

Photometrische Bestimmung von Dicyandiamid in Pflanzen

H. MÜLLER*)

Eingegangen am 4. 12. 1984

Einleitung

Dicyandiamid (DCD) wird neuerdings als Nitrifikationshemmstoff zur effizienteren Stickstoffdüngung in der Landwirtschaft eingesetzt (AMBERGER, 1984; SOLANSKY, 1984). Nicht nur Ertragssteigerungen sind durch die erhöhte Stickstoff-Ausnutzung infolge ver-ringerter Nitratauswaschung und Denitrifikation im Boden zu erzielen, sondern auch nied-rigere Nitratgehalte wurden bei einigen landwirtschaftlichen und gärtnerischen Erzeugnis-sen nach DCD-Anwendung nachgewiesen (ROORDA VAN EYSINGA, 1984).

DCD kann auch zur Verbesserung der Trinkwasserqualität beitragen, da es den Nitrat-fluß vom Boden ins Grundwasser kontrolliert und dadurch die Nitratgehalte im Trink-wasser verringert.

DCD wird als großtechnisches Produkt mit dem Handelsnamen DIDIN in reiner Form organischen (Gülle, Jauche) und anorganischen Flüssigdüngern (Ammoniak-Lösung) zuge-setzt oder es ist Bestandteil von N-Mineraldüngern (ALZON) unterschiedlicher Zusam-mensetzung. Aus toxikologischer Sicht sind bisher keine Bedenken zur DCD-Anwendung bekannt geworden.

Rückstände größeren Ausmaßes sind nur zu erwarten, wenn der Wirkstoff über die Kopfdüngung Nahrungspflanzen mit kurzer Vegetationszeit verabreicht wird. Eine Appli-kation gemeinsam mit dem Startdünger führt dagegen zu DCD-Gehalten von 1 mg/kg oder darunter, wie Spinatversuche gezeigt haben (MÜLLER, 1983).

Eine einfache Methode zur DCD-Rückstandsbestimmung in Pflanzen (für Böden siehe VILSMEIER, 1979 und 1982) sollte aber verfügbar sein, um die fehlerhafte Verwendung von DCD-haltigen Düngern schnell erkennen zu können. Eine solche Methode ist von MÜLLER (1983) speziell für die Untersuchung von Spinat schon auszugsweise vorgestellt worden. Für eine universelle Anwendung der Methode sind ergänzende Angaben und einige Abänderungen im Analysengang notwendig, über die nachfolgend berichtet wird.

Material und Methoden

Extraktion

50–100 g vorzerkleinertes Pflanzenmaterial werden mit dem Ultra-Turrax homogeni-siert, davon 10 g für die DCD-Bestimmung entnommen, 20 ml destilliertes Wasser zuge-setzt und 1 h geschüttelt. Anschließend wird über eine Filternutsche (Filter S & S Nr. 594 für Kopfsalat und Rote Rüben, S & S Nr. 589 für Spinat und Möhren) scharf abgesaugt und der Rückstand gleichzeitig mit einem Glasstopfen so gut wie möglich ausgepreßt. Das erhaltene Filtrat wird mit destilliertem Wasser auf 30 ml Volumen aufgefüllt und zentri-fugiert.

Zentrifugation

Die Verwendung einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge ist – soweit vorhanden – zu empfehlen. Die Lösungen sind nach 30 min Zentrifugation bei 12000 Upm (= 17200 g) für die Kationenaustauschchromatographie geeignet.

*) Dr. H. MÜLLER, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Zentrallaboratorium für Isotopentechnik, Engesserstr. 20, D-7500 Karlsruhe

Bei Benutzung einer normalen Laborzentrifuge mit einer Maximaldrehzahl von 6000 Upm (= 4600 g) sind die unlöslichen Bestandteile in Pflanzenextrakten nicht immer ausreichend zu sedimentieren. Die DCD-Fraktion von der Kationenaustauscher-Säule ist in diesem Falle noch zu stark durch farbige Inhaltsstoffe verunreinigt, die die anschließende photometrische DCD-Bestimmung stören können. Eine Adsorptionschromatographie mit Aluminiumoxid sollte in diesem Fall deshalb der Kationenaustauschchromatographie vorgeschaltet werden.

Aluminiumoxid-Säulenchromatographie

Dazu wird Al_2O_3 für die Adsorptionschromatographie (Merck) mit der Aktivitätsstufe II–III nach Brockmann verwendet. Es wird trocken in die Chromatographiesäule mit 1 cm Durchmesser bis zu einer Säulenhöhe von 10 cm gegeben. 15 ml der bei 6000 Upm zentrifugierten Lösung werden auf die Säule pipettiert. Nach Durchlaufen des Adsorbens wird mit destilliertem Wasser nacheluiert, bis das Ausgangsvolumen von 15 ml erreicht ist.

Kationenaustausch-Säulenchromatographie

Die beiden stark sauren Kationenaustauscherharze Dowex 50WX8 (200–400 mesh) und Amberlite CG–120II (200–400 mesh) – jeweils in der Na^+ -Form – eignen sich gleichermaßen gut. Amberlite hat aber den Vorteil, daß es nach der Regenerierung mit 60 ml 1 molarer NaOH sich schneller neutral waschen läßt.

Die verwendeten Chromatographiesäulen haben einen Durchmesser von 2 cm, das vorgequollene Harz wird auf eine Säulenhöhe von 16 cm eingefüllt und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Auf die Säule werden entweder 15 ml der überstehenden Lösung nach der Zentrifugation bei 12000 Upm oder das Eluat von der Al_2O_3 -Säulenchromatographie gegeben. Es wird mit destilliertem Wasser eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt ca. 30 ml/h. Der Vorlauf von 80 ml nach Verwendung des Dowex- bzw. von 65 ml nach Verwendung des Amberlite-Harzes wird verworfen, der Hauptlauf von jeweils 35 ml für die photometrische DCD-Bestimmung verwendet.

Photometrische Bestimmung

Sie erfolgt nach Farbreaktion mit Diacetyl und 1-Naphthol (VILSMEIER, 1979). Eine wäßrige 0,005 mol/l Diacetylösung und eine stark alkalische 0,08 mol/l 1-Naphthollösung werden dazu benötigt. Der 1-Naphthollösung werden deshalb 1,8 mol/l NaOH, 1,2 mol/l Na_2CO_3 und noch zusätzlich 0,34 mol/l Ethanol (absolut) zugesetzt. Die 1-Naphthollösung muß kurz vor ihrer Verwendung stets frisch hergestellt werden.

Bei der Bereitung der Meßproben verfährt man folgendermaßen: 2 ml Eluat werden 1 ml 1-Naphthollösung und 0,5 ml Diacetylösung zugesetzt, das Kölbchen kurz geschüttelt und 1 h zur Farbentwicklung bei Zimmertemperatur stengelassen. In gleicher Weise wird die Blindlösung aus destilliertem Wasser und den beiden Reagentien hergestellt.

Die photometrische Messung erfolgt in 1-cm-Küvetten bei 545 oder 540 nm. Von Proben mit geringer Extinktion wird noch zusätzlich das Spektrum zwischen 700 und 400 nm aufgenommen. Wir verwenden das Beckman Spectrophotometer UV 5230.

Ergebnisse und Diskussion

Für die verschiedenen in diese Untersuchungen einbezogenen Nahrungspflanzen wurden die Koeffizienten der Funktionsgleichung $y = ax + b$, die als Eichgerade zur DCD-Bestimmung dient, ermittelt (siehe Tab. 1). Linearität ist im DCD-Konzentrationsbereich von 0 bis 25 $\mu\text{g}/2$ ml vorhanden.

Tab. 1

Koeffizienten der Funktionsgleichung $y = ax + b$ (Eichgeraden) zur Bestimmung der DCD-Gehalte in verschiedenen Nahrungspflanzen
 Coefficients of linear function $y = ax + b$ (calibration line) for the determination of DCD contents in various food plants

Matrix	Koeffizienten		
	a	b	r
Destilliertes Wasser	0,025	0,001	0,995
Spinat	0,025*	0,001	0,991
	0,024**	0,004	1,000
Kopfsalat	0,028**	0,001	0,999
Rote Rüben	0,028**	0,003	0,994
Möhren	0,026**	0,004	0,997

y = Extinktion bei 545 nm, x = DCD-Konzentration von 0–25 $\mu\text{g}/2$ ml,
 a = Steigung der Eichgeraden, b = Achsenabschnitt für $x = 0$ (Maßzahl für Verunreinigung im Eluat), r = Korrelationskoeffizient

*) Eluat von der Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid und Kationenaustauscher, Zentrifugation bei 6000 Upm

**) Eluat von der Säulenchromatographie mit Kationenaustauscher, Zentrifugation bei 12000 Upm

Reinigung von Spinatextrakten durch Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid und Kationenaustauscher führt zu Koeffizienten a und b , die mit denen von DCD in destilliertem Wasser identisch sind. Diese Eluate sind in jedem Fall farblos, wie auch entsprechende Versuche mit Kopfsalat, Rote Rüben und Möhren zeigten.

Die Gleichung der Eichgeraden $y = 0,025x + 0,001$ ist somit allgemein für die DCD-Bestimmung in Nahrungspflanzen gültig, wenn der Kationenaustauscher die Aluminiumoxidchromatographie vorgeschaltet wird. Bei Zentrifugation mit einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge und alleiniger Anwendung der Kationenaustauschchromatographie sind dagegen die für die entsprechende Matrix ermittelten Koeffizienten einzusetzen. Die Wiederfindungsraten für DCD-Zusätze von 20–100 μg (4–20 $\mu\text{g}/\text{g}$) betragen für die Aluminiumoxidchromatographie $99,1 \pm 2,8\%$ ($n = 4$). Für den gesamten Trennungsgang wurden Wiederfindungsraten von $97,3 \pm 5,1\%$ ($n = 6$) bei Einbeziehung von beiden chromatographischen Reinigungsschritten bzw. von $98,5 \pm 4,2\%$ ($n = 6$) bei alleinigem Einsatz des Ionenaustauschers ermittelt.

Aus diesen Daten läßt sich eine Nachweisgrenze von 0,2 mg/kg errechnen.

Mit Hilfe des zwischen 700 und 400 nm aufgezeichneten Spektrums ist relativ einfach zu erkennen, ob Extinktionswerte von $E = 0,002$ bis 0,005 entsprechend der untersuchten Matrix bzw. des verwendeten Trennungsgangs von DCD oder von Störsubstanzen herühren. Ein Wendepunkt bei 545–540 nm weist immer auf in der Probe vorhandenes DCD hin.

Hinweise auf Störsubstanzen finden sich in der Publikation von VILSMEIER (1979). Danach ergeben von den freien Aminosäuren nur das Arginin und von den DCD-Abbauprodukten nur das Guanidin eine Farbreaktion mit dem 1-Naphthol-Diacetyl-Reagenz. In beiden Fällen kommt es aber zur Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 515 bzw. 518 nm.

Wir konnten z. B. in Spinat kein Guanidin als Metabolit des applizierten DCD mit Hilfe der Säulen- und Dünnschichtchromatographie nachweisen.

Arginin wird unter unseren Elutionsbedingungen sowohl vom Aluminiumoxid als auch von den beiden verwendeten Kationenaustauscherharzen zurückgehalten.

Zusammenfassung

Es wird eine photometrische Methode zur Dicyandiamid (DCD)-Bestimmung in Nahrungspflanzen vorgestellt.

DCD wird entweder durch Kationenaustauschchromatographie allein (Methode 1) oder durch Adsorptionschromatographie mit Aluminiumoxid und anschließender Kationenaustauschchromatographie (Methode 2) abgetrennt.

DCD ergibt mit 1-Naphthol und Diacetyl einen roten Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum nahe 545 nm liegt.

Die Eichkurve ist im Konzentrationsbereich von 0–25 µg/2 ml linear.

Die Wiederfindungsraten betragen für Methode 1 $98,5 \pm 4,2\%$ bzw. $97,3 \pm 5,1\%$ für Methode 2, wenn dem Pflanzenmaterial 4–20 µg DCD/g zugesetzt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,2 mg DCD/kg Pflanzenmaterial.

Summary

MÜLLER, H.: *Photometrische Bestimmung von Dicyandiamid in Pflanzen (Photometric determination of dicyandiamide in plants)*.

Landwirtsch. Forsch. **39**, 1986

A photometric method for the determination of dicyandiamide (DCD) in food plants is described.

DCD is separated either by cation exchange chromatography alone (method 1) or by adsorption chromatography with aluminium oxide and cation exchange chromatography afterwards (method 2). DCD reacts with 1-naphthol and diacetyl to obtain a red colour complex with absorption maximum near 545 nm. Absorption increased linearly with DCD concentration from 0 to 25 µg/2 ml.

The recovery of DCD added at 4–20 µg/g to food plants is $98,5 \pm 4,2\%$ (method 1) resp. $97,3 \pm 5,1\%$ (method 2). The detection limit is 0,2 mg DCD/kg plant material.

Literatur

AMBERGER, A.: Wirkung und Einsatzmöglichkeiten des Nitrifikationshemmstoffes Dicyandiamid. Symp. „Nitrifikationshemmstoffe“, Weihenstephan, Okt. 1983. VDLUFA-Schriftenreihe, Heft 11, 22–47, 1984

MÜLLER, H.: Wirkung und Metabolismus des Nitrifikationshemmstoffes Dicyandiamid in Gefäßversuchen mit Spinat. Landwirtsch. Forsch. **36**, 18–26, 1983

ROORDA VAN EYSINGA, J. P. N. L.: Einige Erfahrungen mit der Anwendung von Nitrifikationshemmern im Unterglasgemüsebau. Symp. „Nitrifikationshemmstoffe“, Weihenstephan, Okt. 1983. VDLUFA-Schriftenreihe, Heft 11, 157–170, 1984

SOLANSKY, S.: Anwendung von DIDIN-haltigen Stickstoffdüngern (ALZON) im Getreidebau. Symp. „Nitrifikationshemmstoffe“, Weihenstephan, Okt. 1983. VDLUFA-Schriftenreihe, Heft 11, 239–253, 1984

VILSMEIER, K.: Kolorimetrische Bestimmung von Dicyandiamid in Böden. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. **142**, 792–798, 1979

VILSMEIER, K.: Verbesserte kolorimetrische Bestimmung von Dicyandiamid in Bodenextrakten. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. **145**, 503–505, 1982