

CHROM. 5738

Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis von Carbamaten**III. Nachweis insektizider und herbizider Carbamate mit Phosphatase***Einleitung*

Über die Wirkung von insektiziden und herbiziden Carbamaten auf Enzyme ist noch immer relativ wenig bekannt. Bei den Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Carbamat-Insektizide konzentrierte man sich vor allem auf die Hemmung der Cholinesterase. Trotz der allgemein recht guten Anticholinesterase-Wirkung konnte jedoch keine generelle Korrelation zwischen Cholinesterase-Hemmung und insektizider Wirkung der Substanzen festgestellt werden. Über die Wirkung auf andere Enzyme liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Während für die insektiziden Carbamate immerhin die Hemmung eines Enzyms bekannt ist, lagen für die herbiziden Carbamate bis vor kurzem keinerlei Ergebnisse auf diesem Gebiet vor. Ihr Wirkungsmechanismus ist daher noch weitgehend unbekannt. Einerseits scheint es sich bei dieser Pestizid-Gruppe um Mitosegifte zu handeln^{1,2}, andererseits deutet eine Reihe von Ergebnissen auf eine Blockierung des Kohlenhydratabbaus³ sowie auf eine Hemmung der Atmung⁴ hin. Als eigentlicher Wirkungsmechanismus wird jedoch seit langem die Hemmung der Hill-Reaktion angesehen^{5,6}, doch weisen auch diese Autoren darauf hin, dass die Wirkung der Carbamat-Herbizide nicht ausschliesslich auf einer Hemmung der Photosynthese beruhen dürfte, sondern dass diese Wirkstoffe in zahlreiche Stoffwechselprozesse der Zelle einzugreifen scheinen. Erst kürzlich konnte auf dünn-schichtchromatographischer Basis gezeigt werden, dass die Carbamat-Herbizide die Rinderleber-Esterase beeinflussen und diese Wirkung zum Nachweis ausgenutzt werden kann⁷. In vorliegender Arbeit werden Ergebnisse von Untersuchungen zur Hemmung der Phosphatase durch insektizide und herbizide Carbamate auf dünn-schichtchromatographischer Basis berichtet.

Material und methoden

Die in Aceton gelösten Wirkstoffe werden auf handgegossene Kieselgel G-Platten⁸ aufgetragen und in Benzol-Aceton (95:5) chromatographiert. Nach dem Entwickeln werden 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 ca. 20 cm mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln (Boehringer) oder alkalischer Phosphatase aus Kälbermucosa (Serva) besprüht und eine halbe Stunde bei 25° inkubiert. Als Substrat diente Nitrophenylphosphat bzw. Naphthylphosphat. Eine ausführliche Beschreibung des dünn-schichtchromatographisch-enzymatischen Tests auf Phosphatase-Inhibitoren erfolgte an anderer Stelle⁹.

Ergebnisse und diskussion

Bei Verwendung von Nitrophenylphosphat als Substrat erscheinen Phosphatase-Inhibitoren als weisse Flecke auf hellgelbem bis gelbem, bei Verwendung von Naphthylphosphat als Substrat und Echtblausalz B als Diazoreagenz hingegen als

TABELLE I

UNTERE NACHWEISGRENZEN VON NEUN INSEKTIZIDEN CARBAMATEN NACH VERSCHIEDENER VORBEHANDLUNG INFOLGE HEMMUNG DER ALKALISCHEN UND SAUREN PHOSPHATASE BEI VERWENDUNG VON NITROPHENYLPHOSPHAT UND NAPHTHYLPHOSPHAT ALS SUBSTRAT
Nachweisgrenze in μg ; Laufmittelsystem Benzol-Aceton (95:5).

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung				Nach UV-Bestrahlung			
	Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase		Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase	
	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat	Nitrophenyl- phosphat	Naphthyl- phosphat
Promecarb	30	30	0.5	0.3	40	50	0.5	0.5
Methiocarb	40	50	1	0.8	40	50	2	2
Zectran	30	30	1	1	40	100	2	1
Carbaryl	30	30	1	0.8	30	30	1	1
Pyramat	100	70	50	50	100	100	—	—
Dimetan	50	50	20	10	50	50	50	—
Isolan	100	70	50	40	100	50	—	—
Dimetilan	100	70	50	40	100	100	—	—
Pyrolan	100	70	10	10	100	100	40	—

helle Flecke auf rotvioletterm Grund. Wie aus Tabelle I hervorgeht, hemmen alle untersuchten insektiziden Carbamate die alkalische Phosphatase, doch liegen die Nachweisgrenzen relativ ungünstig. Auch die Verwendung von Naphthylphosphat als Substrat und die anschliessende Kupplung des entstehenden Naphthols mit Echtblausalz B bringt nicht immer die erwartete Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit. Überhaupt machten die Carbamate beim Nachweis mit Naphthylphosphat/Echtblausalz B gewisse Schwierigkeiten im Vergleich zu den Chlorkohlenwasserstoffen¹⁰. Im Gegensatz zum Verhalten gegenüber Rinderleber-Esterase¹¹ beeinflusst UV-Behandlung den Nachweis mit Phosphatase nur unwesentlich, lediglich bei Verwendung von Naphthylphosphat als Substrat kommt es zu einer leichten Verschlechterung.

Die Nachweisempfindlichkeit der insektiziden Carbamate mit saurer Phosphatase liegt erheblich günstiger, obwohl auch hier die mit Rinderleber-Esterase erzielten Werte¹¹ nicht im entferntesten erreicht werden (Tab. I). Entsprechend den mit alkalischer Phosphatase gemachten Erfahrungen ist auch bei der sauren Phosphatase durch Verwendung von Naphthylphosphat/Echtblausalz B kaum eine Verbesserung des Nachweises zu erreichen. Eine Bestrahlung der Wirkstoffe mit UV-Licht führt bei den N-Monomethylcarbamaten ebenfalls zu keiner wesentlichen Verschlechterung der Hemmwirkung, während bei den heterocyclischen N-Dimethylcarbamaten eine erhebliche Verminderung eintritt und nur noch Dimetan und Pyrolan eine Hemmung zeigen, die jedoch mit Naphthylphosphat auch nicht mehr nachzuweisen ist.

Die herbiziden Carbamate lassen sich mit Phosphatase erheblich besser nachweisen als die insektiziden (Tab. II). Es fällt vor allem auf, dass sich die Nachweisgrenzen mit alkalischer und saurer Phosphatase im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den insektiziden Carbamaten bei den herbiziden nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Lediglich die drei Thiolcarbamate Eptam, Vernolate und Pebulate lassen sich recht schwer mit alkalischer Phosphatase nachweisen. Eine Erklärung für dieses Verhalten gibt es nicht.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchung mit Rinderleber-Esterase⁷ zeigt, dass der Nachweis mit Phosphatase um etwa eine Zehnerpotenz besser ausfällt. Die Beeinflussung der Nachweisempfindlichkeit durch UV-Bestrahlung ist auch in diesem Fall nur unwesentlich, wenn man davon absieht, dass Phenmedipham nach UV-Behandlung nur noch ein Zehntel und Eptam nur noch ein Fünftel der ursprünglichen Hemmwirkung gegenüber saurer Phosphatase besitzen. Die Verwendung von Naphthylphosphat zum Nachweis erhöht die Empfindlichkeit für eine Reihe von Wirkstoffen beträchtlich, während man bei anderen kaum einen Einfluss feststellen kann.

Obwohl das aktive Zentrum von Esterase und Phosphatase recht ähnlich ist, kommt es dennoch, wie die Ergebnisse zeigen, zu einem recht unterschiedlichen Verhalten. Während die Esterase von den insektiziden Carbamaten recht stark gehemmt wird¹¹, wird die Phosphatase nicht sehr stark gehemmt, wobei die saure Phosphatase der Esterase in der Nachweisempfindlichkeit näherkommt als die alkalische. Besonders interessant ist das Verhalten der Wirkstoffe nach UV-Bestrahlung. Während die Antiesterase-Aktivität erheblich nachliess, wird die Antiphosphatase-Aktivität kaum beeinflusst. Bei den herbiziden Carbamaten stellt man dagegen eine bessere Übereinstimmung im Verhalten gegenüber Esterase und Phosphatase fest. Die vorhandenen Unterschiede sind eher gradueller Natur. Während beim Nachweis mit Esterase eher

TABELLE II

UNTERE NACHWEISGRENZE HERBIZIDER N-PHENYL- UND THIOCARBAMATE NACH VERSCHIEDENER VORBEHANDLUNG INFOLGE HEMMUNG DER ALKALISCHEN UND SAUREN PHOSPHATASE BEI VERWENDUNG VON NITROPHENYLPHOSPHAT BZW. NAPHTHYLPHOSPHAT ALS SUBSTRAT
Nachweisgrenze in μg ; Laufmittelsystem Benzol-Aceton (95:5).

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung				Nach UV-Bestrahlung			
	Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase		Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase	
	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat
CEPC	1	0.8	1	1	1	1	1	1
Propham	3	3	0.9	0.6	3	3	0.8	0.6
Chlorpropham	0.5	0.8	1	1	0.8	0.8	1	1
CPPC	1	0.8	1	1	1	0.8	1	1
Chlorbufam	0.5	0.5	1	0.9	0.8	0.8	1	1
Barban	0.5	0.5	0.5	0.3	0.7	0.7	0.8	0.5
Phenmedipham	0.5	0.5	0.8	0.3	0.5	0.5	10	1
Eptam	—	100	0.9	0.8	—	50	5	0.8
Vernolate	80	50	0.6	0.6	80	30	1	0.8
Pebulate	80	50	0.6	0.2	90	30	1	0.6
Diallat	3	1	0.3	0.3	3	1	0.8	0.6
Triallat	3	0.7	0.6	0.2	1	1	0.8	0.6

eine Aktivierung durch UV-Behandlung zu beobachten war⁷, hat diese im Falle der Phosphatase insgesamt gesehen kaum einen Einfluss.

Die vorliegenden Ergebnisse dürften besonders in toxikologischer Hinsicht von einigem Interesse sein, da die Carbamate, vor allem aber die herbiziden, wegen ihrer intensiven Hemmung der Phosphatase einen negativen Einfluss auf das Knochenwachstum haben könnten. Leider fehlen auf diesem Gebiet bisher jedoch jegliche Untersuchungen.

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

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

F. GEIKE

- 1 W. B. ENNIS, *Amer. J. Bot.*, 35 (1948) 18.
- 2 G. W. IVENS UND G. E. BLACKMAN, *Nature*, 166 (1950) 954.
- 3 A. S. CRAFTS, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 4 (1953) 253.
- 4 C. R. SWANSON, W. C. SHAW UND J. H. HUGHES, *Weeds*, 2 (1953) 253.
- 5 J. S. C. WESSELS UND R. VAN DER VEEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 548.
- 6 D. E. MORELAND UND K. H. HILL, *J. Agr. Food Chem.*, 7 (1959) 832.
- 7 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 257.
- 8 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 9 F. GEIKE, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 134.
- 10 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 279.
- 11 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 269.

Eingegangen am 7. Juli 1971

J. Chromatogr., 65 (1972) 383-387