

Anwendung des Indoxylacetates als Substrat für enzymatischen Nachweis der phosphororganischen Schädlingsbekämpfungsmittel mit der Methode der Dünnschichtchromatographie

MACIEJ BOGUSZ, TADEUSZ BORKOWSKI

Institut für gerichtliche Expertise, Kraków (Polen)

Eingegangen am 22. Februar 1971

Application of Indoxyl Acetate as Substrate for Enzymatic Detection of Organophosphorus Insecticides on Thin-Layer Chromatograms

Summary. Three years ago Mendoza *et al.* published a method for thin-layer enzymatic detection of organophosphorus pesticides, with application of indoxyl- and substituted indoxyl acetates as substrates. The present study indicates the significance of this method for forensic purposes, due to its high sensitivity, stability and intensity of color products of reaction.

Zusammenfassung. Mendoza u. Mitarb. publizierten vor 3 Jahren eine Methode für enzymatisch-dünnschichtchromatographischen Nachweis von phosphorsäureesterhaltigen Insecticiden mit Anwendung von Indoxylacetat und seinen Derivaten als Substrate. In dieser Arbeit wurde es ausgewiesen, daß die Methode für forensische Zwecke gut geeignet ist, dank ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit, der Farbstabilität und Intensität der zu messenden Reaktionsprodukte.

Key-Words: Schädlingsbekämpfungsmittel, Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie — Vergiftung, Phosphorsäureester.

Phosphororganische Verbindungen sind starke Inhibitoren der Esterasen, insbesondere der Cholinesterasen und Carboxylesterase. Diese Eigenschaft wurde bei der chromatographischen Identifizierung von Schädlingsbekämpfungsmitteln ausgenutzt. Das Wesen der Methode besteht — im allgemeinen — in der Besprühung des entwickelten Papier- oder Dünnschichtchromatogramms mit einer Enzymquelle (Cholin- bzw. Carboxylesterase) und darauf mit einem chromogenen Substrat. In den Stellen, wo sich die Pestizidflecke befinden, gibt es keine Substrathydrolyse mit Farbumschlag. Solch ein Chromatogramm weist üblich weiße Flecke auf farbigem Untergrund auf. Als Enzymquelle wurde Pferdeserum oder auch Tierleberhomogenat verwendet. Das Substrat bildete Acetylcholinchlorid mit Bromthymolblau oder Naphtylacetat [1, 2, 4, 6, 7, 11].

Mendoza u. Mitarb. [8—10] gaben 1968 eine Methode für enzymatischen Nachweis der Pesticide auf einem Chromatogramm an, die die bisherigen Methoden in der Nachweisempfindlichkeit der Ergebnisse übertrifft. Die Enzymquelle bildet dabei ein Rinderleberhomogenat, das Substrat dagegen das Indoxylacetat

oder seine Derivate. Die Methode wurde im Grundsatz für Bestimmungen von Pesticidresten in Pflanzenextrakten bearbeitet. Vorliegende Untersuchungen sollten eine Brauchbarkeit in der forensischen Toxikologie nachprüfen.

Material und Methodik

1. *Bereitung der Enzymquelle*

Es wurde die Leber eines gerade geschlechteten 2jährigen Rindes genommen und nach Abtrennung von Bindegewebe und Gefäßen im gekühlten Mixer (MSE, 14000 Umdrehungen/min) zerkleinert. Eine 20 g-Probe wurde mit 100 ml Wasser angerührt und weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde dann in einer Kühlzentrifuge bei 20000 g zentrifugiert. Klares, braun-rotes Homogenat kann innerhalb von 10 Monaten bei Temperatur -20°C ohne bemerkbaren Verlust aufbewahrt werden.

In den Vergleichsuntersuchungen wurde auch eine Lösung von gereinigter Pferdecholinesterase (Koch-Light, Colnbrook, England) und eine Lösung von gereinigter Ali-Esterase aus Pferdeleber angewandt [5].

2. *Bereitung von gepuffertem Substrat*

15 mg Indoxylacetat oder 5-Bromindoxyl-Acetat (Koch-Light, Colnbrook, England) werden *ex tempore* in 5 ml Äthanol (100%) gelöst (Teil A).

4 ml Tris-Puffer 0,05 M werden mit 5 ml NaCl 2M, 0,2 ml CaCl_2 1 M und 3,8 ml H_2O vermischt (Teil B). Die besten Ergebnisse wurden bei Anwendung vom Puffer mit $\text{pH} = 9,0$ erlangt. Demgegenüber empfehlen die Verff. eine Pufferlösung mit $\text{pH} = 8,32$.

Es werden je 1 ml von 0,05 M Kaliumhexacyanoferrat (II) und Hexacyanoferrat (III) vermischt (Teil C).

Sämtliche 3 Teile werden direkt vor Anwendung zusammengebracht und gemischt.

3. *Entwicklung des Chromatogramms*

Glasplatten mit 0,5 mm dicker Kiesel-G-Schicht (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden angewandt. Das zu untersuchende Pesticid — je 10 μl Lösung — wurde mittels Hamilton-Spritze (Hamilton Inc., Whittier, Calif., USA) aufgebracht. Das Chromatogramm wurde in Hexan mit Aceton (4:1) entwickelt. Nach der Entwicklung und Trocknung wurde das Chromatogramm der Einwirkung von Bromdämpfen ausgesetzt und nach etwa 30 min mit Leberhomogenat besprüht. Nach erneuter Trocknung wurde die Platte mit Substratlösung besprüht. In einigen Minuten wurde der Untergrund blau und die Pesticidflecke blieben weiß.

Untersuchungsergebnisse

Es wurden bei den Untersuchungen handelsübliche Präparate der phosphororganischen Verbindungen angewandt. Tabelle 1 stellt die Nachweisgrenzen der aktiven Bestandteile der einzelnen Präparate dar.

In der Abb. 1 wurde ein Sammelchromatogramm von 10 untersuchten Pesticiden dargestellt. Die nachstehende Abb. 2 und 3 stellen die Abstufung der Fleckengrößen beim Präparat Nogos EC (DDVP) und Wofatox als Funktion der Menge der aktiven Substanz dar.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, ist die Nachweisempfindlichkeit bei den Handelspräparaten ein wenig niedriger als es Mendoza u. Mitarb. [8] angeben. Die Nachweisgrenzen liegen jedoch bedeutend niedriger als bei der Anwendung von β -Naphthyl-Acetate [4, 8] als Substrat.

Die Methode nach Mendoza wurde bislang in 5 Fällen von tödlicher Vergiftung mit phosphororganischen Insecticiden und in einem Fall der Untersuchung von vergiftetem Wasser angewandt. Das biologische Material (Leber, Mageninhalt)

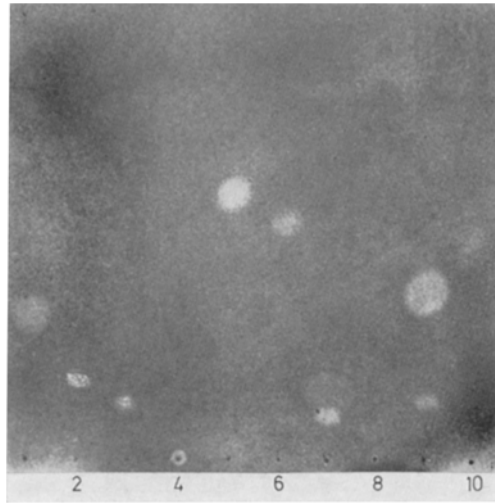


Abb. 1. Chromatogramm von 10 Insecticiden: 1 Wofatox 50 ng, 2 Nogos 20 ng, 3 Metasystox I 500 ng, 4 Metasystox R 500 ng, 5 Disyston 200 ng, 6 Ekatin 750 ng, 7 Tinox 500 ng, 8 Foschlor 5 γ , 9 Folithion 500 ng, 10 Lebaycid 1 γ

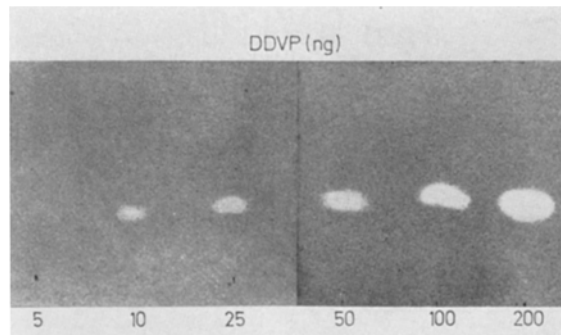


Abb. 2. Die beim Aufbringen von Präparat Nogos (DDVP) in den Mengen von 5—200 ng erhaltenen Flecke

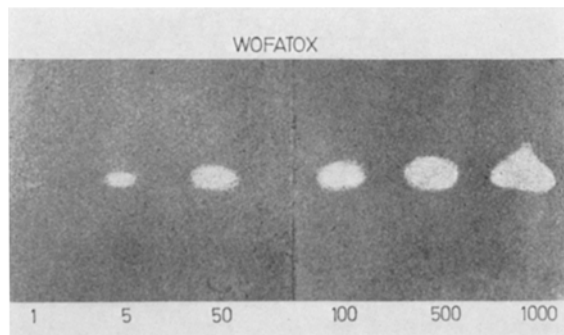


Abb. 3. Die beim Aufbringen von Präparat Wofatox in den Mengen von 1—1000 ng erhaltenen Flecke

Tabelle 1. *Nachweisgrenzen der aktiven Substanzen der untersuchten Insecticide*

Trivial-Name	Synonym	Nachweis- grenze (ng)
Wofatox	methyl-parathion	10
Nogos G50 EC	DDVP	10
Disyston	disulfoton	100
Sadofos	malathion	100
Tinox	methyl-demeton-methyl	100
Metasystox I	demeton-o-methyl	200
Metasystox R	demeton-o-methylsulfoxyd	200
Folithion		200
Lebaycid	fenthion	500
Ekatin	thiometon	500
Bi-58	dimethoate	500
Foschlor	dipterex	5000

wurde mit Äther ausgezogen, der Extrakt abgedampft und nach Lösen des trockenen Rückstandes in Aceton wurde die auf Pesticide gerichtete Untersuchung durchgeführt. Die Tabelle 2 stellt die Untersuchungsergebnisse vor.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gelang es in einem Fall von Vergiftung mit phosphororganischer Verbindung nicht das Gift nachzuweisen, weil der Vergiftete ziemlich lang lebte und die ärztliche Behandlung dabei sehr energisch war. Die Konzentration der phosphororganischen Verbindung in den inneren Organen lag wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. Man stellte die Diagnose nach den klinischen Symptomen, nach den Vergiftungsumständen und niedriger Aktivität der Cholinesterase. In sämtlichen anderen Fällen ließ die Methode von Mendoza die Identifizierung der Insecticide zu.

Auf Grund der Untersuchungen über Anwendung der beschriebenen Methode können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die enzymatische Methode ist den gleichzeitig angewandten chromatographisch-chemischen Methoden hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit weit überlegen.

2. Die entwickelten Chromatogramme sind wenigstens innerhalb von 1 Jahr beständig.

3. Die aus Leichen von solchen Personen erhaltenen Auszüge, die nicht mit Insecticiden vergiftet wurden, sondern infolge anderer Ursachen starben, geben keine Flecke-, „Artefakte“, die die Anwesenheit eines Insecticiden vorzutäuschen vermöchten.

4. Das Ersetzen des Rinderleberhomogenats mit den gereinigten Präparaten der Pferdecholin- bzw. Pferdecaboxylesterase weist keinen Einfluß auf die Qualitätserhöhung der Ergebnisse aus.

5. Die Leberhomogenate, die bei 20000 g zentrifugiert wurden, geben einen gleichmäßigen gefärbten Untergrund als die bei 2000 g zentrifugierten Homogenate.

6. Das 5-Bromindoxylacetat vermag keine besseren Resultate als das Indoxylacetat zu ergeben und überdies 5mal teurer.

Tabelle 2. *Aufstellung der Expertisen, in denen die Methode der enzymatischen Dünnschichtchromatographie verwendet wurde*

Nr.	Fall	Ergebnis	E. D. C.	Andere Methoden
1	Mann, 46 J. alt, irrtümlicherweise unbekanntes Insecticid eingenommen. Tod nach vergeblicher 2 Tage langer Behandlung mit Antidoten	Ø	Ø	Chemische Dünnschichtchromatographie (Ch. D.-Chrom.) erfolglos. AChE-Aktivität (nach [3]) stark gesenkt
2	Mann, 32 J. alt, unbekanntes Insecticidpräparat selbstmörderisch getrunken	Ekatin	+++	Ch. D.-C. +, Spektralphotometr., IR Ø; AChE-Aktivität 0
3	Untersuchung von Wasserprobe aus einem Brunnen	Ekatin	+++	Ch. D.-C. +, biologische Probe mit 5 Tage alten Fliegen (B. P.) +++
4	Frau, 19 J. alt, Insecticidpräparat selbstmörderisch getrunken. Bei der Leiche leere Verpackung aus Metasystox R gefunden	Meta- systox R	+++	Ch. D.-C. +, B. P. +++, AChE-Aktivität 0
5	Mann, 58 J. alt, Insecticidpräparat selbstmörderisch getrunken. Bei der Leiche leere Verpackung vom Bi-58 gefunden	Bi-58 (Dime- thoate)	+++	Ch. D.-C. +, B. P. +++, AChE-Aktivität kaum spürbar
6	Frau, 33 J. alt, Selbstmord, unbekanntes Insecticidpräparat eingenommen. Bei der Verstorbenen ein Glas mit dem Rest der Lösung gefunden	Sadophos (Mala- thion)	+++	Ch. D.-C. des Präparats aus dem Glas +; desgl. aus den Organen Ø. B. P. +++ AChE-Aktivität 0

E. D. C. = enzymatische Dünnschichtchromatographie, Ch. D.-C. = chemische Dünnschichtchromatographie, B. P. = biologische Probe mit 5 Tage alten Fliegen, AChE = Acetylcholinesterase.

7. Das Maximum der Farbtintensität beim Untergrund kommt sowohl für Indoxylacetat als auch für 5-Bromindoxylacetat in der Pufferlösung mit $\text{pH} = 9,0$ und bei der Schichtdicke des Gels von 0,5 mm vor.

Literatur

1. Ackermann, H.: Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide. Aktivierung schwacher Esterasehemmer. *J. Chromatog.* **36**, 309 (1968).
2. — Lexow, B., Plewke, E.: Detection and identification of phosphate, phosphorothioate, phosphonate and carbamate insecticides in biological material. *Arch. Toxikol.* **24**, 316 (1969).

3. Borkowski, T., Bogusz, M.: Changes in acetylcholinesterase activity in the blood and brain during putrefactive decomposition. *Folia med. cracov.* **9**, 409 (1967).
4. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Ong, G. L.: Dünnschichtchromatographisch-enzymatische Prüfung auf cholinesterasehemmende Insektizide in der forensischen Toxikologie. *Arch. Kriminol.* **146**, 154 (1970).
5. Hoppe-Seyler/Thierfelder: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., vol. VI/B, S. 888. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
6. McKinley, W., Read, S.: Esterase inhibition of phosphorus pesticides. *J. Ass. off. agric. Chem.* **45**, 467 (1962).
7. — Johal, P.: Esterase inhibition technique for detection of organophosphorus insecticides. II. Simplified version for routine checking. *J. Ass. off. agric. Chem.* **46**, 840 (1963).
8. Mendoza, C., Wales, P., McLeod, H., McKinley, W.: Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticides and carbaryl on thin-layer chromatograms: an evaluation of indoxyl, substituted indoxyl and 1-naphtyl acetates as substrates of esterases. *Analyst* **93**, 34 (1968).
9. — — — Thin-layer chromatographic-enzyme inhibition procedure to screen for organophosphorus pesticides in plant extracts without elaborate clean-up. *Analyst* **93**, 173 (1968).
10. — Grant, D., Braceland, B., McCully, K.: Evaluation of esterases from livers of beef, pig, sheep, monkey and chicken for detection of some pesticides by thin-layer chromatographic-enzyme inhibition technique. *Analyst* **94**, 805 (1969).
11. Menn, J., McBain, J.: Detection of cholinesterase-inhibiting insecticide chemicals and pharmaceutical alkaloids on thin-layer chromatograms. *Nature (Lond.)* **209**, 1351 (1966).

Dr. med. M. Bogusz
Dr. pharm. T. Borkowski
Instytut Ekspertyz Sadowych
Kraków, Westerplatte 9