

Die Fokussierungsspektren von ^{144}Ce und ^{144}Pr auf Fig. 5 machen es deutlich, dass die Trenngeschwindigkeit gross ist gegenüber der Produktions- und Zerfallsrate von ^{144}Pr . Auf einer fest-flüssig-Ionenauscherkolonne entstehen bei diesem Isotopenpaar immer verschmierte Übergangszonen, weil die Nachlieferungsgeschwindigkeit des ^{144}Pr mit der Transportgeschwindigkeit grössenordnungsmässig übereinstimmt. Hier beträgt die Aufenthaltsdauer eines ^{144}Pr -Teilchens im ^{144}Ce -Maximum bei eingestelltem Gradientenverlauf maximal 6 s, im Zwischenraum der beiden Linien etwa 15 s. Diese Zeit ist 70 mal kleiner als die ^{144}Pr -Halbwertszeit. Ausserdem ist festzuhalten, dass während der Trenndauer das zerfallende ^{144}Pr in der ^{144}Ce -Linie stets nachgebildet und sofort zur ^{144}Pr -Linie transportiert wird. Diese erreicht dadurch eine stationäre Konzentration, welche 99% derjenigen bei momentaner Trennung des Systems im radioaktiven Gleichgewicht beträgt. Nach der Trennung kann das ^{144}Pr in etwa 15" dem Streifen entnommen werden.

Diese Arbeit ist durch die KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT DES SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Projekt A 92) unterstützt worden, wofür wir bestens danken. Der Firma METROHM AG. danken wir für die Überlassung des Prototyps ihres Gerätes für fokussierenden Ionenaustausch.

SUMMARY

1. ^{90}Y , ^{140}La , ^{144}Pr are prepared with radiochemical purities of 99,992%, 99,95% and 98,6% respectively from their parent fission-products: ^{90}Sr , ^{140}Ba and ^{144}Ce . The procedure of ion focusing for this purpose is described. The results are obtained with a separation time of 3 min for ^{90}Y and ^{140}La , or 10 min for ^{144}Pr , with radiochemical yields of over 99%.

2. Double separation in 6 min leads to ^{90}Y with less than 0,01 μC $^{90}\text{Sr}/\text{Curie}$ ^{90}Y , which offers a new possibility for the production of sources for β -therapy. ^{144}Pr is obtained with less than 1 part ^{144}Ce in 5000 parts ^{144}Pr in 15 min.

Anorganisch-chemisches Institut der Universität Zürich

211. Oxydation von o-Dianisidin durch RÖNTGEN-Strahlen bzw. H_2O_2 in Gegenwart von Peroxydase und anderen Haeminverbindungen

von H. Aebi, A. Temperli, R. Gressly, R. Oestreicher und A. Zuppinger

(18. VIII. 60)

Zur Erfassung von Bestrahlungsprodukten eignen sich auch enzymatische Umsetzungen. Voraussetzung dafür ist, dass das betreffende Ferment mit den entstehenden Bestrahlungsprodukten (Radikale, H_2O_2) genügend rasch reagiert und eine hinreichende Strahlenresistenz zeigt. Dies trifft z. B. für das System Katalase + ^{14}C -Formiat zu: Im Bereich von 0–15000 r besteht hier direkte Proportionalität zwischen Dosis und Wirkung, erfasst als $^{14}\text{CO}_2$, wobei zwischen einem enzymatischen und nicht-enzymatischen Anteil unterschieden werden muss (AEBI *et al.*¹⁾). Über die

¹⁾ H. AEBI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* 42, 2531 (1959).

Brauchbarkeit wässriger ^{14}C -Formiatlösungen für Dosimetrie-Zwecke ist inzwischen auch von HARDWICK & GUENTER²⁾ berichtet worden.

Dass die eingangs erwähnten Voraussetzungen auch vom System Peroxydase-o-Dianisidin erfüllt werden, geht aus Experimenten hervor, die in der oben erwähnten Arbeit¹⁾ vergleichshalber angeführt worden sind. Dieses System hat als Indikator für H_2O_2 und H_2O_2 -bildende Fermente bereits vielfache Verwendung gefunden. Wir haben uns daher die Frage gestellt, inwiefern sich Meerrettich-Peroxydase in Verbindung mit einem geeigneten Chromogen, wie z. B. o-Dianisidin, zur quantitativen photometrischen Erfassung von Bestrahlungsprodukten verwenden lässt. Zur Klärung dieser Frage ist in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einiger Versuchsfaktoren auf die durch RÖNTGEN-Strahlen bewirkte o-Dianisidin-Oxydation untersucht worden: Es sind dies der Einfluss der Strahlendosis auf das Ausmass der Reaktion und die Abnahme der Fermenten-Aktivität.

Ferner ist die Abhängigkeit der o-Dianisidin-Oxydation von der Enzymmenge gemessen und mit der (pseudo-)Peroxydasewirkung anderer Haeminverbindungen verglichen worden. Schliesslich soll auf einige Experimente eingegangen werden, welche mit zugesetztem H_2O_2 ausgeführt worden sind. Diese geben die Möglichkeit, die strahlenbedingte o-Dianisidin-Oxydation mit derjenigen zu vergleichen, die nach Zugabe von H_2O_2 oder H_2O_2 -bildenden Fermenten zu beobachten ist.

Wie aus diesen Experimenten hervorgeht, hat das System Peroxydase-o-Dianisidin gegenüber dem System Katalase- ^{14}C -Formiat den Vorteil der leichteren Bestimmbarkeit des Reaktionsproduktes, sowie denjenigen des äusserst geringen Blindwertes. Als Nachteil muss demgegenüber die relativ niedrige Empfindlichkeit gewertet werden, sowie der Befund, dass Meerrettich-Peroxydase in verdünnter Lösung durch konventionelle RÖNTGEN-Bestrahlung in Dosen von über 10000 r eine beträchtliche Inaktivierung erleidet.

Experimenteller Teil

1. Methodisches. – a) *Das Indikatorsystem Peroxydase-o-Dianisidin* entspricht hinsichtlich Herstellung der Lösungen und Zusammensetzung der früher gegebenen Beschreibung¹⁾. Den 8 m fassenden Ansätzen ist jedoch bei den hier publizierten Versuchen meist eine wechselnde Menge von Enzym zugesetzt worden (0,1–500 γ /Ansatz); dagegen wurde die Chromogenkonzentration durchweg konstant gehalten. Der Gehalt an o-Dianisidin beträgt pro Ansatz $167\gamma = 0,68 \mu\text{Mol}$ (0,085 $\mu\text{Mol/ml}$). Bei vollständiger Oxydation dieser o-Dianisidinmenge durch H_2O_2 im Überschuss resultiert je nach Zeitpunkt der Ablesung eine Extinktion von 0,5–0,6, sofern dasentstandene rotbraune Chinonderivat bei 436 $m\mu$ photometriert wird (Messung mit dem EPPENDORF-Photometer). Bei der Meerrettich-Peroxydase handelt es sich um ein gereinigtes Präparat («BOEHRINGER») mit einer Reinheitszahl von 0,3 (=Peroxydase II); bei einigen Versuchsreihen ist auch das Reinezym (=Peroxydase I) mit einer Reinheitszahl von 3,0 mit getestet worden. Das o-Dianisidin («FLUKA») wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus heissem Äthanol gereinigt.

Nebst aktiver und Hitze-inaktivierter Peroxydase sind folgende Haeminverbindungen auf ihre Aktivität bei der o-Dianisidin-Oxydation getestet worden: krist. Wal-Myoglobin³⁾, krist. Human-Haemoglobin³⁾, Haemin («SIGMA») und krist. Leber-Katalase («BOEHRINGER»). Zur Gewinnung einer Vergleichsbasis ist der Proteingehalt dieser Proben nach FOLIN⁴⁾ und der Eisenge-

²⁾ T. J. HARDWICK & W. S. GUENTER, J. phys. Chemistry 63, 896 (1959).

³⁾ In verdankenswerter Weise von Dr. KARL SCHMID, The ROBERT W. LOVETT Memorial Laboratories, Massachusetts General Hospital, Boston 14, Mass. USA, zur Verfügung gestellt.

⁴⁾ O. H. LOWRY, B. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1954).

halt nach SANDELL⁵⁾ bestimmt worden. – Bei den mit H₂O₂-Zusatz ausgeführten Versuchen wurde wie folgt vorgegangen: Zufügen von 0,5 ml 0,001M H₂O₂ aufs Mal und sofortiges Mischen der Probe. In einigen Versuchen erfolgte die H₂O₂-Zugabe protrahiert mittels Dialyse (vgl. ⁶⁾) oder unter Verwendung von Notatin («BOEHRINGER»). Die Messung des oxydierten o-Dianisidins erfolgte im Standard-Test 30 min nach der H₂O₂-Zugabe. Nach diesem Zeitpunkt zeigte die Extinktion bei 436 m μ der bei 25° direkt in den Photometercuvetten inkubierten Ansätze keine weitere Zunahme.

b) Die Bestimmung des H₂O₂-Gehaltes in den Ansätzen wurde zunächst – entsprechend früheren Angaben – mit der Titansulfat-Methode vorgenommen. Bei der Mehrzahl der Versuche wurde indessen einer modifizierten Eisenrhodanid-Methode nach EGERTON⁷⁾ der Vorzug gegeben. Reagens A: 2,5 g Ammonrhodanid werden ad 250 ml in dest. Wasser gelöst. Reagens B: 0,15 g Ferrosulfat (FeSO₄·7H₂O) werden unter Zufügen von 2,5 ml 5N H₂SO₄ ad 50 ml in dest. Wasser gelöst. Zur Ausführung der Bestimmung werden 5,0 ml Reagens A, 1,0 ml Reagens B und die Analysenlösung (meist 3 ml) ad 10 ml mit dest. Wasser versetzt und gemischt. Nach 5 min wird die entstandene Rotfärbung bei 436 m μ gegen einen Reagentien-Blindwert photometriert. Die Eichkurve, ausgeführt mit bekannten Verdünnungen von Perhydrol («MERCK») zeigt bis 20 γ H₂O₂/Ansatz einen linearen Verlauf. Sofern täglich frisches Reagens hergestellt und mit Komplexon-vorbehandelten Glaswaren gearbeitet wird, ergeben sich gut reproduzierbare Werte. Die Empfindlichkeit entspricht etwa derjenigen der Titansulfat-Methode. Dass sich auch o-Dianisidin in Gegenwart eines Peroxydaseüberschusses zur H₂O₂-Bestimmung verwenden lässt, ist von GLOGNER *et al.*⁸⁾ gezeigt worden.

c) *Bestrahlung und Dosimetrie*: Die Bestrahlungen wurden mit einem Therapeutic-Pendelgerät, Modell MÜLLER-TU 1 ausgeführt, unter Einhaltung folgender Bedingungen: 250 kV; 15 mA; 1,0 mm Al+0,25 mm Cu-Filter; Fokusbstand 26 cm. Die mit einer Dosisleistung von 410–430 r/min bestrahlten Proben wurden zum Ausgleich von Feldinhomogenitäten auf einem Plexiglas-träger rotierend bewegt. Dosimetrie mittels VICTOREEN-Kammer. In einer Reihe von Experimenten wurden zudem nach der FRICKE-Dosimetrie die entsprechenden «Eisen-Werte» bestimmt. Die unter identischen Bedingungen mitbestrahlten Ansätze enthielten 8 ml 0,36·10⁻³M angesäuerte Ferrosulfatlösung (= 161 γ Fe^{II}/Ansatz). Unmittelbar nach Bestrahlung wurde die Menge des nicht-oxydierten Fe^{II} durch Rücktitration mit 0,01N K-Permanganat ermittelt. Umrechnung: Oxydation von 1 μ Mol Fe^{II} pro ml = 60 000 r (vgl. ⁹⁾).

2. Einfluss der Peroxydasekonzentration. – Die zuvor gegebenen Daten über die strahleninduzierte o-Dianisidin-Oxydation gelten alle für Ansätze, denen Peroxydase im Überschuss (500 γ /Ansatz zu 8 ml) zugesetzt worden ist. Besonders im Hinblick auf die Versuche, in denen verschiedene Haemine miteinander verglichen werden, ist hier die Abhängigkeit von der Peroxydasekonzentration bei verschiedenen Strahlendosen untersucht worden. Wie aus den in Fig. 1 dargestellten Kurven hervorgeht, ergeben sich bei Variation des Peroxydasezusatzes Sättigungskurven, ähnlich denen wie sie im System Katalase-¹⁴C-Formiat beobachtet werden (vgl. ¹⁾). Behandelt man diese Kurven – wenigstens in rein formaler Hinsicht – als Sättigungskurven, dann ergibt sich, dass der halbe Betrag des Höchstwertes in beiden Systemen bei einer Enzymkonzentration von ca. 3 γ /ml Peroxydase bzw. Katalase erreicht wird. Ein wesentlicher Unterschied besteht indessen darin, dass im System Peroxydase-o-Dianisidin die ohne Peroxydase bestrahlten Ansätze praktisch keine Extinktionszunahme gegenüber dem Ausgangswert ($E \sim 0,005$) zeigen, während im System Katalase-¹⁴C-Formiat auch ohne Katalasezugabe eine beträchtliche Formiat-

⁵⁾ E. B. SANDELL, *Colorimetric Determination of Trace Metals*; Interscience Publ. Inc., New York 1950.

⁶⁾ R. OESTREICHER, Dissertation, Universität Bern 1960.

⁷⁾ A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRAKANCHANA & K. C. SALOOJA, *Analyt. chim. Acta* 10, 422 (1954).

⁸⁾ P. GLOGNER, H. P. WOLF & H. HOLZER, *Biochem. Z.* 332, 407 (1960).

⁹⁾ O. WARBURG, W. SCHRÖDER & H. W. GATTUNG, *Z. Naturforsch.* 15b, 163 (1960).

oxydation zu verzeichnen ist (sog. nicht-enzymatische Komponente, vgl. ¹⁾, Fig. 1b). Werden Kontrollansätze bestrahlt, die ausser Puffer nur o-Dianisidin enthalten, ergibt sich bei einer Dosis von 10000 r eine Extinktionszunahme von 0,004–0,006; Kontrollansätze mit Peroxydase-Lösung allein zeigen dagegen praktisch keine Extinktionszunahme.

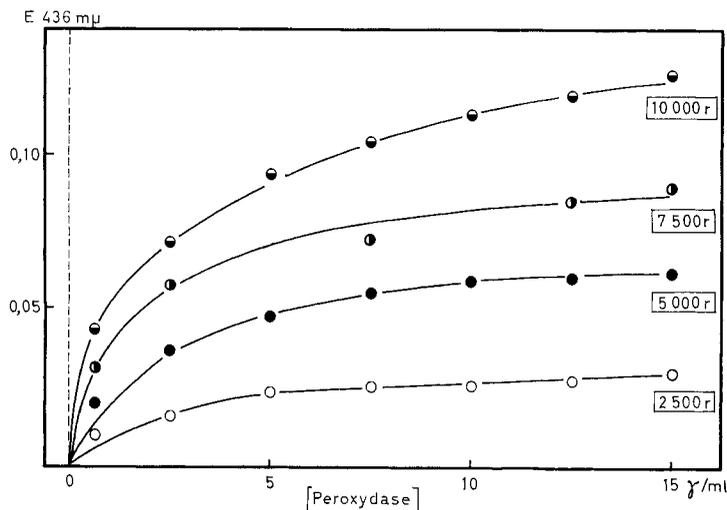


Fig. 1. *o*-Dianisidin-Oxydation als Funktion der Peroxydase-Konzentration bei verschiedenen Strahlendosen

Ordinate: Photometrie bei 436 m μ ca. 30 min nach Bestrahlung. Abszisse: Peroxydase-II-Konzentration in γ /ml (Ansätze zu 8 ml).

Um zu entscheiden, inwieweit es sich bei der in Gegenwart von Peroxydase ablaufenden *o*-Dianisidin-Oxydation um eine nicht-enzymatische Haeminkatalyse handelt, ist das Verhalten von Ansätzen mit Hitze-inaktivierter Peroxydase untersucht worden. Da Meerrettich-Peroxydase relativ hitzebeständig ist und erhitzte Enzymlösungen eine gewisse Tendenz zur Reaktivierung zeigen¹⁰⁾, sind für diese Experimente verdünnte Peroxydaselösungen verwendet worden, die ca. 2 Std. vor Bestrahlungsbeginn während 60 min im kochenden Wasserbad gestanden hatten. Aus den Daten in Tab. 1 geht hervor, dass Ansätze mit Hitze-inaktivierter Peroxydase nur einen Bruchteil der *o*-Dianisidin-Oxydation der entsprechenden «aktiven» Ansätze zeigen. Diese prozentuale Restaktivität derartiger Ansätze mit inaktiver Peroxydase ist konzentrationsabhängig und beträgt im Bereich von 10–20 γ Peroxydase/Ansatz ca. 40%. Beim Vorliegen eines Peroxydaseüberschusses (500 γ /Ansatz) sind es 60–80% (vgl. ¹⁾, Tab. 2). Ein geeignetes Mass für den Aktivitätsunterschied dieser beiden Präparate erhält man bei der planimetrischen Bestimmung derjenigen Peroxydasekonzentration, welche unter Standard-Bedingungen zur Erzielung einer Extinktionszunahme um 0,050 erforderlich ist. Da dies im vorliegenden Fall für eine Konzentration von 5 γ (aktive Peroxydase) bzw. 26 γ (hitzebehandelte Per-

¹⁰⁾ P. H. GALLAGHER, *Biochem. J.* 78, 39 (1924); S. J. KLEBANOFF, *J. biol. Chemistry* 234, 2437 (1959).

oxydase)/Ansatz zutrifft, ergibt sich für die beiden Kurven somit ein Parameterverhältnis von ca. 1:5.

Tabelle I. Oxydation von *o*-Dianisidin durch RÖNTGEN-Strahlen in Abhängigkeit von der Peroxydase-Konzentration; Vergleich zwischen aktiver und hitzeinaktivierter Peroxydase II.

Dosis 10 000 r. Messung der Extinktion 15 min nach Schluss der Bestrahlung. Die Extinktion der unbestrahlten Kontrollansätze beträgt 0,001–0,004 und ist von den in der Tabelle aufgeführten Werten bereits in Abzug gebracht worden.

Peroxydasemenge im Ansatz (γ /Ansatz à 8 ml)	Ansätze mit aktivem Enzym ΔE (436 $m\mu$) a	Ansätze mit hitze- inaktiviertem Enzym ΔE (436 $m\mu$) b	relative Aktivität der hitze- inaktivierten Peroxydase $b/a \cdot 100$
5	0,050	0,021	42%
10	0,073	0,032	44%
20	0,103	0,039	38%
40	0,124	0,064	51%
80	0,146	0,083	57%
240	0,200	0,144	72%

3. *o*-Dianisidin-Oxydation und Enzyminaktivierung als Funktion der Strahlendosis. – Bei Gegenwart eines *o*-Dianisidin-Überschusses und relativ grosser Mengen aktiver Peroxydase (z. B. 500 γ /Ansatz) besteht direkte Proportionalität zwischen Strahlendosis und Farbintensität der bestrahlten Proben (E 436 $m\mu$). Wie gezeigt (vgl. 1), Fig. 2b) erstreckt sich der lineare Bereich der Dosis-Wirkungskurve unter diesen Bedingungen bis zu etwa 8000 r, während bis zur doppelten Dosis nur eine relativ geringe Abflachung der Kurve zu verzeichnen ist. Werden kleine Peroxydasemengen zugesetzt, dann resultiert – wie aus der in Fig. 1 gezeichneten Kurvenschar herauszulesen ist – ein flacherer Verlauf und eine stärkere Durchbiegung der Dosis-Wirkungskurve. Aus diesem Verhalten ergibt sich, dass sich für dosimetrische Studien Ansätze mit hoher Peroxydasekonzentration (über 100 γ /Ansatz) besser eignen.

Um abzuklären, inwieweit Meerrettich-Peroxydase durch die Strahleneinwirkung geschädigt wird, sind Peroxydaselösungen ohne *o*-Dianisidin-Zusatz mit verschiedenen Dosen bestrahlt und anschliessend auf ihre Aktivität untersucht worden. Im selben Ausmass verdünnte, unbestrahlte Kontrollansätze zeigen innert 2–3 Std. keine Aktivitätsabnahme. Das Ergebnis derartiger Versuche, in denen die Restaktivität bestrahlter, wässriger Peroxydaselösungen mit derjenigen unbestrahlter Proben verglichen wurden, ist in Fig. 2 zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass die verbleibende Peroxydaseaktivität mit steigender Strahlendosis abnimmt. Aus dem Verlauf der Kurven, welche die Wirkung gleicher Strahlendosen verbinden, lässt sich zudem eine starke Abhängigkeit von der Enzymkonzentration herauslesen.

Aus den Kurven in Fig. 2 geht z. B. hervor, dass die Peroxydaseaktivität bei einer Enzymkonzentration von 15 γ /ml durch 5000 r auf den halben Betrag erniedrigt wird. Erhöht man die Enzymkonzentration auf 20 bzw. 30 γ /ml, so muss die Strahlendosis zur Erzielung desselben Effektes auf 10000 bzw. 15000 r gesteigert werden. Die Gesetzmässigkeit, dass die proz. Aktivitätseinbusse bei gleicher Strahlendosis mit dem Verdünnungsgrad zunimmt, trifft hier indessen nur für den Konzen-

trationsbereich von 0–ca. 25 γ Peroxydase/ml zu. Die quantitativen Zusammenhänge, welche in diesem Bereich zwischen Enzymkonzentration und Aktivitätsabnahme bestehen, sind in Tab. II wiedergegeben. Errechnet man auf Grund der prozentualen Aktivitätsabnahme die Absolutmenge an Enzymprotein, die durch die Bestrahlung inaktiviert worden ist, ergibt sich eine weitgehende Unabhängigkeit von der Enzym-

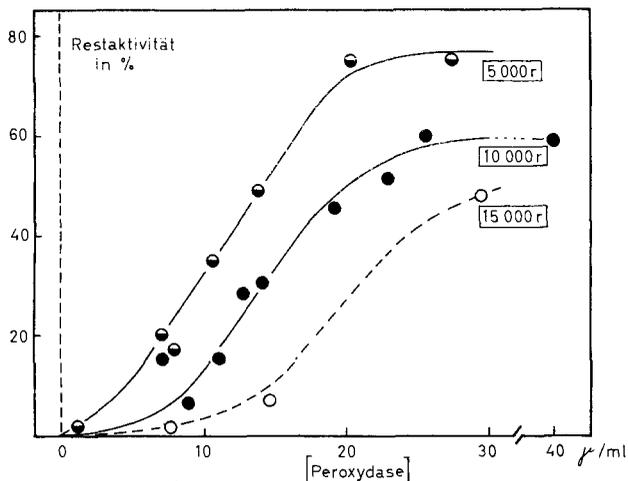


Fig. 2. Aktivitätsabnahme verdünnter Peroxydase-II-Lösungen durch RÖNTGEN-Bestrahlung
 Ordinate: Aktivität, bestimmt mit o-Dianisidin als Substrat unter Verwendung der Eichkurve (10 min) in Fig. 3a. Aktivität gleichbehandelter, aber unbestrahlter Kontrollansätze = 100%.

Tabelle II. Inaktivierung von Peroxydase in verdünnter, wässriger Lösung (ohne o-Dianisidin-Zusatz) durch RÖNTGEN-Strahlen.

Photometrische Bestimmung der Restaktivität $\frac{1}{2}$ Std. nach Bestrahlungsende mittels o-Dianisidin als Substrat. 100 γ Peroxydase II entsprechen 71 γ des nach FOLIN bestimmten Protein-gehaltes.

Strahlen-dosis	Peroxydase-Konzentration (γ Protein pro Ansatz à 8 ml)	Prozentuale Aktivitäts-abnahme	Absolutmenge an inaktiviertem Enzymprotein (γ Protein pro Ansatz à 8 ml)
5000 r	30	– 85%	26
	50	– 70	35
	100	– 35	35
10000 r	150	– 40	58
	225	– 40	90

konzentration im Ansatz. In diesem Konzentrationsbereich (bis ca. 120 γ Protein/Ansatz) ist somit die Menge an inaktiviertem Enzym für eine bestimmte Strahlendosis konstant: je niedriger die Enzymkonzentration, desto grösser die prozentuale Aktivitätsabnahme. Wie aus Tab. II weiter hervorgeht, trifft dies für höhere Enzymkonzentrationen (150–225 γ /Ansatz) nicht zu. Aus der Gleichheit der prozentualen Aktivitätsabnahme folgt, dass in diesem Bereich die Menge an inaktiviertem Enzym

mit steigender Konzentration zunimmt. Diese Konzentrationsabhängigkeit der Strahleninaktivierung wässriger Peroxydase-Lösungen fällt zwar im hier untersuchten Bereich stark ins Gewicht; bei einer Enzymkonzentration von 500 γ /Ansatz, wie sie früher zur Dosimetrie benützt worden ist, dürfte diese Aktivitätsabnahme mit Rücksicht auf den grossen Überschuss dagegen praktisch kaum in Erscheinung treten.

4. Vergleich zwischen Strahlenwirkung und H_2O_2 -Zusatz. – Um Anhaltspunkte über diejenige H_2O_2 -Menge zu erhalten, welche zur Erzielung einer bestimmten Extinktion in den bestrahlten Ansätzen erforderlich ist, sind eine Reihe von Versuchen mit H_2O_2 -Zusatz ausgeführt worden. Dazu stehen im Prinzip die folgenden 3 Möglichkeiten zur Verfügung: 1. Direkte Zugabe einer verdünnten H_2O_2 -Lösung; 2. Protrahierte Zufuhr von H_2O_2 durch Dialyse, 3. Erzeugung von H_2O_2 im Ansatz selbst durch ein H_2O_2 -produzierendes Enzymssystem, z. B. Notatin und Glucose. In orientierenden Versuchen haben sich alle 3 Methoden als gangbar erwiesen.

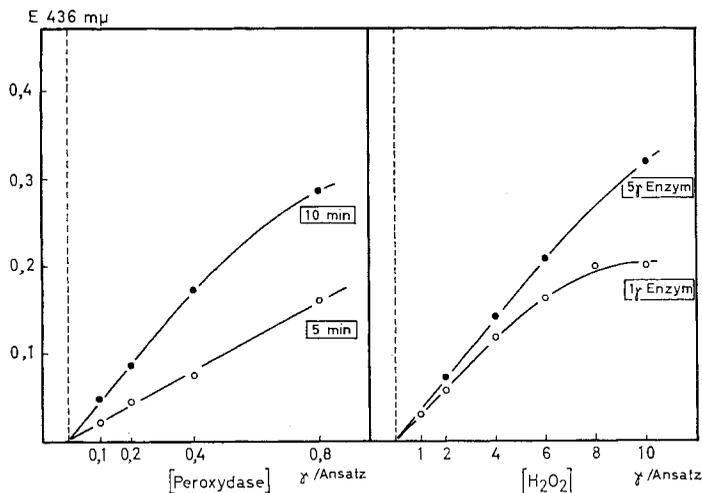


Fig. 3. Oxidation von *o*-Dianisidin als Funktion der Enzymkonzentration (Fig. 3a) und in Abhängigkeit von der zugesetzten H_2O_2 -Menge (Fig. 3b).

ad 3a: Zugabe von 0,5 μ Mol H_2O_2 ; Photometrie 5 und 10 min nach H_2O_2 -Zusatz.

ad 3b: Zugabe des H_2O_2 als verdünnte Lösung (10 γ /ml); Enzymkonzentration 1 bzw. 5 γ Peroxydase II/Ansatz. Photometrie 15 min nach H_2O_2 -Zusatz.

Bei direktem H_2O_2 -Zusatz ergibt sich die in Fig. 3b wiedergegebene Beziehung zwischen zugefügtem H_2O_2 und Extinktion. Sofern die Enzymkonzentration genügend hoch ist (über 5 γ Peroxydase/Ansatz) besteht im untersuchten Bereich direkte Proportionalität zwischen H_2O_2 -Zusatz und Extinktion. Liegt ein Enzymüberschuss vor – was hier der Fall ist – kommt es unmittelbar nach der H_2O_2 -Zugabe zu einer tiefen Rotfärbung (Radikalsalz-Bildung!), welche innert 1–2 min in eine stabile Orangebraun-Färbung übergeht. Unter den gewählten Bedingungen (5 γ Peroxydase/Ansatz) ergibt sich pro 0,1 μ Mol zugesetztes H_2O_2 eine Extinktionszunahme von 0,114 (vgl. Fig. 3b).

Um diesen Vergleich auf denjenigen Konzentrationsbereich ausdehnen zu können, in welchem der Gesamtumsatz durch das Enzym begrenzt wird, sind auch Experimente mit Ansätzen zu 0,1–0,8 γ Peroxydase/Ansatz ausgeführt worden (Fig. 3a). Daraus geht hervor, dass bei H_2O_2 -Zugabe im Überschuss (0,5 μ Mol) direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz besteht. Der Konzentrationsbereich, für den dies zutrifft, ist allerdings recht eng; er reicht nur bis ca. 0,8 γ Peroxydase II pro Ansatz.

Die Kinetik der Farbentwicklung bei RÖNTGEN-Bestrahlung ist zwar von derjenigen nach H_2O_2 -Zusatz verschieden; gleichwohl erscheint es von Interesse, die am Schluss der Bestrahlung in den Ansätzen noch vorhandene H_2O_2 -Menge mit derjenigen in Beziehung zu bringen, die auf Grund der o-Dianisidin-Oxydation während

Tabelle III. H_2O_2 -Bildung bzw. Oxydation von o-Dianisidin durch 10000 r in Wasser, verdünnter Peroxydaselösung und im kompletten System Peroxydase-o-Dianisidin. Dosimetrie mittels saurer Ferrosulfatlösung nach FRICKE: 1 μ Mol oxydiertes Fe^{II} (pro 1 ml) = $6 \cdot 10^4$ r.

Enzymkonzentration (γ Peroxydase II pro Ansatz à 8 ml)	o-Dianisidin (167 γ / Ansatz)	Nach Bestrahlung (10000 r)		Oxydation von o-Dianisidin bestimmt nach Zugabe der in Kol. 3 angeführten H_2O_2 -Mengen (E 436 m μ)
		analytisch bestimmter H_2O_2 -Gehalt (γ /Ansatz)	oxydiertes o-Dianisidin (E 436 m μ)	
0	–	7,5	–	0,254
0	+	6,6	0,005	0,226
10	–	6,3	–	0,214
80	–	6,0	–	0,208
160	–	6,1	–	0,209
10	+	–	0,214	–

der Bestrahlung insgesamt gebildet worden sein muss. Zu diesem Zweck ist zunächst untersucht worden, ob die Gegenwart kleiner Peroxydasmengen die H_2O_2 -Menge, welche am Schluss der Bestrahlung analytisch noch erfassbar ist, beeinflusst. Aus Tab. III geht hervor, dass dies in nur sehr geringem Ausmass der Fall ist; selbst bei einer relativ hohen Peroxydase-Konzentration von 20 γ /ml beträgt die Differenz gegenüber peroxydasefreien Ansätzen nur ca. –15%. Bestrahlt man Wasser bzw. verdünnte Peroxydaselösungen mit 10000 r, so betragen die Absolutwerte des unmittelbar nach Bestrahlung direkt bestimmbar Wasserstoffperoxyds 6–8 γ H_2O_2 /Ansatz à 8 ml. Bestrahlt man andererseits Standardansätze, enthaltend Peroxydase und o-Dianisidin, so resultiert bei der Photometrie 15 min nach beendeter Bestrahlung eine Extinktion von E 436 \sim 0,20–0,22. Setzt man nun diejenige H_2O_2 -Menge, wie sie nach erfolgter Bestrahlung analytisch erfasst worden ist, direkt zum Standardansatz (Peroxydase + o-Dianisidin), dann bewirkt dieses H_2O_2 innert 15 min eine Extinktionszunahme derselben Grösse (vgl. Tab. III). Da die Art der H_2O_2 -Bildung sowie die Kinetik der Farbreaktion in diesen beiden Versuchsanordnungen verschieden sind, ist eine direkte Gegenüberstellung der Werte nur unter Vorbehalt erlaubt. Immerhin zeigen die beiden auf ganz verschiedene Weise zustande gekommenen Extinktionswerte befriedigende Übereinstimmung.

5. Wirkung verschiedener Haeminverbindungen. – Sowohl im Bestrahlungsversuch als auch in Gegenwart von direkt zugesetztem Wasserstoffperoxyd haben Haeminverbindungen im allgemeinen eine beschleunigende Wirkung auf die *o*-Dianisidin-Oxydation. Zur Erzielung desselben Effektes sind indessen bei allen anderen Verbindungen, die getestet worden sind, wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich. Versetzt man Ansätze, die nebst Puffer und *o*-Dianisidin verschiedene Mengen von Peroxydase enthalten, mit $0,5 \mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ und misst man nach 15 min die Extinktion bei $436 m\mu$, ergibt sich aus dem resultierenden Kurvenverlauf, dass zur Erzielung einer Extinktionszunahme von $\Delta E = 0,050$ eine Peroxydase I Menge von ca. $0,01 \gamma/\text{Ansatz}$ erforderlich ist. Dies entspricht ca. $10^{-5} \gamma$ Eisen. Das Ergebnis einer mit verschiedenen Haeminverbindungen ausgeführten Versuchsreihe ist in Fig. 4 dargestellt. Dabei ist durch die Wahl des Eisengehaltes als Vergleichsbasis dem unterschiedlichen Eisengehalt Rechnung getragen worden. Ein analoges

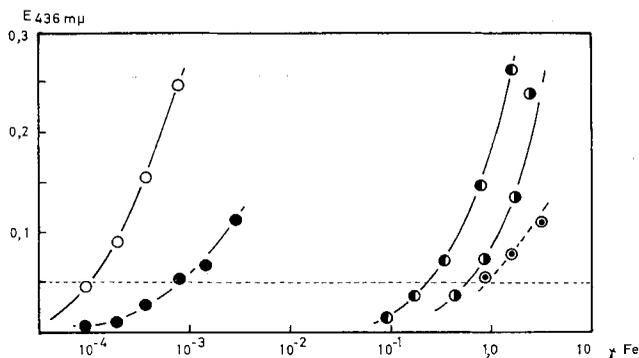


Fig. 4. Oxydation von *o*-Dianisidin durch H_2O_2 in Gegenwart verschiedener Haeminverbindungen. Ordinate: Photometrie bei $436 m\mu$, 15 min nach Zusatz von $0,5 \mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$. Abszisse: Eisengehalt pro Ansatz à 8 ml.

○ Peroxydase II; ● desgl., 30 min bei 100° ; ● Myoglobin; ● Haemoglobin; ⊙ Haemin.

Bild ergibt sich beim Vergleich dieser Substanzen im Bestrahlungsversuch, jedoch mit dem Unterschied, dass die zur Erzielung einer Extinktionszunahme von 0,05 erforderlichen Haemin-Konzentrationen höher sind. Werden Ansätze mit Peroxydase II mit 10000 r bestrahlt, sind 5γ Enzym, bzw. $45 \cdot 10^{-4} \gamma$ Eisen erforderlich. Die für weitere Haeminverbindungen ermittelten Werte sind in Tab. IV zusammengestellt. Zur Erleichterung der Vergleichbarkeit ist diejenige Eisenmenge, welche in Form von Peroxydase ein ΔE von 0,050 bewirkt, als Einheit gewählt worden. Aus der Zusammenstellung dieser relativen Vergleichswerte kann entnommen werden, dass im Bestrahlungsversuch, sowie auch im Experiment mit H_2O_2 -Zusatz, die Aktivität in der Reihenfolge: Peroxydase, aktiv > Peroxydase, Hitze-inaktiviert > Myoglobin > Haemoglobin > Haemin abnimmt. Man braucht bei Bestrahlung 18000 mal und bei H_2O_2 -Zusatz 76000 mal mehr Eisen in Form von Haemin im Vergleich zu Peroxydase, um dieselbe Wirkung zu erzielen. Dass die Vergleichszahlen im Bestrahlungsversuch allgemein kleinere Unterschiede zeigen als bei H_2O_2 -Zusatz-Versuchen, dürfte auf methodische Faktoren zurückzuführen sein; so ist z. B. die Menge des H_2O_2 -Zusatzes grösser gewählt worden, als der bei 10000 r tatsächlich gebildeten Menge entspricht.

6. Konkurrenzversuche mit Peroxydase und Katalase. – Als Hydroperoxydasen sind beide Enzyme imstande, H_2O_2 peroxydatisch umzusetzen; sie sollten daher um Wasserstoffperoxyd, das von aussen zugesetzt oder in den Ansätzen selbst gebildet wird, konkurrieren. Andererseits ist die H_2O_2 -zerlegende (katalatische) Wirkung der Katalase sehr gross, bei der Peroxydase dagegen praktisch nicht vorhanden. Durch Zufügen von Katalase zum System Peroxydase-o-Dianisidin lassen sich weitere Anhaltspunkte über die Wechselwirkungen zwischen beiden Fermenten gewinnen.

Tabelle IV. *Relative Wirksamkeit verschiedener Haeminverbindungen auf die o-Dianisidin-Oxydation durch Wasserstoffperoxyd und RÖNTGEN-Bestrahlung.* Messung der Extinktion bei $436 m\mu$, 15 min nach Zugabe von $0,5 \mu\text{Mol } H_2O_2$, bzw. 30 min nach Schluss der Bestrahlung.

	Konzentration an Eisen, erforderlich zur Erzielung einer Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,05$			
	Versuche mit H_2O_2 -Zusatz		Bestrahlung (10000 r)	
	γ Fe/Ansatz	Vergleichswert	γ Fe/Ansatz	Vergleichswert
Peroxydase I (0,09% Fe)	$1,05 \cdot 10^{-5}$	1	—	—
Peroxydase II	$0,9 \cdot 10^{-4}$	8,6	$45 \cdot 10^{-4}$	8,6
Peroxydase II 120 min bei 100°	$1,26 \cdot 10^{-3}$	120	$2,25 \cdot 10^{-2}$	43
Myoglobin (0,34% Fe)	0,24	23000	0,47	860
Haemoglobin (0,34% Fe)	0,68	65000	2,4	4500
Haemin (8,0% Fe)	0,80	76000	9,6	18000

Wird H_2O_2 in verdünnter Lösung dem System Peroxydase-o-Dianisidin direkt zugefügt, setzt eine rasche Oxydation des Substrates ein. Ist gleichzeitig Katalase zugegen, dann wird o-Dianisidin infolge teilweiser Zerlegung des zugefügten H_2O_2 -Überschusses in wesentlich geringerem Ausmass oxydiert. Wird mit Ansätzen enthaltend 500γ Peroxydase II gearbeitet und 15 min nach der Zugabe von $0,5 \mu\text{Mol } H_2O_2$ photometriert, so hat die Gegenwart von 18γ Katalase bereits eine Abnahme der o-Dianisidin-Oxydation auf 40% des Kontrollwertes zur Folge. 88γ Katalase pro Ansatz bewirken sogar eine Verminderung auf 9% und 176γ Katalase eine solche auf ca. 6% der Kontrolle. Zu einem anderen Ergebnis führen Experimente, bei denen das H_2O_2 durch Notatin und Glucose fortlaufend gebildet wird. Bei dieser Versuchsanordnung hat ein Zusatz von Katalase keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der o-Dianisidin-Oxydation, sofern die Notatin-Konzentration im Verhältnis zu derjenigen der Peroxydase nicht allzu gross gewählt wird. Im Hinblick auf analoge Bestrahlungsversuche ist ferner von Interesse, dass Katalase allein o-Dianisidin in Gegenwart von Notatin und Glucose nur sehr langsam oxydiert (ca. 25 mal langsamer als Peroxydase).

Bestrahlte Ansätze enthaltend Peroxydase, o-Dianisidin und Katalase zeigen eine Oxydation von o-Dianisidin, die eher grösser ist als diejenige in Vergleichsan-

sätzen ohne Katalase. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, verläuft die Dosis-Wirkungskurve der strahlenbedingten *o*-Dianisidin-Oxydation für Ansätze enthaltend 500 γ Peroxydase II und 100 γ Katalase ungefähr gleich wie für solche, die nur Peroxydase enthalten. Der an der Grenze der Signifikanz liegende Unterschied zwischen dem Verlauf der beiden Kurven dürfte darauf zurückzuführen sein, dass bereits in Ansätzen mit Katalase allein eine geringe *o*-Dianisidin-Oxydation zu beobachten ist (vgl. Fig. 5).

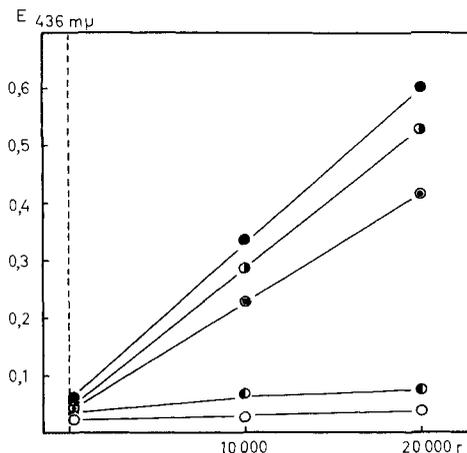


Fig. 5. Oxydation von *o*-Dianisidin durch RÖNTGEN-Strahlen in Gegenwart verschiedener Haeminverbindungen.

○ gepufferte Lösungen von *o*-Dianisidin (= Leerwert); ● + Peroxydase II (500 γ /Ansatz); ● + Katalase (100 γ /Ansatz); ● + Peroxydase + Katalase; ⊙ + Peroxydase 30 min bei 100°.

Das System Peroxydase-*o*-Dianisidin zeigt somit bei Zusatz von Katalase dasselbe Verhalten, gleichgültig ob das H_2O_2 auf enzymatischem Wege gebildet worden ist oder durch Strahleneinwirkung. Im Bestrahlungsversuch ist eine gewisse Konkurrenz nur bei gleichzeitiger Gegenwart von 2 kompletten Indikatorsystemen zu beobachten. Dies ist z. B. der Fall, wenn (Peroxydase-*o*-Dianisidin) und (Katalase- ^{14}C -Formiat) im selben Ansatz bestrahlt und anschliessend sowohl *o*-Dianisidin-Oxydation als auch $^{14}CO_2$ -Bildung gemessen werden. Im Vergleich zu Kontrollansätzen, welche nur das eine der beiden H_2O_2 -Indikatorsysteme enthalten, werden beim gemischten Ansatz in beiden Fällen niedrigere Werte gemessen. Rechnet man mit Hilfe von Eichkurven auf äquivalente H_2O_2 -Werte um, dann entspricht die Summe beider Einzelwerte für den «gemischten Ansatz» dem im System (Peroxydase-*o*-Dianisidin) bestimmten Wert. Aus diesen Experimenten lässt sich schliessen, dass im Konkurrenzversuch das System (Katalase- ^{14}C -Formiat) das strahlengebildete H_2O_2 zu ca. $\frac{3}{4}$ und das System (Peroxydase-*o*-Dianisidin) zu ca. $\frac{1}{4}$ peroxydatisch umsetzen.

Diskussion

Die vorgebrachten Befunde bestätigen zunächst die Brauchbarkeit des Indikatorsystems Peroxydase-*o*-Dianisidin für strahlenchemische Untersuchungen. Die Strahlenempfindlichkeit der Meerrettich-Peroxydase ist zwar in stark verdünnter Lösung beträchtlich, was sich aber bei Dosimetrie-Versuchen durch Verwendung

eines Enzym-Überschusses kompensieren lässt. Um bis zu Dosen von 20000 r eine annähernd linear verlaufende Dosis-Wirkungskurve zu erhalten, genügen bereits ca. 10 γ /ml eines gereinigten Peroxydase-Präparates. Oberhalb dieser Konzentration wird die o-Dianisidin-Oxydation nicht mehr durch das Enzym, sondern durch das Substratangebot, bzw. das bei der Strahleneinwirkung gebildete H_2O_2 begrenzt. Dafür spricht auch der Befund, dass in diesem Konzentrationsbereich nur noch eine geringe Abhängigkeit der o-Dianisidin-Oxydation von der Peroxydasekonzentration besteht (vgl. Fig. 1!).

Die vergleichende Untersuchung verschiedener Protohaeminverbindungen hat zunächst zum erwarteten Ergebnis geführt, dass von allen getesteten Substanzen Peroxydase bei weitem die höchste Aktivität gegenüber o-Dianisidin zeigt. Obgleich das für die Routine-Experimente verwendete Präparat II nicht rein ist, weist dieses im Vergleich zu freiem Haemin eine 2000- bzw. 9000fache Aktivität auf. Da jedoch beim Vergleich verschiedener (Pseudo-)Peroxydasen die relative Aktivität je nach Art des Substrats eine recht verschiedene sein kann, sind die hier für o-Dianisidin gegebenen Verhältniszahlen für andere Substrate, bzw. für Peroxydasen anderer Herkunft *nicht* repräsentativ! Wie aus den von KEILIN & HARTREE¹¹⁾ und den von KNOX¹²⁾ ausgeführten Vergleichen hervorgeht, bestehen zwischen der Substratspezifität verschiedener Peroxydasen beträchtliche Diskrepanzen, welche je nach Art des verwendeten Substrats ein anderes Bild zeigen.

Von besonderem Interesse ist die sich hier ergebende Möglichkeit die o-Dianisidin-Oxydation, wie sie durch direkten H_2O_2 -Zusatz erzeugt werden kann, mit der strahleninduzierten Oxydation dieser Verbindung zu vergleichen. Im Gegensatz zu Katalase hat Peroxydase bei Abwesenheit eines H-Donors praktisch keine H_2O_2 -zerlegende Wirkung; das während der Bestrahlung gebildete H_2O_2 wird daher angehäuft und kann anschliessend entweder analytisch bestimmt oder zur peroxydatischen Umsetzung des Chromogens o-Dianisidin verwendet werden. Dass das Ausmass dieser Indikator-Reaktion, d. h. die durch die Oxydation des o-Dianisidins bedingte Extinktionszunahme tatsächlich eine Aussage über das gebildete H_2O_2 erlaubt, darf auf Grund folgender Befunde angenommen werden: Erstens findet man nach Bestrahlung von Wasser sowie verdünnter Peroxydaselösungen praktisch dieselbe H_2O_2 -Menge. Zweitens hat die Zugabe dieser analytisch bestimmten Menge von Wasserstoffperoxyd zum System Peroxydase-o-Dianisidin praktisch dieselbe Wirkung, wie wenn dieses durch Bestrahlung mit derselben Dosis im Ansatz produziert worden wäre. Die in Gegenwart eines Peroxydaseüberschusses erfolgte Oxydation von o-Dianisidin lässt sich somit durch die H_2O_2 -Produktion der ionisierenden Strahlung quantitativ erklären. Das System Peroxydase-o-Dianisidin zeigt also dieselbe Beziehung zwischen der durch H_2O_2 -Zusatz und der durch Bestrahlung ausgeführten Oxydation, wie sie kürzlich von WARBURG *et al.*⁹⁾ für die Methaemoglobinbildung in bestrahlter Haemoglobinlösung bewiesen worden ist.

Wie die Versuche mit Katalase zeigen, bestehen – was die Konkurrenzwirkung der Katalase anbelangt – wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsanordnungen. Während die Methaemoglobinbildung bei der Bestrahlung durch vor-

¹¹⁾ D. KEILIN & E. F. HARTREE, *Biochem. J.* 60, 310 (1955).

¹²⁾ W. E. KNOX, *Biochim. biophysica Acta* 74, 117 (1954).

gängigen Katalasezusatz praktisch völlig unterdrückt werden kann, hat Katalase auf die strahlenbedingte *o*-Dianisidin-Oxydation keinen Einfluss. Diese Differenz dürfte darauf zurückzuführen sein, dass in Ansätzen mit Peroxydase und einem geeigneten H-Donor als Substrat die stationäre H_2O_2 -Konzentration während der Bestrahlung derart klein bleibt, dass die zur H_2O_2 -Zerlegung durch die Katalase erforderliche Mindestkonzentration von ca. 10^{-9}M nicht erreicht wird. Die Wirkungslosigkeit eines Katalasezusatzes im Bestrahlungsexperiment steht in völliger Übereinstimmung mit Versuchen, in denen H_2O_2 auf enzymatischem Wege (Zusatz von Notatin und Glucose) gebildet worden ist. Dass Katalase die Aktivität der Meerrettich-Peroxydase bei kontinuierlicher H_2O_2 -Zufuhr nicht wesentlich zu beeinflussen vermag, ist bereits von STERN & BIRD¹³⁾ sowie von KNOX¹²⁾ gezeigt worden.

Zu einem anderen Ergebnis gelangt man im Bestrahlungsversuch, wenn nicht einfach Katalase zum System (Peroxydase + *o*-Dianisidin) zugefügt wird, sondern wenn zwei vollständige H_2O_2 -Indikatorsysteme gleichzeitig um das bei der Strahlenwirkung gebildete H_2O_2 konkurrieren, so z. B. die beiden früher getrennt untersuchten Systeme (Peroxydase + *o*-Dianisidin) und (Katalase + Formiat). In einem derartigen «gemischten Ansatz» erfährt das Ausmass beider Indikator-Reaktionen gegenüber dem Kontrollansatz eine Abnahme. Dies dürfte als Zeichen dafür gewertet werden, dass beide Peroxydasen um das bei der Bestrahlung gebildete H_2O_2 konkurrieren. Zugleich bestätigt dieser Befund, dass die zur Ausführung peroxydatischer Umsetzungen erforderliche Mindestkonzentration an H_2O_2 bei beiden Enzymen von derselben Grössenordnung ist.

Die peroxydatische Umsetzung, die in diesen Modellversuchen untersucht worden ist, kommt gleichermassen durch ionisierende Strahlen und durch H_2O_2 -Zusatz zustande. Dies steht mit der Anschauung in Einklang, dass die Hydroperoxydasen als H_2O_2 -umsetzende Enzyme das Ausmass somatischer Strahlenschädigungen mitbestimmen (vgl. 9)). Der Befund, wonach das Vorhandensein oder Fehlen eines geeigneten H-Donors (im Konkurrenzversuch mit Peroxydase bzw. mit Katalase) zu einem andern Versuchsergebnis führen kann, ist möglicherweise auch von biologischem Interesse. Nach CHANCE¹⁴⁾ und CLAYTON¹⁵⁾ ist für die Höhe der stationären H_2O_2 -Konzentration z. B. in der Zelle nicht nur die Geschwindigkeit der H_2O_2 -Bildung, die Konzentration und Verteilung H_2O_2 -umsetzender Fermente, sondern auch das Angebot an geeigneten H-Donoren von Bedeutung.

Die Ausführung dieser Untersuchungen erfolgte mit Mitteln der KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT, wofür hiermit bestens gedankt sei. Herrn M. HESS danken wir für zuverlässige Mitarbeit.

SUMMARY

1. Horseradish-peroxidase with *o*-dianisidine in buffered solution has been used for X-ray dosimetry and for the detection of small amounts of H_2O_2 .

2. A comparative study revealed that the extent of *o*-dianisidine oxidation by X-rays can be completely explained by H_2O_2 formation.

¹³⁾ R. STERN & L. H. BIRD, *Biochem. J.* **49**, 335 (1951).

¹⁴⁾ B. CHANCE, *Science* **116**, 202 (1952).

¹⁵⁾ R. K. CLAYTON, *Biochim. biophysic. Research Comm.* **1**, 191 (1959).

3. Dilute solutions of peroxidase are relatively sensitive to X-rays; an excess of enzyme is required for dosimetry purposes.

4. The peroxidatic activity of some protohemin compounds towards *o*-dianisidine has been examined. On irradiation as well as on addition of H_2O_2 the decrease in activity follows a similar sequence.

5. Addition of catalase to the system does not inhibit oxidation of *o*-dianisidine caused by X-rays or by H_2O_2 generated enzymatically.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern
RÖNTGEN-Institut der Universität Bern

212. Benzimidazol-Derivate und verwandte Heterocyclen VI¹⁾

Synthese von Phenyl-[1-aminoalkyl-benzimidazolyl-(2)]-essigsäure- estern und -amiden

von A. Hunger, J. Kebrle, A. Rossi und K. Hoffmann

(19. VIII. 60)

In der 2. Mitt. dieser Reihe²⁾ ist über die Synthese von 1-Aminoalkyl-2-benzyl-benzimidazolen berichtet worden. Die 3. Arbeit³⁾ hat die Darstellung ähnlicher Verbindungen zum Inhalt, welche im Benzimidazolkern zusätzlich durch eine Nitrogruppe substituiert sind. Einige der hergestellten Derivate zeichnen sich durch sehr starke analgetische Wirkung aus. Da sie im Gegensatz zu den bekannten synthetischen schmerzstillenden Präparaten, wie Pethidin und Methadon⁴⁾, keine Ester-, Amid- oder Alkylketon-Gruppierung enthalten, stellt sich die Frage, ob durch Einführung solcher Reste eine weitere Steigerung der Wirksamkeit erzielt werden kann.

Nachfolgend wird die Synthese von Phenyl-benzimidazolyl-(2)-essigsäure-estern und -amiden beschrieben, die in 1-Stellung des Benzimidazolringes eine Aminoalkylgruppe besitzen. Wiederum stehen dafür zwei Wege offen: Einerseits können Phenyl-benzimidazolyl-(2)-essigsäure-ester und -amide an einem der Stickstoffe des Benzimidazolringes durch eine Aminoalkylgruppe substituiert werden. Andererseits führt der Ringschluss von *o*-Aminoalkylamino-anilinen mit geeigneten Phenylmalonsäure-Derivaten zu den gewünschten Produkten.

Das für den ersten Weg benötigte Phenyl-benzimidazolyl-(2)-acetamid (IV) ist durch Kondensation von *o*-Phenylendiamin (I) mit Phenylcyanessigsäure-äthylester (II) bei 200° zum Nitril III, gefolgt von Hydrolyse in Schwefelsäure, zugänglich. Den Ester VIII erhält man aus dem Iminoäther-hydrochlorid von Phenylmalonsäure-monoäthylester und *o*-Phenylendiamin. Mit Natriumamid lässt sich aus dem Amid IV ein Natriumsalz bereiten, welches sich mit Chloräthyl-diäthylamin zu

¹⁾ 5. Mitt. dieser Reihe s. A. ROSSI, A. HUNGER, J. KEBRLE & K. HOFFMANN, *Helv.* **43**, 1298 (1960).

²⁾ A. HUNGER, J. KEBRLE, A. ROSSI & K. HOFFMANN, *Helv.* **43**, 800 (1960).

³⁾ A. HUNGER, J. KEBRLE, A. ROSSI & K. HOFFMANN, *Helv.* **43**, 1032 (1960).

⁴⁾ Vgl. z. B. N. B. EDDY, *Chemistry & Ind.* **1959**, 1462.