

55. Erich Ludolphy: Notiz über eine Tetrazoliumverbindung der Pyrimidinreihe

[Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg]
(Eingegangen am 4. Januar 1951)

Ausgehend vom Phenylhydrazon des Uracil-4-aldehyds wird über das entsprechende Formazan die Tetrazoliumverbindung dargestellt. Bei der Einwirkung auf tierische Zellen zeigt diese Verbindung keine Besonderheiten und Vorteile hinsichtlich spezifischer Anfärbung, Farbtiefe und Eindringungsvermögen gegenüber den bisher verwendeten Verbindungen.

Die von H. v. Pechmann und P. Runge¹⁾ schon 1894 dargestellten Tetrazoliumsalze wurden von R. Kuhn²⁾ als biologische Reduktionsindikatoren empfohlen und angewendet. Sie sind für den Nachweis von Reduktionsvorgängen und mit gewissen Einschränkungen von Reduktionsorten innerhalb einer Zelle sehr geeignet, da die farblosen, wasserlöslichen Tetrazoliumverbindungen durch Reduktion in die tief gefärbten, wasserunlöslichen Formazane übergehen.

An pflanzlichen Zellen hat sich das Triphenyltetrazoliumchlorid zur Anfärbung bewährt³⁾ und auch bei Tumorzellen lassen sich gute Färbungen erzielen⁴⁾. An Fibroblasten in der Gewebekultur konnte H. Lettré⁵⁾ aber erst mit hohen Dosen, die schon eine Zerstörung der Zellen bewirken, eine Färbung erzielen. Hingegen ergab eine vom α -Phenylzimsäurenitril abgeleitete Tetrazoliumverbindung (H. Lettré⁵⁾ und W. Haede⁶⁾ schon mit nicht wachstumshemmenden Dosen eine Färbung innerhalb der Fibroblasten. Die Art der Substitution der Tetrazoliumverbindungen spielt demnach für das Eindringungsvermögen in die Zelle eine Rolle, und es erscheint daher wichtig, Variationen in der Substitution vorzunehmen, nicht nur im Hinblick auf eine Veränderung der Farbnuancen und der Farbtiefe, sondern auch auf eine Veränderung des Eindringungsvermögens in verschiedenartige Zellen. Auf Anregung von Hrn. Prof. Lettré habe ich daher eine Tetrazoliumverbindung der Pyrimidinreihe dargestellt, von der man durch die Möglichkeit der Anlagerung an Nucleinsäuren vielleicht Besonderheiten erwarten konnte.

Als Ausgangsmaterial wurde der von B. Johnson und A. Cretcher⁷⁾ dargestellte Uracil-4-aldehyd verwendet, der als Acetal durch Kondensation von Diäthoxyacetessigsäureester mit Thioharnstoff und Ersatz des Schwefels durch Sauerstoff erhalten wird. Das von Johnson und Cretcher aus dem freien Aldehyd dargestellte Phenylhydrazon (I) läßt sich in guter Ausbeute unmittelbar aus dem Acetal in saurer Lösung erhalten. Die Kupplung des Phenylhydrazons mit Benzoldiazoniumchlorid gestaltete sich zunächst durch seine Schwerlöslichkeit schwierig; in einem Gemisch von Pyridin und Natronlauge besitzt es hinreichende Löslichkeit, um die Umsetzung durchzuführen zu können. In alkalischer Lösung wird das entstehende Formazan (II) schon

¹⁾ B. 27, 2920 [1894].

²⁾ R. Kuhn u. D. Jerchel, B. 74, 949, [1941]; D. Jerchel, Fiat Review, Biochemie I, 59 [1947].

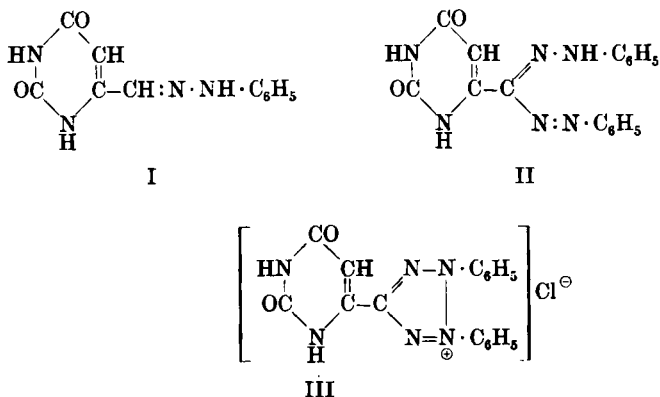
³⁾ G. Lakon, Ber. dtsch. botan. Ges. 60, 434 [1942].

⁴⁾ H. A. Hölscher, Ztschr. f. Krebsforsch. 56, 587 [1950]; dort weitere Literatur.

⁵⁾ Ztschr. f. Krebsforsch. 56, 302 [1948].

⁶⁾ Dissertat. Göttingen 1948. ⁷⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 53, 1991 [1931].

durch Luftsauerstoff entfärbt, so daß bei seiner Darstellung unter Luftausschluß gearbeitet werden muß. Für die Gewinnung der Tetrazoliumverbindung aus dem Formazan ließ sich die Dehydrierung mit Luftsauerstoff aber nicht präparativ verwerten; auch mit Bleitetraacetat ließen sich nur geringe



Mengen an kristallisierten Produkten erhalten. Durch Einwirkung von Isoamylnitrit in Eisessig ließen sich kristallisierte Produkte gewinnen, die durch Reduktion mit Ascorbinsäure in alkalischer Lösung das Ausgangs-Formazan zurücklieferten. Ihre Analyse spricht aber für den Eintritt von Nitrosogruppen in das Molekül. Da die Dehydrierung mit Isoamylnitrit die besten Ausbeuten an kristallinen Produkten ergab, wurde versucht, hieraus die Tetrazoliumverbindung zu erhalten und unter der Annahme, daß Nitrosamino-Gruppen vorliegen, die Verbindung in siedender alkoholischer Lösung mit Chlorwasserstoff behandelt. Nach diesem Verfahren gelang es, die Tetrazoliumverbindung III in analysenreiner Form zu erhalten.

Zellen des Mäuse-Ascites-Tumors werden bei der Bebrütung bei 37° durch diese Verbindung gefärbt, wobei sich zunächst wie mit Triphenyltetrazoliumchlorid rotgefärbte Plasmagranula zeigen. Die Färbung entsteht aber wesentlich langsamer als mit Triphenyltetrazoliumchlorid und nach dem Färbungsbeginn tritt schneller die Kristallisation des Formazans in der Zelle ein, wodurch eine Lokalisierung des Reduktionsortes erschwert ist. In vitro gezüchtete Fibroblasten werden durch die Verbindung nicht gefärbt. Sie zeigt also keine Vorteile oder Besonderheiten als Redoxindikator. Die Entwicklung des Mäuse-Ascites-Tumors in dem von Lettré⁸⁾ angegebenen Testverfahren wird durch eine tägliche Dosis von 100 γ nicht gehemmt, ebenso nicht durch eine Dosis von 200 γ , die aber schon toxische Wirkung auf die Mäuse zeigt.

Hrn. Prof. Lettré danke ich für die Anregung und Ermöglichung der Arbeit, Hrn. Dr. H. A. Hölscher für seine Hilfe bei der biologischen Auswertung der Verbindung.

Beschreibung der Versuche

Phenylhydrazon des Uracil-4-aldehyds (I): 6 g des Acetals des Uracil-4-aldehyds werden mit einem Gemisch von 25 ccm konz. Salzsäure und 50 ccm Wasser $\frac{1}{2}$ Stde. auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung von 2.8 g Phenylhydrazin in 40 ccm einer Mischung von Eisessig-Wasser (1 : 10) wird unter schnellem Rühren hinzugegeben.

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 268, 59 [1941]; Ergebn. d. Physiologie 46, 379 [1950].

Nach dem Abkühlen wird das ausgeschiedene Phenylhydrazon abfiltriert und mit Wasser gewaschen; Ausb. 99%, Schmp. 330° (Zers., Berl-Block). Das Phenylhydrazon ist schwer löslich in wäßr. Natronlauge und in Pyridin, löslich in einer Mischung der beiden.

N, N'-Diphenyl-3-[2.6-dioxy-pyrimidyl-(4)-]-formazan (II): Die Lösung von 1 g Phenylhydrazon des Uracil-4-aldehyds (I) in 100 ccm Pyridin, 300 ccm Wasser und 40 ccm 2*n* NaOH wird auf 0–3° gekühlt. Unter Durchleiten von Stickstoff und Rühren wird eine aus 0.4 g Anilin hergestellte Benzoldiazoniumchlorid-Lösung zuge-
tropft. 2 Stdn. nach Beendigung der Zugabe wird zunächst mit 2*n* HCl abgestumpft und das Formazan durch Zugabe von 110 ccm konz. Salzsäure ausgefällt. Das in dunkelroten Nadeln kristallisierende Formazan wird durch Umkristallisieren aus Eisessig gereinigt; Ausb. 1.1 g (76% d.Th.) vom Schmp. 266° (Berl-Block).

$C_{17}H_{14}N_6O_2$ (334.2) Ber. C 61.0 H 4.2 N 25.1 Gef. C 60.7 H 4.4 N 25.1

Das Formazan ist unlöslich in Wasser, schwer löslich in kaltem oder heißem Aceton, Alkohol, Benzol, Chloroform und Äther; löslich in heißem Eisessig, Pyridin, Nitrobenzol. Alkalische Lösungen des Formazans werden durch Sauerstoff entfärbt; die entfärbten Lösungen werden durch Ascorbinsäure wieder karminrot. Dithionit bewirkt auch Reduktion, die aber weiter geht und von erneuter Entfärbung gefolgt ist.

Reaktionsprodukt aus dem Formazan und Isoamylnitrit: 1 g des vorstehend beschriebenen Formazans wird in 100 ccm siedendem Eisessig gelöst und tropfenweise mit 0.8 g Isoamylnitrit versetzt, wobei die tiefrote Farbe einer blaßgelben weicht. Beim Erkalten kristallisieren farblose Nadeln aus, die oft zu Büscheln vereinigt sind. Durch Zugabe von 100 ccm absol. Äther wird die Abscheidung vervollständigt. Ausb. 1.335 g vom Schmp. 253° (Zers.), nach Braunfärbung ab 170°. Zur Analyse wurde das Produkt nochmals aus Eisessig umkristallisiert (getr. bei 100°/12 Torr). Die Analyse spricht für das Vorliegen des Acetats einer Dinitroso-tetrazolium-Verbindung.

$C_{19}H_{14}N_6O_6$ (450.2) Ber. C 50.6 H 3.1 N 24.9 Gef. C 50.3 H 3.7 N 23.4

Für das Acetat der erwarteten Tetrazoliumverbindung $C_{19}H_{14}N_6O_4$ (392.2) würde sich C 58.1 H 4.1 N 21.4 berechnen.

Das Reaktionsprodukt ist gut löslich in Wasser, Alkohol und Natronlauge. Durch Einwirkung von Ascorbinsäure in alkal. Lösung wurde das Formazan vom Schmp. 266° zurückerhalten, dessen Misch-Schmelzpunkt mit dem Ausgangs-Formazan keine Erniedrigung zeigte.

2.3-Diphenyl-5-[2.6-dioxy-pyrimidyl-(4)]-tetrazoliumchlorid (III): 1 g des vorstehend beschriebenen Produktes wurde in 20 ccm absol. Alkohol gelöst. Durch die siedende Lösung wurde 15 Min. ein kräftiger Strom von Chlorwasserstoff geleitet. Beim Einengen der restlichen Lösung i. Vak. kristallisierten farblose Stäbchen aus, die nach dem Umkristallisieren aus Äthanol den Schmp. 224° (Zers.) zeigten; Ausb. 0.2 g. Die Substanz ist hygroskopisch und wurde nach dem Trocknen bei 100°/12 Torr analysiert.

$C_{17}H_{13}N_6O_2Cl$ (368.6) Ber. C 55.3 H 3.6 N 22.8 Gef. C 55.1 H 3.8 N 22.6
