

## Reaktivität und verzögerte Neurotoxizität von Organophosphaten

Reactivity and Delayed Neurotoxicity of Organophosphates

Hans-Georg Reinhardt

Fachbereich 21 der Freien Universität Berlin,  
Institut für Biochemie

(Z. Naturforsch. **31 c**, 750–752 [1976]; eingegangen  
am 8. September 1976)

Delayed Neurotoxicity, Organophosphates, Alkaline Hydrolysis, Structure-Reactivity-Relationships

Rate constants of the alkaline hydrolysis reaction were correlated with neurotoxic findings of some organophosphates using data published in the literature. This correlation shows upper and lower limits of reactivity comparable to those found with biological activities of some other xenobiotics.

Ein wichtiger Nebeneffekt einiger Organophosphate, die Cholinesterasen hemmen, besteht in ihrer Fähigkeit, bei bestimmten Spezies (z. B. Mensch, Huhn, Katze, Rind) nach einer Latenzzeit von ca. 8–14 Tagen Lähmungserscheinungen an den Extremitäten hervorzurufen. Als Ursache für diese „verzögerte Neurotoxizität“ wurde die Hemmung einer unspezifischen Carboxylesterase im Zentralnervensystem vorgeschlagen<sup>1</sup>; sie kann jedenfalls nicht in einer Störung cholinergischer Mechanismen liegen, denn es gibt auch neurotoxisch aktive Organophosphate, die solche Störungen nicht hervorrufen<sup>2</sup>.

Vor kurzem konnte an einer neu zusammengestellten Reihe von substituierten Triarylphosphaten gezeigt werden, daß sich ein Zusammenhang zwischen der Reaktivität dieser Verbindungen und ihrer neurotoxischen Aktivität herstellen läßt<sup>3</sup>. Als Maß für die Reaktivität diente die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung einer Modellreaktion, der alkalischen Hydrolyse.

Es erschien interessant zu untersuchen, wie sich Daten aus der Literatur in dieses Konzept einordnen lassen. Dazu bedurfte es einer Anzahl von Organophosphaten, die drei Bedingungen erfüllen: 1. die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der alkalischen Hydrolyse bei 25 °C in Wasser mußte bekannt sein oder sich errechnen lassen, 2. für die Verbindung mußte ein neurotoxischer Befund publiziert sein, und 3. dieser Befund sollte ohne die Annahme enzymatischer Umwandlungen an der Verbindung im Organismus interpretierbar sein. Bei den Organophosphaten, die diesen Bedingungen ge-

horden, handelt es sich fast ausschließlich um Verbindungen, die wegen ihrer Fähigkeit, Cholinesterasen zu hemmen, näher untersucht wurden.

Das Ergebnis dieser Zusammenstellung zeigt die Abb. 1, in der die neurotoxischen Befunde logarithmisch nach der Reaktivität geordnet sind. Eine Auswertung in Form von linearen Freie-Energie-Beziehungen vom Brønsted- oder gar Hammett-Typ ist wegen des Mangels an hierfür geeigneter Systematik bei der bisher auf verzögerte Neurotoxizität geprüften Auswahl von Organophosphaten nicht möglich. Die kinetischen Daten der rechten Seite der Abb. 1 sind in Wasser ermittelt worden, die linke Seite zeigt zum Vergleich die Daten für die Triarylphosphat-Reihe<sup>3</sup> im Wasser-Acetonitril-Gemisch (2:1). Die Geschwindigkeitskonstanten für Armin, Paraoxon, Methylparaoxon und Äthyl-O-Ronnel, die für das Solvens Wasser bereits bekannt waren, wurden zusätzlich in diesem Solvens-System bestimmt (Tab. I), um den Einfluß des Solvens-Wechsels abschätzbar zu machen. Ihre alkalische Hydrolyse verläuft in Wasser um den Faktor 1,3–2,4 schneller als im Wasser-Acetonitril-Gemisch. Abstufungen in

Tab. I. Geschwindigkeitskonstanten und Neurotoxizität von Organophosphaten,  $[\text{OH}^-] = 0,1 \text{ N}$  25,0 °C, Wasser/Acetonitril (2:1).

Verbindung	$10^3 \cdot k_2$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Neurotoxizität <sup>a</sup>
Äthyl-4-nitrophenyl- äthylphosphonat (Armin)	116	+ <sup>12</sup>
Dimethyl-4-nitrophenyl- phosphat (Methylparaoxon)	25,4	— <sup>13</sup>
Diäthyl-2,4,5-trichlorphenyl- phosphat (Äthyl-O-Ronnel)	8,25 <sup>b</sup>	— <sup>c</sup>
Diäthyl-4-nitrophenyl- phosphat (Paraoxon)	4,62	— <sup>14</sup>
Tri-2-kresylphosphat (TOCP)	1,28	— <sup>d</sup>
Trimethylphosphat	0,142 <sup>e</sup>	— <sup>f</sup>
Triäthylphosphat	0,0135 <sup>g</sup>	— <sup>f</sup>
Diphenylphosphorylchlorid	$3,4 \times 10^9$ <sup>h</sup>	— <sup>i</sup>

<sup>a</sup> + aktiv, — inaktiv.

<sup>b</sup>  $k_2$ -Wert der alkalischen Hydrolyse in Wasser:  
 $1,79 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Neurotoxisch inaktiv bei einer Dosis von 50 mg/kg (Huhn).

<sup>d</sup> Original-Befund positiv <sup>15</sup>, aktiv ist aber ein Umwandlungsprodukt nach enzymatischer Oxydation <sup>16</sup>.

<sup>e</sup>  $k_2$ -Wert der alkalischen Hydrolyse in Wasser <sup>17</sup>.

<sup>f</sup> Neurotoxisch inaktiv bei einer Dosis von 500 mg/kg (Huhn).

<sup>g</sup>  $k_2$ -Wert der alkalischen Hydrolyse in Wasser <sup>10</sup>, publizierter neurotoxischer Befund: inaktiv bei einer Dosis von 10 mg/kg <sup>21</sup>.

<sup>h</sup>  $k_2$ -Wert der alkalischen Hydrolyse in Wasser <sup>18</sup>, unter der Annahme ausschließlicher  $\text{OH}^-$ -Katalyse berechnet. Dieser Wert muß deswegen als obere Grenze angesehen werden.

<sup>i</sup> Neurotoxisch inaktiv bei einer Dosis von 1000 mg/kg (Huhn).

Sonderdruckanforderungen an Dr. Hans-Georg Reinhardt,  
Institut für Biochemie der Freien Universität, Limonen-  
str. 7, D-1000 Berlin 45.



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 digitalized 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.



Abb. 1. Reaktivität und neurotoxischer Befund von Organophosphaten. Solvens der Reaktivitätsdaten: rechts Wasser, links Wasser/Acetonitril (2:1). Tetraäthylpyrophosphat und Diäthylphosphorylfuorid sind doppelt vertreten, s. Text.

+ Neurotoxisch aktiv, - inaktiv.  
<sup>a</sup> S. Fußnote h zu Tab. I.  
<sup>b</sup> Die Geschwindigkeitskonstante ist aus der bei 27 °C in Veronal-Puffer (pH 9,5) ermittelten Halbwertszeit errechnet.  
<sup>c</sup> Dieser Wert muß als unterer Grenzwert angesehen werden.  
<sup>d</sup> Diese Verbindung ist das neurotoxisch aktive Umwandlungsprodukt, das aus dem TOCP im Organismus gebildet wird.  
<sup>e</sup> S. Fußnote d zu Tab. I.

diesem Rahmen dürften auch bei den anderen Verbindungen anzunehmen sein, so daß eine gemeinsame Diskussion aller Daten durchaus möglich ist. Mit den Angaben für einige weitere Phosphorsäurederivate (Tab. I) kann somit ein Reaktivitätsbereich von fast zwölf Größenordnungen überblickt werden.

Die Annahme einer unteren Schwellen-Reaktivität<sup>3</sup> scheint nicht auf die Triarylphosphat-Reihe beschränkt zu sein, sondern gilt offensichtlich für eine größere Anzahl von Organophosphaten. Darüber hinaus zeigt sich auch eine obere Schwellen-Reaktivität, die mit den geprüften Triarylphosphaten augenscheinlich noch nicht erreicht ist. Lediglich Methylsaligeninphosphat, Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und die beiden Phosphinsäureester 4-Nitrophenyl-diäthylphosphinat und 4-Nitrophenyl-di-n-butylphosphinat fügen sich nicht in dieses Bild ein. Erklärungsversuche hierfür müssen berücksichtigen, daß u. U. nicht alle der Literatur entnommenen  $k_2$ -Werte zuverlässig sind (z. B. findet man für viele Fluoride<sup>4,5</sup> und für TEPP<sup>6,7</sup> mehrere  $k_2$ -Werte; TEPP und Diäthylphosphoryl-fluorid erscheinen in Abb. 1 zur Veranschaulichung dieser Problematik doppelt); weiterhin können geringe Löslichkeit sowie hohe cholinerge Aktivität die Applikation einer zur Auslösung neurotoxischer Symptome ausreichenden Dosis unmöglich machen.

Es ist aber auch damit zu rechnen, daß die Schwellen-Reaktivitäten nicht universell gelten, sondern für

Ester verschiedener Säuren des Phosphors unterschiedlich liegen. Für die Gruppe der Phosphinsäure-Derivate ist eine reaktionsmechanistische Sonderstellung schon vorgeschlagen, allerdings, um die neurotoxische Inaktivität der bisher untersuchten Vertreter dieser Substanzklasse zu erklären. Diese Sonderstellung beruht nach Ansicht von M. K. Johnson<sup>8</sup> darauf, daß ein phosphinyliertes Serin im aktiven Zentrum der als „target“ vermuteten Carboxylesterase im ZNS eine kritische hydrolytische Folge-reaktion nicht eingehen kann.

Untere und obere Schwellen-Reaktivitäten in hydrolytischen Reaktionen für die Auslösung biologischer Effekte sind kürzlich, allerdings nur qualitativ, auch für die cancerogene Aktivität verschiedener Derivate isomerer Fluorenyl-acetamide diskutiert worden<sup>9</sup>. Für die Abhängigkeit der auf den cholinesterase-hemmenden Eigenschaften beruhenden Toxizität kernsubstituierter Dialkyl-phenylphosphate von der Reaktivität sind untere und obere Schwellen-Reaktivitäten bereits 1958 genannt worden<sup>10</sup>, eine moderne Formulierung der Schrader-Regel<sup>11</sup> impliziert ebenfalls Schwellen-Reaktivitäten. Möglicherweise kommt ihnen allgemeinere biochemische und auch toxikologische Bedeutung zu.

Für anregende Diskussionen danke ich den Professoren Dr. E. Riedel und Dr. E.-R. Lochmann.

- <sup>1</sup> W. N. Aldridge u. E. Reiner, *Enzyme Inhibitors as Substrates*, p. 215, Amsterdam 1972.
- <sup>2</sup> J. C. Malone, *Res. Vet. Sci.* **5**, 17 [1964].
- <sup>3</sup> H.-G. Reinhardt, *Z. Naturforsch.* **31c**, 479 [1976].
- <sup>4</sup> I. L. Knunyants, N. A. Loshadkin, A. A. Neimysheva, S. M. Markov u. A. M. Polekhin, *Reakc. Sposobnost Org. Soedin.* **2**, 236 [1965].
- <sup>5</sup> R. F. Hudson u. L. Keay, *J. Chem. Soc.* **1960**, 1859.
- <sup>6</sup> A. L. Green, G. L. Sainsbury, B. Saville u. M. Stansfield, *J. Chem. Soc.* **1958**, 1583.
- <sup>7</sup> J. A. A. Ketelaar u. A. H. Bloksma, *Rec. Trav. Chim.* **67**, 665 [1948].
- <sup>8</sup> M. K. Johnson, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 6 [1973].
- <sup>9</sup> Y. Yost, H. R. Gutmann u. R. E. Rydell, *Canc. Res.* **35**, 447 [1975].
- <sup>10</sup> J. A. A. Ketelaar u. H. R. Gersmann, *Rec. Trav. Chim.* **77**, 973 [1958].
- <sup>11</sup> K.-J. Schmidt, *Pflanzenschutz-Ber.* **39**, 205 [1969].
- <sup>12</sup> M. K. Johnson, *Biochem. J.* **114**, 711 [1969].
- <sup>13</sup> M. K. Johnson, *Arch. Toxicol.* **34**, 259 [1975].
- <sup>14</sup> J. M. Barnes u. F. A. Denz, *J. Path. Bact.* **65**, 597 [1953].
- <sup>15</sup> M. I. Smith u. E. Elvove, *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)* **45**, 1703 [1930].
- <sup>16</sup> J. E. Casida, M. Eto u. R. L. Baron, *Nature* **191**, 1396 [1961].
- <sup>17</sup> P. W. C. Barnard, C. A. Bunton, D. R. Llewellyn, C. A. Vernon u. V. A. Welch, *J. Chem. Soc.* **1961**, 2670.
- <sup>18</sup> P. Wins u. I. B. Wilson, *Biochim. Biophys. Acta* **334**, 137 [1974].
- <sup>19</sup> M. Eto, M. Abe u. H. Takahara, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **35**, 929 [1971].
- <sup>20</sup> M. I. Smith, E. Elvove u. W. H. Frazier, *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)* **45**, 2509 [1930].
- <sup>21</sup> D. R. Davies, P. Holland u. M. J. Rumens, *Brit. J. Pharmacol.* **15**, 271 [1960].
- <sup>22</sup> J. E. Casida, R. L. Baron, M. Eto u. J. L. Engel, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 73 [1963].
- <sup>23</sup> M. K. Johnson, *J. Neurochem.* **23**, 785 [1974].
- <sup>24</sup> Y. Ashani, P. Wins u. I. B. Wilson, *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 427 [1972].
- <sup>25</sup> Sarin: L. Larsson, *Acta Chem. Scand.* **11**, 1131 [1957]; Mipafox: D. F. Heath, *J. Chem. Soc.* **1956**, 3796.
- <sup>26</sup> L. Ginjaar u. S. Vel, *Rec. Trav. Chim.* **77**, 956 [1958].
- <sup>27</sup> R. F. Hudson u. R. Greenhalgh, *J. Chem. Soc. (B)* **1969**, 325.
- <sup>28</sup> D. F. Heath u. P. Casapieri, *Trans. Faraday Soc.* **47**, 1093 [1951].
- <sup>29</sup> G. Aksnes, *Acta Chem. Scand.* **14**, 1515 [1960].
- <sup>30</sup> L. Ginjaar u. S. Blasse-Vel, *Rec. Trav. Chim.* **85**, 694 [1966].