «Bleichung» des Chromatogrammes muss eventuell mehrmals vorgenommen werden, je nachdem viel Silbernitrat aufgesprüht wurde oder nicht. Hat das Chromatogramm einige Minuten nach der ersten Besprühung mit dem Säure-Wasserstoffsuperoxyd-Gemisch nicht wieder eine «weisse» Farbe angenommen, bzw. sind immer noch vereinzelte dunkle Flecken vorhanden, wiederholt man die Besprühung in Abständen von 10 Minuten so oft, bis die Bleichung vollständig ist. Dabei darf aber nie ein «Fliessen» der Säure-Wasserstoffsuperoxyd-Mischung auf dem Papiere eintreten.

Das Trocknen der Chromatogramme soll unbedingt im Dunkeln durch mehrstündiges Stehenlassen an der Luft in einem Abzug (am besten über Nacht) vorgenommen werden.

V. Chemischer Vorgang bei der Sichtbarmachung der Insektizidflecken auf dem Papier

Der Nachweis der Substanzen auf dem Papier unterteilt sich in zwei prinzipielle Vorgänge, nämlich in

a) Abspaltung des organisch gebundenen Chlors,
b) Nachweis des nun in ionogener Form vorhandenen Chlors als Silberchlorid.

Die Abspaltung des organisch gebundenen Chlors geschieht dabei mit der aufgesprühten Kalilauge durch Erhitzen auf 130—133°.

Das in Form von Silbernitrat auf das Papier gebrachte Silber (Besprühung 1) wird dabei gleichzeitig zu metallischem Silber reduziert, und zwar in Verbindung mit der Kalilauge und dem im zweiten Arbeitsgang aufgesprühten Formaldehyd. Bei der abschliessenden Behandlung der Chromatogramme mit der Salpetersäure-Wasserstoffsuperoxyd-Mischung wird alles metallische Silber erneut in Silbernitrat umgewandelt, das sich dabei an denjenigen Stellen, an welchen aus den Insektizidflecken Chlor abgespalten wurde, mit diesem zu Silberchlorid umsetzt. Die Sichtbarmachung des Silberchlorids geschieht durch eine längere Belichtungszeit, wobei sich dieses als violetter Flecken zu erkennen gibt (kolloidales Silber).

Da der Fleckennachweis also auf dem aus den Insektiziden abgespaltenen und dann in ionogener Form vorhandenen Chlor beruht, ist es auch leicht verständlich, warum das Papier nicht mit den Händen, denen immer geringe Schweisspuren (NaCl) anhaften, sondern nur mit Gummihandschuhen angefasst werden soll. Auch beim Aufbewahren und Ablegen der Papiere vermeide man unbedingt, dass diese mit irgendwelchen Chloriden (auch nur Spuren) in Berührung kommen.

B. Trennung und Identifizierung der Phosphorsäureesterverbindungen durch die Papierchromatographie

I. Geräte und Glaswaren

1. Glastank, Einsatzgestell aus Aluminium, Pressglasschalen, Glasstäbe, Spray-Flasche und Photoklammern (wie beschrieben unter «Geräte und Glaswaren» im Kapitel A: «Trennung und Identifizierung der chlorierten Kohlenwasserstoffe durch die Papierchromatographie»).

2. Glaszylinder von 25,5 cm Höhe und 20,5 cm Durchmesser mit eingeschliffenem Glasdeckel. Ein Uhrglas von 10 cm Durchmesser. Ein Korkring zum Auflegen des Uhrglases. Vier bis sechs würfelförmig zugeschnittene Korkstücke. Zwei Büroklammern.
3. Filterpapierbogen Whatman Nr. 1, ebenfalls zugeschnitten in Bogen von 47× 12 cm und unterteilt in vier bzw. später in drei Bahnen (siehe Kapitel A).
4. Analysenquarzlampe.

II. Reagentien

1. Stationäre Phase: Original Silicon DC 550 Fluid in Aether (5+95 v/v), geeignet zur Trennung von Diazinon, Parathion und Malathion oder von Malathion, Parathion und Chlorthion. Die beiden Insektizide Chlorthion und Diazinon lassen sich mit Silicon nicht trennen.

1a. Paraffinum perliquidum Ph.H.V. in Aether (5+95 v/v), geeignet zur Trennung aller vier Phosphorsäureester (siehe Abb. 12).

2. Bewegliche Phase (Fliessmittel): Aethanol-Aceton-Wasser-Mischung (1+1+2 v/v).
3. 5%ige Bromlösung in Tetrachlorkohlenstoff.
4. Fluoresceinlösung (10 mg Fluorescein gelöst in einer Mischung von 97 ml Alkohol absolut und 3 ml n/10 NaOH).
5. Standardlösungen von Chlorthion, Parathion, Diazinon und Malathion in Alkohol, enthaltend 10 mg Substanz pro 1 ml.

III. Methode

Die Vorbereitungen für die papierchromatographische Trennung und Identifizierung der einzelnen Phosphorsäureester sind im Prinzip wiederum dieselben, wie sie bereits für den Nachweis der chlorierten Kohlenwasserstoffe geschildert wurden.

Die gereinigten Pflanzenextrakte sind auch hier in Aceton zu lösen und mit der Auftragungsapparatur auf einem Bogen Whatman Nr. 1 aufzutragen.

Von den Standardlösungen können Diazinon, Parathion und Malathion ohne weiteres auf dieselbe Startbahn bzw. denselben Startpunkt aufgetragen werden, da der Trennungseffekt nach der vorgeschriebenen Methode ausgezeichnet ist. Chlorthion ist getrennt von den anderen Substanzen auf einen separaten Startpunkt aufzutragen. (Diese Angaben beziehen sich auf die Verwendung des stationären Imprägnierungsmittels 1. Bei Verwendung der Lösung 1a können alle vier Phosphorsäureester auf denselben Startpunkt aufgetragen werden.)

Die Imprägnierung des Papieres nach erfolgtem Aufbringen der Extrakte und Standardlösungen mit dem Imprägnierungsmittel (stationäre Phase 1 bzw. 1a) erfolgt wie im Kapitel A beschrieben, ebenso das Befestigen der Bogen in den Pressglasschalen. Als Fliessmittel dient hier ein Alkohol-Aceton-Wasser-Gemisch (Reagens 2) im Gegensatz zum Fliessmittel für die chlorierten Kohlenwasserstoffe, das keinen Alkoholzusatz enthält.

Der Glastank wurde bei unseren Versuchen diesmal nicht mit den zusätzlichen Sättigungsbogen versehen, da die Chromatogramme immer um 18.00 abends angesetzt und bis zum anderen Morgen um 08.00 laufen gelassen wurden. Die Zeit war damit gerade so bemessen, dass das Fliessmittel so weit abgestiegen war, bis die Entfernung vom unteren Rande des Filterpapierbogens nur noch ca. 1—2 cm betrug.

Versuche, bei denen der Glastank mit den zusätzlichen Sättigungsbogen versehen wurde, haben ergeben, dass eine wesentliche Verkürzung der Laufzeit trotzdem nicht erreicht werden konnte. Die vergleichsweise angeführte Gegenüberstellung folgender Zahlen lässt dies ohne weiteres erkennen:

Laufzeit in h	Laufstrecke in cm	
	mit Sättigungsbogen	ohne Sättigungsbogen
8	26—27	
14		38—39

Die Chromatogramme mit 8 Stunden Laufdauer haben ferner gezeigt, dass diese Zeit bei einer Laufstrecke von 26—27 cm die untere Grenze darstellt, die erforderlich ist, um eine saubere und einwandfreie Trennung der Substanzen bzw. Insektizide zu erreichen.

Nach beendeter Chromatographie werden die Bogen aus dem Tank herausgenommen und ca. 1 Stunde an der Luft getrocknet, d.h. zumindest aber so lange, bis das Fliessmittel vom Papier völlig verdunstet ist.

Für das nun folgende *Sichtbarmachen der Chromatogramme* kann hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes keine genaue Arbeitsvorschrift gegeben werden.

Eine gute Sichtbarmachung der Flecken hängt in erster Linie von der Bromierung, wie sie im folgenden beschrieben wird, ab, wobei die Bromierungszeit von der Konzentration der Bromatmosphäre und diese wiederum von der Grösse des Gefässes abhängig ist.

Nach den von uns gemachten Erfahrungen hat sich *folgendes Vorgehen am besten bewährt:*

Ein Uhrglas wird auf einen Korkring gelegt und dieser auf den Boden des Glaszylinders mit dem eingeschliffenen Deckel gestellt. Um den Korkring herum werden die gleichmässig zugeschnittenen Korkwürfel angeordnet (Abb. 11). Nun gibt man mit einer Pipette 7 ml der Bromlösung in Tetrachlorkohlenstoff in die Uhrglasschale und verschliesst den Zylinder mit dem Deckel. Das Papierchromatogramm wird alsdann zu einem Zylinder zusammengelegt, indem der obere Längsrand überrollt und ca. 2 cm unter den unteren geschoben wird, wobei die nun übereinanderliegenden Randpartien beidseitig mit einer Büroklammer aufeinandergeheftet werden. Die aufgetragenen und chromatographierten Substanzen sollen sich auf der Innenseite des Papierzylinders befinden.

Ca. 1 Stunde nach dem Einfüllen der Bromlösung in den Glaszylinder ist in diesem die ideale Sättigungskonzentration der Bromatmosphäre erreicht worden, so dass mit dem eigentlichen Bromierungsvorgang begonnen werden

kann. Nach dem Abheben des Glasdeckels stellt man den zusammengerollten Papierbogen in den Glaszylinder hinein, so dass sich das Uhrglas im Zentrum des Papierzylinders befindet, und setzt den Deckel rasch möglichst wieder auf. Nach ca. 35 Sekunden nimmt man den Bogen bzw. Papierzylinder heraus, dreht ihn um 180° und stellt ihn weitere ca. 35 Sekunden in den Zylinder. Nach dem erneuten Herausnehmen wird das Chromatogramm sogleich mit Hilfe der vier Photoklammern und der beiden Gummibändchen eingespannt (siehe Kapitel A) und mit dem Fluoresceinreagens anfangs nur *leicht* besprüht (nur einseitig).

Die Substanzflecken, herrührend von den Phosphorsäureesterverbindungen, geben sich schon bald, d.h. nach ca. 2—3 Minuten, deutlich als gelblich-weisse Flecken auf rosafarbenem Untergrunde zu erkennen. Die Chromatogramme werden gleich anschliessend unter der Quarzlampe betrachtet und die nun violett- bis blau-schwarz erscheinenden Flecken (auf grünlich-gelbem Hintergrund) mit einem Bleistift umfahren.

War die Bromierungszeit zu kurz, so erscheinen die Flecken im UV-Licht immer noch gelblich-grün. Das Chromatogramm ist in diesem Falle nochmals zu einem Zylinder zusammenzurollen und während ca. zweimal weiteren 10 Sekunden in das Bromierungsgefäss zu stellen und nachfolgend mit der Fluoresceinlösung leicht zu besprühen.

Sollten die Flecken im UV-Licht auch jetzt immer noch einen gelblich-grünen Farbton aufweisen, so ist die Behandlung nochmals zu wiederholen.

Vor einer ersten starken Bromierung muss aber unbedingt gewarnt werden, da sonst der Fall eintreten kann, dass auch unter der Quarzlampe die Flecken nicht mehr lokalisiert werden können, weil der Hintergrund infolge der zu starken Bromierung ebenfalls eine blau-schwarze Färbung annimmt. Auch vor einer Ueberdeckung der Flecken durch zu starkes Besprühen mit der Fluoresceinlösung muss man sich hüten. Versuche, die infolge einer unsachgemässen Behandlung unbrauchbar gewordenen Chromatogramme zu «retten», haben übrigens völlig fehlgeschlagen.

Warum auf die beiden vorstehend erwähnten Punkte der Bromierung und Fluoresceinbesprühung speziell geachtet werden muss, geht leicht auch aus dem *Chemismus des Fleckennachweises* hervor:

Die Phosphorsäureester «adsorbieren» Brom; ob es sich dabei um eine Bromaddition oder -substitution handelt, ist uns nicht bekannt. An den übrigen Stellen auf dem Papier besteht ein Bromüberschuss, der dazu verwendet wird, das aufgesprühte Fluorescein in Eosin umzuwandeln (Eosin = Tetrabromfluorescein). Da aber selbstverständlich das «Adsorptionsvermögen» der geringen Mengen Phosphorsäureester sehr beschränkt ist, kann durch einen zu grossen Bromüberschuss das aufgesprühte Fluorescein über den Flecken auch in Eosin umgewandelt werden und diese damit überdecken.

Ein sofortiges Betrachten der Chromatogramme bzw. der Flecken im UV-Licht soll deshalb vorgenommen werden, weil die Intensität der letzteren dann am deutlichsten ist. Die «Haltbarkeit» der Chromatogramme ist übrigens sehr

unterschiedlich, sie kann nur einige Stunden bis aber auch einige Tage dauern, wenn sie im Dunkeln aufbewahrt werden. Eine nachträgliche, erneute Sichtbarmachung der Flecken durch Wiederholen der Bromierung und Aufsprühen von Fluoresceinlösung gelang nicht mehr.

Beschreibung der Photographien 10 und 11

Abbildung 10: Imprägnierung eines Filterpapierbogens mit dem stationären Lösungsmittel (Silicon in Aether). Der auf der Abbildung – vom Betrachter der Photo aus gesehen – rechts von der Startlinie sich befindende Papierteil ist bereits, mit dem rechten oberen Teil voran, so weit durch das Lösungsmittel hindurchgezogen worden, dass sich dieses nur noch ca. 2 cm entfernt von der Startlinie befindet.
In dieser Stellung wird der Papierbogen nun so lange belassen, bis sich das Lösungsmittel bis zur Startlinie hinaufgesaugt hat, wie dies auf der Abbildung gerade der Fall ist (erkenntlich an der unterschiedlichen Farbtönung zu beiden Seiten der Linie), um dann in der entgegengesetzten Richtung (nach links) wieder zurückgezogen zu werden. Der dunkle Flecken auf der Startlinie stellt ungefähr die Grösse eines aufgetragenen Fleckens dar.

Abbildung 11: Glaszylinder mit eingeschliffenem Glasdeckel zur Bromierung der Chromatogramme. Im Zylinder das Uhrglas zur Aufnahme der Bromlösung, aufgelegt auf einen Korkring und darum die kreisförmig angeordneten Korkwürfel. Rechts vom Zylinder ein zusammengerolltes Papierchromatogramm, bereit zur Bromierung.

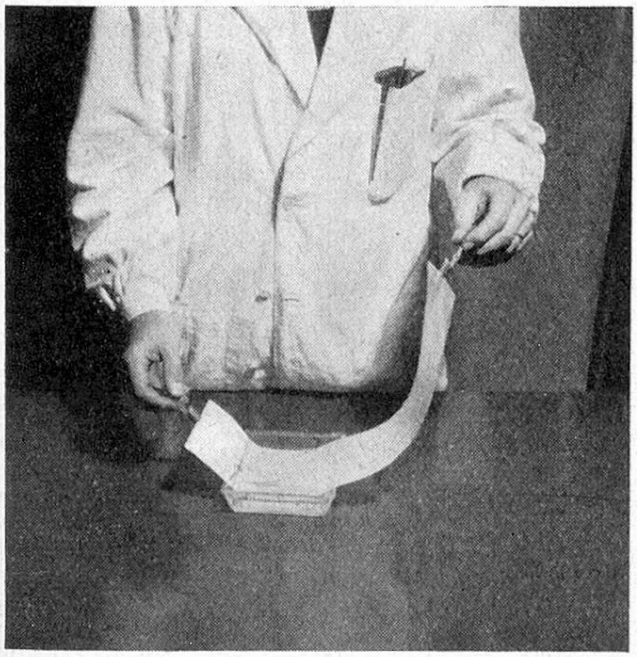


Abbildung 10

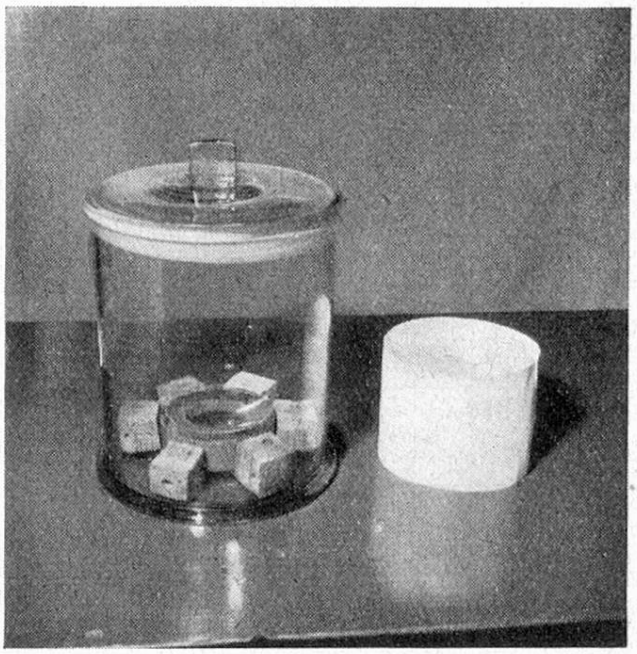


Abbildung 11

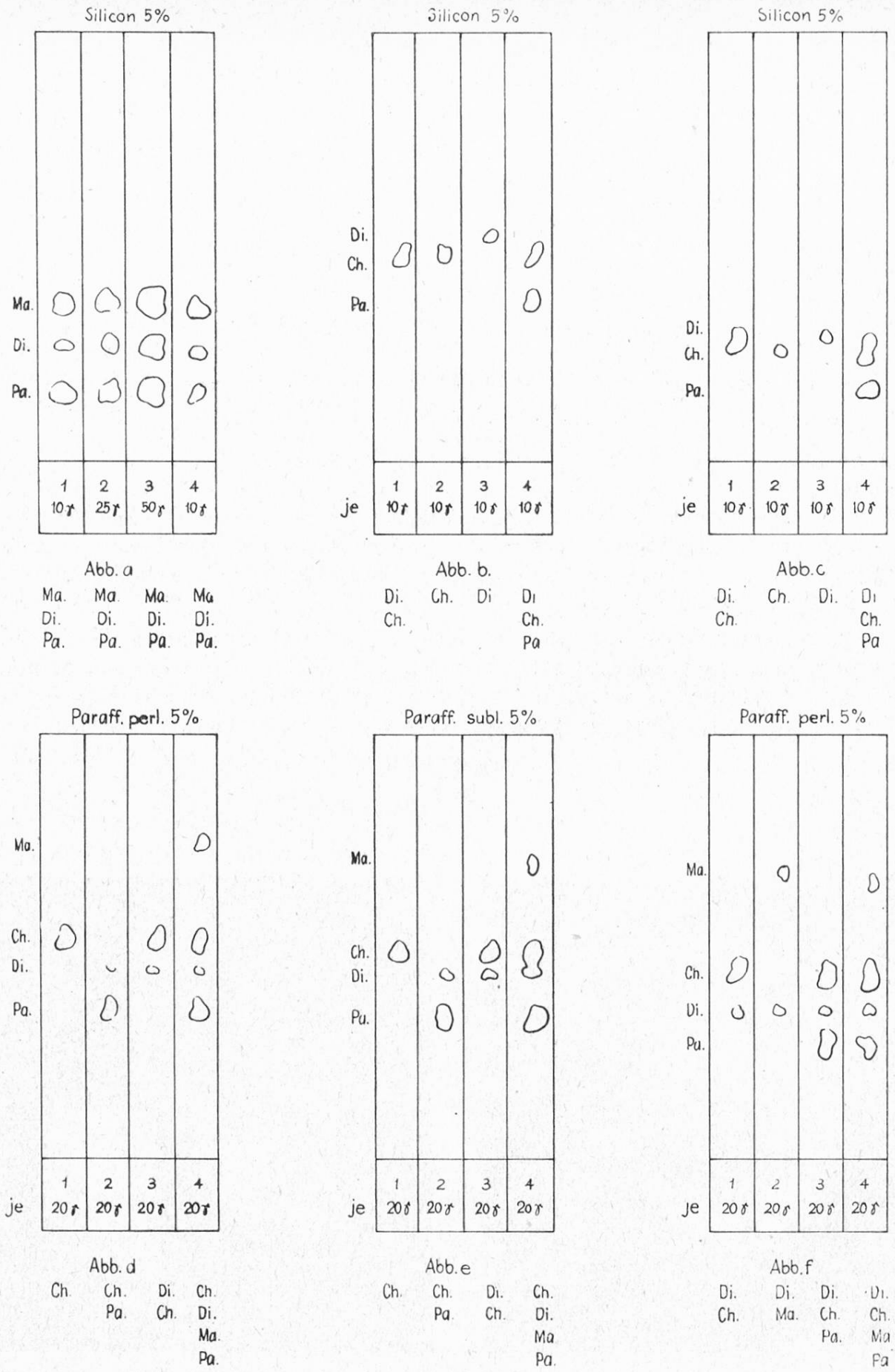


Abbildung 12

Erklärung der Abkürzungen: Ch = Chlorthion, Di = Diazinon, Ma = Malathion, Pa = Parathion

C. Diskussion der mit der Papierchromatographie erzielten Resultate

1. R_f-Werte

Von einer einmaligen R_f-Wertbestimmung der einzelnen Testsubstanzen (chlorierte Kohlenwasserstoffe und Phosphorsäureester) für eine spätere Auswertung der Chromatogramme mit den aufgetragenen Extrakten muss unbedingt abgeraten werden. Unsere Erfahrungen haben gezeigt, dass mit den einem Laboratorium normalerweise zur Verfügung stehenden Chromatographieeinrichtungen keinesfalls konstante R_f-Werte zu erzielen sind, da die Temperatur, der vielleicht wichtigste Faktor zur Erreichung reproduzierbarer Resultate, noch nicht konstant gehalten werden kann. Schon geringfügige Schwankungen genügen oftmals, um beträchtliche Unterschiede innerhalb der R_f-Werte gleicher Substanzen zu erzeugen. Zudem spielen auch noch andere Faktoren, wie Fliessmittel, Konzentration und gleichmässige Verteilung des Imprägnierungsmittels (stationäre Phase) auf dem Papier, Grösse des Tanks, zusätzliche Sättigungsmöglichkeit der Atmosphäre, Luftfeuchtigkeit usw., eine mehr oder weniger wichtige Rolle. In einzelnen Fällen konnten sogar Unterschiede innerhalb der R_f-Werte zweier Chromatogramme festgestellt werden, die zu gleicher Zeit und im gleichen Tank laufen gelassen wurden. Die Differenzen waren wahrscheinlich auf die verschiedene Höhe, in der sich die Fliessmittelschalen mit den Chromatogrammen im Tank befanden, zurückzuführen, da durch diese Anordnung keine homogene Dampfatmosphäre des Lösungsmittels geschaffen werden konnte.

Auf Grund dieser Tatsachen haben wir davon abgesehen, die aus den Extrakten chromatographierten Substanzen anhand der mit Testsubstanzen ermittelten R_f-Werte zu identiifzieren. Die einzig sichere Erkennungsart der Insektizide ergab sich in unserem Falle somit nur durch das Mitlaufenlassen von Testsubstanzen.

Bei der heutigen Vielfalt an Insektiziden wäre es natürlich trotzdem wünschbar, diese auf Grund bekannter und konstanter R_f-Werte zu identifizieren. Mit einem Glastank, der mit Hilfe eines ihn umgebenden Wassermantels auf eine immer gleichzuwählende, konstante Temperatur geheizt werden kann, sowie durch gleiches Einhalten aller übrigen Bedingungen könnte in dieser Beziehung sicher viel erreicht werden, und zwar hauptsächlich für die Phosphorsäureester. Diese Verbindungen zeigten selbst schon bei den uns zur Verfügung stehenden Mitteln ein ziemlich konstantes Verhalten in bezug auf die R_f-Werte (im Gegensatz zu den chlorierten Kohlenwasserstoffen).

Dass hingegen mit je einem einzigen Chromatogramm bzw. einem einzigen Fliessmittelsystem alle Verbindungen der beiden Gruppen getrennt werden können, ist höchst unwahrscheinlich. Der zum Teil sehr ähnliche chemische Aufbau dieser Substanzen dürfte es praktisch verunmöglichen, nach einem solchen Verfahren eine genügend gute und einwandfreie Trennung zu erreichen.

2. *Wahl der Chromatographiemethode sowie der Fliess- und Imprägnierungsmittel*

Der wichtigste Grund, warum wir die *absteigende* und nicht die *aufsteigende Chromatograpie* gewählt haben, war in erster Linie die viel kürzere Laufzeit bei gleicher Laufstrecke der ersten gegenüber der zweiten Methode.

Ferner hatte das absteigende Verfahren zudem noch den Vorteil eines besseren Trennungseffektes der einzelnen Substanzen, und zwar beider Gruppen.

Imprägnierungsmittel (stationäre Phase)

Für die chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden als Imprägnierungsmittel folgende Substanzen ausprobiert:

1. raffiniertes Sojabohnenöl in Aether, 1-, 5- und 10%ige Lösungen (Volumenteile).
2. raffiniertes und von freien Fettsäuren weitgehend befreites Sojabohnenöl in den gleichen Konzentrationen wie sub 1. (Die Reinigung des Oeles wurde so vorgenommen, dass dieses in Petroläther oder Hexan gelöst und durch eine Aluminiumoxydsäule laufen gelassen wurde. Anschliessend wurden die Lösungsmittel wieder abdestilliert.)
3. Paraffinum perliquidum und subliquidum (gemäss Ph.H.V.) in Aether, je 4%ige Lösungen (Volumenteile).
4. Dimethylformamid in Aether, 20- und 25%ige Lösungen (Volumenteile).
5. Original Silicon DC 550 Fluid in Aether, 1-, 2,5-, 5-, 7,5- und 10%ige Lösungen (Volumenteile).

Für die Phosphorsäureesterverbindungen wurden folgende Lösungen ausprobiert:

1. Paraffinum perliquidum und subliquidum (gemäss Ph.H.V.) in Aether, 2,5-, 5-, 7,5- und 10%ige Lösungen (Volumenteile).
2. Original Silicon DC 550 Fluid in Aether, 1-, 2,5-, 5- und 7,5%ige Lösungen (Volumenteile).

Fliessmittel

für chlorierte Kohlenwasserstoffe:

1. Aceton-Wasser-Mischung 75+25, 80+20 v/v.
2. Aethanol-Wasser- und Eisessig-Wasser-Mischungen, je 75+25 v/v.

für Phosphorsäureesterverbindungen:

Aethanol-Aceton-Wasser 1+1+2 (v/v).

Die obgenannten stationären und beweglichen Phasen wurden in ihrer Verwendungsmöglichkeit in dem Sinne geprüft, ob sie für die Trennung aller vier Vertreter der beiden Gruppen geeignet seien oder nicht.

Bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen lieferten einzig die 5%ige Sojabohnenöllösung (gereinigt durch die Aluminiumoxydsäule) und die 5—10%igen Siliconlösungen brauchbare Resultate, wobei sich als bestes Imprägnierungsmittel

schliesslich die 7,5%ige Siliconlösung herausstellte. Bei allen anderen Imprägnierungen waren mehr oder minder grosse «Schwanzbildungen» bzw. schlechte Trennungseffekte der einzelnen Substanzen eingetreten.

Als Fliessmittel, zusammen mit der 7,5%igen Siliconlösung, kamen nur die beiden Aceton-Wasser-Mischungen in Frage, wobei der 75%igen Acetonlösung auf Grund der erzielten Resultate schliesslich der Vorzug gegeben wurde.

Dabei ist noch zu bemerken, dass der Chromatographievorgang nur bei der entsprechenden Raumtemperatur vorgenommen werden konnte und es somit nicht möglich war, die Eignung des einen oder anderen Fliessmittels für höhere Temperaturen zu untersuchen.

Der Vorteil einer intensiven Fleckenbildung bei Anwendung von Sojabohnenöl als stationäre Phase (siehe *Mitchell* [13])) konnte in unseren Versuchen mit einer Siliconlösung und der bereits erwähnten Hocherhitzung auf 130° während zwei Minuten bedeutend verbessert werden.

Bei den Phosphorsäureesterverbindungen wurde nur ein Fliessmittel untersucht, das sich mit den stationären Paraffin- (5 %) und Siliconphasen (5 %) sehr gut bewährte. Der Vorteil der Paraffin- gegenüber der Siliconlösung wurde bereits in der Methode B (Reagentien) beschrieben.

Hinsichtlich der Lösungen, bestehend aus Paraffinum perliquidum und subliquidum, gab die erste für die beiden Substanzen Chlorthion und Diazinon einen einwandfreien Trennungseffekt, was mit der zweiten nicht immer erzielt werden konnte.

Die Siliconlösung gestattet — im Gegensatz zur Paraffinlösung —, die Flecken konzentrierter laufen zu lassen, und ergibt beim Nachweis der Insektizide stärkere Farbflecken.

Papier

Es wurden einander die Papiere Schleicher & Schuell Nr. 2043a und b sowie das Papier Whatman Nr. 1 gegenübergestellt. Dabei wurden mit dem Whatmanpapier die besten Erfolge erzielt, und zwar sowohl hinsichtlich des Trennungseffektes als auch der Konzentration der Flecken.

Ferner wurde für den Nachweis der chlorierten Kohlenwasserstoffe versucht, durch Vorwaschung des Papieres mit destilliertem Wasser noch sauberere Chromatogramme zu erhalten, da damit zu rechnen war, dass von der Fabrikation her geringe Chloridspuren auf dem Papier zurückbleiben würden. Das Papier wurde dabei folgendermassen gewaschen: Die zugeschnittenen Chromatographiebogen wurden mehrmals durch eine mit destilliertem Wasser gefüllte Schale gezogen und dann zur Trocknung an der Luft an zwei Photoklammern aufgehängt.

Tatsächlich konnte in dieser Richtung ebenfalls eine Verbesserung erzielt werden, indem die Substanzflecken nach dem Sichtbarmachen deutlicher und begrenzter zu erkennen waren, als dies bei ungewaschenem Papier der Fall war, und der Hintergrund «weisser» schien.

Hiebei stellte sich aber ein anderer Nachteil ein, nämlich der, dass gleiche Substanzen scheinbar verschieden schnell auf dem Papier wanderten, wenn auch die Unterschiede nur geringfügiger Art waren.

Der Grund dieser Erscheinung scheint uns auf die Trocknung des Papieres zurückzuführen zu sein, da dieses durch die Lufttrocknung schrumpfte und verzogen wurde. Bei geeigneter Trocknung des Papieres, derart, dass dasselbe wieder glatt und ohne Falten ist, dürfte dieser Umstand wieder beseitigt werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind die Erfahrungen und Resultate, die sich beim Nachweis von Insektizidrückständen auf Pflanzenmaterial ergeben haben, zusammengestellt. Die Extraktions- und Nachweismethoden beziehen sich auf die bekanntesten Vertreter der chlorierten Kohlenwasserstoffe (Aldrin, Dieldrin, DDT, Hexachlorcyclohexan) und der Phosphorsäureesterverbindungen (Parathion, Chlorthion, Diazinon, Malathion). Kleinste Mengen eines oder mehrerer Insektizide — in der Grössenordnung von 10 bis 200 Gamma, bezogen auf das untersuchte Material — wurden aus pflanzlichem Material (Gemüse und Früchte) isoliert und die isolierten Stoffe identifiziert.

Es werden die Extraktion des Pflanzenmateriales, die Reinigung der gewonnenen Extrakte sowie der Nachweis der Insektizidrückstände mittels der papierchromatographischen Methode beschrieben. Zahlreiche Photos und Zeichnungen der benützten Einrichtungen und Apparate illustrieren die Darlegungen. Eine Diskussion der mit Hilfe der Papierchromatographie erzielten Resultate beschliesst die Arbeit.

Résumé

Description des expériences faites et des résultats obtenus dans la recherche et le dosage de résidus d'insecticides des légumes et des fruits. Les insecticides examinés furent l'aldrin, le dieldrin, le DDT, l'hexachlorcyclohexane, le parathion, le chlorthion, le diazinon et le malathion. Leur extraction au moyen de dissolvants appropriés et leur séparation et identification par chromatographie sur papier sont décrites. Les méthodes utilisées permettent de retrouver des quantités d'insecticides allant de 10 à 200 gammas.

Summary

Description of the extraction of the following pesticides: aldrin, dieldrin, DDT, benzene hexachloride, parathion, chlorthion, diazinon and malathion, from various fruits and vegetables, and of their separation and identification by paper chromatography. By means of the methods described 10 to 200 gammas of pesticides may be separated and identified.

Literatur

[1]) *Aepli, O. T., P. A. Munter* and *J. F. Gall:* «Determination of Gamma-Benzene Hexachloride by partition chromatography». Anal. Chem. **20** (1948), 610/13.

[2]) *Cook, J. W.:* «Paper chromatography of some organic phosphate insecticides».
I. New spot test. J. Ass. off. agr. Chem. **37** (1954), 984/87.
II. Separation and identification. ibidem 987/89.

III. Effects of light on Systox and Isosystox. ibidem 989/96.
IV. Spot test for in vitro cholinesterase inhibitors. ibidem **38** (1955), 150/53.
V. Conversion of organic phosphates to in vitro cholinesterase inhibitors by N-bromsuccinimide and ultraviolet light. ibidem (1955), 826/35.

[3]) *Davidow, B.:* ibidem **33** (1950), 131.

[4]) *Gruch, W.:* «Ueber papierchromatographische Trennung von Kontaktinsektiziden (DDT, E 605, HCH)». Naturwiss. **41** (1954), 39.

[5]) *Gunther, F. A.* and *R. C. Blinn:* «Analysis of insecticides and acaricides», Chemical Analysis Vol. 6. Interscience Publishers, New York - London, 1955.

[6]) *Horwitz, W.:* «Official methods of analysis of the Association of official agricultural chemists». Washington 1955.

[7]) *John, J. L. St.:* «Pesticides». Anal. Chem. **25** (1953), 42/47.

[8]) *Jones, L. R.* and *J. A. Riddick:* «Separation of organic insecticides from plant and animal tissues». Anal. Chem. **24** (1952), 569/71.

[9]) *Kästli, P.:* «Neuere Entwicklungen in der Landwirtschaft und deren Auswirkung auf die Qualität der Milch und Milcherzeugnisse». Schweiz. Milchztg. **82** (1956), 189/90.

[10]) *Kolbezen, M. J.* and *H. T. Reynolds:* «Determination of 0-(3-chloro-4-nitro-phenyl)-o, o-dimethyl Phosphorothioate (Chlorthion) residues in cottonseed». Agricultural and Food Chemistry **4** (1956), 522/25.

[11]) *Mattson, A. M., J. T. Spillance, C. Baker* and *G. W. Pearce:* «Determination of DDT and related substances in human fat». Anal. Chem. **25** (1953), 1065/70.

[12]) *Meyer, R.:* «Analyse und Zusammensetzung des technischen DDT». Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **38** (1947), 151/60.

[13]) *Mitchell, L. C.:* «Separation and identification of chlorinated organic pesticides by paper chromatography».
I. The isomers of Benzenehexachloride. J. Assoc. off. agr. Chem. **35** (1952), 920/27.
II. — and *W. I. Patterson:* Aldrin and Dieldrin. ibidem **36** (1953), 553/58.
III. Aldrin, Isodrin, Dieldrin and Endrin. ibidem 1183/86.
IV. The components of Dilan. ibidem **37** (1954), 216/17.
V. DDT (ortho, para' and para,para' isomers), Rhothane and Methoxychlor. ibidem 530/33.
VI. Technical Benzene Hexachloride, Lindane, technical DDT, and Rhothane. ibidem 996/1001.

[14]) *Mitchell, L. C.:* «A new indicator for the detection of the chlorinated pesticides on the paper chromatogram». ibidem **35** (1952), 928.

[15]) *Mitchell, L. C.:* «A tank for 8×8 inch paper chromatograms». ibidem **36** (1953), 1187/88.

[16]) *Ordas, E. P., V. C. Smith* and *C. F. Meyer:* «Spetrophotometric determination of Heptachlor and technical Chlordan on food and forage crops». Agricultural and Food Chemistry **4** (1956), 444/51.

[17]) *Pribilla, O.:* «Die Analytik des E 605» in «Vergiftungen mit E 605». Arch. f. Toxikol. **15** (1955), 216/22.

[18]) *Schechter, M. S., M. A. Pogorelskin* and *H. L. Haller:* «Colorimetric determination of DDT in milk and fatty materials». Anal. Chem. **19** (1947), 51/53.

[19]) World Health Organisation. Technical Report Series No. 54. Expert Committee on Insecticides. Fourth Report. Genf, December 1952.