

CHROM. 5539

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS UND ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON CHLORKOHLLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDEN

III. NACHWEIS DURCH PHOSPHATASE-HEMMUNG

F. GEIKE

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

(Eingegangen am 7. Juli 1971)

SUMMARY

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

It is shown that non-irradiated and UV-treated chlorinated hydrocarbons do inhibit the activity of acid and alkaline phosphatase. Using naphthylphosphate as a substrate for the enzyme, shows in most cases that the sensitivity for detection is greater than when using nitrophenylphosphate as a substrate. The minimum quantities detected were in the range of 2–150 μg depending on pretreatment and on the substrate used.

EINLEITUNG

Über den Wirkungsmechanismus der chlorierten Kohlenwasserstoffe liegen noch immer recht spärliche Informationen vor. Allgemein gilt es als gesichert, dass die Chlorkohlenwasserstoffe auf das Nervensystem einwirken, wobei die sensorischen Nerven als Angriffspunkt angesehen werden^{1,2}. In welcher Weise diese Wirkstoffe jedoch am Nerven angreifen, ist weitgehend unbekannt. Zwar konnte gezeigt werden, dass DDT die K^+ -Permeabilität des Nervengewebes erhöht³ und mit Bestandteilen der Nervenmembranen Komplexe bildet^{3,4}, doch geben diese Befunde allein noch keinen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus.

In einer neueren Arbeit zeigten MATSUMURA *et al.*⁵, dass DDT die ATPase der Nervenendigungen im Gehirn hemmt, ein Befund, der einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus geben könnte. Im allgemeinen liegen jedoch nur wenige Untersuchungen über die Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden auf Enzyme vor. Lediglich DDT wurde etwas intensiver untersucht, wobei die Epoxidase-Induktion^{6,7} und die Blockierung von Atmungsfermenten und des Wasserstofftransfers infolge einer Hemmung der Succinat-Dehydrogenase und Cytochromoxidase⁸ von besonderem Interesse ist.

TABELLE I

UNTERE NACHWEISGRENZEN DER CHLORKOHLENWASSERSTOFF-INSEKTIKIDE MIT NITROPHENYLPHOSPHAT UND NAPHTHYLPHOSPHAT ALS SUBSTRAT INFOLGE HEMMUNG DER PHOSPHATASE

Nachweisgrenze in μg ; Laufmittel, Cyclohexan.

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung				Nach UV-Bestrahlung			
	Saure Phosphatase		Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase		Alkalische Phosphatase	
	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat
DDT	70	30	50	8	60	20	10	8
DDD	30	10	60	6	30	10	30	2
DDE	20	10	50	6	30	10	10	2
Dicofol	30	7	20	2	30	7	30	2
Methoxychlor	20	7	30	6	20	6	10	2
Perthan	30	2	20	2	30	4	5	2
Hexachlorbenzol	100	100	150	—	100	100	150	—
Lindan	40	30	150	70	40	20	130	100
Isodrin	40	30	70	70	40	20	30	40
Endrin	30	20	80	40	30	20	40	10
Aldrin	20	20	60	30	10	7	40	6
Diieldrin	40	20	80	30	30	10	50	6
Heptachlor	50	10	50	10	50	30	40	8
Heptachlorepoxyd	30	10	70	70	20	10	40	50
Chlordan	50	7	60	8	50	6	20	6
Isobenzan	40	10	80	70	50	30	70	60
Endosulfan	40	10	50	8	30	30	20	8
Toxaphen	100	80	50	20	100	70	50	10

Neuere Untersuchungen auf dünn-schichtchromatographischer (DC) Basis konnten zeigen, dass die Chlorkohlenwasserstoffe auch die Rinderleber-Esterase beeinflussen und nach UV-Be-strahlung in zum Teil recht kräftige Esterase-Hemmer übergeben⁹. Auch Trypsin wird von einigen Wirkstoffen leicht gehemmt, durch UV-Be-strahlung kommt es jedoch zu einer Überführung aller untersuchten Wirkstoffe in Inhibitoren¹⁰.

In einer Versuchsserie wird die Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektizi-den und ihren UV-Be-strahlungsprodukten auf eine Reihe von Enzymen auf DC Basis getestet, wobei einerseits zu prüfen ist, in welchem Umfange sich diese Verfahren zum Nachweis dieser Substanzklasse eignen, und ob andererseits aufgrund der erarbeiteten Ergebnisse Gefahren für die Umwelt bestehen. Vorliegende Arbeit berichtet über den Nachweis der chlorierten Kohlenwasserstoffe infolge einer Hemmung von Phosphatasen, einer Enzymgruppe, die unter anderem eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum und bei der Glucoseabsorption durch die Placenta spielt. Es handelt sich bei dieser Gruppe teils um recht unspezifische, teils aber auch um hochspezifische Enzyme¹¹.

MATERIAL UND METHODEN

Die Wirkstoffe wurden in Analogie zu früheren Arbeiten^{9,10} auf handgegossenen Kieselgel G-Platten in Cyclohexan chromatographiert und entweder sofort oder nach einstündiger Be-strahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254/366 nm einer Desaga Uvis-Lampe bei einem Abstand Strahler-Platte von 15 cm weiterbehandelt. Der DC-enzymatische Nachweis erfolgte mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln (Boehringer) oder alkalischer Phosphatase aus Kälbermucosa (Serva) unter Verwendung von Nitrophenylphosphat bzw. Naphthylphosphat als Substrat. Die Methode zur Durch-führung des enzymatischen Hemmtests wurde ausführlich an anderer Stelle¹² be-schrieben.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus Tabelle I hervorgeht, wird sowohl die saure als auch die alkalische Phosphatase von den untersuchten Chlorkohlenwasserstoffen gehemmt. Lediglich das Fungizid Hexachlorbenzol fällt in diesem Zusammenhang aus dem Rahmen, da es erst bei sehr hoher Konzentration oder gar nicht hemmt. Lindan zeigt bei der alka-lischen Phosphatase aus Kälbermucosa ebenfalls nur geringe Hemmwirkung, während die Hemmung der sauren Phosphatase aus Kartoffeln im üblichen Bereich liegt. Toxaphen besitzt dagegen genau umgekehrte Eigenschaften. Auffällig ist, dass die Abbauprodukte von DDT, DDD und DDE, kaum weniger hemmend auf die Phos-phatase wirken als DDT selbst—im Falle der sauren Phosphatase sogar stärker—obwohl es sich bei diesen Substanzen im landläufigen Sinne um Detoxifizierungs-produkte handeln soll.

Die Nachweisgrenzen liegen bei der alkalischen und der sauren Phosphatase zum Teil recht unterschiedlich, wobei auffällt, dass ein Teil der Wirkstoffe aus der DDT-Gruppe die alkalische Phosphatase stärker hemmt, während der grösste Teil der Cyclodiene umgekehrt eine intensivere Hemmung der sauren Phosphatase be-wirkt. Ob diese Unterschiede in der Empfindlichkeit der Enzyme sowie das unter-

schiedliche Verhalten der Wirkstoffgruppen allein darauf zurückzuführen sind, dass es sich um verschiedene Enzyme handelt, oder ob die Herkunft aus pflanzlichem oder tierischem Material eine zusätzliche Rolle spielt, lässt sich nicht entscheiden.

Weiter zeigt sich, dass sich der Nachweis mit Naphthylphosphat als Substrat und Echtblausalz B als Diazo-Reagenz gegenüber dem mit Nitrophenylphosphat bei den Chlorkohlenwasserstoffen in den meisten Fällen empfindlicher gestaltet. Der Grund für diese Unterschiede dürfte in erster Linie darin zu suchen sein, dass helle Flecke auf rotvioletterm Grund besser als auf hellgelbem zu sehen sind. Daneben sollte man unterschiedliche Beeinflussungen infolge Wechselwirkung zwischen Enzym, Inhibitor und Substrat nicht ausser acht lassen.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen nur zum Teil mit denen von GUILBAULT *et al.*¹³ überein, die eine Hemmung der alkalischen Phosphatase durch Aldrin und Heptachlor, nicht aber durch Lindan und DDT fanden, während die saure Phosphatase von diesen Wirkstoffen überhaupt nicht beeinflusst wurde. Diese Diskrepanzen könnten teils auf unterschiedlichen Enzymquellen, teils auf das verwendete Substrat sowie auf das Arbeiten bei höheren Temperaturen und schliesslich auf die grundlegenden methodischen Unterschiede zurückzuführen sein. Andererseits erfahren die hier mitgeteilten Befunde durch die Ergebnisse von NAQVI *et al.*¹⁴, die bei *Schistocerca gregaria* nach DDT-Applikation eine dosisabhängige Erniedrigung der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase feststellten, eine gute Bestätigung. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten mit Leberesterase⁹ und Trypsin¹⁰ ist die positive Beeinflussung der Nachweisempfindlichkeit durch UV-Bestrahlung bei der sauren Phosphatase nur gering, während sie im Falle der alkalischen Phosphatase zum Teil recht gut ist. Infolge der UV-Einwirkung entstehen aus den untersuchten Wirkstoffen eine Reihe von Abbauprodukten, deren Anteil allerdings von Versuch zu Versuch schwanken kann. Je nach Substanz entstehen mindestens ein, maximal aber sechs Phosphatasehemmende Abbauprodukte, was etwa mit den Ergebnissen bei Rinderleberesterase und Trypsin¹⁰ übereinstimmt.

Eine Klärung der Frage, ob aufgrund der Phosphatase-Hemmung gesundheitliche Schäden—speziell im Hinblick auf die Knochenentwicklung bei Kindern—zu erwarten sind, muss abgewartet werden.

DANK

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

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird gezeigt, dass die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide mit und ohne UV-Behandlung die alkalische und saure Phosphatase hemmen, wobei der Nachweis mit Naphthylphosphat als Substrat in den meisten Fällen empfindlicher ausfällt als mit Nitrophenylphosphat. Die Nachweisgrenze liegt je nach Vorbehandlung und verwendetem Substrat im Bereich von 2–150 µg.

LITERATUR

- 1 K. D. ROEDER UND E. A. WEIANT, *Science*, 103 (1946) 304.
- 2 J. H. WELSH UND H. T. GORDON, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 30 (1947) 147.
- 3 F. MATSUMURA UND R. D. O'BRIEN, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 36.
- 4 F. MATSUMURA UND R. D. O'BRIEN, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 39.
- 5 F. MATSUMURA, T. A. BRATKOWSKI UND K. C. PATIL, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 4 (1969) 262.
- 6 J. W. GILLETT, T. M. CHAN UND L. C. TERRIERE, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 540.
- 7 J. W. GILLETT, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 4 (1969) 159.
- 8 W. PERKOW, *Die Insektizide*, 2. Aufl., Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1968.
- 9 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 10 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 447.
- 11 S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN (Editors), *Methods in Enzymology*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1955, p. 523 ff.
- 12 F. GEIKE, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 134.
- 13 G. G. GUILBAULT, M. H. SADAR UND M. ZIMMER, *Anal. Chim. Acta*, 44 (1969) 361.
- 14 S. N. H. NAQVI, S. A. MUZAFFAR UND S. H. ASHRAFI; *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 77 (1970) 577.

J. Chromatogr., 61 (1971) 279-283