

Berichte aus der Chemie

Ingrid Walz

**Enzyme Inhibition Assays for the Determination of
Insecticidal Organophosphates and Carbamates**

D 100 (Diss. Universität Hohenheim)

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7459-7

ISSN 0945-070X

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung schneller, biochemischer Prüfmethode zum Nachweis insektizider Organophosphate und Carbamate in pflanzlichen Lebensmitteln unter Ausnutzung deren enzymhemmender Eigenschaften. Enzym-Schnelltests ermöglichen eine rasche Identifizierung positiver Proben und einen höheren Probendurchsatz bei der amtlichen Lebensmittelkontrolle, indem nur positive Probenbefunde dieser Vortests weitergehend zu untersuchen sind. Infolge der einfachen Durchführung und simultanen Messung – z.B. in einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte – sind die Ergebnisse für eine Vielzahl von Proben innerhalb weniger Stunden zu erzielen. Zunächst wurde ein Cutinase (*Fusarium solani pisi*)-Hemmtest im Mikrotiterplatten-Format entwickelt.

Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Hemmtestes war ein vorgeschalteter Oxidationsschritt notwendig, um die weniger hemmaktiven Organophosphat-Thionen in die entsprechenden Oxon-Derivate überzuführen. Auf diese Weise lässt sich die Hemmstärke und somit die Nachweisempfindlichkeit des Tests um ungefähr zwei Zehnerpotenzen erhöhen. Es galt einen milden und dennoch effektiven Oxidationsschritt zu entwickeln, welcher nicht den anschließenden Hemmtest störte. Es wurde ein enzymatischer Ansatz gewählt mittels Chlorperoxidase *Caldariomyces fumago* und Wasserstoffperoxid.

Im dem Bestreben, einen Multienzym-Hemmtest zu entwickeln, wurden weitere Esterasen hinsichtlich ihres Hemmverhaltens durch ausgewählte Insektizide untersucht. Aufgrund unterschiedlichen Hemmverhaltens kann eine qualitative Eingrenzung und Identifizierung eines möglichen Inhibitors vorgenommen werden. Die Kombination aus Cutinase mit Hasenleber Esterase und der rekombinanten *Bacillus subtilis* Esterase BS2 erwies sich als optimal. Organophosphat-Oxone üben die stärkste Hemmwirkung auf diese drei Enzyme aus, allen voran Chlorpyrifos-oxon und Paraoxon, wobei die Organophosphat-ethyl-Derivate deutlich stärkere Hemmwirkungen zeigen als die entsprechenden Methyl-Analogen. Die Nachweisgrenzen für Organophosphate lagen zwischen $3,5 \times 10^{-4}$ mg/L (Paraoxon) und 17 mg/L (Acephat) für Esterase BS2, zwischen $1,6 \times 10^{-5}$ mg/L (Paraoxon) und 6,4 mg/L (Monocrotophos) für Hasenleber Esterase, und zwischen $2,2 \times 10^{-3}$ mg/L (Chlorpyrifos-oxon) und 100 mg/L (Parathion) für Cutinase. Die am stärksten hemmenden Carbamate – Carbaryl bezüglich Esterase BS2 und Ethiofencarb bezüglich Hasenleber Esterase – haben Nachweisgrenzen von jeweils 0,12 mg/L und 0,04 mg/L. Die Carbamate Methomyl und Carbaryl sind mit Nachweisgrenzen von 3,2 mg/L und 10,8 mg/L die stärksten Cutinase-Hemmer. Cutinase ist zwar weniger Insektizid-empfindlich als die beiden anderen Esterasen, reagiert dafür aber auch wesentlich unempfindlicher auf Pflanzenmatrix. Die Empfindlichkeit von Cutinase ist ausreichend hoch für die Rückstandsanalytik.

Der Multienzym-Hemmtest konnte erfolgreich für die Rückstandsbestimmung in dotierten Pflanzenproben verschiedener Matrix eingesetzt werden. Wegen der Matrixempfindlichkeit der verwendeten Enzyme war der Einsatz völlig farbloser Probenextrakte erforderlich. Daher wurde für die mittels der QuEChERS-Methode gewonnenen Acetonitril-Extrakte eine Reinigungsmethode mittels Festphasenextraktion entwickelt. Hierzu wurde eine Kombination aus starkem Anionen-Austauscher (SAX), Primär-Sekundär-Amin-Phase (PSA) und C18-Umkehrphase (C18_{endcapped}) verwendet. Die besten Ergebnisse wurden in Fruchtsäften erzielt.

Im dem Bestreben, einen noch einfacheren Enzym-Schnelltestes zu entwickeln, wurde die Einsetzbarkeit des reflektometrischen Streifenfestes Reflectoquant[®] für die Rückstandsanalytik untersucht. Aufgrund ihrer Zwischenstellung zwischen Esterase und Lipase erwies sich Cutinase als geeignet, das länger-kettige Substrat 5-Brom-4-chlor-3-Indoxylcaprylat auf den Teststreifen umzusetzen. Dies ermöglicht die Anwendbarkeit dieses Schnelltests für die Pestizid-Rückstandsanalytik, und somit ein noch preiswerteres und einfacheres Vorgehen.