

Die bei dem ELISA-Verfahren erhaltenen Extinktionswerte standen in keiner Beziehung zur Symptomausprägung. Demnach war die Viruskonzentration hier, anders als bei Versuchen unter verschiedenen Temperaturbedingungen (DE BOKX und PIRON 1977), für die unter Gewächshausbedingungen gebildeten Symptome nicht entscheidend.

Neben der Sorten-Virus-Kombination kann auch der Infektionszeitpunkt eine Rolle spielen. Symptome bei Primärinfektionen waren oft weniger gut erkennbar als die Symptome der Nachbauten.

Da in diesen Untersuchungen latente Infektionen oder Infektionen mit nur leichten Symptomen wiederholt auftraten, kann man wohl davon ausgehen, daß fehlende oder nur schwer erkennbare Symptome auch unter Feldbedingungen nicht selten sind. Derart erkrankte Pflanzen werden in der Feldanerkennung nur unvollständig erfaßt, erst ein Test kann hier Gewißheit über den Gesundheitszustand der Pflanzen erbringen. Sorten-Virus-Kombinationen, die keine oder nur schwache Symptome verursachen, haben deswegen einen Selektionsvorteil gegenüber Infektionen mit deutlich sichtbaren Symptomen. Sie können sich im Sortiment anhäufen und die Voraussetzung für neue Viruskalamitäten bilden. Erst eine konsequente Testung des Oberstufenmaterials kann einen solchen Selektionsvorteil abbauen und dadurch Voraussetzungen schaffen, die weitere Viruskalamitäten verhindern.

tionsvorteil gegenüber Infektionen mit deutlich sichtbaren Symptomen. Sie können sich im Sortiment anhäufen und die Voraussetzung für neue Viruskalamitäten bilden. Erst eine konsequente Testung des Oberstufenmaterials kann einen solchen Selektionsvorteil abbauen und dadurch Voraussetzungen schaffen, die weitere Viruskalamitäten verhindern.

Literatur

- BODE, O., 1959: Untersuchungen über das Y-Virus der Kartoffel (Tabak-Rippenbräune-Stämme) Mitt. Biol. Bundesanst. H 97, 52–60.
 BOKX, J. A. DE, P. G. M. PIRON, 1977: Effect of temperature on symptom expression and relative virus concentration in potato plants infected with potato virus Y^N and Y^O. Potato Res. 20, 207–213.
 KÖHLER, E., J. BÄRNER, 1942: Über den sogenannten latenten Virusbefall in deutschen Kartoffelsorten. Forschungsdienst, Organ dtsh. Landwirtschaft 13, 14–18.
 ROHLOFF, H., 1979: Beitrag zur Analyse der Kartoffel-Y-Virus-Epidemie von 1976. Gesunde Pflanzen 31, (11), 296–299.
 WEIDEMANN, H. L., R. KOENIG, 1979: Untersuchungen über neue Isolate des Kartoffel-Y-Virus. Gesunde Pflanzen 31, (11), 293–296.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 33 (12), S. 180–191, 1981, ISSN 0027-7479.
 © Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Berlin

Das Schicksal eines scheinbaren Herbizid-Endmetaboliten, des Hydroxymonolinuron- β -glucosids, in Böden und Pflanzen*)

Fate of an apparent herbicide terminal metabolite, hydroxy monolinuron β -glucoside, in soil and plants

Von W. Ebing und A. Haque

Zusammenfassung

Der konjugierte Metabolit Hydroxymonolinuron- β -glucosid wurde in früheren Untersuchungen über Monolinuron in Pflanzen identifiziert (SCHUPHAN & EBING, 1978). Zu Untersuchungen über sein Metabolismusverhalten und zur Beantwortung der Frage, ob seine Bildung einer Detoxifikationsreaktion gleichkommt, wurde radioaktiv markiertes ¹⁴C- β -Glucosid synthetisiert. Im Modellversuch mit Spinat und zwei Standardböden wurde gezeigt, daß das ¹⁴C-Hydroxymonolinuron- β -glucosid gespalten und umgewandelt wird unter Bildung von 4-Chlorphenyl-hydroxymethylmethoxyharnstoff, 4-Chlorphenyl-methoxyharnstoff, 4-Chlorphenylharnstoff und

Kohlendioxid. Die Umwandlungsbilanz in einem geschlossenen Kultursystem mit Spinatpflanzen hat zu dem Ergebnis geführt, daß 96,6 % der Radioaktivität wiedergefunden wurden. Davon waren 3,3 % als ¹⁴CO₂ und 0,1 % als flüchtige Metaboliten festgestellt worden. Bei der Identifizierung der Metaboliten wurden zwei neue Glucosid-Konjugate entdeckt, deren genaue Strukturen jedoch nicht aufgeklärt werden konnten. In einem anderen Versuch wurde Sommerweizen auf Boden kultiviert, der mit ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-glucosidhaltigem Spinat gedüngt war. Zum Erntezeitpunkt waren nur 1,8 % der Radioaktivität für den Weizen bioverfügbar, 5,2 % wurden als ¹⁴CO₂ ausgeschieden, und 82 % blieben im Boden gebunden.

Die Ergebnisse wurden in einen Zusammenhang gestellt mit den bisher bekannten Literaturinformationen über die Bildung und Bedeutung der Konjugat-Metaboliten aus Pflanzenschutzmitteln.

*) Diese Untersuchung wurde im Rahmen des mit BMFT-Mitteln geförderten Pilot-Umweltprobenbank-Projekts unter der Projekträgerschaft des Umweltbundesamtes durchgeführt.

Abstract

The conjugated hydroxymonolinuron- β -glucoside is a metabolite identified from monolinuron studies (SCHUPHAN and EBING, 1978). In order to study its metabolic behaviour and to answer the question whether its formation can be interpreted as a detoxification reaction, radio-labeled ^{14}C - β -glucoside was synthesized. The short-term model experiments with spinach plants and the two standard soils showed that cleavage of ^{14}C -hydroxymonolinuron- β -glucoside and biodegradation occurred with the formation of 4-chlorophenyl-hydroxymethyl methoxyurea, 4-chlorophenyl-methoxyurea, 4-chlorophenylurea and carbon dioxide. The balance of conversion with the spinach plants in a closed cultivating system showed after 27 days experiment that the recovery of the applied radioactivity was 96.6 %; out of which 3.3 % were $^{14}\text{CO}_2$ and 0.1 % volatile metabolites. The metabolites of short-term experiments were confirmed and two new glucoside conjugates were identified, but their structures could not be postulated. In another experiment, ^{14}C -hydroxymonolinuron- β -glucoside injected into spinach plants was added to the soil for uptake by spring wheat plants in a closed cultivating system. The results showed at harvest that only 1.8 % were available to the wheat plants, 5.2 % of the radioactivity were liberated as CO_2 and 82 % were bound to the soil.

The results obtained are discussed in relation to the formation of conjugates with pesticides and their significance in the evaluation of terminal residues.

1. Einleitung

Nach der Anwendung eines Pflanzenschutzmittels gemäß guter landwirtschaftlicher Praxis nimmt in der Regel die Konzentration des Wirkstoffes dieses Mittels im Boden und in den Pflanzen – meist einer hyperbolischen Kurve folgend – deutlich ab. Ein nicht unbedeutender Anteil dieser Originalwirkstoffe wandelt sich dabei in Folgeprodukte um, die an zucker- oder eiweißartige Substanzen gebunden vorliegen. Auch die Ausgangswirkstoffe können in dieser Weise „konjugiert“ werden.

Diese „gebundenen Rückstände“ stellen nach unseren früheren Untersuchungsergebnissen und denen anderer Arbeitskreise nicht selten die Hälfte des vom Kontaminanten verursachten Fremdstoffmaterials in den Pflanzen dar. Sie wurden bis vor kurzem wenig beachtet, da sie einmal analytisch schwieriger erfassbar sind, zum anderen aber auch als Detoxifikationsprodukte im Verhältnis zum Originalfremdstoff angesehen werden.

Die soeben gegebene Beurteilung läßt sich jedoch nur vertreten, wenn sichergestellt ist, daß sich aus diesen konjugierten, oft als Endmetabolite (terminal residues) apostrophierten Materialien nicht unter physiologischen Bedingungen erneut toxischere oder reaktivere Stoffe bilden können.

Genau diese Fragestellung wurde mit dem Folgeprodukt eines Pflanzenbehandlungsmittels, dessen Metabolismus dem hier berichtenden Bearbeiterkreis experimentell gut bekannt war (SCHUPHAN und EBING, 1978), in dem soeben abgeschlossenen Vorhaben modellhaft untersucht. Sie trägt bei zu der erstmals vor fünf Jahren geführten Diskussion auf einer eigens für die gebundenen und konjugierten Rückstände von Pflanzenbehandlungsmitteln vom 23. bis 25. Juni 1975 in Vail/Colo., USA, durch die American Chemical Society organisierten Tagung.

Die Ergebnisse unserer Arbeit ergänzen und werden ergänzt durch einige inzwischen erschienene Veröffentlichungen über das entsprechende Verhalten anderer Wirkstoffe. Aus allen diesen Informationen zusammen läßt sich im Diskussionsteil dieser Arbeit ein gerundetes Bild von der Situation entwerfen.

Unsere früheren Untersuchungen (SCHUPHAN und EBING, 1978) über das Verhalten des Herbizids Monolinuron in Spinat, Kresse und Kartoffeln hatten u. a. zum Ergebnis, daß zu

einem Drittel Hydroxymonolinuron, konjugiert als β -Glucosid, entsteht. Dieser „Endmetabolit“ diente uns als Modell für die gegenwärtige Studie.

2. Experimentelles

2.1. Material

Synthese radioaktiv markierten Hydroxymonolinuron- β -glucosids.

Hydroxymonolinuron, 3-(4-Chlorphenyl)-1-hydroxymethyl-1-methoxyharnstoff, uniform phenyl- ^{14}C -markiert (10 mCi/mMol = 370 MBq) mit einer radioaktiven Reinheit von 99 % wurde von den Farbwerken Hoechst AG käuflich erworben. Als Vorstufe für die Synthese wurde ^{14}C -Hydroxymonolinuron verwendet und mit Acetobromglucose umgesetzt. Das entstandene O- β -D-tetra-O-Acetylglucopyranosid des 3-(4-Chlorphenyl- ^{14}C)-1-methoxy-1-hydroxymethylharnstoffs wurde mit Natriummethylat deacetyliert und das β -D-Glucosid durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie (DC) in Laufmittel E gereinigt. Die Identität wurde massenspektroskopisch und enzymatisch gesichert.

Die zur Identifizierung von Metaboliten nötigen Vergleichsverbindungen wurden selbst synthetisiert (SCHUPHAN, 1974 und 1975b).

β -Glucosidase, β -Glucuronidase und Carboxypeptidase A wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen, die β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Spaltung erfolgte nach FREAR et al. (1974). Die Carboxypeptidase-A-Spaltung wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 37 °C durchgeführt.

Alle Lösungsmittel waren von p.a. Qualität oder für die Rückstandsanalytik bestimmt (Merck). Als Sorptionsmaterialien dienten Kieselgel G und GF₂₅₄. Für säulenchromatographische Zwecke wurde Sephadex LH-20 (Pharmacia) verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Bodenversuche und $^{14}\text{CO}_2$ -Bestimmung

Entsprechend dem Merkblatt 36 der BBA wurden die zwei verschiedenen Standardböden (LUFÄ, Speyer):

Boden 1 – stark humoser lehmiger Sand (org. C-Geh. 2,5 %; abschlämmbare Teile: 16,4 %, pH 6,7)

Boden 2 – mäßig humoser, lehmiger Sand (org. C-Geh. 1,0 %; abschlämmbare Teile: 23 %; pH 5,6) nach Wasserbestimmung und Feststellung der maximalen Wasserkapazität

(MWK) auf 40 % MWK gebracht und 3 Wochen bei 22 °C \pm 2 °C gehalten. Von diesen Böden wurden jeweils gleiche Mengen (Trockengewicht 50 g) in Biometerkolben eingewogen (Abb. 2) und mit ^{14}C -markiertem β -Glucosid über eine Präzisionspritze versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Kolben verschlossen und im dunklen Brutschrank bei 22 °C inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurden die entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen gemessen. Weitere Einzelheiten sind a. a. O. beschrieben (HAQUE et al., 1978).

2.2.2. Boden-Versuche unter sterilen Bedingungen

Für Sterilboden-Versuche wurden die Böden 1 und 2 in Biometerkolben drei Tage hintereinander eine Stunde lang bei 120 °C und 0,98 bar autoklaviert und die Böden aseptisch mit ^{14}C -markiertem β -Glucosid behandelt. Die Applikation geschah mit einer Spritze, die mit einem Membranfilterhalter versehen war (0,2 μm Millipore-Filter). Die Sterilität des Bodens wurde vor und nach dem Versuch durch Inkubation mit einem Nährboden (Zusammensetzung: Glucose 20 g,

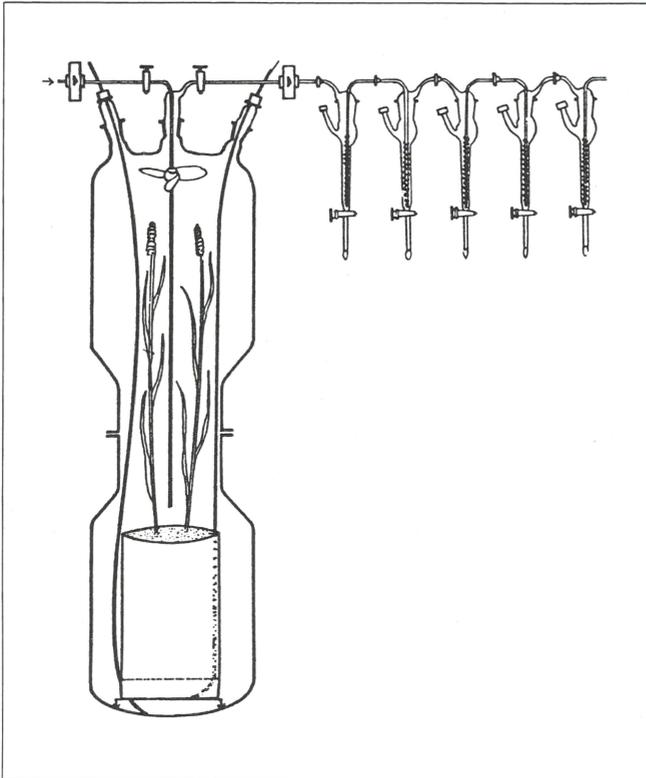
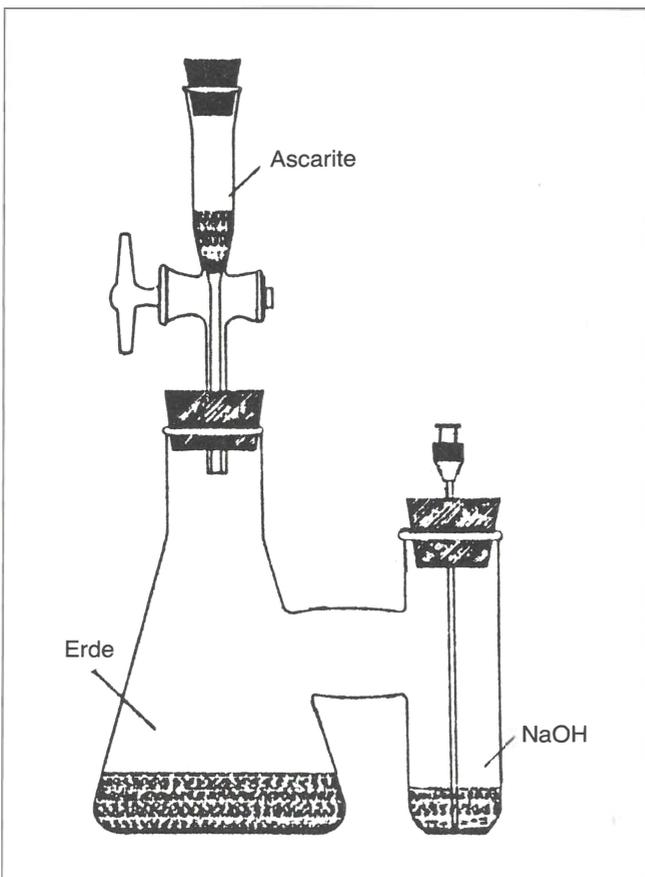


Abb. 1. Geschlossenes Ganzglas-Kultursystem für Bilanzversuche.

Abb. 2. Aufbau eines Biometerkolbens für die Standardbödenversuche.



Hefe-Extrakt 10 g, CaCO₃ 20 g, Agar 17 g pro 1 l Wasser) kontrolliert.

2.2.3. ¹⁴C-Glucosid-Applikation auf Pflanzen

Die Applikation wurde mit einer Präzisionspritze in dreierlei Weise ausgeführt: Tropfen auf die Blätter, Injizieren in die Stengel und Einbringen in das Wurzelmedium. Die Pflanzen wurden in Hydro-Kultur in einem halb konzentrierten Nährmedium nach HOAGLAND & ARNON (1950) kultiviert.

2.2.4. Durchführung der Versuche im geschlossenen Glaskulturgefäßsystem

Die Bilanzversuche erfolgten in einem Planflansch-Glaskulturgefäß (Abb. 1), dessen Funktionsweise an anderer Stelle beschrieben wurde (SCHUPHAN, 1977). Für diese Versuche wurde Berlin-Dahlemer (BBA-)Boden verwendet.*) Gasförmige Metaboliten wurden in Äthylenglykolmonomethyläther bzw. Äthylenglykolmonomethyläther-Äthanolamin (1 : 1) während der Kulturzeit aufgefangen, wobei die Vorlagen zweimal wöchentlich gewechselt wurden. Die Versuche wurden in einem auf 20 °C ± 3 °C klimatisierten Gewächshaus durchgeführt.

Die Belichtung der Pflanzen erfolgte hauptsächlich durch Leuchtstoffröhren, Typ Sylvania, 215 W, white und cool white, kombiniert mit Typ Osram 60 W, Fluora + HQI-TS, 250 W/D, 22 klux im Tag/Nachtrhythmus 16 : 8 Stunden.

6 Wochen alte Spinatpflanzen (Sorte Monnopa) wurden in einen Glaszylinder-Einsatz, der mit Erde gefüllt war, umgepflanzt. Nach 10 Tagen weiterem Wachstum wurde den Pflanzen vor dem Einbringen in das geschlossene System ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in die Stengel injiziert. Nach 27 Tagen wurden die Pflanzen durch Abschneiden über der Erdoberfläche geerntet. Aber auch die Wurzeln wurden herausgeholt, gespült und ihr Gewicht bestimmt. Pflanzen und Erde wurden bis zur Extraktion bei - 25 °C aufbewahrt. Dabei wurden Bodenschichten von je 5 cm Tiefe getrennt gehalten.

Die Pflanzensorten, die in den Versuchen eingesetzt wurden, waren Spinat, Sorte Monnopa, und kurzhalziger Sommerweizen, Sorte Arkas.

2.2.5. Extraktion

Das Pflanzenmaterial wurde im Kontakt mit einem Gemisch von Methanol/Chloroform/Wasser (1 : 1 : 1) zerkleinert (Ultra-Turrax) und homogenisiert. Der Brei wurde durch eine Filternutsche gesaugt und zweimal mit dem gleichen Gemisch nachgespült. Der Rückstand wurde erneut mit dem gleichen Gemisch während 10 Minuten während der Ultrabeschallung extrahiert und der davon übrig bleibende Filterkuchen darüber hinaus 16 Stunden lang im Soxhlet-Apparat mit Methanol extrahiert. Weil - wie sich herausstellte - der Soxhlet-Extrakt nur vernachlässigbare Radioaktivitätsmengen enthielt, wurden im allgemeinen lediglich die beiden anderen Extrakte jeweils auf ein Mischungsverhältnis von Chloroform : Methanol : Wasser (2 : 2 : 1,8 ^{v/v}) gebracht und nach der Methode von BUGH-DYER (1959) in zwei Phasen, nämlich in eine Methanol/Wasser- und eine Chloroform-Phase aufgetrennt (Abb. 3). Aliquote Teile dieser Phasen wurden anschließend im Scintillationszähler gemessen.

Die Bodenproben wurden zuerst 18 Stunden lang bei Raumtemperatur mit Methanol/Chloroform/Wasser

*) Analyse: pH (KCl) = 6,7; C_t = 1,361 %; N_t = 0,102 %; C_N = 13,3; H₂O-Kapazität 33,6 %; Korngrößen 2000-630 μ = 5,4 %; 630-200 μ = 35,3 %; 200-63 μ = 33,3 %; 63-20 μ = 13,2 %; 20-6,3 μ = 3,1 %; < 2 μ = 4,5 %.

(2 : 2 : 1,8 v/v) geschüttelt, wobei das Lösungsmittelgemisch im Volumenverhältnis von 2 ml zu 1 g Erde aufgewendet wurde. Daran schlossen sich die übrigen, bei den Pflanzen beschriebenen Extraktionsschritte an.

Das Kondenswasser wurde dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt sowie die Radioaktivität jedes Extraktes gemessen. Anschließend wurde die im Wasser verbliebene restliche Radioaktivität mit Bariumhydroxid ausgefällt. Durch Salzsäure-Zugabe verflüchtigte sich die Radioaktivität aus der Fällung. Damit war sichergestellt, daß die ausgefallene Radioaktivität aus dem im Kondenswasser gelösten CO₂ bestand.

2.2.6. Analytik

2.2.6.1. Radioaktivitätsmessungen

Die quantitative Radioaktivitätsmessung erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Nuclear Chicago, Mark II) mit Szintillatorflüssigkeit auf Dioxanbasis. Zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren Radioaktivität in Pflanzen und Bodenproben wurde eine Verbrennung im Packard Tri-Carb Sample-Oxidizer (Modell 306) unter Benutzung von Permafluor V Szintillator und Carbosorb vorgenommen.

Die Untersuchungen radioaktiver Extrakte auf DC-Platten wurden mit Hilfe eines Dünnschichtscanners (Berthold LB 2723, Serie II) und durch Autoradiographie (Agfa-Gevaert, Osray T4-Film) durchgeführt.

Zur Detektion radioaktiver Eluate bei der Säulenchromatographie wurde ein Durchflußmonitor (Berthold-Friesecke BF 5026 mit Modul BF 2240) verwendet.

2.2.6.2. Dünnschicht-(DC) und Säulenchromatographie

Neben handgegosenen Kieselgelplatten (4,5 g G bzw. 12,5 g GF₂₅₄ auf 20 × 20 cm) kamen Fertigplatten der Firma Merck mit Kieselgel (60) GF₂₅₄ (Schichtdicken 0,25 und 0,50 mm) mit folgenden Laufmittelgemischen zum Einsatz. Für weniger polare Metaboliten:

(A) Toluol/Aceton (2 : 1); (B) Chloroform/Methanol (9 : 1); Zur Auftrennung stärker polarer Metaboliten:

(C) n-Propanol/Chloroform (1 : 1); (D) Chloroform/Äthylacetat/Ameisensäure (16 : 75 : 10); (E) n-Propanol/Chloroform/Wasser (85 : 30 : 15); (F) Chloroform/Methanol/Essigsäure (75 : 20 : 5). Die Vergleichsmetaboliten waren im UV-Licht bei 254 nm sichtbar. Die grobe Auftrennung von Metaboliten im Methanol/Wasser-Extrakt und im Chloroform-Extrakt erfolgte an einer Sephadex-LH-20-Säule (100 cm × 1,8 cm i. Ø) mit Äthanol als Eluens. Die radioaktiven Eluate erfuhren nach Konzentrierung weitere Auftrennung auf präparativen Kieselgelplatten. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte durch Co-Chromatographie mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Vergleichsverbindungen in den Laufmitteln A–F durch Autoradiographie, Gaschromatographie und kombinierte GC/MS-Technik. Die Konjugat-Metaboliten wurden vorher enzymatisch gespalten und die Aglykone weiter untersucht (Abb. 3).

2.2.6.3. Gaschromatographie und kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die gaschromatographische Identifizierung der Metaboliten wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gaschromatograph: Hewlett-Packard, Modell 5750-G
Detektor: N-FID, 200 °C

Säule: Duranglas 2 mm × 2 m i. Ø, 4 % OV-17 auf Chromosorb W-HP (AW-DMCS) 100–120 mesh. Temperaturpro-

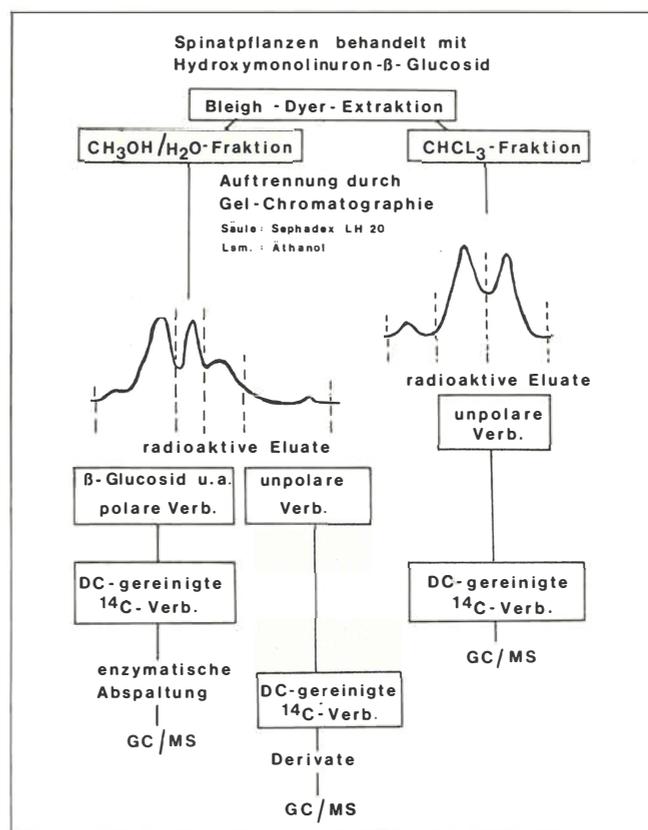


Abb. 3. Aufarbeitungs- und Aufreinigungsschema der Pflanzen- und Bodenproben.

gramm: 100 °C → 240 °C, 8°/min.

Einspritzblocktemperatur: 300 °C

Trärgas: He, 40 ml/min;

Detektorgase: Luft, 50 ml/min; H₂ 100 ml/min; O₂, 20 ml/min.

Die GC/MS erfolgte durch Kombination eines Varian 1400 Gaschromatographen mit einem Varian MAT 112 MS-Gerät. Ionisierungsspannung 70 eV; Temperatur der Ionenquelle 250 °C. GC-Bedingungen: Säule: Duranglas 1,34 m × 2 mm i. Ø, 4 % OV-1 auf Chromosorb W-HP (AW-DMCS, 100–120 mesh).

Temperaturprogramm: 100 °C → 235 °C, 8°/min;

Trärgas: He, 15 ml/min.

2.2.6.4. Derivatisierung

Die isolierten Metaboliten-Proben wurden mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (MSTFA, Macherey & Nagel Co., Düren) derivatisiert. Die Probe wurde in einen Mikrokolben übergeführt, mit Stickstoff trocken geblasen. Zu etwa 1 µg Substanz wurden 10 µl MSTFA gegeben und bei 60 °C fünf Minuten lang erwärmt. Nach 2–5 Stunden Stehenlassen wurde die gesamte Reaktionslösung in den Gaschromatographen eingegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Aufnahme und Verteilung von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-glucosid in Spinat- und Maispflanzen

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, wird das auf die Spinatblätter applizierte Glucosid nur in geringem Maße weiter transpor-

Tab. 1. Translokation und Verteilung von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in Spinatpflanzen nach verschiedenen Applikationsmethoden. Die Prozepte sind auf wiedergefundene Radioaktivität bezogen.

Applikationsmethode	Tage	Pflanzen (%)				Applik.-punkt	Summe (%)	Nährmedium (%)
		Blätter	Stengel	Triebe	Wurzeln			
Blatt-Applikation	1	1,47	0,54	0,15	0,15	97,7	100	0,0
	7	4,30	1,02	0,00	0,18	94,5	100	0,0
Stengel-Applikation	1	65,68	3,94	21,97	0,50	7,91	100	0,0
	7	81,47	3,99	1,60	0,34	12,61	100	0,0
Wurzel-Applikation	1	1,28	1,06	0,35	3,47	0,0	6,16	93,84
	7	15,19	2,12	2,19	18,04	0,0	37,53	62,47

Tab. 2. Differenzierung der extrahierbaren ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-glucosid-Metaboliten aus Spinat im Hydroponic Culture Versuch, 7 Tage nach Wurzelapplikation. Die Prozepte sind auf applizierte Radioaktivität bezogen.

Probe	extrahierb. Radioakt. (%)	Differenzierung* der extrahierbaren Radioaktivität (%)				nicht extrahierb. Radioakt. (%)	Summe wiedergef. (%)
		Rf < 0,20 (Glucosid)	Rf 0,37	Rf 0,60	Rf > 0,80		
Blätter + Stengel	34,9	1,6	9,1	12,3	11,9	4,1	—
Wurzeln	1,2	0,4	0,2	0,2	0,4	10,7	—
Nährmedium	35,5	1,3	14,9	6,6	12,7	—	86,4

* DC auf Kieselgel, Laufmittel F

Tab. 3a. Abbau von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in zwei Standardböden unter Laborbedingungen nach 32 Tagen. Die Prozepte sind auf applizierte Radioaktivität bezogen.

Boden Typ	Gesamt-ausgesch. ¹⁴ CO ₂ (%)	Differenzierung* der extrahierbaren Radioaktivität (%)				nicht extrahierb. Radioakt. (%)	Summe wiedergef. (%)
		Rf 0,1 (Glucosid)	Rf 0,12	Rf 0,34	Rf > 0,50		
Boden 1	23,0 ± 1,4	1,8	2,5	10,8	6,0	55,7 ± 2,7	99,8
Boden 2	22,6 ± 2,3	3,7	6,5	7,3	5,5	52,7 ± 2,9	98,3

* DC auf Kieselgel, Laufmittel F

Tab. 3b. Abbau von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in zwei sterilisierten Standardböden unter Laborbedingungen nach 34 Tagen. Die Prozepte sind auf applizierte Radioaktivität bezogen.

Boden Typ	Gesamt-ausgesch. ¹⁴ CO ₂ (%)	Differenzierung* der extrahierbaren Radioaktivität (%)				nicht extrahierb. Radioakt. (%)	Summe wiedergef. (%)
		Rf 0,1 (Glucosid)	Rf 0,22	Rf 0,45	Rf > 0,7		
Boden 1	0,20	6,0	4,0	62,6	1,5	27,0	101,1
Boden 2	0,20	75,4	4,4	11,6	0,8	7,1	99,3

* DC auf Kieselgel, Laufmittel F

Tab. 4. Bilanzierung des Verbleibs von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in Spinat und Boden im geschlossenen System nach 27 Tagen Versuchsdauer. Die prozentuale Verteilung ist auf die eingesetzte Radioaktivität bezogen.

Probe	Extrahierbare Radioaktivität			Summe extrahierbar (%)	Summe nicht extrahierbar (%)	Summe (%)
	Kaltrakt nach Bligh-Dyer (%)	Ultraschall MeOH (%)	Soxhlet MeOH (%)			
Blätter + Stengel	6,28	0,17	0,09	6,54	3,39	9,93
Wurzeln	0,05	0,01	0,01	0,07	0,47	0,54
Boden:						
0–5 cm	9,96		2,32	12,28	66,07	78,35
5–10 cm	0,45		0,13	0,58	2,58	3,16
10–15 cm	0,10		—	0,10	0,81	0,91
Flüchtige Metaboliten:						
Metab. + CO ₂				3,32	—	3,32
Kondenswasser				0,13	—	0,13
Sickerwasser				0,17	—	0,17
Gefäßspülung				0,09	—	0,09
Summe				23,28	73,32	96,60

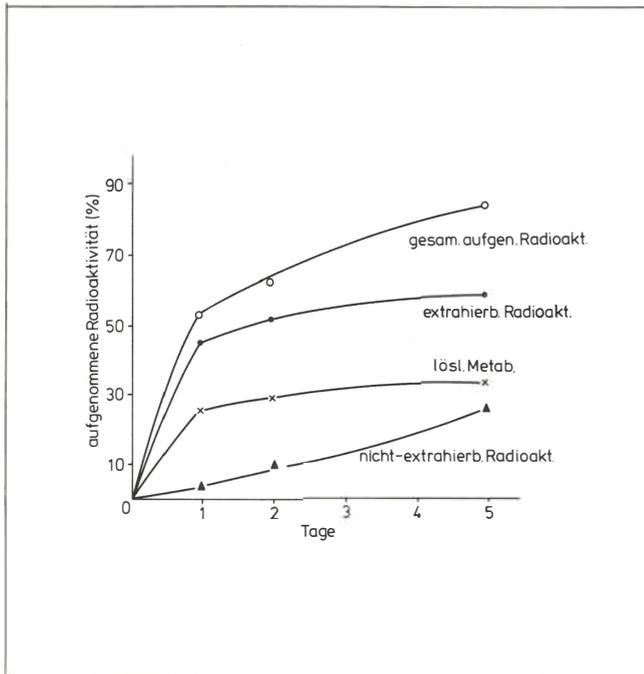


Abb. 4. Absorption und Verteilung von ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosid in Maispflanzen.

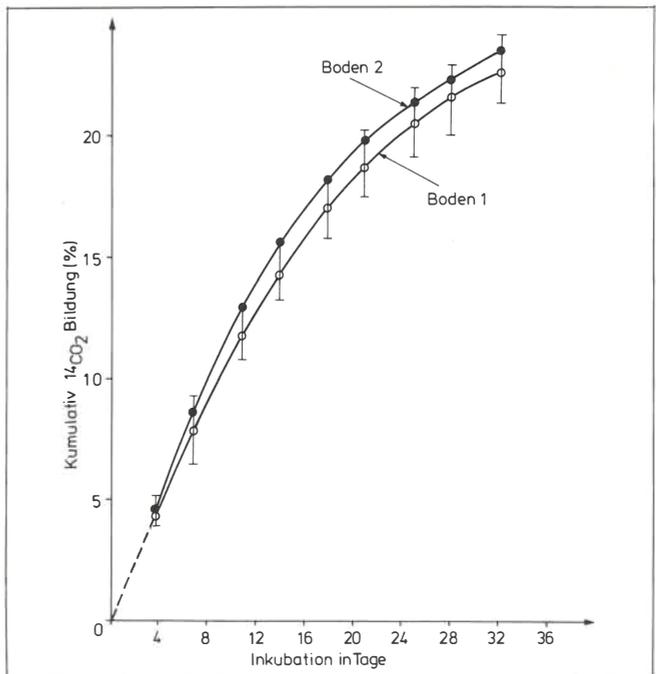


Abb. 5. Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ in zwei Standardböden nach ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosid-Behandlung.

tiert. Wird es dagegen in die Stengel injiziert oder den Wurzeln angeboten, so kann erhebliche Mobilität des Konjugates festgestellt werden, und zwar in akropetaler Richtung offenbar durch das Xylem. Die dünnschichtchromatographische Differenzierung der extrahierbaren Radioaktivität der Spinatpflanze (Blätter + Stengel + Wurzel) (Tab. 2) ergibt, daß > 90 % des ursprünglichen Glucosids bereits nach 7 Tagen umgewandelt worden sind. Ein ähnliches Abbauverhalten stellten wir durch Hydrokulturversuche mit Mais fest: Nach fünf Tagen bestanden 33 % nicht mehr aus dem ursprünglichen Glucosid, sondern aus Abbauprodukten davon (Abb. 4). Somit dürfte das von uns gefundene Abbauverhalten des Hydroxymonolinuron- β -glucosids für mehrere Pflanzenarten zutreffen.

3.2. Abbau von ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosid in zwei Standardböden

Die zeitliche Verfolgung der Bildung des $^{14}\text{CO}_2$ aus der ^{14}C -phenyl-Markierung zeigt, daß Hydroxymonolinuron- β -glucosid zum Teil rasch zu Kohlendioxid mineralisiert werden kann. Nach 32 Tagen sind bereits 23,0 % in Boden 1 und 22,6 % in Boden 2 zum Endabbauprodukt Kohlendioxid abgebaut (vgl. Tab. 3a, Abb. 5). Die Ergebnisse aus entsprechenden Versuchen mit sterilem Boden (Tab. 3b) zeigen, daß dieser hohe Anteil $^{14}\text{CO}_2$ aus der mikrobiellen Ringspaltung stammen muß. Der Befund, daß bei sterilem Boden 1 trotzdem viel Glucosid abgebaut worden ist (nicht zu CO_2 !), wird von uns auf Hydrolysereaktionen zurückgeführt.

Die Extrahierbarkeit der Radioaktivität war bei nicht sterilisierten Böden infolge der Tätigkeit von Mikroorganismen kleiner als bei sterilisierten.

3.3. Erstellung der Radioaktivitätsbilanz

Die Bilanzierung der in die Pflanzenstengel injizierten Radioaktivität konnte nach 27 Tagen Versuchsdauer mit 96,6 %

Wiederfindungsrate abgeschlossen werden (Tab. 4). Obwohl die Applikation in den Stengel erfolgte, gelangte eine nicht unerhebliche Radioaktivitätsmenge in die Erde. Dies war artifiziel bedingt, da während des Injizierens sich im Stengel ein Überdruck in den Stamm gebildet hatte, der zum Auslaufen eines Teiles der Applikationslösung führte. Aus den Wurzeln wurde Radioaktivität nicht abgesondert, wie schon im Kurzzeit-Versuch in Abschnitt 3.1 (Tab. 1) festgestellt wurde. Den flüchtigen Radioaktivitätsanteil während des Versuchs stellten mit 3,3 % das $^{14}\text{CO}_2$ und andere Metaboliten. Der Verlauf der Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ und flüchtigen Metaboliten ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ in den ersten 15 Tagen deutlich rascher vorstatten ging als gegen Versuchsende. Dies gilt auch für die flüchtigen Metaboliten, die mit dem Kondenswasser oder in den Absorptionsvorlagen aufgefangen wurden. Wie Tabelle 4 zeigt, ist die Extrahierbarkeit der Radioaktivität aus den verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedlich. Es ist bemerkenswert, daß ein großer Teil Radioaktivität gebunden bleibt und nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden konnte. Es ist anzunehmen, daß die gebundenen Rückstände hauptsächlich aus den Umwandlungsprodukten des β -Glucosid-Konjugats entstanden sind.

3.4. Metabolitenzuordnung

Die quantitative Differenzierung der extrahierbaren Radioaktivität zeigt (Tab. 5), daß ca. 87 % des ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosids während der 27 Tage Versuchsdauer abgebaut wurden. Die hauptsächlichlichen Umwandlungsprodukte (Verb. III + IV und I + II) sind weniger polar als das ursprüngliche β -Glucosid. Außerdem sind auch polarere Verbindungen in Pflanzen und Erde entstanden. Die mit dem Kondenswasser aufgefangene Radioaktivität besteht hauptsächlich aus nicht polaren Verbindungen, die flüchtig sind und hohen Dampfdruck haben.

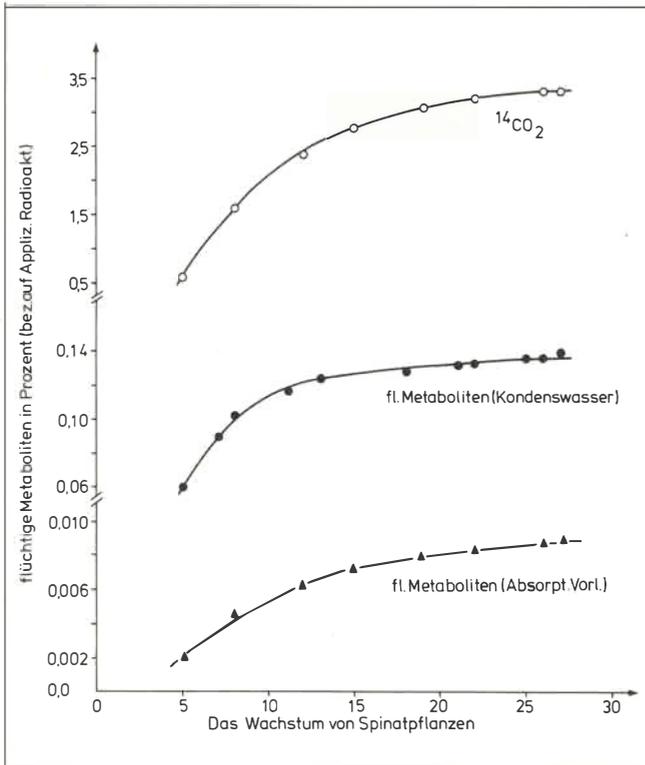


Abb. 6 (links). Bildung von flüchtigen Metaboliten und CO₂ während des Wachstums der Spinatpflanzen.

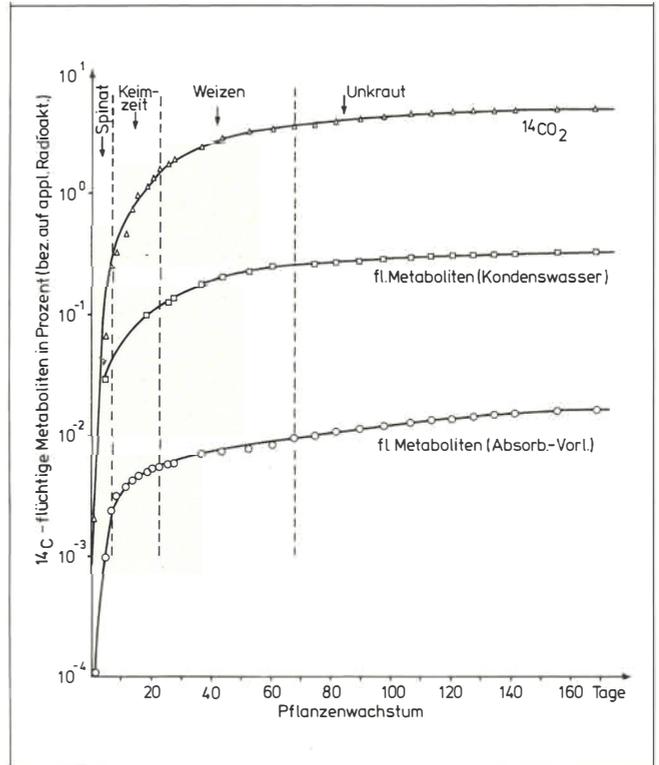


Abb. 7 (rechts). Bildung von flüchtigen Metaboliten und CO₂ während des Wachstums von Sommerweizen als Folgekultur nach Gründung durch ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid-behandelte Spinatpflanzen in einem geschlossenen System.

3.4.1. Metabolismus in Spinat

Die Aufarbeitung nach dem Schema der Abbildung 3 und die quantitative Auftrennung ergab, daß 13,3 % als unverändertes ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in der Methanol/Wasser-Fraktion vorliegt, jedoch kein Glucosid in der Chloroform-Fraktion (Tab. 6a, 6b). Zusätzlich zur Ausgangsverbindung sind zwei neue Metaboliten als Konjugate aufgetreten, die teilweise mit β-Glucosidase, β-Glucuronidase oder Carboxypeptidase abspaltbar sind. Als Spaltprodukte konnten aus diesen Konjugaten die Aglukone Verb. II und III identifiziert werden (Tab. 7). Der Hauptmetabolit, der identifiziert werden konnte, war 4-Chlorphenylharnstoff (Verb. IV, 16 %). Er

nimmt gleichzeitig eine Zentralstellung in dem Metabolismusweg des ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosids ein.

3.4.2. Metabolismus im Boden

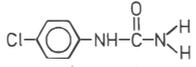
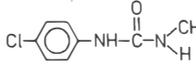
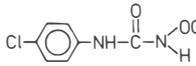
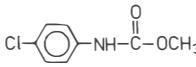
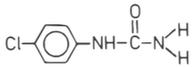
Der extrahierbare Radioaktivitätsanteil des Bodens an der eingesetzten Radioaktivität betrug 12,9 % (Tab. 4). Die quantitative Auftrennung dieser extrahierbaren Radioaktivität ergab nach der für die Spinatpflanzen beschriebenen Aufarbeitungsmethode (Abb. 3), daß 3,1 % ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid unverändert geblieben waren. Es konnten keine neuen Konjugate isoliert werden, obwohl eine beträchtliche Menge (84 %) Radioaktivität in der Erde gebunden bleibt (Tab. 4). Als Hauptmetabolit wurde wiederum 4-Chlorphenylharnstoff (25,5 % Verb. IV) identifiziert (Tab. 8a, 8b), der hauptsächlich im MeOH/H₂O-Extrakt in geringer Menge, aber auch im Chloroform-Extrakt gefunden wurde. Gegenüber dem Metabolismus in Pflanzen konnten im Boden die beiden neuen Konjugate nicht gefunden werden; dagegen wurden neben Spuren 4-Chloranilin nennenswerte Mengen an 4-Chloracetanilid nachgewiesen (Tab. 8a, 8b).

Tab. 5. Differenzierung der extrahierbaren Radioaktivität von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in Spinatpflanzen, Erde und Kondenswasser nach Versuchsende von 27 Tagen. Die prozentuale Verteilung ist auf die eingesetzte Radioaktivität bezogen.

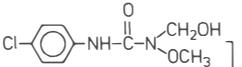
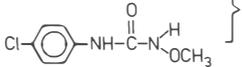
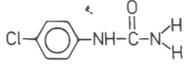
Probe	Differenzierung* der extrahierbaren Radioaktivität (%)					Summe (%)
	Start	Glucosid	Verb. III + IV	Verb. I + II	unbekannt	
Blätter + Stengel	1,05	1,38	1,42	2,69		6,54
Wurzeln	0,02	0,02	0,01	0,02		0,07
Boden:						
0- 5 cm	0,37	0,71	5,05	6,15		12,28
5-10 cm	0,17	0,27	0,11	0,03		0,58
10-15 cm	—	—	—	—		0,10
Kondenswasser**	0,00	0,00	0,00		0,13	0,13

* DC auf Kieselgel, Laufmittel F
 ** DC auf Kieselgel, Laufmittel A

Tab. 6a. Prozentuale Aufteilung und vergleichschromatographische Angaben zum ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid und dessen Umwandlungsprodukte im Spinat

Probe	Säulen-Fraktion LH-20	Metabolit	% der extrahierbaren Radioaktivität	Vergleichschromatographie Rf			
				A	B	D	E
Pflanze MeOH/H ₂ O	1 + 2 (67–161) ml	Unbekannt	7,00				0,17
		Unbekannt	9,20				0,28
		β-Glucosid	16,26			0,10	0,45
			6,88	0,12	0,12	0,72	
				0,23	0,24		
			0,34	0,33	0,42		
			0,34		0,53		
		Unbekannt	0,30	0,06		0,29	
		Unbekannt	0,44	0,00	0,00		
		3 (162–222) ml	Unbekannt	1,19	0,00		
	Unbekannt		17,08				0,26
	Unbekannt						0,13
	Unbekannt	1,47				0,26	
	4 (223–366) ml		15,40	0,12	0,12	0,72	0,68
Start		1,10	0,00	0,00			
Unbekannt		4,42	0,00	0,00	0,15	0,24	
		Unbekannt	0,38			0,55	

Tab. 6b. Prozentuale Aufteilung und vergleichschromatographische Angaben zum ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid und dessen Umwandlungsprodukte im Spinat

Probe	Säulen-Fraktion LH-20	Metabolit	% der extrahierbaren Radioaktivität	Vergleichschromatographie Rf		
				A	B	E
Pflanze CHCl ₃	1 (0–96) ml		2,50	0,23	0,33	
				0,33	0,42	
		Unbekannt	7,30	0,00	0,00	
	2 (97–146) ml		0,50	0,12	0,12	
	3 (147–516) ml	Unbekannt	1,20			0,26

3.5. Erstellung der Radioaktivitätsbilanz bei Sommerweizen als Folgekultur von Spinat

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu erfahren, inwieweit das Glucosid im Boden umgewandelt wird, wenn es mit einer Gründüngung in die Erde gelangt. Der Versuch wurde im geschlossenen System, wie in Abschnitt 3.3 angegeben, durchgeführt.

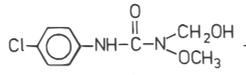
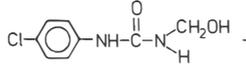
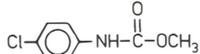
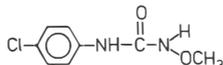
Die Spinatpflanzen wurden in zwei Glaszylinder-Einsätze ausgesät und waren zum Zeitpunkt des Injizierens 16 Wochen alt. 7 Tage nach der Injektion wurde der Spinat in die Erde bis zu 5 cm Tiefe eingearbeitet. Gleichzeitig wurden Pflanzen- und Bodenproben entnommen, um zu diesem Zeitpunkt die Metabolismus-Situation zu ermitteln. Anschließend wurde der Sommerweizen ausgesät, und ein Glaszylinder-Einsatz wurde

Tab. 7. Die Ergebnisse von den enzymatischen und Säurespaltungen der Methanol/Wasser-löslichen Metaboliten, die aus Spinatpflanzen nach Injektion von ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosid isoliert worden sind. Die identifizierten Aglukone sind in Klammern angegeben (s. Abb. 8).

Sephadex LH 20 Säulenfraktion 1	Rf-Werte*	^{14}C -Aglukone in Prozent			
		Spaltung mit Carboxypeptid.	Spaltung mit β -Glucosidase	Spaltung mit β -Glucuronidase	Spaltung mit 1 N-HCl
DC. Zone 1	0,17	14,9 (I + III)	15,5 (III)	4,0 (?)	15,9 (I)
DC. Zone 2	0,28	11,3 (?)	6,4 (III)	1,5 (?)	40,0 (I + II)
DC. Zone 3	0,45	— —	73,5 (I + III)	— —	— —
^{14}C -Hydroxymono- linuron- β -glucosid	0,45	— —	72,0, (I)	— —	— —

* DC auf Kieselgel, Laufmittel E

Tab. 8a. Prozentuale Aufteilung und vergleichschromatographische Angaben zum ^{14}C -Hydroxymonolinuron- β -glucosid und dessen Umwandlungsprodukte im Boden der Spinatpflanzen

Probe	Säulen- Fraktion LH-20	Metabolit	% der extrahierbaren Radioaktivität	Vergleichs- chromatographie Rf			
				A	B	C	D
Erdextr. MeOH/H ₂ O	1 (93–162) ml		8,65	0,23	0,33		
				0,23	0,24		
	2 (163–235) ml	Unbekannt	0,89			0,00	0,00
		β -Glucosid	3,09			0,07	0,10
	3 (236–303) ml		8,48	0,54	0,53		
			12,38	0,33	0,42		
		Unbekannt	< 1,0			0,22	0,61

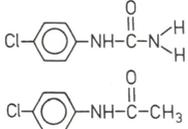
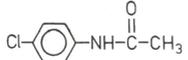
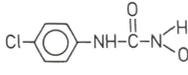
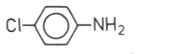
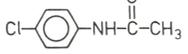
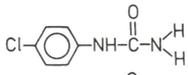
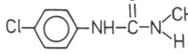
in das geschlossene System eingebracht, während der andere unter offenen Gewächshausbedingungen gelassen wurde. Der Versuch im geschlossenen System wurde vorzeitig abgebrochen, da der Weizen vergilbte. Da im Gefäß Unkraut wuchs, wurden $^{14}\text{CO}_2$ - und andere Radioaktivitätsmessungen weiter bis zum Reifestadium des Weizens im offenen Versuch fortgeführt.

Abb. 7 zeigt, daß die Metabolitenbildung bereits in der Vorkultur und in der Keimzeit rasch ansteigt. Die Gesamtbilanzierung schloß nach 24 Wochen Versuchsdauer mit 93,6 % für den geschlossenen und mit 62,7 % für den offenen Versuch ab (Tab. 9). Die Zahlen aus beiden Versuchsansätzen lassen sich gut interpretieren. Die bei Weizenstroh, Unkraut, 5–15 cm Bodentiefe und Gefäßspülung höheren Werte des geschlossenen Versuchs sind auf Resorption bzw. Reassimilation unter diesen Bedingungen zurückzuführen. Erwartungsgemäß finden sich die Hauptanteile Radioaktivität am Ort ihrer Einbringung in das Versuchssystem. Die Mobilität des

Glucosids oder seiner unmittelbaren Folgeprodukte ist also nicht sehr groß.

Wie aus Tab. 9 ersichtlich, konnten nur sehr geringe Mengen Radioaktivität aus dem Weizen extrahiert erhalten werden. Sowohl im geschlossenen als auch im offenen Versuch verteilte sich diese extrahierte Aktivität zu jeweils einem Drittel auf die Chloroform- und zu zwei Dritteln auf die Methanol/Wasser-Phase. In beiden Versuchen betrug das unveränderte ^{14}C -Glucosid nur 0,1 % von der extrahierten Aktivität. Aus der obersten Bodenschicht betrug der Glucosidanteil beim geschlossenen Versuch 5 %, beim offenen 2 % der extrahierten Aktivität. Darüber hinaus wurden 24 % bzw. 5 % 4-Chlorphenylharnstoff (Verb. IV) plus Demethoxyhydroxymonolinuron (Verb. III) nachgewiesen. Die übrigen Radioaktivitätsanteile sind polaren und nicht polaren Umwandlungsprodukten zuzuordnen. Eine einigermaßen vollständige Aufklärung der Metabolitenstrukturen war wegen der geringen extrahierbaren Mengen nicht möglich.

Tab. 8b. Prozentuale Aufteilung und vergleichschromatographische Angaben zum ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid und dessen Umwandlungsprodukte im Boden der Spinatpflanzen

Probe	Säulen-Fraktion LH-20	Metabolit	% der extrahierbaren Radioaktivität	Vergleichschromatographie Rf A	Rf B
Erdextrakt CHCl ₃	1 (99–136) ml		22,79	0,12	0,12
				0,32	0,36
	2 (137–219) ml		15,05	0,33	0,42
				0,47	0,47
				0,32	0,36
	3 (220–277) ml		3,13	0,12	0,12
				0,23	0,24
		Unbekannt	< 1,0	0,36	0,37

Tab. 9. Radioaktivitätsverteilung von ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosid in Sommerweizen, gezogen als Nachfolgekultur. Der Boden wurde mit ¹⁴C-β-glucosid-injizierten Spinatpflanzen gemischt. Die prozentuale Verteilung ist auf die eingesetzte Radioaktivitätsmenge bezogen

Probe	Kontrolliert belüfteter geschlossener Versuch			offener Versuch		
	Aufteilung der Radioaktivität (%)		Summe	Aufteilung der Radioaktivität (%)		Summe
Gesamt extrahierbare Radioaktivität	Gesamt nicht extrahierbare Radioaktivität	Gesamt extrahierbare Radioaktivität		Gesamt nicht extrahierbare Radioaktivität		
<i>Weizen:</i>						
Ähren	–	–	0,0	0,03	0,01	0,04
Stroh	0,67	1,13	1,80	0,12	0,06	0,18
Stopp. + Wurz.	–	–	–	0,08	0,26	0,34
<i>Unkraut:</i>	0,69	1,90	2,59	0,02	0,01	0,03
<i>Boden:</i>						
0– 5 cm	3,40	44,06	47,46	3,73	42,67	46,40
5–10 cm	2,01	25,26	27,27	1,65	11,99	13,64
10–15 cm	0,24	7,23	7,47	0,43	1,29	1,72
<i>Flüchtige Anteile:</i>						
CO ₂	–	–	5,22	–	–	–
Kondenswasser	0,22	0,11	0,33	–	–	–
Sickerwasser	–	–	0,10	–	–	0,26
<i>Gefäßspülung:</i>	–	–	1,41	–	–	0,16
Summe			93,65			62,77

4. Diskussion

Zur Untersuchung des Verhaltens der sog. „konjugierten Endmetaboliten“ im *Pflanzenreich* haben wir am Modellbeispiel unseres O-Glucosid-Konjugats aus der Klasse der 4-Chlorphenylharnstoffderivate gezeigt, daß es in Spinatpflanzen nach relativ kurzer Zeit abgebaut wird (90 % nach

7 Tagen, s. Tab. 2). Dieses Abbauverhalten ist nicht Species-spezifisch, sondern dürfte – wie unsere Beobachtungen am Mais ergeben haben – allgemein für Grünpflanzen zutreffen. Durch welche Enzymsysteme die O-Glucosid-Konjugate entstehen können, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Aber es ist bekannt, daß UDP-Glucosyltransferase (UDPG)

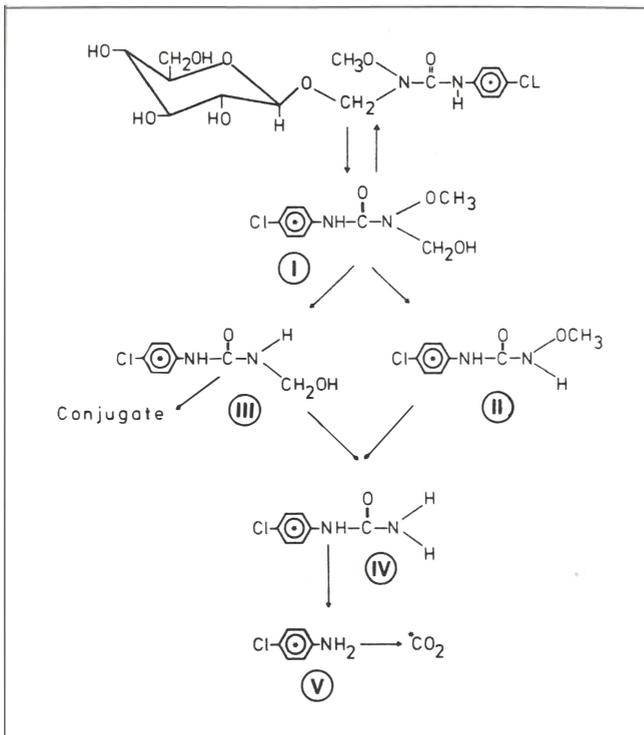


Abb. 8. Metabolismus von Hydroxymonolinuron-β-Glucosid in Spinatpflanzen.

an der enzymatischen O-Glucosylierung der Pflanzenschutzwerkstoffe und deren Metaboliten beteiligt ist (PRIDHAM, 1964; SMITH, 1968). Darüber hinaus ist es interessant, zu wissen, daß die Enzymaktivitäten wiederum von Umweltfaktoren wie Ozongehalt (HODGSON et al., 1973; HODGSON et al., 1974) oder Lichtintensität und Luftfeuchtigkeit beeinflusst (SCHULTZ und TWEEDY, 1972) werden. Die Bilanz unserer Arbeiten hat gezeigt, daß injiziertes Hydroxymonolinuron-β-glucosid im Spinat nach 27 Tagen zu 87 % abgebaut (Tab. 6a) wird, obwohl ein vergleichbares Ergebnis bereits nach 7 Tagen erreicht ist (Tab. 2). Dies deutet darauf hin, daß das gebildete Hydroxymonolinuron erneut mit Glucose-Molekülen rekonjugiert wurde. Offensichtlich kann diese Reaktion reversibel verlaufen, wie in Abb. 8 dargestellt ist. Zwar wurden nur 2,5 % Hydroxymonolinuron gefunden (Tab. 6b); dies ist aber unter bestimmten Bedingungen nicht stabil und geht in Methoxymonolinuron über (Verb. II). Daraus folgt, daß die Abbaureaktion des β-Glucosids mit der Bildung anderer Produkte besonders schnell verläuft. Diese Produkte können wiederum andere Konjugate bilden (Tab. 6a). Zwei auf diese Weise gebildete neue Konjugate wurden nach der Enzym- und Säurespaltung gefunden und deren Aglykone identifiziert (Tab. 7). Daß gebildete Konjugate zu anderen Konjugaten umgewandelt werden können, haben KAMINURA et al. (1974) in Arbeiten mit Gurkenkeimlingen gleichfalls gezeigt: Das O-Glucosid-Konjugat 2-(β-D-Glucopyranosyl)-5-methylisoxazol hydrolysierte mit anschließender Bildung von N-Glucosid-Konjugat 2-(β-D-Glucopyranosyl)-5-methyl-4-isoxazol-3-on. Letzteres ist stabiler und bleibt unverändert.

Analoge Ergebnisse wurden in Versuchen mit Ratten erhalten: Der Abbau von 1-Naphthyl-β-glucosid verläuft über die Abspaltung der Glucosereste mit anschließender Bildung von 1-Naphthyl-glucuronid (DOROUGH et al., 1974). Aus anderen

Arbeiten geht hervor, daß Pflanzenschutzmittel außer O- und N-Glucosiden auch S-Glucosid-Konjugate bilden können: KASLANDER et al. (1961) haben mit Gurkenkeimlingen und Kartoffel-Scheiben gezeigt, daß das Fungizid Dimethyldithiocarbamat unter Bildung von S-Glucosid-Konjugat metabolisiert wird. Nach Untersuchungen von GESSNER und ACARA (1968) bilden auch Thiophenol und 5-Mercaptouracil in Insekten S-Glucosid-Konjugate. Allerdings ist über das weitere Verhalten von S-Glucosid-Konjugaten nichts bekannt. Außer Glucosid-Konjugaten können auch häufig in Pflanzen und Tieren Aminosäure-Konjugate mit Pflanzenschutzmittelwirkstoffen und deren Metaboliten gebildet werden. Die bekanntesten sind Glycin-Konjugate der sauren funktionellen Gruppen enthaltenden Wirkstoffe (KNAAK und SULLIVAN, 1968; LETHCO und BROUWER, 1966). Ferner ist von Glutathion-Konjugaten der Triazin- und Diphenyläther-Herbizide berichtet worden (FREAR und SWANSON, 1973; LAMOUREUX et al., 1973). FEUNG et al. (1975) haben über die Entstehung von Aminosäure-Konjugaten des 2,4-D in fünf Pflanzen-Kallusgeweben berichtet. Sehr wenig ist über das Verhalten dieser Aminosäure-Konjugate berichtet worden. FEUNG et al. (1972) haben in Arbeiten mit Sojabohnen-Kallusgewebe gezeigt, daß die Aminosäure-Konjugate des 2,4-D rasch gebildet werden können, aber innerhalb von 15 Tagen bis 50 % wieder abgebaut werden. Hervorgehoben werden soll, daß 2,4-D-Glutathion-Konjugat zu anderen Aminosäure-Konjugaten, insbesondere zu Asparaginsäure-Konjugat, umgewandelt wurde.

Der Abbauweg des ¹⁴C-Hydroxymonolinuron-β-glucosids im Boden verläuft durch Abspaltung des Glucosidrestes und die Bildung von 4-Chlorphenylharnstoff (25 %) als Hauptmetabolit. Dieser Metabolit wurde weiter abgebaut unter Bildung von ¹⁴CO₂ aus der Phenyl-Markierung. Im geschlossenen Versuch mit der Pflanzenkultur werden 3,3 % ¹⁴CO₂ (Tab. 4) gebildet. Im Biometerkolben werden mit Erde allein ohne Pflanzen (Abb. 2) aber 22 % ¹⁴CO₂ gemessen. Diese ¹⁴CO₂-Werte im Biometerkolben stellen maximale Beträge dar, da die Bodenmikroorganismen hierbei optimale Wachstumsbedingungen haben und keine Möglichkeit zur Reassimilierung des ¹⁴CO₂ besteht, wie es im geschlossenen System-Versuch mit den Pflanzen möglich wäre. Da im geschlossenen Versuch (Tab. 4) im Boden nur Spuren von 4-Chloranilin, aber in großer Menge (ca. 20 %) Acetanilid nachgewiesen worden ist (Tab. 8a, 8b), das bekanntlich ein 4-Chloranilinderivat darstellt, wird angenommen, daß nennenswerte Mengen 4-Chloranilin im Boden gebunden bleiben und für die Pflanzen nicht verfügbar sind. Diese Befunde werden von anderen Abbauergebnissen über 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin in Böden unterstützt (SÜSS et al., 1978). Dort wird gezeigt, daß 60 % des applizierten 4-Chloranilins an den Bodenkomplex gebunden und nach 10 Wochen Versuchsdauer 12–17 % zu CO₂ mineralisiert wurden. Besonders wird aus dem Ergebnis unseres Folgeversuches deutlich, daß nach Gründüngung durch behandelte Spinatpflanzen eine sehr geringe Menge (1,8 %) der applizierten Radioaktivität von den Weizenpflanzen und dem Unkraut (2,6 %) aufgenommen (Tab. 9) wurde. Die überwiegende Radioaktivitätsmenge (82 %) war aus dem Boden nicht extrahierbar, und das bedeutet, daß wahrscheinlich die Kohlenhydrate der Pflanzen und damit auch die Abbauprodukte des ¹⁴C-Glucosids durch die mikrobielle Tätigkeit in Humus-Komplexe umgewandelt sind. Zur Bestätigung dieser Annahme müßten die Humin- und Fulvinsäure-Fractionen des Bodens näher untersucht werden.

DOROUGH (1976) schlägt Möglichkeiten zur Prüfung der bioziden Wirksamkeit von Pflanzenschutzmittel-Konjugaten

in Pflanzen und Tieren vor. Bezüglich des Pflanzenreiches wurden unsere Untersuchungen in einer entsprechenden Weise durchgeführt mit dem Ergebnis, daß das von uns untersuchte Glucosid selbst praktisch weder in Pflanzen aufgenommen wird noch diesem gegenüber toxisch wirkt. Allerdings sollte nicht außer acht gelassen werden, daß das Konjugat abgebaut wird und die Abbauprodukte wohl in Pflanzen aufgenommen werden können.

Genauere Untersuchungsergebnisse und mehr Informationen wären zu erwarten, wenn für die Konjugatforschung Methoden zur direkten Strukturbestimmung entwickelt würden.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß Glucosid-Konjugate der Pflanzenbehandlungsmittel, insbesondere O-Glucoside, als Vorstufen zu den „Terminal Residues“ betrachtet werden müssen, da sie umgewandelt und metabolisiert werden können. Die Bedeutung dieser Konjugate für die Bioregulierung der toxischen Fremdstoffeinflüsse in Pflanzen und Insekten ist groß und sollte nicht vernachlässigt werden. Aus diesem Grunde sollte das Langzeitschicksal (fate) solcher Chemikalien in Pflanzenproben über längere Zeiträume unbedingt verfolgt werden.

Danksagung

Wir danken Frau A. WEGENER geb. LUDECKY für die sorgfältige technische Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche. Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie wird für die großzügige Finanzierung dieser Untersuchung gleichfalls gedankt.

Literatur

- BLIGH, E. G. und W. J. DYER, 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.
- DOROUGH, H. W., J. P. MCMANUS, S. S. KUMAR und R. A. CARDONA, 1974: Chemical and metabolic characteristics of 1-naphthyl- β -D-glucoside. *J. Agr. Food Chem.* **22**, 642–645.
- DOROUGH, H. W., 1976: Biological activity of pesticide conjugates. In: *Bound and Conjugated Pesticide Residues*, Hrsg.: D. D. KAUFMAN, G. G. STILL, G. D. PAULSON und S. K. BANDAL, S. 11–34, ACS Symposium Series 29.
- FEUNG, C. S., R. H. HAMILTON, F. H. WITHAM und R. O. MUMMA, 1972: The relative amounts and identification of some 2,4-dichlorophenoxyacetic acid metabolites isolated from soybean cotyledon callus cultures. *Plant Physiol.* **50**, 80–86.
- FEUNG, C. S., R. H. HAMILTON und R. O. MUMMA, 1975: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. VII. Comparison of metabolites from fine species of plant callus tissue cultures. *J. Agr. Food Chem.* **23**, 373–376.
- FREAR, D. S. und H. R. SWANSON, 1974: Monuron metabolism in excised *Gossypium hirsutum* leaves: Aryl hydroxylation and conjugation of 4-chlorophenylurea. *Phytochemistry* **13**, 357–360.
- FREAR, D. S. und H. R. SWANSON, 1973: Metabolism of substituted diphenylether herbicides in plants. I. Enzymatic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum* L.). *Pesticide Biochem. Physiol.* **3**, 473–482.
- GESSNER, T. und M. ACARA, 1968: Metabolism of thiols: S-Glucosylation. *J. Biol. Chem.* **243**, 3142–3147.
- HAQUE, A., I. SCHUPHAN und W. EBING, 1978: Metabolic fate of a conjugated phenylurea- β -glucoside in plants. In: 4th International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC), Abstract Vol., V–513, Zürich.
- HAQUE, A., I. SCHUPHAN und W. EBING, 1978: On the metabolism of phenylurea-herbicides. X. Movement and behaviour of a glucosid conjugate. *Chemosphere* **7** (8), 675–680.
- HOAGLAND, D. R. und D. J. ARNON, 1950: The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. exp. Sta.* **347**, 39.
- HODGSON, R. H., D. S. FREAR, H. R. SWANSON und L. A. REGAN, 1973: Alteration of diphenamid metabolism in tomato by ozone. *Weed Sci.* **21**, 542–549.
- HODGSON, R. H., K. E. DUSHABEK und B. L. HOFFER, 1974: Diphenamid metabolism in tomato: Time course of an ozone fumigation effect. *Weed Sci.* **22**, 205–210.
- KAMIMURA, S., M. HISHIKAWA, H. SAEKI und Y. TAKAHI, 1974: Absorption and metabolism of 3-hydroxy-5-methylisoxazole in plants and the biological activities of its metabolites. *Phytopathology* **64**, 1273–81.
- KASLANDER, J., A. K. SJPESTEINJ und G. J. M. VANDERKERK, 1961: On the transformation of dimethyldithiocarbamate into its β -glucoside by plant tissues. *Biochem. Biophys. Acta* **52**, 396–397.
- KNAAK, J. B. und L. J. SULLIVAN, 1968: Metabolism of 3,4-dichlorobenzyl N-methylcarbamate in the rat. *J. Agr. Food Chem.* **16**, 454–459.
- LAMOUREUX, G. L., L. E. STAFFORD, R. H. SHIMBUKURO und R. G. ZAYLSKIE, 1973: Atrazine metabolism in sorghum: Catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *J. Agr. Food Chem.* **21**, 1020–1030.
- LETHCO, E. J. und E. A. BROUWER, 1966: The metabolism of naphthaleneacetic acid- $1-^{14}\text{C}$ in rats. *J. Agr. Food Chem.* **14**, 532–535.
- Merkblatt 36 der Biologischen Bundesanstalt (BBA), 1976: Unterlagen zum Verhalten von Pflanzenbehandlungsmitteln im Boden im Rahmen des Zulassungsverfahrens von W. WEINMANN und K. SCHINKEL, 2. Auflage.
- PRIDHAM, J. B., 1964: The phenol glucosylation reaction in the plant kingdom. *Phytochemistry* **3**, 493–497.
- SCHULTZ, D. P., B. G. TWEEDY, 1972: The effect of light and humidity on absorption and degradation of diphenamid in tomatoes. *J. Agr. Food Chem.* **20**, 10–13.
- SCHUPHAN, I., 1974: Zum Metabolismus von Phenylharnstoffen – II. Abbau und Metabolismus von Monolinuron-O-methyl- ^{14}C im Boden. *Chemosphere* **3** (3), 127–130.
- SCHUPHAN, I., 1975b: Zum Metabolismus von Phenylharnstoff-Herbiziden – IV. Synthese von hydroxylierten Phenylharnstoffen, *Chemosphere* **4** (1), 31–34.
- SCHUPHAN, I., 1977: Zum Metabolismus von Phenylharnstoff-Herbiziden – VI. Geschlossene Kultursysteme für die Bilanzierung radioaktiv markierter Pestizide nach Anwendung bei Kulturpflanzen. *Chemosphere* **6** (1), 5–10.
- SCHUPHAN, I. und W. EBING, 1978: Metabolism and balance studies of ^{14}C -monolinuron after use in spinach followed by cress and potato cultures. *Pesticide Biochem. Physiol.* **9**, 107–118.
- SMITH, J. N., 1968: A comparative metabolism of xenobiotics. *Advan. Comparative Physiol. Biochem.* **3**, 173–232.
- SÜSS, A., G. FUCHSBICHLER und CH. EBEN, 1978: Abbau von Anilin, 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin in verschiedenen Böden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* **141**, 57–65.