Beiträge zur Tabakforschung · Band 9 · Heft 2 · Juni 1977 DOI: 10.2478/cttr-2013-0434

Methoden zur Bestimmung von Phytopharmaka in Tabak und Tabakerzeugnissen

IV. Mitteilung: Ein Bestimmungsverfahren für Vamidothion und seine Metaboliten*

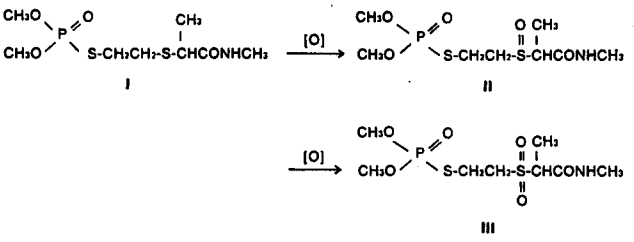
von A. N. Sagredos und R. Moser

NATEC · Gesellschaft für naturwissenschaftlich-technische Dienste mbH, Hamburg

1. EINLEITUNG

N-Methyl-3-thia-2-methyl-5-(0,0-dimethylmonothiophosphoryl)valeramid [I], das unter dem Trivialnamen Vamidothion oder unter den Handelsnamen Trucidor, Kilval bzw. Vation bekannt ist, wird im Obst- und Gemüseanbau als systemisch wirkendes Insektizid und Akarizid eingesetzt und kommt auch für den Tabakanbau in Frage.

Vamidothion [I] wandelt sich auf der Pflanze sehr schnell in sein Sulfoxid [II] um (1), das wiederum durch weitere Oxidation das entsprechende Sulfon [III] ergibt.



Vamidothion [I] und sein Sulfoxid [II] sind aktive Cholinesterase-Hemmstoffe und fallen unter die „Höchstmengenverordnung Pflanzenschutz, pflanzliche Lebensmittel" der Bundesrepublik Deutschland vom 5. 6. 1973. Das Vamidothion-sulfon [III] ist in dieser Verordnung nicht berücksichtigt worden.

Verschiedene Verfahren zur Bestimmung von Vamidothion mittels Papier-, Dünnschicht- oder Gaschromatographie sind bekannt (2–5), für Routineuntersuchungen im Betriebslabor jedoch nicht zu empfehlen, da von diesen Verfahren Vamidothion und seine Metaboliten nicht simultan erfaßt werden. Nach einer von *Desmoras* et al. (6) angegebenen gaschromatographischen Methode erfolgt keine Trennung von Vamidothion [I] und dessen Sulfoxid [II], sondern beide werden mit Kaliumpermanganat oxidiert und als Sulfon [III] bestimmt. Diese Methode (6) benötigt außerdem eine relativ große Menge an Pflanzenmaterial (mindestens 100 g), was beim Tabak mit seinem hohen Gehalt an in organischen Lösungsmitteln löslichen Inhaltsstoffen zu Schwierigkeiten beim „clean-up" führt.

Es wird nun über eine Methode zur Simultanbestimmung von Vamidothion und dessen Metaboliten berichtet.

* Eingegangen am 1. Juli 1976.
Diese Arbeit wurde im Auftrage des Verbandes der Cigarettenindustrie, Hamburg, durchgeführt.

2. PRINZIP DER METHODE

Nach Extraktion des Tabaks mit einer Mischung von Wasser/Aceton/Essigsäure wird der Wirkstoff in Chloroform aufgenommen, über eine Aluminiumoxid-Säule gereinigt und anschließend mittels GLC mit Schwefel-Flammenphotometer-Detektor (S-FPD) nachgewiesen (7).

3. DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Das Verfahren wurde in Anlehnung an die Ausführungen einer früheren Mitteilung (7) ausgeführt.

3.1 Reagenzien

Chloroform[a]	nanograde
Aceton[a]	nanograde
Essigsäure[b]	p. a.
Glaswolle[c]	
Aluminiumoxid[d]	Aktivitätsstufe V
Natriumsulfat[e]	granuliert, wasserfrei
Stickstoff	nachgereinigt

3.2 Testsubstanzen und Testlösungen

Kontroll-Tabak[f]: Cigarettentabak (Blendmischung)

Vamidothion [I][g]: technisch;
GLC (Bedingungen: 11 % (OV-17 + QF 1), 175 °C, S-FPD): eine Komponente mit einer Retentionszeit (t_R) von ca. 13,3 min;
MS- und NMR-Daten: siehe Tabellen 1 und 2.

Vamidothion-sulfoxid [II][g]: gelöst in Methyläthylketon;
GLC (Bedingungen: 11 % (OV-17 + QF 1), 135 °C, S-FPD): eine Hauptkomponente mit t_R = ca. 3,5 min;
MS- und NMR-Daten: siehe Tabellen 1 und 2.

Vamidothion-sulfon [III]: hergestellt aus Vamidothion bzw. Vamidothion-sulfoxid in Anlehnung an (6) in folgender Weise:
0,5 g Vamidothion bzw. -sulfoxid wurden in 16 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 20 ml einer Puffer-

a: Mallinckrodt
b: Merck
c: Riedel-de Haën
d: Woelm
e: Hopkins & Williams Ltd.
f: Verband der Cigarettenindustrie
g: Rhône-Poulenc

Tabelle 1. MS-Daten von Vamidothion und seinen Metaboliten*.

Intensive Fragmente, die für alle 3 Verbindungen auftreten	Vamidothion	Vamidothion-sulfoxid	Vamidothion-sulfon**
m/e	m/e	m/e	m/e
169: $(CH_3O-)_2P(=O)-S-CH_2=CH_2^{\urcorner+}$	287/288: $M^+/M^+ + 1$	303/304: $M^+/M^+ + 1$	319: M^+
142: $(CH_3O-)_2P(=O)-SH^{\urcorner+}$	259: $M^+ - 28$	243: $M^+ - 60$	289: $M^+ - 30$
125: $(CH_3O-)_2P=S^{\urcorner+}$	229: $M^+ - (CONHCH_3)$	217: $M^+ - (CH(CH_3)CONHCH_3)$	255: $M^+ - 64$
109: $(CH_3O-)_2P=O^{\urcorner+}$	201: $M^+ - (CH(CH_3)CONHCH_3)$	199: $M^+ - 104$	227: $M^+ - 92$
87: $[CH(CH_3)C(=O)NHCH_3+H]^+$	145: $CH_2=CH-S-CH(CH_3)-CONHCH_3^{\urcorner+}$	169***: $(CH_3O)_2P(=O)-S-CH_2=CH_2^{\urcorner+}$	169***: $(CH_3O)_2P(=O)-S-CH=CH_2^{\urcorner+}$
79: $(CH_3O)(HO)P^{\urcorner+}$	169: $(CH_3O)_2P(=O)-S-CH_2=CH_2^{\urcorner+}$		
58: $CONHCH_3^{\urcorner+}$	87***: $[CH(CH_3)C(=O)NHCH_3+H]^+$		

* Angegeben sind einige der für die Identifizierung wichtigen MS-Fragmente. Messung mit Varian MAT-Spektrometer CH 7; Ionenquelle: ca. 50 °C; Schubstange: 100—170 °C.

** Aus der Oxidation von Vamidothion bzw. -sulfoxid mit $KMnO_4$.

*** Hauptpeak.

Tabelle 2. NMR-Daten von Vamidothion und seinen Metaboliten.

Einige für die Identifizierung wichtige NMR-Signale (Messung in $CDCl_3$)	
Vamidothion	$(CH_3O\text{-})_2\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{P}\text{-}S\text{-}\underbrace{CH_2CH_2}_{d_1}\text{-}S\text{-}\underset{\underset{CH_3}{\|}}{\underset{\underset{c_1}{\|}}{CH}}\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}NH\text{-}CH_3$ (a, b)
Vamidothion-sulfoxid	$(CH_3O\text{-})_2\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{P}\text{-}S\text{-}\underbrace{CH_2CH_2}_{d_2}\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{S}\text{-}\underset{\underset{CH_3}{\|}}{\underset{\underset{c_2}{\|}}{CH}}\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}NH\text{-}CH_3$ (a, b)
Vamidothion-sulfon	$(CH_3O\text{-})_2\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{P}\text{-}S\text{-}\underbrace{CH_2CH_2}_{d_3}\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{S}\text{-}\underset{\underset{CH_3}{\|}}{\underset{\underset{c_3}{\|}}{CH}}\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}NH\text{-}CH_3$ (a, b_1)

Zuordnungen:

a: 3,74/3,89 ppm, 2 Singuletts
b: 2,82 ppm, Dublett
b_1: 2,84 ppm, Dublett
c_1: 1,44 ppm, Dublett
c_2: 1,51 ppm, Dublett
c_3: 1,64 ppm, Dublett
d_1: ca. 2,9 ppm, verbreitert
d_2: ca. 3,2 ppm, verbreitert
d_3: 2,9—3,7 ppm, mehrfache Aufspaltung

lösung (6,81 g KH_2PO_4, 29,5 ml 1 N NaOH in 1 l bidest. Wasser gelöst) und 40 ml 1%iger wäßriger $KMnO_4$-Lösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Überführen in einen Schütteltrichter wurde das oxidierte Produkt viermal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und bei 40 °C vom Lösungsmittel befreit.
GLC (Bedingungen: 11 % (OV-17 + QF 1), 170 °C, S-FPD): eine Komponente mit $t_R = 1{,}6$ min (Abb. 1a—c); MS- und NMR-Daten: siehe Tabellen 1 und 2.

3.3 Geräte

1. Zentrifuge[h] (Typ UJ 3)
2. Ultra-Turrax[i] (Typ 45)
3. Rotationsverdampfer
4. Graduierte Vorlage (5-ml-Volumen)
5. Aluminiumoxid-Säule (20 cm Länge und 1 cm Durchmesser; gefüllt mit 8,5 g Aluminiumoxid V in Chloroform eingerieselt; 1 cm Natriumsulfat (obere Schicht).

3.4 Extraktion

10 g Cigarettentabak werden mit 150 ml bidest. Wasser, 50 ml Aceton und 7 ml 10 %iger Essigsäure versetzt und mittels Ultra-Turrax 5 min bei 4000—6000 U/min extrahiert. Der Extrakt wird über Glaswolle filtriert und anschließend zentrifugiert. Von der klaren Lösung wird ein aliquoter Teil von 100 ml (entsprechend 5 g Tabak) abgenommen, in einen 500-ml-Schütteltrichter übergeführt und zweimal mit je 50 ml, einmal mit 200 ml und einmal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Extrakte werden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Wasserstrahlvakuum auf 2 ml eingeengt.

3.5 Reinigung über Aluminiumoxid-Säule

Der eingeengte Chloroform-Extrakt wird auf die Aluminiumoxid-Säule gegeben, mit 5 ml Chloroform nachgewaschen und anschließend mit 50 ml Chloroform eluiert. Das Eluat wird in einem Rundkolben gesammelt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Wasserstrahlvakuum auf ca. 2 ml eingeengt. Zur Bestimmung am Gaschromatographen wird es mit einer Fortuna-Pipette in eine 5-ml-Vorlage (graduiert) übergeführt und zweimal mit je 1—2 ml Chloroform nachgewaschen; anschließend wird die Chloroformlösung durch Überleiten von Stickstoff bei 30 °C auf 2 ml eingeengt.

3.6 Gaschromatographie

Die Bestimmung erfolgt mit einem Hewlett-Packard Gaschromatographen (Modell 5750) unter Verwendung einer Glassäule von 200 cm Länge und 2 mm Durchmesser, gefüllt mit 11 % (OV-17 + QF 1) auf Gaschrom Q, 80—100 mesh, oder einer Glassäule von 180 cm Länge und 2 mm Durchmesser, gefüllt mit 10 % DC 200 auf Gaschrom Q, 80—100 mesh.

	11 % (OV-17+QF 1)	*10 % DC 200*
Säulentemperatur:		
Vamidothion [I]	175 °C	110—160 °C, 4°/min, dann 6 min isotherm
Vamidothion-sulfoxid [II]	135 °C	
Vamidothion-sulfon [III]	170 °C	
Einspritzblocktemperatur	300 °C	300 °C
Detektor:		
Typ	FPD mit 394-nm-Filter für S	
Temperatur	235 °C	240 °C
Strömungsgeschwindigkeit Luft/O_2/H_2 (ml/min)	109/17/187	50/22/180
Trägergas N_2	100 ml/min	100 ml/min
Retentionszeit:		
Vamidothion [I]	13,3 min	25,2 min
Vamidothion-sulfoxid [II]	3,5 min	2,1 min
Vamidothion-sulfon [III]	1,6 min	6,9 min

Die Auswertung erfolgt über die Peakhöhe im Vergleich mit Testsubstanzen.
Die gaschromatographische Anzeige ist für Vamidothion und seine Metaboliten im Bereich von 2—60 ng linear.

h: M. Christ, Osterode/Harz i: Janke & Kunkel

Abbildung 1. Gaschromatogramme von Vamidothion-sulfon [III]. Gaschromatographische Bedingungen: Säule 11 % (OV-17 + QF 1); Säulentemperatur 170 °C; Injektortemperatur 300 °C; Detektortemperatur 235 °C; Länge 200 cm; Durchmesser 2 mm; Gasmengenstrom N_2 ca. 100 ml/min; H_2/Luft/O_2: 187/109/17; Detektortyp S-FPD.

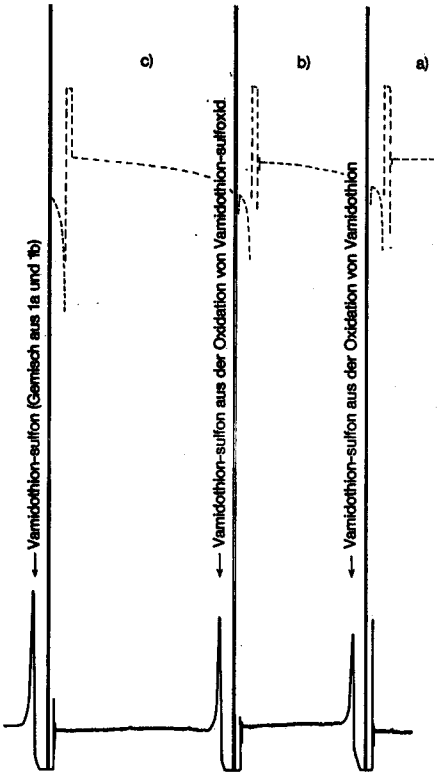


Abbildung 2. Gaschromatogramm des Kontroll-Tabaks nach Zusatz von 0,5 ppm Vamidothion [I] nach Reinigung über Aluminiumoxid-Säule. Gaschromatographische Bedingungen: Säule 11 % (OV-17 + QF 1); Säulentemperatur 175 °C; Injektortemperatur 300 °C; Detektortemperatur 235 °C; Länge 200 cm, Durchmesser 2 mm; Gasmengenstrom N_2 ca. 100 ml/min; H_2/Luft/O_2: 187/109/17; Detektortyp S-FPD.

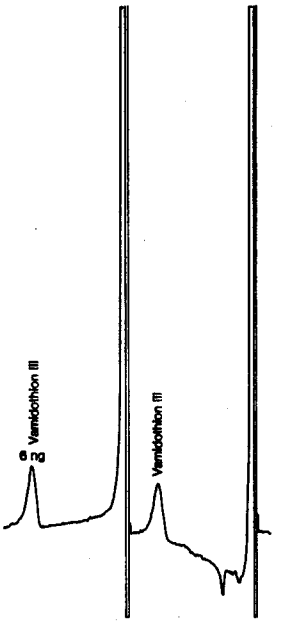


Abbildung 3. Gaschromatogramm des Kontroll-Tabaks nach Zusatz von 0,5 ppm Vamidothion-sulfoxid [II] nach Reinigung über Aluminiumoxid-Säule. Gaschromatographische Bedingungen: Säule 11 % (OV-17 + QF 1); Säulentemperatur 135 °C; Injektortemperatur 300 °C; Detektortemperatur 235 °C; Länge 200 cm, Durchmesser 2 mm; Gasmengenstrom N_2 ca. 100 ml/min; H_2/Luft/O_2: 187/109/17; Detektortyp S-FPD.

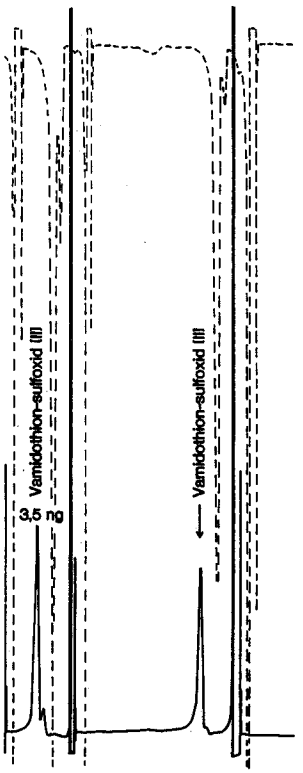
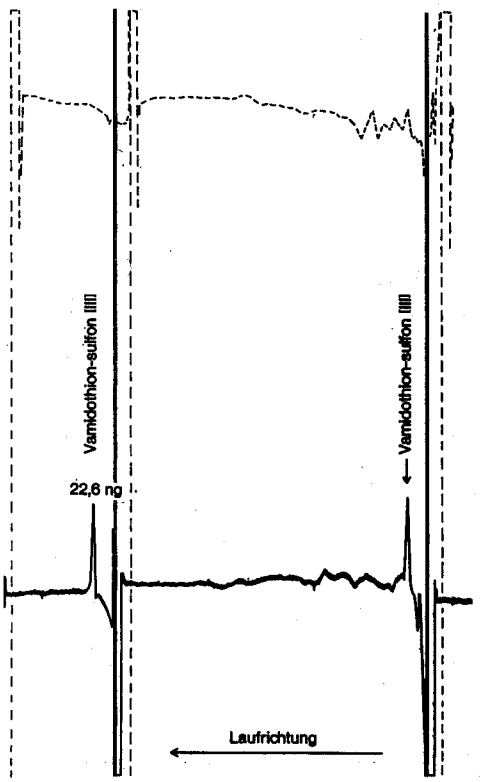


Abbildung 4. Gaschromatogramm des Kontroll-Tabaks nach Zusatz von 0,5 ppm Vamidothion-sulfon [III] nach Reinigung über Aluminiumoxid-Säule. Gaschromatographische Bedingungen: Säule 11 % (OV-17 + QF 1); Säulentemperatur 170 °C; Injektortemperatur 300 °C; Detektortemperatur 235 °C; Länge 200 cm; Durchmesser 2 mm; Gasmengenstrom N_2 ca. 100 ml/min; H_2/Luft/O_2: 187/109/17; Detektortyp S-FPD.



4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vamidothion-sulfon [III] wurde aus Vamidothion [I] und aus Vamidothion-sulfoxid [II] durch Oxidation mit Kaliumpermanganat hergestellt und mittels MS und NMR in seiner Struktur bestätigt (Tab. 1 und 2).
Die Wiederauffindungsraten der Substanzen I, II und III wurden ermittelt, indem jeweils 0,5 ppm der Substanz einzeln dem Kontroll-Tabak zugemischt und wie üblich dem Analysengang unterworfen wurde.
Dabei wurden folgende Resultate erzielt:

	Wiederauf-findungsrate (%)	*Nachweis-grenze in* ppm
Vamidothion [I]	92	0,1
Vamidothion-sulfoxid [II]	70	0,1
Vamidothion-sulfon [III]	91	0,1

Die Abbildungen 1 bis 4 zeigen die Gaschromatogramme des aus dem Tabak wiedergewonnenen Vamidothion und dessen Metaboliten.
Die Nachweisgrenze für alle drei Verbindungen liegt bei 0,1 ppm.

ZUSAMMENFASSUNG

In Anlehnung an eine frühere Arbeit (7) ist eine Methode zur simultanen Bestimmung von Vamidothion [I], Vamidothion-sulfoxid [II] und Vamidothion-sulfon [III] in Tabak entwickelt worden. Nach dieser Methode werden die Verbindungen mit Wasser/Aceton/Essigsäure aus dem Tabak extrahiert, über eine Aluminiumoxid-Säule gereinigt und anschließend gaschromatographisch mit spezifischem Schwefel-Detektor bestimmt.
Die Wiederauffindungsraten betragen 70 bis 92 %, die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ppm.
MS- und NMR-Daten von Vamidothion [I], Vamidothion-sulfoxid [II] und Vamidothion-sulfon [III] werden angegeben.

SUMMARY

Based on previous work (7) a method to simultaneously determine vamidothion [I], vamidothion-sulfoxide [II] and vamidothion sulfone [III] in tobacco has been developed. The compounds are extracted with water/acetone/acetic acid from the tobacco, cleansed over an aluminium oxide column and then determined on the gas chromatograph with the specific sulphur detector.
Rates of recovery are 70 % – 92 %, the determination level is 0.1 ppm.
Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance data of vamidothion [I], vamidothion-sulfoxide [II] and vamidothion-sulfone [III] are given.

RÉSUMÉ

Se basant sur un travail antérieur (7) on a développé une méthode pour la détermination simultanée de vamidothion (I), de vamidothion-sulfoxide (II) et de vamidothion-sulfon (III) dans le tabac. Le procédé consiste à extraire ces composés du tabac avec de l'eau / de l'acétone / de l'acide acétique, à les purifier sur une colonne d'oxide d'aluminium, et ensuite à les déterminer par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur spécifique au soufre.
Les pourcentages de récupération atteignent 70 à 92 %, les limites de détermination se situent vers 0,1 ppm.
Des données MS et NMR concernant le vamidothion (I), le vamidothion-sulfoxide (II) et le vamidothion-sulfon (III) sont indiquées.

LITERATUR

1. Desmoras, J., J. Fournel und J. Metivier: Phyt. Phytopha. 11 (1962) 107.
2. Bates, J. A. R.: Analyst 90 (1965) 453.
3. Smart, N. A., und A. C. Hill: J. Chromatogr. 30 (1967) 626.
4. Ruzicka, J. H., J. Thomson und B. B. Wheals: J. Chromatogr. 30 (1967) 92 sowie ibd. 31 (1967) 37.
5. Asken, J., J. H. Ruzicka und B. B. Wheals: Analyst 94 (1969) 275.
6. Desmoras, J., M. Laurent und M. Buys: In G. Zweig: Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives, Vol. VII; Academic Press, New York.
7. Sagredos, A. N., und W. R. Eckert: Beitr. Tabakforsch. 8 (1976) 438.

Herrn Dr. W. R. Eckert und seinen Mitarbeitern danken wir für die Ausführung der Gaschromatographie.

Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. A. N. Sagredos, Lehrstuhl für organische Chemie, Abteilung Chemieingenieurwesen, Technische Fakultät, Universität Thessaloniki, Bas. Olgas 29b, Thessaloniki, Griechenland.

Dr. R. Moser, NATEC / Gesellschaft für naturwissenschaftlich-technische Dienste mbH, Behringstraße 154, D-2000 Hamburg 50.