

Darstellung von 5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon-(4,5-¹⁴C) durch mikrobielle Dephenylierung von 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon-(4,5-¹⁴C) (Pyrazon) im Boden

N. DRESCHER¹ und T. F. BURGER²
*Badische Anilin- & Soda-Fabrik AG,
Ludwigshafen/Rhein, Deutschland*

Summary

Synthesis of 5-amino-4-chloro-3(2H)-pyridazinone-(4,5-¹⁴C) by microbiological dephenylation of 5-amino-4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone-(4,5-¹⁴C) (Pyrazon) in soil.

Earlier experiments have shown (1,2) that pyrazon (5-amino-4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone), the active ingredient of the herbicide PYRAMIN®, is dephenylated in soil to form the metabolite 5-amino-4-chloro-3(2H)-pyridazinone (metabolite B). More recent investigations into the decomposition of pyrazon in the soil have shown (4,5) that soils with extreme "degradation-capacity" can be obtained by repeated additions of active ingredient to the soil, while keeping both temperature and humidity at an optimum. Soils conditioned by this method in the laboratory were capable of completely metabolizing up to 5 000 ppm pyrazon within 10-14 days.

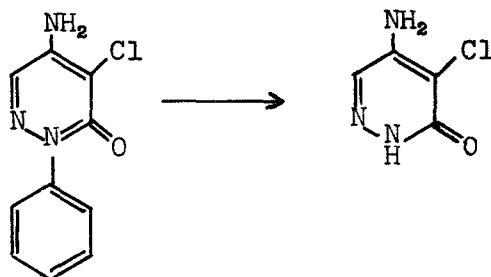
Obviously strains of micro-organisms are selected in the soil, which use the phenyl-ring of pyrazon as their main carbon source. Dephenylation proceeds with good yield and is therefore suitable for preparation of the metabolite. Since chemical synthesis of the radioactive metabolite is rather difficult and costly, the biochemical degradation of pyrazon-(4,5-¹⁴C) was used to obtain the labeled metabolite. Recovery from soil was 53,1 % of the theoretical amount. The metabolite obtained was both chemically and radiochemically pure.

¹ BASF, Landwirtschaftliche Versuchsstation
6703 Limburgerhof/Pfalz

² BASF, Isotopenlaboratorium, 6700 Ludwigshafen

® Eingetragenes Warenzeichen der BASF

Pyrazon (5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon), der Wirkstoff des Herbizids [®]PYRAMIN, wird im Boden dephenyliert und es entsteht 5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon (Metabolit B) (1,2).



P y r a z o n M e t a b o l i t B

BURGER (3) hatte bereits früher für die Untersuchung des Pyrazon-Metabolismus das 4,5-¹⁴C-Pyrazon dargestellt. Für weitere Studien benötigten wir den radioaktiv markierten Metaboliten. Dieser hätte im Prinzip nach dem gleichen Verfahren hergestellt werden können, wobei lediglich Phenylhydrazin durch Hydrazin hätte ersetzt werden müssen. Die Synthese dieser Verbindung wäre jedoch sehr zeitraubend und kostspielig gewesen. Wir konnten die gewünschte Substanz auf anderem Wege schnell und erheblich billiger erhalten:

Bei unseren Untersuchungen über den Abbau von Pyrazon im Boden mit inaktivem Wirkstoff konnten wir nachweisen (4,5), daß die Dephenylierung im Boden auf mikrobiellem Wege erfolgt, und daß man äußerst abbauknappe Böden erhalten kann, wenn man dem Boden wiederholt Pyrazon anbietet. Hierdurch reichern sich die Mikroorganismen, die den Phenylring des Moleküls als C-Quelle benutzen, so stark an, daß sie innerhalb von 10-14 Tagen Pyrazonmengen bis 5 000 ppm ($\hat{=}$ 0,5 %) vollständig abbauen. Die quantitative Untersuchung des Abbaus hatte außerdem gezeigt, daß der Metabolit mit etwa 60 % der theoretischen Ausbeute aus dem Boden isoliert werden kann.

Wir waren von den früheren Untersuchungen über den Pyrazon-Metabolismus in der Pflanze noch im Besitz einer geringen Menge des im heterocyclischen Ring ¹⁴C-markierten Pyrazons. Dies brachte uns auf den Gedanken, die gewünschte Menge des markierten Metaboliten durch mikrobielle Dephenylierung im Boden herzustellen:

Beschreibung der Versuche

1. Bereitung eines abbauknapten Bodens:
Boden unserer Versuchsstation Limburgerhof (lehmiger

Sand, pH 7,3; max. Wasserkapazität 27,2 %; Humus 2 %; abschlämmbare Teile 15 %) wurde an der Luft getrocknet, gesiebt und auf einen Wassergehalt von 12 % eingestellt. Dann wurden dem Boden 2 000 ppm analysenreines Pyrazon gleichmäßig eingearbeitet, und der Ansatz wurde durch Zumischen von 5 % einer Bodenprobe, die schon mehrfach Pyrazon abgebaut hatte, "angeimpft". Die Probe wurde im Mitscherlich-Gefäß, locker verschlossen, im Labor bei 20 ± 3 °C aufbewahrt und zur besseren Versorgung mit Luftsauerstoff täglich durchgemischt. Das verdunstete Wasser wurde alle 2 - 3 Tage ergänzt.

Nach 14 Tagen war dünnschichtchromatographisch kein Pyrazon mehr nachweisbar. Wir mischten erneut 100 ppm Wirkstoff zu und konnten 11 Tage später kein intaktes Pyrazon mehr nachweisen. Der Boden war somit für den Versuch mit radioaktivem Material hinreichend abbauaktiv.

2. Isolierung des Metaboliten:

200 g der Bodenprobe wurden erschöpfend mit Methanol extrahiert (30 min Schütteln mit 150 ml Methanol, Absaugen über ein Blaubandfilter, Nachwaschen mit 3 x 50 ml Methanol und dreimalige Wiederholung des gesamten Vorgangs). Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 4 ml 0,5 N Natronlauge und 14 ml Wasser gelöst, mit wenig Aktivkohle behandelt und filtriert. Filter und Kohle wurden mit 6 ml Wasser nachgewaschen. Das klare, farblose Filtrat wurde mit 4 ml konz. Salzsäure angesäuert und zur Vervollständigung der Kristallisation über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde über eine G 3-Fritte abgesaugt, mit 4 ml Eiswasser gewaschen und 30 min bei 120 °C getrocknet.

Die Ausbeute an 5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon betrug 183,2 mg = 68,2 % der Theorie. Im Dünnschichtchromatogramm erschien die Verbindung einheitlich, Verunreinigungen waren nicht zu erkennen.

3. Abbau von 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon-(4,5- ^{14}C):

200 g des abbauaktiven Bodens wurden 203 mg inaktives Pyrazon und 204 mg Pyrazon-(4,5- ^{14}C) (4,047 mCi) gleichmäßig zugemischt. Die Bodenprobe wurde in einem Glasstutzen, mit einem Uhrglas bedeckt, im Labor unter den bereits genannten Bedingungen gehalten. Der Wasserverlust wurde anhand von Gewichtskontrollen täglich ergänzt (im Versuchszeitraum von 14 Tagen verdunsteten 12,3 ml).

13 Tage nach Versuchsbeginn zeigte das Dünnschichtchromatogramm noch etwa 3 % intakten Wirkstoff. Am 14. Tage wurde die Bodenprobe daher aufgearbeitet und zwar genau in der oben beschriebenen Weise.

Die Bestimmung der Radioaktivität ergab:

1. + 2. Filtrat	3,172 mCi
3. Filtrat	0,036 mCi
4. Filtrat	0,005 mCi
Summe	3,213 mCi \cong 79,39 %

Im extrahierten Boden wurde noch eine Aktivität von 0,598 mCi gemessen. Somit wurden insgesamt 3,811 mCi, d.h. 94,16 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden.

Die Isolierung des radioaktiven Metaboliten erfolgte in gleicher Weise wie bei den inaktiven Vorversuchen. Die Ausbeute betrug 304,1 mg 5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon-(4,5- ^{14}C) = 56 % der Theorie, bezogen auf eingesetztes Pyrazon-(4,5- ^{14}C). Die Radioaktivitätsausbeute betrug 2,15 mCi (= 53,1 % der Theorie).

Die erhaltene Verbindung erwies sich als chemisch rein (Elementaranalyse, Dünnschichtchromatographie). Die radiochemische Reinheit wurde durch umgekehrte Isotopenverdünnungsanalyse (3 x umkristallisiert aus Aethanol) zu 99,6 % bestimmt. Radioaktive Verunreinigungen zeigten sich weder im Autoradiogramm noch beim Abtasten der Dünnschichtplatte mit einem Dünnschicht-Scanner (Typ LB 2720, Firma Laboratorium Prof. Dr. Berthold; Erfassungsgrenze ca. $5 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$). Die erhaltene Verbindung war somit hinsichtlich ihrer Reinheit für weitere Metabolitenstudien geeignet.

4. Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel HR (Merck), Schichtdicke 0,25 mm; 45 min aktiviert bei 110 °C; Laufmittel: Benzol-Aethanol/75:25.

Zur Sichtbarmachung des Wirkstoffs bzw. des Metaboliten werden die entwickelten Platten in einem Behälter mit nitrosen Gasen (aus einer Gasflasche entnommen oder aus NaNO_2 + HCl entwickelt) gestellt.

Nach ca. 1 min wird die Platte aus der Kammer genommen und zur Entfernung adsorbierter nitroser Gase einige Minuten an der Luft liegengelassen, oder mit Kaltluft abgeblasen. Dann sprüht man mit einer 1%igen Lösung von α -Naphthol in Aethanol ein und stellt in eine Ammoniakatmosphäre. Die Verbindungen erscheinen als rotviolette Flecken auf der Platte.

Diskussion

Die präparative Herstellung eines (radioaktiv markierten) Metaboliten durch mikrobielle Umsetzung des entsprechenden Wirkstoffs im Boden ist eine elegante Methode, die dann angewendet werden kann, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. Man muß über hinreichend "abbauaktive" Böden verfügen, das heißt aber, daß der Metabolismus im Boden auf mikrobiellem Wege erfolgen muß.
2. Die optimalen Bedingungen für den Abbau (Bodenart, pH-Wert, Temperatur, Feuchtigkeit) müssen weitgehend bekannt sein.
3. Das gewünschte Endprodukt darf seinerseits nicht, oder wenigstens nur langsam, weiter metabolisiert werden.
4. Das radioaktiv markierte Ausgangsmaterial muß chemisch-präparativ leichter zugänglich sein als der Metabolit selbst.

Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, wenn darüberhinaus Isolierung und Reinigung des Metaboliten keine besonderen Schwierigkeiten bereiten, wird man dem biochemischen Verfahren gegenüber der Totalsynthese den Vorzug geben können.

Das hier angewandte Verfahren besitzt jedoch einen Nachteil: Um einen abbauaktiven Boden zu erhalten, muß dem Boden wiederholt inaktiver Wirkstoff angeboten werden. Das bringt aber mit sich, daß sich der inaktive Metabolit im Boden bereits angereichert hat und dadurch die spezifische Aktivität des radioaktiven Metaboliten entsprechend verdünnt wird. Ein Ausweg würde sich dann anbieten, wenn die betreffenden Mikroorganismen z. B. in Nährlösung gezüchtet werden können und der Boden mit einer Reinkultur der Organismen angeimpft werden kann.

Literatur

1. FISCHER, A. Weed Res. 2, 177 (1962)
2. BURGER, T.F. Vorträge anlässlich des VI. Internationalen Pflanzenschutzkongresses, Wien, 30.8.-6.9. 1967
3. BURGER, T.F. J. Labelled Comp. 4, (3) 262 (1968)
4. DRESCHER, N. u. OTTO, S. Z. Pflanzenkrh. u. Pflanzenschutz 76, (1) 27 (1969)
5. DRESCHER, N. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem 132, 73 (1969)