

CHROM. 6760

ZUM METABOLISMUS VON PHENYLHARNSTOFFEN

I. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UND NACHWEIS VON ALIPHATISCHEN HYDROXYLAMINEN NEBEN NIEDEREN AMINEN*

INGOLF SCHUPHAN und FRIEDBERND GEIKE

Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D1 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 29. März 1973)

SUMMARY

Metabolism of phenylureas. I. Thin-layer chromatographic separation and identification of aliphatic hydroxylamines in the presence of aliphatic amines

Methyl-substituted hydroxylamines, which can be formed as metabolites from various pesticides, were easily separated in the presence of alkylamines by thin-layer chromatography (TLC). The volatile hydroxylamines were steam-distilled from crop samples, concentrated in diluted hydrochloric acid and then chromatographed as hydrochlorides in dioxane-ethanol-1 *N* HCl (3:3:1) on cellulose layers. To ensure the identity of the hydroxylamines, they were converted to 2,4-dinitrophenyl and 4-chlorophenylcarbamoyl derivatives. These compounds could be separated by thin-layer chromatography on silica gel using several solvent systems. The detection limits were in the range of 1 μg for the hydrochlorides up to 0.1 μg for the 2,4-dinitrophenyl and 4-chlorophenylcarbamoyl derivatives.

EINLEITUNG

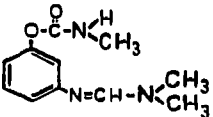
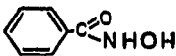
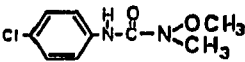
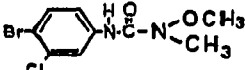
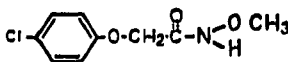
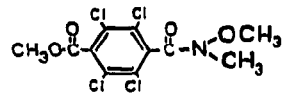
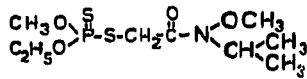
Zahlreiche Pflanzenschutzmittel enthalten in ihrem Molekül niedere aliphatische Amin- und Hydroxylamingruppierungen (Tabelle I), die im Verlauf des Stoffwechsels als freie Verbindungen entstehen können, jedoch bisher nur in wenigen Fällen einem empfindlichen Nachweis zugänglich waren, so dass ihr Entstehen während des Metabolismus dieser Pflanzenschutzmittel nur vermutet wurde.

Eine grosse Anzahl aliphatischer Amin- und Hydroxylamingruppierungen sind in den verschiedenen Herbizid-, Insektizid- und Fungizidklassen zu finden. Als Amide von Carbonsäurederivaten finden sie sich in den substituierten Harnstoffen, den Carbamaten, Thio- und Dithiocarbamaten, während sie als Amine in einer grossen Anzahl von Triazinen enthalten sind. Für Untersuchungen zum Metabolismus ist

* Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie wird für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des koordinierten Forschungsprogrammes "Herbizide unter Umweltgesichtspunkten" gedankt.

TABELLE I

BEISPIELE VON PFLANZENSCHUTZMITTELN MIT MÖGLICHERWEISE IM STOFFWECHSEL FREIWERDENDEN AMIN- UND HYDROXYLAMINGRUPPIERUNGEN

Struktur	Chemische Bezeichnung	Anwendung
	3-(N',N'-Dimethylaminomethylenimino)-phenyl-methylcarbamat Formetanat (Schering).	Akarizid Insektizid
	Benzhydroxamsäure (Bayer)	Fungizid
	3-(4-Chlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff Monolinuron (Hoechst)	Herbizid
	3-(3-Chlor-4-bromphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff C 6313 (Ciba)	Herbizid
	4-Chlorphenoxyessigsäure-O-methylamid (Velsicol)	Herbizid
	N-Methoxy-N-methyl-2,3,5,6-tetrachlor-4-carbomethoxy-benzamid (Velsicol)	Herbizid
	O-Methyl-O-äthyl-S-(N-isopropyl-N-methoxy-carbonylmethyl)-dithiophosphorsäureester (Velsicol)	Herbizid

der Nachweis dieser als Amine und Hydroxylamine abspaltbaren Gruppen wichtig, um Aussagen über mögliche Abbauege und damit die angreifenden Enzyme sowie die Persistenz der Substanzen machen zu können.

Einige papier- und dünnschichtchromatographische Nachweisverfahren aliphatischer Amine sind bereits bekannt¹⁻⁴. Unberücksichtigt blieben dabei jedoch die aliphatischen Hydroxylamine, von denen lediglich für das N,O-Dimethylhydroxylamin ein dünnschichtchromatographischer Nachweis vorliegt⁵.

In der hier vorliegenden Arbeit wird speziell das Trenn- und Nachweisverhalten aliphatischer Hydroxylamine in Gegenwart einiger niederer aliphatischer Amine berücksichtigt, wobei ein grösserer Wert auf eine saubere Trennung als eine hohe Nachweisempfindlichkeit gelegt wurde, denn diese Methoden dienen als Grundlage

für Metabolismusstudien mit ^{14}C -markierten Wirkstoffen. Markierte Substanzen aber können bekanntlich aufgrund ihrer Strahlung hinreichend empfindlich erkannt werden. Zur Sicherung der Hydroxylamin-Identität wurden neben dem Trenn- und Nachweisverfahren der Hydroxylamine in Form ihrer Hydrochloride je zwei weitere Derivate der untersuchten Substanzen hergestellt und diese ebenfalls dünnschichtchromatographisch getrennt und nachgewiesen. Dabei musste besonders auf die zwei verschiedenartig gebundenen Wasserstoffatome geachtet werden, die beide Ausgangspunkt möglicher Derivatbildung sein können.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien zur Chromatographie und Derivatbildung

Die zur Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel (Merck) waren analysenrein. Zur Plattenbeschichtung⁶ wurden je 4 g Cellulose, mikrokristallin "Avicel" (Merck), in 16.5 ml Wasser oder 5.7 g Kieselgel G oder GF₂₅₄ nach Stahl mit ca. 13% CaSO₄, mittlere Korngrösse 10–40 μ , in 15 ml Wasser verwendet. Zur Derivatbildung wurde 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (p.a. Merck) und 4-Chlorphenylisocyanat (Ega) verwendet.

Die Detektion der Hydroxylaminhydrochloride erfolgte mit Ninhydrin: 2 g Ninhydrin (p.a. Merck) werden in 40 ml Wasser erwärmt, mit einer Lösung aus 80 g Zinn(II)chlorid in 50 ml Wasser versetzt und der Niederschlag abfiltriert. 50 ml dieser Stammlösung werden mit 50 ml Wasser und 450 ml Isopropanol zu dem Sprühreagenz verdünnt. Nach dem Besprühen hält man die Platten 30 min bei 80°.

Die 2,4-Dinitrophenyl(DNP)-Derivate der Amine und Hydroxylamine sind bereits aufgrund ihrer Eigenfärbung sichtbar. Auf Kieselgel GF₂₅₄ wird die Nachweisgrenze bei Ausnutzung der Fluoreszenzlösung unter dem UV-Licht (254 nm) um etwa den Faktor 5 verbessert.

Zum Nachweis der 4-Chlorphenylcarbamoyl (CPC)-Derivate wurde N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichlorid (p.a. Merck) benutzt. Dazu wird die chromatographierte Platte mit Eisessig-Äthanol (3:1) besprüht und 15 min bei 150° gehalten⁷. Das entstandene 4-Chloranilin wird mit einem frisch bereiteten Gemisch einer 0.3 N Natriumnitrit- und 2 N wässrigen Salzsäurelösung (1:1) diazotiert (ca. 1 ml/Platte) und mit einer 0.01 M wässrigen N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichloridlösung gekuppelt (ca. 1 ml/Platte). Die Flecke erscheinen rosa auf weissem Grund.

Herstellung der Substanzen

N-Monosubstituierte Hydroxylamine werden durch äquimolare Mengen Dimethylsulfat zuerst am Sauerstoff methyliert. Nach Zugabe eines weiteren Mols Dimethylsulfat erfolgt Methylierung am Stickstoff. Bei einer Acylierung reagiert dagegen zuerst der N-ständige Wasserstoff. Danach geht eine weitere Acylgruppe die O-Bindung ein.

1-Fluor-2,4-dinitrobenzol vermag offensichtlich aus sterischen Gründen nur am Stickstoff zu substituieren. Mit 4-Chlorphenylisocyanat reagieren monosubstituierte Hydroxylamine einheitlich zu 4-Chlorphenylcarbamoylderivaten, also zu substituierten Phenylharnstoffen^{8–10}.

Hydroxylaminhydrochloride. N,O-Dimethylhydroxylamin **1** kann über die Reaktion von Nitrit mit Natriumdisulfit zum Fremysalz und sukzessiver Methylierung

runge¹¹ hergestellt werden. Ausserdem wurde es aus 3-(4-Chlorphenyl)-1-methyl-1-methoxyharnstoff (Monolinuron) durch alkalische Hydrolyse und anschliessende Destillation bei 60° (15-cm Kolonnenrohr, gefüllt mit NaOH-Rotolies) in einer Ausbeute von 78% erhalten. Durch Einleiten von HCl-Gas erhält man das Hydrochlorid. O-Methylhydroxylamin **2** wurde ebenfalls über das Fremysalz durch Methylierung mit Dimethylsulfat synthetisiert¹²⁻¹⁴. N-Methylhydroxylamin **3** wurde durch Reduktion von Nitromethan mit Zinkstaub hergestellt^{15,16}. Die Hydroxylaminhydrochloride **1-3** werden durch Umkristallisation aus absolutem Äthanol gereinigt.

Hydroxylamindinitrophenyl-derivate. Die präparative Darstellung der DNP-Derivate erfolgte durch Umsetzen von 0.02 Mol Hydroxylamin (bzw. Amin) mit 0.02 Mol 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol. Bei Verwendung der Hydrochloride wurde in wässriger Lösung (2 ml) unter Zusatz von 0.5 g Na₂CO₃ gearbeitet. Dabei kann mit Ausnahme der Verbindungen **10** und **11** bis 60° erhitzt werden. Alle Substanzen fallen kristallin an und können aus Alkohol umkristallisiert werden. Die Substanzen **10** und **11** reinigt man ohne Erwärmung durch Umfällen aus 1 N NaOH mit 1 N HCl (Farbumschlag der Lösung von schwarz nach gelbrot).

Hydroxylamin-(4-chlorphenyl)-carbamoylderivate. Verbindung **22** entsteht durch Reaktion von Hydroxylaminhydrochlorid mit 4-Chlorphenylisocyanat⁸. Aus Verbindung **22** wird durch Methylierung mit einem Mol Dimethylsulfat Verbindung **20** und mit 2 Molen Dimethylsulfat Verbindung **19** erhalten^{17,18}. Daneben kann Verbindung **20** auch durch Umsetzung von 4-Chlorphenylisocyanat mit O-Methylhydroxylamin¹⁰ hergestellt werden. Nach dem gleichen Verfahren entsteht auch Verbindung **21*** aus N-Methylhydroxylamin und 4-Chlorphenylisocyanat⁹.

DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE UND ERGEBNISSE

(1) *Trennung und Nachweis als Hydroxylaminhydrochloride*

Trennung und Nachweis von Hydroxylaminen als Hydrochloride ist eine der naheliegendsten Möglichkeiten. Hierbei müssen jedoch wässrige Laufmittelgemische eingesetzt werden, wodurch ein Arbeiten mit allgemein gängigen Sorptionsmitteln, wie Kieselgel und Aluminiumoxid, sehr erschwert wird.

Aus diesem Grunde wurde bisher eine Anzahl Amine als Hydrochloride in Anlehnung an Aminosäuretrennungen nicht mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC), sondern papierchromatographisch untersucht¹. Da die DC jedoch viele Vorteile bietet, wurde hier mit Celluloseschichten gearbeitet, die sich für eine DC-Trennung von Aminen und Hydroxylaminen in Form ihrer Hydrochloride bewährten. Als besonders geeignet erwies sich ein Laufmittelgemisch aus Dioxan-Alkohol-1 N HCl (3:3:1) (Tabelle II). Mit Hilfe von Ninhydrin als Sprühreagenz können Substanzflecke zwischen 1-10 µg sichtbar gemacht werden.

Ein Arbeiten mit Hydrochloriden in wässriger Lösung hat gegenüber dem Arbeiten mit freien Aminen den Vorteil, dass Lösungen gefahrlos auf ein kleines Volumen konzentriert werden können, ohne dass ein Substanzverlust infolge zu hoher Flüchtigkeit zu erwarten wäre. So konnten 1 mg N-Methyl-, O-Methyl- und N,O-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid in 5 ml 0.1 N HCl quantitativ wiederge-

* Für eine zur Verfügung gestellte Vergleichsprobe sei den Farbwerken Hoechst AG vielmals gedankt.

TABELLE II

$R_F \times 100$ -WERTE VON HYDROXYLAMINHYDROCHLORIDEN IM VERGLEICH ZU EINIGEN AMINHYDROCHLORIDEN*

Sorptionsmaterial: Cellulose mikrokristallin "Avicel"; Laufmittelsysteme: (A) Alkohol-konz. HCl (100:1); (B) Dioxan-Alkohol-1 N HCl (3:3:1); Sprühreagenz: Ninhydrin. (Z) = Zersetzung; (S) = Sublimation.

Nr.	Verbindung· HCl	Fp. (°C)	$R_F \times 100$ -Wert		Farbe mit Ninhydrin
			A	B	
1	$\begin{array}{l} \text{CH}_3\text{O} \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{NH}$	115-116	38	52	rosa
2	$\begin{array}{l} \text{CH}_3\text{O} \\ \text{H} \end{array} \text{NH}$	148-149	33	42	gelb
3	$\begin{array}{l} \text{HO} \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{NH}$	88- 89	35	49	gelb
4	$\begin{array}{l} \text{HO} \\ \text{H} \end{array} \text{NH}$	153 (Z)	30	39	gelb
5	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{NH}$	170-172	23	37	violett
6	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{H} \end{array} \text{NH}$	232 (S)	18	30	violett
7	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$		62	64	orange

* Mittelwerte aus acht Bestimmungen.

funden werden, nachdem sie auf ein Volumen von 100 μl bei 40° am Rotationsverdampfer eingengt worden waren.

Durch kombinierte Destillation der freien Hydroxylamine aus einem Pflanzenhomogenat mit Anreicherung durch Einengen des salzsauren Destillates können mit Hilfe der DC niedere Hydroxylamine bis hinunter in den μg -Bereich nachgewiesen werden.

So wurden 10 g Kartoffel mit je 1 mg der Hydroxylamine 1-3 im Ultraturrax mazeriert und auf ein Volumen von 15 ml gebracht. Ein Milliliter der Suspension wurde in einer Mikrodestillationsapparatur* mit 1 ml 8 N NaOH versetzt, durch Einleiten von Stickstoff bei 100° wasserdampfdestilliert und in zwei hintereinandergeschalteten Vorlagen mit je 4 ml 0.1 N HCl aufgefangen. Das Destillat wird am Vacuumrotationsverdampfer bis eben zur Trockne eingengt und mit 100 μl Äthanol

* Glastechnische Werkstätten, Rheinallee 68, 65 Mainz, B.R.D.

TABELLE III

WERTE DER ELEMENTARANALYSE UND $R_F \times 100$ -WERTE VON DINITROPHENYLDERIVATEN EINIGER HYDROXYLAMINE UND NIEDERER AMINE

Sorptionsmaterial: Kieselgel G; Laufmittelsysteme: (A) Toluol; (B) Chloroform-Hexan (5:1); (C) Diisopropyläther-Chloroform-*n*-Hexan (1:1:1); Flecken durch Eigenfärbung sichtbar. (S)=Sublimation, (Z)=Zersetzung, (Gef.)=failing.

Nr.	Verbindung	Fp. (°C)	Analysewerte						$R_F \times 100$ -Wert		
			C		H		N		A	B	C
			Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.			
8	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	85-87	42.3	41.9	4.0	3.7	18.5	18.7	35	53	50
9	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{H} \end{array}$	108-109	39.4	39.3	3.3	3.1	19.7	19.6	24	34	42
10	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	176-77 (S)	39.4	39.6	3.3	3.3	19.7	19.6	20	44	28
11	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{H} \end{array}$	76-77 (Z)	36.2	36.7	2.5	2.6	21.1	20.1	25	43	37
12	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	74-75	45.5	45.0	4.3	3.7	19.9	20.4	25	46	36
13	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N-DNP} \\ \\ \text{H} \end{array}$	181-182 (S)	42.6	43.2	3.6	3.5	21.3	21.7	24	43	26

aufgenommen. Davon werden 25 μ l auf eine mit Cellulose beschichtete Platte aufgetragen und in Laufmittel B (Tabelle II) entwickelt. Alle drei Substanzen (theoretisch vorliegende Menge 17 μ g) sind ungestört neben codestillierten Kartoffelinhaltstoffen gut nachweisbar.

(2) Trennung und Nachweis der Hydroxylamine als DNP-Derivate

Die Umsetzung von Hydroxylaminen zu ihren DNP-Derivaten gelingt sowohl unter präparativen als auch analytischen Bedingungen leicht. Die DNP-Derivate ermöglichen eine gute Trennung auf Kieselgel G-Platten, wobei sich durch ihre starke Eigenfärbung ein Sprühreagenz erübrigt.

DNP-^{3,19-27}, 3,5-Dinitrophenyl-² und 4-Dimethylamino-3,5-dinitrobenzoesäure-^{4,22} Derivate einiger Amine wurden bereits dünn-schichtchromatographisch untersucht, doch waren die Hydroxylamine hierbei nicht berücksichtigt worden. Sie lassen sich, wie Tabelle III zeigt, als DNP-Derivate sicher nachweisen und trennen, wobei als Laufmittel Diisopropyläther-Chloroform-*n*-Hexan (1:1:1) besonders geeignet erscheint. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei 1 μ g.

Der Nachweis von Hydroxylaminen in Extrakten wurde in ähnlicher Weise wie unter (1) durchgeführt: Das fast zur Trockne eingedampfte Destillat der Wasserdampfdestillation eines Kartoffelhomogenates (10 g Kartoffel + je 1 mg der Verbindungen 1 und 2) wurde mit 1 μ Mol 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) in 2 ml 1 *N* Na₂CO₃-Lösung zur Reaktion gebracht (15 min 40°), mit dreimal je 0.5 ml Äther gut ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherextrakte in einem 1-ml Schliffkölbchen mit Stickstoff gerade zur Trockne geblasen und mit 100 μ l Aceton aufgenommen. Ein Aliquot von 10 μ l wurde auf eine DC-Platte aufgetragen. Neben vier gefärbten Blindwertflecken (Verbindungen 14 und 17 und zwei unbekannt Substanzen) können die Verbindungen 1 und 2 als Verbindungen 8 und 9 ungestört identifiziert werden (Fig. 1). Nicht umgesetztes FDNB hydrolysiert, falls nicht in zu grossem Überschuss zugesetzt,

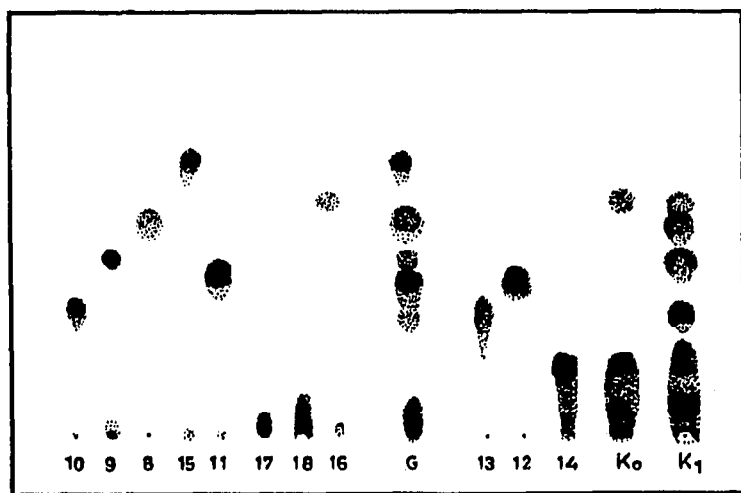


Fig. 1. Destillat eines Kartoffelhomogenates nach Reaktion mit FDNB. K₀=Unbehandelte Kartoffel, K₁=mit den Verbindungen 1, 2 und 3 behandelte Kartoffel; G=Gemisch der Testverbindungen 8-11, 17 und 18 (1 μ g/Verbindung).

zum 2,4-Dinitrophenol und stört den Nachweis der Hydroxylamine nicht. Bei Reaktion der Verbindungen 3 und 4 tritt im Falle eines Überschusses an FDNB häufig jeweils ein weiterer Fleck mit geringerem R_F -Wert als die Hauptverbindungen auf. Diese neu auftretenden Substanzen konnten bis jetzt durch Elementaranalyse nicht als Bis-dinitrophenylverbindungen —wie anfangs vermutet— nachgewiesen werden. Das Auftreten der Verbindung 14 ist wahrscheinlich auf Ammoniak zurückzuführen, das möglicherweise bei der Wasserdampfdestillation durch Zersetzung von Inhaltsstoffen der Kartoffel entsteht.

(3) *Trennung und Nachweis von Hydroxylaminen als CPC-Derivate*

Hydroxylamine reagieren mit 4-Chlorphenylcarbonylchlorid oder 4-Chlorphenylisocyanat glatt zu den entsprechenden CPC-Verbindungen. Arbeitet man in einem zweiphasigen System, z.B. Wasser–Dichlormethan, so verläuft die Reaktion zwar mit guten Ausbeuten⁸, doch bildet sich als Nebenprodukt stets der symmetrische 4,4'-Dichlordiphenylharnstoff 26.

Die Derivatbildung der Hydroxylamine zu den entsprechenden CPC-Verbindungen lässt sich zum analytischen Nachweis gut ausnutzen. Die CPC-Derivate stellen Phenylharnstoffe dar, die sich sicher mit Hilfe der DC trennen und nachweisen lassen und zum Teil als Umwandlungsprodukte von Phenylharnstoffherbiziden in Mikroorganismen und Pflanzen beschrieben wurden^{7,23,24}.

Der Nachweis erfolgt in folgender Weise: Salzsäure Wasserdampfdestillate mit den Hydroxylaminhydrochloriden werden im Vakuum im Kuderna–Danish-Kolben mit angeschlossenem 1-ml Schliffkölbchen gerade eben zur Trockne eingengt, mit 1 ml Toluol versetzt und unter Eiskühlung 10 sec lang mit einem feinen Ammoniakstrom begast. Nach Zugabe von 0.5 ml einer toluolischen Lösung von 4-Chlorphenylisocyanat (20 mg/ml) wird 1 Std. bei 35° gehalten und anschliessend die Lösung durch einen feinen Stickstoffstrom auf 1 ml eingengt. Von dieser Lösung werden 10 μ l auf eine DC-Platte aufgetragen, mit Chloroform–Methanol–Pyridin (100:5:1) entwickelt und nach saurer Hydrolyse zum Farbstoff gekuppelt. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.1 μ g der Harnstoffverbindung.

Durch Nebenreaktionen bei der Derivatbildung kann man neben wenig 4-Chlorphenylisocyanat 28 immer Verbindung 25 (CPC-Derivat des Ammoniaks) und den symmetrischen 4,4'-Dichlordiphenylharnstoff 26 nachweisen. Verbindung 26 stört nur den sicheren Nachweis von Verbindung 23. Bei einem grossen Überschuss an 4-Chlorphenylisocyanat entsteht bei der Reaktion mit dem Hydroxylamin 4 eine weitere Substanz mit dem $R_F \times 100$ -Wert von 52, bei der es sich möglicherweise um 4,4'-Dichlordiphenylhydroxybiuret handelt^{18,25}.

DISKUSSION

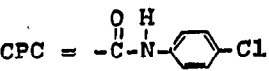
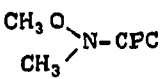
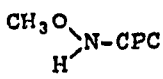
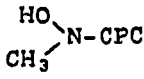
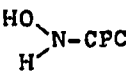
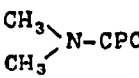
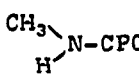
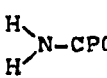
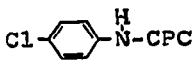
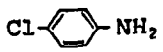
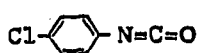
Mit Hilfe einer Kombination von Derivatbildung und DC-Trennung wird die sichere Identifizierung einer Reihe beim Abbau von Phenylharnstoffherbiziden zu erwartender Hydroxylamine 1–4 und niederer aliphatischer Amine bis hinab in den μ g-Bereich möglich. Es wurde versucht, durch Auswahl sehr unterschiedlicher Hydroxylaminderivate die Identifizierung der Verbindungen so sicher wie möglich zu gestalten und nicht nur die Identität auf mehrere R_F -Werte einer Ausgangsverbindung in verschiedenen Laufmitteln zu begründen.

Von allen drei beschriebenen Methoden ist die Trennung der Hydroxylamine über die Hydrochloride sicher die einfachste und schnellste Methode, jedoch ähneln sich manche Substanzen in ihrem chromatographischen Verhalten sehr stark. Beispielsweise sind die Verbindungen 1 und 3 als Hydrochloride (Tabelle II) nicht zweifelsfrei nebeneinander zu identifizieren, während sie als DNP- bzw. CPC-Derivate (Verbindungen 8 und 10 bzw. 19 und 21 der Tabellen III bzw. IV) ohne Schwierig-

TABELLE IV

$R_F \times 100$ -WERTE VON 4-CHLORPHENYLCARBA MOYL-DERIVATEN EINIGER HYDROXYLAMINE UND NIEDERER AMINE*

Sorptionsmaterial: Kieselgel G; Laufmittelsysteme: (A) Diisopropyläther; (B) Chloroform-Methanol-Pyridin (100:5:1).

Nr.	CPC = 	Fp. (°C)	$R_F \times 100$ -Wert	
			A	B
19		76-78	24	77
20		138-140	13	50
21		142-143	21	42
22		170-175 (Z)	12	15
23		174-175	17	57
24		243-244	4	28
25		205-207	2	11
26		309-310(S)	—	59
27		70-71	37	69
28		—	—	68

* Mittelwerte aus zehn Bestimmungen.

keiten zu trennen und identifizieren sind. Bei Arbeiten mit nicht radioaktiv markierten Substanzen ist bei geeigneter Arbeitsweise durch die Derivatbildung eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 10 möglich, wobei sich im Falle der DNP-Derivate ein Nachweis durch die starke Eigenfärbung der Verbindungen besonders einfach gestaltet.

Eine Umsetzung der Hydroxylaminhydrochloride zu den DNP-Derivaten direkt auf der DC-Platte —zur Vermeidung von Verlusten bei den Reaktions- und Ausschüttelvorgängen— gestaltet sich bei inaktiven Versuchen schwierig. Durch die wässrige, gesättigte Carbonatlösung (1 μ l) und einen nötigen grösseren FDNB-Überschuss kommt es zu einem tailing, das durch hydrolytische Umwandlung von FDNB 16 zur freien Phenolverbindung 18 während der Chromatographie begründet ist. Ein Zusatz von Glycin zur Beseitigung des Überschusses an FDNB wiederum führt zu einer Überladung des Startflecks und verursacht ebenfalls Schwanzbildung. Bei einem Nachweis der radioaktiven Hydroxylamine 1–3 ist die Methode der Derivatbildung auf der Platte jedoch gut praktikabel, da Überschüsse an Reagenzien den radioaktiven Nachweis nicht stören.

Eine Umsetzung der Hydroxylamine zu den entsprechenden CPC-Derivaten führt vor allem zu einer sicheren Trennung des unsubstituierten Hydroxylamins 4 und des Dimethylamins 5. Während diese sich weder als Hydrochloride noch als DNP-Derivate (Verbindungen 11 und 12) sicher unterscheiden lassen (Tabelle II und III), gelingt dies sehr gut in Form ihrer CPC-Derivate (Verbindungen 22 und 23 der Tabelle IV). Diese Trennmöglichkeit ist sehr wichtig, da das Dimethylamin 5 häufig in Proben anwesend ist, in denen das unsubstituierte Hydroxylamin 4 nachgewiesen werden soll. Die Nachweisempfindlichkeit entspricht jener der DNP-Derivate.

Die Reaktion der Hydroxylamine zu den CPC-Derivaten kann auch am Startpunkt der DC-Platte erfolgen, doch führen auch hier Reagenzienüberschüsse zu Schwierigkeiten bei der anschliessenden Detektion mit dem Sprühreagenz, die nur beim radioaktiven Arbeiten ohne Bedeutung sind.

Bei der Wasserdampfdestillation in neutraler Lösung werden Amidbindungen (im Gegensatz zur Destillation in alkalischem Medium) nicht gespalten. Dies ist wichtig, wenn die frei vorliegenden Amine und Hydroxylamine, die beispielsweise während des Metabolismus von Phenylharnstoffherbiziden entstehen können, im Wasserdampfdestillat nachgewiesen werden sollen. Auch während des Stoffwechsels ausgeschiedene gasförmige Amine und Hydroxylamine können in geschlossenen Systemen nach Adsorption in einer mit verdünnter Säure beschickten Vorlage und anschliessender Konzentrierung leicht nachgewiesen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Niedere aliphatische Hydroxylamine, die als Metaboliten verschiedener Pflanzenschutzmittel auftreten können, werden neben niederen Alkylaminen mit Hilfe der DC getrennt. Zur Trennung dieser wasserlöslichen, leicht flüchtigen Hydroxylamine in Form ihrer Hydrochloride eignen sich besonders Sorptionsschichten von Cellulose und als Laufmittel Dioxan-Alkohol-1 N HCl (3:3:1). Zur weiteren Sicherung der Identität wird die Herstellung von Hydroxylamin-2,4-dinitrophenyl (DNP)- und 4-Chlorphenylcarbamoyl (CPC)-Derivaten beschrieben. Diese lassen sich sehr gut auf Kieselgelschichten mit verschiedenen Laufmittelgemischen trennen. Alle drei Methoden erlauben einen Nachweis der Verbindungen zwischen 0.1–1 μ g pro Fleck.

LITERATUR

- 1 E. Stein von Kamienski, *Planta*, 50 (1957) 291.
- 2 M. Večeřa, B. Voláková, M. Kozáková und M. Jureček, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 25 (1960) 1281.
- 3 H.-J. Ilert und T. Hartmann, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 119.
- 4 I. P. G. Wirotama und K. H. Ney, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 166.
- 5 G. Engelhardt, P. R. Wallnöfer und R. Plapp, *Appl. Microbiol.*, 23 (1972) 664.
- 6 H. G. Henkel und W. Ebing, *J. Chromatogr.*, 14 (1964) 283.
- 7 H. G. Henkel, *Chimia*, 18 (1964) 252.
- 8 G. Steinbrunn BASF, *Deut. Pat.*, 1 127 344 (1960).
- 9 G. Steinbrunn BASF, *Deut. Pat.*, 1 129 151 (1960).
- 10 O. Scherer und P. Heller Farbwerke Hoechst AG, *Deut. Pat.*, 1 028 986 (1956).
- 11 O. Scherer und G. Schneider, Farbwerke Hoechst AG, *Deut. Pat.*, 1 1616 232 (1959).
- 12 O. Scherer, G. Hörlein, R. Hübner und G. Schneider, Farbwerke Hoechst AG, *Deut. Pat.*, 1 112 082 (1959).
- 13 H. Hjeds, *Acta Chem. Scand.*, 19 (1965) 1764.
- 14 Houben-Weyl und E. Müller (Herausgeber), *Methoden der organischen Chemie*, Band 10/1, Georg Thieme, Stuttgart, 1971, S. 1184.
- 15 E. Beckmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 365 (1909) 204.
- 16 M. Davis und N. A. Spiers, *J. Chem. Soc., London*, (1959) 3971.
- 17 O. Scherer und G. Hörlein, Farbwerke Hoechst AG, *Deut. Pat.*, 1 140 925 (1961).
- 18 O. Scherer, G. Hörlein und K. Härtel, *Angew. Chem.* 75 (1963) 854.
- 19 I. M. Lockhart, *Nature (London)*, 177 (1956) 393.
- 20 L. M. Libbey und E. A. Day, *J. Dairy Sci.*, 46 (1963) 598.
- 21 A. Zeman und I. P. G. Wirotama, *Z. Anal. Chem.*, 247 (1969) 155.
- 22 A. Zeman und I. P. G. Wirotama, *Z. Anal. Chem.*, 259 (1972) 351.
- 23 M. Schroeder, *Dissertation*, Kiel, 1969.
- 24 H. Börner, H. Burgemeister und M. Schroeder, *Z. Pflanzenk. Pflanzensch.*, 76 (1969) 385.
- 25 O. Exner, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 706.