

CHROM. 6126

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON
ORGANOQUECKSILBER-VERBINDUNGEN

F. GEIKE UND I. SCHUPHAN

*Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutzmittelforschung,
D 1 Berlin 33 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 18. April 1972)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic detection of organomercury compounds

The possibility of detecting organomercury fungicides by means of thin-layer chromatographic-enzymatic and chemical techniques has been studied. Urease proved to be very sensitive for the detection of mercury compounds and their impurities of which up to five were found in the fungicides studied. The detection limits for the main compounds ranged from 50 ng to 1 μ g, and for the impurities from 1 to 60 μ g. Bovine liver esterase, α -, and β -amylase are also inhibited by the fungicides and can be used for their detection, but are generally less sensitive.

The chemical detection with sodium sulphide and dithizone ranged from 0.5 to 20 μ g and the impurities did not interfere with the detection. Two solvent systems, isopropyl ether and chloroform-ethyl acetate (10:4), respectively, were suitable for the separation of nine mercury fungicides.

EINLEITUNG

Organoquecksilber-Verbindungen werden in der Landwirtschaft seit Jahren auf breiter Basis als Fungizide eingesetzt. Ihr Hauptanwendungsgebiet liegt in der Saatgutbehandlung (Beizung) des Getreides; aber auch Rüben, Saatkartoffeln, Baumwolle und Hülsenfrüchte werden mit quecksilberhaltigen Präparaten gebeizt. Daneben werden Organoquecksilber-Verbindungen auch als Spritzmittel unter anderem zur Vorblütenspritzung gegen Apfelschorf und im Citrusbau eingesetzt*. In der Technik finden Quecksilber und seine Verbindungen in grossem Umfange in der Chloralkali-, Holzveredlungs- und Kunststoffindustrie Verwendung, wobei vor allem bei organischen Synthesen leicht anorganisches Katalysator-Quecksilber direkt in organisches übergehen kann, wie sich bei der Acetaldehydsynthese zur Herstellung von Polyvinylchlorid-Kunststoff in Minamata (Japan) gezeigt hat¹. Auch in der Pharmazie werden trotz erheblicher Bedenken noch immer Quecksilber-Verbindungen verwandt. Das zur Zeit gültige Deutsche Arzneibuch 7 (Lit. 2) beschreibt eine Anzahl Salben, Tabletten und Tinkturen, die häufig 5-10 %

* Siehe APPENDIX.

Quecksilber enthalten. Eine heute gängige Lutschtablette zur Desinfektion des Nasen-Rachenraumes enthält unter anderem Phenylmercuriborat³. Weitere Organoquecksilber-Verbindungen finden sich in Präparaten zur Behandlung von Verbrennungen, zur Desinfektion, zur Konservierung von Injektionslösungen sowie in Hautantiseptika und Diuretika^{3,4}.

Nach den weltweit bekannt gewordenen Erkrankungen und Todesfällen durch Methylquecksilber-Verbindungen aus der Nahrung⁵ (Minamata-Krankheit) setzten intensive toxikologische Untersuchungen von Quecksilber-Verbindungen ein. Dabei zeigte sich, dass Organoquecksilber-Verbindungen eine wesentlich grössere Retentionszeit in einer Reihe von Geweben und eine grössere spezifische Wirkung auf das Nervensystem haben als anorganische Quecksilber-Verbindungen. Vor allem Methylquecksilber-Verbindungen können Chromosomenbrüche und sogenannte *c*-Mitosen hervorrufen, wobei die Wirkung etwa 1000-fach stärker ist als die des Colchizins^{6,7}.

Ähnlich wie die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide reichern sich auch die hochtoxischen Methylquecksilber-Verbindungen in Krebsen, Muscheln und Fischen stark an⁵. In Fischen, die intensiver als alle anderen Organismen untersucht sind, lag Quecksilber in der Hauptsache als Methylquecksilber-Salz vor⁸, das sehr intensiv als Fungizid verwandt wurde. Trotz Verbots dieser Verbindung fand man in Schweden auch weiterhin fast 100 % des gesamten Quecksilbers in Fischen als "Methylquecksilber". Auch in Eiern und Organen von Hühnern fand man nach Verfütterung von mit Quecksilbernitrat, Methoxyäthyl- oder Phenylquecksilberhydroxid kontaminiertem Weizen "Methylquecksilber"⁹. Erst seit einigen Jahren weiss man, dass dieses "Methylquecksilber" mikrobiell oder enzymatisch mit Vitamin B₁₂ als Cofaktor aus anderen Quecksilber-Verbindungen entstehen kann¹⁰⁻¹².

Aufgrund der Feststellung, dass in gewissen Gegenden zahlreiche Nahrungsmittel mit Quecksilber-Verbindungen kontaminiert sind, wurden in letzter Zeit Stimmen laut, die starke Bedenken gegen eine weitere Verwendung dieser Substanzen anmelden, doch nimmt ihre Anwendung in der Landwirtschaft*, Industrie und Pharmazie nur allmählich ab.

Arbeiten über die Translokation von Quecksilber-Verbindungen und die in Nahrungsmitteln vorkommenden Rückstände wurden erst kürzlich zusammenfassend dargestellt^{1,13}. In der Regel werden die Rückstandsuntersuchungen noch in der Weise durchgeführt, dass die Probe mit Säure behandelt und das anorganische Quecksilber dann als Dithizonat bestimmt wird. Auf diese Weise erhält man zwar Aufschluss über das Vorhandensein und die Konzentration des Quecksilbers, jedoch keinen Hinweis über die chemische Natur der Quecksilber-Rückstände, deren Kenntnis sehr wichtig ist, da die Toxizität der einzelnen Verbindungen zum Teil erheblich schwankt. Methylquecksilber-Verbindungen sind beispielsweise erheblich toxischer als Phenylquecksilber-Verbindungen. Aus diesem Grunde sollte eine schnelle und genügend empfindliche Methode vorhanden sein, um Routineuntersuchungen auf Rückstände durchführen zu können. Relativ wenige Arbeiten liegen bisher jedoch für die Identifizierung und Bestimmung bestimmter Quecksilber-Verbindungen vor. In vielen Fällen werden die Substanzen papierchromatographisch getrennt und durch Besprühen mit Dithizon nachgewiesen^{14,15}. Die Nachweis-

* Siehe APPENDIX.

empfindlichkeit liegt im Bereich von 1–1.5 μg Quecksilber. Eine neuere Arbeit untersucht einige Quecksilber-Verbindungen dünn-schichtchromatographisch (DC) in Form ihrer Dithizonate, wobei die Nachweisgrenzen etwa 2 μg betragen, während sie beim gaschromatographischen Nachweis für die gleichen Verbindungen zwischen 0.05 und 1 ng liegen¹⁶. In einer weiteren Untersuchung werden die Organoquecksilber-Verbindungen durch Überführen in die Organoquecksilberchloride und successives Besprühen mit Kupfersulfat und Natriumsulfit–Kaliumjodid nachgewiesen¹⁷. Die Nachweisgrenzen liegen sowohl im UV als auch im sichtbaren Licht für Quecksilber(II)chlorid nach diesem Verfahren bei 0.1–0.025 μg (Lit. 17). Eine ähnliche Empfindlichkeit wurde für Quecksilber(II)chlorid kürzlich auch mit einer DC-enzymatischen Methode erreicht¹⁸.

In vorliegender Arbeit werden neun Organoquecksilber-Verbindungen, die als Fungizide noch heute Anwendung finden oder erst vor kurzem vom Markt verschwanden, DC-enzymatisch und chemisch untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien und Wirkstoffe

Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und stammten von der Firma Merck (Darmstadt). Zur Plattenbeschichtung wurde Kieselgel G oder GF₂₅₄ nach Stahl mit ca. 13 % CaSO_4 , mittlere Korngrösse 10–40 μ , verwendet.

Die in Tabelle I aufgeführten Testsubstanzen wurden entweder von den Herstellerfirmen zur Verfügung gestellt oder selbst synthetisiert. Ausgehend von metallischem Quecksilber wurde Methylquecksilberacetat nach einer Patentvorschrift von Klös *et al.*¹⁹ und daraus durch Umsetzen mit KOH Methylquecksilberhydroxyd hergestellt²⁰. Letztere Verbindung wurde mit H_2SO_4 zu Methylquecksilbersulfat, mit HCl zu Methylquecksilberchlorid, mit Mercaptobenzoessäure zu Methylquecksilbermercaptopbenzoat, mit Hydroxychinolin zu Methylquecksilberhydroxychinolat und mit Cyanoguanidin zum Methylquecksilbercyanoguanidin umgesetzt.

Testlösungen, Dünn-schichtchromatographie und Sprühreagenzien

Die Verbindungen 3,4,6 und 9 wurden durch Extraktion aus ihren Formulierungen gewonnen und wie die übrigen Verbindungen nach Umkristallisation in den in Tabelle I genannten Lösungsmitteln gelöst, auf handgegossene Kieselgel-Platten²¹ aufgetragen, und in verschiedenen Laufmitteln entwickelt.

Zum Nachweis der Quecksilber-Verbindungen diente bei Verwendung von Kieselgel GF₂₅₄ UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, bei Kieselgel G eine 5 % wässrige Natriumsulfid-Lösung bzw. eine 0.5 % Dithizon-Lösung in Tetrachlorkohlenstoff. Beim Nachweis mit Dithizon erscheinen die Hg-haltigen Substanzen als gelbe Flecke auf blauvioletterm Grund. Besprüht man zusätzlich mit 25 % NH_4OH , so entwickeln sich nach längerer Zeit rötliche Flecke auf gelbem Grund. Der Nachweis wird durch dieses Verfahren allerdings nicht empfindlicher gestaltet.

Enzym- und Substratlösungen

Als Enzymquelle für den Nachweis mit Urease dient eine Lösung von 30 mg Enzym (E.C. 3.5.1.5, Serva, 250 U/mg) in 10 ml 10^{-6} M Phosphatpuffer pH 7.0 und als Substrat eine solche von 500 mg Harnstoff in 12.5 ml 0.01 % Bromthymolblau-Lösung, die mit Na_2CO_3 auf pH 7.0 eingestellt wurde. Eine ausführliche

Beschreibung des enzymatischen Hemmtests erfolgte an anderer Stelle¹⁸.

Die Herstellung der Enzympräparation und Substratlösung für die Untersuchungen mit Rinderleberesterase erfolgte in Anlehnung an ACKERMANN²², doch wurde, wie schon früher beschrieben²¹, das Homogenisieren der Leber und die Verdünnung der Enzympräparation mit 0.02 M Phosphatpuffer pH 7.0 durchgeführt. Für das Besprühen der Platte wurde eine etwa 1:60 (w/v) verdünnte Enzymlösung genommen. Als Substrat diente Naphthylacetat, als Kupplungsreagenz Echtblausalz B.

Als Enzymquelle für den Nachweis mit Hilfe der Amylase-Hemmung diente α -Amylase aus *Bacterium subtilis* (E.C. 3.2.1.1, Merck, 170 U/mg) oder β -Amylase aus Gerste (E.C. 3.2.1.2, Merck, 28 U/mg), als Substrat eine Lösung von löslicher Stärke in Puffer. Die Durchführung des enzymatischen Hemmtests wurde an anderer Stelle²³ ausführlich beschrieben. Es empfiehlt sich jedoch ein kräftiges Sprühen mit Jod, um auch schwächere Hemmflecke sichtbar zu machen.

Durchführung des enzymatischen Hemmtests

Die Platten wurden nach dem Entwickeln ohne weitere Vorbehandlung sofort mit Enzym besprüht und eine halbe Stunde bei 25° und 80–90% Luftfeuchte inkubiert. Anschliessend wird mit Substrat besprüht und entsprechend der jeweiligen Methode^{18, 21–22} weiterbehandelt.

TABELLE II

$R_F \times 100$ -WERTE UND UNTERE NACHWEISGRENZEN VON QUECKSILBER-FUNGIZIDEN INFOLGE HEMMUNG DER UREASE-AKTIVITÄT

Laufmittel, Benzol-Aceton (90:10); F = Fahnenbildung.

Wirkstoff	$R_F \times 100$ -Wert	Untere Nachweisgrenze (μ g)
Methylquecksilberchlorid	79 F	0.5 (0.4 Hg)
	0	1.0 (0.8 Hg)
Methylquecksilbersulfat	0	0.1 (0.08 Hg)
Methoxyäthylquecksilberchlorid	75	60.0 (40.5 Hg)
	50	0.05 (0.03 Hg)
	35	10.0 (6.8 Hg)
	18	2.0 (1.4 Hg)
	0	10.0 (6.8 Hg)
Phenylquecksilberacetat	97 F	10.0 (6.0 Hg)
	77 F	0.05 (0.03 Hg)
Methylquecksilbermercaptopbenzoat	77 F	1.0 (0.5 Hg)
	0	0.5 (0.3 Hg)
Phenylquecksilberbrenzcatechin	95	0.1 (0.05 Hg)
	78	0.4 (0.2 Hg)
	29	4.0 (2.1 Hg)
	0	4.0 (2.1 Hg)
Methylquecksilberhydroxychinolat	75	0.7 (0.4 Hg)
	58	50.0 (28.0 Hg)
	25	10.0 (5.6 Hg)
	0	0.1 (0.06 Hg)
Methylquecksilbercyanoguanidin	74	10.0 (6.7 Hg)
	0	0.1 (0.07 Hg)
Methylquecksilberchlorendicsäureimid	85	1.0 (0.34 Hg)
	50	7.0 (2.4 Hg)
	0	3.0 (1.03 Hg)

TABELLE III

RF X 100-WERTE UND UNTERE NACHWEISGRENZEN VON QUECKSILBER-FUNGIZIDEN INFOLGE HEMMUNG DER LEBERESTERASE, α - UND β -AMYLASE
 Laufmittel, Cyclohexan-Aceton (4:1); w = weiße Flecke; (w) = helle Flecke mit Hemmhof; F = Fahnenbildung..

Wirkstoff	RF X 100-Werte Mit Urease zusätzl. Hemmfl.	Untere Nachweisgrenze (μ g) Leberesterase	α -Amylase	β -Amylase
Methylquecksilberchlorid	51 ^a F 31 0	100.0 (80.0 Hg) — 80.0 (64.0 Hg)	— 1.0 (0.8 Hg) 1.0 (0.8 Hg)	1.0 (0.8 Hg) — 1.0 (0.8 Hg) (w)
Methylquecksilbersulfat	47 0 ^a	— 7.0 (5.3 Hg)	— 7.0 (5.3 Hg)	— 10.0 (7.6 Hg) (w)
Methoxyäthylquecksilberchlorid	38 ^a F 30 20 12 0	20.0 (13.5 Hg) — — — —	3.0 (2.1 Hg) — — 20.0 (13.5 Hg) 30.0 (20.2 Hg)	0.5 (0.3 Hg) — — — —
Phenylquecksilberacetat	56 ^a F 0 43	100.0 (59.6 Hg) — 10.0 (6.0 Hg)	9.0 (5.3 Hg) 3.0 (1.8 Hg) 1.0 (0.6 Hg)	— — 0.5 (0.3 Hg) 0.5 (0.3 Hg) (w) 1.0 (0.5 Hg)
Methylquecksilbermercaptobenzoat	43 0 ^a	— —	— 3.0 (1.5 Hg)	— —
Phenylquecksilberbrenzcatechin	79 ^a 54 ^a F 36 14 0	— — 10.0 (5.1 Hg) — 5.0 (2.6 Hg)	1.0 (0.5 Hg) 0.6 (0.3 Hg) — 1.0 (0.5 Hg) 3.0 (1.6 Hg)	— — — 1.0 (0.5 Hg) (w) 1.0 (0.5 Hg) (w) 1.0 (0.5 Hg)
Methylquecksilberhydroxychinolat	49 ^a F 38 16 0 ^a	— — — —	1.0 (0.6 Hg) 3.0 (1.7 Hg) 10.0 (5.6 Hg)	— — — 1.0 (0.6 Hg) (w) 1.0 (0.6 Hg) (w)
Methylquecksilbercyanoguanidin	48 ^a F 18	5.0 (2.8 Hg) —	3.0 (1.7 Hg) 50.0 (33.5 Hg)	10.0 (6.7 Hg) —
Methylquecksilberchlorendicsäureimid	0 ^a 59 47 ^a	50.0 (33.5 Hg) — —	1.0 (0.7 Hg) — 5.0 (1.7 Hg)	10.0 (6.7 Hg) (w) 0.2 (0.07 Hg) 1.0 (0.3 Hg)
	21 0	0.1 (0.03 Hg) 5.0 (1.7 Hg)	50.0 (17.2 Hg) 10.0 (3.4 Hg)	— 0.8 (0.3 Hg) 2.0 (0.7 Hg) (w)

^a RF X₁₀₀-Werte mit stärkster Urease-Hemmung.

TABELLE IV

$R_F \times 100$ -WERTE UND NACHWEISGRENZEN DER UNTERSUCHTEN QUECKSILBER-FUNGIZIDE BEI ANWENDUNG CHEMISCHER METHODEN
 Laufmittelsysteme: (A) Tetrachlorkohlenstoff-Aceton (7:3); (B) Benzol-Aceton (10:2); (C) Dioxan; (D) Chloroform-Essigester (10:4); (E) Iso-
 propyläther; (F) Isopropyläther-Isopropanol (7:3). F = Fahrenbildung.

Wirkstoff	$R_F \times 100$ -Werte						Nachweisgrenze (μg)		
	Bei chemischem Nachweis						UV GF ²³⁴	Na ₂ S	Dithizon
	Mit Urease	System A		System B		System C			
Methylquecksilberchlorid	75 0	68	80	66	37	67	—	5.0	1.0
Methylquecksilbersulfat	75 0	67	—	85	33	59	—	—	20.0
Methoxyäthylquecksilberchlorid	74 F 61	50	73	54	18	61	—	5.0	2.0
	38 0								
Phenylquecksilberacetat	84 F	70	77	78	61	88	—	5.0	5.0
Methylquecksilbermercaptopbenzoat	75 0	71 0-16 F	78 5-17 F	64 6 F	35 0-8 F	62 48 F	—	20.0	20.0
Phenylquecksilberbrenzcatechin	88 F	76	77	85	75	90	10.0	5.0	5.0
		70			63		10.0	—	—
Methylquecksilberhydroxychinolat	75 0	68	54	44	35	59	—	20.0	20.0
Methylquecksilbercyan Guanidin	74 0	67	—	85	47 F	29 F	20.0	—	—
				19 F	33	59	—	—	20.0
Methylquecksilberchloroendicsäureimid	68 23 16 0	68	73 68	76	35	67	10.0	1.0	0.5

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter den hier angewandten Bedingungen lassen sich alle neun untersuchten Verbindungen zum Teil recht empfindlich nachweisen. Einer sauberen Trennung der Wirkstoffe steht jedoch — vor allem beim DC-enzymatischen Nachweis — ihre grosse Uneinheitlichkeit entgegen. Im Urease-Hemmtest sind teilweise bis zu fünf (Tabelle II) und mit den übrigen untersuchten Enzymen bis zu vier (Tabelle III) Substanzen festzustellen. Für die Interpretation der Ergebnisse wirkt erschwerend, dass nicht sicher entschieden werden kann, ob die in den enzymatischen Hemmtests nachgewiesenen Verunreinigungen der Wirkstoffe Quecksilber enthalten. Für eine derartige Beweisführung erwiesen sich die für Schwermetalle spezifischen Sprühreagenzien Natriumsulfid und Dithizon als zu wenig empfindlich und täuschten daher auch eine relativ grosse Einheitlichkeit der untersuchten Verbindungen vor (Tabelle IV).

Aus diesem Grunde kommt den empfindlicheren enzymatischen Nachweisverfahren eine besondere Bedeutung zu, da sie die Identifizierung von üblicherweise nicht feststellbaren Verunreinigungen, die durch ihre hohe biologische Wirksamkeit gefährlich werden könnten, ermöglichen. In diesem Zusammenhang sollte auch auf die grosse Toxizität der Dialkylquecksilber-Verbindungen hingewiesen werden. Diese im technischen Herstellungsprozess gefürchteten Verbindungen entstehen leicht bei der Produktion der Methyl- oder Äthylquecksilber-Vorprodukte und könnten als Spuren in die Wirkstoffe gelangen oder aus ihnen entstehen, wie von WOOD *et al.*¹⁰ nachgewiesen wurde.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, eignet sich Urease ganz besonders zum Nachweis von Quecksilber-Fungiziden. Die Nachweisempfindlichkeiten sind recht unterschiedlich. Am besten lassen sich Methoxyäthylquecksilberchlorid und Phenylquecksilberacetat mit je 50 ng nachweisen, wobei beide Substanzen auf Quecksilberbasis in die Nähe von HgCl_2 kommen¹⁸. Stellt man den Vergleich auf Quecksilberbasis an, so schneiden auch Methylquecksilberhydroxychinolat mit 60 ng, Methylquecksilbercyanoguanidin mit 70 ng und Methylquecksilbersulfat mit 80 ng Hg recht gut ab. Das etwas schlechtere Abschneiden von Methylquecksilberchlorid im Vergleich zu den bisher genannten Wirkstoffen dürfte auf die grosse Flüchtigkeit dieser Verbindung zurückzuführen sein. Dennoch könnte die hier gefundene Nachweisgrenze von 0.5 μg durchaus mit bisher publizierten konkurrieren.

Die Ergebnisse in Tabelle II zeigen weiter, dass der Urease-Hemmtest sich vor allem auch zum Nachweis von eventuell toxikologisch bedeutsamen Verunreinigungen zu eignen scheint. Die in der Tabelle angegebenen Auftragsmengen an Gesamtsubstanz, bei denen die einzelnen Komponenten gerade noch nachzuweisen sind, sagen zwangsläufig nichts über die eigentliche Hemmstärke dieser Substanzen aus, da ihr Anteil am Wirkstoff und ihre Struktur unbekannt sind. Es ist daher durchaus denkbar, dass eine Substanz, die schon bei relativ hoher Auftragsmenge nicht mehr nachzuweisen ist, dennoch den stärksten Urease-Hemmer darstellt, ihr Anteil an der Gesamtsubstanz aber verschwindend gering ist. Dieses Testverfahren ermöglicht daher in der vorliegenden Form keine quantitativen Aussagen.

Auch andere Enzyme können zum Nachweis von Organoquecksilber-Verbin-

dungen herangezogen werden, wie Tabelle III zeigt. Diese eignen sich jedoch in der Regel nicht so gut zum Erfassen von Verunreinigungen wie die Urease. Auch die untere Nachweisgrenze liegt in der Regel ungünstiger. Die mit Esterase zu erfassenden Konzentrationen bewegen sich in den meisten Fällen zwischen 100 und 5 μg , lediglich Methylquecksilberchlorendicsäureimid (Memmi) ist mit Esterase empfindlicher nachzuweisen als mit Urease. In der Regel wird mit Leberesterase nur eine Substanz erfasst, die in den meisten Fällen mit der am empfindlichsten durch Urease nachzuweisenden übereinstimmt. Von dieser Regel macht Memmi eine deutliche Ausnahme; denn hier werden lediglich zwei, mit Urease nur bei hohen Auftragsmengen nachweisbare Bestandteile infolge empfindlicher Esterase-Hemmung nachgewiesen.

Bei Hemmtests mit α -Amylase treten teilweise bis zu drei neue, mit Urease nicht feststellbare Flecke auf, während Ureasehemmflecke andererseits verschwinden (Tabelle III). Unverständlich ist das Erscheinen von weissen Flecken auf schwach bläulichem Grund, wenn man die Jodlösung etwas früher als üblich sprüht. Eine Aktivierung der Amylase kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber recht unwahrscheinlich. Eher könnte man eine Reduktion des Jods zum Jodid durch eine Verunreinigung in den Wirkstoffen in Betracht ziehen, doch ist eine Klärung dieser Frage erst möglich, wenn alle Bestandteile in den Wirkstofflösungen bekannt sind und in reiner Form vorliegen.

Der β -Amylase-Hemmtest zeigt ähnliche Ergebnisse wie der Esterase-Hemmtest, er gestaltet sich jedoch wesentlich empfindlicher. Auch hier treten gelegentlich weisse Flecke mit blauem Hof — vornehmlich am Start — auf. Die früher beobachtete grössere Empfindlichkeit der β -Amylase im Vergleich zur α -Amylase^{23,24} ist hier nicht vergleichbar, da die Hemmflecke nur teilweise übereinstimmen.

In Tabelle IV wird eine mit Hilfe des DC-enzymatischen Nachweises erzielte Trennung jener mit chemischen Mitteln erhaltenen gegenübergestellt. Auf den ersten Blick ergibt sich, dass mit Hilfe der Urease-Hemmung im grossen und ganzen mehr Substanzen in den Wirkstoffen nachzuweisen sind, während mit chemischen Methoden nur eine, höchstens zwei Verbindungen in einem Wirkstoff vorzuliegen scheinen. Welcher Methode man im Falle von Rückstandsuntersuchungen den Vorzug geben soll, sollte auch im Hinblick auf die empfindlicheren Nachweisgrenzen des Urease-Systems nicht schwerfallen. Der Nachteil des DC-enzymatischen Nachweises liegt darin, dass eine solche Vielzahl von Substanzen erfasst wird, dass sie auf DC-Platten kaum zu trennen sein werden.

Bei Anwendung des chemischen Nachweises sind die Hauptbestandteile der neun Wirkstoffe relativ leicht voneinander zu trennen (Tabelle IV). Als Gruppe lassen sich die Verbindungen 1,2,5 und 7-9 mit Isopropyläther als Laufmittel gut von den Verbindungen 3,4 und 6 abtrennen. Diese beiden Gruppen können dann mit Chloroform-Essigester (10:4) aufgetrennt werden. Bei einer zweidimensionalen Chromatographie stören zum Teil die Schwanzbildungen der Substanzen 5 und 7.

DANK

Unser besonderer Dank gilt Frau R. ARLT, Frau H. BENDEL und Frau I. BLEICH für die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche sowie den Firmen Bayer, Fahlberg-List und Velsicol für die freundliche Überlassung von Wirkstoffen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Möglichkeiten eines Nachweises von Quecksilber-Fungiziden mit Hilfe von DC-enzymatischen und chemischen Verfahren, werden untersucht. Dabei zeigt sich, dass der Nachweis mit Urease hochempfindlich ist und bis zu fünf Substanzen pro Fungizid nachgewiesen werden können. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 50 ng und 1 μg für die Hauptbestandteile und zwischen 1 und 60 μg für die Verunreinigungen. Auch Rinderleberesterase, α - und β -Amylase werden gehemmt und können zum Nachweis herangezogen werden, doch sind die Nachweisgrenzen in der Regel ungünstiger.

Der chemische Nachweis mit Natriumsulfid und Dithizon gestaltet sich im Vergleich zu Urease unempfindlicher. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0.5 und 20 μg , und es erscheinen nur maximal zwei Substanzflecke. Mit Hilfe von zwei Laufmittelsystemen, Isopropyläther und Chloroform-Essigester (10:4), und chemischem Nachweis ist eine Trennung der neun untersuchten Quecksilber-Fungizide möglich.

APPENDIX

In der BRD ist aufgrund der "Verordnung über Anwendungsverbote und -beschränkungen für Pflanzenschutzmittel" vom 23. Juli 1971 die Anwendung von Quecksilber-Verbindungen nur zulässig als Saatgutbeizmittel bei Getreide, Gräsern, landwirtschaftlichen Leguminosen, Öl- und Futterpflanzen, Zierpflanzen einschliesslich Blumenzwiebeln und -knollen sowie Hackfrüchten ausser Kartoffeln. Darüber hinaus sind Bestrebungen im Gange, in einer Novellierung der obigen Verordnung die Anwendung von Quecksilber-Verbindungen weiter einzuschränken, so dass diese nur noch als Saatgutbeizmittel bei Getreide, ausser Mais, angewendet werden dürfen.

LITERATUR

- 1 P. NUORTEVA, *Naturwiss. Rundsch.*, 24 (1971) 233.
- 2 *Deutsches Arzneibuch*, 7. Aufl., Wissensch. Verlagsgesellsch. MBH, Stuttgart, 1968.
- 3 E. MUTSCHLER, *Arzneimittelwirkungen, ein Lehrbuch der Pharmakologie*, Wissensch. Verlagsgesellsch. MBH, Stuttgart, 1970, S. 302.
- 4 H. AUERHOFF, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, 5 Aufl., Wissensch. Verlagsgesellsch. MBH, Stuttgart, 1968, S. 68-71.
- 5 M. UCHIDA, K. HIRAKAWA UND T. INONE, *Kumamoto Med. J.*, 14 (1961) 181.
- 6 C. RAMEL, *Fauna Flora*, 63 (1968) 196.
- 7 C. RAMEL, *Hereditas*, 61 (1969) 208.
- 8 G. WESTÖB, *Acta Chem. Scand.*, 20 (1966) 2131.
- 9 A. KIVIMÄE, Å. SWENSSON, U. ULFVARSSON UND G. WESTÖB, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 1014.
- 10 J. M. WOOD, F. S. KENNEDY UND C. G. ROSÉN, *Nature*, 220 (1968) 173.
- 11 S. JENSEN UND A. JERNELÖV, *Nature*, 223 (1969) 753.
- 12 L. BERTILSSON UND H. Y. NEUJAHN, *Biochemistry*, 10 (1971) 2805.
- 13 N. A. SMART, *Res. Rev.*, 23 (1968) 1.
- 14 I. KANAZAWA UND R. SATO, *Bunseki Kagaku (Jap. Anal.)*, 8 (1959) 322; *C. A.*, 60 (1964) 10707 a.
- 15 K. SERA, M. KANDA, A. MURAKAMI, Y. SERA, K. KONDO UND T. YANAGI, *Kumamoto Med. J.*, 15 (1962) 38; *Anal. Abstr.*, 10 (1963) 1235.
- 16 J. O' G. TATTON UND P. L. WAGSTAFFE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 284.
- 17 G. W. JOHNSON UND C. VICKERS, *Analyst London*, 95 (1970) 356.

- 18 F. GEIKE, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 258 (1972) 284.
- 19 H. KLÖS, H. SCHLÖR UND K.-J. SCHMIDT, *Deut. Pat.*, 1 177 638, 1965.
- 20 K. H. SLOTTA UND K. R. JACOBI, *J. Prakt. Chem.*, 120 (1929) 272.
- 21 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 22 H. ACKERMANN, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 309.
- 23 F. GEIKE, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 203.
- 24 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 343.

J. Chromatogr., 72 (1972) 153-163