

CHROM. 6982

## DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHER SCREENING-TEST ÜBER DIE HEMMEIGENSCHAFTEN VON PHENYLHARNSTOFF-HERBIZIDEN GEGENÜBER EINIGEN ENZYMEN

F. GEIKE

*Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D1 Berlin 33 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 14. Juni 1973)

---

### SUMMARY

*A thin-layer chromatographic screening test for the detection of inhibiting properties of phenylurea herbicides on certain enzymes*

The possibility of employing a thin-layer chromatographic enzymatic inhibition technique using bovine liver esterase, alkaline and acid phosphatase, trypsin and chymotrypsin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase, and urease for the detection of phenylurea herbicides is studied. While the untreated substances, with the exception of benzomarc and metoxymarc have some influence on bovine liver esterase, only at high concentrations, identification is possible for most of the herbicides after UV irradiation at concentrations below 1  $\mu$ g. Both phosphatases in most cases are very strongly inhibited and in some cases UV irradiation brings about significant improvement in detection limits. The proteases trypsin and chymotrypsin are inhibited by only a few phenylureas at high concentrations, chymotrypsin being more sensitive than trypsin.  $\alpha$ -Amylase is inhibited by only a few herbicides at high concentrations, while  $\beta$ -amylase is moderately inhibited by all substances. Finally, urease is moderately inhibited too by most of the phenylurea herbicides studied.

---

### EINLEITUNG

Über die Wirkung von Phenylharnstoff-Herbiziden auf allgemeine Stoffwechselfvorgänge liegen bisher nur spärliche Informationen vor, obwohl sie seit über zehn Jahren intensiv in der Landwirtschaft eingesetzt werden. Lediglich der Tatsache, dass sie als Hemmstoffe der Hill-Reaktion in die Photosyntheseforschung Eingang fanden, verdanken Diuron und Monuron eine intensive Untersuchung ihres Wirkungsmechanismus im Bereich der Photosynthese.

Über ihre Hemmstelle im photosynthetischen Elektronentransport scheint inzwischen weitgehend Einigkeit zu herrschen. Aufgrund der Tatsache, dass es nach Diuron-Vergiftung schnell zu einer photochemischen Reduktion des Quenchers "Q" kommt<sup>1</sup> und Photosystem I "Q" nicht länger reoxidieren kann<sup>2</sup>, dürfte es als gesichert gelten, dass die Hemmstelle von Diuron im offenkettigen Elektronentransport nahe beim Quencher "Q" auf der oxidierenden Seite liegt<sup>3,4</sup>. Alle diese Daten schliessen

jedoch nicht aus, dass Diuron eine weit komplexere Wirkungsweise einschliesslich einer Wirkung auf die Wasserspaltung<sup>5,6</sup> hat. Neben dem Block von Diuron im Bereich von Photosystem II scheint noch ein weiterer Angriffspunkt zu existieren. Untersuchungen von Tanner *et al.*<sup>7</sup> über die Photoassimilation von Glucose in *Chlorella* einerseits und Van Rensen<sup>8</sup> über die cyclische Photophosphorylierung in *Scenedesmus* andererseits deuten auf eine weitere Hemmstelle im Bereich des Photosystems I bei höheren Inhibitorkonzentrationen hin, was sich ebenfalls aus *in vitro* Versuchen<sup>9</sup> ergibt. Auch die übrigen Phenylharnstoff-Herbizide sind als Inhibitoren der Hill-Reaktion bekannt<sup>10-13</sup>, doch sind ihre Hemmstellen nicht so eingehend untersucht wie die des Diuron und Monuron.

Während über die Wirkungsweise der Phenylharnstoffe im Bereich der Photosynthese einige Daten vorliegen, existieren über Einflüsse dieser Wirkstoffgruppe auf einzelne Enzyme oder Stoffwechselwege praktisch keine Untersuchungen. Lediglich eine Arbeit befasst sich mit Enzymspiegeluntersuchungen nach Diuron-Behandlung von Zuckerrohr und stellt Veränderungen bei einer Reihe von Enzymen fest<sup>14</sup>, ohne jedoch deren Ursachen näher zu untersuchen.

In vorliegender Arbeit wird erstmals eine grössere Zahl von Phenylharnstoff-Herbiziden im Rahmen eines dünn-schichtchromatographisch (DC)-enzymatischen Screening-Tests hinsichtlich ihrer Wirkung auf eine Reihe von Enzymen untersucht. Diese Untersuchungen sollen einerseits Aufschluss darüber geben, in welchem Bereich mit Eingriffen von Substanzen dieser Verbindungsklasse in Stoffwechselforgänge zu rechnen ist, andererseits sollen sie die Frage klären, ob und in welchem Umfange ein DC-enzymatischer Nachweis dieser Herbizidgruppe möglich ist. Dazu werden alle Enzyme, für die ein entsprechendes Testverfahren vorliegt, herangezogen. Nicht beabsichtigt wurde im Rahmen dieser Arbeit, eine optimale DC-Trennung zu erreichen.

## MATERIAL UND METHODEN

### *Reagenzien*

Alle für die Untersuchung verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien waren analysenrein und stammten von der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.). Sie wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Zur Plattenbeschichtung wurde Kieselgel G nach Stahl mit ca. 13% CaSO<sub>4</sub> und einer mittleren Korngrösse von 10–40  $\mu$  von der gleichen Firma genommen.

### *Wirkstofflösungen und Dünnschichtchromatographie*

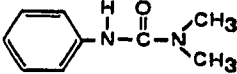
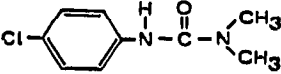
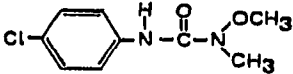
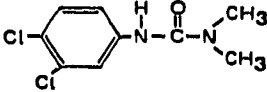
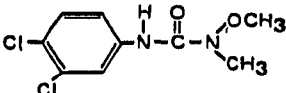
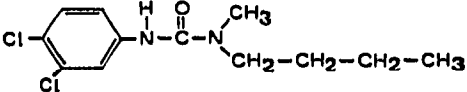
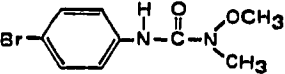
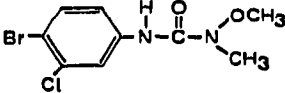
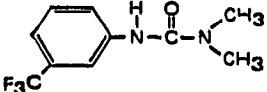
Die in der Tabelle I aufgeführten Phenylharnstoff-Herbizide wurden in Konzentrationen von 10 mg/ml in Aceton (Stammösung) gelöst und bei Bedarf mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Die Wirkstoffe wurden auf handgegossenen Kieselgel G-Platten<sup>15</sup> aufgetragen und in Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1) chromatographiert.

### *Durchführung des enzymatischen Hemmtests*

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, Hanau, B.R.D.) bei einem Abstand Strahler-Platte von ca. 20 cm zunächst leicht mit Puffer und anschliessend mit Enzymlösung besprüht.

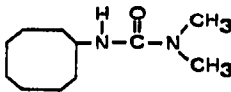
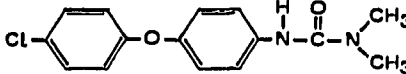
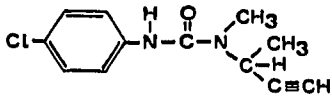
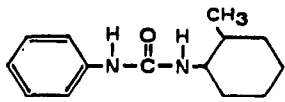
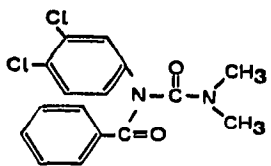
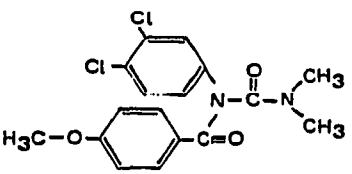
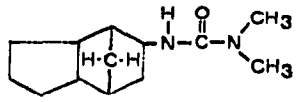
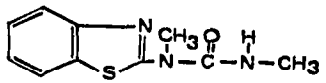
TABELLE I

## NAME UND STRUKTUR DER UNTERSUCHTEN PHENYLHARNSTOFF-HERBIZIDE

<i>Trivial-Name</i>	<i>Chemische Bezeichnung</i>	<i>Strukturformel</i>
Fenuron	1,1-Dimethyl-3-phenylharnstoff	
Monuron	3-( <i>p</i> -Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	
Monolinuron	3-( <i>p</i> -Chlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	
Diuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	
Linuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	
Neburon	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-butyl-1-methylharnstoff	
Metobromuron	3-( <i>p</i> -Bromphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	
Chlorbromuron	3-(4-Brom-3-chlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	
Fluometuron	3-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -Trifluor- <i>m</i> -tolyl)-1,1-dimethylharnstoff	

(Fortgesetzt auf S. 202)

TABELLE I (Fortsetzung)

Trivial-Name	Chemische Bezeichnung	Strukturformel
Cycluron	3-Cyclooctyl-1,1-dimethylharnstoff	
Cloroxuron	3-[p-(p-Chlorphenoxy)phenyl]-1,1-dimethylharnstoff	
Buturon	3-(p-Chlorphenyl)-1-methyl-1-(1-methylprop-2-ynyl)harnstoff	
Siduron	1-(2-Methylcyclohexyl)-3-phenylharnstoff	
Benzomarc	3-Benzoyl-3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	
Metoxymarc	3-(4-Methoxybenzoyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	
Norea	3-(Hexahydro-4,7-methanoindan-5-yl)-1,1-dimethylharnstoff	
Tribunil	3-(2-Benzthiazolyl)-1,3-dimethylharnstoff	

Nach einer Inkubation von 30 min bei 25° und 80–90% Luftfeuchte wird mit Substrat nachgesprüht und in einigen Fällen direkt oder nach weiterer Inkubation unter obigen Bedingungen ausgewertet.

### *Enzym- und Substratlösungen*

Die Herstellung der Enzympräparation und Substratlösung für die Untersuchungen mit Rinderleberesterase erfolgt in Anlehnung an Ackermann<sup>16</sup>, doch wurde —wie schon früher beschrieben<sup>15</sup>— das Homogenisieren der Leber und die Verdünnung der Enzympräparation mit 0.02 M Phosphatpuffer pH 7.0 durchgeführt. Als Substrat diente Naphthylacetat und als Kupplungsreagenz Echtblausalz B. Zum Besprühen der Platten wurde eine etwa 1 : 60 verdünnte Enzymlösung (w/v) genommen.

Für den DC-enzymatischen Nachweis mit Hilfe der Phosphatasehemmung wurde saure Phosphatase aus Kartoffeln (EC 3.1.3.2, Boehringer\*, 2.0 U/mg) und alkalische Phosphatase aus Kälbermucosa (EC 3.1.3.1, Serva\*\*, 1.0 U/mg) benutzt. Als Substrat diente eine Lösung von Nitrophenylphosphat in Puffer und Naphthylphosphat in Wasser, wobei im Falle des Naphthylphosphates Echtblausalz B als Kupplungsreagenz zugegeben wird. Die Methode des enzymatischen Hemmtestes wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben<sup>17</sup>.

Die Untersuchungen zum Nachweis der Wirkungen auf Trypsin bzw. Chymotrypsin wurden mit Trypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.4.4, Merck, 2.0 U/mg) bzw. mit  $\alpha$ -Chymotrypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.4.5, Merck, 45 mU/mg) durchgeführt. Als Substrat diente im Falle des Trypsins eine Suspension von N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid in Puffer und im Falle des Chymotrypsins eine Lösung von N-Glutaryl-L-phenylalanin-2-naphthylamid in Puffer. Eine eingehende Beschreibung der beiden Hemmtests erfolgte an anderer Stelle<sup>18,19</sup>.

Für den Nachweis mit Hilfe der Amylasehemmung diente  $\alpha$ -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) als Enzymquelle und eine Lösung von löslicher Stärke in dem jeweiligen Puffer als Substrat. Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung des enzymatischen Hemmtestes findet sich in einer früheren Arbeit<sup>20</sup>.

Der Ureasehemmtest wird mit einer Lösung von Urease (EC 3.5.1.5, Serva, 250 U/mg) in Phosphatpuffer pH 7.0 als Enzymquelle und einer solchen von Harnstoff in einer 0.01%-igen Bromthymolblaulösung als Substrat durchgeführt. Auch diese Methode wurde ausführlich an anderer Stelle beschrieben<sup>21</sup>.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der DC-enzymatische Hemmtest als analytisches Hilfsmittel wird inzwischen allgemein anerkannt, was den Nachweis von Phosphorsäureestern und Carbamaten betrifft. Die im Laufe der Zeit aus einer Grundmethode durch Modifikation bezüglich Substrat, Kupplungsreagenzien oder Inkubationsbedingungen hervorgegangenen Varianten sind recht zahlreich<sup>16,22–28</sup>. Eine ausführliche Zusammenfassung findet sich bei Mendoza<sup>29</sup>. Dass sich die für andere Enzyme ausgearbeiteten DC-enzymatischen Methoden noch nicht allgemein zum Pestizidnachweis durchgesetzt haben, liegt sicher

\* Boehringer, Mannheim, B.R.D.

\*\* Serva, Heidelberg, B.R.D.

nicht zuletzt daran, dass sie in den meisten Fällen eher zum Screening-Test auf mögliche Hemmwirkungen als zum hochempfindlichen Nachweis geeignet sind. Eine Ausnahme hiervon macht der Nachweis von Organoquecksilberverbindungen mit Urease<sup>30</sup> und von herbiziden Carbamaten mit Phosphatase<sup>31</sup>, die bis hinunter in den Nanogrammbereich nachweisbar sind.

Die Beeinflussung der Rinderleberesterase durch die Phenylharnstoff-Herbizide ist, abgesehen von wenigen Ausnahmen, recht einheitlich (Tabelle II). Der grösste Teil der untersuchten Wirkstoffe führt bei hohen Auftragsmengen zu einer Farbtintensivierung. Lediglich Benzomarc und Metoxymarc zeigen mit einer Nachweisgrenze von 40 bzw. 30  $\mu\text{g}$  infolge Esterasehemmung eine analytisch gerade noch vertretbare Empfindlichkeit. Cycluron mit einer Nachweisgrenze von 90  $\mu\text{g}$  sowie Fenuron, Norea und Tribunil mit einer solchen von 100  $\mu\text{g}$  hemmen ebenfalls die Leberesterase, während Fluometuron selbst bei Auftragsmengen von 150  $\mu\text{g}$  keine Wirkung auf das Enzym zeigt.

TABELLE II

UNTERE NACHWEISGRENZE ( $\mu\text{g}$ ) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE INFOLGE HEMMUNG DER RINDERLEBERESTERASE

Laufmittel: Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1); I = Farbtintensivierung.

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung	Nach UV-Behandlung
Fenuron	100	100
Monuron	100 I	0.4
Monolinuron	100 I	0.7
Diuron	100 I	0.9
Linuron	100 I	0.9
Neburon	100 I	0.1
Metobromuron	100 I	0.8
Chlorbromuron	100 I	0.9
Fluometuron	—	—
Cycluron	90	100
Chloroxuron	100 I	0.5
Buturon	100 I	0.8
Siduron	100 I	100 I
Benzomarc	40	10
Metoxymarc	30	8
Norea	100	100
Tribunil	100	90

Nach UV-Bestrahlung der Wirkstoffe auf der Dünnschichtplatte verändert sich die Wechselwirkung zwischen Enzym und Phenylharnstoffen grundlegend. Lediglich jene Substanzen, die bereits vor einer UV-Behandlung eine Esterasehemmung zeigten, werden wenig oder gar nicht beeinflusst, während die übrigen Wirkstoffe mit Ausnahme von Siduron, das bei einer Auftragsmenge von 100  $\mu\text{g}$  auch nach UV-Bestrahlung eine Farbtintensivierung hervorruft, in zum Teil kräftige Esterasehemmer übergehen, von denen Neburon mit 0.1  $\mu\text{g}$  besonders stark hemmt (Tabelle II). Einige Phenylharnstoffe zeigen nach UV-Bestrahlung eine Eigenfärbung, neben der jedoch die

Hemmflecken festzustellen sind. Das Auftreten von Eigenfärbung nach UV-Behandlung könnte auf einer teilweisen Polymerisierung der Wirkstoffe beruhen, wie sie in Lösung beobachtet wurde<sup>32</sup>. Als weitere Photoreaktionen wurden eine schrittweise Oxidation<sup>32,33</sup> und Abspaltung der Methylgruppen, Hydroxylierung des aromatischen Kerns<sup>32</sup> sowie eine Substitution von Chlor durch Hydroxyl<sup>33</sup> bekannt. Die Polymerisationsprodukte dürften das Enzym sicher nicht hemmen, doch ist unbekannt, in welchem Umfange die anderen Photoreaktionsprodukte einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben können. Aus Arbeiten mit insektiziden Carbamaten ist bekannt, dass eine Hydroxylierung nicht unbedingt eine Abnahme der Anticholinesteraseaktivität bedeuten muss<sup>34,35</sup>, doch führt andererseits eine UV-Bestrahlung dieser Insektizidgruppe zu einer kräftigen Abnahme der Nachweisempfindlichkeit<sup>36</sup>. Aufgrund der gefundenen Photozersetzungsprodukte von Monuron und Fenuron schlossen Mazzocchi und Rao<sup>37</sup> auf das Auftreten von Radikalen als Zwischenprodukte bei der UV-Bestrahlung. Solche Radikalzwischenprodukte könnten zwar die Ausgangsprodukte für die nach Bestrahlung der Wirkstoffe auftretenden gefärbten Verbindungen darstellen, dürften aber wegen ihrer Kurzlebigkeit kaum die Enzymaktivität beeinflussen können. Von Interesse für eine Enzymhemmung wäre das Auftreten von Peroxiden, doch scheint diese Möglichkeit aufgrund der Erfahrungen mit UV-bestrahlten Chlorkohlenwasserstoffen<sup>18</sup> nicht in Betracht zu kommen, so dass hier auf einen entsprechenden Nachweis verzichtet wurde. Ausserdem deuten die Ergebnisse bei den anderen untersuchten Enzymen nicht auf eine Enzymhemmung infolge des Auftretens von Peroxiden hin.

Besonders hervorzuheben ist das Auftreten von Farbintensivierungen beim Esterasehemmtest nach Ausfärbung der Platten bei den meisten der Originalwirkstoffe (Tabelle II). Eine ähnliche Reaktion war bereits beim Nachweis herbizider Carbamate mit Rinderleberesterase zu beobachten<sup>38</sup>. Die Ursache für die Farbintensivierung ist unbekannt, doch könnte man vermuten, dass Teile des Leberrohextraktes Phenylharnstoffe unter Bildung substituierter Aniline spalten, die dann mit Echtblausalz B unter Farbstoffbildung reagieren könnten. Zur Abklärung dieser Frage wurden die chromatographierten Phenylharnstoffe mit Enzym besprüht und nach Inkubation mit Echtblausalz behandelt oder mit Substrat/Echtblausalz B ohne Enzym inkubiert. In beiden Fällen kommt es zu keiner Farbausbildung. Die Frage nach der Rolle aller beteiligten Komponenten in diesem komplexen System bleibt daher offen. Eine Aktivierung des Enzyms durch die Wirkstoffe sollte eigentlich nicht in Frage kommen, da in diesem Fall von Anbeginn an eine stärkere Ausfärbung der Platte im Herbizidbereich zu erwarten wäre.

Die Phosphatasen werden von nahezu allen untersuchten Phenylharnstoff-Herbiziden gehemmt (Tabelle III). Lediglich Fenuron hemmt keines der beiden Enzyme und Tribunil nur die saure Phosphatase leicht. Auffällig ist die Nachweisverbesserung vor allem bei der sauren Phosphatase durch Verwendung von Naphthylphosphat als Substrat, während beim Nachweis mit alkalischer Phosphatase in einer Reihe von Fällen mit Nitrophenylphosphat ein empfindlicher Nachweis erreicht wird. Diese Ergebnisse sind analog jenen beim Nachweis der insektiziden und in geringerem Masse denen der herbiziden Carbamate<sup>31</sup>. Auch in der allgemeinen Nachweisempfindlichkeit zeigen sich deutliche Analogien, da sie auch im vorliegenden Fall mit saurer Phosphatase in den meisten Fällen günstiger liegt (Tabelle III). Die am stärksten hemmenden Substanzen sind Siduron und Neburon, aber auch Buturon zeigt noch

TABELLE III

UNTERE NACHWEISGRENZE ( $\mu\text{g}$ ) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG DER ALKALISCHEN UND SAUREN PHOSPHATASE

Substrat: Nitrophenylphosphat bzw. Naphthylphosphat; Laufmittelsystem: Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1).

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung			Nach UV-Bestrahlung		
	Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase	Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase
	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat	Nitrophenyl-phosphat	Nitrophenyl-phosphat	Naphthyl-phosphat	Nitrophenyl-Naphthyl-phosphat
Fenuron	—	—	—	—	—	—
Monuron	20	30	—	20	15	10
Monolinuron	100	70	10	7	5	8
Diuron	20	9	3	2	3	2
Linuron	20	15	5	4	5	5
Neburon	1	0.9	0.5	0.2	0.4	0.4
Metobromuron	3	10	10	7	15	7
Chlorbromuron	20	10	2	1	3	2
Fluometuron	20	20	10	7	20	4
Cycluron	10	20	60	40	30	4
Chloroxuron	8	8	5	6	9	4
Buturon	4	9	3	2	5	8
Siduron	0.6	0.4	1	1	0.4	1
Benzomarc	30	10	60	40	10	1
Metoxymarc	70	30	50	30	20	30
Norea	40	20	5	3	40	20
Tribumil	—	—	80	60	—	3
						80



eine recht gute Hemmwirkung. Eine UV-Bestrahlung bringt bei einer Reihe von Wirkstoffen, vor allem beim Nachweis mit alkalischer Phosphatase, eine Nachweisverbesserung, die in einigen Fällen nicht unerheblich ist (Tabelle III). Daneben kommt es ebenso zu Nachweisverschlechterungen oder zu keiner Beeinflussung der Nachweisempfindlichkeit durch UV-Bestrahlung.

Bemerkenswert ist der geringe Einfluss der Phenylharnstoffe auf die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin. Von den unbehandelten Wirkstoffen wird Trypsin lediglich von den in ihrer Struktur einander recht ähnlichen Substanzen Benzomarc und Metoxymarc gehemmt (Tabelle IV). Eine UV-Bestrahlung der Wirkstoffe hat keinen Einfluss auf die Enzymhemmung.

TABELLE IV

UNTERE NACHWEISGRENZE ( $\mu\text{g}$ ) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE INFOLGE HEMMUNG VON TRYPSIN UND CHYMOTRYPSIN

Laufmittel: Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1).

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung		Nach UV-Bestrahlung	
	Trypsin	Chymotrypsin	Trypsin	Chymotrypsin
Fenuron	—	—	—	—
Monuron	—	—	—	—
Monolinuron	—	—	—	—
Diuron	—	—	—	—
Linuron	—	—	—	—
Neburon	—	130	—	20
Metobromuron	—	—	—	—
Chlorbromuron	—	130	—	—
Fluometuron	—	130	—	90
Cycluron	—	—	—	—
Chloroxuron	—	130	—	—
Buturon	—	80	—	—
Siduron	—	100	—	130
Benzomarc	30	130	30	130
Metoxymarc	30	130	30	130
Norea	—	130	—	130
Tribunil	—	—	—	—

Chymotrypsin wird von einer ganzen Reihe von Phenylharnstoff-Herbiziden gehemmt, doch liegen die aufzuwendenden Konzentrationen recht hoch (Tabelle IV). Eine UV-Bestrahlung bringt lediglich im Falle von Neburon eine erhebliche und bei Fluometuron eine leichte Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, während Buturon, Chlorbromuron und Chloroxuron nicht mehr nachzuweisen sind (Tabelle IV).

Auch  $\alpha$ -Amylase wird von den Phenylharnstoff-Herbiziden kaum gehemmt. Von den unbehandelten Wirkstoffen hemmen lediglich Monuron, Diuron, Neburon, Chlorbromuron und Buturon das Enzym bei hohen Auftragsmengen, während nach UV-Bestrahlung nur noch Neburon einen Hemmeffekt zeigt (Tabelle V).  $\beta$ -Amylase, die im Hemmtest allgemein stärker als  $\alpha$ -Amylase beeinflusst wird<sup>20,39</sup>, wird von allen untersuchten Substanzen mehr oder weniger ausgeprägt gehemmt, wobei Buturon und

TABELLE V

UNTERE NACHWEISGRENZE ( $\mu\text{g}$ ) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE INFOLGE HEMMUNG VON AMYLASE

Laufmittel: Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1).

Wirkstoff	Ohne Vorbehandlung		Nach UV-Bestrahlung	
	$\alpha$ -Amylase	$\beta$ -Amylase	$\alpha$ -Amylase	$\beta$ -Amylase
Fenuron	—	30	—	70
Monuron	100	10	—	10
Monolinuron	—	70	—	50
Diuron	100	10	—	8
Linuron	—	40	—	10
Neburon	100	20	100	5
Metobromuron	—	20	—	20
Chlorbromuron	100	20	—	8
Fluometuron	—	40	—	20
Cycluron	—	30	—	30
Chloroxuron	—	10	—	8
Buturon	100	8	—	8
Siduron	—	8	—	8
Benzomarc	—	40	—	60
Metoxymarc	—	40	—	60
Norea	—	80	—	70
Tribunil	—	70	—	40

Siduron die stärkste Wirkung zeigen (Tabelle V). Durch UV-Bestrahlung kommt es in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit; lediglich Fenuron, Benzomarc und Metoxymarc zeigen eine deutliche Verschlechterung.

Die Urease wird von den meisten Wirkstoffen nur mittelstark gehemmt. Lediglich Fenuron, Cycluron, Benzomarc und Tribunil zeigen keinerlei Hemmung des Enzyms (Tabelle VI). Durch eine UV-Bestrahlung der Phenylharnstoffe wird die Hemmwirkung der Substanzen mit Ausnahme von Neburon zum Teil erheblich verstärkt. Von den Wirkstoffen, die ohne UV-Behandlung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten, ging nur Chloroxuron nach Bestrahlung in einen schwachen Ureaseinhibitor über (Tabelle VI).

Aufgrund der hier vorliegenden Screening-Ergebnisse scheint den untersuchten Phenylharnstoffen selbst kaum eine grössere toxikologische Bedeutung zuzukommen. Lediglich die zum Teil recht ausgeprägte Hemmung der Phosphatasen stimmt etwas bedenklich, da vor allem alkalische Phosphatase beim Aufbau der Knochen eine grosse Rolle spielt<sup>40</sup>. Von toxikologischem Interesse könnten eventuell auch die UV-Bestrahlungsprodukte sein, da sie sowohl die Esterase als auch die Phosphatase teilweise recht stark hemmen, man andererseits aber bedenken muss, dass die Bestrahlungsbedingungen nicht die natürlichen Verhältnisse widerspiegeln. Dort, wo eine stärkere Enzymhemmung im Screening-Test zu beobachten ist, werden intensivere Untersuchungen Aufschluss darüber geben müssen, ob am lebenden Objekt entsprechende Hemmungen auftreten. Einleitende Versuche in dieser Richtung laufen bereits.

Von analytischem Interesse ist zunächst einmal der Nachweis mit Phosphatase,

TABELLE VI

UNTERE NACHWEISGRENZE ( $\mu\text{g}$ ) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE INFOLGE HEMMUNG DER UREASE

Laufmittel: Cyclohexan-Essigsäureäthylester (1:1).

<i>Wirkstoff</i>	<i>Ohne Vorbehandlung</i>	<i>Nach UV-Behandlung</i>
Fenuron	—	—
Monuron	40	10
Monolinuron	40	10
Diuron	50	40
Linuron	50	8
Neburon	20	40
Metobromuron	40	10
Chlorbromuron	20	10
Fluometuron	50	50
Cycluron	—	100
Chloroxuron	60	10
Buturon	50	10
Siduron	20	10
Benzomarc	—	—
Metoxymarc	—	—
Norea	50	20
Tribunil	—	—

da er für die nicht UV-behandelten Wirkstoffe zum Teil recht empfindlich ausfällt. Von eventuell noch grösserer Bedeutung scheint der Nachweis der UV-bestrahlten Wirkstoffe mit Rinderleberesterase zu sein, da die nach diesem Verfahren erzielten Nachweisgrenzen für einen grossen Teil der untersuchten Herbizide unter  $1 \mu\text{g}$  liegen.

## DANK

Unser besonderer Dank gilt Frau H. Bensel und Frau F. Lorimer für die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche. Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie wird für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des koordinierten Forschungsprogrammes "Herbizide unter Umweltgesichtspunkten" gedankt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Möglichkeiten für einen dünn-schichtchromatographisch-enzymatischen Hemmtest mit den Enzymen Rinderleberesterase, alkalische und saure Phosphatase, Trypsin und Chymotrypsin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase sowie Urease als Nachweis für die Phenylharnstoff-Herbizide wurden untersucht. Während die unbehandelten Substanzen, ausser Benzomarc und Metoxymarc, nur bei hohen Konzentrationen einen Einfluss auf Rinderleberesterase haben, ist der Nachweis nach UV-Bestrahlung, von einigen Ausnahmen abgesehen, für den grössten Teil der Herbizide bis unter  $1 \mu\text{g}$  möglich. Die Phosphatasen werden von den meisten Substanzen recht kräftig ge-

hemmt, wobei UV-Bestrahlung in einigen Fällen zu einer deutlichen Nachweisverbesserung führt. Die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin werden nur von wenigen Substanzen —und dann meist bei hohen Konzentrationen— gehemmt, wobei Chymotrypsin empfindlicher reagiert als Trypsin.  $\alpha$ -Amylase wird nur von einigen Herbiziden bei hohen Konzentrationen,  $\beta$ -Amylase hingegen von allen mittelstark gehemmt. Urease schliesslich wird von einem grossen Teil der Phenylharnstoffe mittelstark inhibiert.

## LITERATUR

- 1 P. Joliot, R. Delosme und A. Joliot, in J. B. Thomas und J. C. Goedher (Herausgeber), *Currents in Photosynthesis*, Ad. Donker, Rotterdam, 1966, S. 359.
- 2 D. M. Geller, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2947.
- 3 L. N. M. Duysens und H. E. Sweers, in *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, Jap. Soc. Plant Physiol., Univ. Tokyo, special Issue of Plant and Cell Physiol., Tokyo, 1963, S. 353.
- 4 P. Bennoun, *Biochim. Biophys. Acta*, 216 (1970) 357.
- 5 S. Izawa und N. E. Good, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 20.
- 6 G. M. Cheniac und I. F. Martin, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 819.
- 7 W. Tanner, L. Dächsel und O. Kandler, *Plant Physiol.*, 40 (1965) 1151.
- 8 J. J. S. van Rensen, *Meded. Landbouwhoges. Wageningen*, 71, Nr. 9 (1971) 1.
- 9 T. Asahi und A. T. Jagendorf, *Arch. Biochem. Biophys.*, 100 (1963) 531.
- 10 A. R. Cooke, *Weeds*, 4 (1956) 397.
- 11 J. S. C. Wessels und R. van der Veen, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 548.
- 12 D. E. Moreland, K. L. Hill und J. L. Hilton, *Abstr. Weed Sci. Soc. Amer.*, 2 (1958) 40.
- 13 N. E. Good, *Plant Physiol.*, 36 (1961) 788.
- 14 A. G. Alexander, *Abstr. Int. Congr. Plant Protect.*, 6th, Vienna, 1967, S. 424.
- 15 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 16 H. Ackermann, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 309.
- 17 F. Geike, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 134.
- 18 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 447.
- 19 F. Geike, *Z. Anal. Chem.* 261 (1972) 397.
- 20 F. Geike, *Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 203.
- 21 F. Geike, *Z. Anal. Chem.*, 258 (1972) 284.
- 22 J. J. Menn und J. B. McBain, *Nature (London)*, 209 (1966) 1351.
- 23 C. E. Mendoza, P. J. Wales, H. A. McLeod und W. P. McKinley, *Analyst (London)*, 93 (1968) 34.
- 24 W. Winterlin, G. Walker und H. Frank, *J. Agr. Food Chem.*, 16 (1968) 809.
- 25 C. E. Mendoza, D. L. Grant, B. Braceland und K. A. McCully, *Analyst (London)*, 94 (1969) 805.
- 26 C. E. Mendoza, P. J. Wales, D. L. Grant und K. A. McCully, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 1196.
- 27 P. J. Wales, H. A. McLeod und W. P. McKinley, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 51 (1968) 1239.
- 28 T. Stijve und E. Cardinale, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 62 (1971) 25.
- 29 C. E. Mendoza, *Residue Rev.*, 43 (1972) 105.
- 30 F. Geike und I. Schuphan, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 153.
- 31 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 383.
- 32 D. G. Crosby und C. S. Fang, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 1044.
- 33 J. D. Rosen, R. F. Strusz und C. C. Still, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 206.
- 34 H. W. Dorough und J. E. Casida, *J. Agr. Food Chem.*, 12 (1964) 244.
- 35 D. G. Crosby, E. Leitis und W. L. Winterlin, *J. Agr. Food Chem.*, 13 (1965) 204.
- 36 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 269.
- 37 P. H. Mazzocchi und M. P. Rao, *J. Agr. Food Chem.*, 20 (1972) 957.
- 38 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 257.
- 39 F. Geike, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 343.
- 40 G. H. Bourne (Herausgeber), *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Vol. III, Academic Press, New York, 2nd ed., 1971.