

OXYDATION KARZINOGENER AZOFARBSTOFFE XII.*
OXYDATION *meta*-SUBSTITUIERTER DERIVATE
DES N,N-DIMETHYL-4-AMINOAZOBENZOLS
MIT HILFE VON MOLEKULAREM SAUERSTOFF
IM UDEFRIENDSCHEM HYDROXYLASE-MODELL

M. MATRKA, V. RAMBOUSEK, J. DIVIŠ, V. ZVĚŘINA und J. MARHOLD

*Toxikologisches und organisch-technologisches Laboratorium I,
Forschungsinstitut für organische Synthesen, Pardubice-Rybitví*

Eingegangen am 16. April 1970

Im Rahmen der Untersuchung der Oxydation karzinogener Azoverbindungen, namentlich des N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzols und einiger seiner Derivate, richteten wir unsere Aufmerksamkeit auch auf die in der 3'-Stellung substituierten Derivate. In der vorhergehenden Mitteilung wurde von uns die Oxydation dieser Substanzen unter Zuhilfenahme verschiedener Oxydationsmittel sowie die elektrochemische Oxydation an einer Rotations-Platinscheibenmikroelektrode¹ untersucht. Zwecks tunlichster Näherung an die Bedingungen der enzymatischen Oxydation (durch mikrosomale Leberfraktionen) wurden von uns die *meta*-substituierten Derivate des N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzols mittels Molekularsauerstoffs unter Verwendung der Sauerstoffüberträger vom Typ komplexer Eisenverbindungen in Form des bekannten Udenfriendschen Hydroxylase-Modells² oxydiert. Die Versuche wurden dem bei der Oxydation des N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzols als solchen beschriebenen Verfahren³ angepaßt. Die Oxydation wurde mit zehn Substanzen durchgeführt. Die Oxydationsprodukte wurden zum Unterschied von der vorhergehenden Arbeit¹ mittels Silicagel-Dünnschichtchromatographie identifiziert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien und Apparatur

Modellpräparate. N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Methoxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Chlor-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Brom-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Jod-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Fluor-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Carboxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, 3'-Acetylamino-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol und 3'-Nitro-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol waren Präparate gleicher Provenienz und Reinheit wie die in der vorhergehenden Arbeit verwendeten¹. Ihre Reinheit wurde mit Hilfe der Papierchromatographie kontrolliert⁴. Die übrigen Chemikalien waren analysen- und chemisch reine Präparate der Firmen Lachema und Merck.

Die zur Oxydation mittels Molekularsauerstoffs verwendete Apparatur nach Udenfriend wurde in der von uns durchgeführten Modifikation bereits beschrieben^{1,3}.

Arbeitsgang

In ein Reduktionsgefäß wurden 13 ml Aceton, 0,055 g Kaliumhydrogenmonophosphat und 0,57 g Kaliumdihydrogenmonophosphat eingetragen, die in 23 ml Wasser, 0,00087 g Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure (d.i. $3 \cdot 10^{-5}$ mol) in 4 ml Wasser, 0,0528 g Ascorbinsäure (d.i. $3 \cdot 10^{-4}$ mol) in 4 ml Wasser, 0,0058 g Eisen(II)-ammoniumsulfat (d.i. $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol)

* XI. Mitteilung: diese Zeitschrift 35, 3784 (1970).

TABELLE I

Oxydationsprodukte der *meta*-substituierten N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzolderivate mit Molekularsauerstoff im Udenfriedschen Hydroxylase-Modell, identifiziert mit Hilfe der Silicagel-Dünnschichtchromatographie (Silufol UV 254, Marke Kavalier). Entwickelt mit dem Waschsystem Äthanol-Xylol (2 : 8)

| Verbindung (3-X-DAB) ^a | <i>R_F</i> | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | 3'-X-DAB ^a | 3'-X-MAB ^b | 3'-X-4'-HDAB ^c |
| X = H | 0,68 | 0,54 | 0,25 |
| X = OCH ₃ | 0,67 | 0,57 | 0,38 |
| X = CH ₃ | 0,65 | 0,56 | 0,36 |
| X = Cl | 0,72 | 0,61 | 0,42 |
| X = Br | 0,72 | 0,63 | 0,45 |
| X = J | 0,71 | 0,59 | 0,41 |
| X = F | 0,74 | 0,63 | 0,43 |
| X = COOH | 0,26 | 0,18 | — |
| X = NHCOCH ₃ | 0,155 | 0,13 | — |
| X = NO ₂ | 0,71 | 0,58 | — |

gleichfalls in 4 ml Wasser und 4 ml Acetonlösung des entsprechenden *meta*-substituierten N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzolderivates mit einem Gehalt von $1,6 \cdot 10^{-5}$ mol gelöst waren.

Nach Austemperieren auf 40°C wurde die Reaktionslösung unter Sauerstoffdruck von 760 Torr 4 Stunden unter Zuhilfenahme eines Vibrationsrührwerks gemischt. Nach Beendigung der Oxydation wurde die Lösung in 10 ml Benzol aufgenommen und der gewonnene Extrakt wurde unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der Abdampfrückstand wurde von neuem in 1 ml Benzol gelöst und zum chromatographischen Nachweis der Oxydationsprodukte herangezogen.

Auf eine dünne Schicht von verfestigtem, handelsüblichem, in Platten gelieferttem Silicagel, Silufol UV 254, Marke Kavalier, wurden 20 µl einer benzolischen Lösung der gewonnenen oxydierten Produkte aufgetragen und mit Hilfe eines Xylol-Äthanolgemisches (8 : 2) entwickelt. Der Nachweis der von den einzelnen Substanzen stammenden Flecke wurde durch deren Überführung mit Dämpfen von konz. Chlorwasserstoffsäure in die farbintensiveren protonisierten Formen durchgeführt (Tab. I).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Oxydation der *meta*-substituierten N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzolderivate mittels Molekularsauerstoffs im Udenfriedschen Hydroxylase-Modell verläuft auf gleiche Weise wie bei der Oxydation mit Cer(IV)-sulfat, ggf. mit einigen weiteren Oxydationsmitteln¹. Im Prinzip handelt es

TABELLE I
(Fortsetzung)

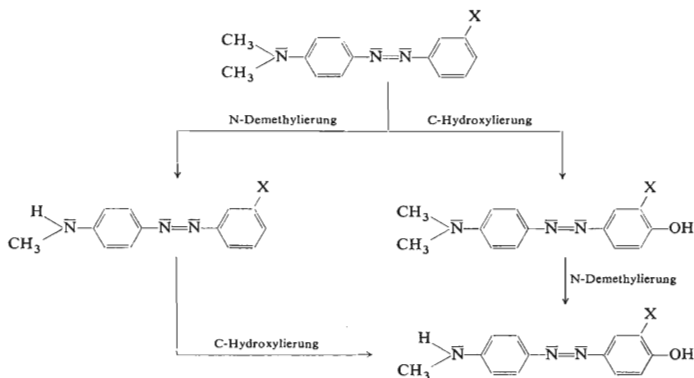
| R_F | |
|---------------------------|---|
| 3'-X-4'-HMAB ^d | die übrigen |
| 0,18 | 0,00 ^f |
| 0,31 | 0,00 ^f , 0,24 ^e ; 0,41 ^e ; 0,46 ^g |
| 0,28 | 0,26 ^e ; 0,41 ^e |
| 0,33 | 0,26 ^e ; 0,44 ^e |
| 0,36 | — — |
| 0,34 | 0,46 ^e ; 0,50 ^e |
| 0,35 | 0,23 ^e ; 0,29 ^e ; 0,47 ^e |
| — | 0,02 ^f , 0,12 ^e ; 0,54 ⁱ ; 0,68 ^h |
| — | 0,25 ^e ; 0,20 ^e ; 0,32 ^f ; 0,39 ^j ; 0,54 ⁱ ; 0,68 ^h |
| — | 0,225 ^e ; 0,325 ^e ; 0,42 ^e |

Allgemeinformeln:

^a für *meta*-(X)-substituiertes N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzol, ^b für *meta*-(X)-substituiertes N-Methyl-4-aminoazobenzol, ^c für *meta*-(X)-substituiertes 4'-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, ^d für *meta*-(X)-substituiertes 4'-Hydroxy-N-methyl-4-aminoazobenzol, ^e rotgefärbte Flecke, ^f violettgefärbte Flecke, ^g blaugefärbte Flecke, ^h N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzol, ⁱ N-Methyl-4-aminoazobenzol, ^j 4'-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol.

sich hier wiederum um zwei grundsätzliche Oxydationsmechanismen, und zwar erstens um N-Demethylierung der Aminogruppe, zweitens um C-Hydroxylierung des zweiten Benzolkerns in der 4'-Stellung (Schema 1). Der Nachweis wurde durch chromatographische Identifizierung der entstehenden Produkte erbracht (Tab. I). Gleichzeitig wurden neben N-demethylierten und C-hydroxylierten Produkten einige weitere Substanzen gefunden. Mit Rücksicht auf ihre geringfügige Menge konnte die Mehrzahl von ihnen vorläufig nicht besser spezifiziert werden und für das gegebene chromatographische System sind nur ihre R_F -Werte und die Farbe der Flecke angeführt (Tab. I).

In den Oxydationsprodukten wurden weder *meta*-substituiertes 4-Aminoazobenzol noch sein 4-Hydroxyderivat gefunden; es erfolgt demnach keine zweite Demethylierung. Ähnlich wie bei der Oxydation mit Cer(IV)-sulfat trat beim 3'-Carboxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol, beim 3'-Nitro-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol und beim 3'-Acetylamino-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol keine C-Hydroxylierung ein. Im Gegensatz zur Arbeit¹ wurde das 3'-Sulfo-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzol weggelassen, welches bei der Oxydation mit Cer(IV)-sulfat, ggf. mit einigen weiteren Oxydationsmitteln gleichfalls kein 4'-Hydroxyderivat gab. Es kann demnach für die Oxydation der *meta*-substituierten Derivate des N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzols das Schema 1 angeführt werden. Eine Ausnahme bilden die Stoffe mit einigen elektronegativen Substituenten ($-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$) und mit der $-\text{NHCOCH}_3$ -Gruppe.



SCHEMA 1

Interessant ist der Nachweis der Decarboxylierung bei der 3'-Carboxy-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzoloxydation. In den Oxydationsprodukten wurde eine verhältnismäßig erhebliche Menge von N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzol (R_F 0,68) und N-Methyl-4-aminoazobenzol (R_F 0,54) festgestellt. In kleinen Mengen wurden diese Substanzen auch bei der Oxydation des 3'-Acetyl-amino-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzols gefunden.*

Während bei der Oxydation mit Cer(IV)-sulfat und einigen weiteren Oxydationsmitteln vor allem die Präferenz der C-Hydroxylierung beobachtet wurde, wird bei der Oxydation mit Molekulsauerstoff im Udenfriedschen Hydroxylase-Modell gerade das Gegenteil festgestellt. Es verläuft hauptsächlich N-Demethylierung, während die C-Hydroxyderivate, wenn deren Bildung überhaupt eintritt, nur in kleinen Mengen, ja manchmal nur in Spurenmengen vorkommen. Auf Grund der Vorversuche können nach Verabreichung von *meta*-substituierten Derivaten in der Galle von Ratten analoge Oxydationsprodukte wie bei der Oxydation im Udenfriedschen Hydroxylase-Modell identifiziert werden.

LITERATUR

1. Matrka M., Chmátal V., Pípalová J., Ságner Z., Kroupa J., Marhold J.: diese Zeitschrift, im Druck.
2. Udenfriend S., Clark C. T., Axelrod J. U., Brodis B. B. J.: *Biol. Chem.* 208, 731 (1954).
3. Matrka M., Marhold J., Ságner Z., Pípalová J.: diese Zeitschrift 33, 3761 (1968).
4. Matrka M., Marhold J., Chmátal V., Pípalová J.: diese Zeitschrift 31, 2605 (1966).
5. Waters W. A.: *Mechanismus of Oxidation of Organic Compounds*. Wiley, London—New York 1963.

Übersetzt von K. Grundfest.

* Die Ansicht bezüglich des Oxydationsmechanismus der Decarboxylierung ist bekannt und wurde für eine Reihe organischer Carbonsäuren beschrieben⁵.