

CHROM. 5882

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH-ENZYMATISCHER NACHWEIS EINIGER LINDAN- UND THEORETISCH MÖGLICHER DDT-METABOLITEN SOWIE VON PENTACHLORPHENOL

F. GEIKE

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

(Eingegangen am 20. Dezember 1971)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic-enzymatic identification of some lindane- and possible DDT-metabolites as well as pentachlorophenol

The possibility of identifying ρ -chlorobenzaldehyde, ρ -chlorobenzoic acid, benzophenone, chlorobenzene, benzoic acid, pentachlorophenol, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, 1,2,3-trichlorobenzene, and 1,2,4-trichlorobenzene by their inhibition of the enzymes bovine liver esterase, trypsin, acid and alkaline phosphatase, α - and β -amylase on thin-layer plates is studied. Pentachlorophenol is a very strong inhibitor of all the enzymes studied and can be detected in the range of 10 ng with bovine liver esterase to 3 μ g with α -amylase. Benzophenone, however, shows strong inhibitory activity only against the phosphatases, while the other enzymes are only moderately inhibited. Chlorobenzene cannot be identified by inhibition of any of the enzymes by this technique. The other substances studied show a very different behaviour and often are only inhibitory after UV irradiation.

EINLEITUNG

Obwohl ihre Anwendung zunehmend eingeschränkt wird, bilden die in der Land- und Forstwirtschaft angewandten Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide ein ernstes Problem für die Umwelt, da sie im Boden sehr lange persistieren. Lindan beispielsweise persistiert unter bestimmten Bedingungen im Boden elf Jahre¹, und über die Abbau- und Umwandlungsreaktionen in der Atmosphäre ist kaum etwas bekannt. Auch die Stoffwechselwege im Organismus sind noch recht unklar. Bei Fliegen kommt es nach Lindan-Applikation zur Bildung kleiner Mengen Trichlorbenzol², und 1,2,4-Trichlorbenzol wird als Zwischenprodukt des Lindanstoffwechsels bei Ratten angesehen³. In gereinigten Extrakten aus hochresistenten Stubenfliegen (*Musca domestica*) konnte ein Lindan-Metabolit aufgrund massenspektrometrischer

Untersuchungen und der gaschromatographischen (GC) Retentionszeiten als 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol identifiziert werden⁴. Daneben konnte die Bildung von 1,2,3,4-Tetrachlorbenzol sowie 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol im Verlauf des Stoffwechsels ebenfalls aufgrund der GC-Retentionszeiten wahrscheinlich gemacht werden⁴. Hochresistente Stämme bilden diese und eine Reihe weiterer Metaboliten nach Lindan-Applikation im Vergleich zu empfindlichen Stämmen in grösserem Ausmass, doch konnte nach Chlorbenzol-Applikation kein weiterer Stoffwechsel dieser Verbindungen festgestellt werden⁵. Da andererseits alle Metaboliten in relativ kleinen Mengen auftreten, ist der eigentliche Lindanabbau kaum über die Chlorbenzol-Reihe zu suchen.

Über die Wirkung dieser Verbindungen auf Enzyme sind bisher keine Daten bekannt geworden, so dass letztlich auch nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob es sich bei den bekannten Stoffwechselprodukten um echte Entgiftungsprodukte handelt. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, diese Substanzen auf dünnenschicht-chromatographisch-enzymatischer Basis mit sechs Enzymen nachzuweisen und auf diese Weise gleichzeitig Hinweise auf mögliche Wirkungen der Metaboliten zu erhalten. In die Untersuchungen wurden theoretisch mögliche, bisher jedoch nicht als DDT-Metaboliten bekannt gewordene Verbindungen sowie Pentachlorphenol eingeschlossen, das sehr umfangreich eingesetzt werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien waren analysenrein und stammten von der Fa. Merck, Darmstadt. Zur Plattenbeschichtung wurde Kieselgel G nach Stahl mit ca. 13% CaSO₄ und einer mittleren Korngrösse von 10–40 μ von der gleichen Firma genommen.

Enzym- und Substratlösung

Die Herstellung der Enzympräparation und Substratlösung erfolgte für die Untersuchungen mit Rinderleberesterase in Anlehnung an ACKERMANN⁶, doch wurde, wie schon früher beschrieben⁷, das Homogenisieren der Leber und die Verdünnung der Enzympräparation mit 0.02 M Phosphatpuffer pH 7.0 durchgeführt. Als Substrat diente Naphthylacetat, als Kopplungsreagenz Echtblausalz B. Für das Besprühen der Platte wurde eine etwa 1:60 verdünnte Enzymlösung (w/v) genommen.

Die Trypsin-Untersuchungen wurden mit einer jeweils frisch bereiteten Lösung von 250 mg Trypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.4.4—Merck, 2.0 U/mg) in 50 ml 0.03 M Phosphatpuffer pH 8.0 durchgeführt. Als Substrat diente eine ebenfalls stets frisch angesetzte Suspension von 400 mg Na-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid in 50 ml des gleichen Puffers. Die angesetzten Lösungen reichen für sechs Platten. Eine genaue Beschreibung des Hemmtests findet sich an anderer Stelle⁸.

Der DC-enzymatische Nachweis mit Hilfe der Phosphatase-Hemmung erfolgte mit saurer Phosphatase aus Kartoffeln (EC 3.1.3.2—Boehringer, 2.0 U/mg) und alkalischer Phosphatase aus Kälbermucosa (EC 3.1.3.1—Serva, 1.0 U/mg) unter Verwendung von Nitrophenyl- bzw. Naphthylphosphat als Substrat. Die Methode des enzymatischen Hemmtests wurde ausführlich an anderer Stelle beschrieben⁹.

Als Enzymquelle für den Nachweis mit Hilfe der Amylase-Hemmung dient α -Amylase aus *Bacterium subtilis* (EC 3.2.1.1—Merck, 170 U/mg) oder β -Amylase aus Gerste (EC 3.2.1.2—Merck, 28 U/mg), als Substrat eine Lösung von löslicher Stärke in Puffer. Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung des enzymatischen Hemmtests erfolgte an anderer Stelle¹⁰.

Wirkstofflösungen und Dünnenschichtchromatographie

Benzophenon, 4-Chlorbenzaldehyd, 4-Chlorbenzoësäure, Benzoësäure, Chlorbenzol und Pentachlorphenol wurden in Konzentrationen von 10 mg/ml in Äthanol, 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol, 1,2,3-Trichlorbenzol und 1,2,4-Trichlorbenzol in Konzentrationen von 10 mg/ml in Benzol gelöst, auf handgegossene Kieselgel G-Platten⁷ aufgetragen und in Cyclohexan-Aceton (10:4) chromatographiert.

Durchführung des enzymatischen Hemmtests

Die Platten werden nach dem Entwickeln sofort oder nach 1-h Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254/366 nm einer Fluotest Universal-Lampe (Hanau) bei einem Abstand Strahler-Platte von ca. 20 cm zunächst leicht mit Puffer und anschliessend mit Enzymlösung besprüht. Nach 30-min Inkubation bei 25° und 80–90% Luftfeuchte wird mit Substrat nachgesprührt.

ERGEEINSSE UND DISKUSSION

Es ist bekannt, dass aus DDT unter dem Einfluss von UV- und Sonnenlicht unter anderem 4,4'-Dichlorbenzophenon entsteht^{11,12}, das selbst weder die Rinderleberesterase noch Trypsin, noch die saure Phosphatase hemmt, nach UV-Bestrahlung aber in einen Esterase-Hemmer übergeht¹³. Ausgehend vom 4,4'-Dichlorbenzophenon könnten durch Aufbrechen des Moleküls Chlorbenzol, 4-Chlorbenzoësäure, 4-Chlorbenzaldehyd und durch Dechlorierung Benzophenon entstehen. Als weiterer Metabolit wäre schliesslich noch Benzoësäure denkbar, die als Konservierungsmittel eine verbreitete Anwendung findet. Die Wirkung dieser Substanzen auf Enzyme ist ebensowenig bekannt wie die der Lindan-Metaboliten und des Pentachlorphenols, so dass es sinnvoll erschien, auch sie in die Untersuchungen über Möglichkeiten eines DC-enzymatischen Nachweises einzubeziehen.

TABELLE I

UNTERE NACHWEISGRENZE (μg) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG DER RINDERLEBERESTERASE

Laufmittelsystem: Cyclohexan-Aceton (10:4).

| Substanz | Ohne UV-Bestrahlung | Mit UV-Bestrahlung |
|--------------------------|---------------------|--------------------|
| 4-Chlorbenzaldehyd | — | — |
| 4-Chlorbenzoësäure | 10 | 10 |
| Benzophenon | 20 | 20 |
| Chlorbenzol | — | — |
| Benzoësäure | 10 | 5 |
| Pentachlorphenol | 0.01 | 0.03 |
| 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol | — | 50 |
| 1,2,3-Trichlorbenzol | — | 60 |
| 1,2,4-Trichlorbenzol | — | 80 |

Wie aus Tabelle I hervorgeht, wird die Rinderleberesterase von den Lindan-Metaboliten erst nach UV-Bestrahlung relativ schwach gehemmt, während die unbehandelten Substanzen keine Wirkung auf das Enzym zeigten. Von den übrigen untersuchten Verbindungen hemmen 4-Chlorbenzoësäure, Benzophenon und Benzoësäure die Esterase recht gut, wobei eine UV-Behandlung kaum einen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit hat. Lediglich bei der Benzoësäure wird die Nachweisgrenze durch UV-Bestrahlung von 10 auf 5 µg gesenkt. Der empfindlichste Nachweis ist für Pentachlorphenol möglich. Mit 10 ng liegt er in der Empfindlichkeit im Bereich der insektiziden Carbamate¹⁴, typischen Esterasehemmern, und mit UV-Behandlung kommt es nur zu einer unwesentlichen Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit, was völlig im Gegensatz zu den Erfahrungen mit insektiziden Carbamaten steht, die nach UV-Bestrahlung kräftig in ihrer Antiesterase-Aktivität abnehmen¹⁴. Diese Ergebnisse stehen aber auch im Widerspruch zu den mit Chlorkohlenwasserstoffen gemachten Erfahrungen, wo die Antiesterase-Wirkung nach UV-Behandlung zunahm⁷. Vor allem die Ergebnisse mit Pentachlorphenol zeigen deutlich, dass nicht unbedingt Verbindungen mit Esterkonfiguration wie die insektiziden Carbamate und Phosphorsäureester die Esterase allein hemmen—allerdings dürfte die Hemmung in diesem Fall wohl kaum nach dem bekannten Mechanismus über eine Acylierung des aktiven Zentrums verlaufen.

TABELLE II

UNTERE NACHWEISGRENZE (µg) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG VON TRYPSIN

Laufmittelsystem: Cyclohexan-Aceton (10:4).

| Substanz | Ohne UV-Bestrahlung | Mit UV-Bestrahlung |
|--------------------------|---------------------|--------------------|
| 4-Chlorbenzaldehyd | — | — |
| 4-Chlorbenzoësäure | 40 | 30 |
| Benzophenon | 20 | 20 |
| Chlorbenzol | — | — |
| Benzoësäure | 40 | 60 |
| Pentachlorphenol | 0.3 | 0.3 |
| 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol | 80 | 100 |
| 1,2,3-Trichlorbenzol | — | 100 |
| 1,2,4-Trichlorbenzol | — | 100 |

Die untersuchten Lindan-Metaboliten zeigen gegenüber Trypsin nur eine recht schwache Inhibitorwirkung; denn von den unbehandelten hemmt nur 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol das Enzym, während es nach UV-Bestrahlung von allen drei nur sehr schwach gehemmt wird (Tabelle II). Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol im Vergleich zu Lindan, das Trypsin nicht hemmt⁸, im Hinblick auf dieses Enzym als toxischer anzusehen ist, während die Bestrahlungsprodukte gegenüber denen des Lindans in ihrer Nachweisempfindlichkeit stark abfallen. 4-Chlorbenzoësäure, Benzoësäure und Benzophenon hemmen ebenfalls Trypsin, wobei UV-Bestrahlung den Nachweis von 4-Chlorbenzoësäure leicht verbessert und den von Benzoësäure leicht verschlechtert. Pentachlorphenol hemmt auch hier wieder die Enzymaktivität am stärksten (Tabelle II). Die Wirkung der Substanzen auf die Esterase und das Trypsin, die in ihrem aktiven Zentrum recht ähnlich sind,

TABELLE III
UNTERE NACHWEISGRENZE (μg) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG DER SAUREN UND ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Substrat: Nitrophenylphosphat bzw. Naphthylphosphat. Laufmittelsystem: Cyclohexan-Aceton (10:4).

| Wirkstoff | Ohne Vorbehandlung | | Nach UV-Bestrahlung | |
|--------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | Alkalische Phosphatase | | Saurer Phosphatasen | |
| | Nitrophenyl-phosphat | Naphthyl-phosphat | Nitrophenyl-phosphat | Naphthyl-phosphat |
| 4-Chlorbenzaldehyd | 80 | 40 | 20 | 70 |
| 4-Chlorbenzoësäure | 10 | 1 | 10 | 30 |
| Benzophenon | 5 | 1 | 0,5 | 0,8 |
| Chlorbenzol | — | — | — | — |
| Benzoësäure | 20 | 5 | 10 | 60 |
| Pentachlorphenol | 0,8 | 0,1 | 0,5 | 0,8 |
| 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol | — | — | 90 | 100 |
| 1,2,3-Trichlorbenzol | — | — | — | — |
| 1,2,4-Trichlorbenzol | — | — | — | — |

stimmt recht gut überein, doch kann man mit Ausnahme des Benzophenon allgemein eine Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit mit Trypsin feststellen, die jedoch beim Pentachlorphenol mit einem Faktor von 10 am ausgeprägtesten ist. Diese Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit mit Trypsin konnte allerdings auch schon bei den Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden festgestellt werden⁸.

Beide Phosphatasen werden durch den grössten Teil der untersuchten Verbindungen gehemmt, wobei die saure Phosphatase in den meisten Fällen stärker gehemmt wird (Tabelle III). Die fehlende Hemmung der Enzyme durch Chlorbenzol dürfte hier ebenso wie bei den anderen Nachweisreaktionen darauf beruhen, dass die Substanz weitgehend verdunstet ist. Mit alkalischer Phosphatase gestaltet sich der Nachweis mit Naphthylphosphat stets empfindlicher als der mit Nitrophenylphosphat, während bei der sauren Phosphatase z. T. recht erhebliche Empfindlichkeiteinbussen beim Nachweis mit Naphthylphosphat festzustellen sind. Damit scheint ein nicht unerheblicher Substrateinfluss bei der Hemmintensität vorzuliegen; denn die Chlorkohlenwasserstoffe zeigten mit Naphthylphosphat stets eine grössere Nachweisempfindlichkeit¹⁵. Eine UV-Bestrahlung bringt nur in wenigen Fällen eine Verbesserung des Nachweises. Besonders auffällig ist die starke Hemmung vor allem der sauren Phosphatase durch Benzophenon.

Die Amylasen schliesslich werden nur von drei Substanzen gehemmt (Tabelle IV), wobei die β -Amylase empfindlicher reagiert, wie auch schon an anderer Stelle beobachtet wurde^{10,16}. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Pestiziden¹⁶ ist Pentachlorphenol der weitaus stärkste Amylase-Hemmer. Eine UV-Bestrahlung bringt in diesem Fall nur einen geringen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Möglichkeit eines DC-enzymatischen Nachweises für die einzelnen Substanzen recht unterschiedlich ist. Einige Verbindungen, wie Benzophenon und Pentachlorphenol hemmen alle untersuchten Enzyme, 4-Chlorbenzoësäure und Benzoësäure hingegen alle Enzyme mit Ausnahme der Amylasen, wobei man nicht eindeutig sagen kann, ob das Chlor eine Verstärkung der Hemmwirkung hervorruft oder nicht. 4-Chlorbenzaldehyd wiederum hemmt nur die Phosphatasen und Amylasen, nicht aber die Esterase und Trypsin.

TABELLE IV

UNTERE NACHWEISGRENZE (μg) DER UNTERSUCHTEN WIRKSTOFFE MIT UND OHNE UV-BESTRAHLUNG INFOLGE HEMMUNG DER AMYLASEAKTIVITÄT

Laufmittelsystem: Cyclohexan-Aceton (10:4).

| Substanz | α -Amylase | | β -Amylase | |
|--------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | Ohne UV-Bestrahlung | Mit UV-Bestrahlung | Ohne UV-Bestrahlung | Mit UV-Bestrahlung |
| 4-Chlorbenzaldehyd | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4-Chlorbenzoësäure | — | — | — | — |
| Benzophenon | 50 | 50 | 10 | 10 |
| Chlorbenzol | — | — | — | — |
| Benzoësäure | — | — | — | — |
| Pentachlorphenol | 1 | 3 | 0.9 | 1 |
| 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol | — | — | — | — |
| 1,2,3-Trichlorbenzol | — | — | — | — |
| 1,2,4 Trichlorbenzol | — | — | — | — |

Die Lindan-Metaboliten schliesslich lassen sich in der Regel nur nach UV-Bestrahlung nachweisen; lediglich 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol hemmt auch ohne vorherige Aktivierung Trypsin und die saure Phosphatase leicht.

Sofern bei den wenigen untersuchten Enzymen überhaupt ein solcher Schluss zulässig ist, würde es sich aufgrund dieser Ergebnisse bei den Lindan-Metaboliten eindeutig um Detoxifizierungsprodukte handeln, obwohl die Chlorbenzole bei den resistenten Fliegenstämmen nicht den Hauptstoffwechselweg darstellen sollen⁵, Alternativ-Stoffwechselwege aber fehlen. Eine ähnliche Unbedenklichkeitserklärung kann für die möglichen DDT-Metaboliten nicht ohne weiteres gegeben werden, da einige der untersuchten Enzyme doch relativ stark gehemmt werden und auf diese Weise einen, wenn auch recht unspezifischen, Nachweis erlauben, der wiederum gleichzeitig Aufschluss über eventuelle Nebenwirkungen gibt. Die grössten Bedenken sollte man jedoch Pentachlorphenol entgegenbringen, über dessen Rückstandsverhalten wenig bekannt ist, und das doch alle untersuchten Enzyme recht stark hemmt.

DANK

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

ZUSAMMENFASSUNG

Die Möglichkeit eines dünnenschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweises der Verbindungen ρ -Chlorbenzaldehyd, ρ -Chlorbenzoësäure, Benzophenon, Chlorbenzol, Benzoësäure, Pentachlorphenol, 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol, 1,2,3-Trichlorbenzol und 1,2,4-Trichlorbenzol wurde mit den Enzymen Rinderleberesterase, Trypsin, alkalische und saure Phosphatase sowie α - und β -Amylase untersucht. Pentachlorphenol hemmt alle untersuchten Enzyme stark, wobei die nachgewiesenen Mengen im Bereich von 10 ng mit Rinderleberesterase bis 3 μ g mit α -Amylase liegen. Benzophenon hingegen hemmt nur die Phosphatasen stark, alle übrigen Enzyme jedoch mittelmässig. Chlorbenzol kann mit Hilfe der Enzymhemmung nicht nachgewiesen werden, und die übrigen Substanzen zeigen ein unterschiedliches Verhalten und sind oft nur nach UV-Bestrahlung nachzuweisen.

LITERATUR

- 1 E. P. LICHTENSTEIN UND J. P. POLIVKA, *J. Econ. Entomol.*, 52 (1959) 289.
- 2 F. R. BRADBURY UND H. STANDEN, *J. Sci. Food Agric.*, 9 (1958) 203.
- 3 P. L. GROVER UND P. SIMS, *Biochem. J.*, 96 (1965) 521.
- 4 W. T. REED UND A. J. FORGASH, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 896.
- 5 W. T. REED UND A. J. FORGASH, *J. Agr. Food Chem.*, 18 (1970) 475.
- 6 H. ACKERMANN, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 309.
- 7 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 95.
- 8 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 447.
- 9 F. GEIKE, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 134.
- 10 F. GEIKE, *Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 203.
- 11 R. D. CHISHOLM, R. H. NELSON UND E. E. FLECK, *J. Econ. Entomol.*, 42 (1949) 154.
- 12 E. E. FLECK, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71 (1949) 1034.
- 13 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 282.
- 14 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 269.
- 15 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 279.
- 16 F. GEIKE, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 343.