Untersuchungen zur Anwendung von ^{32}P -markiertem Dimefox

H. KOCH, H.-CHR. ABENDROTH und A. JESKE *

Institut für angewandte Radioaktivität Leipzig

(Z. Naturforsch. **24 b**, 1605—1609 [1969]; eingegangen am 8. Juli 1969)

Die Markierungssynthese des ^{32}P -markierten Dimefox [Bis-(dimethylamino)-phosphorylfluorid] ausgehend von rotem Phosphor-32 wird beschrieben.

Es wird über den hydrolytischen Abbau bei saurer sowie bei alkalischer Reaktion berichtet.

Über die Aufnahme des Wirkstoffes nach Blatt- bzw. Wurzelbehandlung an Hopfenpflanzen in Hydrokulturen und unter Freilandbedingungen wird berichtet sowie Betrachtungen über das Verhalten des Wirkstoffes in der Pflanze werden dargelegt. Die Dauer der Wirksamkeit des Insektizides in der Pflanze wird verfolgt.

1. Die Herstellung von ^{32}P -markiertem Dimefox

Die Verbindung Bis-(dimethylamino)-phosphorylfluorid wurde 1940 erstmalig hergestellt¹. Auf Grund des starken Interesses an dieser insektizid wirksamen Verbindung sind weitere Darstellungsmethoden ausgearbeitet worden.

Unsere Arbeiten hatten zunächst das Ziel, in Anlehnung an bekannte Darstellungsverfahren einen Syntheseweg zu finden, der einmal für den Einsatz des Radionuklides ^{32}P geeignet war und zum anderen befriedigende radiochemische Ausbeuten garantierte, da für nachfolgende Untersuchungen ^{32}P -markiertes Dimefox in verhältnismäßig großen Mengen mit relativ hoher spezifischer Aktivität gebraucht wurde. Folgender Syntheseweg entsprach diesen Forderungen am besten: Als Ausgangsmaterial diente roter Phosphor-32, der in Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel im gelinden Chlorstrom zum Phosphorpentachlorid umgesetzt wurde. Dieses ließen wir mit stöchiometrischen Mengen Äthanol zum $^{32}\text{POCl}_3$ weiterreagieren. Nach PIANKA² gelangt man vom POCl_3 durch Umsetzen mit vier Äquivalenten Dimethylamin zum Bis-(dimethylamino)-phosphorylchlorid, das mit einer konzentrierten wäßrigen Kaliumfluoridlösung zum Endprodukt weiterreagiert.

Bei 50 mMol Ansätzen und unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten zwischen 70 und 420 mCi rotem Phosphor-32 lagen die Gesamtausbeuten (bezogen auf das Radionuklid) bei 50—54% der Theorie.

2. Hydrolyse

Im sauren sowie im alkalischen Milieu unterliegt das Dimefox einem hydrolytischen Abbau, während neutrale wäßrige Lösungen der Verbindung nahezu unbegrenzt haltbar sind.

Bei der säurekatalysierten Hydrolyse ist anzunehmen, daß der erste Reaktionsschritt die Spaltung einer P—N-Bindung ist. Die Vermutung, daß zuerst die P—F-Bindung gelöst wird, konnte experimentell nicht bestätigt werden. Bei der Spaltung der P—F-Bindung müßte als erstes Hydrolyseprodukt die Bis-(dimethylamino)-phosphorsäure entstehen. Diese ist nach HAETH und CASAPIRI³ gegen H-Ionen relativ beständig, und die Stabilität dieser Verbindung vergrößert sich mit der Zunahme der H-Ionenkonzentration. Deshalb müßte diese Amino-phosphorsäure unter den Hydrolyseprodukten nachzuweisen sein. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie haben wir versucht, die Hydrolyseprodukte aufzutrennen. Wie Abb. 1 zeigt, konnten wir Phosphorsäure und je nach den Hydrolysebedingungen unterschiedliche Mengen reiner Ausgangsverbindung nachweisen. Somit ist anzunehmen, daß die säure-

* Anschriften der Verfasser: Prof. Dr. H. KOCH, Dipl.-Chem. H.-CHR. ABENDROTH, Institut für angewandte Radioaktivität, 705 Leipzig, Permoserstr. 15; Dr. A. JESKE, Biologische Zentralanstalt, 1532 Kleinmachnow, Stahnsdorfer Damm 81.

¹ G. SCHRADER, BIOS Final Report **714**, 40 [1947].

² M. PIANKA, US-Patent 2,765,252 (1956).

³ D. F. HEATH u. P. CASAPIRI, Trans. Faraday Soc. **47**, 1093 [1951].

katalysierte Hydrolyse durch einen P—N-Bindungsbruch eingeleitet wird und über sehr instabile Zwischenprodukte zur Phosphorsäure weiterreagiert. Mittels Dünnschichtchromatographie gelang es uns nicht, die einzelnen Zwischenstufen zu erfassen.

Abb. 1. Radiochromatogramm der sauren Hydrolyseprodukte des Dimefox. Träger: Kieselgel G, Laufmittel: Methanol/Ammoniak/Wasser/Trichloressigsäure 55 ml/5 ml/40 ml/3 g.

Bei der mit geringerer Geschwindigkeit verlaufenden alkalisch katalysierten Hydrolyse konnte die Bis-(dimethylamino)-phosphorsäure bzw. deren Salz nachgewiesen werden (Abb. 2). Es ist demnach wahrscheinlich, daß der alkalische Abbau durch einen P—F-Bindungsbruch zur genannten Verbindung führte, die in der weiteren Reaktion zu Salzen der Phosphorsäure verseift wird.

Abb. 2. Radiochromatogramm der alkalischen Hydrolyseprodukte des Dimefox.

Die Halbwertszeiten und Hydrolysegeschwindigkeits-Konstanten des Dimefox bei unterschiedlichen pH-Werten sind in Tab. 1 zusammengestellt. Da

pH-Wert	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$	Geschwindigkeitskonstante k [min^{-1}]
2	2 Stdn.	$5,75 \cdot 10^{-3}$
3	16,5 Stdn.	$7,00 \cdot 10^{-4}$
4	8,2 Tage	$5,88 \cdot 10^{-5}$
5	85 Tage	$5,65 \cdot 10^{-6}$
11	93,5 Tage	$5,15 \cdot 10^{-6}$
12	13 Tage	$3,70 \cdot 10^{-5}$

Tab. 1. Halbwertszeiten und Hydrolysegeschwindigkeits-Konstanten des Dimefox bei unterschiedlichen pH-Werten und 20 °C.

sich Dimefox aus seinen wäßrigen Lösungen mit Chloroform gut extrahieren läßt, ist es möglich, den Fortgang der Hydrolyse an Hand der ^{32}P -Aktivitätsverteilung durch Probenentnahme aus den Hydrolysegemischen bei verschiedenen pH-Werten zu verfolgen. Die einzelnen Hydrolyseemischungen wurden so zusammengestellt, daß das Reagenz — die pH-Pufferlösung — in sehr großem Überschuß gegenüber dem Substrat Dimefox vorhanden war, so daß der Hydrolysevorgang einer pseudomonomolekularen Reaktion entsprach. Nach der graphischen Ermittlung der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ konnte die Hydrolysegeschwindigkeits-Konstante k nach $k = \frac{\ln 2}{\tau_{1/2}}$ berechnet werden.

3. Pflanzenversuche

3.1. Die Aufnahme des Wirkstoffes unter Laborbedingungen

Die Wirkstoffaufnahme wurde nach Blatt- und Wurzelbehandlung überprüft. Zur Blattbehandlung wurden die Blätter einer Pflanze in eine 0,05-proz. Wirkstofflösung getaucht, wobei die Blätter annähernd gleichmäßig mit dem Insektizid benetzt wurden. Nach 5 Stdn. bestimmten wir den von der Pflanze aufgenommenen bzw. nicht aufgenommenen Anteil sowie die Verdunstungsverluste des Wirkstoffes. Im Durchschnitt dringen 13% in das Blattinnere ein, 60% befinden sich auf der Oberfläche und 27% verdunsten. Der Grund für die verhältnismäßig geringe Aufnahme ist in der schwachen Lipidlöslichkeit des Dimefox zu suchen.

Im Gegensatz zur Blattbehandlung konnte bei Wurzelbehandlungen eine relativ schnelle Aufnahme und Verteilung beobachtet werden. Es wurden junge Hopfenreben zur Prüfung herangezogen. Diese wurden mit den Wurzeln in eine 0,05-proz. Wirkstofflösung gebracht. Nach 3—5 Stdn. war bei den Versuchspflanzen, die eine Höhe von ca. 1,20 m hatten,

der Wirkstoff in allen Teilen nachweisbar. Der Nachweis der ^{32}P -Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Szintillationsmeßgerätes. In der Abb. 3 ist die Wirkstoffaufnahme von 4 Blättern in unterschiedlicher Höhe in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Abb. 3. Zunahme der Aktivität in Hopfenblättern unterschiedlicher Höhe während einer Wirkstoffaufnahme aus einer 0,05-proz. wäßrigen ^{32}P -Dimefoxlösung.

Von DAVID⁴ wurde die interessante Feststellung gemacht, daß Bohnenpflanzen aus einer wäßrigen Dimefoxlösung den Wirkstoff selektiv absorbierten, d. h., der Wirkstoff wurde schneller aufgenommen als Wasser. Wir haben die Aufnahme an Hopfenpflanzen geprüft. Dazu wurden die Konzentrationsänderungen in der zurückbleibenden Kulturlösung während der Wirkstoffaufnahme bestimmt. Nach 80 Stdn. war eine durchschnittliche Verringerung der Konzentration um 28% festzustellen (Abb. 4).

Abb. 4. Konzentrationsabnahme einer 0,05-proz. wäßrigen ^{32}P -Dimefoxlösung während einer Wurzelaufnahme von Hopfenpflanzen.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß eine Beziehung zwischen der mittleren Aufnahmegeschwindigkeit des Wirkstoffes durch die Wurzeln und der Wirkstoffkonzentration in der Kulturlösung besteht. Wie aus den Abbn. 3 und 4 hervorgeht, verhält sich die Wirkstoffaufnahme umgekehrt proportional der Konzentrations-Änderung der wirkstoffhaltigen Kulturlösung.

3.2. Die Aufnahme des Wirkstoffes unter Freilandbedingungen

Im Gegensatz zu der relativ hohen Aufnahmegeschwindigkeit des Wirkstoffes bei Wurzelbehandlungen mit Hilfe von Hydrokulturen war bei der Bodeninfiltration unter Freilandbedingungen eine sehr viel langsamere Aufnahme zu verzeichnen.

Die Hopfenpflanzen des Feldversuches wurden mit 100 ml einer 0,5-proz. wäßrigen ^{32}P -haltigen Wirkstofflösung gegossen. Um die Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit des Wirkstoffes vom Entwicklungsstadium der Pflanze zu ermitteln, wurden die Hopfenpflanzen bei zwei verschiedenen Entwicklungsstadien behandelt. Außerdem wurden die Pflanzen in unterschiedlicher Entfernung vom Pflanzenstengel gegossen, um den Einfluß der Gießgenauigkeit auf die Aufnahmegeschwindigkeit und die aufgenommene Wirkstoffmenge zu kontrollieren. Die Aufnahme wurde an der zeitlichen Zunahme der ^{32}P -Aktivität in den Blättern verschiedener Höhe verfolgt.

Bei den Pflanzen mit einem niedrigen Entwicklungsstadium (Rebenhöhe ca. 2 m) konnte nach 16–18 Tagen keine Aufnahme mehr nachgewiesen werden, während bei den Pflanzen im ausgewachsenen Zustand (Rebenhöhe ca. 6 m) eine um 8–10 Tage längere Aufnahmezeit festgestellt werden konnte. Bei den in unterschiedlicher Entfernung vom Pflanzenstengel gegossenen Pflanzen zeigten die in 15 cm bzw. 30 cm gegossenen einen um 20–30% bzw. 25–35% geringeren Wirkstoffgehalt als die direkt am Pflanzenstengel gegossenen Pflanzen.

DAVID⁴ hatte feststellen können, daß die Aufnahmegeschwindigkeit wesentlich von der Beschaffenheit des Erdbodens abhängt. Die erzielten Ergebnisse haben deshalb nur für unser Versuchsfeld absolute Gültigkeit. Eine Verallgemeinerung ist nur unter Berücksichtigung der jeweiligen Boden- und Klimaverhältnisse möglich.

⁴ W. A. L. DAVID, Ann. appl. Biol. 39, 203 [1952].

3.3. Bewegung und Ablagerung des Wirkstoffes

Das Gefäßsystem zur Säfteleitung im pflanzlichen Organismus besteht aus dem markwärtsgelegenen Holzteil — dem Xylem, in dem die Produkte des Transpirationsstromes aufwärts geführt werden, und dem rindwärtsgelegenen Siebteil — dem Phloem, in welchem der Assimilationsstrom abwärtsgeleitet wird. Es war nun interessant zu verfolgen, in welchen der beiden Säfteströme das Dimefox bevorzugt aufgenommen und transportiert wird. Dazu wurde den Versuchspflanzen der Wirkstoff in der unteren Hälfte des Pflanzenstengels injiziert und an Hand der Verteilung der ^{32}P -Aktivität in der Pflanze die Bewegung des Wirkstoffes verfolgt. Es zeigte sich, daß der Wirkstoff fast vollständig im Transpirationsstrom aufwärts geführt wird, während nur geringe Mengen zu unteren Teilen der Pflanze gelangen. Die Vermutung, daß durch den systemischen Effekt des Dimefox bei injizierten Pflanzen infolge einer Abwärtsbewegung des Wirkstoffes von nur einer behandelten Rebe der Pflanze über den gemeinsamen Wurzelstock auch die anderen unbehandelten Reben insektizid geschützt werden, hat sich nicht bestätigt. In den benachbarten, zur gleichen Pflanze gehörenden Reben war kein Wirkstoff nachzuweisen. An den injizierten Reben hatte sich nach 3 Tagen eine in Abb. 5 dargestellte Aktivitätsverteilung ausgebildet, die sich in der folgenden Zeit in seinen Proportionen praktisch nicht mehr änderte.

Abb. 5. Aktivitätsverteilung an einer mit 0,5 ml 50-proz. ^{32}P -Dimefoxlösung injizierten Hopfenrebe 3 Tage nach der Behandlung.

In den Blättern wandert der Wirkstoff innerhalb von 20 Tagen nach den Blatträndern, wie durch Autoradiogramme gefunden wurde.

Bei den wurzelbehandelten Pflanzen konnte beobachtet werden, daß der Wirkstoff nicht gleichmäßig über der ganzen Pflanze verteilt wurde. Wie in der Abb. 6 dargestellt ist, zeigten die oberen jüngeren Blätter einen höheren Wirkstoffgehalt als die unteren Blätter einer Rebe.

Abb. 6. Aktivitätsverteilung in Hopfenreben mit 100 ml 0,5-proz. ^{32}P -Dimefoxlösung gegossener Pflanzen in Abhängigkeit von der Pflanzenhöhe.

3.4. Abbau des Wirkstoffes

Vom Dimefox sowie von jedem anderen Insektizid wird erwartet, daß es über eine bestimmte Periode insektizid wirksam ist, jedoch sollen im Erntegut keine toxischen Rückstände vorhanden sein. Die Entgiftung einer Pflanze von den insektiziden Infiltraten kann einmal durch Transpiration und zum anderen durch Abbaureaktion zu nichttoxischen Verbindungen erfolgen. Für die praktische Anwendung des Insektizides ist die genaue Kenntnis der Geschwindigkeit des Entgiftungsprozesses und die sich daraus ergebende Dauer der Wirksamkeit in der Pflanze von großer Bedeutung.

Da durch Injektion der Wirkstoff als einmaliger Stoß der Pflanze zugeführt wurde, war es möglich, Betrachtungen über die von der Pflanze transpirierte Wirkstoffmenge zu machen. In der Abb. 7 ist der Aktivitätsabfall in den der Behandlung folgenden Tagen ersichtlich. Diese Aktivitätsabnahme wurde durch eine Eliminierung des Wirkstoffes durch Transpiration hervorgerufen.

Wie aus der Abb. 7 ersichtlich, vermindert sich der anfangs starke Aktivitätsabfall in Abhängigkeit von der Zeit. Diese Verminderung der Aktivitätsabnahme ist darauf zurückzuführen, daß der Wirkstoff in der Pflanze einer Abbaureaktion unterliegt

Abb. 7. Aktivitätsabnahme von Blättern mit ^{32}P -Dimefox injizierter Hopfenreben in Abhängigkeit von der Zeit.

und die entstehenden Abbauprodukte mit geringerer Geschwindigkeit eliminiert werden.

In einem Freilandversuch wurde die Geschwindigkeit des Wirkstoffabbaues an Hopfenpflanzen verfolgt. Nach Applikation des Wirkstoffes durch Gießen von 100 ml einer 0,5-proz. wäßrigen ^{32}P -Dimefoxlösung wurde über eine Zeitdauer von 6 Wochen nach regelmäßiger Probenentnahme der Wirkstoffgehalt in der Pflanze bestimmt. Dazu wurde von 1 g Blattmasse ein wäßriger Pflanzenextrakt hergestellt, aus dem der intakte Wirkstoff mit Chloroform extrahiert werden konnte. Durch Ausmessen des Chloroformextraktes im Flüssigkeitszählrohr erhielten wir eine Zählrate, die nach notwendigen Korrekturen (^{32}P -Abklingzeit, Nulleffekt, Verteilungskoeffizient) der zum Zeitpunkt der Probenentnahme aktiven Wirkstoffmenge in der entsprechenden Pflanze proportional war. Mit Hilfe einer Eichlösung bekannten Insektizidgehaltes konn-

te der ermittelte Meßwert auf die Wirkstoffmenge umgerechnet werden.

Anfangs konnte ein starker Abbau des Wirkstoffes in der Pflanze beobachtet werden. Nach 3 Tagen verteilte sich die in der Pflanze nachgewiesene Gesamtaktivität zu etwa 70–75% auf die Abbauprodukte und zu 25–30% auf unveränderten Wirkstoff. In den Hopfenpflanzen wurde 5–7 Tage nach der Applikation des Wirkstoffes die höchste Wirkstoffkonzentration von durchschnittlich 5 mg/kg Blattmasse festgestellt. In der folgenden Zeit nahm der Wirkstoffgehalt laufend ab, obwohl — wie schon erwähnt — bis etwa 25 Tage nach der Behandlung ständig Wirkstoff von der Pflanze aufgenommen wurde. Nach 6 Wochen war in den Hopfenpflanzen eine Wirkstoffkonzentration von durchschnittlich 0,6 mg/kg Blattmasse, das entsprach etwa 3% der in der Pflanze vorhandenen Gesamtaktivität, nachweisbar, mit der noch ein insektizider Schutz erreicht wurde. Es war uns nicht bekannt, welche Wirkstoffkonzentration in einer Hopfenpflanze notwendig ist, um eine erfolgreiche insektizide Wirkung gegen die zu bekämpfende Hopfenblattlaus (*Phorodon humuli* Schrank) zu erreichen. Wie der biologische Test zeigte, waren die behandelten Pflanzen über die gesamte Versuchszeit von 6 Wochen insektizid geschützt, während dem gegenüber unbehandelte Pflanzen der gleichen Hopfenanlage mehr oder weniger stark mit Blattläusen bevölkert waren. Selbst nach 9 Wochen war an den Versuchspflanzen kein nennenswerter Blattlausbefall festzustellen.

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, daß der Wirkstoff Dimefox durch Gießbehandlung mit den von uns applizierten Mengen einen wirksamen Schutz gegen Blattlausbefall an Hopfen über eine Periode von 6–7 Wochen gewährleistet.