

CHROM. 4933

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS UND ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON CHLORKOHLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDEN

II. NACHWEIS DURCH HEMMUNG VON TRYPSIN

F. GEIKE

*Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutzmittelforschung,
D 1 Berlin 33 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 13. Juli 1970)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic-enzymatic identification and the mode of action of chlorinated hydrocarbon insecticides. II. Identification by inhibition of trypsin

It is shown that of the non-irradiated chlorinated hydrocarbons only dicofol and methoxychlor inhibit trypsin. After UV-irradiation on thin-layer plates all eighteen compounds studied show inhibiting activity against trypsin. Several unknown degradation products are formed by UV-irradiation. The amount of these substances may be variable, depending on environmental factors. It is unlikely that these new compounds are peroxides since reaction with KJ/starch and $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ gives negative results.

EINLEITUNG

Zur Vermeidung von Gefahren für Menschen, Tiere und Pflanzen bei Anwendung von Pflanzenschutzmitteln ist es nötig, das Schicksal der eingesetzten Wirkstoffe zu kennen und geeignete Nachweismethoden für sie und ihre Abbauprodukte zu finden. Ebenso wichtig ist es jedoch, die Wirkung dieser Verbindungen zu ermitteln, da nur aufgrund umfassender Kenntnis ihres Wirkungsmechanismus geeignete Schutzmassnahmen ergriffen werden können. Im Falle der schon lange als Insektizide bekannten Chlorkohlenwasserstoffe liegt bis heute zwar ein umfangreiches Material über Abbauewege und Metaboliten vor, doch kennt man noch immer nicht das stabilste Endprodukt der Abbaukette. Auch ist bisher noch immer relativ wenig über ihren Wirkungsmechanismus bekannt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass man in neuerer Zeit zwar eine Abnahme der Schalendicke bei Vogeleiern durch DDT bzw. seine Abbauprodukte feststellte¹⁻⁶, der Grund dafür jedoch unbekannt blieb.

Es gilt heute allgemein als sicher, dass diese Substanzen primär auf das Nervensystem einwirken, wobei vor allem die sensorischen Nerven als Angriffspunkte angesehen werden. In welcher Weise die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide jedoch am

sensorischen Nerven eingreifen, ist bisher ebenfalls weitgehend ungeklärt. Zwar konnte gezeigt werden, dass DDT die K^+ -Permeabilität des Nervengewebes erhöht⁷ und mit Bestandteilen der Nervenmembranen Komplexe bildet^{7,8}, doch sagen diese Befunde noch nichts über den eigentlichen Wirkungsmechanismus aus.

In einer neueren Arbeit konnten MATSUMURA *et al.*⁹ zeigen, dass DDT die ATPase der Nervenendigungen im Gehirn hemmt. Diese Befunde könnten einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus geben, da eine Hemmung der ATPase auch zu einer Hemmung des aktiven Iontentransports durch die Membranen führen dürfte.

Über die Wirkung der Chlorkohlenwasserstoffe auf Enzyme liegen bisher nur spärliche Untersuchungen vor. Lediglich das DDT ist in dieser Hinsicht etwas eingehender untersucht worden. In diesem Zusammenhang ist die Epoxidase-Induktion durch DDT^{10,11} von besonderem Interesse. Leider sind auch hier die letztlichen Gründe für diese DDT-Wirkung unbekannt. Ebenso unbekannt ist die Ursache für die östrogene Aktivität von *o,p'*-DDT¹² und den durch DDT hervorgerufenen Hyperthyroidismus¹³. Auch der festgestellte Eingriff in den Aminosäurestoffwechsel und den Wasserhaushalt¹⁴ lässt sich nicht eindeutig zuordnen. Die ebenfalls bekannte Blockierung von Atmungsfermenten und des Wasserstofftransfers wird *in vitro* durch eine Hemmung der Succinat-Dehydrogenase und Cytochromoxidase erklärt¹⁴.

Weitgehendes Fehlen von enzymatischen Untersuchungen zur Wirkung der Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide und ihrer Abbauprodukte lassen den Wirkungsmechanismus noch immer ungewiss erscheinen und mögliche Gefahren für die Umwelt unerkannt bleiben. Neuere Untersuchungen auf dünnenschichtchromatographischer Basis konnten zeigen, dass die Chlorkohlenwasserstoffe auch die Rinderleber-Esterase beeinflussen und nach UV-Bestrahlung zum Teil in sehr kräftige Esterase-Hemmer übergehen¹⁵, obwohl alle bisher verfügbaren Daten gegen eine Hemmung der Acetylcholinesterase sprachen^{14,16,17}. Wie im Biotest mit *Drosophila*-Imagines nach dem "dry-film"-Verfahren gezeigt werden konnte¹⁸, verlieren die nach UV-Bestrahlung entstandenen Antiesterase-Substanzen die insektizide Wirkung der Originalwirkstoffe, bei Verfütterung an *Drosophila*-Larven nimmt diese hingegen zum Teil nur wenig ab¹⁹, so dass Warnungen¹⁸, sich auf den Biotest nach dem "dry-film"-Verfahren zu verlassen, mehr als berechtigt erschienen. Die künftige Rückstandsanalyse muss daher auch diese Abbauprodukte erfassen und wegen möglicher Gefahren berücksichtigen.

In einer Reihe von Untersuchungen soll die Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden und ihren UV-Abbauprodukten auf dünnenschichtchromatographischer Basis auf einige Enzyme getestet werden, wobei zu prüfen ist, in welchem Umfange sich diese Verfahren zum Nachweis dieser Substanzklasse eignen. Gleichzeitig dienen diese Arbeiten der Aufdeckung möglicher Gefahrenquellen. Es soll hier über Untersuchungen zur Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden auf Trypsin berichtet werden.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden verwendet: Kieselgel G nach Stahl mit *ca.* 13% $CaSO_4$, mittlere Korngrösse 10–40 μ ; Aceton p.A.; Methylenchlorid p.A.; Cyclohexan p.A., nachgetrocknet mit Na_2SO_4 ; Methanol, getrocknet, p.A.; Chloroform

p.A.; Trypsin aus Rinderpankreas krist. lyophilisiert 2.0 U/mg (E.C. 3.4.4.4); N^α-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid (Merck, Darmstadt, G.F.R.).

Enzym- und Substratlösung

Als Enzymquelle dient eine frisch bereitete Lösung von 250 mg Trypsin (E.C. 3.4.4.4) in 50 ml 0.03 M Phosphatpuffer pH 8.0, als Substrat eine ebenfalls frisch angesetzte Suspension von 400 mg N^α-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid in 50 ml des gleichen Puffers. Die angesetzten Lösungen reichen für sechs Platten.

Insektizidlösungen und Dünnschichtchromatographie

Die untersuchten Wirkstoffe in analytischer Standardqualität werden mit Ausnahme von Hexachlorbenzol, das in Methylenchlorid gelöst wurde, als 1%ige Lösung in Aceton angesetzt, auf handgegossene Kieselgel G-Platten¹⁵ aufgetragen und zur Bestimmung der Grenzkonzentration in Cyclohexan, zur Auftrennung der Bestrahlungsprodukte hingegen in Cyclohexan-Chloroform-Methanol (10:3:2) entwickelt.

Durchführung des enzymatischen Hemmtestes

Die Platten werden nach dem Entwickeln entweder sofort oder nach halbstündiger Bestrahlung mit ungefiltertem UV-Licht einer Hg-Analysen-Quarzlampe (Hanau) mit einem Abstand Strahler-Platte von 30 cm zunächst kurz mit Puffer und anschliessend mit der Trypsin-Lösung besprüht. Danach wird eine halbe Stunde bei 25° und etwa 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschliessend mit Substrat besprüht und etwa 1-2 Std. weiterinkubiert. Die endgültige Auswertung erfolgt, sobald die Platten unter Laborbedingungen nahezu trocken sind bei guter Beleuchtung.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Untersuchungen zur Wirkung von Insektiziden auf Enzyme sind *in vitro* wegen der meist geringen Wasserlöslichkeit der Wirkstoffe stets etwas schwierig. Eine Applikation an lebende Tiere und anschliessende Bestimmung von Enzymaktivitäten schliesst den Nachteil der geringen Löslichkeit aus, birgt jedoch die Gefahr in sich, dass eine Verminderung der Aktivität verschiedene Ursachen haben kann und nicht unbedingt auf einer spezifischen Hemmung des untersuchten Enzyms beruhen muss. Dieser Einwand ist besonders dann berechtigt, wenn nicht gleichzeitig andere Parameter untersucht wurden. Bei Untersuchungen zur Wirkung von Pestiziden auf Enzyme auf dünnschichtchromatographischer Basis fällt das Problem der Löslichkeit nicht ins Gewicht, obwohl es zu einer direkten Wechselwirkung zwischen Enzym und Wirkstoff kommt. Nachteil dieses Verfahrens ist lediglich, dass man keine quantitativen Aussagen über Inhibitorkonstanten etc. machen kann. Leider ist diese Art der Untersuchung aus methodischen Gründen auf relativ wenig Enzyme beschränkt, da man für den Nachweis Reaktionsprodukte braucht, die entweder selbst gefärbt sind oder leicht in farbige Produkte überführt werden können. Man greift dabei in der Regel auf bekannte Testansätze zurück, die jedoch den Erfordernissen der Dünnschichtplatte entsprechend umgearbeitet werden müssen. Zum DC-Hemmtest mit Trypsin benötigt man eine relativ kräftige Substratsuspension, um später einen ausreichenden Kontrast zu erzielen. Aus dem gleichen Grund muss auch länger als normalerweise

TABELLE I

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER CHLORKOHLLENWASSERSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG VON TRYPSIN

Nachweisgrenze in μg ; () = nicht einwandfrei zu identifizieren.

Substanz	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung	Substanz	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung
DDT	(100)	6	Isodrin	(100)	6
DDD	(100)	6	Endrin	—	7
DDE	—	6	Aldrin	(100)	5
Dicofol	70	6	Dieldrin	—	7
Methoxychlor	70	6	Heptachlor	—	5
Perthan	—	6	Heptachlorepoxyd	—	7
Hexachlorbenzol	—	5	Chlordan	—	9
Lindan	—	20	Isobenzan	—	6
Toxaphen	—	20	Endosulfan	—	7

bei Enzymreaktionen üblich bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert werden, um möglichst viel Substrat zu spalten, das kontinuierlich in Lösung geht.

Unter den hier angewandten Bedingungen wird, wie aus Tabelle I hervorgeht, Trypsin nur von Dicofol und Methoxychlor gehemmt. Bei einer Auftragsmenge von $70 \mu\text{g}$ kommt es an der Stelle, wo die Substanzen auf der Platte erscheinen, zu einer deutlichen Hemmung. DDT, DDE, Isodrin und Aldrin lassen bei einer Auftragsmenge von $100 \mu\text{g}$ zwar Flecken erkennen, doch sind diese nur schwach und nicht eindeutig als Hemmstellen zu identifizieren. Interessant ist jedoch, dass bei Isodrin am Start eine deutliche Trypsinhemmung auftritt, die jedoch auf Verunreinigungen des Wirkstoffes zurückzuführen sein dürfte.

Nach UV-Bestrahlung kommt es zu einer mehr oder weniger starken Trypsinhemmung durch alle untersuchten Wirkstoffe, wobei die nachzuweisenden Mengen zwischen $20 \mu\text{g}$ für Lindan und Toxaphen und $5 \mu\text{g}$ für Hexachlorbenzol, Aldrin und Heptachlor liegen (Tabelle I). Diese in der Regel um etwa eine Zehnerpotenz schlechtere Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem Nachweis durch Esterasehemmung¹⁵ verwundert jedoch nicht, da der Kontrast der weissen Hemmflecke auf hellgelbem Grund nur sehr mangelhaft ist. Damit eignet sich dieses Verfahren sicher nicht zum enzymatischen Routinenachweis für Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide, obwohl eine Trypsinhemmung bei grösserem Kontrast sicher noch bei erheblich kleineren Auftragsmengen festzustellen wäre. Die hier beschriebene Methode ist jedoch trotz des geringen Kontrastes sehr gut zum Screening auf Trypsininhibitoren anwendbar. Gleichzeitig zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine neue, bisher unbekannte Wirkung von Abbauprodukten der Chlorkohlenwasserstoffe, deren Bedeutung für die Gesundheit an dieser Stelle jedoch nicht diskutiert werden soll. Ebenso erscheint es verfrüht, den Angriffspunkt dieser Substanzen am Enzym zu diskutieren, bevor nicht ein umfangreicheres Material über die Wirkung dieser Verbindungen auf Enzyme vorliegt. Weitere Arbeiten in dieser Richtung sollen folgen.

Zur Prüfung der Frage, ob durch die UV-Bestrahlung nur eines oder mehrere Abbauprodukte entstanden sind und ob es sich um Trypsininhibitoren handelt oder nicht, wurden $50 \mu\text{g}$ Substanz auf die Platten aufgetragen, mit UV bestrahlt und nach Chromatographie in verschiedenen Laufmitteln, von denen sich das hier aufgeführte

TABELLE II

hR_F-WERTE DER CHLORKOHLLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDE NACH AKTIVIERUNG DURCH UV-BESTRAHLUNG

Substanz	Aktivierung			
	Vor Entwicklung	Vor und nach Entwicklung	Nach Entwicklung	
DDT	0; 9; 13; 19	0; 2; 9; 13; 19;	94	94
DDD	0; 6; 22	0; 6; 9; 42;	91	91
DDE	0; 4; 9	0; 9; 41;	94	94
Dicofol	0; 6; 12; 18; 51	0; 6; 12; 38;	63	63
Methoxychlor	0; 5; 15	0; 5; 9; 34;	88	88
Perthan	0; 4; 18	0; 4; 18; 40;	93	93
Hexachlorbenzol	0; 5; 20	0;	96	96
Lindan	0	0;	88	88
Isodrin	0; 9; 15; 22; 31	0; 4; 9; 15; 31; 55;	95	95
Endrin	0; 10; 49	0; 5; 10; 41;	91	91
Aldrin	0; 6; 12; 18; 32; 45	0; 6; 12; 18; 32;	92	92
Dieldrin	0; 5; 11; 16	0; 5; 11;	89	89
Heptachlor	0; 12; 19; (38)	0; 12; (28);	94	94
Heptachlorepoxyd	0; 8; 15; 22	0; 15; (64);	89	89
Chlordan	0; 10; 17; 22	0; 17; (29);	91	91
Isobenzan	0; 4; 9; 18	0; 18;	94	94
Endosulfan	0; 12	0; 25;	74; 92	74; 92
Toxaphen	0; 9; 16	0; 29;	93	93

als das geeignetste erwies, entweder sofort oder nach nochmaliger Aktivierung durch UV-Bestrahlung mit Enzym behandelt. Wie aus Tabelle II hervorgeht, entstehen eine Reihe von Abbauprodukten, deren Anteil sich allerdings von Versuch zu Versuch zum Teil stark ändern kann. Diese Änderungen dürften auf Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchte, Anzahl katalytisch aktiver Zentren auf dem Schichtmaterial etc. beruhen, die in diesem Zusammenhang jedoch nicht weiter untersucht wurden. Bei den in der Tabelle II nach der erneuten Bestrahlung auftretenden Hemmflecken mit den hohen *hR_F*-Werten handelt es sich um die nach der ersten UV-Behandlung unverändert gebliebenen Originalwirkstoffe, wie ein Vergleich zwischen Spalte 1, 2 und 3 der Tabelle II zeigt. Diese Ergebnisse, wonach die Flecke der unveränderten Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide erst nach erneuter Aktivierung auftreten, stimmen mit denen aus Tabelle I sehr gut überein, wonach von den unbehandelten Wirkstoffen nur Dicofol und Methoxychlor bis zu einer Menge von 70 µg nachzuweisen sind. Da bei diesen Versuchen nur 50 µg aufgetragen wurden und über die Hälfte in Bestrahlungsprodukte übergegangen sein dürfte, wie aufgrund der Hemmintensität abgeschätzt wurde, ist es klar, dass ohne nochmalige Aktivierung keine Flecke in der Position der unveränderten Insektizide auftreten dürfen.

Allgemein zeigt sich, dass bei nochmaliger UV-Bestrahlung nach dem Entwickeln die Tendenz zur Hemmung verstärkt wird und neue Flecke auftreten, andere hingegen verschwinden. Ähnliche Erscheinungen konnten auch mit Rinderleber-Esterase festgestellt werden²⁰. Das Sichtbarwerden von neuen Flecken nach nochmaliger Aktivierung dürfte darauf zurückzuführen sein, dass weniger wirksame Zwischenprodukte in das mögliche stark hemmende Endprodukt dieser Abbaureihe übergehen, das in diesem Laufmittel anscheinend am Start verbleibt. Ein befriedigendes Verfahren zur Auftrennung der Abbauprodukte konnte bisher noch nicht ge-

funden werden—eine Tatsache, an der auch deren Reinisolierung bisher scheiterte. Vor allem wirkt sich die starke Fahnenbildung sehr störend aus, da die Flecke vielfach in der Fahne untergehen. Auch eine Verminderung der Auftragsmenge führte zu keiner verbesserten Auftrennung. Daher sind auch auf diesem Gebiet noch weitere Untersuchungen geplant.

Über die Struktur der UV-Bestrahlungsprodukte liegen bisher keine Anhaltspunkte vor, es dürfte sich jedoch sicher nicht um Peroxide handeln, die das Enzym oxydieren und auf diese Weise eine Hemmung vortäuschen. Von acht Wirkstoffen mit repräsentativen Vertretern aus jeder Gruppe der untersuchten Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide wurden je 2 mg punktförmig auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und 1 Std. mit UV-Licht bestrahlt. Weder eine Behandlung mit Eisen-(II)-rhodanid noch mit KJ/Stärke-Lösung deutete auf entstandene oxydierende Bestrahlungsprodukte hin.

DANK

Mein besonderer Dank gilt Frau R. RAUBE für die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird gezeigt, dass von den chlorierten Kohlenwasserstoffen nur Dicofol und Methoxychlor Trypsin hemmen. Nach UV-Bestrahlung der Dünnschichtplatten zeigen alle achtzehn untersuchten Wirkstoffe eine Hemmung gegen Trypsin. Durch die UV-Bestrahlung entstehen mehrere unbekannte Abbauprodukte. Der Anteil dieser Substanzen variiert mit den Umwelteinflüssen. Es dürfte sich bei diesen neuen Verbindungen nicht um Peroxide handeln, da eine Reaktion mit KJ/Stärke und Eisen-(II)-rhodanid negativ verläuft.

LITERATUR

- 1 J. A. KEITH, *J. Appl. Ecol., Suppl.*, 3 (1966) 57.
- 2 D. A. RATCLIFFE, *Nature*, 215 (1967) 208.
- 3 J. J. HICKEY UND D. W. ANDERSON, *Science*, 162 (1968) 271.
- 4 R. D. PORTER UND S. N. WIEMEYER, *Science*, 165 (1969) 199.
- 5 J. BITMAN, H. C. CECIL, S. J. HARRIS UND G. F. FRIES, *Nature*, 224 (1969) 44.
- 6 R. G. HEATH, J. W. SPANN UND J. F. KREITZER, *Nature*, 224 (1969) 47.
- 7 F. MATSUMURA UND R. D. O'BRIEN, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 36.
- 8 F. MATSUMURA UND R. D. O'BRIEN, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 39.
- 9 F. MATSUMURA, T. A. BRATKOWSKI UND K. C. PATIL, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 4 (1969) 262.
- 10 J. W. GILLET, T. M. CHAN UND L. C. TERRIERE, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 540.
- 11 J. W. GILLET, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 4 (1969) 159.
- 12 J. BITMAN, H. C. CECIL, S. J. HARRIS UND G. F. FRIES, *Science*, 162 (1968) 371.
- 13 D. J. JEFFERIES, *Nature*, 222 (1969) 578.
- 14 W. PERKOW, *Die Insektizide*, 2. Aufl., Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1968.
- 15 F. GEIKE, *J. Chromatog.*, 44 (1969) 95.
- 16 H. MAIER-BODE, *Pflanzenschutzmittel-Rückstände*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1965.
- 17 R. D. O'BRIEN, *Insecticides—Action and Metabolism*, Academic Press, New York, 1967.
- 18 F. GEIKE, *Z. Angew. Entomol.*, 65 (1970) 98.
- 19 F. GEIKE, in Vorbereitung.
- 20 F. GEIKE, unveröffentlicht.