

daß sich mit Herrn Dr. Klever und dem von ihm geleiteten Teil der Redaktion eine intensive und harmonische Zusammenarbeit entwickelt hat, so daß die beiden Redaktionen, trotz getrennter Arbeitsstätten, ihre Aufgaben voll erfüllen konnten und erfüllen, obgleich die Arbeitsbelastung durch die starke Umfangserweiterung in der letzten Zeit ungewöhnlich groß geworden ist.

Zur Bearbeitung in wissenschaftlichen Fragen steht dem Herausgeber ein Beirat aus den Herren Brockmann (Göttingen), Franck (Berlin), Klemm (Münster), Langenbeck (Halle), Thilo (Berlin) und Winnacker (Frankfurt-Main-Höchst) zur Seite. Dieser hat 1950 in einer Sitzung in Berlin mit dem Herausgeber bzw. den Chefredakteuren die allgemeinen Richtlinien noch einmal durchgesprochen.

Für die allgemeinen Fragen der Herausgabe des Zentralblattes sind zuständig: 1.) Das auf Veranlassung der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen eingesetzte Kuratorium mit den Herren: Bayer (Leverkusen), Brockmann (Göttingen), Klemm (Münster) und Schmidt (Berlin). 2.) Der Wissenschaftliche Beirat der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, insbesondere die Herren Franck und Thilo (Berlin).

Seit dem Jahre 1950 hat das Chemische Zentralblatt seine alte Kraft wiedergewonnen dank der Initiative von Persönlichkeiten beider Teile Deutschlands, denen es gelang, die schwierige Aufgabe des Zusammenschmelzens zu Nutz und Frommen und Gedeihen des alten deutschen Kulturgutes durchzusetzen.

Es ist zu hoffen, daß die seit 1945 gemachten Anstrengungen nicht umsonst gewesen sind, und daß dieses in aller Welt geschätzte Werk nicht wirtschaftlichen Gesichtspunkten zum Opfer fällt. Eine deutsche Kulturarbeit und ein deutsches Kulturwerk überdauerte Generationen und zwei Weltkriege und war Vorbild für viele ähnliche Einrichtungen auf dem Gebiete der Dokumentation im In- und Ausland. Bestand nun nicht oft die bange Frage: wird dieses vorbildliche Werk in der Not der Zeit wie ein entlaubter Stamm neue Triebe als Zeuge deutscher Wertarbeit entfalten, oder wird es dem sic transit gloria mundi anheimfallen und damit nicht mehr der Gegenwart, sondern der Geschichte angehören? Es scheint die zuversichtliche Hoffnung berechtigt, daß das redliche Bemühen und die sorgfältige Arbeit aller an diesem Werk Beteiligten wieder zur endgültigen Anerkennung desselben führen wird.

Seit dem Jahre 1950 wird das Chemische Zentralblatt durch eine enge Zusammenarbeit des Akademie-Verlags und des Verlags Chemie herausgegeben im Auftrage der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen und der Gesellschaft Deutscher Chemiker, zu denen im Jahre 1953 noch die Chemische Gesellschaft in der Deutschen Demokratischen Republik hinzugetreten ist. Es ist dies ein Zeichen großen Verständnisses für die Bedeutung dieses von unseren Vätern übernommenen Dokumentationswerkes für die Wissenschaft.

Eingeg. am 20. November 1953 [A 607]

Zum Wirkungsmechanismus moderner synthetischer Insektizide

Von Prof. Dr. F. DUSPIVA, Heidelberg

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Obstbau

Sowohl im Stoffwechselgeschehen als auch im Nervensystem der Insekten konnten Wirkungsstellen von Insektiziden gefunden werden. Besonders eingehend werden die Wirkungsmechanismen der Phosphorhaltigen Verbindungen und die Chlorkohlenwasserstoffe behandelt. Anscheinend wird in einigen Fällen erst im Insektenkörper das Insektizid zur eigentlich toxischen Verbindung umgesetzt, doch sind auch Fälle beobachtet worden, in denen Insektizide in harmlosere Substanzen umgewandelt werden; in diesem Zusammenhang werden auch Resistenzfragen diskutiert.

Mit der Entdeckung der insektiziden Wirkung von p,p'-Dichlor-diphenyl-trichloräthan (DDT) vor ungefähr 10 Jahren¹⁾ wurde eine Entwicklung eingeleitet, die zu großen Erwartungen Anlaß gab. Dem DDT gesellten sich in schneller Folge weitere Stoffe zu, von denen hier nur γ -Hexachlorcyclohexan (γ -HCH) und die Insektizide aus der Reihe der organischen Phosphorsäure-Verbindungen eingehender betrachtet werden sollen. Aus der breiten Anwendung dieser Insektizide im Obst-, Wein- und Hopfenbau, auf den Rüben- und Kartoffelfeldern, in den Ställen zur Fliegenbekämpfung und auf den Fluren zur Abwehr krankheitsübertragender Insekten ergaben sich bald gewisse Grenzen in ihrer Wirksamkeit sowie Gefahren bei ihrer Anwendung²⁾, die die Notwendigkeit einer biochemischen Untersuchung ihrer Wirkungsweise nahelegten. Der praktische Gebrauch von Insektiziden führt zu außerordentlich komplexen Problemen. Bei der Anwendung von Insektiziden im Pflanzenschutz werden nicht weniger als 4 biologische Systeme betroffen: der Schädling, die Pflanze, die Biozönose (darunter auch die Honigbiene) und der Mensch.

Einen wesentlichen Anstoß zur Bearbeitung des Wirkungsmechanismus insektizider Stoffe ergab die überraschende Beobachtung, daß DDT schon bald nach dem Großeinsatz zur Fliegenabwehr nach anfänglich guter Wirkung versagte. Es ist heute so gut wie sicher, daß sich Fliegen an die regelmäßige Behandlung ihres Wohnraumes mit DDT und auch anderen Insektiziden anpassen können und eine Resistenz erwerben. DDT-resistente Stämme der Stubenfliege sind erstmalig aus Schweden und Dänemark bekannt geworden und sind heute besonders in Ländern mit einer gut geführten Landwirtschaft weit verbreitet^{3, 4, 5)}. In Korea wurde 1950 erstmalig auch ein Versagen von DDT bei der Bekämpfung der Kleiderlaus (*Pediculus humanus corporis*) beobachtet. Auch hierbei handelt es sich um eine echte Resistenz⁶⁾. Die Tatsache, daß Insekten nicht allein gegen DDT, sondern auch gegen andere Insektizide resistent werden können, berechtigt zu ernststen Sorgen, ob die anfangs so vielversprechende Entwicklung auch in Zukunft einen Erfolg verbürgt. Manche

¹⁾ P. Luger, H. Martin u. P. Muller, *Helv. chim. Acta* 27, 892 [1944].
²⁾ P. Munchberg, *Z. angew. Entomol.* 32, 317 [1951].

³⁾ R. Wiesmann, *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.* 20, (5), 484 [1947].

⁴⁾ R. Wiesmann, *Ergebn. d. Hygiene, Bakteriol., Immunittsforsch. exper. Therapie* 26, 46 [1949].

⁵⁾ H. A. V. Monro, *Anz. Schdlingskunde* 24, 130 [1951].

⁶⁾ G. W. Eddy, *J. econ. Entomol.* 45, 1034 [1952].

Insektenarten sind von Natur aus gegen gewisse Insektizide resistent. So ist bekannt, daß DDT gegen Heuschrecken praktisch wirkungslos ist⁷⁾. Im Obstbau fällt der deutliche Anstieg der Spinnmilbenpopulation als Folge einer DDT-Behandlung auf. Die Ursache ist in einem verwickelten Wechselspiel zahlreicher Faktoren zu suchen, die biochemischer, biologischer und ökologischer Natur sind⁸⁾. Die Praxis stellt die Forderung nach einer sicheren Wirksamkeit gegen Schadinsekten und geringen Toxizität gegen Menschen, Haustiere und Bienen.

Alle diese Fragen drängen nach einer vergleichend biochemischen Bearbeitung des Problems. Das weit verzweigte, z. T. noch sehr mangelhaft aufgeklärte Zusammenspiel der zahlreichen Faktoren sowie die bereits unabsehbare Literatur machen eine vollständige Behandlung der einschlägigen Fragen unmöglich. Es kann daher im folgenden nur versucht werden, einige der wesentlichsten Fragen zu formulieren und die wichtigsten Ergebnisse zu skizzieren, ohne dabei den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben.

1. Der Angriffspunkt der Insektizide im Insekt

Das Vergiftungsbild^{9, 10)} spricht gegen eine allgemeine Schädigung des Zellstoffwechsels. In die gleiche Richtung deutet eine Beobachtung von *Bodenstein*¹¹⁾, daß Imaginalscheiben aus *Drosophila*-Larven, die 20 h unter der Einwirkung von DDT gestanden haben, in unbehandelte Larven implantiert, normal weiterleben. Heute ist allerdings bekannt, daß die Larven der Dipteren (Zweiflügler) in besonders ausgiebiger Weise DDT zu entgiften vermögen.

Nach der Latenzphase, der Zeit, die der Wirkstoff braucht, um an den Wirkort vorzudringen, je nach Applikation, Wirkstoffmenge und Resistenz des Versuchstieres mindestens 10–15 min bis zu mehreren Stunden, setzt die Exzitationsphase ein. Die erste unmittelbar sichtbare Reaktion auf sämtliche Kontaktinsektizide ist eine Stimulation der spontanen Beweglichkeit. Sie äußert sich in einer zunehmenden Unruhe, vermehrten Putzbewegungen u. dgl. sowie in einer Neigung zum Fliegen. Die anschließende Phase der Koordinationsstörungen ist durch das Auftreten von Tremor, Spasmen und Lähmungserscheinungen charakterisiert. Laufstörungen treten nur bei schnellen Fluchtbewegungen, nicht bei langsamem Gang auf. Auch komplizierte Putzbewegungen sind noch möglich, verlaufen aber mit großem Bewegungsüberschuß. In späteren Stadien der Vergiftung werden die Symptome schwerer. Die Tiere fallen infolge von Koordinationsstörungen auf den Rücken; schließlich gelingt der Umkehrreflex nicht mehr.

Nach einer DDT-Vergiftung ist bei Stubenfliegen im Stadium der Rückenlage ein ununterbrochener Tremor an den Tarsen (Fußglieder), den Tibien (Unterschenkeln), am Abdomen (Hinterleib) und Rücken festzustellen. Die Flügelhaltung bleibt normal. Die Beine sind nicht verkrampft. Charakteristisch ist der Autotremor der Beine, der auch nach Abtrennung vom Körper weitergeht⁷⁾.

Bei der γ -HCH-Vergiftung fällt schon frühzeitig eine Störung in der Thorakalmuskulatur (Brust) auf, die zu einer abnormen Flügelhaltung führt. Die Flügel werden in der Ruhehaltung häufig ventral umgeklappt. Schwirrende Bewegungen in der Rückenlage sind häufig. Der Beintremor findet mit verkrampft an den Körper angezogenen Beinen statt. Ein Autotremor der Beine kommt nicht vor⁷⁾.

Bei der Parathion (E 605)-Vergiftung beobachtet man an den Stubenfliegen im Stadium der Rückenlage einen anhaltenden Beintremor mit gestreckten Beinen. Die Flügelhaltung ist nor-

mal, schwirrende Bewegungen kommen vor. Isolierte Extremitäten zeigen nur manchmal einen kurzen Autotremor⁷⁾.

Nach längerer Gifteinwirkung nehmen die Bewegungsreaktionen allmählich an Heftigkeit ab, schließlich erlischt die Bewegung. Spastische Kontraktionen, vor allem der Abdomalmuskulatur, beherrschen nun das Vergiftungsbild (adynamische Phase). Die auffallende Hyperaktivität und die Koordinationsstörungen in den frühen Phasen des Vergiftungsvorganges haben zu der weit verbreiteten Auffassung geführt, daß die Kontaktinsektizide „Nervengifte“ seien, d. h. ihr Angriffspunkt in das Nervensystem der Insekten verlegt werden muß.

Eine Vergiftung von Insekten durch Kontaktinsektizide äußert sich jedoch nicht nur in einer Störung des neuromuskulären Systems, sondern wirkt sich vor allem auch im Wasserhaushalt aus. Unbehandelte Insekten verlieren aus einer Wunde (Amputation eines Fühlerendgliedes) nahezu keine Hämolymphe. Im Anfangsstadium einer Vergiftung mit DDT oder E 605 tritt das Blut in Tropfen aus, was für eine Erhöhung des Hämolymphe-druckes spricht¹⁰⁾. In einem nur wenig späteren Vergiftungsstadium fließt kein Blut mehr aus. In der kurzen Zeit vom Ende der Latenzphase bis zum Anfang deutlicher neuromuskulärer Störungen hat sich eine bedeutende Verlagerung von Wasser aus der Hämolymphe über die Speicheldrüse und das Mitteldarmepithel in den Verdauungskanal hinein vollzogen¹²⁾. Bei Raupen von *Dendrolimus pini* L. sinkt während einer Parathion-Vergiftung der Wassergehalt des Blutes von 88 auf 56% ab¹³⁾. Blutfarbstoffe und Farbstoffträger werden hierbei angereichert, was für eine selektive Ausscheidung einzelner Bestandteile der Hämolymphe – des Wassers – spricht¹²⁾. Es erhebt sich die Frage, wo der primäre Angriffspunkt im Insekt liegt. *Fritsch*¹⁰⁾ hält die unter dem Einfluß der Insektizide auftretende spastische Kontraktion der Abdomalmuskulatur und den damit verbundenen stark erhöhten Hämolymphe-druck für die Ursache der Flüssigkeitsverlagerung, die demnach als eine Art von hemmungsloser Diurese aufzufassen wäre. *Jochum*¹³⁾ betrachtet dagegen den Schwund an Körperflüssigkeit als die primäre Folge der Vergiftung: Die abnormen nervösen Erscheinungen und der Tod würden durch den Schwund an Blütflüssigkeit und nicht durch eine direkte Einwirkung der Gifte auf die Nervenzellen verursacht. Es ist erwiesen, daß Kontaktinsektizide auch einen direkten Einfluß auf das neuromuskuläre System ausüben können. An einem isolierten Ganglien-Muskel-Präparat vom Gelbrandkäfer (*Dytiscus marginalis*) lassen sich vom Ganglion aus mit DDT, γ -HCH und E 605 Bewegungsvorgänge in der zugehörigen Muskulatur auslösen^{10, 13, 14)}. Nach einer DDT-Behandlung des Ganglion (Schwellenwert 10^{-6}) resultieren anhaltende frequente Beugungen und Streckungen, nach einer E 605-Gabe (Schwellenwert 10^{-8}) tritt zuerst eine motorische Erregung auf vom normalen Bewegungstyp (Atmungs-bewegung), die nach und nach in einen Dauerspasmus übergeht. Die γ -HCH-Wirkung ist anfangs der des DDT sehr ähnlich, geht aber bald in einen Bewegungstyp über, der aus Spasmen und Einzelzuckungen gemischt ist. Nach der Resektion des Ganglions folgt in allen Fällen ein sofortiger Stillstand der Abdominalbewegungen und ein Tonusverlust. Wird in das Abdomen solcher stillgelegter Präparate E 605 oder γ -HCH injiziert, so tritt keine neuerliche Erregung oder Kontraktur ein, aber DDT erzeugt ab $2 \cdot 10^{-6}$ im Abdominalmuskel erneut rhythmische Kontraktionen, oft auf erhöhter Tonusbasis¹⁰⁾. Es dürfte heute keinem Zweifel mehr

⁷⁾ R. Wiesmann, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 58, 161 [1951].

⁸⁾ D. W. Davis, J. econom. Entomol. 45, 1011 [1952].

⁹⁾ H. H. Velbinger, Pharmazie 4, 165 [1949].

¹⁰⁾ H. Fritsch, Biol. Zbl. 77, 512 [1952].

¹¹⁾ D. Bodenstein, Biol. Bull. 90, 148 [1946].

¹²⁾ Fr. Jochum, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 60, 354 [1953].

¹³⁾ H. Fritsch u. H. Krupp, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 214, 227 [1952].

¹⁴⁾ H. Krupp, L. Lendle u. K. Stapenhorst, ebenda 215, 443 [1952].

unterliegen, daß allein dem DDT neben einem zentralen auch ein peripherer Angriff zukommt. Hierfür spricht vor allem auch der Autotremor des Fliegenbeines, der an einem isolierten Bein nach Aufbringen einer DDT-Lösung hervorgerufen werden kann^{4, 7, 15, 16, 17, 18}). Auch im ganglienlosen Abdomen von *Drosophila*-Imagines bewirkt eine Injektion von DDT stundenlang anhaltende Konvulsionen¹¹). Das Zustandekommen eines Beintremors mit geringen DDT-Mengen erfordert hingegen eine intakte anatomische Struktur, die aus der lateralen Hälfte des Bauchganglions mit den zugehörigen Beinnerven und den übrigen peripheren Strukturen, wie Sinnesorganen, sensiblen Nerven, motorischen Nerven und Nervendplatten besteht. Eine Resektion des Ganglions, eine Durchschneidung der Beinnerven oder eine synaptische Blockierung des Ganglions mittels Nicotin sistiert den Beintremor sofort^{19, 20}). Es steht also fest, daß Kontaktinsektizide direkt am Nervengewebe angreifen können. Ob sie aber außerdem die Permeabilität sekretorischer Epithelien beeinflussen und ob beiden Vorgängen derselbe Mechanismus zugrunde liegt oder ob der mit der Vergiftung verbundene Flüssigkeitsverlust eine Folge nervös induzierter spastischer Kontraktionen der Abdominalmuskulatur ist, läßt sich noch nicht entscheiden. Nach einer Parathion-Gabe gehen parallel mit dem Flüssigkeitsverlust mancherlei andere Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes vor sich. So steigt der p_H -Wert des Blutes von Seidenraupen von 6,8 auf 7,11, der p_H -Wert des Darmsaftes fällt dagegen von 9,7 auf 7,6²¹). Nach Beobachtungen von Sternburg und Kearns²¹) häufen sich im Blut von DDT-vergifteten Schaben toxische Produkte parallel mit dem Auftreten der charakteristischen motorischen Störungen an. Toxische Blutproben erzeugen am isolierten Nervenstrang der Schabe elektrophysiologische Reaktionen (Erhöhung der Spontanaktivität), die nicht auf den minimalen Gehalt an DDT zurückgehen. Ähnlich wie die Vergiftungssymptome der Schabe schwinden, wenn die Tiere von 15° auf 35 °C gebracht werden, so verschwindet bei einer Temperaturerhöhung auch das Toxin aus dem Blut.

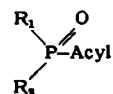
2. Die Wirkung von Insektiziden auf die Enzyme des Stoffwechsels

Die kleinen Wirkstoffmengen, die zum Tode des Insekts führen und sich in der Größenordnung von 1 bis wenigen mg/kg Körpergewicht bewegen²²), legen die Vermutung nahe, daß die Wirkung der Insektizide in letzter Linie auf die Blockade oder teilweise Inaktivierung von Enzymen zurückgeht, die in die Kette der Lebensprozesse eingeschaltet sind, die bei der Vergiftung gestört werden.

a) Die Gruppe der organischen Phosphorsäure-Verbindungen

Nach Schrader²³) zeigen Phosphorsäure-Verbindungen eine kontaktinsektizide Wirkung, „wenn am Zentralatom Phosphor neben doppelt gebundenem Sauerstoff 2 gleiche oder verschiedene Substituenten (Alkoxy-Gruppen oder der Rest einer sekundären Base) vorhanden sind und

außerdem am Zentralatom Phosphor noch eine saure Gruppe anorganischer oder organischer Herkunft gefunden wird“²³).



Werden bei der Abwandlung der Acylgruppe Reste substituiert, so entstehen Derivate der Pyrophosphorsäure.

In diese Gruppe zählen die in Deutschland verwendeten Pflanzenschutzmittel „E 605 forte“, Bayer (Wirkstoff: Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat), vielseitig verwendbar; „Potasan G flüssig“, Bayer (Wirkstoff: 4-Methyl-7-oxycumarinester der Diäthyl-thiophosphorsäure), geeignet zur Kartoffelkäferbekämpfung, und das systemische Insektizid „Systox“, Bayer (Wirkstoff: Diäthyl-thiophosphorsäureester des β -Oxy-äthyl-thioäthyläthers). In angelsächsischen Ländern findet außerdem das ebenfalls von Schrader entwickelte systemische Insektizid „Schradan“ (Pestox III), Pest-Control Ltd. (Wirkstoff: Octamethyl-tetra-pyrophosphorsäureamid, OMPA) ausgedehnte Verwendung.

E. Gross²⁴) hat schon 1939 erkannt, daß Pyrophosphorsäure-äthylester (TEPP) ein potenter Hemmstoff des Enzyms Cholinesterase ist. 1946 gelang Mazur und Bodansky²⁵) der Nachweis der hemmenden Wirkung von Diisopropyl-fluorophosphat (DFP) und ein Jahr später zeigten DuBois und Mangun²⁶), daß die Insektizide Tetraäthyl-pyrophosphat (TEPP) und Hexaäthyl-tetra-phosphat (HETP, Bladan) noch in hoher Verdünnung die Cholinesterase in Wirbeltiergewebe blockieren. Bald darauf wurde von DuBois, Doull, Salerno und Coon²⁷) die gleiche Wirkung dem Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (E 605, Parathion) zugeschrieben. Ungefähr gleichzeitig wiesen Chadwick und Hill²⁸) nach, daß DFP, HETP und Physostigmin die Cholinesterase im Bauchmark der amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*) hemmen. Die toxische Wirkung dieser Verbindungen gegen das Insekt erwies sich weitgehend als eine Funktion ihrer Anticholin-esterase-Aktivität. Somit schien der Wirkungsmechanismus dieser Gruppe von Insektiziden aufgeklärt zu sein.

Im Gewebe von Wirbeltieren kommt neben Lipasen und Esterasen ein von Abderhalden und Paffrath²⁹) beschriebenes Enzym vor, das Cholinester besonders leicht spaltet. Mendel und Rudney³⁰) unterscheiden zwischen einer echten Cholinesterase (Acetylcholinesterase), die neben Acetylcholin auch Acetyl- β -methylcholin spaltet, und einer Pseudocholinesterase (Serumcholinesterase), die neben Acetylcholin Benzoylcholin abbaut. Im Blut enthalten die Erythrocyten den ersten, das Serum den anderen Typ dieses Enzyms. In den Ganglien und peripheren Nervenfasern sind beide Typen des Enzyms vorhanden, aber die echte Cholinesterase überwiegt weit aus^{31, 32}). Nach Augustinsson^{33, 34, 35}) eignet sich die Aktivitäts-Substratkonzentrations-Beziehung zur Charakterisierung der beiden Cholinesterase-Typen. Die echte

¹⁵) L. Emmel u. M. Kruepe, Z. Naturforsch. 1, 691 [1946].

¹⁶) R. Wiesmann u. P. Fenjves, Mitt. schweiz. entomol. Ges. 19, 179 [1944].

¹⁷) J. F. Yeager u. S. G. Munson, Science [Washington] 102, 305 [1945].

¹⁸) P. N. Witt, Z. Naturforsch. 2b, 361 [1947].

¹⁹) J. M. Tobias u. J. J. Kollros, Biol. Bull. 91, 247 [1946].

²⁰) J. M. Tobias, J. J. Kollros u. J. Savit, J. cellular. comparat. Physiol. 28, 159 [1946].

²¹) J. Sternburg u. C. W. Kearns, Science [Washington] 116, 144 [1952].

²²) D. Dresden u. B. J. Krijgsman, Bull. entomol. Res. 38, 575 [1948].

²³) G. Schrader, diese Ztschr. 62, 471 [1950]; Z. angew. Entomol. 33, 1 [1951]; „Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen, 2. Aufl. Monogr. zu „Angew. Chem.“ u. „Chemie-Ingenieur-Technik“ Nr. 62 [1952].

²⁴) Zit. bei G. Schrader²³).

²⁵) A. Mazur u. O. Bodansky, J. biol. Chemistry 163, 261 [1946].

²⁶) K. P. DuBois u. G. H. Mangun, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 64, 137 [1947].

²⁷) K. P. DuBois, J. Doull, P. R. Salerno u. J. M. Coon, J. Pharmacol. exp. Therap. 95, 79 [1949].

²⁸) L. E. Chadwick u. D. L. Hill, J. Neurophysiol. 10, 235 [1947].

²⁹) E. Abderhalden u. H. Paffrath, Fermentforsch. 8, 299 [1925].

³⁰) B. Mendel u. H. Rudney, Biochemic. J. 37, 59 [1943].

³¹) D. Nachmansohn, Bull. Johns Hopkins Hospital 83, 463 [1948].

³²) M. G. Ord u. R. H. S. Thompson, Biochemic. J. 46, 346 [1950].

³³) K. B. Augustinsson, Acta Physiol. Scand. 15, Suppl. 52, 1 [1948].

³⁴) K. B. Augustinsson u. D. Nachmansohn, Science [New York] 110, 98 [1949].

³⁵) K. B. Augustinsson, Arch. Biochemistry 23, 111 [1949].

Cholinesterase gibt eine glockenförmige P_s -Kurve, d. h. ein Substratüberschuß über eine optimale Konzentration hemmt die Aktivität des Enzyms. Die Pseudocholinesterase spaltet dagegen mit steigender Substratkonzentration besser. Auch bei den Insekten sind Cholinesterasen allgemein anzutreffen. Das aus den Köpfen gewonnene Enzym spaltet Acetylcholin besonders leicht und wird ähnlich wie bei Wirbeltieren durch einen Substratüberschuß gehemmt. Bezüglich der Spaltung von Acetyl- β -methylcholin bestehen aber besondere Verhältnisse, da die Spaltbarkeit dieses Substrates bei verschiedenen Insektenarten recht unterschiedlich ist. Bienenhirn-Cholinesterase hydrolysiert diesen Stoff gut, aber nach Art einer unspezifischen Cholinesterase, während die Spaltung durch Fliegenhirn-Cholinesterase nur sehr schwach ist^{36, 37}. Auch bei der Diptere (*Dacus dorsalis*) wird Acetyl- β -methylcholin schlecht gespalten, aber nach Art einer echten Cholinesterase³⁸. Benzoylcholin wird bei allen bisher untersuchten Arten schlecht hydrolysiert. Die Cholinesterase der Insekten ist mit der von Wirbeltieren nicht in allen Eigenschaften identisch und bedarf noch eingehender Bearbeitung.

Cholinesterasen werden durch eine Reihe von Stoffen spezifisch gehemmt. Dazu gehören: 1. Quaternäre Ammoniumbasen (Prostigmin), 2. Urethane (Prostigmin, Physostigmin, Dimetan, Pyrolan u. a.), 3. Alkylfluorophosphat (DFP) 4. Alkylpyro- und -polyphosphate (TEPP, HETP) sowie eine Reihe organischer Phosphor-Verbindungen (E 600, E 605, E 838 u. a.). Den Mechanismus der Hemmung und Enthemmung durch organische Phosphorsäure-Präparate hat *Wilson*³⁹ studiert. Wahrscheinlich wird dabei eine basische Gruppe dieses Enzyms phosphoryliert. In diesem Zustand entfaltet aber das Enzym noch eine Reaktionsfähigkeit mit nucleophilen Gruppen (Cholin, Hydroxylamin) und kann dadurch reaktiviert werden. Diese Reaktion kann möglicherweise eine therapeutische Bedeutung bei Vergiftungsfällen mit Pflanzenschutzmitteln auf Anticholinesterase-Basis erlangen. Den Hemmungsmechanismus der Urethane haben *Goldstein* und *Hamlisch*⁴⁰ untersucht. Dem Pflanzenreich geht ein neuromuskuläres System ab. Im Zusammenhang damit fehlt auch eine typische Cholinesterase. An ihre Stelle tritt eine Acetylsterase^{41, 42}, über deren physiologische Funktion gegenwärtig noch wenig bekannt ist.

α) Toxizität und Inhibitorwirkung.

Während in den älteren Arbeiten eine enge Korrelation zwischen insektizider Wirkung und Grad der Cholinesterase-Hemmung betont wird, häufen sich in jüngerer Zeit Befunde an, die dieser Auffassung widersprechen. Schon bei *Chadwick* und *Hill*²⁸) fällt auf, daß nach parentaler Applikation an Insekten die Übereinstimmung zwischen Mortalität und Anticholinesterasewirkung bei DFP am besten, bei Physostigmin und HETP weniger gut ist. Bei Verwendung von technischem Parathion ist stets eine recht gute Übereinstimmung zu bekommen. *Metcalf* und *March*⁴³) haben außer Parathion weitere 32 ähnliche Verbindungen geprüft und im allgemeinen eine gute Korrelation zwischen der DL_{50} nach örtlicher Applikation des

Wirkstoffes und der Konzentration desselben feststellen können, die zu einer 50proz. Hemmung der Cholinesterase im Homogenat der Köpfe von Fliegen und Bienen führt. *Frawley*^{44, 45}) hat eine Methode zur Bestimmung von insektizid wirksamen organischen Phosphorsäure-Verbindungen in γ -Quantitäten ausgearbeitet, die auf der Messung der Cholinesterase-Hemmung bei Fliegen beruht. *Lord* und *Potter*⁴⁶) haben zwar nicht die Cholinesterase, sondern eine ubiquäre Esterase (Substrat: Äthylbutyrat und o-Nitrophenylacetat) untersucht, haben aber erstmalig ganz klar erkannt, daß die Güte einer Verbindung als Insektizid und ihre Wirksamkeit als Antiesterase sogar in einem umgekehrten Verhältnis stehen können. So erweist sich TEPP als ein viel stärkerer Fermentinhibitor als E 605 und ist unter gewissen Umständen auch toxischer als E 605. Eine Eigenart dieser Verbindung ist ihre geringe Stabilität in wässriger Lösung. Die Hydrolyse des Esters setzt so schnell ein, daß 2 h später nur noch die Hälfte der Anfangskonzentration vorhanden ist. Infolge der kurzen Wirkungsdauer findet dieser Ester in Deutschland als Pflanzenschutzmittel keine Anwendung, ist aber in USA zur Abwehr von Blattläusen eingeführt, wobei man von seiner hohen Anfangstoxizität und baldiger Inaktivierung bewußten Gebrauch macht. Wird TEPP in hoher Konzentration angewandt, so verläuft die Giftwirkung so rasch, daß die während des Eindringens bis zum Wirkort in der Blattlaus stattfindende Hydrolyse von untergeordneter Bedeutung ist. Eine Herabsetzung der Konzentration unter einen gewissen Schwellenwert bewirkt eine Zunahme der Reaktionszeit. In diesem Falle macht sich die Instabilität von TEPP geltend, während das sehr viel stabilere Parathion auch in noch schwächeren Konzentrationen toxisch bleibt. Darin liegt sein Vorzug als Insektizid.

Es steht heute fest, daß allein die Kenntnis der Aktivität einer organischen Phosphorsäure-Verbindung als Inhibitor der Cholinesterase „in vitro“ noch keine Aussagen über die Eignung als Insektizid zuläßt. Ein derartig einfacher Zusammenhang besteht nicht. Manche Verbindungen dieser Gruppe haben in reiner Form eine kaum nennenswerte Wirksamkeit als Antiesterase „in vitro“, können aber trotzdem ausgezeichnete insektizide Eigenschaften besitzen. Aber in jedem der bisher untersuchten Fälle hat sich gezeigt, daß die Cholinesterase im Nervensystem des Insektes stets weitgehend inaktiviert wird, wenn irgendeine organische Phosphorsäure-Verbindung toxische Wirkungen erzeugt.

β . Artspezifität der Inhibitorwirkung.

Metcalf und *March*³⁶) gelang der Nachweis, daß Diisopropyl-p-nitrophenylthiophosphat bei lokaler Applikation für Honigbienen weit weniger giftig ist als für Stubenfliegen. In Übereinstimmung damit hemmt dieser Wirkstoff die Fliegenhirn-Cholinesterase „in vitro“ weit stärker als das Bienenhirn-Enzym. Der gleiche Wirkstoff hat auch gegen die Cholinesterase aus Mäusehirn eine nur sehr schwache Wirksamkeit. Die ähnlich aufgebauten Wirkstoffe Di-äthyl-p-nitrophenylthiophosphat (E 605), Di-äthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600, Mintacol) und Di-n-propyl-p-nitrophenylthiophosphat hemmen die Cholinesterase bei allen 3 Tierarten gleich stark. Tetraisopropyl-di-thiopyrophosphat und Tetra-isopropylpyrophosphat beeinflussen in ähnlicher Weise das Fliegenenzym wesentlich stärker als das Bienen- oder Mäuse-

³⁶) R. L. Metcalf u. R. B. March, J. econ. Entomol. 43, 670 [1950].

³⁷) F. H. Babers u. J. J. Pratt, Physiol. Zool. 23, 58 [1950]; 24, 127 [1951].

³⁸) C. C. Roan u. Sh. Maeda, J. econ. Entomol. 46, 775 [1953].

³⁹) I. B. Wilson, Fed. Proc. 10, 271 [1951]; J. biol. Chemistry 190, 111 [1951].

⁴⁰) A. Goldstein u. R. E. Hamlisch, Arch. Biochem. Biophys. 35, 12 [1952].

⁴¹) E. F. Jansen, M. D. F. Nutting u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 170, 417 [1947]; 175, 975 [1948].

⁴²) E. F. Jansen, R. Jang u. L. R. Donnell, Arch. Biochemistry 15, 415 [1947].

⁴³) R. L. Metcalf u. R. B. March, J. econ. Entomol. 42, 721 [1949].

⁴⁴) J. P. Frawley, E. C. Hagan u. O. G. Fitzhugh, J. Pharmacol. exp. Therap. 105, 156 [1952].

⁴⁵) J. P. Frawley, E. P. Laug u. O. G. Fitzhugh, J. Assoc. Offic. Agric. Chemists 35, 745 [1952].

⁴⁶) K. A. Lord u. C. Potter, Ann. appl. Biol. 38, 495 [1951].

enzym, während Tetra-n-propyl-di-thiopyrophosphat und Di-isopropyl-fluorophosphat das Enzym bei allen drei Tierarten gleich stark hemmen. Diesem Effekt dürfte eine sterische Hinderung bei der Bildung des Enzym-Substratkomplexes zugrunde liegen, die mit einer Anhäufung von Isopropoxy-Gruppen um das zentrale P-Atom des Wirkstoffes einsetzt, durch eine Kombination desselben mit Thiophosphoryl-Gruppen gesteigert wird und mit einer Kombination von Phenoxy-, Isopropoxy- und Thiophosphoryl-Gruppen ein Maximum erreicht. Das quantitative Ausmaß dieser sterischen Behinderung ist offensichtlich in hohem Grade artspezifisch. Der Fall steht nicht einzeln da. *Beard*⁴⁷⁾ demonstrierte in einfachen Versuchen, wie ausgeprägt und verbreitet artliche Unterschiede gegenüber Enzyminhibitoren nicht nur bei der Cholinesterase sondern auch bei anderen Fermenten sind. Eine artspezifische Hemmwirkung gegenüber der Cholinesterase zeigen auch verschiedene Carbaminsäureester⁴⁸⁾. Über eine ausgeprägt selektive Wirkung der Urethane, Dimetan und Pyrolan, beides Anticholinesterasen, berichten *Wiesmann, Gasser und Grob*⁴⁸⁾ sowie *Gasser, Geigy und Basle*⁴⁹⁾.

Diesen Erscheinungen liegt wohl die fundamentale Tatsache zugrunde, daß sich Artunterschiede nicht nur in der groben Morphologie der Tiere, sondern auch in der Feinstruktur der Eiweißkörper äußern, was besonders dann klar zutage tritt, wenn Eiweißkörper enzymatische Eigenschaften haben. Der Einfluß von Aktivator und Inhibitoren auf den Verlauf der Zeitumsatzkurve dürfte ein feines Maß für subtile Unterschiede in der Proteinstruktur sein.

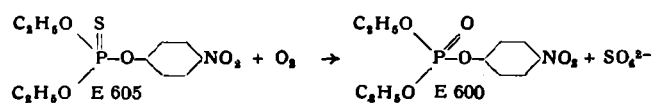
Die Erfahrungen wurden auch praktisch auszuwerten versucht. Der geringeren Toxizität für den Säureorganismus wegen wird im Ausland p-Nitrophenoxy-äthoxy-thiophosphoryl (EPN) für Pflanzenschutz Zwecke verwendet. Einen beachtenswerten Erfolg in dieser Richtung stellt das S-(1,2-Di-carbäthoxyäthyl)-0,0-dimethyl-dithiophosphat (Malathion*) dar, welches gegen verschiedene Insektarten zwar nur ein Viertel so wirksam ist wie E 605, dafür aber nur ein Hundertstel des Giftwertes von E 605 gegen Säugetiere (Mäuse) aufweist⁵¹⁾. Weitere organische Phosphorverbindungen mit herabgesetzter Wirbeltiertoxizität sind Chlorthion (0,0-Dimethyl-0-(3-chlor-4-nitrophenyl)-thiophosphat) und Diazinon (Thiophosphorsäure-(2-isopropyl-4-methylpyrimidyl-6)-diäthylester). Der von *Metcalfe* und *March*⁵²⁾ geprüfte Di-isopropyl-Ester, der die Bienen-Cholinesterase „in vitro“ nur gering hemmt, ist zwar in Staubform auf Blüten aufgebracht für Honigbienen erheblich weniger toxisch als Parathion-Staub, aber keineswegs völlig ungefährlich⁵⁰⁾.

γ) Enzymatische Umwandlung einer unwirksamen Vorstufe in eine potente Anticholinesterase.

In den ersten Arbeiten über die Wirkungsweise von Parathion (E 605) bei Säugern und Insekten wurde nicht nur über eine starke Anticholinesterase-Wirkung „in vivo“, sondern auch über eine gute Wirkung „in vitro“ berichtet^{26, 48, 52, 53, 54)}. Aber *Diggle* und *Gage*⁵⁵⁾ zeigten, daß eine hochgereinigte Probe von Parathion die Rattenhirncholinesterase „in vitro“ nur schwach hemmt und daß

die älteren Befunde mit Präparaten des Wirkstoffes erhoben wurden, die durch Spuren von Isomeren verunreinigt waren. Isomeren bilden sich schon beim Erhitzen von Parathion während der Destillation, durch Einwirkung von UV-Licht, selbst schon bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur und sind in technischen Präparaten stets vorhanden. Das S-Äthyl- sowie das S-Methyl-Isomere sind aber „in vitro“ ebenso starke Inhibitoren der Cholinesterase wie das Sauerstoff-Analogon von Parathion (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat, Paraxon, E 600) und 10³ bis 10⁴ mal so wirksam als das gereinigte Thiophosphat. Die Ergebnisse der Autoren wurden von *Metcalfe* und *March*⁵⁶⁾ in vollem Umfang bestätigt. Nach *Myers* u. a.⁵⁷⁾ hemmt Paraxon (E 600) sowohl „in vivo“ als auch „in vitro“ die echte Cholinesterase des Gehirns stärker als die Aliesterase, während das S-Äthyl-Isomer von Parathion beide Enzymarten gleich stark beeinflusst. Parathion entfaltet nach parenteraler Darbietung „in vivo“ die gleiche Wirkung auf die verschiedenen Esterasen wie Paraxon. Über die Toxizität der Isomeren von Parathion liegen bereits mehrere Untersuchungen vor. An Insekten als Fraß- oder Kontaktgift verabreicht, sind sie stets bedeutend weniger wirksam als reines Parathion^{53, 58)}, ebenso auch bei subkutaner oder oraler Gabe an Säuger^{59, 60)}. Aber intravenös geboten sind die Isomeren deutlich toxischer als der Thiophosphorsäureester^{59, 60)}. Die Ursache für diese Abweichungen liegt in der bedeutend gesteigerten Empfindlichkeit der Isomeren gegen eine Hydrolyse, die ihre Wirksamkeit vernichtet. Malathion und EPN erleiden eine ähnliche Isomerisation⁵⁶⁾.

Da aber Parathion in vivo eine progressive Hemmung der Cholinesterase im Nervensystem der Insekten und auch bei Säugetieren entfaltet und dieser Effekt auch mit gereinigtem Parathion gelingt, so liegt die Erklärung nahe, daß in vivo eine enzymatische Umwandlung von Parathion in einen potenten Cholinesterase-Inhibitor erfolgt nach folgender Gleichung⁵⁴⁾:



Eine solche Umwandlung läuft mit Salpetersäure schon in der Kälte ab⁶¹⁾. Für eine Umwandlung im Insekt spricht die Beobachtung von *Metcalfe* und *March*⁴⁹⁾, daß bei gleicher Dosierung zur Erzielung eines bestimmten Intoxikationszustandes bei Fliegen mit Parathion eine 3-5fach längere Zeit notwendig ist als mit Paraxon. *Chamberlain* und *Hoskins*⁶²⁾ versuchten diese Transformation bei der amerikanischen Schabe nachzuweisen und erzielten tatsächlich eine starke Aktivitätsminderung der Cholinesterase des Bauchmarks, wenn sie dieses mit Parathion inkubierten. Keinen Beweis für eine Umwandlung ergab der Versuch, ein Inkubat von Parathion mit Hämolymphe, Muskulatur, Fettkörper, Malpighischen Schläuchen (bestimmte Darmabschnitte) oder Epidermis zur Prüfung seiner Inhibitorwirkung mit einer aktiven Cholinesterase aus Bauchmark „in vitro“ zu versetzen: Die Hemmung war nicht stärker als mit reinem Parathion allein. *Diggle* und *Gage*⁵⁵⁾ fanden die Mäuseleber zu einer Umwandlung von E 605 in E 600 fähig. Die Leber ist aber nicht der

⁴⁷⁾ R. L. Beard, J. econ. Entomol. 44, 469 [1951].

⁴⁸⁾ R. Wiesmann, R. Gasser u. H. Grob, Experientia 7, 117 [1951].

⁴⁹⁾ R. Gasser, J. R. Geigy u. S. A. Basle, Vortrag Intern. Entomol. Congress, Amsterdam, August 1951.

⁵⁰⁾ Neuer Name für Malathion (J. econ. Entomol. 46, 797 [1953]).

⁵¹⁾ L. D. Anderson u. T. O. Tuft, J. econ. Entomol. 45, 466 [1952].

⁵²⁾ A. G. Johnson, H. J. Fletcher u. K. G. Nolan, ebenda 45, 279 [1952].

⁵³⁾ W. N. Aldridge, Biochemic. J. 46, 451 [1950].

⁵⁴⁾ D. Grob, W. J. Garlick u. A. M. Harvey, Bull. Johns Hopkins Hospital 87, 106 [1950].

⁵⁵⁾ D. Grob, ebenda 87, 95 [1950].

⁵⁶⁾ W. M. Diggle u. J. C. Gage, Nature [London] 168, 998 [1951]; Biochemic. J. 49, 491 [1951].

⁵⁷⁾ R. L. Metcalfe u. R. B. March, J. econ. Entomol. 46, 288 [1953].

⁵⁸⁾ D. K. Myers, B. Mendel, H. R. Gersmann u. J. A. A. Ketelaar, Nature [London] 170, 805 [1952].

⁵⁹⁾ H. Martin, Ann. appl. Biol. 36, 153 [1949].

⁶⁰⁾ G. Hecht u. W. Wirth, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 211, 264 [1950].

⁶¹⁾ W. N. Aldridge u. J. M. Barnes, Nature [London] 169, 345 [1952].

⁶²⁾ P. A. Giang u. S. A. Hall, Analytic. Chem. 23, 1830 [1951].

⁶³⁾ W. F. Chamberlain u. W. M. Hoskins, J. econ. Entomol. 44, 177 [1951].

einzigste Ort, an dem der Umsatz möglich ist, da hepatektomierte Tiere gegen Parathion nicht minder empfindlich sind. In einer schönen Arbeit haben Metcalf und March⁶³⁾ gezeigt, daß die Mäuseleber und mehrere Gewebe von *Periplaneta americana* zu einer Umwandlung von Parathion in eine toxische Anti-Cholinesterase fähig sind, die „in vitro“ die Cholinesterase in Homogenaten von Fliegenköpfen hemmt. Diese Umwandlung geht „in vitro“ unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von Leberschnitten oder Gewebestücken der Schabe vor sich, wird aber durch Erhitzung, Homogenisierung der Gewebe und in Gegenwart von Cyanid, Azid, Selenit, Jodacetat, Hydroxylamin sowie Chlorpikrin blockiert. Die Umwandlungsgeschwindigkeit erreicht bei der Schabe zwischen p_H 8 und 9 ein Maximum. Die höchste Aktivität entfaltet der Vorderdarm, eine geringere die Malpighischen Schläuche, Mitteldarm, Nervenstrang, Enddarm und Fettkörper. Zur Ermittlung der Natur des Umwandlungsproduktes erwies sich die Papierchromatographie sehr geeignet. Ätherextrakte aus Ansätzen von Parathion bzw. des Methylanalogs mit Schabendarm ergaben auf dem Papier Flecke, die im R_f-Wert mit den entsprechenden der Sauerstoff-Analogen Paroxon (E 600) bzw. Methyl-paroxon übereinstimmen. Es dürfte mithin also erwiesen sein, daß der Vergiftung mit Parathion und verwandten Thiophosphaten eine enzymatische Reaktion zugrunde liegt, die den Umsatz dieser Verbindungen zu den entsprechenden Sauerstoff-Analogen bewirkt, welche potente Cholinesterase-Inhibitoren sind. Ob der Angriff der Antiesterasen am zentralen Nervensystem oder schon bereits am Darm die entscheidenden physiologischen Störungen hervorruft, die zum Tode führen, läßt sich noch nicht sicher entscheiden.

Octamethyl-tetrapyrophosphorsäure-amid (Pestox III, OMPA, Schradan) ist als systemisches Insektizid bekannt. Es ist befähigt, in der Pflanze durch die Cutikula der Blätter und Wurzel einzudringen und mit dem Saftstrom zu wandern. Es gilt auch als selektives Insektizid, da es hauptsächlich saugende Arthropoden (Hemipteren, Spinnmilben) erfaßt^{64, 65, 66, 67)}. „In vitro“ verhält sich diese Verbindung wie eine sehr schwache Anticholinesterase^{43, 65, 66, 67)}. Sie entfaltet bei Säugetieren auf die Haut gebracht, subkutan oder oral geboten, eine Millionen mal höhere Toxizität als man auf Grund ihrer Aktivität als Anticholinesterase erwarten würde. Mit OMPA vergiftete Blattläuse oder Feuerwanzen (*Pyrrhocris apterus*) weisen einen hochgradigen Aktivitätsverlust der Cholinesterase im Zentralnervensystem auf. Die Vergiftungssymptome erinnern an die Wirkung einer Anticholinesterase⁶⁷⁾. Nach einer Verabfolgung von OMPA treten beim Hund Erbrechen, Salivation (Speichelfluß), fibrilläre Zuckungen, Tremor und Muskelschwäche auf. Es fehlen aber Symptome für einen Angriff am Zentralnervensystem, wie Konvulsionen, Depressionen und Desorientierung. Nach einer letalen Dosis findet man die Cholinesterase gehemmt, die Aktivität des Enzyms ist aber im Gehirn nur zu 7%, bei peripheren Organen jedoch zu 90% blockiert⁶⁸⁾.

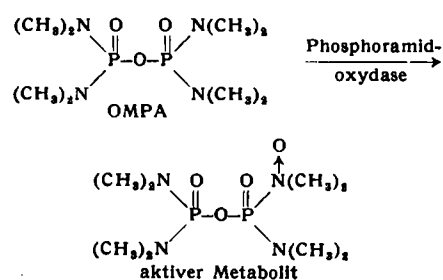
Alle diese Beobachtungen sprechen für eine enzymatische Verwandlung von OMPA in eine hochtoxische Verbindung. Gardiner und Kilby⁶⁹⁾ konnten direkt

zeigen, daß OMPA in den Blutkreislauf von Säugetieren eingeführt zur Bildung einer Inhibitoraktivität führt, die den verabfolgten Wirkstoff um das 5000fache übertrifft. Die Umwandlung in den aktiven Inhibitor tritt hierbei in der Leber ein, wie an hepatektomierten Ratten⁶⁹⁾, an solchen mit Leberschaden durch CCl₄-Gaben⁷⁰⁾ und durch die Prüfung der Fähigkeit von Gewebeschnitten zur Umwandlung von OMPA in den Inhibitor „in vitro“⁶⁸⁾ gezeigt werden konnte. Das aktive Umwandlungsprodukt ist Chloroform-löslich, dialysabel und instabil; es inaktiviert außer Cholinesterase auch die Esteraseaktivität von Chymotrypsin⁷¹⁾ in nichtkompetitiver und irreversibler Weise⁷²⁾. Das Enzym wird hierbei phosphoryliert. Casida und Stahmann⁷³⁾ klärten das Umwandlungsprodukt als das Amidoxyd von OMPA auf. Diese Verbindung ist ein ebenso wirksamer Inhibitor von Cholinesterase und Chymotrypsin wie DFP oder TEPP.

Hartley u. a.^{74, 75)} studierten den Abbau von OMPA in der Pflanze und haben auf eine biologische Oxydation der Methyl-Gruppe, eines Amid-N oder auf die Bildung eines Oxymethyl-Derivates geschlossen. Casida und Mitarb.^{73, 76)} fanden das pflanzliche Umwandlungsprodukt mit dem tierischen hinsichtlich Formaldehyd-Bildung, Verhalten bei der Verteilung auf verschiedene Lösungsmittel, Stabilität und Wirksamkeit als Anticholinesterase übereinstimmend. Mit der Bildung des Metaboliten aus OMPA hängt auch die Phytotoxizität von Schradan zusammen und dürfte auf der Hemmung von Phosphatase^{77, 78, 79, 80)} oder eines anderen für die Pflanze lebenswichtigen Enzyms beruhen.

Hartley⁸¹⁾ fand, daß OMPA durch Chlor, Jod und Permanganat angegriffen wird. Es zeigte sich, daß jede Veränderung in der Molekel von OMPA, die die -P-O-P-Bindung instabil macht, zu einem potenten Cholinesterase-Inhibitor führt⁶⁹⁾. Casida u. a.^{73, 75)} erhielten mit neutralem Permanganat eine komplexe oxydative Demethylierung unter Verbrauch von 36 Äquivalenten Sauerstoff pro Mol OMPA. Das erste dabei auftretende Oxydationsprodukt ist mit dem biologischen Metaboliten identisch.

Es dürfte demnach feststehen, daß Pflanzen, Säuger und Insekten OMPA mittels eines bei Organismen weit verbreiteten Enzyms (Phosphoramidoxydase) unter Bildung einer Phosphoramidoxyd-Gruppe oxydieren.



⁶³⁾ R. L. Metcalf u. R. B. March, Ann. Entomol. Soc. Amer. 46, 63 [1953].

⁶⁴⁾ W. E. Ripper, R. M. Greenslade u. G. S. Hartley, Bull. entomol. Res. 40, 481 [1950]; J. econ. Entomol. 44, 448 [1951].

⁶⁵⁾ J. E. Gardiner u. B. A. Kilby, Biochemic. J. 46, XXXII [1950]; 57, 78 [1952].

⁶⁶⁾ E. Y. Spencer u. R. D. O'Brien, J. Agric. Food Chem. 1, 716 [1953].

⁶⁷⁾ F. Duspiva, Mitt. biol. Zentralanstalt Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 70, 91 [1951].

⁶⁸⁾ K. P. DuBois, J. Doull u. J. M. Coon, J. Pharmacol. exp. Therap. 99, 376 [1950].

⁶⁹⁾ K. K. Cheng, Brit. J. exp. Pathol. 31, 44 [1951].

⁷⁰⁾ J. P. Frawley, E. P. Laug u. O. G. Fitzhugh, Fed. Proc. 11, 347 [1952].

⁷¹⁾ E. F. Jansen, A. L. Curl u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 190, 557 [1951].

⁷²⁾ J. E. Casida, T. C. Allen u. M. A. Stahmann, J. Amer. chem. Soc. 74, 5548 [1952].

⁷³⁾ J. E. Casida u. M. A. Stahmann, J. Agric. Food Chem. 1, 883 [1953].

⁷⁴⁾ G. S. Hartley u. D. F. Heath, Nature [London] 167, 816 [1951].

⁷⁵⁾ G. S. Hartley, D. F. Heath, J. M. Hulme, D. W. Poud u. M. Whitaker, J. Sci. Food Agric. 7, 303 [1951].

⁷⁶⁾ J. E. Casida, R. K. Chapman u. T. C. Allen, J. econ. Entomol. 45, 568 [1952].

⁷⁷⁾ V. Ignatieff u. H. Wasteneys, Biochemic. J. 30, 1171 [1936].

⁷⁸⁾ H. T. R. Rogers, R. W. Pearson u. W. H. Pierre, Soil Sci. 54, 353 [1942].

⁷⁹⁾ H. C. Yin, New Phytologist 44, 191 [1945].

⁸⁰⁾ E. F. Jansen, H. D. F. Nutting u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 175, 975 [1948].

⁸¹⁾ G. S. Hartley, XIIth Intern. Congr. Pure Appl. Chem., New York [1951].

Das Reaktionsprodukt enthält ein positiv geladenes N-Atom, welches sich mit dem anionischen Zentrum der Cholinesterase unter Inaktivierung verbindet.

Es bleibt noch zu erklären, warum OMPA bei Insekten eine so ausgesprochene artspezifische Toxizität besitzt. *DuBois* u. a.⁸⁶⁾ hielten die Insekten zu einer Transformation von OMPA in eine Antiesterase für unfähig und meinten, daß saugende Insekten im Feldversuch deshalb gegen den Wirkstoff anfällig sind, weil sie mit dem Pflanzensaft den darin enthaltenen pflanzlichen Esterase-hemmenden Metaboliten aufnehmen. Im pflanzlichen Gewebe sind aber selbst nach reichlichen Gaben von OMPA nur bescheidene Mengen an hemmenden Umsetzungsprodukten anzutreffen, was dafür spricht, daß der instabile Metabolit sehr schnell nach seiner Bildung verschwindet und sich keinesfalls etwa in der Pflanze anhäuft, wie das für intaktes OMPA zweifellos zutrifft⁸²⁾. *Duspiva*⁸⁷⁾ konnte jedoch zeigen, daß OMPA bei Blattläusen und gewissen Wanzen nicht nur über die Pflanze, sondern auch nach lokaler Applikation toxische Symptome und eine Blockierung der Cholinesterase im zentralen Nervensystem hervorruft. Er vermutete, daß das zur Transformation von OMPA in einen Cholinesterase-Inhibitor nötige Enzym nur den empfindlichen Insektenarten eigen ist. *Casida* und *Stahmann*⁷³⁾ fanden aber auch die Gewebe der resistenten Arten zu dieser Umwandlung fähig und halten eine artlich verschiedene Empfindlichkeit der Insektencholinesterase dem toxischen Metaboliten gegenüber für die Ursache der selektiven Wirkung von OMPA. Eigenartigerweise ist nach *O'Brien* und *Spencer*⁸³⁾ die Aktivität des Fettkörpers gerade bei resistenten Insektenarten besonders hoch. Auf Grund dieser Beobachtung stellten sie die Hypothese auf, daß bei den unempfindlichen Insektenarten so viel des aufgenommenen OMPA schon im Fettkörper umgesetzt wird, daß einerseits zu wenig unverändertes OMPA übrig bleibt, um noch in genügender Menge in das Bauchmark einzudringen und dort nach Umwandlung zum toxischen Metaboliten zu wirken, daß aber andererseits der im Fettkörper entstandene instabile Metabolit nur schwierig durch die sehr speziell geartete Membran des Nervensystems der Insekten einzudringen vermag. Die Instabilität des Metaboliten sei so groß, daß er nur dann zur Wirksamkeit kommt, wenn er unmittelbar nach seiner Bildung ohne große räumliche oder zeitliche Abstände auf Cholinesterase einwirken kann. Das Problem mündet in grundsätzliche Fragen der Histochemie und Physiologie des Insektennervens aus.

8. Kommt das System Acetylcholin-Cholinesterase bei Insekten vor?

Da keine einfachen Beziehungen zwischen der Toxizität eines Insektizids und der Hemmung von Cholinesterase im „in vitro“-Test besteht, fühlten sich in letzter Zeit mehrere Autoren dazu veranlaßt, an der Bedeutung des Systems Acetylcholin-Cholinesterase für die Funktion der Erregungsübertragung vom Rezeptions- zum Erfolgsorgan bei Insekten zu zweifeln.

Eine Substanz, die sich pharmakologisch dem Frosch-Rektus und Blutegelmuskel gegenüber wie Acetylcholin verhält, wurde bei Insekten in hoher Konzentration nachgewiesen^{80, 84, 85)}. Homogenisierte Insektengewebe sind in Gegenwart von Eserin auch zu einer ausgiebigen Synthese

von Acetylcholin befähigt. Der Nachweis der Identität des gebildeten Produktes mit Acetylcholin wurde papierchromatographisch geführt⁸⁶⁾.

Es ist sehr auffällig, daß die Organe der Insekten gegen Acetylcholin fast völlig unempfindlich sind, während cholinergisch innervierte Organe von Wirbeltieren auf kleinste Mengen von Acetylcholin reagieren; beispielsweise geben isolierte Insektenmuskeln im Gegensatz zu Froschmuskeln mit Acetylcholin keine Kontraktur. *Hopf*⁸⁷⁾ hat in eingehenden Versuchen festgestellt, daß Acetylcholin, Acetyl- β -methylcholin, Carbamylcholin, Benzoylcholin, Cholin sowie auch Prostigmin und Atropin der Heuschrecke *Locusta migratoria* parenteral appliziert praktisch ungiftig sind, während Physostigmin (Eserin) wenn auch in weit höherer Dosis als beim Menschen eine gewisse Toxizität entfaltet. Am isolierten Ganglienkörperpräparat vom Gelbrandkäfer bestätigen *Krupp* u. a.¹⁴⁾ die Unwirksamkeit von Acetylcholin und Atropin. Aber Physostigmin und Prostigmin zeigen eine tonussteigernde und kontrakturartige Wirksamkeit. *Florey*⁸⁸⁾ fand Prostigmin bei Insekten völlig unwirksam und hält es für möglich, daß Insekten eine Prostigmin-feste Cholinesterase besitzen. „In vitro“ wird jedoch auch die Cholinesterase der Insekten von Prostigmin stark gehemmt⁸⁹⁾. Atropin verhält sich bei Insekten nicht antagonistisch zu Anticholinesterasen. Ein Vergleich des isolierten Ganglions vom Gelbrandkäfer mit dem Cervikalganglion der Katze hinsichtlich der lähmenden Wirkung von Acetylcholin, Physostigmin, Atropin, Strychnin, Nicotin, Arekolin und KCl ergab für die meisten dieser Stoffe eine gute qualitative und quantitative Übereinstimmung. Eine Ausnahme bildete jedoch Acetylcholin, das am Insektenganglion völlig unwirksam ist¹⁴⁾. Der Passivität des Ganglien-Muskelpräparates gegen Acetylcholin steht die hohe Empfindlichkeit des Arthropoden-(Gliederfüßler)-Herzens gegenüber^{88, 90)}. Zur Erklärung des eigentümlichen Verhaltens der Insektenorgane gegen Acetylcholin sind mehrere Hypothesen aufgestellt worden^{87, 88)}.

- 1.) Die Insekten-Cholinesterase ist so ungemein aktiv, daß sie auch die größten Mengen an Acetylcholin, die im Versuch geboten werden, sofort entgiftet.
- 2.) Bei den Insekten treten so wie bei Wirbeltieren sowohl Acetylcholin als auch Cholinesterase in der erregbaren Membran der Synapsen (Übergangsstellen, z. B. Nerv mit Muskel) und Nervendplatten auf, aber diese Acetylcholin-empfindlichen Orte sind durch Strukturen nach außen abgeschirmt, die wohl für Insektizide sowie für Physostigmin permeabel sind, nicht aber für Cholinesterase, Atropin, Tubocurarin und Prostigmin, also Pharmaka, deren gemeinsames Merkmal eine geringe Löslichkeit in Lipiden ist.
- 3.) Bei Insekten haben Cholinesterase keine physiologische Bedeutung. Bei der Erregung in den Synapsen und Nervendplatten tritt kein Acetylcholin auf. Die toxische Wirkung der als Anticholinesterase wirksamen Insektizide kann daher nicht auf der Cholinesterase-Hemmung beruhen und muß einen anderen Wirkungsmechanismus haben.

Mehrere Autoren neigen gegenwärtig zu der letztgenannten Auffassung, da die völlige Ungiftigkeit von Acetylcholin bei Insekten dadurch am einfachsten erklärt erscheint.

⁸²⁾ R. L. Metcalf u. R. B. March, J. econ. Entomol. 45, 988 [1952].
⁸³⁾ R. D. O'Brien u. E. Y. Spencer, J. Agric. Food Chem. 1, 946 [1953].

⁸⁴⁾ E. Corteggiani u. A. Serfaty, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 131, 1124 [1939].

⁸⁵⁾ S. J. Mikalosis u. R. H. Brown, J. cellular. comparat. Physiol. 18, 401 [1941].

⁸⁶⁾ S. E. Lewis, Nature [London] 172, 1004 [1953].

⁸⁷⁾ H. S. Hopf, Ann. appl. Biol. 39, 193 [1952].

⁸⁸⁾ E. Florey, Pflanzenschutz Ber. (Wien) 7, 81 [1951].

⁸⁹⁾ F. Duspiva, Verh. Dtsch. Ges. angew. Entomol. (im Druck).

⁹⁰⁾ B. J. Krüggman, D. Dresden u. N. E. Berger, Bull. Entomol. Res. 41, 141 [1950].

Man darf nicht vergessen, daß das Nervensystem der Arthropoden schon im Bauplan von dem der Vertebraten (Wirbeltiere) stark abweicht. Bei Wirbeltieren innerviert bekanntlich ein Axon nur eine ganz kleine Gruppe von Muskelfasern, bei Arthropoden dagegen einen ganzen Muskel. Eine einzelne Muskelfaser wird bei Vertebraten nur von einem einzigen motorischen Axon (Nervenast) innerviert, bei Arthropoden von 2–4 Axonen, die sogar physiologisch ungleichwertig sind. Bei Arthropoden ist eine multiple Termination der Nervenfasern die Regel. Daher wird die motorische Aktivität der Arthropoden hauptsächlich in der Peripherie, bei Vertebraten dagegen im Zentralnervensystem geregelt. Damit im Zusammenhang steht die geringe Größe des Nervenstranges der Arthropoden im Vergleich zu dem umfangreichen Cerebrospinalsystem der Vertebraten. Die myoneuralen Verbindungen der Arthropoden dürften physiologisch mehr den Synapsen der Wirbeltiere als den Nervendplatten vergleichbar sein⁹¹). *Riesser*⁹²) hat darauf hingewiesen, daß der kapillare Abtransport von Acetylcholin aus der Muskulatur der Wirbeltiere zur Aufrechterhaltung der Erregbarkeit eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Ein solcher Abtransport ist aber nur möglich, wenn die Region der Nervendplatte den Austausch hydrophiler Stoffe zuläßt. Wie *Nachmanson*⁹¹) darlegt, ist es lipoidunlöslichen Stoffen wie Acetylcholin, Curare und Prostigmin wohl möglich, in die Region der Endplatte einzudringen, nicht aber in den peripheren Nerven. Auf diese Weise ist es auch verständlich, daß Acetylcholin im peripheren Nerven der Wirbeltiere keine Erregung hervorzubringen vermag, wohl aber in der Endplatte. Ebenso verhält sich auch Prostigmin. Auf diese Weise kann Acetylcholin, welches beim Erregungsvorgang freigesetzt wurde, aus der Endplatte austreten und in die Blutkapillaren eindringen. Da den Insekten ein geschlossener Blutkreislauf fehlt und der Sauerstofftransport vom Tracheensystem besorgt wird, herrschen hier ganz andere Verhältnisse. Es ist verständlich, daß unter diesen Umständen auch andere Permeabilitätsverhältnisse vorliegen, was sich darin zeigt, daß hydrophilen Stoffen der Eintritt verwehrt wird. Dann kann aber auch umgekehrt Acetylcholin, wenn es in der Insektensynapse gebildet wurde, diese Region nicht verlassen, um in die Hämolymphe abzufließen. Es muß zur Inaktivierung an Ort und Stelle durch die Cholinesterase gespalten oder in eine inaktive Form umgewandelt werden. Als Stütze für diese Anschauung scheint dem Verf. der schon von *Bacq*⁹³) erhobene Befund dienlich zu sein, daß der Hämolymphe der Arthropoden die Fähigkeit abgeht, Acetylcholin zu spalten. Eine weitere Stütze ist die hohe Aktivität der Cholinesterase im Nervensystem der Insekten. Das Fehlen von Cholinesterase im Insektenblut spricht dafür, daß unter physiologischen Bedingungen von den Organen des Insekts kein Acetylcholin in die Hämolymphe abgegeben wird. Für besondere Permeabilitätsverhältnisse beim Insektennerv spricht auch die Tatsache, daß bei Insekten ein hoher Kaliumionen-Spiegel im Blut die Regel ist, und der Insektennerv auf diesen Zustand völlig unempfindlich ist⁹⁴).

Die erste der oben dargelegten Hypothesen ist unwahrscheinlich und abzulehnen. Die zweite Hypothese hat mehr Wahrscheinlichkeit für sich, als ihr *Hopf*⁹⁷) zubilligt. Die dritte Hypothese stößt auf die Schwierigkeit, die Reaktionsfähigkeit des Insektenherzens mit Acetylcholin zu erklären. Außerdem fand *Florey*⁹⁸), daß Acetylcholin, durch ein Bohrloch direkt in ein Auge der Biene gebracht, zu deutlichen Reaktionen führt. Unter diesen experimentellen Bedingungen wird der Weg über die Hämolymphe vermieden. Eine Bestätigung des Versuches wäre sehr erwünscht.

b) Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffe

Im Verlaufe der Vergiftung einer amerikanischen Schabe durch eine Anticholinesterase (DFP, TEPP) wird die normalerweise vorhandene synaptische Resistenz im Bauchmark so weit vermindert, daß selbst minimale Geräusche oder Erschütterungen anhaltende Entladungen in den das Bauchmark der Länge nach durchziehenden Riesenfasern hervorlocken. Die Nachentladungen verwischen jegliche Synchronisierung zwischen Reiz und Antwort. Sie dauern

auch nach Aussetzen der Reizquelle weiter an. Schließlich tritt ein synaptischer Block ein, die Erregungsübertragung liegt still. Nachentladungen und synaptischer Block können alternierend abwechseln^{95, 96}). Das Bild erinnert an eine mit DFP vergiftete Nervendplatte beim Wirbeltier und widerspricht nicht der Vorstellung, daß ihm eine Anhäufung von Acetylcholin zugrunde liegt. Cholinester, Curare und Atropin haben keinen Einfluß auf die Erregungsübertragung. Dagegen übt eine lange Reihe von Insektiziden, darunter Pyrethrine, p-Dichlorbenzol, Naphthalin, Nicotin, DDT, DDT-Analogen u. a. m., die zwar chemisch stark verschieden sind, aber als gemeinsames Merkmal einen hohen Lipoid-Wasser-Verteilungs-Quotienten haben, eine durchaus ähnliche Wirkung auf den Insektennerv aus: sie erzeugen alle eine charakteristische Vielfältigung von Nervenimpulsen. Das Nächstliegende wäre, die Wirksamkeit aller dieser Stoffe auf eine rein physikalische Interferenz mit den Lipoiden der erregbaren Membran zurückzuführen⁹⁷). Der Vorgang liegt aber verwickelter. Bei DDT-vergifteten Schaben ist im Stadium der Rückenlage der Gehalt an freiem Acetylcholin im thorakalen Teil des Bauchmarkes auf 210% angestiegen. In früheren Intoxikationsstadien ist der Effekt nicht zu sehen. In derselben Weise wirken auch Cyclopropan und γ -Hexachlorcyclohexan. Hunger, Durst oder Nicotin vermehren den Acetylcholin-Gehalt nicht, Physostigmin als Anticholinesterase aber wohl⁹⁹). Es ist wahrscheinlich, daß es sich dabei um irgendeinen spezifischen Effekt der Kohlenwasserstoffe handelt, doch muß er nicht notwendigerweise auf einer Hemmung der Cholinesterase beruhen. Acetylcholin kann sich auch als Produkt einer postmortalen Synthese anhäufen⁹⁸).

Der Nachweis einer Hemmung von Cholinesterase durch chlorierte Kohlenwasserstoffe ist im „in vitro-Test“ bis heute noch niemandem gelungen⁹⁹). *Metcalf* und *Kearns*⁹⁹) haben einen solchen Zusammenhang auf Grund der Ähnlichkeit des Vergiftungsbildes nach einer DDT-Applikation bei Schaben mit dem durch Physostigmin hervorgerufenen vermutet. In neuerer Zeit berichtet *Stegwee*¹⁰⁰), daß DDT als Kontaktgift geboten im Spätstadium der Vergiftung eine totale Hemmung der Cholinesterase im Zentralnervensystem der Schaben verursacht, sich also ähnlich wie Parathion verhält. Applizierte er aber den Schaben DDT intra-abdominal, so wirkt der Stoff ebenfalls letal, es bleibt aber die volle Cholinesterase-Aktivität im Nervenstrang erhalten. Hierin besteht ein krasser Unterschied zu Parathion. Eine plausible Erklärung kann für diesen Befund noch nicht gegeben werden. Elektrophysiologisch verhält sich DDT wie eine Anticholinesterase. Im Frühstadium der Vergiftung tritt eine Herabsetzung der synaptischen Resistenz im Zentralnervensystem und wahrscheinlich auch in den myoneuralen Verbindungen ein (Übererregbarkeit), später kommt auch hier ein Synapsenblock zustande. *Roeder* und *Weiant*¹⁰¹) beobachteten nach Injektion einer DDT-Suspension in das Schabenbein Serien von hochfrequenten Impulsen in sensible Nervenfasern, die von den campaniformen Organen des Trochanter (Schenkelring) (propriozeptive Rezeptoren) zum Bauchganglion laufen¹⁰²).

⁹⁵) K. D. Roeder, N. K. Kennedy u. E. A. Samson, J. Neurophysiol. 10, 1 [1947].

⁹⁶) K. D. Roeder, Bull. Johns Hopkins Hosp. 83, 587 [1948].

⁹⁷) J. H. Welsh u. H. T. Gordon, J. cellular. comparat. Physiol. 30, 147 [1947].

⁹⁸) R. Truhaut u. D. Vincent, Bull. Soc. Chim. biol. 30, 694 [1948].

⁹⁹) R. L. Metcalf u. C. W. Kearns, Tenn. Valley Ant. Dep. Entomol. Illinois 1946.

¹⁰⁰) D. Stegwee, Biochim. Biophys. Acta 8, 187 [1952].

¹⁰¹) D. Roeder u. E. A. Weiant, Ann. Entomol. Soc. Amer. 44, 372 [1951]; J. cellular. comparat. Physiol. 32, 175 [1948].

¹⁰²) J. W. S. Pringle, J. exp. Biology 15, 114 [1938].

⁹¹) D. Dresden: Philosoph. Doctor Thesis, Univ. Utrecht, 1949; Bull. entomol. Res. 38, 575 [1948].

⁹²) O. Riesser: Muskelphysiologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten. Bern 1949.

⁹³) Z. M. Bacq, Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 22, 73 [1947].

⁹⁴) G. Hoyle, J. exp. Biology 30, 121 [1953].

Es gibt heute noch keine befriedigende Erklärung für den Wirkungsmechanismus von DDT und γ -HCH. Die Hydrolysentheorie von *Martin* und *Wein*¹⁰³), der zufolge eine Abspaltung von Salzsäure am Wirkungsort die Ursache der Toxizität von DDT sein sollte, ist in Anbetracht der zur Vergiftung eines Insekts nötigen winzigen Menge (1 mal 10^{-8} g DDT pro Stubenfliege) höchst unwahrscheinlich. Auch die *Läugersche* Theorie¹) der toxisch wirksamen und lipoid löslichen Molekelkomponente, sowie die Narkosetheorie von *Gavaudan* und *Poussel* befriedigen nicht aus Gründen, die *Riemschneider*¹⁰³) und *Domenjoz*¹⁰⁴) bereits eingehend besprochen haben. Es bleibt also nur noch die Cholinesterase-Inhibitorhypothese übrig. Von den zahlreichen Isomeren des Hexachlorcyclohexan ist bekannt, daß die α -, β - und δ -Form eine schwache, das γ -Isomer aber eine sehr gute insektizide Wirksamkeit hat¹⁰⁵), während das ϵ - und η -Isomer praktisch unwirksam sind. Da allein das γ -Isomere nach intravenöser Verabreichung an Hunde schwere Krämpfe auslöst, halten *Dallemagne*, *Philippot* und *Gernay*¹⁰⁶) eine Beeinflussung der synaptischen Cholinesterase am lebenden Nervensystem für möglich, obgleich eine Aktivitätshemmung „in vitro“ bisher nicht erzielt werden konnte. Die seinerzeit geäußerte Meinung, daß die Wirkung des γ -HCH infolge seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Mesoinositol auf einer kompetitiven Hemmung des Wachstumsfaktors beruhe, ließ sich experimentell nicht bestätigen. Der große Einfluß der räumlichen Konfiguration der Molekel auf seine biologische Wirksamkeit, die toxische Wirkung in kleinsten Quantitäten und die Ähnlichkeit des neurophysiologischen Vergiftungsbildes mit dem einer Anticholinesterase sprechen für die Beeinflussung irgend einer enzymatischen Reaktion im Zentrainervensystem. Für eine Interferenz mit einem elektiven zentralen nervösen Vorgang spricht auch die Beobachtung von *Coper*, *Herken* und *Klempau*¹⁰⁷), daß eine einmalige Gabe von γ -HCH Cardiazol-Krämpfe bei Warmblütern verhindert.

Es mag sein, daß die Esterasen des Nerven stärker differenziert sind als wir wissen^{108, 109}). Es ist möglich, daß organische Phosphor-Verbindungen Gruppen von Esterasen hemmen, während γ -HCH nur eine einzige Komponente beeinflusst. Im Versuch würde in diesem Fall eine so geringfügige Herabsetzung der Aktivität eintreten, daß sie der Aufmerksamkeit der bisherigen Untersucher entgangen sein könnte.

c) Allgemeine Einflüsse auf den Stoffwechsel

Es hat nicht an Bemühungen gefehlt, den Einfluß von Insektiziden auf allgemeine Stoffwechselvorgänge zu studieren. In mehreren Arbeiten wird darauf hingewiesen, daß sich der Vergiftungsvorgang in der Respiration der Insekten auswirkt¹¹⁰). In dieser Hinsicht sind 2 Gruppen zu unterscheiden: 1.) Insektizide, die im Frühstadium der Vergiftung die Atmung steigern und 2.) solche, die die Atmung herabsetzen. Zur ersten Gruppe zählen 2,4-Dinitro-o-kresol, Parathion, γ -HCH, DDT, Pyrethrine, Toxaphen, Chlordan und HETP, zur zweiten Gruppe Rotenon und die Thiocyanate. Bei Toxaphen, Chlordan und Parathion setzt die Atmungssteigerung etwas später ein als bei

den anderen. Die Wirkung von γ -HCH und der Pyrethrine ist besonders komplexer Natur. Die anfängliche Stimulation der Atmung bei Insekten der ersten Gruppe durch Insektizide spiegelt die Steigerung irgendwelcher Stoffwechselprozesse wieder, die heute noch nicht genauer bekannt sind. Man weiß, daß DDT-vergiftete Säugetiere einen raschen Abbau von Leberglykogen zeigen und in eine charakteristische hyperglykämische Phase eintreten, mit Blutzuckerwerten bis 200 mg%, der später eine hypoglykämische Phase folgt. Die Blutmilchsäure steigt an, die Alkalireserve wird vermindert. Im Harn treten aber weder Zucker noch Ketokörper auf, doch soll nach einer DDT-Injektion bei Ratten der Harnstickstoff einen plötzlichen Anstieg zeigen. Möglicherweise ist eine Störung im vegetativen Nervensystem der auslösende Faktor. Leberschnitte von Ratten zeigen auf frühen Intoxikationsstadien des Versuchstieres entnommen eine erhöhte, auf späteren eine herabgesetzte O_2 -Aufnahme¹¹¹). Messungen der Galvanonarkoseschwelle bei Fischen auf verschiedenen Intoxikationsstadien nach einer Verabreichung von organischen Phosphorsäure-Verbindungen führten *Schwarz*¹¹²) zu der Auffassung, daß diese Wirkstoffe an irgend einer Stelle in den Chemismus der Oxydationsfermente lähmend oder blockierend eingreifen. *Sacktor*¹¹³) fand tatsächlich eine hemmende Wirkung von DDT auf die Cytochromoxydase des Säugerherzens und der Stubenfliege. *Torda* und *Wolff*¹¹⁴) beobachteten im Gegensatz dazu eine Aktivierung dieses Enzyms. Nach Untersuchungen der gleichen Autoren ist DDT aber ein starker Inhibitor der Kohlensäureanhydratase. *Keller*¹¹⁵) bestätigte diesen Befund und arbeitete eine auf diesem Prinzip fußende, sehr empfindliche Methode zur Bestimmung kleinster Mengen von DDT in Stoffgemischen aus. Zahlreiche Enzyme des Zellstoffwechsels werden nach *Judah*¹¹⁶) durch DDT nicht beeinflusst. Dazu gehören die Aldolase, Adenosin-triphosphatase, Glutaminsäuredehydrase, Cholinoydase, Hexokinase, Bernsteinsäureoxydase u. a. *Johnston*¹¹⁷) erhielt aber mit DDT und analogen Verbindungen einen deutlichen Hemmeffekt bei dem Bernsteinsäureoxydase-System des Rattenherzens. Das komplizierte aus einer Kette von Enzymen aufgebaute Bernsteinsäureoxydase-System ist in der Zelle fast ausschließlich an die labile Struktur der Mitochondrien gebunden. Diesen lipoidreichen Organellen fällt die wichtige Rolle zu, die bei der Veratmung von Betriebsstoffen frei werdende Energie zur Darstellung energiereicher Phosphate wie Adenosin-triphosphorsäure zu verwerten. *Johnston* konnte zeigen, daß DDT auch die Cytochromoxydase hemmt. Da dieses Enzym ein wesentlicher Bestandteil des Bernsteinsäureoxydase-Systems ist, könnte die an dem ganzen System beobachtete Hemmung möglicherweise allein auf der Blockierung der Cytochromoxydase beruhen. Auf die demselben System angehörigen Dehydrasen hat DDT keinen Einfluß^{117, 118}). Das reduzierte Glutathion in der Zelle wird außer von Arsentrioxyd durch keines der gebräuchlichen Insektizide beeinflusst¹¹⁹). Dagegen dürfte nach *Rosedale*¹²⁰) der Nucleinsäure-Stoffwechsel von einer DDT-Vergiftung betroffen sein. Bei gewissen Termitenarten geht im Verlaufe der Vergiftung der Phosphor von der Adenylsäure quantitativ auf die 5-Methyl-cytidylsäure über.

¹⁰³) R. Riemschneider, Zur Kenntnis der Kontaktinsektizide. II. Pharmazie, 9. Beheft, 1. Erg.-Bd. [1950].

¹⁰⁴) R. Domenjoz, Ergebn. Hyg., Bakteriolog., Immunitätsf. exp. Therap. 26, 18 [1949].

¹⁰⁵) M. J. Dallemagne, E. Philippot u. J. M. Gernay, Experientia 4, 155 [1948].

¹⁰⁶) L. Lendle u. H. H. Schneider, Pharmazie 5, 382 [1950].

¹⁰⁷) H. Coper, H. Herken u. J. Klempau, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 212, 463 [1951].

¹⁰⁸) R. D. Hawkins u. B. Mendel, J. cellular. comparat. Physiol. 27, 69 [1946].

¹⁰⁹) R. Pulver u. R. Domenjoz, Experientia 7, 306 [1951].

¹¹⁰) K. A. Lord, Ann. appl. Biol. 36, 113 [1949]; 37, 105 [1950].

¹¹¹) Zit. bei R. Domenjoz¹⁰⁴).

¹¹²) F. Schwarz, Pharmazie 6, 144 [1951].

¹¹³) B. Sacktor, J. econ. Entomol. 43, 832 [1950].

¹¹⁴) C. Torda u. H. G. Wolff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 744 [1950]; J. Pharmacol. exp. Therap. 95, 444 [1949].

¹¹⁵) H. Keller, Naturwiss. 39, 109 [1952].

¹¹⁶) J. D. Judah, Brit. J. Pharmacol. 4, 120 [1949].

¹¹⁷) C. D. Johnston, Arch. Biochem. Biophysics 37, 375 [1951].

¹¹⁸) G. Demuth u. L. Lendle, Arch. Pharmacol. Ber. dtsch. pharmac. Ges. 284, 298 [1951].

¹¹⁹) A. J. Forgash, J. econ. Entomol. 44, 870 [1951].

¹²⁰) J. L. Rosedale, J. entomol. Soc. South Africa 17, 34 [1948].

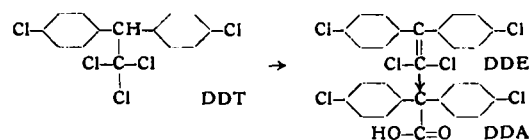
Histologische Untersuchungen konnten bisher noch keinen Fingerzeig geben, in welchen Zellstrukturen mikroskopisch sichtbare Veränderungen auftreten, die ein Licht auf den Wirkungsmechanismus von Insektiziden werfen könnten^{121, 122}). DDT und HCH schädigen alle Organe außer Muskulatur; der Fettkörper wird nekrotisch. Sehr deutlich reagieren die Blutzellen, die Kerne zeigen Degeneration und Karyorhexis (Zellkernzerfall). DDT bewirkt darüber hinaus Plasmaverquellung und Vakuolisierung, HCH Zellpyknosen. Die motorischen Zellen der Ganglien lösen sich unter dem Einfluß der Kontaktinsektizide nach Schrumpfung. Verlust der Nißl-Schollen und Kernhyperchromatose auf, auch die assoziativen Zellen werden geschädigt, bleiben aber erhalten¹²³). Aldrin bewirkt in subletaler Dosis bei Mäusen Hypertrophie und gesteigerte mitotische Tätigkeit der Leberzellen¹²⁴).

Eine akute Vergiftung mit großen Dosen an Parathion gibt beim Säugetier keine irgendwelche histologisch nachweisbaren Veränderungen an den Organen. Bei chronischer Vergiftung sind nur in den Drüsen Veränderungen nachweisbar, die auf eine gesteigerte sekretorische Aktivität hinweisen¹²⁵). Bei *Drosophila* äußert sich eine Vergiftung mit Parathion an den großen Nervenzellen im Sinne einer Schwellung und Chromophobie (Chromatolyse, Tigrolyse). Bei höheren Tieren ist eine solche Nervenzellveränderung als Folge von Intoxikation, Infektion, Axonverletzung und nach übermäßiger Arbeitsleistung der Nervenzellen bei langfristiger Reizung bekannt¹²⁶). Chang¹²⁷) beobachtete nach DDT-Gaben eine charakteristische Veränderung am Golgi-Apparat (labile, lipoidreiche bläschen- oder röhrenartige Cytoplasmastruktur) der Ganglienzellen bei Schaben und Bienen zugleich mit dem Einsetzen schwerer Koordinationsstörungen und Auflösung dieser Zellorganelle mit dem Tod der Tiere. Bei γ -HCH-Behandlung erfährt der Golgi-Apparat einen unspezifischen Abbruch.

3. Die Entgiftung von Insektiziden

Die Inaktivierung der Cholinesterase durch organische Phosphor-Verbindungen ist praktisch irreversibel. Die Vergiftungssymptome, die auf einen Mangel von Cholinesterase-Aktivität zurückgehen, werden also nur in dem Maße schwinden können, als eine Neubildung von Enzym möglich ist. Nach einer überstandenen Parathion-Vergiftung ist bei Ratten eine etwa 30proz. Steigerung der Gehirn- und Plasmacholinesterase gegenüber normalen Tieren zu verzeichnen. Dieses Spätsymptom der Parathion-Vergiftung deutet auf eine stimulierende Wirkung des Inhibitors auf die Bildungsorte der Cholinesterase in den Körperzellen¹²⁸). Parathion wird im Organismus hydrolytisch gespalten. Im Harn erscheint p-Nitrophenol; der Stoff könnte — eine ausreichende Erfahrung vorausgesetzt — zum Nachweis einer Parathion-Exposition dienen¹²⁹). In den Organen, sowie im Serum von Kaninchen und Ratten ist ein Enzym enthalten, das Diäthyl-p-nitrophenylphosphat hydrolysiert (E 600-Esterase). Das Enzym ist mit der A-Esterase aus Säugerserum identisch, die durch E 600 bis 10^{-3} m nicht gehemmt wird, während die B-Esterase schon bei 10^{-8} m blockiert ist¹³⁰).

Nach Verabreichung von DDT beobachtet man bei Säugetieren im Äther-Extrakt des Harnes ein Ansteigen von organisch gebundenem Chlor. Es wird ein Abbau von DDT über die Dichloräthylen-Verbindung (DDE) zu p,p'-Dichlor-diphenylelessigsäure (DDA) wahrscheinlich gemacht, welche zusammen mit anderen Zwischenprodukten im Harn erscheinen¹⁰⁴).



Diese Umbildung hat bei Säugetieren nicht die Bedeutung einer Entgiftung, da DDA auch toxisch wirkt, sondern erleichtert die Ausscheidung. Stubenfliegen verwandeln DDT ebenfalls zur Dichloräthylen-Verbindung DDE. Nichtresistente Stämme sind zu dieser Umwandlung in einem viel geringeren Umfang fähig als resistente. Ähnlich liegt der Fall bezüglich der Wirkstoffe von Toxaphen und Chlordan¹³¹). Resistente Fliegen nehmen diese Substanzen ebenso leicht auf wie nichtresistente, bauen sie aber in viel kürzerer Zeit zu weniger toxischen Derivaten ab.

Es gibt Insektenarten, die von Natur aus gegen DDT in der üblich angewandten Dosis resistent sind. Dazu zählen z. B. *Epilachna varivestis*, *Argyrotaenia velutinana* und *Melanoplus femur-rubrum*. Diese Arten lassen sich in der Praxis mit DDT nicht bekämpfen. Alle drei Arten haben in ausgeprägtem Maße die Fähigkeit, DDT zu entgiften¹³²), und zwar durch einen enzymatischen Abbau¹³³). Die Heuschrecken sind an und für sich gegen DDT recht empfindlich. *Melanoplus* kann man schon durch 2 γ DDT vergiften, wenn man das Gift intraabdominal verabreicht. Aber diese Art ist selbst gegen Dosen von 9000 γ DDT resistent, wenn der Wirkstoff durch das Integument (Körperdecke) eindringen muß. Peroral verträgt *Melanoplus* 2500 γ DDT. Die Faktoren, die *Melanoplus* gegen DDT schützen, sind die rasche Umsetzung des durch die Cuticula eingedrungenen Wirkstoffes zu DDE in den Zellen der Hypodermis, sowie die geringere Resorption von DDT im Darm und die rasche Entgiftung der aufgenommenen Wirkstoffmengen in den Darmzellen. Wenn DDT nicht direkt in die Hämolymphe der Heuschrecken eingespritzt wird, kann das Gift den Wirkort in aktiver Form nicht erreichen. Bei den Heuschrecken besteht also keine echte inhärente Immunität gegen die toxische Wirkung von DDT. Ähnlich liegt der Fall bei den beiden anderen Arten. Wenn *Epilachna* reichlich DDT gefressen hat, so kann es zu Tremorerscheinungen kommen, diese hören aber bald auf, da das Gift schneller abgebaut wird, als sich die weiteren Vergiftungsphasen entwickeln.

Die Stoffwechselvorgänge, welche zur Entgiftung von DDT führen, sind enzymatischer Natur und daher genabhängig. Die Vererbung der DDT-Resistenz ist bei der deutschen Schabe recht komplex, da sowohl chromosomale als auch extrachromosomale Faktoren beteiligt sind¹³⁴). Die Weibchen der Schabe besitzen eigenartigerweise eine deutlich höhere Resistenz gegen DDT als die Männchen.

Ein eigenartiges Phänomen ist der negative Temperaturkoeffizient der DDT-Intoxikation. Es ist schon lange bekannt, daß DDT-vergiftete Insekten symptomfrei werden, wenn man sie auf eine höhere Temperatur

¹²¹) A. G. Richards, J. New York, Entomol. Soc. 51, 55 [1943]; 52, 285 [1944].

¹²²) A. G. Richards u. L. K. Cutkomp, ebenda 53, 313 [1945].

¹²³) H. Lüdtke u. H. Hopp, Naturwiss. 40, 346 [1953].

¹²⁴) E. Annan, H. Konst u. P. J. G. Plummer, Canad. J. Med. Sci. 30, 463 [1952].

¹²⁵) F. A. Denz, J. Pathol. Bacteriol. 63, 81 [1951].

¹²⁶) Th. Lüers, H. Köpf u. H. Lüers, Biol. Zbl. 72, 478 [1953].

¹²⁷) Chang Peh-I, Ann. entomol. Soc. Amer. 44, 311 [1951].

¹²⁸) A. Locker u. H. Siedek, Experientia 8, 146 [1952].

¹²⁹) J. Lieben, R. K. Waldman u. L. Krause, Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. 6, 491 [1952].

¹³⁰) W. N. Aldridge, Biochemic. J. 53, 110 [1953]; 53, 117 [1953].

¹³¹) R. A. Hoffman u. A. W. Lundquist, J. econ. Entomol. 45, 233 [1952].

¹³²) J. Sternburg u. C. W. Kearns, Ann. Entomol. Soc. Amer. 43, 444 [1950]; J. econ. Entomol. 45, 497 [1952]; 45, 505 [1952].

¹³³) J. Sternburg, E. B. Vinson u. C. W. Kearns, J. econ. Entomol. 46, 513 [1953].

¹³⁴) D. G. Cochran, J. M. Grayson u. M. Levitan, J. econ. Entomol. 45, 997 [1952].

bringt¹⁸⁵⁾. Der Vorgang ist reversibel, man kann durch Abkühlung die Symptome gleich wieder hervorrufen. Das Eindringen von DDT in den Körper der Schabe ist bei 35 °C beschleunigt. Der prozentuale Abbau der tatsächlich aufgenommenen Wirkstoffmengen ist bei 15° und 25 °C gleich. Die im Warmen gehaltenen Schaben enthalten demnach in ihrem Körperinneren mehr aktiven Wirkstoff als die kalt gehaltenen Tiere. In nicht zu weit vorgeschrittenen Vergiftungsstadien wird die Abbaugröße von DDT durch zwei Faktoren begrenzt. 1.) die im Körper enthaltene DDT-Menge, 2.) das Entgiftungspotential der Schabe. Eine Dosiserhöhung verändert in der Wärme das Entgiftungspotential nicht. In der Kälte wird es aber herabgesetzt, vorausgesetzt, daß mehr als 8 γ DDT in der Schabe enthalten sind. Die geringere Wirksamkeit der Entgiftungsreaktion bei höheren DDT-Mengen in der Kälte ist das Ergebnis einer gesteigerten Wirksamkeit von DDT bei der Zerstörung zahlreicher physiologischer Funktionen in der Zelle¹⁸⁶⁾.

Die letzten Ausführungen haben eindeutig gezeigt, daß ein Stoff, obwohl er die Fähigkeit besitzt, in den Insekten-

¹⁸⁵⁾ E. Haefliger, *Experientia* 4, 223 [1948]; *J. econ. Entomol.* 42, 523 [1950].

¹⁸⁶⁾ E. B. Vinson u. C. W. Kearns, *J. econ. Entomol.* 45, 484 [1952].

körper einzudringen und lebenswichtige Fermente zu blockieren, noch lange kein brauchbares Insektizid zu sein braucht. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei der Stoffwechsel der Insekten, der wirksame Substanzen in unwirksame Produkte verwandeln kann und an sich unwirksame Pharmaka in potente Gifte umzusetzen imstande ist. Die an solchen Umsetzungen beteiligten Reaktionsketten laufen nicht bei allen Insektenarten in der gleichen Weise ab, da enzymatische Umsetzungen in diese Reaktionsketten eingeschaltet sind, die gewisse Fermente voraussetzen, die ihrerseits wieder genetisch bedingt sind. Von hier aus ergeben sich Beziehungen zum Resistenzproblem. Ein Stoff ist auch nur dann als Insektizid brauchbar, wenn er den Bedingungen im Freiland eine genügende Stabilität entgegengesetzt zur Verbürgung einer nachhaltigen Wirkung, wenn er den Stoffwechsel der Pflanze nicht oder nur in erträglichen Grenzen beeinflusst und Menschen sowie Haustieren nicht gefährlich wird. Die notwendig gewordene Beschäftigung mit dem Wirkungsmechanismus von Insektiziden führt zu einer intensiveren Bearbeitung vergleichend biochemischer Probleme, ein Fachgebiet, das bislang nur rein theoretisches Interesse hatte.

Eingeg. am 15. März 1954

[A 584]

Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel „E 605“

Von Dr. SIGRID von EICKEN, Wuppertal-Elberfeld

Aus dem Toxikologischen und Gewerbehygienischen Laboratorium der Farbenfabriken „Bayer“, Wuppertal-Elberfeld

Es wird ein empfindlicher Nachweis von p-Nitrophenol im Urin beschrieben. Man extrahiert das p-Nitrophenol aus der Harnprobe mit organischen Lösungsmitteln, schüttelt es mit wäßrigem Ammoniak aus, reduziert mit TiCl₃ und setzt mit o-Kresol zum Indophenolblau um, welches bei 620 mμ photometriert wird. Die Bedeutung des Verfahrens für die Diagnose der „E 605“-Vergiftung wird erörtert.

Zur Sicherung der Diagnose und zum Nachweis der Vergiftung mit „E 605“ (0,0-Diäthylthiophosphorsäure-O-p-nitrophenylester) ist bislang zumeist die Prüfung der Cholinesterase-Aktivität herangezogen worden. Rein chemisch analytische Verfahren begegnen gewissen Schwierigkeiten, wenn sie auf Blut und Harn oder Organe angewendet werden sollen. Ein recht charakteristisches Verfahren zum „E 605“-Nachweis ist von *Averell und Norris*¹⁾ (Reduktion des „E 605“ und diazotieren und kuppeln der entstandenen Amino-Gruppe) angegeben und in der Folgezeit auch von verschiedenen Autoren²⁾ benutzt worden, insbesondere, wenn es sich um die Analyse von Mageninhalt und ähnl. handelt. Die Methode gibt zweifellos zuverlässige Resultate, begegnet jedoch bei der Übertragung auf kleine Mengen Blut, Organe oder Harn recht erheblichen Schwierigkeiten.

Neben dem Verfahren von *Averell und Norris* sind nun von anderen Autoren Mikro-Bestimmungsmethoden angegeben, die speziell für die Blut-Analyse geeignet sein sollen. *Schwerd und Schmidt*³⁾ haben ein Verfahren angegeben, bei dem das mit Trichloressigsäure-entweißte Blutfiltrat nach Erhitzen mit Alkali eine Gelbfärbung ergeben soll. Wir konnten mit diesem Verfahren keine befriedigenden und hinreichend genauen Resultate und keine ausreichende Empfindlichkeit erzielen. *Kaiser und Lang*⁴⁾ haben ebenfalls einen Nachweis im Blut angegeben, der sich des Trichloressigsäure-Filtrates bedient. Sie reduzieren mit Zink und

Salzsäure und schließen eine Diazotierung und Kupplung der entstandenen Amino-Verbindung mit Naphthyläthylendiamin, entsprechend dem Verfahren von *Averell und Norris*, an.

Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß erstens nur ein geringer Anteil des zum Blut in einer Konzentration von 50–500 γ/ml zugesetzten „E 605“ im Trichloressigsäure-Filtrat erscheint und zweitens ein Nachweis von „E 605“ im Tierversuch nach der hohen Dosis von 20 mg/kg per os im Blut dieser Tiere (Kaninchen) nicht gelingt.

Aus diesen Gründen haben wir uns einer weiteren Möglichkeit des analytischen Nachweises des Kontaktes mit „E 605“ zugewendet, nämlich dem Nachweis des p-Nitrophenols.

Schon 1951 haben *Mountain, Zlotolow und O'Connor*⁵⁾ darauf hingewiesen, daß im Organismus als Spaltprodukt des „E 605“ p-Nitrophenol auftritt und mit der Indophenolblau-Reaktion im Urin nachweisbar ist. Dasselbe haben auch einige andere Autoren gefunden, die etwas andere Analysenvorschriften veröffentlicht haben. Wir haben diese Methoden überarbeitet und geben im folgenden die Versuchsvorschrift, die sich bei uns bewährt hat:

Als Lösungsmittel zur Extraktion von p-Nitrophenol aus Urin wenden wir wie *Lawford und Harvey*⁶⁾ eine Mischung von Äther, Petroläther und Isoamylalkohol an. Dem Lösungsmittelgemisch wird das p-Nitrophenol mit 2n Ammoniak entzogen und nach Reduktion mit Titantrichlorid das entstehende p-Aminophenol mit o-Kresol zum Indophenolblau, dessen Absorptionsmaximum bei 620 mμ liegt, umgesetzt.

¹⁾ *Averell u. Norris*, *Analytic. Chem.* 20, 753 [1948].

²⁾ *G. Vogel*: *Samml. v. Vergiftungsfällen*, *Arch. Toxikol.* 14, 381 [1953].

³⁾ *Schwerd u. Schmidt*, *Dtsch. Med. Wschr.* 77, 372 [1952].

⁴⁾ *Kaiser u. Lang*, *Süddtsch. Apotheker-Ztg.* 93, 394 [1953]. Vgl. auch diese *Ztschr.* 65, 424 [1953].

⁵⁾ *Mountain, Zlotolow u. O'Connor*, *Ind. Health Monthly* 11, 88–89 [1951]. ⁶⁾ *Lawford u. Harvey*, *Analyst* 78, 63–65 [1953].