

CHROM. 5710

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS  
EINIGER PESTIZIDE DURCH HEMMUNG DER AMYLASE-AKTIVITÄT

F. GEIKE

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

(Eingegangen am 15. September 1971)

## SUMMARY

*Thin-layer chromatographic-enzymatic detection of some pesticides by inhibition of amylases*

(1) Thin-layer chromatographic-enzymatic inhibition technique is used to study the effect of some pesticides on amylases.

(2) It is shown that under these conditions the non-irradiated and UV-treated chlorinated hydrocarbons do inhibit the activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase, and in most cases  $\beta$ -amylase is more strongly inhibited than  $\alpha$ -amylase. After UV treatment the majority of the substances show stronger inhibitory activity; some insecticides, however, became weaker inhibitors.

(3) Of the carbamate insecticides studied, only carbaryl shows a slight activity against  $\beta$ -amylase;  $\alpha$ -amylase, however, is not inhibited at all.

(4) Of the thiolcarbamates, only diallate and triallate are weak inhibitors of  $\beta$ -amylase, while all N-phenylcarbamates show relatively strong inhibitory activity.  $\alpha$ -Amylase is not inhibited by any of the herbicidal carbamates studied.

## EINLEITUNG

Das Angebot an chemischen Verbindungen aller Art wächst täglich, und der Mensch muss freiwillig oder unfreiwillig einen Teil davon in Form von Medikamenten, Konservierungs- und Pflanzenschutzmitteln oder als Verunreinigungen von Wasser und Luft aufnehmen. Durch Gesetze wird zwar versucht, Schäden zu vermeiden, aber dieses Unterfangen muss solange lückenhaft bleiben, als kaum Daten über mögliche Schädigungen vorliegen; denn die toxikologischen Untersuchungen in der bisher üblichen Form können kaum alle Nebenwirkungen aufdecken. Vor allem werden kaum Untersuchungen über die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf Enzyme und mögliche mutagene Aktivitäten durchgeführt. Ebenso, wenn nicht stärker als der Mensch, sind die übrigen Organismen den schädigenden Einflüssen von Chemikalien mehr oder weniger hilflos ausgeliefert. Der Mensch muss daher einerseits Kenntnisse über mögliche negative Einflüsse sammeln und andererseits energisch um Abhilfe bemüht sein. Recht wenig wurde bis heute über die Wirkung von Pestiziden auf Enzyme bekannt, was daran liegen dürfte, dass enzymatische Untersuchungen

infolge der Schwerlöslichkeit dieser Verbindungen recht schwierig sind. Eine Abhilfe auf diesem Gebiet schafft die Anwendung des enzymatischen Hemmtestes auf Dünnschichtplatten, ein Verfahren, das schnell und einfach anzuwenden ist.

Bei den insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten gab man sich bisher weitgehend mit der Feststellung zufrieden, dass sie gute Hemmer der Acetylcholinesterase darstellen<sup>1</sup>, und für die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide war nicht viel mehr bekannt, als dass sie auf das Nervensystem wirken<sup>1</sup>. Erst in jüngerer Zeit zeigten MATSUMURA *et al.*<sup>2</sup>, dass DDT die ATPase der Nervenendigungen im Gehirn hemmt, und auf dünnschichtchromatographischer (DC) Basis wurde eine Hemmung der Rinderleber-Esterase<sup>3</sup>, des Trypsins<sup>4</sup> und der Phosphatasen<sup>5</sup> durch Chlorkohlenwasserstoffe und ihre UV-Bestrahlungsprodukte nachgewiesen. Ebenso konnte inzwischen für die herbiziden Carbamate, für die bisher nur ein Eingreifen in die Photosynthese und in den Mitoseablauf bekannt ist, eine Hemmung der Rinderleber-Esterase<sup>6</sup> und der Phosphatase<sup>7</sup>, die auch von den insektiziden Carbamaten gehemmt wird<sup>7</sup>, festgestellt werden.

In vorliegender Arbeit wird die Eignung der Amylasen für einen selektiven DC Nachweis einiger Pestizide untersucht, wobei gleichzeitig Aufschluss über das Ausmass der Hemmbarkeit dieser Enzyme durch Pestizide erhalten wird. Diese Enzyme kommen in fast allen Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vor und sind dort für den Abbau der Polysaccharide Stärke und Glycogen von grösster Bedeutung. Bei tierischen Amylasen handelt es sich meistens um  $\alpha$ -Amylasen, die 1,4-Bindungen im Inneren des Polysaccharids spalten. Als typisch pflanzliche Enzyme gelten hingegen die  $\beta$ -Amylasen, die das Polysaccharid vom nichtreduzierenden Ende unter Bildung von  $\beta$ -Maltose und — bei verzweigten Glucanen — Grenzdextrinen angreifen.  $\alpha$ -Amylasen kommen jedoch auch in zahlreichen Pflanzen vor, besonders aber in keimenden Cerealien, Pilzen und Bakterien.

#### MATERIAL UND METHODEN

Die in Aceton gelösten Wirkstoffe wurden auf handgegossene Kieselgel G-Platten<sup>3</sup> aufgetragen. Die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide wurden in Cyclohexan, die Carbamate aber in Benzol-Aceton (95:5) chromatographiert. Nach dem Entwickeln wurden die Platten entweder sofort oder nach einstündiger Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254/366 nm einer "Fluotest" Universal-Lampe (Hanau) bei einem Abstand Strahler-Platte von etwa 20 cm mit Enzym besprüht und 30 min bei 25° inkubiert, bevor mit einer Lösung von löslicher Stärke als Substrat nachgesprüht und eine weitere Stunde inkubiert wird. Als Enzymquelle dient  $\alpha$ -Amylase aus *Bacterium subtilis* (EC 3.2.1.1 — Merck, 170 U/mg) oder  $\beta$ -Amylase aus Gerste (EC 3.2.1.2 — Merck, 28 U/mg). Eine eingehende Beschreibung der Durchführung des enzymatischen Hemmtests wird an anderer Stelle<sup>8</sup> gegeben. Die Platten werden nach der Inkubation mit einer 0,02 %igen Jodlösung besprüht, wobei die Hemmflecke als blaue Flecke auf weissem Grund erscheinen.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter den hier angewandten Bedingungen werden beide Amylasen von allen untersuchten Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden gehemmt (Tabelle I). Eine Inten-

TABELLE I

HEMMUNG DER  $\alpha$ - UND  $\beta$ -AMYLASE DURCH CHLORKOHLLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDE NACH UNTERSCHIEDLICHER VORBEHANDLUNGNachweisgrenze in  $\mu\text{g}$ ; Laufmittel, Cyclohex n.

Wirkstoff	$\alpha$ -Amylase		$\beta$ -Amylase	
	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung
DDT	50	20	40	10
DDD	70	40	30	6
DDE	40	8	10	7
Dicofol (Kelthan)	2	1	8	6
Methoxychlor	8	6	20	20
Perthan	30	6	8	8
Lindan	80	80	40	40
Isodrin	70	70	60	50
Endrin	60	30	40	30
Aldrin	70	10	40	30
Dieldrin	50	30	50	40
Heptachlor	40	40	10	10
Heptachlorepoxyd	40	50	40	40
Chlordan	10	20	10	20
Isobenzan	90	90	50	60
Endosulfan	30	60	30	30
Toxaphen	30	60	40	50

sivierung der Hemmung durch die UV-Bestrahlungsprodukte ist im Falle der Amylasen nicht so ausgeprägt wie bei der Rinderleber-Esterase<sup>3</sup> und beim Trypsin<sup>4</sup>, ja zum Teil ist sogar eine Verminderung der Hemmintensität zu beobachten. Die Tendenz, dass  $\beta$ -Amylase von Inhibitoren stärker beeinflusst wird als  $\alpha$ -Amylase<sup>8</sup>, ist auch bei den hier vorliegenden Ergebnissen festzustellen, doch machen einige Verbindungen eine deutliche Ausnahme.

Die ebenfalls auf Amylasehemmung untersuchten insektiziden Carbamate Promecarb, Methiocarb, Zectran, Carbaryl, Pyramat, Dimetan, Isolan, Dimetilan und Pyrolan zeigten bei Auftragsmengen von 100  $\mu\text{g}$  keinen Einfluss auf die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase. Auch  $\beta$ -Amylase wird bei dieser Auftragsmenge von keinem der untersuchten Wirkstoffe mit Ausnahme von Carbaryl gehemmt. Carbaryl zeigt allerdings nur eine sehr schwache Hemmwirkung.

Interessant ist die Wirkung der untersuchten herbiziden Carbamate auf die Aktivität der Amylasen (Tabelle II). Während  $\beta$ -Amylase von allen N-Phenylcarbamaten mit Ausnahme des Biscarbamats Phenmedipham sowie von den Thiocarbamaten Diallat und Triallat gehemmt wird, zeigt keiner der Wirkstoffe in dem untersuchten Konzentrationsbereich eine Hemmwirkung gegenüber  $\alpha$ -Amylase. Diese Ergebnisse deuten, ebenso wie die in vorliegenden Untersuchungen beobachtete Tendenz, dass die  $\beta$ -Amylase durch Inhibitoren stärker beeinflusst wird, auf grundlegende Unterschiede in den Enzymen hin. Besonders hervorzuheben ist, dass die unbehandelten Substanzen deutlich die Enzymaktivität hemmen, während die UV-bestrahlten Wirkstoffe mit Ausnahme von Prophan und den beiden Thiocarbamaten erheblich von ihrer Inhibitoreigenschaft einbüßten. Es fällt dabei besonders auf, dass bei den UV-behandelten Platten keine scharf umgrenzten Flecke mehr auf-

TABELLE II

WIRKUNG HERBIZIDER CARBAMATE NACH UNTERSCHIEDLICHER VORBEHANDLUNG AUF DIE AMYLASE-AKTIVITÄT

Untere Hemmgrenze des Wirkstoffs in  $\mu\text{g}$ ; Laufmittelsystem, Benzol-Aceton (95:5); H = Hofbildung.

Wirkstoff	$\alpha$ -Amylase		$\beta$ -Amylase	
	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung	Ohne UV- Bestrahlung	Mit UV- Bestrahlung
CEPC	—	—	10	80 H
Propham	—	—	10	30
Chlorpropham	—	—	10	80 H
CPPC	—	—	10	80 H
Chlorbufam	—	—	10	80 H
Barban	—	—	10	100 H
Phenmedipham	—	—	—	—
Eptam	—	—	—	—
Vernolate	—	—	—	—
Pebulate	—	—	—	—
Diallat	—	—	50 H	100 H
Triallat	—	—	100	100 H

traten, sondern alle Substanzen mit Ausnahme des Propham zur Hofbildung neigen, d.h. um den Hemmfleck tritt eine diffuse Hemmzone auf, und teilweise ist sogar der Zentralfleck verwaschen. Diese Erscheinung könnte auf die Bildung wasserlöslicher Bestrahlungsprodukte zurückzuführen sein, die in die Umgebung des Hemmflecks hineindiffundieren und auf diese Weise die Hofbildung auslösen.

Amylasen kommt beim Kohlenhydratabbau eine erhebliche Rolle zu. Dementsprechend findet man sie einerseits auch im Speichel- sowie im Pankreassekret, andererseits in keimenden Pflanzensamen, vor allem beim Getreide. In ungekeimten Weizenkörnern liegt  $\beta$ -Amylase in einer durch Bindung an Glutenin inaktiven Form vor, aus der sie beim Keimungsprozess als aktives Enzym freigesetzt wird<sup>9</sup>. Während der Keimung tritt in den ersten Tagen nur  $\beta$ -Amylase auf, die direkt im Endosperm vorliegt und den Stärkeabbau aus dem Inneren heraus vornimmt, während  $\alpha$ -Amylase erst nach fünf Tagen auftritt und vom Scutellum her in das Endosperm abgegeben wird, dann aber auf dem Höhepunkt nach zehn Tagen neun Zehntel der amylolytischen Aktivität ausmacht<sup>10</sup>. Das Auftreten von  $\alpha$ -Amylase beruht auf einer *de novo* Synthese, die völlig von Gibberellinsäure abhängt<sup>11</sup>.

Durch den Abbau der Reservekohlenhydrate, zunächst durch  $\beta$ -Amylase und später durch beide Amylasen, wird dem Embryo die nötige Energie für sein Wachstum bereitgestellt. Unter diesem Gesichtspunkt kommt den hier mitgeteilten Ergebnissen eine erhebliche Bedeutung zu, da Rückstände der die Amylase hemmenden Pestizide die während der Keimung ablaufenden amylolytischen Vorgänge negativ beeinflussen könnten. Ebenso darf nicht ausser acht gelassen werden, dass auch die Tiere zum Aufschluss ihrer Nahrung auf Amylasen angewiesen sind und letztlich sogar Industriezweige von der Wirkung der Amylasen abhängig sind. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse sollte man jedoch nicht verallgemeinern, dass grundsätzlich alle Amylasen durch die untersuchten Pestizide gehemmt werden müssen,

sondern man müsste von Fall zu Fall die jeweilige Wirkung auf das in Frage kommende Enzym untersuchen.

## DANK

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

## ZUSAMMENFASSUNG

Auf dünn-schichtchromatographischer Basis wurde die Wirkung einer Reihe von Pestiziden auf Amylasen untersucht. Es wird gezeigt, dass unter den hier angewandten Bedingungen die Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide mit und ohne UV-Behandlung die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase hemmen, wobei die Hemmung der  $\beta$ -Amylase in den meisten Fällen intensiver ausfällt. UV-Bestrahlung führt überwiegend zu einer Verstärkung, bei einigen Wirkstoffen hingegen zu einer Verminderung der Hemmwirkung.

Von den untersuchten insektiziden Carbamaten hemmt lediglich Carbaryl die  $\beta$ -Amylase leicht, während die  $\alpha$ -Amylase von keinem der Wirkstoffe gehemmt wird.

Während von den Thiolcarbamaten nur Diallat und Triallat die  $\beta$ -Amylase schwach hemmen, wird das Enzym von den N-Phenylcarbamaten recht kräftig gehemmt, doch nimmt die Hemmintensität nach UV-Bestrahlung stark ab. Eine Hemmung der  $\alpha$ -Amylase durch die herbiziden Carbamate war nicht festzustellen.

## LITERATUR

- 1 R. D. O'BRIEN, *Insecticides-Action and Metabolism*, Academic Press, New York, 1967.
- 2 F. MATSUMURA, T. A. BRATKOWSKI UND K. C. PATIL, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 4 (1969) 262.
- 3 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 4 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 447.
- 5 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 279.
- 6 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 257.
- 7 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, im Druck.
- 8 F. GEIKE, *Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 203.
- 9 E. V. ROWSELL UND L. J. GOAD, *Biochem. J.*, 84 (1962) 73 P.
- 10 L. S. DURE, *Plant Physiol.*, 35 (1960) 925.
- 11 J. E. VARNER UND G. R. CHANDRA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 52 (1964) 100.

*J. Chromatogr.*, 63 (1971) 343-347