

## Trennung und biologische Wirksamkeit der Enantiomere eines chiralen Thiadiazolysulfoxides

Separation and Biological Activity of the Enantiomers of a Chiral Thiadiazolyl Sulfoxide

Wolfgang Walek<sup>a</sup>, Christine Fieseler<sup>a</sup>, Peter Schneider<sup>b</sup> und Gerhard W. Fischer<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Chemie AG Bitterfeld-Wolfen, Zörbiger Straße, D-O-4400 Bitterfeld

<sup>b</sup> Forschungsstelle für chemische Toxikologie, Permoserstraße 15, D-O-7050 Leipzig

Z. Naturforsch. **47b**, 597–599 (1992); eingegangen am 23. September 1991

Thiadiazolyl Sulfoxide, Enantiomeric Resolution, Liquid Chromatography, Fungicide, Bactericide

The enantiomers of the fungicidal and bactericidal (3-chloro-1,2,4-thiadiazol-5-yl)-(3'-chloro-1',2',4'-thiadiazolyl-5'-ylthiomethyl)-sulfoxide (**2**) have been separated by liquid chromatography on triacetylcellulose. Tested in a photometer assay on *Torulopsis* H 24 and *Erwinia carotovorum* (+)-**2** and (–)-**2** show practically the same activity and do not differ from the racemic mixture.

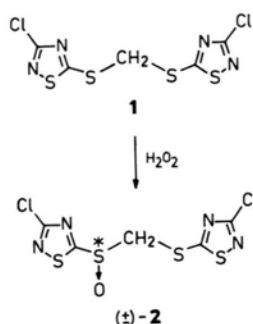
### Einleitung

Wie in der Reihe der Pharmaka gewinnt auch auf dem Pestizidsektor die Frage nach der Aktivität von Enantiomeren bei Wirkstoffen mit Chiralitätszentren – insbesondere unter dem Aspekt des „isomeren Ballastes“ – zunehmend an Bedeutung [1]. Von den bisher diesbezüglich bekannten Pestiziden dominieren erwartungsgemäß solche mit einem oder mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen, gefolgt von Wirkstoffen mit Phosphor oder Schwefel als Chiralitätszentrum. Im Falle des Schwefels handelt es sich meist um pestizide Phosphorsäureester mit einer unsymmetrisch substituierten Sulfoxidgruppe (z. B. Fensulfothion, Oxydemeton-methyl, Disyston S) [2]; bei einer Reihe von Pestiziden treten Sulfoxide als Metabolite auf (z. B. Aldicarbulsulfoxid, Fenthionsulfoxid) [3]. Zur Auftrennung dieser Verbindungen in die Enantiomere und deren Aktivitätsprüfung liegen bisher keine Informationen vor. Über die Racemattrennung anderer Sulfoxide wurde dagegen schon mehrfach berichtet [4–12].

\* Sonderdruckanforderungen an Dr. habil. G. W. Fischer.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-W-7400 Tübingen  
0932–0776/92/0400–0597/\$ 01.00/0

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich das bei der Oxidation des symmetrischen Bis(3-chlor-1,2,4-thiadiazol-5-ylthio)-methans **1** als Racemat anfallende Mono-sulfoxid ( $\pm$ )-**2** in die Enantiomere auftrennen läßt. Da ( $\pm$ )-**2** ausgeprägte fungizide und bakterizide Eigenschaften [13–18] besitzt, war ferner von Interesse, ob sich die biozide Wirkung der Enantiomere von der des Racemates unterscheidet.



### Ergebnisse und Diskussion

Die Enantiomertrennung von ( $\pm$ )-**2** erfolgte mittels semipräparativer Flüssigkeitschromatographie an Triacetylcellulose mit Ethanol als Eluens. Die geringe Löslichkeit von ( $\pm$ )-**2** in diesem Solvens begrenzte die Konzentration auf 1 mg/ml und erforderte mehrere Trennungen; insgesamt wurden ca. 6 mg von jedem Enantiomer gewonnen. Die flüssigkeitschromatographische Analyse dieser Proben zeigt, daß eine weitgehende Anreicherung des (+)- und (–)-Enantiomere erzielt wurde (vgl. Abb. 1).

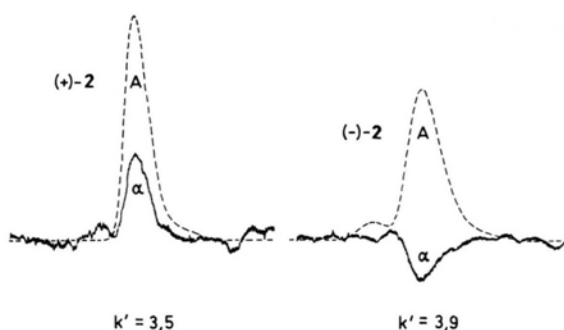


Abb. 1. Analytische Kontrolle der semipräparativ angereicherten Enantiomere (+)-**2** und (–)-**2** mittels Flüssigkeitschromatographie an Triacetylcellulose (s. experimentellen Teil). A: Absorption bei 278 nm;  $\alpha$ : Drehwinkel bei 436 nm;  $k'$ : Kapazitätsfaktor.



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.

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität diente – da klassische Methoden der Pflanzenschutzmittelprüfung aufgrund der geringen Substanzmengen an (+)-**2** und (–)-**2** nicht in Frage kamen – ein auf Trübungsmessung beruhender Photometertest an Hefen (*Torulopsis* Stamm H 24) und Bakterien (*Erwinia carotovorum*). Hierzu wurde die fungizide bzw. bakterizide Wirkung der Enantiomeren in Form der prozentualen Hemmung ermittelt (Details s. exp. Teil) und mit der jeweiligen Wirkung des Racemates verglichen. Die Ergebnisse aus den Mittelwerten von je 3 Versuchsreihen (durchgeführt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit je 3 Konzentrationen) sind in Tab. I zusammengefaßt.

Tab. I. Prozentuale Hemmwirkung der Enantiomeren (+)-**2** und (–)-**2** sowie des Racemates (±)-**2** auf *Torulopsis* H 24 und *Erwinia carotovorum* (Mittelwerte von 3 Versuchsreihen, durchgeführt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen).

Verb.	<i>Torulopsis</i> H 24 Konzentration (ppm)			<i>Erwinia carotovorum</i> Konzentration (ppm)		
	1	0,8	0,5	1	0,8	0,5
(+)- <b>2</b>	88	66	0	90	82	0
(–)- <b>2</b>	94	57	30	98	83	0
(±)- <b>2</b>	90	47	0	93	66	0

Während bei einer Konzentration von 1 ppm durchweg noch Hemmwerte zwischen 88 und 98% erreicht werden, fällt die Wirkung bei weiterer Verdünnung stark ab und liegt bereits bei 0,5 ppm zwischen 0 und 30%. Die bei 0,8 ppm gemessenen Unterschiede sind nicht signifikant und verlieren sich weitgehend bei Konzentrationen  $\geq 1$  ppm. Im wirksamen Konzentrationsbereich sind folglich beide Enantiomere von annähernd gleicher biozider Aktivität wie das Racemat. Für den praktischen Einsatz von (±)-**2** als Fungizid bzw. Bakterizid ist damit das Problem des „isomeren Ballastes“ nicht relevant, d. h. es besteht keine Notwendigkeit zur Herstellung bzw. Applikation eines enantiomerenreinen Wirkstoffes.

### Experimenteller Teil

IR: Specord M 80, Carl Zeiss, Jena. – <sup>1</sup>H-NMR: Bruker AM 250 (TMS interner Standard). – MS: Varian MAT CH 6, Bremen. – LC: Membranpumpe ProMinent Electronic B 2505, Chemie und Filter GmbH, Heidelberg; Glassäulen 2,5 × 30 cm, Serva GmbH, Heidelberg; Photometer Uvicord S, LKB; Polarimeter Perkin-Elmer 241. – Trübungsmessung: Modifiziertes Biophotometer

Bonet-Maury, Fa. Jobin Yvon, Division d'Instruments S. A.

(3-Chlor-1,2,4-thiadiazol-5-yl)-(3'-chlor-1',2',4'-thiadiazol-5'-ylthiomethyl)-sulfoxid (rac. **2**)

Das Gemisch aus 3,17 g (10 mmol) Bis(3-chlor-1,2,4-thiadiazol-5-ylthio)-methan (**1**) [19], 15 ml Eisessig und 1,5 ml Acetanhydrid wird auf 60–70 °C erwärmt und unter Beibehaltung dieser Temperatur portionsweise mit 3 ml 30-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Das sich beim Abkühlen kristallin abscheidende Racemat (±)-**2** wird abgesaugt und mit kaltem Ethanol gewaschen. – Ausb. 2,40 g (72%); farblose Nadeln, Schmp. 160 °C (Methanol). – IR (KBr): SO 1050, 1062 (s), CH<sub>2</sub> 2952 (m) cm<sup>-1</sup>. – <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ CH<sub>2</sub> 5,17 (d, J = 13,7 Hz), 5,42 ppm (d, J = 13,7 Hz). – MS (70 eV, 140 °C): m/e (%) M<sup>+</sup> 332 (7), 165 (100), 104 (73), 93 (23), 46 (25), 45 (20).

C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>4</sub> (333,26)

Ber. C 18,02 H 0,60 N 16,12,  
Gef. C 18,25 H 0,57 N 15,98.

### Racemattrennung

Die semipräparative Racemattrennung sowie die analytische Kontrolle der Fraktionen erfolgten in vorbeschriebener Weise [20] mittels Niederdruckflüssigkeitschromatographie unter Verwendung von mikrokristalliner Triacetylcellulose [21] als Sorbens und Ethanol als Eluens. Die Chromatographie wurde bei 22 °C und einem Druck von 3,0 bar durchgeführt; die Flußraten betragen ca. 200 ml/h. Die UV-Detektion erfolgte bei 278 nm, die polarometrische Messung bei 436 nm.

### Biologische Prüfung

Die Vermehrung der Mikroorganismen erfolgte im Flüssigkulturverfahren. *Erwinia carotovorum* wurde zunächst auf Glucose-Nährbouillon I (Fertigmedium) angezogen und für die eigentliche Messung auf Meyer-Nährlösung umgesetzt. Anzucht und Messung von *Torulopsis* H 24 erfolgten in Miller-Original-Medium.

Zur Sauerstoffversorgung wurden die Kulturen intensiv geschüttelt; die Versuchstemperatur lag bei 30 °C. Für die Versuchsdurchführung wurde die exponentielle Wachstumsphase der Mikroorganismen, d. h. die Zeit, in der eine konstante maximale Teilungsrates vorliegt, genutzt.

Die Ermittlung der biologischen Aktivität mittels Trübungsmessung im Mehrküvettenphotometer erfolgte dergestalt, daß die in den Küvetten befindlichen Kulturlösungen unter sterilen Bedin-

gungen mit abgemessenen Volumina der in Dimethylformamid (DMF) bereiteten Wirkstoff-Stammlösungen versetzt wurden, bei jeder Küvette (zwecks Ausgleich der vom Wirkstoff verursachten Trübung) mittels vorgeschalteter Blende die maximale Lichtdurchlässigkeit eingestellt und dann die durch Wachstum der Kulturen bedingte Trübung automatisch registriert wurde. Aus dem Anstieg der einzelnen Kurven im Vergleich zur nur mit DMF behandelten Kontrolle berechnet sich die prozentuale Hemmung wie folgt:

$$\text{Hemmung(\%)} = 100 - \frac{a \cdot 100}{b},$$

wobei a die Zeit ist, in der eine bestimmte Trübungsänderung in der Kontrolle erfolgt und b die Zeit darstellt, in der die gleiche Trübungsänderung in der behandelten Probe erzielt wird.

In Vorversuchen wurde die Konzentration ermittelt, in der durch den Wirkstoff letztmalig eine

Hemmung von 90–100% erzielt werden kann; sie lag bei 1 ppm. Als Prüfkonzentrationen wurden 0,5, 0,8 und 1 ppm festgelegt; die Versuchsdauer war auf 6 Std. begrenzt. Das zur Lösung von (+)-**2**, (-)-**2** und ( $\pm$ )-**2** benutzte Solvens (DMF) beeinflusst die Vitalität der Hefen und Bakterien in den verwendeten Konzentrationen nicht.

#### Dank

Dem Fonds der Chemischen Industrie sei für finanzielle Unterstützung (Fördermittel an G. W. F.) gedankt.

Für die Durchführung der Racemattrennung danken wir Herrn Prof. Dr. Albrecht Mannschreck und Frau Georgine Stühler, Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg.

- 
- [1] Zusammenfassende Darstellung: E. J. Ariens, J. J. S. van Rensen und W. Welling (Herausg.), *Stereoselectivity of Pesticides*, Elsevier, Amsterdam (1988).
- [2] Vgl. C. Fest und K.-J. Schmidt, *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*, S. 99, 119, 125, Springer-Verlag, Berlin (1973).
- [3] C. M. Menzie, *Metabolism of Pesticides*, Special Scientific Report – Wildlife No. 127, S. 209; No. 184, S. 6, Washington (1969, 1974).
- [4] W. H. Pirkle und D. L. Sikkenga, *J. Chromatogr.* **123**, 400 (1976).
- [5] W. H. Pirkle und D. W. House, *J. Org. Chem.* **44**, 1957 (1979).
- [6] W. H. Pirkle, D. W. House und J. M. Finn, *J. Chromatogr.* **192**, 143 (1980).
- [7] W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner und B. C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3964 (1981).
- [8] W. H. Pirkle und J. M. Finn, *J. Org. Chem.* **47**, 4037 (1982).
- [9] S. Allenmark, L. Nielsen und W. H. Pirkle, *Acta Chem. Scand.* **B 37**, 325 (1983).
- [10] E. Bayer, E. Küsters, G. J. Nicholson und H. Frank, *J. Chromatogr.* **320**, 393 (1985).
- [11] G. Gagaro, F. Gasparini, D. Misiti, G. Palmieri, M. Pierini und C. Villani, *Chromatographia* **24**, 505 (1987).
- [12] T. Schibata, *Jap. Pat.* 62198657 (26. 2. 1986; 2. 9. 1987); *C. A.* **110**, 7189 (1988).
- [13] P. Barth, C. Fieseler, W. Walek, W. Wildgrube, V. Otte und W. Steinke, *Dtsch. Pat.* DD-AP 282 174 (13. 4. 1989; 5. 9. 1990).
- [14] W. Walek, H. Beckel, D. Bertram, M. Engemann, U. Thust, H. Kadner, J. Naumann und H. Wigert, *Dtsch. Pat.* DD-AP 291 248 (2. 1. 1990; 27. 6. 1991).
- [15] W. Walek, U. Thust, J. Naumann, R. Hesse, H.-D. Pfeiffer, K. Trautner, H. Kirk, C. Seidel und C. Fieseler, *Dtsch. Pat.* DD-AP 291 284 (2. 1. 1990; 27. 6. 1991).
- [16] W. Walek, E. Drieschner, J. Naumann, B. Kurzweg, D. Laubach, U. Thust und S. Böhm, *Dtsch. Pat.* DD-AP 291 331 (2. 1. 1990; 27. 6. 1991).
- [17] W. Walek, U. Thust, H.-D. Kläeger, J. Naumann, E. Schiewald, H.-D. Pfeiffer und K. Trautner, *Dtsch. Pat.* DD-AP 291 332 (2. 1. 1990; 27. 6. 1991).
- [18] W. Walek, U. Thust, C. Fieseler, J. Naumann, J.-U. Meier, H. Wigert, E. Will und R. Schmidt, *Dtsch. Pat.* DD-AP 291 343 (2. 1. 1990; 27. 6. 1991).
- [19] W. Walek, *Z. Chem.* **20**, 370 (1980).
- [20] M. A. Cuyengkeng u. A. Mannschreck, *Chem. Ber.* **120**, 803 (1987).
- [21] G. Hesse u. R. Hagel, *Chromatographia* **6**, 227 (1973); **9**, 62 (1976); *Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 996.