

Untersuchungen über bakterio­statische Chinone und andere Antibiotica.

1. Mitteilung: Hemmungswirkungen verschiedener Anti­biotica auf die Harnstoff­zer­setzung durch Urease.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und W. H. Lee*.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 5. Febr. 1946. Vorgelegt in der Sitzung am 7. Febr. 1946.)

Während der Wirkungsmechanismus der Antibiotica aus der Salicyl­säuregruppe durch die Arbeiten von *G. Ivanovics*¹ bereits weitgehend auf­geklärt ist, kann man für die Art der Wirkung anderer Antibiotica, wie des Penicillins, des Fumigatins und anderer Substanzen mit Chinon­struktur, sowie der ungesättigten Lactone vom Typus des Patulins oder der Parasorbinsäure, noch keine sichere Begründung geben.

In einem Sammelreferat von *K. Wallenfels*² wird die Möglichkeit dis­kutiert, daß die bakterio­statische Wirkung dieser Stoffe auf ihrem Hemm­vermögen gegenüber fermentativen Prozessen, welche für den bakteriellen Stoffwechsel notwendig sind, beruht. Diese Vermutung wird durch den Befund wahrscheinlich gemacht, daß sowohl Penicillin als auch einige Chinone auf verschiedene fermentchemische Prozesse auch noch in größter Verdünnung eine hemmende Wirkung ausüben. *Wallenfels* berichtet in seiner oben zitierten Arbeit über noch unveröffentlichte Versuche von *R. Kuhn* und *H. Beinert* über die Hemmung der Carboxylaseaktivität durch verschiedene bakterio­statisch wirksame Chinonderivate. Bei den Derivaten des 1,4-Naphthochinons wurde auch eine gewisse Überein­stimmung zwischen der bakterio­statischen Wirkung und der Hemmung der Carboxylaseaktivität gefunden; allerdings zeigte es sich, daß manche Halogennaphthochinone, die eine relativ geringe Wirkung auf das Bak-

* Angehöriger der amerikanischen Besatzungsarmee in Österreich.

¹ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **276**, 33 (1942).

² Chemie **58**, 1 (1945).

terienwachstum haben, gegenüber Carboxylase sehr aktiv sind. Bei den Derivaten des p-Benzochinons ergeben sich noch größere Unstimmigkeiten; das p-Benzochinon selbst, dessen bakteriostatische Wirkung recht gering ist, hat eine viel stärker hemmende Wirkung auf die Carboxylase als das Fumigatin (3-Oxy-4-methoxytoluchinon) oder das 2,6-Dimethoxybenzochinon, beides Substanzen, deren bakterienhemmende Aktivität diejenige des p-Benzochinons um ein Vielfaches übertrifft. Auch bei Berücksichtigung der Verschiedenheit der Systeme — Bakterienwachstum und Wirksamkeit einer hochgereinigten Fermentlösung — erscheint es daher doch etwas gewagt, aus den erhaltenen Werten einen kausalen Zusammenhang zwischen Carboxylasehemmung und bakteriostatischer Wirkung anzunehmen.

Um zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der genannten Antibiotica beizutragen, erschien es wesentlich, die Wirkung dieser Substanzen auf verschiedene *andere* Fermentsysteme zu untersuchen. Wir begannen unsere Versuche mit der Messung der hemmenden Wirkung einiger Antibiotica auf die Harnstoffzersetzung durch die Urease. Als erstes zu untersuchendes Ferment wählten wir die Urease deshalb, weil es bekannt ist, daß Penicillin imstande ist, die Wirkung der Urease *in vitro* wie *in vivo* zu hemmen,³ und weil nach Untersuchungen von *J. H. Quastel*⁴ auch das p-Benzochinon eine Hemmwirkung gegenüber der Urease zeigt. Außerdem wurde die Urease in vielen Bakterien nachgewiesen und scheint eine dominierende Stellung im Stoffwechsel mancher von ihnen einzunehmen.

Bei unseren Versuchen fanden wir (vgl. Tabelle), daß die Hemmung der Ureaseaktivität *in keiner Weise parallel* zur antibakteriellen Wirksamkeit ging.

Unter den Chinonen mit einem Sechsering erwiesen sich das p-Benzochinon, das Toluchinon und das 2,5-Dimethoxybenzochinon als stark hemmend auf die Ureasewirksamkeit, während das 4-Methoxytoluchinon und das 2,6-Dimethoxybenzochinon, deren bakteriostatische Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* nach den Untersuchungen von *A. E. Oxford*⁵ eine viel größere ist als die der vorgenannten Substanzen, überhaupt keine Wirkung auf die Harnstoffzersetzung hatten. Wir untersuchten auch einige Halogenderivate des p-Benzochinons auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Ureaseaktivität. Über die antibakterielle Wirksamkeit dieser Stoffe ist unseres Wissens bisher noch nicht gearbeitet worden, wir haben die Absicht, in nächster Zeit diesbezügliche Versuche durchzuführen.

Bei den Naphthochinonen zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie bei

³ *J. C. Turner, F. K. Heath und B. Magasanik, Nature (London) 150, 633 (1942).*

⁴ *Biochemic. J. 27, 1116 (1933).*

⁵ *Chem. Industry 61, 189 (1942).*

den Benzochinonderivaten. Auch hier gab es keinerlei Parallelen zwischen der antibakteriellen Wirkung; die bei diesen Substanzen von *E. F. Moeller* (zitiert in der oben genannten Arbeit von *Wallenfels*) untersucht wurde, und der Hemmwirkung gegenüber der ureatischen Harnstoffzersetzung. So zeigt das Methylnaphthazarin (2-Methyl-5,8-dioxy-1,4-naphthochinon) überhaupt keine Wirkung auf die Urease, gilt dagegen nach *Moeller* als die stärksten wirkende bakteriostatische Substanz dieser Gruppe. Das Naphthazarin dagegen, also das 5,8-Dioxy-1,4-naphthochinon, das sich vom Methylnaphthazarin nur durch das Fehlen einer Methylgruppe unterscheidet, zeigt eine ziemlich deutliche Hemmung der Ureasewirkung. Leider ist die antibakterielle Wirksamkeit letzterer Substanz noch nicht bestimmt worden. Eine sehr starke Hemmwirkung auf die Urease hat das einfache 1,2-Naphthochinon, dessen bakteriostatische Eigenschaften vergleichsweise jedoch ziemlich gering sind. Etwas geringer war die durch 1,4-Naphthochinon erzielte Hemmwirkung.

Tabelle 1. Ureasehemmung durch Chinone und andere Antibiotica.

Substanz (Lösungsmittel)	Hemmung der NH ₃ -Entwicklung in Prozent/10 Minuten bei verschiedenen molarer Konzentration des Hemmstoffs			
	2.10 ⁻³	2.10 ⁻⁴	2.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁶
p-Benzochinon (Wasser)	95,6	23,5	1,5	0
Toluchinon (Wasser)	94,4	57,5	0	—
4-Methoxytoluchinon (Wasser)	0	—	—	—
2,5-Dimethoxychinon (Methanol)	—	30,4*	4,3	—
2,6-Dimethoxychinon (Wasser)	—	0	—	—
2,6-Dichlorchinon (Wasser)	—	17,4	0	—
2,5-Dichlor-3,6-dioxychinon(Wasser)	0	—	—	—
Trichlormethylchinon (Äthanol)	—	17,0	0	—
Tetrachlorchinon (Äthanol)	—	3,7	—	—
1,2-Naphthochinon (Wasser)	89,0	79,0	23,6	1,4
1,4-Naphthochinon (Methanol)	—	25,0	5,3	0
Naphthazarin (Methanol)	25,5	0	—	—
Methylnaphthazarin (Methanol)	0	—	—	—
Patulin (Wasser)	0	—	—	—
Salicylsäure (Wasser)	22,7	1,0	0	—

Zum Vergleich untersuchten wir auch zwei Antibiotica anderer Gruppen als der der Chinone auf ihre Ureasewirkung. Als Vertreter der antibiotischen ungesättigten Lactone stand uns das Patulin (Anhydro-3-oxymethylen-tetrahydropyron-2-carbonsäure) zur Verfügung, das aber auch bei der höchsten geprüften Konzentration keine Hemmwirkung gegenüber der Ureasewirkung zeigte. Die Salicylsäure dagegen, welche

* Gesättigte Lösung in Methanol, etwa 10⁻⁴-molar.

ebenso wie einige ihrer Derivate als spezifisches Antibioticum zu wirken imstande ist, hemmte die Harnstoffzersetzung in einem allerdings geringen Ausmaße.

Bei der Darstellung der verschiedenen Chinone erfreuten wir uns der tatkräftigen Hilfe von Frl. *G. Reitmaier*. Für die Überlassung eines Ureasepräparates aus Sojabohnenmehl sind wir Herrn Prof. *S. Edlbacher* (Basel) zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

Die Bestimmung der Ureaseaktivität, bzw. ihrer Hemmung durch die verschiedenen Antibiotica und Chinone, wurde in Anlehnung an die Bestimmungsmethode für Blutharnstoff von *van Slyke* und *Cullen* (beschrieben in *A. v. Muralt*, Praktische Physiologie, Berlin 1944) durchgeführt. Als Ureasepräparat verwendeten wir ein vorgereinigtes Sojabohnenmehl, da uns kristallisierte Urease nicht zur Verfügung stand und die zur Darstellung letzterer einzig geeignete Schwertbohne, *Canavalia ensiformis*, in Österreich nicht gedeiht und zur Zeit auch nicht erhältlich ist. Als Standardpuffer- und gleichzeitig auch Harnstofflösung verwendeten wir eine wäßrige Lösung, die 1,2% KH_2PO_4 , 1,0% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,3% Harnstoff enthielt. Alle Versuche wurden bei einem $\text{pH} = 6,7$ durchgeführt. Die von *van Slyke* beschriebene Apparatur verbesserten wir durch Verwendung von Normalschliffen an Stelle der Schlauchverbindungen, weil wir die Erfahrung machten, daß der Alterungsgrad der Kautschukschläuche einen gewissen Einfluß auf die erhaltenen Werte hatte, die bei Verwendung neuer Schläuche niedriger ausfallen. Wir führten die Messungen bei der jeweiligen Zimmertemperatur durch, da wir feststellen konnten, daß kleine Temperaturschwankungen einen zwar erheblichen Einfluß auf die absolute Ureaseaktivität hatten, dagegen die prozentuelle Hemmung durch die untersuchten Inhibitoren, auf die es uns ja ankam, unberührt ließen.

7 ccm der oben beschriebenen Standardlösung und 2 ccm der zu prüfenden Lösung eines Hemmkörpers wurden in eine beiderseits mit Normalschliffen versehenen Waschflasche gegeben. Diese Waschflasche ist auf beiden Seiten mit gleichartigen Waschflaschen in Verbindung, von welchen diejenige auf der Einleitungsseite mit 5%iger Schwefelsäure beschickt ist, während die andere 15 ccm $\frac{1}{100}$ n-HCl enthält. In die mittlere Waschflasche wurden einige Tropfen Octylalkohol sowie 1 ccm 10%ige Ureaselösung zugegeben und die nun in Gang gesetzte Reaktion nach 10 Minuten durch Zugabe von 10 ccm gesättigter wäßriger Lösung von K_2CO_3 abgestoppt und durch Einschalten der Wasserstrahlpumpe das gebildete NH_3 $\frac{1}{2}$ Stunde lang in die vorgelegte Salzsäure übergetrieben. Durch Rücktitration mit $\frac{1}{100}$ n-NaOH gegen Phenolphthalein wurde dann der gebildete Ammoniak bestimmt.

Zur Bestimmung der perzentuellen Hemmung ist es notwendig, einen Blindversuch bei genau derselben Temperatur durchzuführen, wobei an Stelle der 2 ccm Lösung des Hemmungskörpers 2 ccm reines Lösungsmittel zuzugeben ist. (Als Lösungsmittel trachteten wir im allgemeinen destilliertes Wasser zu verwenden; nur wenn die Löslichkeit der Chinone dies nicht mehr erlaubte, verwendeten wir Methanol oder Äthanol.) Aus den erhaltenen Ammoniakwerten beim Versuch mit dem Hemmkörper und dem Blindversuch läßt sich leicht die perzentuelle Hemmung berechnen. Da die Harnstoffzersetzung durch Urease den Gesetzen einer Reaktion nullter Ordnung folgt, ist es prinzipiell möglich, die Reaktionszeit beliebig zu verlängern oder zu verkürzen, doch leidet bei einer kürzeren Reaktionszeit als 10 Minuten die Genauigkeit der Methode. Die Messungen sind mit einer Genauigkeit von etwa 1% reproduzierbar.

Zusammenfassung.

Es wurde die hemmende Wirkung verschiedener Antibiotica, hauptsächlich aus der Chinonreihe, auf die Harnstoffspaltung durch die Urease gemessen. Die Resultate ergaben, daß gerade die stärkst antibakteriellen Substanzen, wie das 4-Methoxytoluchinon, das 2,6-Dimethoxybenzochinon, das 2-Methyl-5,8-dioxynaphthochinon, sowie das zur Reihe der ungesättigten Lactone gehörige Patulin überhaupt keine hemmende Wirkung auf die Ureaseaktivität ausübten, während Stoffe, deren bakteriostatische Wirksamkeit vergleichsweise gering ist, wie das p-Benzochinon oder das 1,2-Naphthochinon, die Harnstoffzersetzung durch die Urease stark hemmten. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß zwischen den Wirkungsmechanismen der Hemmung des Bakterienwachstums durch die genannten Stoffe und der hemmenden Wirkung auf die Ureaseaktivität durch ebendieselben ein kausaler Zusammenhang kaum bestehen dürfte.