

## Tetrametil – tiuram – diszulfid hatóanyagú csávázószer maradékának szemikvantitatív meghatározása vékonyréteg kromatográfias módszerrel

MOLNÁR PÁL és RODLER IMRE

Baranya megyei Közegészségügyi és Járványügyi Állomás, Pécs.

Érkezett: 1968. február 12.

A növényvédelem keretében a kémiai növényvédelem gyors ütemű fejlődése és az azzal járó sokféle egészségügyi veszély elhárítása mind alaposabb szakismeretet kíván a toxikológiával foglalkozóktól. Az elmúlt években számtalan új növényvédőszer gyakorlati bevezetésére került sor, ami megköveteli ezen új szerek élelmi anyagokon, növényeken fellelhető maradékának pontos, gyors és nem utolsósorban olcsó meghatározását.

A mezőgazdasági terméshozam növelése szempontjából nagyon jelentős munka a vetőmagvak csávázása. Régebben a célra kizárólag szervesetlen vegyületeket alkalmaztak, azonban az utóbbi időben a gombaölő hatás emelésére, valamint a régi szerek aránylag nagy toxicitása miatt előtérbe került a szerves hatóanyagú fungicidok használata. E csoport közül a szerves higanyvegyületek klasszikus szerekeknek tekinthetők, maradáiknak vizsgálata élelmiszerekben már régen megoldódott. Újabbán egyre nagyobb méreteket ölt a ditiokarbamát típusú növényvédőszer használata, melyek közül sok készítmény TMTD hatóanyagot tartalmaz (tetrametil-tiuram-diszulfid). Ismeretes szinonimái: Ob 72, Thiurad, Thiuram, TMTDS, TUADS, Thiram. Ilyen hatóanyagot tartalmaznak a következő gyári készítmények: Arasan, Fernasan, Linosan 20, Linosan 40, Pol-Thiuram, Pomarsol forte, Rhodisan, Thiotox, Thirosan, TMTD porcsávázó, TMTD + Lindan porcsávázó, hogy csak a legismertebbeket említsük. Úgyszintén elterjedtek az előbbi szerekhez kémiailag hasonló hatóanyagot tartalmazó DPTD (Thiuram DPTD, Dipirrodil-thiuram-diszulfid) készítmények.

Az előbbieken felsorolt készítményeket elsősorban kukorica *nigrospora* és *fusarium* ellen, palántadőlés, valamint drótféreg elleni talajfertőtlenítés céljából használják hazánkban. Az elkövetkező években várható a felhasználási terület kiszélesítése, ugyanis a TMTD Lindannal keverve máris használatos mind kombinált fungicid – inszekticid szer. Számos, a fentiekben említett hatóanyagot tartalmazó készítményt – egyenlőre mint kísérleti készítményt – gyümölcsösökben a fuzikladium fertőzés ellen használják preventív és kuratív hatással, 0,05 – 0,15% töménységben permetezve.

A TMTD és DPTD hatóanyagú szerek mint a ditiokarbamátok valamennyien a testfelszínen izgató hatásúak, önmagukban kevésbé mérgezők, de gátolják a szervezetben az aldehidoxidáz enzim működését, ami különösen alkoholfogyasztásnál jelentős, mert az alkohol normális oxidatív lebomlása vízre és szénsavra csökken, helyette acetaldehid szaporodik fel. Mérgezett állatokban a hatóanyag bomlástermékeként a rendkívül mérgező szénkéng is kimutatható. A szervezetből nagyon lassan ürülnek ki, idült mérgezéseket is okozhatnak. Embernél ennek egyik jelentkező formája a tartós alkohol intolerancia. (1)

A szerek használata egyenlőre még állategészségügyi problémákban jelentkezett, de számíthatunk arra, hogy az ember és állat kapcsolataként, valamint

a TMTD hatóanyagú készítmények gyümölcsösökben, konyhakertben történő használatakor toxikológiai problémák jelentkeznek közvetlenül a humán egészségügyben is.

A TMTD hatóanyagú növényvédőszer maradvékának kimutatása és meghatározása az eddig rendelkezésre álló spektrofotometriás eljárással hosszadalmas és költséges volt. A színreakción alapuló eljárások hátránya az, hogy a spektrofotométerrel mérhető szín kialakulását számtalan körülmény zavarhatja és ezzel a módszer sokszor nem specifikus. Hátránya a spektrofotometriás TMTD meghatározásnak még az is, hogy a meghatározáshoz a vizsgálati anyag nagy mennyisége szükséges (200 – 500 g) ami a hatóanyag kivonására szolgáló oldószer mennyiségét is megnöveli ezáltal a módszer költségessé válik. A szín kialakulását számtalan körülmény zavarhatja így pl. a TMTD kombinált szereknél a Lindan stb. A módszer nem eléggé érzékeny, ami a legnagyobb hátrányának róható fel.

Mindezek a tények arra készítették bennünket, hogy a spektrofotometriás módszer helyett gyors, olcsó és jóval pontosabb, érzékenyebb módszert keressünk a TMTD és DPTD hatóanyagú növényvédőszer maradvékának meghatározására. Szempontunk volt még az is, hogy a módszer alkalmas legyen sorozatvizsgálatok elvégzésére is, mivel a régen használatos spektrofotometriás meghatározás sorozatvizsgálatokra szintén alkalmas volt. Az új módszer keresésénél és bevezetésénél a vékonyréteg kromatografiára gondoltunk, mert a könnyen kivitelezhető és ma már minden toxikológiai laboratórium be van rendezve vékonyréteg kromatografiás vizsgálatok végzésére. Lényegesnek tartottuk, hogy a vékonyréteg kromatografiás vizsgálati meghatározások szemikvantitatív jellegük ellenére pontosabbak, specifikusabbak a zavaró anyagok elválasztódása folytán mint az alkalmazott spektrofotometriás eljárások. Az ismertető módszer kiindulási alapja *N.G. Porter* hivatkozott közleménye volt, amelyet helyi körülményeinkhez adaptáltunk.

Intézetünkben bevezetésre került vékonyrétegekromatografiás TMTD, DPTD meghatározás lényege:

A gabonaszemek és egyéb vizsgálati anyagok TMTD maradvékát kloroformmal mossuk le, ezt a kivonatot szilikagél G vékonyrétegen kloroformszéntetraklorid vízzel telített elegyével futtatjuk majd a kifejlődő foltokat nátriumazidos jódoldattal előhívjuk.

#### *Szükséges vegyszerek, eszközök:*

1. Kloroform p.a.
2. Széntetraklorid p.a.
3. 0,1 n káliumjodidos jódoldat (Táramérlegben kis hengerpohárkában gyorsan lemérünk 13,0 g jódot, 1000 ml-es mérőlombikba visszük, 25,0 g KJ-al és 30 ml deszt vízzel addig rázzuk míg a jód teljesen fel nem oldódik, majd a lombikot a jelig feltöltjük)
4. Szilikagél G (kromatografiás célra)
5. Nériumazid p.a.
6. Keményítő p.a.
7. Vékonyrétegekromatografiás berendezés
8. Mikropipetták (10  $\mu$ l mennyiségek felvitelére alkalmas)
9. 10 ml-es mérőlombikok, vagy becsiszolt dugós mérőhengerek
10. 25 ml-es becsiszolt dugós mérőhenger
11. 1 ml-es pipetták
12. Üvegorlasztó (finom eloszlású aerosol készítésére alkalmas)

### *Standard sor készítése:*

A tiszta TMTD, DPTD és Ferbam hatóanyagokat kloroformban oldjuk fel, a hígításokat is kloroformmal végezzük. Célszerű olyan hígításokat készíteni a törzsoldatból, hogy annak  $10 \mu\text{l}$  mennyiségei,  $0,1 \mu\text{g}$ - $2 \mu\text{g}$  tartományba essenek. Mivel a módszer  $0,1$ – $2 \mu\text{g}$  standard tartományban ad jól megkülönböztethető nagyságú foltokat, nagyobb mennyiségű  $10$ – $20$  mikrogramm-os standardokat a lemezre nem érdemes felvinni, itt ugyanis a kék alapon megjelenő fehér foltoknak csak a nagyságát lehet megkülönböztetni, a színmennyiséggel – minthogy mindegyik folt fehér – nem operálhatunk: a nagy mennyiségű standardok foltjai kb. egyenlőnek látszanak.

### *A vizsgálati anyag előkészítése:*

A vizsgálandó gabonaszemekről, vagy egyéb vizsgálati anyagokról a TMTD és DPTD maradékot kloroformmal mossuk le, illetve oldjuk ki. A módszer nagy érzékenysége lehetővé teszi, hogy igen kis vizsgálati anyagmennyiségekből induljunk ki. A vizsgálandó anyag  $1$ – $2$  g-ját pontosan lemérjük és azt  $25$  ml-es becsiszolt dugós mérőhengerbe tesszük és  $10$  ml kloroformmal egy percig erőteljesen rázzuk. A TMTD és DPTD nagyon jól oldódik kloroformban és ez lehetővé teszi maradéktalan kioldódását. Gabonamagvak és száraz minták esetében a kloroformot a gabonaszemektől elválasztjuk, leöntjük és a kapott kloroformos extraktum alkalmas közvetlen felvitelre. Gyümölcsöknél, illetve nagy víztartalmú vizsgálati anyagoknál ha nemcsak felületi lemosást alkalmaztunk, hanem homogenizált mintából végezzük a kloroformos kioldást akkor vízmentesítés céljából az oldathoz kevés vízmentes nátrium szulfátot adunk majd a nátrium szulfátról a kloroformot leöntve alkalmas a vékonyrétegre való felvitelére.

### *A standard sor és a vizsgálati anyag felvitelére a vékonyrétegre:*

Öt darab  $20 \times 20$  cm-es üveglemezre számítva  $30$  g szilikagél G és  $65$  ml deszt. vízzel vizes szuszpenziót készítünk úgy, hogy a szuszpenzió eloszlatlan szilikagél részektől csomómentes legyen, majd a már előzőleg zsirtalanított üveglemezre, alkalmas rétegfelvívő készülékkel  $250$  mikron vastagságú réteget húzunk. Az üveglemezre felvitt szilikagél réteg megszáradása után a réteget aktiválni kell, e célból a lemezeket fél órára  $90^\circ\text{C}$ -ra beállított szárítószekrénybe helyezük. Aktiválatlan lemezeken a kromatogramok kifejlődése nem éles, erősen deformálódott, vagy hosszú farokképződés tapasztalható. A vizsgálat céljából, hogy a vizsgálati anyagunk szemikvantitatíve meghatározható legyen egy lemezen futtatjuk a standard sor különböző mennyiségeit és a vizsgálati anyagot. A standard és a vizsgálati anyag felvitelét alkalmas mikropipettával végezzük ügyelve arra, hogy a felviteli folt ne haladjon meg a  $2$ – $3$  mm-t. A foltok szétterülését a felvitelkor fuvással, vagy gyenge hideg fön áramoltatásával akadályozhatjuk meg. Erre a célra bármilyen hajszárító készülék állványba fogva megfelel. Ajánlatos a startpontokat egymástól  $2$  cm távolságokban felvinni, mert közelebbi startpontok esetén a felvitt anyagok nagyobb mennyiségei zavarhatják egymást. A standard értékeket célszerűen úgy válasszuk meg, hogy a felvitt sorban a vizsgálati anyaguk lehetőleg középértéket érjen el.

### *A kromatogramok kifejlesztése:*

A felvitel után a lemezeket alkalmas, lehetőleg csiszolt fedelű üvegládába állítjuk, melybe előzőleg már  $3 : 1$  arányú kloroform-széntetraklorid vízzel telített

elegyét öntöttünk futtató-szerként, hogy az az üvegcád légkörét gőzeivel telítse. Ügyelni kell arra, hogy csak annyi futtatószer szabad a kádba önteni, hogy a folyadékszint a startvonal alatt legyen kb. egy centiméterrel. A futtatást addig végezzük míg a futtatószer mintegy 15 cm magasságig nem ér fel a startvonaltól számítva.

### *A kifejlesztett kromatogramok előhívása:*

A futtatás befejeztével a lemezeket 37 °C-os termosztátba helyezük egy éjszakára. Célszerű ennek megfelelően a vizsgálati oldat és standard oldatok felvitelét, a futtatást a délutáni órákban végezni, mert így a munka befejeztével a termosztátban való szárítás, mint következő munkafázis természetesen nem akadályozza munkánk folyamatosságát. Az előhívást másnap reggel végezzük el. Előhívószerül *F. Feigl* (2) nátriumazidos jódoldat spray-t javasol (3 g nátriumazid 100 ml 0,1 n jódoldatban oldva), mely előhívó nagyon alkalmas és érzékeny előhívószer a szilikagélen futtatott TMTD és DPTD-nek. Az így előhívott lemezen a TMTD foltok, különösen az egy mikrogrammnál kisebb mennyiségek rövid idő múlva értékelhetetlenekké válnak a háttér kivilágosodása következtében. A lemez közvetlen előhívás utáni 2%-os jódoldattal való befúvása stabilizálja a háttér színt. Sokkal kontrasztosabb képet és ezzel értékelhetőbb eredményt kapunk ha előhívás előtt nagyon finom eloszlású, saját tapasztalatunk szerint 3%-os keményítő oldat spray-t alkalmazunk mindaddig míg a lemezünk opalescensé nem válik. (3) A keményítő oldattal való befúvás után végezzük el az előhívóoldat lemezre való ráfúvását és az így végzett előhívás után a TMTD foltok hófehér foltok formájában jelentkeznek a kékes-fekete háttérben. A felvitt TMTD nagyobb mennyiségei (1–2  $\mu\text{g}$ ) néhány másodperc alatt láthatóvá válnak, de az 1  $\mu\text{g}$  alatti mennyiségek is 10–15 perc alatt határozottan kifejlődnek.

Több órai állás után a lemez kékes-fekete háttér színe elhalványul és világosbarnába megy át. Ilyenkor ha deszt. vízzel befújjuk a lemezt az eredeti háttér szín visszaáll.

### *Az előhívott foltok értékelése:*

Az előhívás utáni szembetűnő érdekesség, hogy a kifejlődött foltok  $R_f$  értékei a koncentrációval változnak, így a 0,01 mikrogrammtól 10 mikrogramm felvitelig az  $R_f$  érték 0,190-től 0,196-ig változik, a koncentráció növekedésével az  $R_f$  érték is nő.

Ha a felvitelnél a foltot 1 mm átmérőben sikerült felvinni, még 0,01 mikrogramm TMTD is kimutatható. Alkalmas standard sort használva és azt a vizsgálati anyaggal egylemezen futtatva a módszer szemikvantitativ  $\pm 0,5$  mikrogramm pontossággal jól használható.

### *Tapasztalatok*

1. A módszer csak szilikagél G vékonyrétegen vezet szép eredményhez. Alumíniumoxid G rétegen a foltok kifejlődése zavaros, nem a felvitt koncentrációknak megfelelő, alacsony koncentrációk ki sem fejlődnek. Sokszor tapasztaltuk, hogy a kerek, szabályos foltok helyett elnyúlt csíkok fejlődtek ki.
2. Szilikagélen a leírtak pontos betartása mellett a módszer érzékenysége a tapasztalataink szerint 0,1 mikrogramm.

3. Lényegesnek tartjuk a 8–10 órás 37 C°-on való szárítást a futtatás és előhívás szakasza között. A fentiek szerint futtatás után nem szárított lemezen az alacsonyabb értékek nem fejlődtek ki, előhívás után csak a magasabb értékek feleltek meg a párhuzamosan végzett és szárított lemezen levő azonos értékeknek.
4. A nátriumazidos jódoldat sötétben és hűvös helyen két hétig eltartható. Az ilyen előhívószerral a foltok kifejlődése a háttér színtabilitása ugyanolyan jó mint a friss előhívószerral történt előhívás után. Két hónapnál régebbi előhívószert is alkalmaztunk és azt tapasztaltuk, hogy a kromatogramok szépen előhívódtak, de a háttér színtabilitása meg sem közelíti a friss előhívószernél tapasztaltat. Ajánlatosnak tartjuk, hogy az előhívást friss, de legalábbis két hétnél nem régebbi előhívóoldattal végezzük.
5. Olyan növényvédőszerreknél mint pld. a TMTD+Lindan kombinált szerek a Lindan nem zavarja a vizsgálatokat, minthogy a Lindan a megadott előhívószerral (nátriumazidos jódoldat) nem hívható elő.
6. A módszer előnye, hogy gyors, jóval érzékenyebb mint az eddig rendelkezésre álló, TMTD maradékok meghatározására szolgáló eljárás, vegyszer- és eszközigénye csekély, s a minta kloroformos kivonatát közvetlenül; fáradtságos és esetenként költséges előtisztítás nélkül lehet vékonyréteg-kromatografálni.
7. Az eljárás a TMTD és DPTD hatóanyagú szereken kívül alkalmas még Ferbam (vas-N, N-dimetilditiokarbamát) meghatározására is mivel a Ferbam az előzőekben említett szerektől a vékonyrétegen jól elválik.

#### IRODALOM

- (1) *Bordás S.*: Veszélyes Növényvédőszerrek. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1967.
- (2) *Feigl F.*: Spot Tests. II. Organic Application, Elsevier, Amsterdam, 1954, p. 165.
- (3) *Kjaer A.* és *Rubinstein K.*: Acta Chim. Scand., 7, 528, 1953.
- (4) *Porter N. G.*: J. Chromatog., 28, 470, 1967.

### СЕМИКВАНТИТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ПРОТРАВЛИВАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ СОДЕРЖАЩИХ АГЕНТА ТЕТРАМЕТИЛ – ТИУРАМ – ДИСУЛФИДА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*П. Мольнар и. И. Родлер*

Авторы знакомяют семиквантитативное определение остатков протравливающих веществ содержащих агента ТМТД методом тонкослойной хроматографии.

Метод следующий: из испытуемого материала отмывают остаток ТМТД хлораформом а вытяжку наводят на тонкослойный силикагель Г со смесью водонасыщенного хлораформ – тетраклорметана в соотношении 3 : 1, а появившиеся пятна проявляют водным раствором с азидом натрия.

Параллельной новодкой стандартного ряда испытуемым раствором, метод подходящий для определения остатка ТМТД чувствительностью 0,5 микрограмм.

SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG DER RÜCKSTÄNDE  
VON DEN WIRKSTOFF TETRAMETHYL-THIURAM-DISULFID  
ENTHALTENDE BEIZMITTELN VERMITTELS DER  
DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

*P. Molnár und I. Rodler*

Die Verfasser beschreiben die semiquantitative Bestimmung von TMTD-wirkstoffhaltigen Beizmitteln mit der Dünnschichtchromatographie.

Das Verfahren ist Folgendes: Der Rückstand von TMTD wird von der zu prüfenden Probe mit Chloroform abgewaschen und dieser Auszug auf einer Silicagel G Schicht mit dem wassergesättigten Laufmittel Chloroform-Kohlen-tetrachlorid 3 : 1 chromatographiert; Entwicklung der Flecke erfolgt mit einer Natriumazid-Jodlösung.

Durch Mischchromatographieren einer Standardreihe eignet sich die Methode zur Bestimmung des TMTD-Rückstandes von 0,5 Mikrogramm.

SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION OF RESIDUES  
OF TETRAMETHYLTHIURAMDISULPHIDE-BASE SEED  
DRESSING AGENTS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

*P. Molnár and I. Rodler*

A thin-layer chromatographic technique is described for the semiquantitative determination of residues of tetramethyldiuramdisulphide-base seed dressing agents (TMTD).

The method consists essentially of the following steps. Residues of TMTD are washed off the sample with chloroform. The extract is allowed to run on a thin layer of silicagel G, using a 3 : 1 mixture of chloroform and carbon tetrachloride, saturated with water. Subsequently, the evolved spots are developed with an iodine solution containing sodium azide.

Parallel with the test solution, also a standard series of known TMTD contents is allowed to run. The method lends itself to the determination of TMTD residues, with a sensitivity of 0.5 micrograms.

DOSAGE SÉMIQUANTITATIF DES RÉSIDUS DES MACÉRATEURS À  
BASE DE TETRAMÉTHYLTIURAM – DISULFITE PAR CHROMATO-  
GRAPHIE EN COUCHE MINCE

*P. Molnár et I. Rodler*

Les auteurs ont décrit dans leur mémoire le dosage des résidus des macérateurs à base de TMTD par chromatographie en couche mince.

La méthode est la suivante: on enlève de l'objet à examiner avec du chloroforme les résidus du macérateur à base de TMTD et on fait courir cet extrait sur une couche mince de silicagel G avec un mélange 3 : 1 de chloroforme-tétrachlorure de carbone saturé d'eau, puis on développe les taches avec une solution de iode contenant de l'azide de sodium.

L'on fait courir parallèlement à la solution à examiner une série standard. La méthode est bonne pour le dosage des résidus à TMTD avec une sensibilité de 0,5 microgrammes.