

with these observations, it has been found that iproniazid inhibits the response of the cat nictitating membrane to epinephrine.

E. C. GRIESEMER, C. A. DRAGSTEDT,
J. A. WELLS, and E. A. ZELLER

Departments of Pharmacology and Biochemistry of the Northwestern University Medical School, Chicago, Ill., March 22, 1955.

Zusammenfassung

1-Isonicotinyl-2-isopropylhydrazin (Iproniazid) blockiert reversibel den Angriffsort des Adrenalins im Furchgottischen Präparat der Kaninchenaorta. Die Wirkung wird der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Adrenalin und Iproniazid zugeschrieben.

Utilization of Exogenous Adenine by the Rat

We have previously speculated on the possibility of a complex path for the incorporation of exogenous purines and for biological interconversions among the purines¹. GREENBERG² has made the interesting observation that in pigeon liver the purine ring of hypoxanthine may be completed after introduction of the ribose and phosphate residues. Other investigators have since presented evidence which suggests the hypothesis that ring-opened intermediates, at the riboside or ribotide level are involved in purine interconversions and synthesis.

Thus FLAVIN and ENGELMAN³ have noted a discrepancy between specific activities of administered guanine-¹⁴C and nucleic acid guanine isolated from *Tetrahymena gelii*. The possibility of exchange of the 8-carbon was ruled out by these authors based on the nutritional inertness of 2,4-diamino-5-formylamino-6-hydroxypyrimidine and 4-formamido-5-imidazole carboxamide. However, nothing is said of the possibility of ribosides or ribotides of these compounds being involved. In this connection BEN ISHAI *et al.*⁴ have shown that the riboside of 4-amino-5-imidazole carboxamide is effective in promoting the growth of an *Escherichia coli* mutant. Further, there is evidence that 4-formamidoimidazole-5-carboxamide is utilized by mutants of *E. coli*⁵, and that the free amine is utilized by yeast⁶, *Lactobacillus arabinosus*⁷, pigeon liver homogenates⁸, a mutant of *Ophidioma*⁹, and by the intact rat¹⁰. Finally BUCHANAN *et al.* have found that incubation of radioactive 4-aminoimidazole-5-carboxamide with inosinic acid and hypoxanthine resulted in four to five times more activity in the inosinic acid than in the hypoxanthine, showing that the elements of ribose and phosphate are added to the carboxamide prior to ring closure with 'active' formate¹¹.

GREENBERG has obtained similar results as mentioned above¹.

We have studied the incorporation of adenine-8-¹³C into rat² purines under conditions almost identical with those used by BROWN *et al.*³ for adenine-1,3-¹⁵N. The much lower incorporation of 8-labeled adenine (Table) may be evidence for ring opening in the incorporation of exogenous purines. These conclusions are not in agreement with those in the study by MARRIAN *et al.*⁴ based on doubly labeled adenine. The reports by SCHULMAN and BUCHANAN⁵ and by GREENBERG⁶ that the 2-carbon seems to be more labile than the 8-carbon suggest that experiments on feeding of 2,4-¹⁴C and 4,8-¹⁴C labeled adenine might give definitive information on the lability of the 2- and 8-carbons of exogenous adenine in the rat.

Table.—Feeding of Adenine-8-¹³C (30 mg per kilo per day)

Fraction	Atom percent Excess C-13	Atom % C-13 calculated on basis of 100% C-13 in Adenine fed
Dietary Adenine-8- ¹³ C	6.67	100.0
Allantoin	0.035	0.525
Urea	0.216	3.24
Purine Hydrochlorides	0.035	0.525

Feeding of Adenine-1,3-¹⁵N (27 mg per kilo per day)⁴

Fraction	Atom percent Excess N-15	Atom % N-15 calculated on basis of 100% N-15 in Adenine fed
Dietary Adenine-1,2- ¹⁵ N	6.29	100.0
Allantoin	0.348	5.53
Urea	0.003	0.05
Purine Hydrochlorides	0.23	3.65

75 mg of adenine-8-¹³C was incorporated into 150 g of rat feed biscuits, the adenine having been first diluted with some glucose. Five adult male rats (Sherman strain) totalling 750 g were fed the above diet at the rate of 10 g per rat per day for three days. On the morning of the fourth day the rats were fed unlabeled diet and then sacrificed in the afternoon. The diet had been formed into wafers and dried to minimize loss during feeding. The organs were removed and frozen in dry ice methanol solution. The combined frozen organs were homogenized three times with ethanol and once with dry ether, filtering each time. The pale pink powder was stirred once with hot ethanol and filtered, and this step was repeated with dry ether. The dry powder amounted to 18 g.

17 g of dry, powdered organs were extracted with 10% sodium chloride solution and the free nucleic acids were obtained by the method of PLENTL and SCHOENHEIMER⁷. The purine hydrochlorides were obtained by the usual procedures⁷.

¹ G. R. GREENBERG, Fed. Proc. 9, 179 (1950).

² M. GORDON, J. Chem. Soc. 1954, 757.

³ G. B. BROWN, P. M. ROLL, A. A. PLENTL, and L. F. CAVALIERI, J. Biol. Chem. 172, 469 (1953).

⁴ D. H. MARRIAN, V. L. SPICER, M. E. BALIS, and G. B. BROWN, J. Biol. Chem. 189, 533 (1951).

⁵ M. P. SCHULMAN, J. M. BUCHANAN, and C. S. MILLER, Federation Proc. 9, 225 (1950).

⁶ G. R. GREENBERG, Federation Proc. 9, 179 (1950).

⁷ A. A. PLENTL and R. SCHOENHEIMER, J. Biol. Chem. 153, 203 (1944).

¹ M. GORDON, Science 114, 2952 (1951).

² G. R. GREENBERG, J. Biol. Chem. 190, 611 (1951).

³ M. FLAVIN and M. ENGELMAN, J. Biol. Chem. 200, 59 (1953).

⁴ R. BEN ISHAI, E. D. BERGMANN, and B. E. VOLCANI, Nature 168, 1124 (1951).

⁵ E. D. BERGMANN, R. BEN ISHAI, and B. E. VOLCANI, J. Biol. Chem. 194, 531 (1953).

⁶ W. J. WILLIAMS, Fed. Proc. 10, 270 (1951).

⁷ W. SHIVE, Ann. New York Acad. Sci. 52, 1225 (1950).

⁸ M. P. SCHULMAN, J. M. BUCHANAN, and C. S. MILLER, Federation Proc. 9, 225 (1950).

⁹ N. FRIES, S. BERGSTROEM, and M. ROTTENBERG, Physiol. Plantarum 2, 210 (1949).

¹⁰ C. S. MILLER, S. CURIN, and D. W. WILSON, Science 112, 654 (1950).

¹¹ J. M. BUCHANAN, J. Cell. Comp. Physiol. 38, 143 (1951).

Allantoin was isolated as the mercuric salt¹, and urea was isolated as the dioxanthidrol².

The mass spectrometer results are given in the Table for our experiment and that of BROWN *et al.*¹.

It will be seen that from a comparison of our data with those of the N-15 experiment there is markedly less incorporation of the 8-carbon than of the 1,3-nitrogens of dietary adenine into nucleic acid purines. We thus find support for our earlier hypothesis regarding the complex path, involving ring opening, followed in the incorporation of exogenous purines.

The author is indebted to Sir CHARLES HARRINGTON for his generous gift of isotopically labeled formic acid, to Prof. A. HADDOW for providing animal facilities, and to Dr. R. BENTLEY for mass Spectrometer measurements. This work was done during the tenure of a British-American exchange fellowship of the American Cancer Society and the British Empire Cancer Campaign.

M. GORDON³

Imperial College of Science and Technology, London, January 20, 1955.

Zusammenfassung

Der Einbau von oral an Ratten verabreichtem Adenin-8-C¹³ in den Purinanteil der Nukleinsäuren wurde mit den in der Literatur für die Aufnahme von Adenin-1,3-N¹⁵ beschriebenen Werten verglichen. Die wesentlich geringere Aufnahme von Adenin-8-C¹³ lässt darauf schliessen, dass der Einbau von exogenen Purinen unter Ringöffnung erfolgt.

¹ G. B. BROWN, P. M. ROLL, A. A. PLENTL, and L. F. CAVALIERI, J. Biol. Chem. 172, 469 (1953).

² O. FOSSE, Ann. Chem. 6, 13 (1916).

³ Present address: Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, New Jersey.

Über ein carcinostatisch wirksames Hydrochinonderivat

Vor kurzem haben DOMAGK, PETERSEN und GAUSS in der Zeitschrift für Krebsforschung über 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon (I) berichtet¹. Die Verbindung wirkt nach diesen Autoren auf das Wachstum des auf Ratten intramuskulär implantierten Yoshida-Sarkoms (Ascites-Form) hemmend.

Wir hatten diese Substanz schon 1½ Jahre vor der Domagkschen Publikation hergestellt und waren zu jenem Zeitpunkt bereits einen Schritt weiter gelangt, hatte sich doch nach Untersuchungen von LOUSTALOT, SCHÄR und MEIER² in unseren biologischen Laboratorien herausgestellt, dass das rot gefärbte Bis-äthylenimino-benzochinon bei peroraler Gabe³ das Wachstum von überimpfbaren Mäuse- und Rattentumoren wenig hemmte. Demgegenüber erwies sich an einem breiten Spektrum von sieben überimpfbaren Tumoren, ebenfalls bei peroraler Applikation, ein ursprünglich als Nebenprodukt gewonnenes, farbloses Hydrochinonderivat bei entsprechender Dosierung von aussergewöhnlicher Wirksamkeit².

Veranlasst durch die eingangs erwähnte Publikation sei daher über diese Substanzgruppe schon jetzt berichtet.

Das nun von DOMAGK beschriebene 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon (I) wird in besonders guter Ausbeute bei der Einwirkung von zwei Mol Äthylenimin auf drei Mol Benzochinon erhalten.

Anders verläuft die Reaktion, wenn auf ein oder mehr Mole Äthylenimin nur ein Mol Benzochinon verwendet wird. Anfangs bildet sich dabei nur das Chinonderivat I. Im Laufe mehrerer Stunden entsteht jedoch ein hellrötliches Kristallgemisch, in welchem man unter dem Mikroskop die orangen Rhomboeder des Chinons, nebst weisslichen, mikrokristallinen Konglomeraten erkennt. Diese schmelzen nicht bis 310° und sind unlöslich in Wasser und allen organischen Lösungsmitteln. Ihre Analyse stimmt auf 2,5-Bis-äthylenimino-hydrochinon (II).

Die neue Verbindung II ist in 2-n. Natronlauge löslich, und wird von überschüssigem Benzochinon bei 80° glatt zum Bis-äthylenimino-benzochinon (I) oxydiert. Umgekehrt lässt sie sich aus dem Chinon I durch Hydrierung gewinnen.

Weitere Untersuchungen legten jedoch die Vermutung nahe, dass das 2,5-Bisäthylenimino-hydrochinon nicht als solches, sondern als *inneres Salz III* vorliegt. Diese Annahme wird durch das IR.-Spektrum bestätigt: eine C=O- oder eine OH-Bande fehlt völlig, dafür treten bei 3,67 und 3,88 μ Absorptionen auf, die auf Ladungsverschiebungen hindeuten. Vermutlich ist aber dieses innere Salz III nicht monomer ($x = 1$), sondern bildet eine Art Ionengitter, in dem zwei oder mehrere Hydrochinonkerne intermolekular ihre Protonen ausgetauscht haben, so dass der Sauerstoff der einen Molekel dem Stickstoff einer zweiten gegenüber liegt und so fort. In der Formel III könnte x daher einen hohen Wert haben.

Das Auftreten eines solchen Hydrochinons in der Form eines inneren Salzes und seine Tumorstärke waren so bemerkenswert, dass eine weitere chemische Bearbeitung angezeigt schien.

Zunächst war es möglich, die Reaktion so zu leiten, dass nur das Hydrochinon III, nicht aber Bis-äthylenimino-benzochinon (I) entstand.

Dann wurde die Frage abgeklärt, ob bisher bei der Darstellung von Aminochinonen bei uns und anderwärts¹ das Auftreten von Aminhydrochinonen übersehen worden wäre. Dazu wurde die Reaktion zwischen Benzochinon und Piperidin bzw. Benzochinon und Pyrrolidin herangezogen. Im ersteren Fall isolierten wir nur die bereits bekannten, permanganatfarbigen Prismen des 2,5-Bis-piperidino-benzochinons (IV)². Einzig bei Anwendung eines grossen Überschusses an Piperidin liess sich neben viel harzigen Produkten eine sehr geringe Menge des weissen, schwer löslichen 2,5-Bis-piperidino-hydrochinons (V) gewinnen. Bei der Reaktion von Benzochinon und Pyrrolidin konnte hingegen überhaupt kein Hydrochinon VII entdeckt werden; es entstanden nur die karminroten Platten des 2,5-Bis-pyrrolidino-benzochinons VI. Trimethylenimin lieferte ebenfalls nur ein Chinon, das in violetten Prismen kristallisierende 2,5-Bis-trimethylenimino-benzochinon. Demnach verläuft die Reaktion mit den höheren Homologen des Äthylenimins ganz verschieden von derjenigen mit Äthylenimin selbst.

Aus diesen Chinonen durch Reduktion erhaltene Hydrochinone, nämlich das erwähnte 2,5-Bis-piperidino-hydrochinon (V) und das 2,5-Bis-pyrrolidino-

¹ G. DOMAGK, S. PETERSEN und W. GAUSS, Z. Krebsforschung 59, 617 (1954).

² P. LOUSTALOT, B. SCHÄR und R. MEIER, vgl. die nachfolgende Arbeit, Exper. 11, 186 (1955).

³ Die Verbindung ist in Wasser schwer löslich.

¹ Vgl. die Zusammenfassung bei M. MARTYNOFF und G. TSATSAS, Bull. Soc. Chim. Fr. 14, 52 (1947), und C. J. CAVALLITO, A. E. SORIA und J. O. HOPPE, J. Amer. Chem. Soc. 72, 2661 (1950).

² B. LACHOWICZ, Mh. Chem. 9, 506 (1888).