

Kurze Mitteilungen

Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen). Bis zum 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Manuskripte können günstigenfalls am 15. des folgenden Monats veröffentlicht werden.

Bemerkungen zur Rückstandsanalytik von Carbaryl (N-Methyl-1-naphthyl-carbamat) *

Summary

The solubilities in water and eleven organic solvents are given for N-methyl-1-naphthylcarbamate (insecticide Sevin), as well as the distribution coefficients for Sevin between some solvent pairs. Since the Nernst' distribution law is fulfilled, no association takes place. The maximum attainable yields for the extraction of Sevin by various solvents are calculated. Finally, a method for cleaning extracts for the determination of Sevin residues in food-stuffs is suggested.

Zur Bestimmung der Rückstände von Pestiziden in pflanzlichen oder tierischen Produkten wird bevorzugt eine Methode angewendet, welche auf der Extraktion des Materials mit Hexan oder Petroläther und anschließender Beseitigung der mitgerissenen Begleitstoffe durch Verteilung in Acetonitril/Hexan basiert^{1,2}.

Bei der Rückstandsbestimmung von Carbaryl (in englischem Sprachbereich Sevin; N-Methyl-1-naphthyl-carbamate, Insektizid mit langer Dauerwirkung, vorwiegend Berührungsgift) wurden mit dieser Methode auffallend kleine Ausbeuten erzielt. Zur Abklärung möglicher Verlustquellen wurden die Löslichkeit und der Verteilungskoeffizient von Carbaryl in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittel-Paaren genauer untersucht.

Alle Untersuchungen wurden an einem Präparat unternommen, das aus technischem Carbaryl durch dreifache Umfällung (aus Methylenchloridlösung mit Hexan) zubereitet wurde. Der Schmelzpunkt der gereinigten Substanz beträgt 140,5°C (DSC); differentialkalorimetrisch wurde eine Reinheit von 99,2% (Mol.) ermittelt.

Löslichkeit von Carbaryl

Die Löslichkeit wurde bei 20,0 ± 0,5°C bestimmt. Es wurden folgende Mengen Carbaryl in 100 ml gesättigter Lösung gefunden:

16,6 g in Methylenchlorid	0,08 g in α -Pinen
16,1 g in Aceton	0,06 g in Cyclohexan
9,3 g in Acetonitril	0,05 g in Hexan
7,6 g in Äthylacetat	0,03 g in Heptan
5,2 g in Äthylalkohol	0,03 g in Acetonitril/ Wasser 80/20
0,63 g in Äthylenglykol	
0,58 g in Schwefelkohlenstoff	0,03 g in Wasser

Für die Reinigung des Carbaryls von Begleitstoffen kommen untereinander nicht mischbare Lösungsmittelpaare in Frage, deren eine Komponente in Wasser unbegrenzt löslich ist (z.B. Acetonitril). Die Verteilung

des Carbaryls zwischen diesen Lösungsmitteln wurde bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen der Wirksubstanz gaschromatographisch untersucht. Eine gewisse Einschränkung in Richtung höherer Konzentrationen ergibt sich daraus, daß zur Vermeidung der Bildung heterogener Systeme die (bei einigen Lösungsmitteln sehr niedrige) maximale Löslichkeit von Carbaryl nicht überschritten werden darf. Neben den Lösungsmittelpaaren, in denen als eine der Komponenten Acetonitril figuriert, wurden Gemische von Acetonitril und Wasser (20/80 und 60/40 Vol.-%) gegen Hexan angesetzt; diese Verhältnisse entsprechen etwa denjenigen der «clean up»-Verdünnung.

Alle Verteilungsbestimmungen wurden bei 20,0 ± 0,5°C durchgeführt, wobei die in Acetonitril gelöste Wirksubstanz zuerst mit dem anderen Lösungsmittel versetzt, 1 Stunde geschüttelt und anschließend 24 Stunden lang zum Erreichen des Phasengleichgewichtes stehengelassen wurde.

Die gaschromatographische Bestimmung des Gehaltes an Carbaryl in den nunmehr abgetrennten Phasen wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Gaschromatograph Perkin-Elmer 3920, 2 m Glassäule mit 2,5% Carbowax 20 M gepackt, 30 Nml Stickstoff pro Minute, 230°C isotherm; Flammenionisationsdetektor. Bei dieser Anordnung und einer Abschwächung von 1 × 1 liegt die Nachweisgrenze bei 20 ng Carbaryl.

Die Verteilung wurde bei zwei verschiedenen Gesamtkonzentrationen (bezogen auf das zweiphasige System) ermittelt: die Meßreihe $K_{0,1}$ bei 0,1% Carbaryl, die Werte $K_{0,05}$ bei 0,05% (G/V). Es wurden folgende Verteilungskoeffizienten des Carbaryls gefunden:

Lösungsmittelpaar	Verteilungskoeffizient			Dichte des Lösungsmittels bei 20°C
	$K_{0,1}$	$K_{0,05}$	Mittel	
Acetonitril				0,7857
– Hexan	59,2	59,8	59,5	0,6603
– Heptan	93,7	93,7	93,7	0,6838
– Schwefelkohlenstoff	5,93	5,94	5,94	1,2631
– α -Pinen	39,7	34,4	37,1	0,8582
– Cyclohexan	54,9	56,1	55,5	0,7786
Acetonitril/Wasser 20/80				0,9735
– Hexan	1,10	1,03	1,07	0,6603
Acetonitril/Wasser 60/40				0,8872
– Hexan	31,05	30,0	30,5	0,6603

* Eingegangen am 14. Juli 1975.

Die Erfüllung des Nernstschen Verteilungssatzes schließt Assoziierungsvorgänge in unseren Lösungen weitgehend aus. Die maximal erreichbaren Ausbeutegrade für eine einmalige Extraktion der entsprechenden Carbaryl-Lösung sind:

a) mit gleichem Volumen Acetonitril aus

– Hexan	98,3 %
– Heptan	98,9 %
– Schwefelkohlenstoff	85,6 %
– α -Pinen	98,6 %
– Cyclohexan	98,2 %

b) mit gleichem Volumen Hexan aus

– Acetonitril/Wasser 20/80	51,5 %
– Acetonitril/Wasser 60/40	3,2 %

Diese Werte zeigen, daß das sehr verbreitete «clean up»-Verfahren (wobei die Wirksubstanz aus einer Hexanlösung mit Acetonitril ausgeschüttelt und nach vierfacher Verdünnung mit Wasser wieder mit Hexan aufgenommen wird) für Carbaryl nicht geeignet ist.

Die geringe Löslichkeit des Carbaryls in Hexan kann jedoch auf einfache Weise – durch Modifizierung der «clean up»-Stufe – vorteilhaft ausgewertet werden:

Wird die Wirksubstanz nach der Extraktion des pflanzlichen Materials zuerst durch Ausschütteln oder Aufnehmen des Trockenrückstandes in Acetonitril überführt, so können die meisten wachsartigen Begleitstoffe nach partiellem Verdünnen mit Wasser (auf etwa 60 % Acetonitril) mit kleineren Portionen Hexan extrahiert werden, ohne daß dabei übermäßige Verluste an Carbaryl auftreten. Bleibt die Gesamtmenge des Hexans unter dem Volumen der auszuschüttelnden 60%igen Acetonitril-Lösung, so können die Verluste an Carbaryl unter 3 % gehalten werden.

Literatur

- 1 Werner Perkow, *Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Verlag Paul Parey, Berlin 1971.
- 2 *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1974.

Milan Haering* und Helen Weiß

Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, Sektion Chemie, Unterstraße 11, 9001 St. Gallen

* Anfragen sind an Milan Haering zu richten.

Zur Temperaturabhängigkeit der pH-Abhängigkeit enzymatischer Modellreaktionen *

Summary

The temperature dependence of the pH-dependence of the hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate catalyzed by 4 (β -hydroxyethyl)-imidazole, imidazole-propionic acid, *cis*- and *trans*-urocanic acid, mercaptoethanol, cysteamine and mercaptomethyl-imidazole was investigated in order to determine the dissociation energy of the catalytic active group. Bifunctional catalysts like mercaptomethyl-imidazole and mercaptoethanol gave wrong kinetic *pK*-values and non-linear *pK*/1/*T* plots.

Aus der pH-Abhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen lassen sich in günstigen Fällen Rückschlüsse auf die *pK*-Werte der an der Katalyse beteiligten dissoziablen Gruppen ziehen¹. Die Zuordnung eines so gefundenen *pK*-Wertes zu einer bestimmten funktionellen Gruppe wird jedoch dadurch verunsichert, daß die Dissoziationskonstanten in den Proteinen oft erheblich von denen in den freien Aminosäuren abweichen und sich überlappen. Um ein zusätzliches Kriterium für die Zuordnung eines gefundenen *pK*-Wertes zu einer bestimmten funktionellen Gruppe zu erhalten, kann man die Temperaturabhängigkeit der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion und daraus die Dissoziationswärme der fraglichen Säure oder Base bestimmen^{2,3,4}.

Da dieses Vorgehen bei der Komplexität enzymatischer Reaktionen häufig nicht unproblematisch ist, haben wir

Messungen der Temperaturabhängigkeit der pH-Abhängigkeit an übersichtlichen enzymatischen Modellreaktionen durchgeführt, um Aufschlüsse über mögliche Komplikationen bei dieser Methode und ihre Ursachen zu gewinnen. Wir wählten dazu die durch bifunktionelle Imidazol- und SH-Verbindungen katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat. Es ging uns dabei unter anderem um die Frage, wie sich das Vorhandensein mehrerer, unter Umständen kooperativ wirksamer Gruppen im Katalysator auf die Bestimmung der Dissoziationswärme über kinetische Messungen auswirkt. Solche Untersuchungen liegen in der Literatur bisher nicht vor.

Material und Methoden

4-Hydroxyäthylimidazol, Synthese erfolgte nach *loc. cit.* 5; Imidazolpropionsäure wurde durch katalytische Hydrierung von Urocaninsäure⁶ gewonnen; *cis*-Urocaninsäure wurde durch Photoisomerisierung von *trans*-Urocaninsäure nach *loc. cit.* 7, 8 erhalten; 4-Merkapto-methylimidazol⁹; Cysteamin und Merkcaptoäthanol, Präparate der Firma Serva; die Kontrolle des SH-Gehaltes der Thiole erfolgte mit Ellmann-Reagenz¹⁰ (5,5-Dithio-bis-2-nitro-benzoesäure). Alle sonst verwendeten Substanzen waren p.a. Präparate der Firma Merck, Darmstadt.

* Eingegangen am 13. August 1975.

Kinetische Messungen

Zur pH-Messung wurde das pH-Meter M26 von Radiometer, Kopenhagen, mit Einstabelektrode EA147 Metrohm verwendet. Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit dem Beckmann Spektralphotometer Acta III mit temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt. Lösungen von SH-Verbindungen wurden täglich frisch angesetzt. Die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat wurde oberhalb pH 7 bei 405 nm, unterhalb pH 7 bei 317,5 nm verfolgt. Im pH-Bereich von 6 bis 8 wurde ein 0,132 m Phosphatpuffer, oberhalb pH 8 ein 0,02 m-Phosphat-Borat-Puffer verwendet; durch NaCl-Zusatz wurde für eine konstante Ionenstärke in allen Ansätzen gesorgt. Die Stammlösung von *p*-Nitrophenylacetat war 10^{-2} m in abs. Äthanol, die Stammlösung der Katalysatoren 0,2 m in Wasser; die Konzentration des Katalysators betrug im Reaktionsansatz 10^{-3} m, die des Esters 10^{-4} m. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus mindestens drei Messungen bestimmt. Die Hydrolyse wurde in der Regel bis zu 75 % Umsatz beobachtet. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1 erfolgte entweder nach dem Guggenheim-Verfahren¹¹ oder der Endwertmethode. Die Ermittlung der *pK*-Werte aus der pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte nach dem Lindley-Verfahren¹² aus dem $1/k_1/H^+$ -Diagramm; aus den Abszissen-Abschnitten erhält man den *pK*-Wert der katalytisch aktiven Gruppe, aus dem Ordinatenabschnitt die pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 ; wir bezeichnen die so gewonnenen *pK*-Werte als «kinetische *pK*-Werte» im Unterschied zu den potentiometrisch oder photometrisch ermittelten Werten. Die Berechnung der Dissoziationswärme erfolgte nach

$$\Delta H = \frac{2,303 \times R \times T_1 \times T_2 (pK_2 - pK_1)}{T_1 - T_2}$$

Ergebnisse und Diskussion

Die durch Imidazol- und SH-Verbindungen katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat verläuft über einen nucleophilen Angriff des unprotonierten Imidazols bzw. des Thiolations auf das Carbonylkohlenstoffatom des Esters unter intermediärer Bildung eines kovalenten N-Acetylimidazols bzw. Thioesters¹³. Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion wird daher durch eine sigmoidförmige Kurve («Titrationskurve») wiedergegeben, aus deren Wendepunkt sich der *pK*-Wert des Katalysators ergibt. Nimmt man die pH-Abhängigkeit der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen auf, so erhält man die Temperaturabhängigkeit der *pK*-Werte, woraus sich die Dissoziationswärme der katalytisch aktiven Gruppe bestimmen läßt; man erhält so nur über kinetische Daten die *pK*-Werte, ihre Temperaturabhängigkeit und Dissoziationswärme. Da sich bei niedrigen (sehr langsame Reaktion) und hohen (sehr schnelle Reaktion) pH-Werten die Geschwindigkeitskonstanten nur mit ungenügender Genauigkeit be-

stimmen lassen, verwenden wir für die graphische Bestimmung der *pK*-Werte eine lineare Darstellung der pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten in Form eines «Lindley-Diagramms»¹². Als Beispiel ist in Abb.1 ein Lindley-Diagramm für *cis*-Urocaninsäure wiedergegeben.

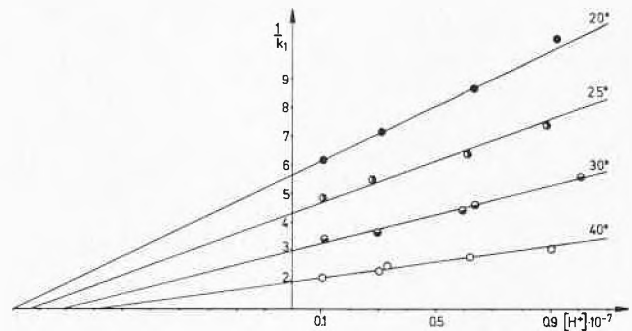


Abb.1. «Lindley-Diagramm» ($1/k_1/H^+$) der Katalyse der *p*-Nitrophenylacetathydrolyse durch *cis*-Urocaninsäure bei verschiedenen Temperaturen.

Für das Mercaptomethylimidazol erhält man ein nicht lineares Lindley-Diagramm (Abb.2). Das bedeutet, daß wir es hier nicht mit einer einfachen Brönsted-Katalyse zu tun haben. Nur bei hohen pH-Werten, bei denen die SH-Gruppe quantitativ als Anion und der Imidazolrest vollständig deprotoniert vorliegen, finden wir Geschwindigkeitskonstanten, wie sie aufgrund der vollständig dissoziierten SH-Gruppe zu erwarten sind. Bei niedrigen pH-Werten werden höhere Konstanten bestimmt oder, anders ausgedrückt, die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung, die eigentlich pH-unabhängig sein sollten, sind pH-abhängig.⁹

Wie wir an anderer Stelle eingehend dargelegt haben⁹, wird diese «Aktivierung» der SH-Gruppe durch den benachbarten Imidazolrest bewirkt. Aus dem «Lindley-Diagramm» kann man in diesen Fällen versuchen, *pK*-Werte zu extrapolieren, da bei niedrigen Wasserstoffkonzentrationen (hohen pH-Werten) «richtige» Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden. pH-abhängige Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung

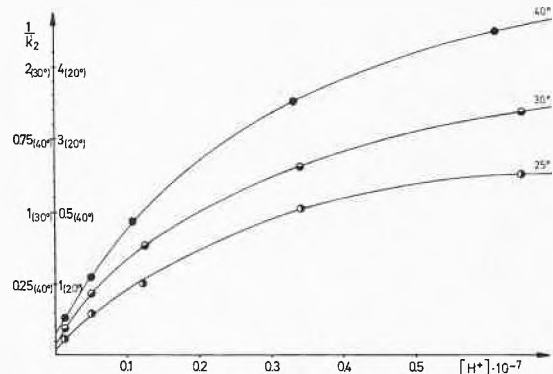


Abb.2. «Lindley-Diagramm» ($1/k_2'/H^+$) der Katalyse der *p*-Nitrophenylacetathydrolyse durch 4-Mercaptomethylimidazol bei verschiedenen Temperaturen.

$$\left(k_2' = \frac{k_1}{C} \right)$$

Tabelle 1: pK -Werte und Dissoziationswarmen der katalytisch aktiven Gruppen

Verbindung	kinetische pK -Werte (25°)	potentiometrischer bzw. photometrischer pK -Wert (25°)	Dissoziationswärme ΔH kcal/mol* aus kinetischen pK -Werten	aus potentiometrischen oder photometrischen pK -Werten
Imidazolpropionsaure	7,58	7,58	4,8	5,0
<i>trans</i> -Urocaninsäure	—	5,81	—	5,7
<i>cis</i> -Urocaninsäure	6,96	6,82	4,1	3,6
4- β -Hydroxyathylimidazol	7,30	7,26	7,7	7,2
Cysteamin (SH)	8,41	8,23 ¹⁵	7,3	7,3
Merkaptomethylimidazol	9,20 (SH)	9,50 ⁹	—	—
Merkaptoathanol	8,76 (SH)	9,48 ¹⁶	—	6,5

* Die Fehlerbreite beträgt maximal $\pm 10\%$.

wurden auch für die durch Merkaptoathanol und Cysteamin katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat gefunden.¹⁴ Für 4-Merkaptomethylimidazol und Cysteamin findet man daher zum Teil erhebliche Diskrepanzen zwischen den kinetisch und photometrisch ermittelten pK -Werten der SH-Gruppe.

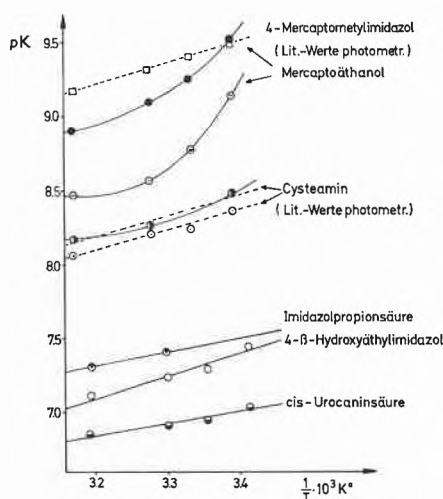
Ein Vergleich der aus den «Lindley-Diagrammen» ermittelten kinetischen pK -Werte mit den potentiometrisch bzw. photometrisch bestimmten Werten ist in Tabelle 1 durchgeführt. Nur bei Gültigkeit des Bronstedtschen Katalysegesetzes ist Übereinstimmung zwischen kinetischen und photometrischen oder potentiometrischen pK -Werten zu erwarten und wird sie auch gefunden.

Für *trans*-Urocaninsäure ließ sich ein kinetischer pK -Wert nicht ermitteln, da die katalytische Aktivität dieser Verbindung wegen ihres niedrigen pK -Wertes in dem gemessenen pH -Bereich zu gering und daher nicht exakt bestimmbar ist.

Der gegenüber *trans*-Urocaninsäure um eine pH -Einheit erhöhte pK -Wert der *cis*-Urocaninsäure spricht für eine direkte Wechselwirkung zwischen Imidazolrest und Carboxylgruppe in der *cis*-Verbindung, wahrscheinlich über eine Wasserstoffbrückenbindung. Auch die Unterschiede in den pK -Werten der Carboxylgruppe stützen diese Annahme (siehe Tabelle 1). So beträgt der Wert für die *cis*-Säure 2,3 gegenüber 3,0 für die *trans*-Verbindung.

Zur Bestimmung der Dissoziationswärme der katalytisch aktiven Gruppen wurden die kinetischen pK -Werte gegen $1/T$ aufgetragen (Abb. 3). Aus den Neigungen der erhaltenen Grade wurden die Dissoziationswarmen der Tabelle 1, Spalte 4, bestimmt. Für Merkaptomethylimidazol und Merkaptoathanol erhält man Kurven, aus denen eine Bestimmung von ΔH -Werten nicht möglich ist, für Cysteamin läßt sich noch ein Wert extrapolieren. Die photometrisch ermittelten pK_{SH} -Werte des Merkaptoathanols und Cysteamins ergeben im Arrheniusdiagramm dagegen Grade, deren Neigungen eine Dissoziationswärme von 6,5 bzw. 7,3 kcal/Mol liefern.

Der besonders niedrige ΔH -Wert der *cis*-Urocaninsäure ist wahrscheinlich die Folge der Bildung einer H-Brücke zwischen Imidazolstickstoff und Carboxylgruppe; eine

Abb. 3. $pK/ - 1/T$ von Imidazolderivaten und SH-Verbindungen.

solche H-Brücke konnte auch aus NMR-Messungen wahrscheinlich gemacht werden¹⁷.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Messung der Temperaturabhängigkeit der pH -Abhängigkeit nucleophil katalysierter Reaktionen in solchen Fällen nichtlineare Arrheniusdiagramme liefern kann, in denen kooperative Effekte bei der Katalyse eine Rolle spielen, was bei enzymkatalysierten Reaktionen sehr häufig der Fall ist.

Literatur

- 1 M. Dixon und E. Webb, *Enzymes*, Longmans, 1964, S.116.
- 2 E. Katchalski, *Arch. Biochem. Biophys.* 88 (1960) 361.
- 3 H. Gutfreund, *Trans. Faraday Soc.* 51 (1955) 441.
- 4 G. Legler und H. Gilles, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 349, 1525.
- 5 W. Reppe und Mitarbeiter, *Liebigs Ann. Chem.* 596 (1955) 1, (1968) 68.
- 6 A. H. Mehler, H. Tabor und O. Heyaischi, *Biochem. Prep.* 4, (1955) 50.
- 7 S. Edlbacher und F. Heitz, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 279 (1943) 63.
- 8 H. P. Baden, *Nature* 210, (1966) 732.
- 9 Fr. Schneider, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 348 (1967) 1034.
- 10 G. L. Ellmann, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70.
- 11 E. A. Guggenheim, *Philos. Mag.* 2 (1926) 538.
- 12 H. Lindley, *Biochem. J.* 74 (1960) 577, 82 (1962) 418.

- 13 T.C. Bruice und S. Benkovic, *Bioorganic Mechanismus*, Benjamin, Inc. New York 1966, S. 46 und 104.
- 14 J.W. Ogilvie, J.T. Tildon und B.S. Strauch, *Biochemistry* 3 (1964) 754.
- 15 J. Wadsö, R.J. Irving und L. Neland, *Acta Chem. Scand.* 18 (1964) 769.
- 16 J.P. Daneley und C.J. Noel, *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (1960) 2511.
- 17 H. Ruyterjans, unveröffentlichte Ergebnisse.

R.v. Kleinsorge, H.G. Löffler und F. Schneider*

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Marburg
D-355 Marburg/Lahn (BRD)

* Autor, an den Korrespondenz zu richten ist.