

59. Der Abbau des Insektizides GS 13005 in der Ratte. Strukturaufklärung der wichtigsten Metabolite [1]

von H. O. Esser, W. Mücke und K. O. Alt

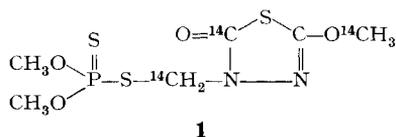
Forschung Agro-Chemikalien, J. R. GEIGY A.G., Basel

(5. I. 68)

Summary. The structures of the essential metabolites which are excreted by the rat after oral application of GS 13005 (O,O-dimethyl-S-[(2-methoxy-1,3,4-thiadiazole-5(4*H*)-one-4-yl)-methyl] dithiophosphate) have been elucidated. The product of final oxidation, CO₂, was found to be the main metabolite (up to 36% of the dose applied). Among the degradation products excreted in the urine (up to 45% of the dose applied) the two most important were isolated. They are 4-methylsulfinylmethyl and 4-methylsulfonylmethyl derivatives respectively of the intact 2-methoxy-1,3,4-thiadiazole-5-one heterocycle (metabolites III and II, in amounts of 20–25% and 5–7% of the dose applied, respectively). These metabolites originate by methylation and subsequent oxidation from the mercaptomethyl derivative liberated after hydrolysis of the P–S bond of the dithiophosphoric acid ester.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über den Metabolismus des Dithiophosphorsäureesters GS 13005¹⁾ ist bereits über sein allgemeines metabolisches Verhalten sowohl in Pflanzen als auch im Tier [1] [2] [3] berichtet worden. Dabei wurde der Beweis für den intensiven und raschen Abbau der Substanz erbracht. Als Hauptausscheidungswege für die Metabolite erwiesen sich bei beiden Organismen die Atemluft und beim Tier zusätzlich der Urin.

In der vorliegenden Arbeit wird die Strukturaufklärung der wichtigsten Metabolite beschrieben, die von der Ratte nach oraler Applikation von GS 13005 ausgeschieden werden. Durch isotope Markierung mit ¹⁴C wahlweise an drei verschiedenen Stellen [4] war es möglich, das Schicksal der Molekel eingehend zu verfolgen. Formel 1 gibt die Struktur von GS 13005 und die Stellungen der jeweiligen ¹⁴C-Markierung wieder:



Im Rahmen von Bilanzuntersuchungen wurde die Abgabe von radioaktivem CO₂ mit der Atemluft als einer der beiden Hauptwege der Ausscheidung von Meta-

1) (Dithiophosphorsäure-0,0-dimethyl-S-[(2-methoxy-1,3,4-thiadiazol-5(4*H*)-on-4-yl)-methyl]-ester)^{1a)}; Wirkstoff der Handelspräparate Supracid® und Ultracid®.

1a) *Anmerkung der Redaktion.* Um die Einheitlichkeit der Benennung dieser und ähnlicher Verbindungen in den verschiedenen Veröffentlichungen der Firma J. R. GEIGY A.G. nicht zu stören, hat die Redaktion auf ausdrücklichen Wunsch der Verfasser die von ihnen verwendete Bezifferung beibehalten, obgleich sie den IUPAC-Regeln nicht entspricht. Korrekterweise sollte dieser Ester als Dithiophosphorsäure-0,0'-dimethyl-S [(5-methoxy-1,3,4-thiadiazol-2(3*H*)-on-3-yl)-methyl]-ester bezeichnet werden.

boliten festgestellt. In der Fig. 1 ist diese Ausscheidung bei der Ratte nach oraler Applikation der drei Markierungstypen graphisch dargestellt.

Man erkennt den schnellen und vollständigen Abbau der gesamten Molekel bis zur Endoxydation der entstehenden C_1 -Fragmente zu CO_2 . Dessen Abgabe ist im wesentlichen innerhalb 48 Stunden nach Applikation beendet.

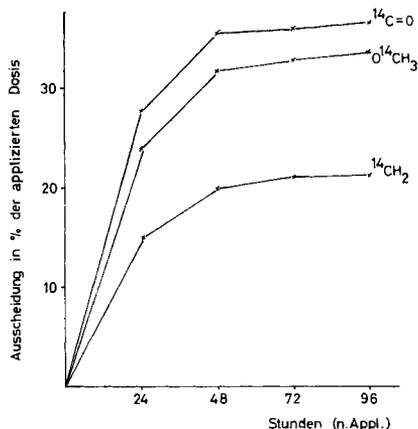


Fig. 1. Ausscheidung von $^{14}CO_2$ nach Fütterung von unterschiedlich ^{14}C -markiertem GS 13005 bei der Ratte

Jeder Zeitwert repräsentiert einen Mittelwert aus vier Versuchen

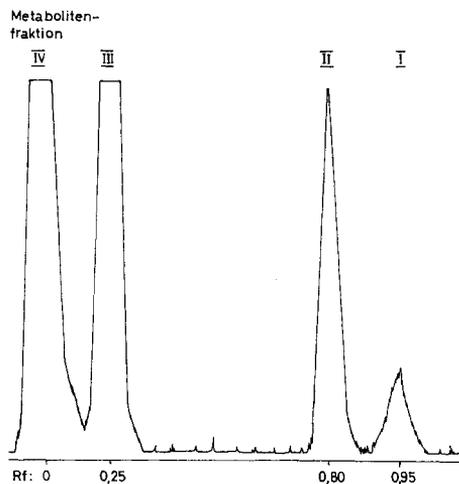


Fig. 2. Metabolitenmuster im Urin der Ratte nach Fütterung von $^{14}C=O$ -markiertem GS 13005 (Radiochromatogramm: System A)

Neben dem CO_2 als Hauptmetaboliten wurde im Urin ein etwas grösserer Anteil der applizierten Dosis in Gestalt polarer Abbauprodukte ausgeschieden (bei Versuchen mit $^{14}C=O$ -Markierung bis zu 45%). Fig. 2 zeigt das Metabolitenmuster des Urins.

Die Fraktionen I–III erwiesen sich als einheitlich, während sich Fraktion IV aus mindestens vier sehr polaren Substanzen zusammensetzte, die z. T. Säurecharakter besaßen. Von wesentlicher Bedeutung war der Befund, dass das Muster in qualitativer Hinsicht vom Typ der verwendeten Markierung unabhängig war, d. h. dass es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um primäre Metabolite handelte, die den intakten Heterozyklus mit der Methylenbrücke noch enthielten.

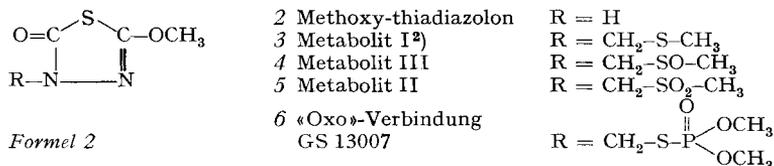
Obwohl Metabolit I intermediär beim Abbau des GS 13005 entsteht, wie später gezeigt wird, ist sein Auftreten im Urin artifizuell, da er aus Metabolit III gebildet wird, wenn der Urin im Kontakt mit Kot längere Zeit ohne Kühlung stehen bleibt.

Eine weitere Umwandlung wurde bei Reinigungsversuchen des Metaboliten III beobachtet. Bei der Chromatographie von Rohfraktionen an Kieselgelsäulen mit Essigsäure-äthylester fand eine Umwandlung in den Metaboliten II statt. Durch diese Umwandlungen wurde zunächst die nahe Verwandtschaft der Metabolite I–III untereinander festgestellt.

In einer Reihe von Spaltungsversuchen konnte die Annahme, dass die Metabolite I–III noch den intakten Heterozyklus enthalten, gestützt werden. Wurde z. B. der Metabolit III mit Jodwasserstoffsäure oder mit Hydrazin gespalten, so gingen

die ^{14}C -Markierungen an der Methylen- und an der Methoxy-Gruppe verloren, während diejenige an der Carbonylgruppe erhalten blieb. In Kontrollversuchen mit GS 13005 und mit dem Methoxy-thiadiazolon (siehe Formel 2, Struktur 2) gelangte man zu den gleichen Abbaumustern; bei der Jodwasserstoffspaltung des Ringes z. B. wurde selektiv die Methoxygruppe entfernt.

Während dieser Vorversuche wurden 5,7 Liter Rattenurin gesammelt von Tieren, die mit $^{14}\text{C}=\text{O}$ -markiertem GS 13005 gefüttert wurden. Mit Hilfe des im experimentellen Teil beschriebenen Aufarbeitungsverfahrens wurden 37 mg Metabolit III und 12 mg Metabolit II isoliert. Deren spektroskopische Untersuchung führte eindeutig zu den Strukturen 3, 4 und 5, die in der Formel 2 wiedergegeben sind.

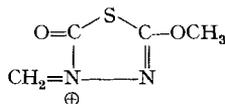


Allen drei Metaboliten sind die folgenden, für den methoxylierten Thiadiazolon-Ring charakteristischen Merkmale gemeinsam:

IR.-Spektrum: Absorptionsbanden bei 1685 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) und 1585 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$)

NMR.-Spektrum: Singulett bei $\tau = 6,00$ (OCH_3)

Massenspektrum: Basissignal bei m/e 145 für



Bei allen Metaboliten fehlen die Merkmale für den Dithiophosphorsäureester-Teil, welche im Falle des GS 13005 im IR.-Spektrum bei 1010 cm^{-1} ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$) und im NMR.-Spektrum bei $\tau = 4,83$, Dublett $J = 16\text{ Hz}$ ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{P}$), und $\tau = 6,21$, Dublett $J = 15\text{ Hz}$ ($\text{P}-\text{O}-\text{CH}_3$) auftreten.

Die Unterschiede der Substituenten in 4-Stellung des Thiadiazolonringes bei den einzelnen Metaboliten machen sich in der chemischen Verschiebung zweier NMR.-Signale bemerkbar:

Metabolit I:	$\tau = 5,15$ für $\text{N}-\text{CH}_2-\text{S}$,	$\tau = 7,72$ für $\text{S}-\text{CH}_3$
Metabolit III:	$\tau = 5,12$ für $\text{N}-\text{CH}_2-\text{SO}$,	$\tau = 7,30$ für $\text{SO}-\text{CH}_3$
Metabolit II:	$\tau = 5,00$ für $\text{N}-\text{CH}_2-\text{SO}_2$,	$\tau = 6,97$ für SO_2-CH_3

Beim Metaboliten II sind diese beiden Signale in ein Quartett und ein Triplet aufgespalten mit einer Kopplungskonstanten von $0,8\text{ Hz}$.

Im Massenspektrum wurden die folgenden Molekularsignale bestimmt:

	m/e	Hochauflösung (ca. 1:30000)	
Metabolit I:	192	gef. 192,001	ber. 192,002
Metabolit III:	208	gef. 207,996	ber. 207,997
Metabolit II:	224	gef. 223,993	ber. 223,992

²⁾ Im Falle des Metaboliten I wurde nur synthetisches Material untersucht; der Identitätsbeweis wurde durch chromatographische Vergleiche des Umwandlungsproduktes aus Metabolit III in Urin mit synthetischer Referenzsubstanz geführt.

Weitere Charakteristika zeigt das IR.-Spektrum des Metaboliten III mit einer SO-Bande bei 1040 cm^{-1} und das des Metaboliten II mit Banden bei 1310 und 1130 cm^{-1} für die SO_2 -Gruppe.

Diese Strukturen wurden durch Vergleich mit den entsprechenden synthetischen Referenzsubstanzen [5] bestätigt.

Damit kann folgender Abbauweg formuliert werden: Bei der Spaltung des Dithiophosphorsäureesters verbleibt der Schwefel auf der Seite des Heterozyklus (analog der chemischen Hydrolyse in alkalischem Milieu). Die entstandene Thiol-Verbindung wird anschliessend methyliert und zum polaren Sulfoxid oxydiert. Der grösste Teil des Sulfoxides entkommt einer weiteren Oxydation zum Sulfon (Verhältnis Sulfoxid : Sulfon ca. 4:1) und wird direkt ausgeschieden.

Weitere Zwischenstufen bis zum Endoxydationsprodukt CO_2 wurden nicht isoliert; ob solche in der Metabolitenfraktion IV enthalten sind, wurde nicht geprüft.

Die Anwesenheit des Oxydationsproduktes GS 13007 und des Methoxy-thiadiazolons (siehe Formel 2, Strukturen **6** und **2**) im Urin wurde mit Hilfe chromatographischer Methoden ausgeschlossen.

Über die toxikologischen und biologischen Eigenschaften der isolierten Metabolite sowie über ihr Verhalten im Metabolismus, wenn sie selbst appliziert werden, ist an anderer Stelle berichtet worden [1] [3].

Frl. S. KÜNZLI und Frl. V. CARENZI danken wir für ausgezeichnete experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

1. Substanzen. – Über die Synthese von GS 13005, seinen Derivaten und Metaboliten [5] sowie über die mehrfache ^{14}C -Markierung der Molekel [4] wird an anderer Stelle berichtet.

2. Tierversuche. – *Versuchsapparaturen.* Geschlossene Ganzglas-Stoffwechsellapparaturen zur Trennung von Urin, Kot und Atemluft.

Dosierung. Zur Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung: Unabhängig vom Markierungstyp jeweils 0,8 mg GS 13005 pro Ratte (männlich, 200 g Körpergewicht) in 1,2 ml 25-proz. Äthanol mittels Schlundsonde.

Zur Metabolitengewinnung: viermalige Dosierung wie zuvor im Abstand von 24 Std.; dann Ersatz durch unbehandelte Tiere. Ca. $\frac{1}{6}$ der Tiere erhielt ^{14}C =O-markiertes, der Rest nicht markiertes GS 13005. Die gesammelte Urinmenge von 5,7 l entsprach etwa 825 Rattentagesmengen, die applizierte Dosis ca. 0,65 g GS 13005.

3. Trennsysteme. – *Dünnschichtchromatographie* (DC; Kieselgel G (MERCK), 0,025 cm): System A: Benzol-Chloroform-Essigsäure-äthylester-Propanol 4:2:4:2; System B: Benzol-Äthanol 9:1; System C: Chloroform-Aceton 9:1; System D: Benzol-Chloroform-Essigsäure-äthylester 4:4:2.

Gegenstromverteilung (GV; 10 ml Phasenvolumen): System E (60 Stufen): Essigsäure-äthylester- H_2O ; System F (70 Stufen): Nitromethan- H_2O /Methanol (8/2).

Säulenchromatographie (SC): System G: Kieselgel G (MERCK), 0,05–0,20 mm; Säule 14 cm \times 0,9 cm \varnothing . Lösungsmittel Methylenchlorid, 5 ml Fraktionen.

4. Meßsysteme. – *Radioaktivität:* Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 4312, PACKARD INSTR. CORP.

Messung von $^{14}\text{CO}_2$: Absorption des ausgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ in NaOH, Übertreiben in Methanol-Äthanolamin (88:12) mittels H_2SO_4 und Überführen von 5-ml-Aliquoten zu 10 ml Scintillatorlösung I.

Messung von Urin und gelösten Metaboliten: Scintillatorlösung II.

Scintillatorlösungen: I Toluol-Glykolmonomethyläther 666 + 333 ml, 5,5 g PPO; II Dioxan-Glykolmonomethyläther 1000 + 200 ml, 12 g PPO, 0,6 g POPOP, 60 g Naphtalin.

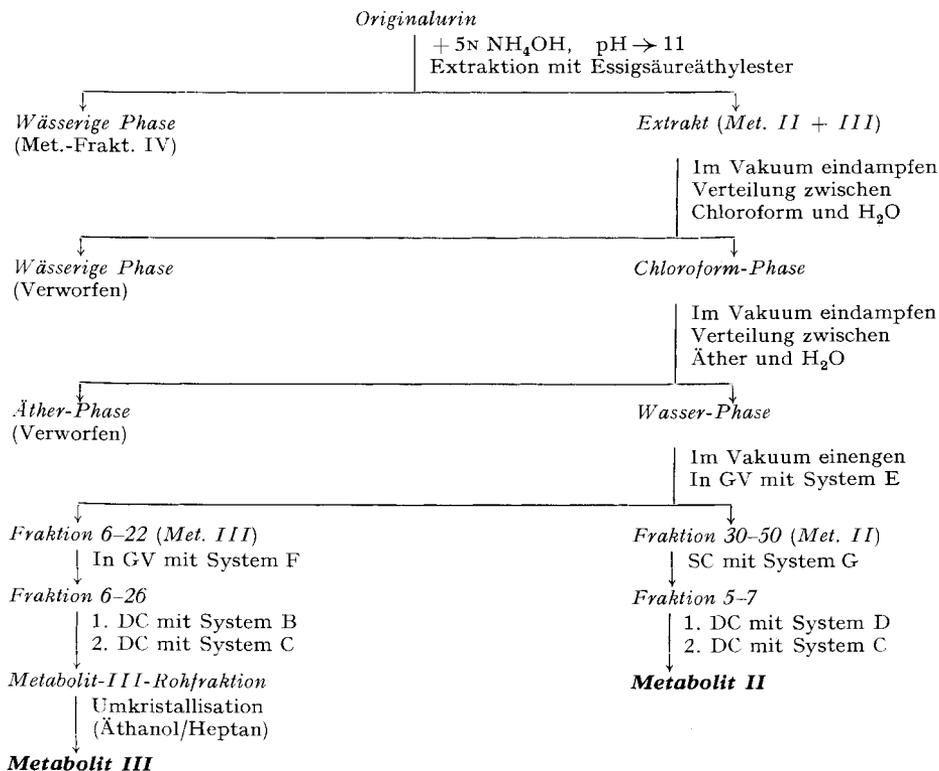
Dünnschichtchromatogramme mit radioaktiven Fraktionen: Actigraph III der NUCLEAR CHICAGO CORP.

Spektren: Die IR.-Spektren wurden auf einem PERKIN-ELMER-Spektrographen Modell 221 mit NaCl-Prisma aufgenommen. Präparationstechnik: KBr.

Die NMR.-Spektren wurden auf einem VARIAN-Spektrographen Modell HA-100 in CDCl_3 registriert. Als interner Standard diente Tetramethylsilan.

Die Aufnahme der MASSENSPEKTREN erfolgte auf einem hochauflösenden Spektrometer der CONSOLIDATED ELECTRODYNAMICS CORPORATION, Modell 21-110-B.

5. Verfahren zur Isolierung der Urin-Metabolite



LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teilweise vorgetragen am 6. Internationalen Pflanzenschutzkongress, 30. August / 6. September 1967, Wien; Abstr. S. 199.
- [2] H. O. ESSER & P. W. MÜLLER, *Experientia* 22, 36 (1966).
- [3] H. O. ESSER, G. DUPUIS & W. MÜCKE, in Vorbereitung.
- [4] J. E. CASSIDY, D. P. RYSKIEWICH & R. T. MURPHY, *J. Agric. Food Chemistry*, in Vorbereitung.
- [5] K. RÜFENACHT, *Helv.* 51, 518 (1968).