

Abbau und Toxizität von Hexachlorbicyclo [2.2.1]-hept-5-en-Derivaten (Cyclodien-Insektizide)

Structural Aspects of Biological Conversion and Toxicity of Hexachloro-norbornene Derivatives (Cyclodiene-Insecticides)

W. RÜCKERT und K. BALLSCHMITER

Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

(Z. Naturforsch. 28 c, 107–112 [1973]; eingegangen am 18. September 1972/4. Januar 1973)

Biological conversion, cyclodiene-insecticides, house-fly, piperonyl butoxide, intrinsic toxicity

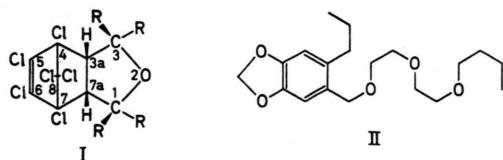
The aspects of molecular-structure and biological conversion have been studied for 12 derivatives of the endosulfan ether **1** [4, 5, 6, 7, 8, 8-hexachloro-1, 3, 3a, 4, 7, 7a-hexahydro-4, 7-methanoisobenzofuran]. Adults of a normal house-fly strain (*Musca domestica*) have been used in the assay.

Derivatives of **1** monosubstituted in position 1 are found to be converted substantially faster than products disubstituted in position 1 and 3, respectively. Metabolism is inhibited for all compounds studied after application of piperonyl butoxide as a synergist. Besides proving that on oxidative metabolism has to be discussed and in fact could be proved for some derivatives, the intrinsic toxicity of the compounds studied shows up under these conditions. Some derivatives known to be metabolites of the pesticide Endosulfan® show a high intrinsic toxicity to houseflies if the oxidative metabolism is inhibited.

Einleitung

Es ist heute allgemein bekannt^{1,2}, daß der oxydative Metabolismus (= Hydroxylierung) von Insektiziden durch Methylendioxyphenyl-Derivate (Sesamex, Piperonylbutoxyd) stark herabgesetzt, wenn nicht sogar blockiert wird, da Methylendioxyphenyl-Verbindungen den für den oxydativen Metabolismus verantwortlichen mikrosomalen polyfunktionellen Oxygenasen²³ als alternatives Substrat zu den Wirkstoffen dienen.

Da nach bisherigen Ergebnissen der Untersuchung des Metabolismus verschiedener Cyclodien-Insektizide³⁻⁷ eine Hydroxylierung durch polyfunktionelle Oxygenasen in 1- und 3-Stellung von I als



ein bevorzugter Abbaumechanismus angesehen werden muß, sollten Substituenten in diesen Positionen sich hemmend auf die Umwandlung auswirken.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. BALL-SCHMITER, Institut für Anorgan. Chemie und Analytische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität, D-6500 Mainz, Joh.-Joachim-Becher-Weg 24.

Andererseits sollte eine Hemmung der mikrosomalen polyfunktionellen Oxygenasen durch Methylen-dioxyphenyl-Verbindungen Rückschlüsse auf die Beteiligung dieser Enzyme am Abbau zulassen¹. Zugleich ist zu erwarten, daß durch die Blockierung des Wirkstoffabbaus Aussagen zur eigentlichen Toxizität (intrinsic toxicity) der untersuchten Verbindungen möglich werden. Ergebnisse dieser Art sind besonders deswegen interessant, weil für eine Reihe von Cyclodien-Insektiziden Derivate von 1 als Metabolite auftreten^{5,7}.

Als Pestizid-Synergist setzten wir in unseren Untersuchungen Piperonylbutoxyd (= PBO) (II) ein. Insgesamt verfolgten wir den Ablauf des Abbaus von 13 verschiedenen, strukturell ähnlichen Cyclodien-Insektiziden ohne und mit Zusatz von Piperonylbutoxyd. Tab. I gibt eine Übersicht über die eingesetzten Verbindungen.

Konfiguration und Konformation aller in der Arbeit untersuchten Derivate von 1 wurden bereits zum Teil schon von RIEM SCHNEIDER^{21,22} untersucht, der gezeigt hat, daß Hexachlorbicyclo [2.2.1]-hept-5-en-Derivate der *cis-endo*-Reihe angehören, was durch ¹H-NMR-spektroskopische Messungen bestätigt werden konnte^{23a-25}.

Die in 1-Stellung mono- bzw. in 1.3-Stellung dissubstituierten Derivate von 1 tragen ihre Substituenten



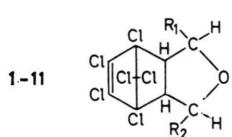
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht:
Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I.

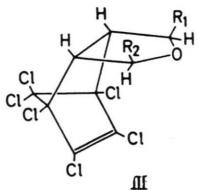


Übersicht über die eingesetzten Hexachlorbicyclo [2.2.1] hept-5-en-Derivate.

Verbindung	R ₁	R ₂	Fp. [°C]	Synthese Lit.	Struktur Lit.
1	H	H	226	8	9
2	H	Cl	89	10	9
3	H	OH	235	11, 12	9
4	H	OCH ₃	94	12, 13 14, 15	
5	H	OC ₂ H ₅	97	12, 13, 14, 15	
6	H	OCOCH ₃	129	12	9
7	F	F	181–82	14	
8	Cl	Cl	122–23	14, 16, 17	9, 13
9	OCH ₃	OCH ₃	166	14	9, 13
10	OC ₂ H ₅	OC ₂ H ₅	77	14	13
11	OCOCH ₃	OCOCH ₃	168	13, 14	13
12			260–63	11, 18	
13 (=Alodan®)			105–07	19	20

den Wasserstoffatomen an Kohlenstoff 3a und 7a gleichgerichtet^{9,13,20} (siehe III). Den wenigen nicht untersuchten Verbindungen wurde eine analoge Konfiguration zugeordnet.

schließend in ein Sammelgefäß überführt, das als Aufenthaltsort für 0, 2, 5, 10 und 24 Stdn. diente. Bei den Versuchen wurde stets mit 20 Fliegen pro Versuchsansatz gearbeitet.



Experimenteller Teil

Versuchstiere, Applikation, Aufarbeitung

Es wurden adulte Tiere des Normalstammes von *Musca domestica*, die 1 bis 10 Tage alt waren, verwendet. Die Tiere wurden bei Temperaturen von 27-30 °C gehalten und mit Zuckerwasser gefüttert.

Bei Versuchsbeginn wurden die Fliegen mit CO_2 narkotisiert und nach der Wirkstoff-Applizierung an-

Die Wirkstoffe wurden in Aceton gelöst und mit Hilfe von 1 µl-, 2 µl- oder 5 µl- „Microcaps“® auf den dorsalen Teil des Thorax aufgebracht. Die applizierte Wirkstoffmenge je Fliege richtete sich dabei nach der Giftigkeit der betreffenden Verbindung und bewegte sich inzwischen 0,01 µg bei 8 und 0,5 µg bei 1. Zur Bestimmung der verbliebenen Wirkstoffmenge wurden die Fliegen mit 5 ml Toluol übergossen und mit Hilfe eines Glasstabes unter Verwendung von etwas Na₂SO₄ (wasserfrei) fein zerrieben. Der Toluolextrakt wurde ohne weitere Reinigung gaschromatographisch untersucht.

Da es galt, in den Synergismus-Versuchen den Synergisten in seiner optimalen Wirksamkeit kennenzulernen, wurden die für Piperonylbutoxyd von BROOKS und HARRISON²⁶ ermittelten Bedingungen berücksichtigt, was bedeutete, daß der Synergist immer 1 Std.

* Made in USA by Drummond Scientific Co.

vor Applizierung der jeweiligen Cyclodien-Insektizide eingesetzt wurde, und zwar stets 5 µg Piperonylbutoxyd in 1 µl Aceton gelöst auf den dorsalen Teil des Thorax der Fliege.

Durch Vergleich der Ausfallziffern an Fliegen zwischen dem Versuch ohne und dem entsprechenden mit Zusatz von Piperonylbutoxyd konnte bereits qualitativ auf ein Vorliegen oder Nichtvorliegen einer synergistischen Wirkung geschlossen werden, was dann quantitativ analytisch zu untermauern war.

Als „tot“ (siehe Fliegenausfall) wurden entsprechend der Praxis bei LD₅₀-Bestimmungen alle Fliegen bezeichnet, die in Rückenlage liegen, ohne Rücksicht darauf, ob Exitus schon eingetreten ist oder nicht, d. h. alle Fliegen in reversibler und irreversibler Rückenlage.

Gaschromatographie

Gaschromatograph: Becker-Delft-Gerät Modell-Typ 409 mit einer Glassäule und ⁶³Ni-Elektronen-Einfang-Detektor.

Trägergas: Mischung aus Argon und 5% Methan.
Säule: 2% Propylnitrilmethylphenylsilikonkautschuk (OV-225) auf Anakrom ABS; 110-120 mesh; Glas Duran 50; innerer Durchmesser 2,5 mm, Länge

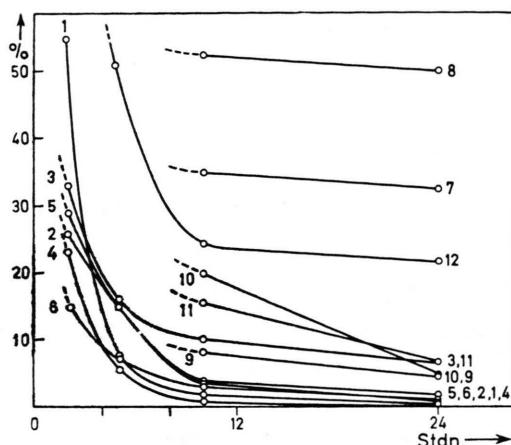


Abb. 1. Abbau von cuticular applizierten Hexachlorbicyclo [2.2.1] hept-5-en-Derivaten in Fliegen nach angegebener Zeit in % applizierter Menge.

Tab. II. Untersuchte Hexachlorbicyclo [2.2.1] hept-5-en-Derivate. Bestimmung von: Abbau (A) in % applizierter Menge; Abbauhemmung (H) nach Gabe von Piperonylbutoxyd (PBO) ($\mu\text{g}(\text{mit PBO}) - \mu\text{g}(\text{ohne PBO})/\mu\text{g}(\text{gesamt})$) in %; Fliegenausfall (Rückenlage) ohne PBO in % (L); Fliegenausfall (Rückenlage) mit PBO in % (L_{PBO}).

[%]	[Stdn.]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	2	55	26	33	23	29	15	—*	—	—	—	—	81	66
B	5	8	16	15	5	15	7	—	—	—	—	—	51	29
A	10	2	4	10	1	4	3	33	53	8	20	16	24	12
U	24	<0,1	0,5	7	<0,1	2	1	33	50	4	5	7	22	4
(A)														
H	2	24	47	26	45	41	33	—	—	—	—	—	9	11
E	5	67	19	31	42	39	15	—	—	—	—	—	33	39
M														
M	10	44	12	9	35	45	6	—	—	51	39	1	38	44
U														
N	24	24	8	2	25	40	0,5	—	—	38	50	1	13	43
G														
(H)														
L	2	0	0	0	10	0	0	—	—	—	—	—	5	15
E	5	0	0	0	10	0	0	—	—	—	—	—	5	5
T														
A	10	20	0	0	25	0	0	100	100	75	0	5	5	0
L	24	0	0	0	35	0	0	100	100	85	0	0	0	0
(L)														
L	2	0	10	0	20	0	0	—	—	—	—	—	5	15
E	5	35	50	0	20	0	0	—	—	—	—	—	20	40
T														
A	10	55	60	0	35	25	0	—	—	85	10	30	15	85
L	24	20	90	5	80	25	0	—	—	95	30	15	40	95
(L _{PBO})														

* — = Nicht gemessen.

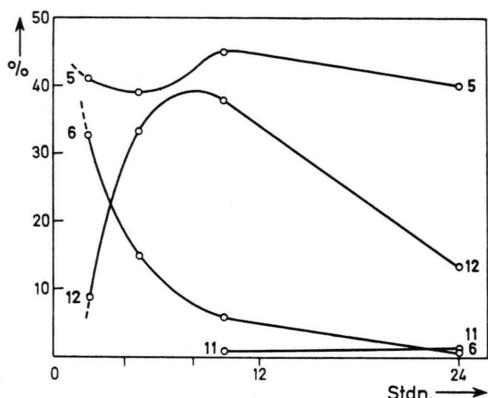


Abb. 2. Abbauhemmung ($\mu\text{g}(\text{mit PBO}) - \mu\text{g}(\text{ohne PBO})/\mu\text{g}(\text{gesamt})$) in % von cuticular applizierten Hexachlorbicyclo [2.2.1] hept-5-en-Derivaten in Fliegen nach vorheriger Applikation des Synergisten Piperonylbutoxyd (PBO).

1 m. Säulenofen: 200 °C; Einspritzblock: 200 °C; Detektor: 300 °C; Retentionszeit (Aldrin): 1,16 min.

Diskussion

Abbau der Hexachlorbicyclo [2.2.1] hept-5-en-Derivate

Alle 13 untersuchten Verbindungen werden von Fliegen umgewandelt. Hinsichtlich der Abbauschwierigkeit lassen sich die Verbindungen 1 bis 13 in folgende Gruppen einteilen, Tab. II und Abb. 1:

Gruppe A:

Sehr schneller Abbau; nach 24 Stdn. Abbau bis auf ca. 1 % der Ausgangsverbindung: 1, 2, 4, 5, 6.

Gruppe B:

Schneller Abbau; nach 24 Stdn. Abbau bis auf 4-7% der Ausgangsverbindung: 3, 9, 10, 11, 13.

Gruppe C:

Langsamer bis sehr langsamer Abbau; nach 24 Stdn. Abbau bis auf 20-50% der Ausgangsverbindung: 7, 8, 12.

In Gruppe A befinden sich nur Monosubstitutionsprodukte, d. h. Verbindungen, die nur in 1-Stellung von größeren Substituenten besetzt sind. Diese Substanzen sind also in 3-Stellung einer Hydroxylierung sehr leicht zugänglich, was ihren schnellen Abbau hinreichend erklärt.

In Gruppe B und C befinden sich überwiegend Disubstitutionsprodukte, d. h. Verbindungen, die in

1- und 3-Stellung von größeren Substituenten besetzt sind. Hier ist die Hydroxylierung in 1- bzw. 3-Stellung behindert, was den verhältnismäßig langsamem bis sehr langsamem Abbau verstehen lässt.

Verbindung 13 = Alodan®, die hinsichtlich ihrer Abbauschwierigkeit gewissermaßen zwischen Gruppe A und B vermittelt, kann auf Grund der erhöhten Bewegungsmöglichkeit der Chloratome an den Methylengruppen²⁰ sowohl als Mono- als auch als Disubstitutionsprodukt aufgefaßt werden.

Ungenügend in das aufgezeichnete Konzept passen lediglich die Verbindungen 3 und 12, die ebenfalls als Monosubstitutionsprodukte aufgefaßt werden können, hinsichtlich ihrer Abbaurate allerdings zu Gruppe B bzw. zu Gruppe C zu zählen sind.

Infolge des bereits stark polaren Charakters dieser Verbindungen ist eine geringe Penetrationsgeschwindigkeit durch die Insekten-Kutikula nicht ausgeschlossen, ja sogar wahrscheinlich. Dadurch ist eine Verzerrung der Abbaugeschwindigkeit leicht möglich.

Abbauhemmung der Hexachlorbicyclo[2.2.1]hept-5-en-Derivate

Eine Hemmung des Abbaus nach Gabe von Piperonylbutoxyd (PBO) ist bei allen untersuchten Verbindungen festzustellen. Hinsichtlich des Ausmaßes dieses synergistischen Effekts lassen sich die Verbindungen 1 bis 13 in folgende Gruppen einteilen:

Die Verbindungen sind nach steigender Abbauhemmung, definiert als wiedergefundene Menge applizierter Substanz nach Gabe von PBO minus wiedergefunden Menge applizierter Substanz ohne PBO pro gesamter applizierter Menge in %, angeordnet, Tab. II.

Gruppe A:

Über 24 Stdn. sehr großer synergistischer Effekt; nach 24 Stdn. Abbauhemmung von 13-50%: 1, 4, 5, 9, 10, 12, 13.

Gruppe B:

Anfänglich großer synergistischer Effekt, dann stark nachlassend; nach 24 Stdn. Abbauhemmung 0,5-8%: 2, 3, 6.

Gruppe C:

Synergistischer Effekt dauernd gering; Abbauhemmung vernachlässigbar: 11.

Unterschiede im Ausmaß der Hemmung können auf unterschiedlichem Anteil der Oxygenasen am Abbau oder b auf unterschiedlicher, strukturbedingter

Substrat-Enzym Affinität im Sinne der kompetitiven Hemmung beruhen. Da die Versuchsanordnung komplex ist, können bezüglich der Abbaugeschwindigkeit nur qualitative Aussagen gemacht werden.

Die anfänglich hohe Abbauhemmung (2.-5. Stde.) der Monosubstitutionsprodukte 1 bis 6 unterstreicht deutlich, daß, wie für 1 nachgewiesen, eine Hydroxylierung als der erste Abbauschritt anzunehmen ist. Bemerkenswert ist der unterschiedliche Abfall der Hemmung durch PBO, die Monosubstitutionsprodukte sind gleichermaßen in Gruppe A und B vertreten.

Die Abbauhemmung durch PBO war für die Verbindung 12, einem cyclischen Lakton, der erste Hinweis dafür, daß ein oxidativer Abbau vorliegen könnte. Ein cyclisches Hydroxy-Lakton konnte als Metabolit von 12 nachgewiesen werden⁵.

Es fällt auf, daß die Kurven der Abbauhemmung bei den Verbindungen 1, 3, 12 und 13 ein Maximum durchlaufen. Da auf Grund der unterschiedlichen Polarität die Penetrationsrate dieser Verbindungen sich sehr stark unterscheiden sollte, muß dies auf einen Struktureffekt zurückzuführen sein.

Intrinsic-Toxizität der Hexachlorobicyclo[2.2.1]hept-5-en-Derivate

Ein Vergleich zwischen den Fliegenausfällen des Synergismus-Versuches mit denen des Normalversuches (Tab. II) geben bei Berücksichtigung der eingesetzten Insektizid-Menge erste wertvolle Hinweise auf die Intrinsic-Toxizität der entsprechenden Verbindung, als es einfache Giftigkeitsuntersuchungen ohne Zusatz eines Synergisten vermögen.

Die Größe der Intrinsic-Toxizität betreffend schälen sich hierbei aus dem Spektrum der untersuchten Verbindungen 3 Gruppen heraus, die wie folgt zu charakterisieren sind:

Die Verbindungen sind nach fallender Intrinsic-Toxizität angeordnet (siehe Tab. II).

Gruppe A:

Außerordentlich große und sehr große Intrinsic-Toxizität: Verbindungen 8, 7, 2, 4, 9, 13.

Gruppe B:

Gewisse bis beträchtliche Intrinsic-Toxizität: Verbindungen 1, 5, 10, 12, 11.

Gruppe C:

Nicht nachweisbare Intrinsic-Toxizität: Verbindungen 6, 3.

Mit Ausnahme der Verbindungen 6 und 11 hat auch diese Zusammenfassung mit der vorhergehenden Grup-

peneinteilung gemeinsam das Phänomen, daß sich entsprechende Mono- und Disubstitutionsprodukte ein und derselben Gruppe angehören. Dies unterstreicht die bekannte Tatsache, daß bei Hexachlorbicyclo[2.2.1]-hept-5-en-Derivaten den Substituenten in 2- und 3-Stellung für die hohe oder niedrige insektizide Wirkung einer Verbindung entscheidende Bedeutung zukommt.

Im übrigen vermag die Kenntnis der Intrinsic-Toxizität und der Abbaurate einer Verbindung zum Verständnis ihrer Wirksamkeit entscheidend beizutragen. So haben die Verbindungen 7 und Telodrin 8 eine außerordentlich hohe Toxizität und ihr Abbau ist sehr langsam. Das garantiert eine hohe Fliegen-tötende Wirksamkeit.

Die Verbindungen 2, 4 und 13 haben eine sehr große Intrinsic-Toxizität, ihr Abbau verläuft allerdings sehr schnell, was eine geringe Fliegen-tötende Wirksamkeit zur Folge hat. Wird ihre Abbauschnelligkeit dagegen von Piperonylbutoxyd gebremst, so kann die hohe Intrinsic-Toxizität der entsprechenden Verbindung ins Spiel gebracht werden, was dann eine große Wirksamkeit mit sich bringt.

Bei der Verbindung 12, einem Lakton, das als polarer, lipophiler Metabolit beim Abbau der Insektizide Endosulfan, Telodrin (8) und Alodan auftritt^{4,5}, ist trotz langsamen Abbaus eine erhebliche Intrinsic-Toxizität erst nach Gabe des Synergisten festzustellen. Eine Erklärung dieser Beobachtung durch Konzentrationsanstieg von 12 ist demnach nicht möglich, eher erscheint die Annahme eines toxischen Metaboliten von 12 berechtigt.

Die Untersuchungen zeigen, daß relativ einfache molekulare Strukturmerkmale ein vergleichbares biologisches Verhalten (Abbau, Toxizität) von Hexachlorbicyclo[2.2.1]hept-5-en-Derivaten bewirken. Dazu lassen sich mit gezielten Enzymhemmungen z. B. durch Piperonylbutoxyd interessante Aspekte der Intrinsic-Toxizität herausstellen.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, und von der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie e. V., Frankfurt, gefördert.

¹ J. E. CASIDA, J. agric. Food Chem. **18**, 753 [1970].

² R. D. O'BRIEN, I. YAMAMOTO, Biochemical Toxicology of Insecticides, Academic Press, New York, London 1970.

³ R. WEGLER, Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel, 1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg/New York 1970.

⁴ G. T. BROOKS, Residue Rev. **27**, 81 [1969].

- ⁵ W. RÜCKERT u. K. BALLSCHMITER, *Z. analyt. Chem.* **259**, 188–190 [1972].
- ⁶ I. SCHUPHAN, K. BALLSCHMITER u. G. TÖLG, *Z. Naturforsch.* **23b**, 701 [1968].
- ⁷ K. BALLSCHMITER u. G. TÖLG, *Angew. Chem.* **78**, 775 [1966].
- ⁸ H. FRENSCH u. H. GOEBEL, DBP 960989 [1957].
- ⁹ H. SINGER u. K. BALLSCHMITER, *Chem. Ber.* **101**, 17–23 [1968].
- ¹⁰ H. FEICHTINGER u. H. W. LINDEN, *Chem. Ber.* **97**, 2779 [1964].
- ¹¹ K. BALLSCHMITER, Dissertation Universität Mainz 1966.
- ¹² H. FEICHTINGER u. H. W. LINDEN, *Chem. Ber.* **100**, 855 [1967].
- ¹³ H. FEICHTINGER, H. W. LINDEN u. H. SINGER, *Chem. Ber.* **101**, 2776 [1968].
- ¹⁴ H. FEICHTINGER u. H. W. LINDEN, *Chem. and Ind.* **1965**, [1938].
- ¹⁵ H. FEICHTINGER u. S. PUSCHHOF, DBP 1006436, 1954.
- ¹⁶ H. FEICHTINGER, H. TUMMES u. S. PUSCHHOF, DBP 1020346, 1954 und DBP 968171, 1954.
- ¹⁷ H. FEICHTINGER u. H. W. LINDEN, DBP 1026325, 1957.
- ¹⁸ R. RIEMSCHEIDER, DBP 1117568, 1960.
- ¹⁹ H. FRENSCH u. W. FINKENBRINK, DBP 1002341, 1955.
- ²⁰ K. BALLSCHMITER, Unveröffentlichte Arbeitsergebnisse.
- ²¹ R. RIEMSCHEIDER, B. B. GRAVIZ u. BOTYU-KAHAGU, *Scientific Insect Control* **25**, 123 [1960].
- ²² R. RIEMSCHEIDER, *World Rev. Pest. Contr.* **2(4)**, 29–61 [1963].
- ²³ V. ULLRICH, *Angew. Chem.* **84**, 689 [1972]; *Angew. Chem. Int. Ed.* **11**, 701 [1972].
- ^{23a} R. R. FRASER, *Canad. J. Chem.* **40**, 78 [1961].
- ²⁴ E. I. SNYDERO, B. FRANZUS, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1166 [1964].
- ²⁵ E. N. PRILEZHAYEVA, *Organosulfur Chemistry*, M. J. JANSEN (Herausgeber), S. 64, Interscience J. Wiley, New York 1967.
- ²⁶ G. T. BROOKS u. A. HARRISON, *Biochem. Pharmacol.* **13**, 827 [1964a].