

in 1 ccm klar lösen, wenn man 31 mg H_3BO_3 + 20 mg NaOH zugibt und zuletzt mit 25 mg KH_2PO_4 abpuffert.

2-Oxy-2'-methoxy-benzil: Aus 2,2'-Dimethoxy-benzil (2 g) wurden durch Kochen in 20 ccm Eisessig mit 5 ccm 66-proz. Bromwasserstoffsäure (10—20 Min.) neben bromhaltigen Produkten und unverändertem Ausgangsmaterial durch häufiges Umkrystallisieren aus absol. Alkohol (tief kühlen!) als bromfreie Phenolfraktion weiße, briefumschlagähnliche Blättchen vom Schmp. 124—126° erhalten.

$C_{15}H_{12}O_4$ (256.1). Ber. C 70.29, H 4.72, OCH_3 12.10.
Gef. „ 70.01, „ 4.54, „ 12.14.

Die tiefgelbe Schmelze wird beim Erkalten wieder farblos.

Frau A. Birkofer, Fr. A. Roehse und Hrn. K. Breitwieser danken wir für Unterstützung bei Ausführung der Versuche.

137. Richard Kuhn und Helmut Beinert: Über das aus krebserregenden Azofarbstoffen entstehende Fermentgift.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 15. Juli 1943.)

Dimethylaminoazobenzol $C_6H_4 \cdot N:N \cdot C_6H_4 \cdot N(CH_3)_2$, der bekannteste Vertreter unter den krebserregenden Azofarbstoffen¹⁾ (Buttergelb), wird *in vivo* an der Azogruppe reduktiv gespalten²⁾. Dieser Vorgang gleicht der Bildung von Sulfanilamid aus Prontosil rubrum im Tierkörper.

In 2 vor kurzem erschienenen Mitteilungen geben C. J. Kensler, S. O. Dexter und C. P. Rhoads³⁾ sowie C. J. Kensler, N. F. Young und C. P. Rhoads⁴⁾ an, daß bei 13 untersuchten aromatischen *p*-Diaminen a) die hemmende Wirkung im Hefecarboxylase-Cocarboxylase-system und im Diphosphopyridin-nucleotid-fermentssystem offensichtlich in Beziehung steht zur krebserregenden Wirkung der Azofarbstoffe, aus denen sie entstehen können, b) die Hemmung der Carboxylase parallel geht der Beständigkeit⁵⁾ der freien Radikale (Wursterschen Farbsalze), die durch Oxydation dieser *p*-Diamine gebildet werden. Danach sollten diese freien Radikale die wahren Fermentgifte und möglicherweise auch die eigentlichen krebserregenden Stoffe sein. „In each case the toxicity was associated with the formation of colored oxidation products from the reduced diamines.“ Uns schien es von höchstem Interesse festzustellen, ob auch andere freie Radikale, soweit sie wasserlöslich und luftbeständig sind, so auffallende biologische Wirkungen entfalten.

¹⁾ Zusammenfassung: H. v. Euler u. B. Skarzynski, Biochemie der Tumoren, Stuttgart 1942, S. 119 usw.

²⁾ E. S. Stevenson, K. Dobriner u. C. P. Rhoads, Cancer Res., in press (zit. nach Journ. biol. Chem. **143**, 465 [1942]). Die entsprechende hydrierende Spaltung von *o*-Amino-azotoluol im Tierkörper hatte schon Y. Hashimoto, Gann. **29**, 306 [1935], festgestellt.

³⁾ Cancer Res. **2**, 1 [1942].

⁴⁾ Journ. biol. Chem. **143**, 465 [1942].

⁵⁾ L. Michaelis, M. P. Schubert u. S. Granick, Journ. Amer. chem. Soc. **61**, 1981 [1939].

Die Schlußfolgerungen der amerikanischen Forscher mußten aber zunächst noch experimentell überprüft werden. Denn es wurde als Carboxylase lediglich ausgewaschene Trockenhefe verwendet und die Bildung der Wursterschen Farbsalze aus den zugesetzten *p*-Diaminen diesen Hefepreparaten bzw. der bei Anwesenheit von Luft stattfindenden Autoxydation überlassen. Von Versuchen mit hochgereinigter Carboxylase und kristallisierten Wursterschen Salzen war eine Entscheidung zu erwarten.

Die von uns verwendeten Carboxylase-Präparate waren aus Hefe der Löwenbrauerei München nach der Vorschrift von D. F. Green, D. Herbert und V. Subrahmanyan⁶⁾ dargestellt, Wursters Rot nach R. Willstätter und J. Piccard⁷⁾, Wursters Blau nach der bei E. Weitz ausgeführten Dissertation von K. Fischer⁸⁾. Die Messung der carboxylatischen Spaltung von Brenztraubensäure erfolgte in Manometergefäßen nach Warburg. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. (Temperatúrausgleich) wurde eine Lösung von Natriumpyruvat eingekippt und die CO₂-Entwicklung nach 3, 6 und 9 Min. gemessen; Temperatur 30°, im Gasraum Luft. Wir fanden: 1) *asymm.* Dimethyl-*p*-phenylendiamin hemmt nicht bis zur höchsten geprüften Konzentration von 4×10^{-3} Mol/l, *N.N.N'.N'*-Tetramethyl-*p*-phenylendiamin kaum bis 7×10^{-4} Mol/l. Man muß allerdings die Lösungen des Tetramethylkörpers sofort nach der Herstellung verwenden. Wenn nach einigem Stehenlassen Blaufärbung aufgetreten ist, so wird die Carboxylase bereits merklich gehemmt. 2) Krystallisierte Präparate von Wursters Rot und Wursters Blau hemmen.

Beispiel 1: Im Manometergefäß 0.3 ccm Fermentsuspension; 0.2 ccm 0.5-*m.* Citratpuffer, p_H 6.0; 0.3 ccm 1-*m.* Natriumpyruvat; Gesamtvolumen 2 ccm; Endkonzentration des Hemmstoffs 1.5×10^{-4} Mol/l.

ccm CO ₂ von Minute	1—3	4—6	7—9	1—9
ohne Zusatz.....	197	87	44	328
mit Wursters Rot.....	154	83	43	280
mit Wursters Blau.....	124	75	41	240

Lösungen von Dimethyl-*p*-phenylendiamin, die mit 1 Atom Brom je Mol. oxydiert waren, zeigten die gleiche Wirksamkeit. Bis hierher stehen unsere Versuche mit den Vorstellungen von Kensler, Young und Rhoads in Einklang.

3) Geht man jedoch mit der Menge des Oxydationsmittels über 1 Atom Br je Molekül Diamin hinaus, wobei unter Rückgang der Farbe die Radikalkonzentration wieder abnimmt, so nimmt das Hemmungsvermögen weiter beträchtlich zu (Abbild. 1 und 2).

Es fiel auf, daß bei mehrstündigem Stehenlassen einer Lösung von Wursters Rot, wobei die Farbe nach Violettschlag, das Hemmungsvermögen nicht abnahm. Bei der Oxydation von Tetramethyl-*p*-phenylendiamin mit Brom in wäßr. Lösung tritt, auch wenn schon 2 Atome Br je Mol. zugesetzt sind, die blaue Farbe nach kurzer Zeit wieder auf⁹⁾. Nach Zusatz von 3—4 Atomen Br kommt plötzlich nicht mehr die blaue, sondern

⁶⁾ Journ. biol. Chem. **138**, 327 [1941].

⁷⁾ B. **41**, 1458 [1908].

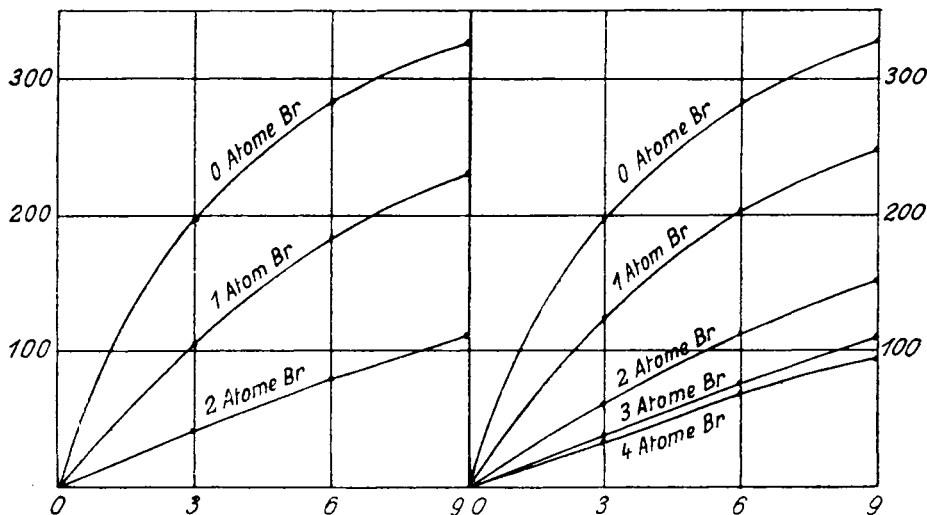
⁸⁾ Über Radikale und merichinoide Salze, Halle a. d. S. 1926. Für die Überlassung von *N.N.N'.N'*-Tetramethyl-*p*-phenylendiamin haben wir Hrn. Prof. Dr. E. Weitz zu danken.

⁹⁾ Vergl. L. Michaelis, a. a. O.; FaBu. 15, S. 1991.

eine rosarote (in höherer Konzentration kirschrote) Farbe zurück, die lange bestehen bleibt. Solche Lösungen, die offenbar kein Radikal mehr enthalten, waren im Carboxylase-Test am giftigsten. Auch beim Dimethyl-*p*-phenylen-

N.N-Dimethyl-*p*-phenyldiamin oxydiert durch

N.N.N'.N'-Tetramethyl-*p*-phenyldiamin oxydiert durch



Abbild. 1.

Abbild. 2.

Hemmung der Carboxylase durch oxydierte Lösungen von *N.N*-Dimethyl- und *N.N.N'.N'*-Tetramethyl-*p*-phenyldiamin.

Abszisse: Minuten; Ordinate: cmm CO₂.

Oxydation in 0.001-*m*. wäbr. Lsg. mit 1.2 (3.4) Atomen Br/Molekül. Im Manometergefäß: 0.3 ccm Fermentsuspension; 0.2 ccm 0.5-*m* Citratpuffer, pH 6.0; 0.3 ccm 1-*m* Natriumpyruvatlsg.; 0.6 ccm 5×10^{-4} -*m* oxydierte Lsg. Gesamtvol. 2 ccm. Endkonz. des Hemmstoffs 1.5×10^{-4} Mol/l.

diamin waren die mit einem Überschuß von Brom (3 Atome je Mol.) versetzten, nahezu farblosen Lösungen am wirksamsten. Kontrollversuche ergaben, daß die bei der Oxydation der Diamine mit Brom in reinem Wasser entstehenden Br⁻- und H⁺-Ionen ohne Einfluß sind. Überschüssiges Brom (Br₂) hemmt stark, läßt sich aber durch einen N₂-Strom leicht entfernen.

4) Als 1 g *N.N.N'.N'*-Tetramethyl-*p*-phenyldiamin mit Brom (4 Atome/Mol.) in 1500 ccm Wasser (Gesamtvol.) bis zum Auftreten der kirschroten Farbe oxydiert und die hochwirksame Lösung bei 35° im Vak. eingengt wurde, zeigte sich zu unserer Überraschung, daß der Wirkstoff mit Wasserdampf flüchtig ist und sich in den ersten hellgelben Anteilen des Destillats wiederfindet. Der mit Wasserdampf nicht flüchtige Rückstand war wirkungslos. Durch 5-maliges Ausschütteln des stechend riechenden ersten Destillats, das inzwischen mehr bräunlich geworden war, mit Chloroform erhielten wir 170 mg *p*-Benzochinon vom Schmp. 110–113°. Zur Analyse wurde sublimiert. Schmp. und Misch-Schmp. 112–114° (Schmp. nach Kofler 113°).

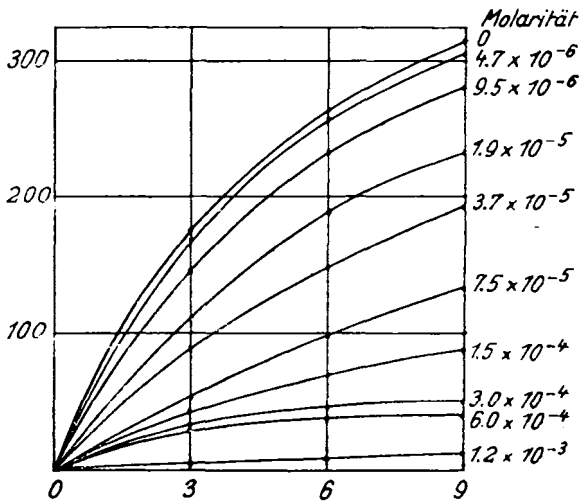
C₆H₄O₂ (108). Ber. C 66.67, H 3.73. Gef. C 66.37, 66.43, H 4.18, 4.28.

Im Carboxylasetest ist reines Chinon wirksamer als alle bisher untersuchten Oxydationsprodukte von *p*-Diaminen¹⁰⁾.

Beispiel 2: Bedingungen wie Beispiel 1. Andere Fermentfraktion.

cm ^m CO ₂ von Minute	1—3	4—6	7—9	1—9
ohne Zusatz	154	82	44	280
mit Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin + 1 Atom Br; 1.5 × 10 ⁻⁴ - <i>m</i>	87	61	38	186
mit Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin + 4 Atome Br; 1.5 × 10 ⁻⁴ - <i>m</i>	21	20	13	54
mit Wasserdampfdestillat, 1. Frakt. (880 ccm), davon 0.6 ccm unverdünnt	39	3	2	44
mit Wasserdampfdestillat, 1. Frakt. auf übliche Konz. des Hemmstoffs verdünnt	20	19	12	51
mit <i>p</i> -Benzochinon; 3.3 × 10 ⁻⁴ - <i>m</i>	20	4	3	27
ber. aus Abbild. 3 für 1.5 × 10 ⁻⁴ - <i>m</i>	27	10	10	47

Die Wirkung steigender Chinonmengen ist aus Abbild. 3 ersichtlich.



Abbild. 3.

Hemmung der Carboxylase durch *p*-Benzochinon.

Abszisse: Minuten; Ordinate: cm^m CO₂.

Im Manometergefäß: 0.3 ccm Fermentsuspension; 0.2 ccm 0.5-*m* Citratpuffer, pH 6.0; 0.3 ccm 1-*m* Natriumpyruvatlsg.; 0.3 ccm frische Chinonlsg. Gesamtvolumen 2 ccm.

Cystein sowie Ferrosulfat verhindern die Chinonwirkung. Dies steht in Übereinstimmung mit den von den amerikanischen Autoren⁴⁾ an rohen Wirkstofflösungen erhobenen Befunden. Auf 1 Mol. Chinon werden 2 Mol. Cystein benötigt, um die volle Fermentwirkung zu erhalten. Wird das Cystein nach bereits erfolgter Chinoneinwirkung zugesetzt, so wird wesentlich mehr benötigt. Da die Inkubationszeit des Ferments mit Chinon nicht ohne Einfluß ist, spielt auch der Zeitpunkt des Cysteinzusatzes eine Rolle.

¹⁰⁾ Weitere Chinone werden untersucht.

5) Als noch die Wursterschen Salze als Fermentgifte in Betracht kamen, haben wir als wasserlösliche und O₂-beständige freie Radikale geprüft: a) Nitrosodisulfonsaures Kalium¹¹⁾ O:N:(SO₃K)₂, dessen permanganat-ähnliche Farbe im Fermentversuch bestehen blieb; es war mit 9.3×10^{-3} Mol/l unwirksam. b) Das blaue Doppelradikal Porphyrindin¹²⁾ wurde auch nicht entfärbt und blieb gleichfalls ohne Wirkung bis 2.1×10^{-3} Mol/l. c) Das rote Porphyrexid¹³⁾, eines der stärksten Oxydationsmittel, hemmte mit 100 γ je ccm etwa gleich stark wie Chinon mit 10 γ je ccm. Hieraus ist zu schließen, daß es sich nicht einfach um eine Angelegenheit des Redoxpotentials, sondern um eine besondere Eigenschaft der Chinonmoleküle handelt. — Diese Versuche haben uns in der Auffassung bestärkt, daß die Effekte, um die es sich handelt, nicht von freien Radikalen ausgehen.

Daß es sich bei dem aus krebserregenden Azofarbstoffen hervorgehenden Carboxylasegift um *p*-Benzochinon handelt, ist im Hinblick auf folgende Tatsachen bemerkenswert:

H. Wieland hat bereits gezeigt, daß verschiedene Fermente (Aldehydrase und Xanthindehydrase der Milch, Succinodehydrase des Muskels) gegen Chinon sehr empfindlich sind¹³⁾. Da H. Wieland an der gleichen Stelle auch schon über die starke Schädigung eines Hefefermentensystems durch Chinon berichtet hat, ist es auffallend, daß Kensler und Mitarbeiter die Möglichkeit nicht erwogen haben, auch für die Hemmung der von ihnen untersuchten Fermentensysteme der Hefe eine höhere als die merichinoide Oxydationsstufe der Diamine verantwortlich zu machen. J. H. Quastel¹⁴⁾ berichtete über die Giftigkeit von Chinon gegenüber Urease, A. Alexejew und K. Russinowa¹⁵⁾ erkannten die Giftigkeit für Blutkatalase. Die Empfindlichkeit der Kartoffeloxydase gegen *o*-Chinon hat F. Kubowitz¹⁶⁾ hervorgehoben.

Nach N. Takizawa¹⁷⁾ besitzt *p*-Benzochinon cancerogene Wirkung, wenn es in 1-proz. Benzollösung täglich auf die Haut von Mäusen gepinselt wird. Es entstanden Papillome, die nach 200 Tagen bei 15—20% der Tiere in Epitheliome übergingen.

Für die krebserregenden Kohlenwasserstoffe von der Art des 1,2,5,6-Dibenz-anthracens hat E. Boyland bei der Photooxydation die Möglichkeit eines Überganges in Hydrochinone¹⁸⁾ oder 9,10-Anthrachinone¹⁹⁾ in Betracht gezogen. Nach J. W. Cook und R. H. Martin²⁰⁾ entstehen aber dabei

¹¹⁾ Dargestellt nach F. Raschig, Schwefel- und Stickstoff-Studien, Leipzig und Berlin 1924, S. 149.

¹²⁾ B. **68**, 1528 [1935]. E₀' für Porphyrexid = +0.73, für Porphyrindin = +0.56, für Chinon = +0.27 Volt (pH = 7).

¹³⁾ A. **509**, 182 [1934], **477**, 24 [1929], **485**, 199 [1930], **492**, 162 [1931]. Ob die Empfindlichkeit mancher Bakterien gegen gewisse Chinone (vergl. z. B. A. E. Oxford, Chem. Ind. **61**, 189 [1942]; Biochem. Journ. **36**, 438 [1942]; A. E. Oxford u. H. Raistrick, Chem. Ind. **61**, 128 [1942]; W. K. Auslow u. H. Raistrick, Biochem. Journ. **32**, 687 [1938];) sich auf die Vergiftung von Bakterienfermenten zurückführen läßt, darf noch der Prüfung.

¹⁴⁾ Biochem. Journ. **27**, 1116 [1933].

¹⁵⁾ Bull. Inst. Rech. biol. Perm. **6**, 425 [1929] (zit. nach C. **1929** II, 2055).

¹⁶⁾ Biochem. Ztschr. **292**, 221 [1937].

¹⁷⁾ Proceed. Imp. Acad. [Tokyo] **16**, 309 [1940] (zit. nach C. **1941** I, 653).

¹⁸⁾ Nature [London] **130**, 274 [1932].

¹⁹⁾ Biochem. Journ. **27**, 791 [1933].

²⁰⁾ Journ. chem. Soc. London **1940**, 1125.

keine Chinone, und es besteht keine Beziehung zwischen krebserregender Wirksamkeit der Kohlenwasserstoffe und ihrer Neigung zur Photooxydation.

Gegen die Vermutung eines Zusammenhanges zwischen der Erzeugung von Leberkrebs durch Buttergelb und der Hemmung der Carboxylase und anderer Fermente durch Chinon spricht anscheinend die Tatsache, daß Dimethyl-*p*-phenylendiamin, das auf dem Weg Azofarbstoff → Diamin → Wurstersalz → Chinonimin → Chinon durchlaufen wird²⁾, nach R. Kinoshita²¹⁾ an der Ratte peroral kein Carcinom erzeugt. Es ist aber zu berücksichtigen, was schon 1887 C. Wurster²²⁾ erkannt hat, daß frische, dem eben getöteten Tier entnommene Muskeln eine Lösung von Dimethyl-*p*-phenylendiamin blauschwarz färben, und daß diese Erscheinung ausbleibt, wenn die Muskeln vorher gekocht werden. Nach all unseren Erfahrungen tritt (vergl. Abbild. 1 und 2), wenn Bildung der Wursterschen Farbsalze stattfindet, auch schon Chinon auf²³⁾. Vielleicht kommt es nur darauf an, daß durch die besonderen Affinitäten der krebserregenden Azofarbstoffe bzw. ihrer Reduktions- und Spaltungsprodukte zu bestimmten Gewebeelementen im Tierkörper Chinon an solchen Stellen im Organismus immer wieder neu entsteht, die von Chinon, das man per os oder intravenös zuführt, nicht erreicht werden können, weil dieses schon früher anderweitig abreagiert²⁴⁾. Auch bei percutaner Zufuhr dürfte nur ein sehr kleiner Teil zur Wirkung gelangen, so daß der Erfolg der Versuche von N. Takizawa (Erzeugung von Epitheliomen durch Pinseln mit *p*-Benzochinon) die wahre Wirksamkeit des Chinons wohl noch nicht erkennen läßt.

138. Paul Seidel: Anilblau*).

(Aus Daisbach, Baden, eingegangen am 5. Juli 1943.)

Vor 100 Jahren berichtete Fritzsche¹⁾ über einen indigoähnlichen Stoff, welchen er aus dem durch Kochen seiner Chrysanilsäure mit verdünnter Mineralsäure sich primär abscheidenden kristallisierenden, aber äußerst zersetzlichen blauschwarzen Produkt erhalten hatte und welcher im folgenden als Anilblau bezeichnet ist. Durch seine auffallende Ähnlichkeit mit dem Indigo erregte dieser Stoff vor 40 Jahren auch mein Interesse. Es war bis zu dieser Zeit nicht gelungen, für die Chrysanilsäure eine Konstitutionsformel aufzustellen, trotzdem im Laufe der Jahrzehnte sich eine große Reihe namhafter Forscher²⁾ mit der Säure beschäftigt hatte.

²¹⁾ R. Kinoshita, zit. nach H. v. Euler u. B. Skarzynski, a. a. O., S. 122; vergl. auch C. Dittmar, Ztschr. Krebsforsch. **52**, 17 [1942], u. zwar S. 26/27.

²²⁾ Arch. Anat. u. Physiologie, Physiol. Abt. **1887**, 179.

²³⁾ Daß die Wursterschen Salze in wäßr. Lösung Gleichgewichtsgemische sind, haben L. Michaelis, M. P. Schubert u. S. Granick, a. a. O., gezeigt.

²⁴⁾ Allein die Bildung von Methämoglobin aus Hämoglobin und Chinon ist schon Gegenstand zahlreicher Abhandlungen gewesen, vergl. z. B. W. Heubner, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **72**, 239 [1913].

* Die Arbeit wurde im wesentlichen in den Jahren 1903–1907 im Indigo-Laborat. der Bad. Anilin- u. Sodafabrik, Ludwigshafen, durchgeführt.

¹⁾ Journ. prakt. Chem. **28**, 198 [1843].

²⁾ Fritzsche, Journ. prakt. Chem. **23**, 67 [1841]; A. **39**, 76 [1841]; Handwörterbuch der Chemie **2**, 287 [1842]; Gerhardt, Lehrbuch der Chemie (deutsch von Wagner) **3**, 569 [1855]; Heumann u. Bachofen, B. **26**, 225 [1893]; Hentschel, Journ. prakt. Chem. [2] **60**, 577 [1899].