

ZUR BEDEUTUNG CHEMISCH-BIOLOGISCHER WECHSELWIRKUNGEN FÜR DIE TOXISCHE UND KREBSERZEUGENDE WIRKUNG AROMATISCHER AMINE—III

SYNTHESE UND ANALYTIK EINIGER STOFFWECHSELPRODUKTE VON *TRANS*-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN, *CIS*-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN UND 4-DIMETHYLAMINOBIENZYL*

M. METZLER† und H.-G. NEUMANN

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Received in Germany 21 November 1970; Received in the UK for publication 7 December 1970)

Abstract—A radio-gas chromatographic procedure has been devised to enable comparison of the pharmacokinetics of tritium labelled, carcinogenic *trans*-4-dimethylaminostilbene and inactive *cis*-4-dimethylaminostilbene and 4-dimethylaminobiphenyl. This method makes it possible to analyse the pattern of metabolites in complex mixtures obtained by tissue extraction. With a specific radioactivity of 1 mCi/mg and an applied dose of 1 mg (per rat), 10^{-3} μ g of a metabolite or 10^{-4} % of the administered dose can be determined. Since the use of reference substances is obligatory, 15 possible metabolites of the starting compounds were synthesized. For control experiments 5 of them were also labelled with tritium. 4-Dimethylamino-4'-hydroxystilbene and -biphenyl and 4-dimethylamino-3-hydroxy-stilbene and -biphenyl are among the unknown compounds.

The UV, NMR, mass and IR spectra of the synthesized compounds are discussed, and the data for radio-gas chromatography and thin-layer chromatography of the reference substances are given.

KREBSERZEUGENDE, aromatische Amine erlangen ihre biologische Aktivität erst durch Veränderungen im Stoffwechsel. Ihre Wirkung ist mit der Entstehung reaktionsfähiger Metaboliten verbunden.¹ Die Untersuchung ihres Stoffwechsels ist deshalb von besonderem Interesse. Bisher wurden zur Isolierung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten häufig nur die Ausscheidungsprodukte, insbesondere der Harn von Versuchstieren herangezogen, oder Gewebshomogenate inkubiert. Es erscheint aber zunehmend wichtig, das Schicksal der Verbindungen im Organismus zu verfolgen. Es geht nicht nur darum, die Bildung bestimmter Metaboliten nachzuweisen, sondern auch ihren Entstehungsort, ihre Verteilung und ihre Gewebskonzentration zu kennen. Das gilt vor allem für lipophile Stoffwechselzwischenprodukte, die kaum ausgeschieden werden. Dazu gehören in der Klasse der aromatischen Amine die Vorstufen der N-Hydroxylierung, die N-Hydroxy-Verbindungen selbst und bestimmte Derivate davon, also gerade die Verbindungen, die im Zusammenhang mit der Aktivierung interessieren.

Es besteht damit das Problem, das Metabolitmuster der Verbindungen nicht nur in den Ausscheidungsprodukten, sondern auch in einzelnen Geweben kennenzulernen,

* IL H. K. Rjosk, H.-G. Neumann, Z. Krebsforsch, 75, 209 (1970)

† Die Arbeit enthält einen Teil der Dissertation M. Metzler, Universität München, 1970.

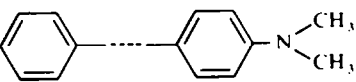
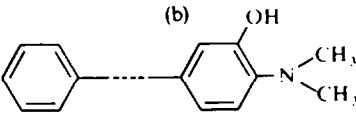
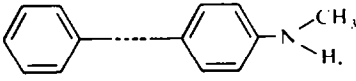
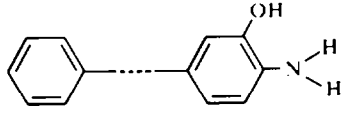
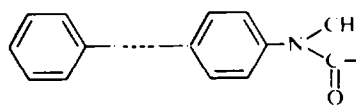
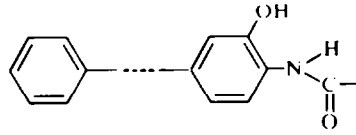
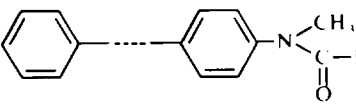
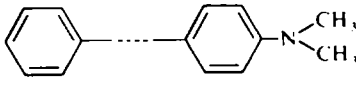
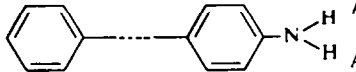
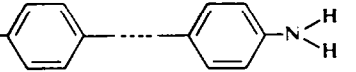
d.h. ausserordentlich kleine Substanzmengen in komplexen Gemischen nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

Für unsere Untersuchungen mit dem carcinogenen *trans*-4-Dimethylaminostilben (*trans*-DAS) und den beiden unwirksamen Vergleichsverbindungen *cis*-4-Dimethylaminostilben (*cis*-DAS) und 4-Dimethylaminobibenzyl² erschien zur Bearbeitung dieses Problems die Radiogaschromatographie besonders geeignet, weil sie das hohe Trennvermögen und die Schnelligkeit der Gaschromatographie mit der Empfindlichkeit der Isotopentechnik verbindet. Ihre Anwendung setzt aber voraus, dass die zu bestimmenden Stoffe als Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese der Referenzsubstanzen sowie ihre radiogaschromatographische und dünnschichtchromatographische Analyse beschrieben.

Auswahl der Referenzsubstanzen

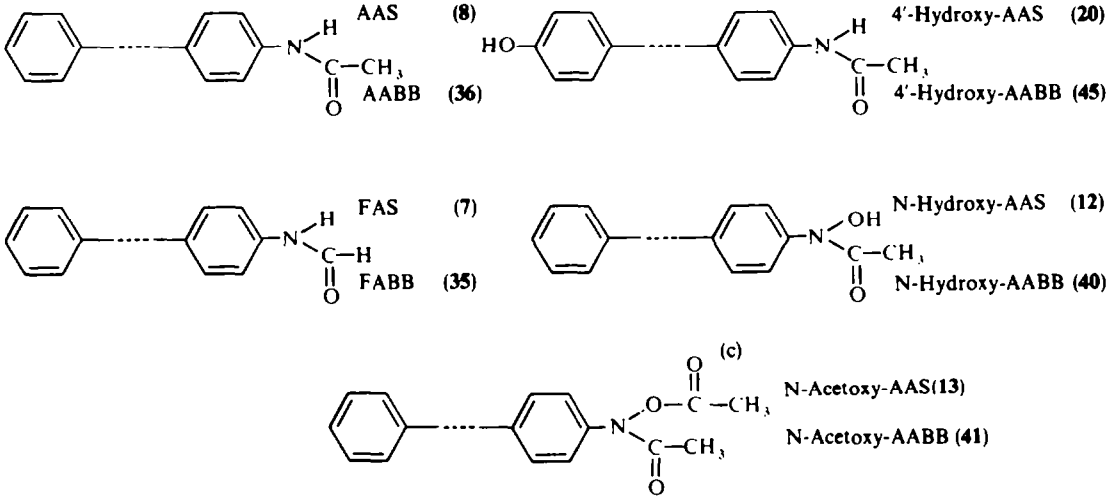
Über den Stoffwechsel von Stilbenaminen wurde bisher in drei Arbeiten berichtet.³⁻⁵ Als Stoffwechselprodukte des hauptsächlich untersuchten *trans*-4-Acetylaminostilbens* (*trans*-AAS) in der Ratte waren 4-Aminostilben, 4'-Hydroxy-, 3-Hydroxy- und N-Hydroxy-4-acetylaminostilben im Harn nachgewiesen worden. 4'-Hydroxy-

TABELLE I

(a)			(b)		
	DAS	Nr. (1)		3-Hydroxy-DAS	(28)
	DABB	(32)		3-Hydroxy-DABB	(46)
	MAS	(6)		3-Hydroxy-AS	(29)
	MABB	(34)		3-Hydroxy-ABB	(47)
	AMAS	(10)		3-Hydroxy-AAS	(31)
	AMABB	(38)		3-Hydroxy-AABB	(48)
	FMAS	(9)		4'-Hydroxy-DAS	(17)
	FMABB	(37)		4'-Hydroxy-DABB	(43)
	AS	(3)		4'-Hydroxy-AS	(19)
	ABB	(33)		4'-Hydroxy-ABB	(44)

* Im folgenden ist die Isomerenbezeichnung womöglich weggelassen worden. Es ist dann die *trans*-Form gemeint.

TABELLE 2 Cont.



Erläuterungen zu Tab. 1:

- Die Punkte zwischen den aromatischen Ringen stehen bei den Stilbenen für $-\text{CH}=\text{CH}-$, bei den Bibenzylen für $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.
- Die in Klammern zugefügten Nummern entsprechen den Nummern der Verbindungen in Tab. 2-3.
- Abkürzungen:

DAS	= N,N-Dimethyl-4-aminostilben
DABB	= N,N-Dimethyl-4-aminobibenzyl
MAS	= N-Methyl-4-aminostilben
MABB	= N-Methyl-4-aminobibenzyl
AMAS	= N-Acetyl-N-methyl-4-aminostilben
AMABB	= N-Acetyl-N-methyl-4-aminobibenzyl
FMAS	= N-Formyl-N-methyl-4-aminostilben
FMABB	= N-Formyl-N-methyl-4-aminobibenzyl
AS	= 4-Aminostilben
ABB	= 4-Aminobibenzyl
AAS	= N-Acetyl-4-aminostilben
AABB	= N-Acetyl-4-aminobibenzyl
FAS	= N-Formyl-4-aminostilben
FABB	= N-Formyl-4-aminobibenzyl
3-Hydroxy-DAS	= 3-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminostilben
3-Hydroxy-DABB	= 3-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminobibenzyl
3-Hydroxy-AS	= 3-Hydroxy-4-aminostilben
3-Hydroxy-ABB	= 3-Hydroxy-4-aminobibenzyl
3-Hydroxy-AAS	= 3-Hydroxy-N-acetyl-4-aminostilben
3-Hydroxy-AABB	= 3-Hydroxy-N-acetyl-4-aminobibenzyl
4'-Hydroxy-DAS	= 4'-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminostilben
4'-Hydroxy-DABB	= 4'-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-aminobibenzyl
4'-Hydroxy-AS	= 4'-Hydroxy-4-aminostilben
4'-Hydroxy-ABB	= 4'-Hydroxy-4-aminobibenzyl
4'-Hydroxy-AAS	= 4'-Hydroxy-N-acetyl-4-aminostilben
4'-Hydroxy-AABB	= 4'-Hydroxy-N-acetyl-4-aminobibenzyl
N-Hydroxy-AAS	= N-Hydroxy-N-acetyl-4-aminostilben
N-Hydroxy-AABB	= N-Hydroxy-N-acetyl-4-aminobibenzyl
N-Acetoxy-AAS	= N-Acetoxy-N-acetyl-4-aminostilben
N-Acetoxy-AABB	= N-Acetoxy-N-acetyl-4-aminobibenzyl

und N-Hydroxy-4-acetylaminostilben waren auch nach Gabe von *trans*-DAS gefunden worden. Bei DABB konnten keine Metaboliten eindeutig zugeordnet werden und *cis*-DAS wurde bisher nicht untersucht. In der neuesten Mitteilung⁵ über den Stoffwechsel von *trans*-AAS und *trans*-N-Hydroxy-AAS wurden unter Verwendung von ¹⁴C-markierten Ausgangssubstanzen die Metaboliten in Harn und Faeces quantitativ bestimmt. Dabei wurde zusätzlich zu den bereits genannten Stoffwechselprodukten noch 4'-Hydroxy-4-aminostilben identifiziert.

Werden dazu die Stoffwechseluntersuchungen über *trans*-4-Dimethylaminoazobenzol⁶⁻⁸ und anderer aromatischer Amine⁹ berücksichtigt, ergibt sich für die zu untersuchenden Verbindungen ein allgemeiner Stoffwechselweg: Entmethylierung, Acetylierung des Amins, C-Hydroxylierung, besonders in *ortho*- und *para*-Stellung zum Aminorest und N-Hydroxylierung, Konjugation der Hydroxylverbindungen mit Glucuronsäure und Schwefelsäure.

Daraus folgte im wesentlichen die in Tab. 1 zusammengestellte Auswahl von Referenzsubstanzen. Sie enthält noch einige weitere, möglicherweise auftretende Substanzen. So war die Frage zu prüfen, ob wie beim Dimethylaminoazobenzol auch *trans*-DAS am aromatischen Ring, vor der Abspaltung der Methylgruppen, hydroxyliert wird. Formylierte Amine wurden zwar bisher nicht als Stoffwechselprodukte beschrieben, sie könnten aber als Zwischenstufen entstehen und interessieren, weil sie durch Oxydation einer N-Methylgruppe an der Luft gebildet werden können.¹⁰ N-Formyl-N-methyl-4-aminostilben wurde auch in einer *trans*-DAS-Probe, die längere Zeit gestanden hatte, nachgewiesen.¹¹ N-Acetoxy-N-acetyl-4-aminostilben (N-Acetoxy-AAS) wurde bisher nicht als Stoffwechselprodukt nachgewiesen, wird aber wegen seiner Reaktionsfähigkeit als mögliches ultimales Carcinogen diskutiert.¹

Von den Verbindungen der Tabelle 1 wurden die *trans*-Stilbene und Bibenzyle synthetisiert. Die Darstellung der entsprechenden *cis*-Verbindungen war nicht nötig, da diese durch Isomerisierung der *trans*-Isomeren in Lösung unter Lichteinwirkung entstehen (s.u.).

Synthesen

Ausser bei *trans*-DAS 1 wurden zunächst die Nitrostilbene dargestellt, zu den Aminostilben reduziert und diese in verschiedene Derivate überführt. Die Verbindungen der Bibenzyl-Reihe wurden durch katalytisches Hydrieren entsprechender Stilbene erhalten.

Neue Synthesewege mussten für die Darstellung von 4'-Hydroxy-DAS (17) und von 3-Hydroxy-DAS (28) gesucht werden, da diese Verbindungen nicht nach dem allgemeinen Syntheseprinzip für Stilbene durch Kondensation¹² zugänglich waren. Durch Diazotieren und Phenolverkochen von 4-Dimethylamino-4'-aminobibenzyl (42) kann zwar 4'-Hydroxy-DABB (43), nicht aber aus dem entsprechenden Stilben 4'-Hydroxy-DAS (17) gewonnen werden. Die empfindlichere Stilben-Verbindung lässt sich aus dem Rohprodukt nur sehr schwer rein isolieren. Deshalb wurde die Hydroxylgruppe von 4-Nitro-4'-hydroxy-stilben (14) durch Veräthern mit α -Chlordimethyläther¹³ geschützt, die Nitrogruppe reduziert und das entstandene Amin mit Methyljodid methyliert. Beim Überführen des dabei gebildeten quartären Ammoniumsalzes in das tertiäre Amin mit Äthanolamin wird dann gleichzeitig die Methoxymethylenoxy-Gruppe abgespalten.

Ganz entsprechend bereitete auch die Umwandlung von 3-Amino-4-dimethyl-

amino-stilben¹⁴ in das Phenol Schwierigkeiten. Die Darstellung von 3-Hydroxy-DAS (28) gelang schliesslich durch Benzylieren von 3-Hydroxy-4-nitro-stilben (24), Reduzieren der Nitrogruppe, Methylieren des Amins mit Methyljodid und anschliessendes Abspalten der Benzylgruppe. Aus dem für diese Synthese dargestellten 3-Hydroxy-4-nitrostilben (24) liess sich 3-Hydroxy-4-aminostilben (29) und daraus auf anderem Wege als bei Andersen *et al.*³ 3-Hydroxy-AAS (31) gewinnen.

Für Kontrollversuche wurden ausserdem radioaktives AAS (8), 3-Hydroxy-AAS (31), 4'-Hydroxy-AAS (20), N-Hydroxy-AAS (12) und N-Acetoxy-AAS (13) durch Umsetzen der entsprechenden Aminostilbene mit ³H-Acetanhydrid dargestellt (s. Versuchsteil). Aus der spezifischen Aktivität des eingesetzten Anhydrids errechnete sich für die erhaltenen Substanzen eine spezifische Aktivität von 25 mC/mMol.

Die synthetisierten Verbindungen der Stilbenreihe sind in Tabelle 2, diejenigen der Bibenzylreihe in Tabelle 3 zusammengestellt. Von den erstmals dargestellten Substanzen sind die Stickstoffanalysen angegeben.

Von allen Substanzen wurden UV-, IR-, Kernresonanz- und Massenspektren aufgenommen und zum Strukturbeweis herangezogen. Darüber hinaus bieten sich die Daten aber auch für einige vergleichende Betrachtungen an. In die Tabellen wurden auch einige in der Literatur bereits beschriebene Verbindungen aufgenommen. Insbesondere sind alle von uns gemessenen UV-Daten der *trans*-Stilbene angegeben, da die Werte für das langwellige Absorptionsmaximum gelegentlich bis zu 10m μ längerwellig lagen als die in der Literatur zugänglichen (s. Diskussion der UV-Spektren).

UV-Spektren

Die *trans*-Stilbene lagern sich in verdünnten Lösungen, wie sie zur Aufnahme von UV-Spektren dienen ($< 10^{-2}$ molar) unter dem Einfluss von Tageslicht rasch und weitgehend in die *cis*-Form um, worauf schon Haddow *et al.*¹⁵ hinwiesen (s.a. Scharf¹⁶, Hammond *et al.*¹⁷). Auf die Schnelligkeit der Reaktion haben besonders SYZ u. Zollinger¹⁸ aufmerksam gemacht. Da sich die UV-Spektren der beiden Isomeren beträchtlich voneinander unterscheiden, wurden die Lösungen der *trans*-Verbindungen unter Ausschluss von Tageslicht im schwachen Rotlicht der Dunkelkammer bereitet und sofort gemessen. Bei mehrmaligem Aufnehmen derselben Lösung wurden unter den angewendeten Bedingungen keine Veränderungen in den Spektren beobachtet. Die so erhaltenen Werte für das langwellige Absorptionsmaximum lagen gelegentlich bis zu 10 m μ längerwellig als die in der Literatur zugänglichen Daten.

Von den bei den dargestellten *trans*-Stilbenen durchwegs auftretenden 2 Banden (B-Bande bei 230 m μ , $\epsilon = 10000-20000$, A-Bande 300-420 m μ , $\epsilon = 30000-40000$, Bandenbezeichnung nach Beale u. Roe²⁷) wird die B-Bande durch Substituenten meist nicht sehr beeinflusst, während die Lage der A-Bande stark vom Substituenten abhängt. Für monosubstituierte Benzole wurde von DOUB u. Vandenbelt²⁸ gezeigt, dass die durch den Substituenten bewirkte Verschiebung der p-Bande (Nomenklatur nach Clar²⁹) proportional zur Differenz $\Delta\sigma$ der Hammet'schen Konstanten dieses Substituenten für *para*- und *meta*-Stellung ist ($\Delta\sigma = \sigma_p - \sigma_m$) und damit direkt mit der Fähigkeit des Substituenten zur Mesomerie mit dem aromatischen Kern zusammenhängt. Rao³⁰ fand später eine bessere Linearität bei Verwendung der Taft'schen Resonanzparameter.³¹

Ein ähnlicher Zusammenhang wurde in der Reihe der monosubstituierten Stilbene

TABELLE 2. TRANS-STILBENE

Nr.	Substituent	Darst.	Schmp.	Ausbeute %	N-Anal.	R_f -Werte			UV-Spektrum in Äthanol mp (e)	Literatur
						a	b	c		
1	4-N(CH ₃) ₂		148° (A)	49	-	83	80	84	236 (12.8), s 237 (8.3), 349 (33.4)	19
2	4-NO ₂	A	154° (A)	65	-	55(B), 70(C)			239 (12.2), 268 (8.9), 351 (28.0)	20
3	4-NH ₂	B 2	149° (A)	90	-	54	60	52	232 (14.3), 328.5 (32.4)	3
4	4-NH-SO ₂ C ₆ H ₄ CH ₃	3	182° (A)	78	-	25(C), 73(E)			225.5 (27.9), 316 (38.4)	4
5	4-N(CH ₃)SO ₂ C ₆ H ₄ CH ₃	4	163° (A)	85	-	56(C), 70(E)			227.5 (26.8), s 305 (35.8), 315 (37.3)	4
6	4-NH-CH ₃	5	107° (A)	93	-	69	75	75	235 (12.0), 345.5 (30.8)	4
7	4-NH-CHO	C 2	222° (B)	75	-	36	33	17	229 (16.3), s 314 (38.3) 323 (39.7), s 340 (24.6)	22
8	4-NH-COCH ₃	D 3	232° (M)	75	-	35	26	16	229 (16.9), s 312 (37.7) 324 (40.4), s 338 (25.7)	19
9	4-N(CH ₃)CHO	C 6	153° (A)	88	5.90 5.84	48	60	52	226 (18.8), s 307 (37.8), 313 (38.0)	4
10	4-N(CH ₃)COCH ₃	D 6	139° (M)	97	-	35	47	29	226 (19.0), 300 (35.3), 311.5 (35.3), s 322 (25.0)	4
11	4-N(CHO-COCH ₃)	D 7	140° (A)	75	5.27 5.24	33(C), 62(E)				
12	4-N(OH-COCH ₃)	2	188° (B)	4	-	31	22	10	228 (17.7), 324 (38.2), s 345 (18.4)	3
13	4-N(O-COCH ₃)COCH ₃	12	106° (A)	56	-	23(C), 56(E)			227 (20.5), s 305 (40.0) 315 (41.8)	3
14	4-NO ₂ -4'-OH	A	205° (ES)	65	-	9(C), 67(E)			382 (34.5) 244.6 (12.7), s 271 (10.6), 368 (30.0)	23
15	4-NO ₂ -4'-OCH ₂ OCH ₃	G 14	113° (M)	47	4.90 4.71	27(B), 56(C)			s 227 (13.0), s 317 (31.4), 331 (32.6)	
16	4-NH ₂ -4'-OCH ₂ OCH ₃	B 15	122° (A)	88	5.48 5.64	17(C), 60(E)				

17	4-N(CH ₃) ₂ -4'-OH	F 16	184° (M)	r 37	5-85 5-98	53 43 40	s 233 (10-5), 262 (5-0) 332 (32-6), 345-5 (34-0)
18	4-N(CH ₃) ₂ -4'-NO ₂	A	251° (B)	33	-	31(B), 62(C)	260 (9-6), 298 (14-7) 428 (27-8)
19	4-NH ₂ -4'-OH	B 14	265° (E)	42	-	26 18 17	s 230 (10-4), 314 (28-1) 331-5 (28-1)
20	4-NH-COCH ₃ -4'-OH	A	234° (M)	20	3-94	15 7 4	s 228 (15-6), s 315 (39-8)
21	4-NH-COCH ₃ -4'-OSO ₃ Na	H 20	360°	56	3-95	36(X2)	333 (46-8), s 348 (31-9)
22	cis-4-NO ₂ -3-OH-β-COOH	J	225° (A)	59	4-82	55(X1)	229 (16-2), s 315 (41-3) 328 (45-6), s 342 (29-2) 214(27-0), 322-5 (12-8)
23	cis-4-NO ₂ -3-OH	J 24	öl	70	5-80 5-67	53(B), 70(C)	s 250 (10-0), 353 (11-7)
24	trans-4-NO ₂ -3-OH	J 23	126° (A)	42	5-80 5-83	52(B), 70(C)	s 232 (14-0), 270 (9-4), 371 (25-6)
25	4-NO ₂ -3-OCH ₂ -C ₆ H ₅	J 24	140° (M)	85	4-22	47(B), 70(C)	230 (19-7), 322 (21-6) 350 (21-0)
26	4-NH ₂ -3-OCH ₂ -C ₆ H ₅	B 25	104° (P2)	93	4-64 4-66	44(C), 70(E)	243 (15-8), s 311 (19-2), 341 (30-0)
27	4-N(CH ₃) ₂ -3-OCH ₂ -C ₆ H ₅	E 26	77° (M)	70	4-25 4-24	18(B), 60(C)	s 207 (41-2), 242 (17-0), 333 (29-7)
28	4-N(CH ₃) ₂ -3-OH	J 27	149° (P2)	48	5-85 5-73	65 70 59	237 (12-6), s 297 (17-0), s 309 (19-2), 331 (23-4)
29	4-NH ₂ -3-OH	B 24	219° (B)	69	6-63 6-37	40 24 15	242 (14-9), s 300 (16-9), s 312 (19-7), 339 (31-2)
30	4-N(COCH ₃) ₂ -3-OCOCH ₃	D 29	123° (A)	67	4-17 4-20	31(C), 64(E)	230 (18-1), 302 (33-3), 314 (34-1), s 327 (22-6)
31	4-NH-COCH ₃ -3-OH	K 30	215° (B)	82	-	34 18 13	s 221 (20-8), s 312 (31-8) 329 (35-7)

* Der Buchstabe bezeichnet die Beschreibung im Versuchsteil, die Ziffer die Ausgangssubstanz der Synthese.

† Unter dem Schmp. ist das Lösungsmittel angegeben, aus dem umkristallisiert wurde. Es bedeutet: A = Äthanol, B = Benzol, C = Chloroform, Cy = Cyclohexan, D = Dioxan, E = Essigester, ES = Essigsäure, M = Methanol, Pl = Petroläther 40/60, P2 = Petroläther 60/80, W = Wasser, X1 = Benzol:Dioxan:Essig 90:25:4, X2 = Essigester:Pyridin:Eisessig:Wasser 62:21:6:11 (STAHL 1967).

‡ Für alle bisher nicht beschriebenen Substanzen sind die Stickstoffanalysen angegeben, ber./gcf.

§ Für alle Referenzsubstanzen sind die h_R-Werte (= R_f × 100) in DC1 = Petroläther 40/60:Aceton 7:3, DC2 = Benzol:Methanol 9:1, DC3 = Chloroform:Essigester 95:5 angegeben, für die übrigen Substanzen h_R-Werte in den bezeichneten Laufmitteln.

¶ Aufnahmebedingungen s. Text, Wellenlängen der Maxima in mp (s = Schulter), in Klammern $\epsilon \times 10^{-3}$

TABELLE 3. BIBENZYL^a

Nr.	Substituent	Darst.	Schmp.	Ausbeute	N-Anal.	R _f -Werte DC1 DC2 DC3	UV-Spektrum in Äthanol mp (μ)	Literatur
32	4-N(CH ₃) ₂	F 1	60° (A)	93	6.21 6.33	83 80 76	255 (16.6), 301 (18.4)	26
33	4-NH ₂	F 2	48° (P2)	68	-	52 60 49	238 (12.4), 268.5 (1.0), 290.5 (1.65) ^b	21
34	4-NH-CH ₃	F 6	Öl	quant	-	68 76 69	247.5 (14.4), 298 (1.77)	
35	4-NH-CHO	C 33	116° (Cy)	85	6.21 6.16	36 32 21	247 (18.6), s 284 (1.03) ^c	
36	4-NH-COCH ₃	F 2	136° (B)	46	-	32 24 17	246.5 (18.8), s 285 (0.66)	3
37	4-N(CH ₃ -CHO)	C 34	58° (B)	37	5.85 5.81	48 60 51	273 (13.4)	
38	4-N(CH ₃ -COCH ₃)	D 34	52° (P1)	50	5.53 5.73	37 46 33	s 260 (1.03)	
39	4-N(CHO-COCH ₃)	D 35	81° (P2)	79	5.23 5.24	9(C), 44(E)	245 (13.1)	
40	4-N(OH-COCH ₃)	2	112° (B)	7	-	27 21 8	254.5 (12.6), 324 (1.36), s 340 (0.81) ^c	3
41	4-N(OCOCH ₃ -COCH ₃)	D 40	Öl	60	-	34(C), 60(E)	228 (10.8), s 268 (1.9) 300 316 (0.38) ^c	
42	4-N(CH ₃) ₂ -4'-NH ₂	B 18	82° (P2)	84	11.65 11.79	17(C), 55(E)	251 (22.2), 292.5 (3.14)	
43	4-N(CH ₃) ₂ -4'-OH	L 42	108° (Cy)	76	5.80 5.96	54 41 32	224.5 (12.6), 254.5 (17.4), s 258 (3.1), s 300 (1.86)	
44	4-NH ₂ -4'-OH	F 14	219° (D/W)	60	-	26 16 13	232 (16.2), 280 (3.32), 285 (3.44), s 330 (0.8)	23
45	4-NH-COCH ₃ -4'-OH	F 20	177° (A)	90	-	13 8 3	218 (27.6), 249 (24.4) 263 (14.5), 300 (12.8)	23
46	4-N(CH ₃) ₂ -3-OH	F 27	62° (M/W)	83	5.80 5.68	70 70 57	242 (6.74), s 270 (2.48) 286 (3.75)	
47	4-NH ₂ -3-OH	F 24	184° (B)	68	6.57 6.30	39 22 13	237 (10.5), 290 (4.36)	
48	4-NH-COCH ₃ -3-OH	F 24	136° (B)	59	5.49 5.50	36 20 13	208.5 (34.6), 247 (10.7) s 257 (7.25), 286.5 (5.23)	

^a Fussnoten s. Tabelle 2^b enthält etwa 0.6% Stilben^c enthält etwa 1% Stilben^d enthält etwas Benzol

gesucht. Für die durchwegs stickstoffhaltigen Substituenten waren nicht alle Hammett'schen und Taft'schen Konstanten zugänglich. Für die restlichen Verbindungen konnte nur ein sehr grober Zusammenhang zwischen der Verschiebung $\Delta\lambda$ und den Hammett'schen Konstanten σ gefunden werden. Auch die Taft'schen Resonanzparameter lieferten keine befriedigende Linearität. Dagegen konnte ein ebenfalls von Doub u. Vandenberg²² bei den paradisubstituierten Benzolen beobachteter Befund in der Stilbenreihe bestätigt werden. Wenn Benzol eine elektronenliefernde und in *para*-Stellung eine elektronenanziehende Gruppe trägt, so verstärken sich die Effekte dieser beiden Substituenten, d.h. die beobachtete langwellige Verschiebung der p-Bande ist grösser als die Summe der durch jeden Substituenten allein bewirkten Verschiebung. Stehen sich dagegen zwei Gruppen gleichen Typs gegenüber, so stimmt die gemeinsam bewirkte Verschiebung etwa mit der überein, die der stärkere Substituent auch alleine bewirken kann. Dieser Effekt tritt auch in der Stilbenreihe auf. (s. Tabelle 4). Die verstärkte Verschiebung im Falle der *para*-Disubstitution mit gegensätzlichen Gruppen deutet auf eine hohe Beteiligung chinoider Formen im angeregten Zustand hin.

TABELLE 4. EFFEKT DER 4,4'-DISUBSTITUTION X—C₁₄H₁₀—Y AUF DIE A-BANDE VON *trans*-STILBEN

Nr.	X	Verschiebung ^a für X (m μ)	Y	Verschiebung ^a für Y (m μ)	berechnet Summe	gefunden
18	—N(CH ₃) ₂	54	—NO ₂	56	110	133
14	—OH	6 ^b	—NO ₂	56	62	87
c	—OCH ₃	11 ^b	—NO ₂	56	67	79
20	—OH	11	—NH—COCH ₃	29	35	38
17	—OH	6	—N(CH ₃) ₂	54	60	51
c	—OCH ₃	11	—N(CH ₃) ₂	54	65	52
c	—N(CH ₃) ₂	54	—NH ₂	33	87	59
19	—OCH ₃	6	—NH ₂	33	39	36
c	—OCH ₃	11	—NH ₂	33	44	37

^a bezogen auf das unsubstituierte *trans*-Stilben (A-Bande: 295 m μ)

^b der Literatur entnommen (Güsten u. Salzwedel³⁴)

^c Dissertation Metzler, 1970.

Massenspektren

Das unsubstituierte Stilben selbst neigt wegen seines völlig konjugierten Systems nicht sehr zur Fragmentierung. Neben dem Molekülion (100%) wird vor allem das Bruchstück der Masse 165 (40% bei 70 eV) gefunden, das dem durch Umlagerung unter Verlust einer Methylgruppe entstandenen Fluorenylion zugeschrieben wird³³. Die geringe Neigung des Stilbenmoleküls zur Fragmentierung zeigt sich auch bei den substituierten Stilbenen. So werden meist die Substituenten abgespalten, ehe das Grundgerüst fragmentiert. Dabei tritt immer das Ion der Masse 165 auf, oft ist es von demjenigen der Masse 152 begleitet, das dem Biphenylen zukommt. Ist die Abspaltung der Substituenten energetisch ungünstig, wie z.B. bei Nitro-, Amino-, Hydroxy-, Methoxy-, Methylamino-, Dimethylamino- und Formylamino-Verbindungen, so tritt meist das Molekülion mit der grössten Intensität auf. Wird dagegen

ein Teil des Substituenten leicht abgespalten, wie es bei Benzyloxy-, Acetoxy-, Acetylamino- und Tosylamino-Derivaten der Fall ist, wird meist das zurückbleibende Stilbenion als intensivstes Signal gefunden.

Bei den Nitrostilbenen fällt auf, dass bei den meisten neben der erwarteten Abspaltung der Nitrogruppe (46 ME) oft mit grösserer Intensität der Verlust von $\text{NO}_2 + \text{H}$ (47 ME) gefunden wird. Dies dürfte eine für Nitrostilbene charakteristische Spaltung sein, die hier zum Phenanthren-Kation führen kann; sie wird bei einfachen Nitro-Aromaten nicht gefunden.

Anders als die Stilbene fragmentieren die Bibenzyle sehr leicht. Sie brechen in der Mitte zwischen den Methylengruppen auseinander. Bei den substituierten Verbindungen erhält dabei durchweg der den Stickstoff tragende Teil die positive Ladung und bedingt das intensivste Signal im Spektrum, wenn der Substituent nicht selbst noch zu Fragmentierungen Anlass gibt. Das Molekülion kommt meist nur mit geringer Intensität vor.

Kernresonanz-Spektren*

Wie in neuerer Zeit vor allem von Güsten u. Salzwedel³⁴ gezeigt wurde, wird die Lage der Signale der olefinischen Protonen bei Stilbenen durch Substituenten beeinflusst. Substituenten in 4-Stellung wirken dabei wesentlich stärker als in 3-Stellung, und vor allem auf das entferntere (β)-Proton. Der Zusammenhang zwischen π -Elektronendichte am Ort der olefinischen Protonen und der chemischen Verschiebung ergibt sich aus der linearen Abhängigkeit der letzteren von der HAMMETT'schen Konstanten bzw. der TAFT'schen Kombination und wurde inzwischen durch HMO-Berechnungen bestätigt.³⁵ Daraus wurde geschlossen, dass für die Veränderungen der chemischen Verschiebung der olefinischen Protonen vor allem der mesomere Effekt der Substituenten verantwortlich ist.

Die von uns gemessenen Werte bestätigen, dass bei den in 4-Stellung monosubstituierten *trans*-Stilbenen der Substituent eine gleichgerichtete Lageverschiebung der aromatischen ortho-Protonen und des entfernteren olefinischen Protons bewirkt.

In Abb 1 wurden die ppm-Werte für die α -Protonen von paradisubstituierten *trans*-Stilbenen, bei denen der Substituent S konstant bleibt ($-\text{NO}_2$ bzw. $-\text{NH}_2$), gegen die ppm-Werte der ortho-Protonen des variablen Substituenten X aufgetragen. Dabei wird für jede der beiden Substanzgruppen (Nitro- bzw. Aminostilbene) wie für die monosubstituierten Stilbene ein etwa linearer Zusammenhang gefunden. Es zeigt sich aber auch, dass die α -Protonen der Nitrostilbene bei tieferem Feld als die der Aminostilbene liegen. Daraus folgt, dass die Elektronendichte an α -H auch von S deutlich beeinflusst wird. Durch S wird ein Grundwert festgelegt, zu dem sich der durch X bestimmte Wert addiert.

IR-Spektren

Die Nitro-Gruppe gibt im Infrarot-Spektrum Anlass zu einer symmetrischen und einer asymmetrischen N-O-Valenzschwingungsbande, die aufgrund ihrer Lage und Intensität meist gut zugeordnet werden können. Für aromatische Nitroverbindungen wird als Lage für die asymmetrische $1527 \pm 16 \text{ cm}^{-1}$, für die der symmetrischen Schwingung $1348 \pm 11 \text{ cm}^{-1}$ angegeben.³⁶ Die Lage der kürzerwelligen Bande wird

* Die gemessenen und zugeordneten Daten sind in der Dissertation Metzler niedergelegt.

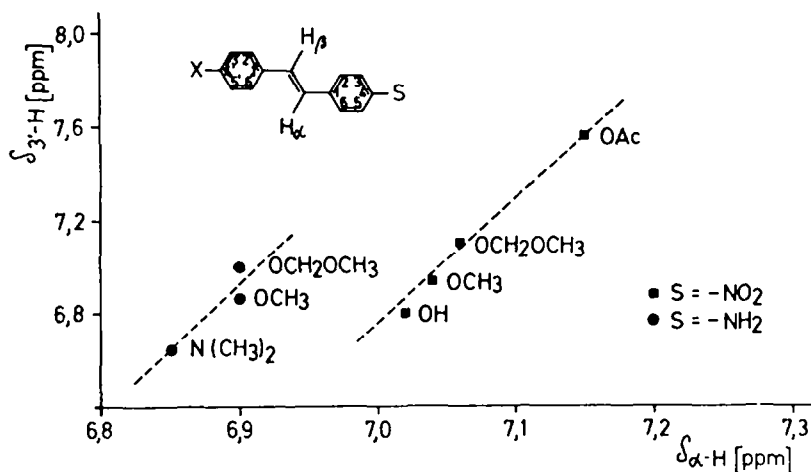


ABB 1. Chemische Verschiebung der 3'-Protonen gegen die chemische Verschiebung der olefinischen α -Protonen bei 4'-substituierten *trans*-4-Nitro-stilbenen bzw. *trans*-4-Amino-stilbenen.

durch weitere Substituenten am aromatischen System derart beeinflusst, dass elektronenliefernde Gruppen nach kleineren Wellenzahlen verschieben. Die längerwellige Bande wird weniger stark beeinflusst, nimmt aber bei zunehmender Konjugation in der Intensität zu.

Es ist bemerkenswert, dass bei den Nitrostilbenen, werden sie als Derivate von Nitrobenzol aufgefasst, der *para*-Styryl-Rest auf die Nitrogruppe wie ein stark elektronenliefernder Substituent wirkt, denn die asymmetrische N-O-Valenzschwingung von *trans*-4-Nitrostilben liegt so langwellig wie diejenige von *p*-Dimethylamino-nitrobenzol (s. Tabelle 5).

Substituenten 1. Ordnung in 4'-Stellung bewirken keine oder nur eine geringe zusätzliche Erniedrigung der Wellenzahl für die asymmetrische Schwingung. Die symmetrische Schwingung wird von 1340 cm^{-1} bei Nitrostilben bis nach 1327 cm^{-1} in der 4'-Dimethylamino-Verbindung verschoben.

Demgegenüber scheint der *p*-Styryl-Rest die Elektronendichte am Stickstoff in den Verbindungen, die in Tabelle 6 zusammengestellt sind, praktisch nicht zu beeinflussen. Jedenfalls liegen die C=O-Valenzschwingungsbanden der Carbonylgruppen in den entsprechenden Verbindungen der Stilben- und der Bibenzyl-Reihe gleich. Sie werden innerhalb jeder Reihe, aber sehr wohl, je nach der Art des dritten Liganden am Stickstoff verschoben.

Betrachtungen dieser Art interessieren im Hinblick auf die unterschiedliche carcinogene und toxische Wirkung der beiden Acetoxy-acetamine.² Sie wurde mit der unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit der N-O-Bindung in Zusammenhang gebracht. Für das Stilben wurde eine höhere Reaktionsfähigkeit als im Einklang damit stehend angesehen, dass der *p*-Styryl-Rest als Substituent 2. Ordnung die Elektronendichte am Stickstoff erniedrigt. Die dargelegten Beobachtungen zeigen die Problematik solcher Betrachtungen. In den Nitrostilbenen wirkt der *p*-Styryl-Rest wie ein Substituent 1. Ordnung, und der erwartete Einfluss des Substituenten

auf die Elektronendichte am Stickstoff bei den Amin-Derivaten lässt sich zumindest aus der Lage der Carbonylbande nicht ablesen. Aufgrund dieser Daten würde kaum auf unterschiedliche Reaktionsfähigkeit der beiden N-Hydroxy oder N-Acetoxy-N-acetyl-Verbindungen geschlossen werden.

TABELLE 5. LAGEN DER ASYMMETRISCHEN UND SYMMETRISCHEN N-O-VALENZSCHWINGUNGSBANDEN IN DEN IR-SPEKTREN EINIGER *p*-DISUBSTITUIERTER BENZOLE UND *trans*-STILBENE

	NO ₂ -asym. cm ⁻¹	NO ₂ -sym. cm ⁻¹
NO ₂ -Phenylen-NO ₂	1560	
-CH ₃	1527	1350
-OH	1522	1357
-N(CH ₃) ₂	1506	1332
NO ₂ -Stilben-H	1508	1340
-OCH ₂ OCH ₃	1510	1358
-OH	1500	1336
-N(CH ₃) ₂	1500	1327

Gaschromatographie der Referenzsubstanzen

Alle in Tabelle 1 aufgeführten Referenzsubstanzen liessen sich gaschromatographieren. Dazu mussten die Verbindungen mit Hydroxylgruppen (Tabelle 1 Gruppe b) in flüchtigere Derivate übergeführt werden. Nach nicht ganz befriedigenden Vorversuchen mit dem Gemisch Trimethylchlorosilan/Hexamethyldisilazan/Pyridin³⁷ und dem sehr reaktiven O,N-Bis(trimethylsilyl)acetamid³⁸ wurde das von Birkhofer *et al*³⁹ eingeführte N-Trimethylsilylacetamid (TMSA) verwendet. Es reagierte mit den phenolischen Substanzen in Acetonitril bei Raumtemperatur zu einheitlichen Stoffen.* Die dabei erhaltenen klaren Lösungen wurden direkt aufgegeben (zur Vollständigkeit der Umsetzung s.u.). Von den 5 getesteten stationären Phasen (XE 60, Apiezon L, Se 30, Versamid 900 und Carbowax 20 M) zeigte XE 60 für die zu untersuchenden Substanzen das beste Trennvermögen und wurde für die Standardsäule verwendet. Apiezon L, SE 30 und Versamid trennten weniger gut und wurden bei ergänzenden Kontrollen benutzt. Carbowax 20 hielt ausser den Dimethylamino-, Methylamino- und Amino-Verbindungen alle Substanzen zurück.

In Abb. 2–5 sind die Gaschromatogramme der Bibenzyl-Verbindungen von Tabelle 1 zusammengestellt.

Bei den Stilbenen werden unter geeigneten Bedingungen (s. Versuchsteil) sehr ähnliche Chromatogramme erhalten. Da sich bei Tageslicht immer ein Gleichgewicht zwischen *trans*- und *cis*-Form ausbildet und sich die Isomeren auf allen Säulen durch ihre Retentionszeit unterscheiden, werden die Chromatogramme etwas komplizierter. Die Verdoppelung der Signale nach Lichteinwirkung kann aber für die Identifizierung auch nützlich sein. Beim Arbeiten mit Metallsäulen werden die Stilbene etwas isomerisiert, nicht dagegen bei Glassäulen. Trotzdem wurden Metall-

* Nur 3-Hydroxy-AS lieferte nach Umsetzen mit TMSA zwei Signale im Gaschromatogramm.

säulen bevorzugt, weil sich bei Glassäulen sehr schnell teeriges Material am Säulenfang abschied und damit auch die Trennleistung nachliess. Für die quantitative Bestimmung wurde immer mit der Summe von *cis*- und *trans*-Signal gerechnet.

TABELLE 6. LAGE DER CARBONYLBANDEN IN DEN IR-SPEKTREN EINIGER 4-AMINOBIBENZYL- UND EINIGER TRANS-4-AMINOSTILBEN-DERIVATE

	R = Bibenzyl Carbonylbande	cm ⁻¹	R = Stilben Carbonylbande	cm ⁻¹
$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{H} \end{array}$	1695		1697	
$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1665		1665	
$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$	1720	1695	1720	1698
$\begin{array}{c} \text{H} \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$		1659		1662
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$		1655		1668
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$		1646		1645, 1625
$\begin{array}{c} \text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3 \\ / \\ \text{R}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$	1794	1690	1788	1690

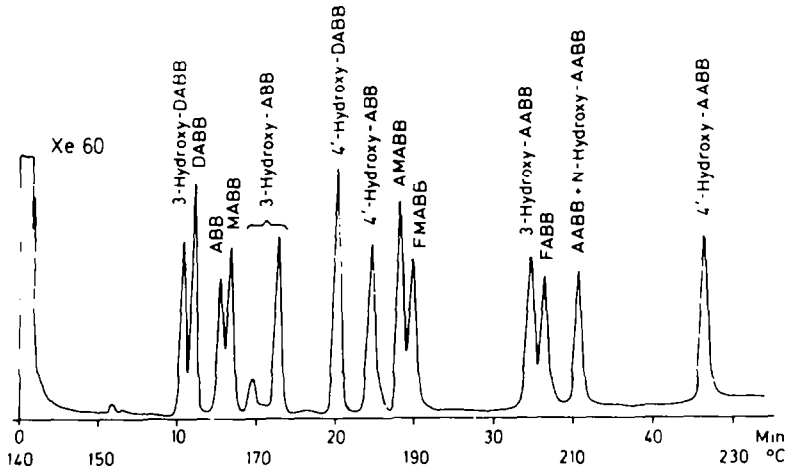


Abb 2. Gaschromatogramm der Bibenzyl-Referenzsubstanzen an Xe 60.

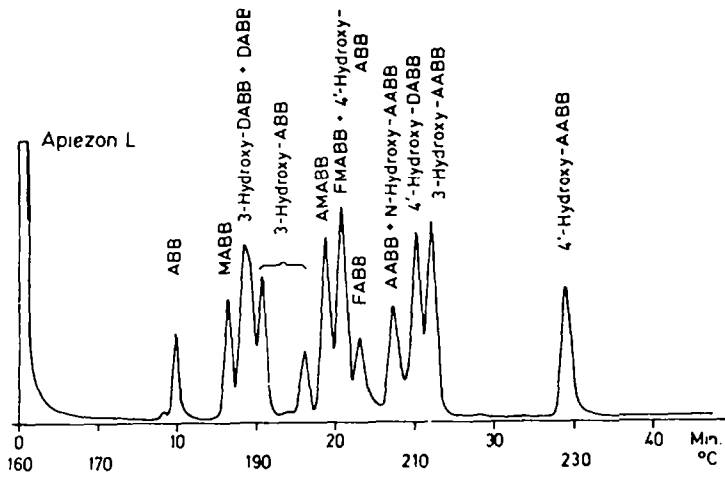


Abb 3. Gaschromatogram der Bibenzyl-Referenzsubstanzen an Apiezon L.

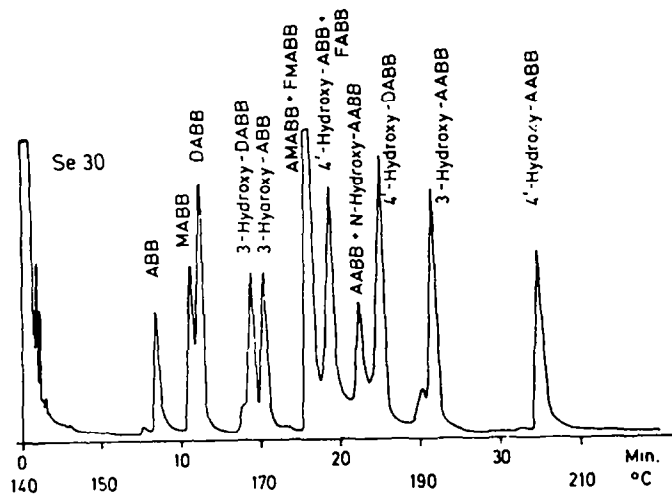


Abb 4. Gaschromatogramm der Bibenzyl-Referenzsubstanzen an Se 30.

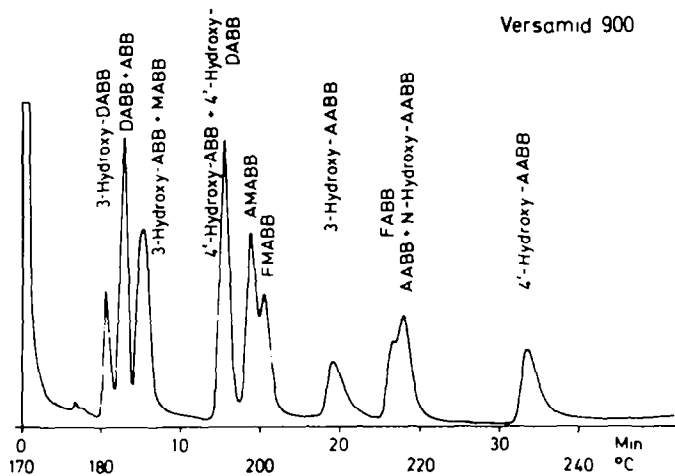


Abb 5. Gaschromatogramm der Bibenzyl-Referenzsubstanzen am Versamid 900.

Bei der Standardsäule mit XE 60 unterscheiden sich die Retentionszeiten von *trans*-DAS, *trans*-MAS und *trans*-AS wie auch der entsprechenden Bibenzyle nur um etwa 1 Min. Für eine eindeutige Zuordnung dieser Verbindungen und vor allem eine genaue quantitative Bestimmung mussten auch die anderen Säulen herangezogen werden, bei denen sich ausser der Retentionszeit auch die Reihenfolge ändert.

Beim Gaschromatographieren der N-Hydroxy-acetylamine und N-Acetoxy-N-acetylamine wurden nur die Signale der entsprechenden Acetylamine gefunden, was auf einen thermischen Zerfall im Injektor zurückzuführen sein dürfte (auch im Massenspektrum der N-Hydroxyl-N-acetylamine tritt ein Signal M-16 auf). Bei Verwendung einer Glassäule und eines Glaseinsatzes im Injektor war diese Zersetzung lediglich weniger vollständig. Es wurden 4 Signale mit nicht reproduzierbaren Intensitäten gefunden, darunter hauptsächlich wieder dasjenige des Acetylamins. Praktisch ist der Nachteil dieser Zersetzung aber nicht allzu gross, da aufgrund der Vortrennung der löslichen Metaboliten durch Chromatographieren an Aluminiumoxyd⁴⁰ N-Hydroxy-AAS nur in Fraktionen enthalten sein konnte, die kein AAS enthielten, so dass bei diesen ein AAS-Signal von N-Hydroxy-AAS stammen musste. Unverändertes N-Acetoxy-AAS wäre allerdings zusammen mit AAS erfasst worden.

Radiogaschromatographie

Für die Analyse der radioaktiv markierten Substanzen wurde der Gasstrom vor dem Detektor des Gaschromatographen im Verhältnis 9:1 geteilt und die Hauptmenge in den Radiogaschromatographen (RGC 170 der Fa. Berthold/Frieseke) geleitet. Die Zählzelle für Tritium lag unter den angewendeten Bedingungen (s. Versuchsteil) etwas unter 10%. Bei einer spezifischen Aktivität von 1 mC/mg, wie wir sie für unsere Versuche zunächst verwendeten, ergab sich daraus eine Nachweisgrenze von 10^{-3} µg oder 10^{-4} ‰ einer 1 mg-Dosis/Ratte.

Eine Voraussetzung für die Anwendung der Radiogaschromatographie zur quantitativen Analyse ist bei Verbindungen mit Hydroxylgruppen die vollständige Überführung in Derivate, da die nicht umgesetzten Verbindungen die Gaschromatographiesäule nicht passieren und damit der Bestimmung entgehen. Bei 2 Verbindungen, nämlich 3-Hydroxy-AAS und 4'-Hydroxy-AAS, wurde die Vollständigkeit der Umsetzung mit TMSA mit Hilfe der markierten Substanzen geprüft. Dazu wurden gleiche Teile des Trimethylsilylierungsansatzes einmal direkt in den Durchflussreaktor und einmal in den Gaschromatographen injiziert, ohne etwas für den Detektor abzuzweigen, und die erhaltenen Integrationsstufen im Radiogaschromatogramm miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei zu kleinen Substanzmengen (10^{-1} – 10^{-3} µg) nur 60–80% der Radioaktivität über die Säule kamen. Nach Zusatz von nichtmarkiertem Carrier erschien beim 3-Hydroxy-AAS 100%, beim 4'-Hydroxy-AAS 86% der eingespritzten Aktivität im Radiogaschromatogramm. Damit war die Vollständigkeit der Derivatisierung, aber auch die Notwendigkeit für den Zusatz nichtmarkierter Substanz als Carrier erwiesen.

Bei der Analyse von biologischem Material ist Zusetzen von Carrier besonders wichtig, weil die nicht interessierenden Begleitsubstanzen mengenmässig weit überwiegen. Im Gaschromatogramm sind die Signale der gesuchten Verbindungen ohne Carrier häufig überhaupt nicht zu erkennen. Ausserdem macht der Carrier die Signale schärfer und erleichtert dadurch Zuordnung und quantitative Bestimmung im Radiogaschromatogramm.

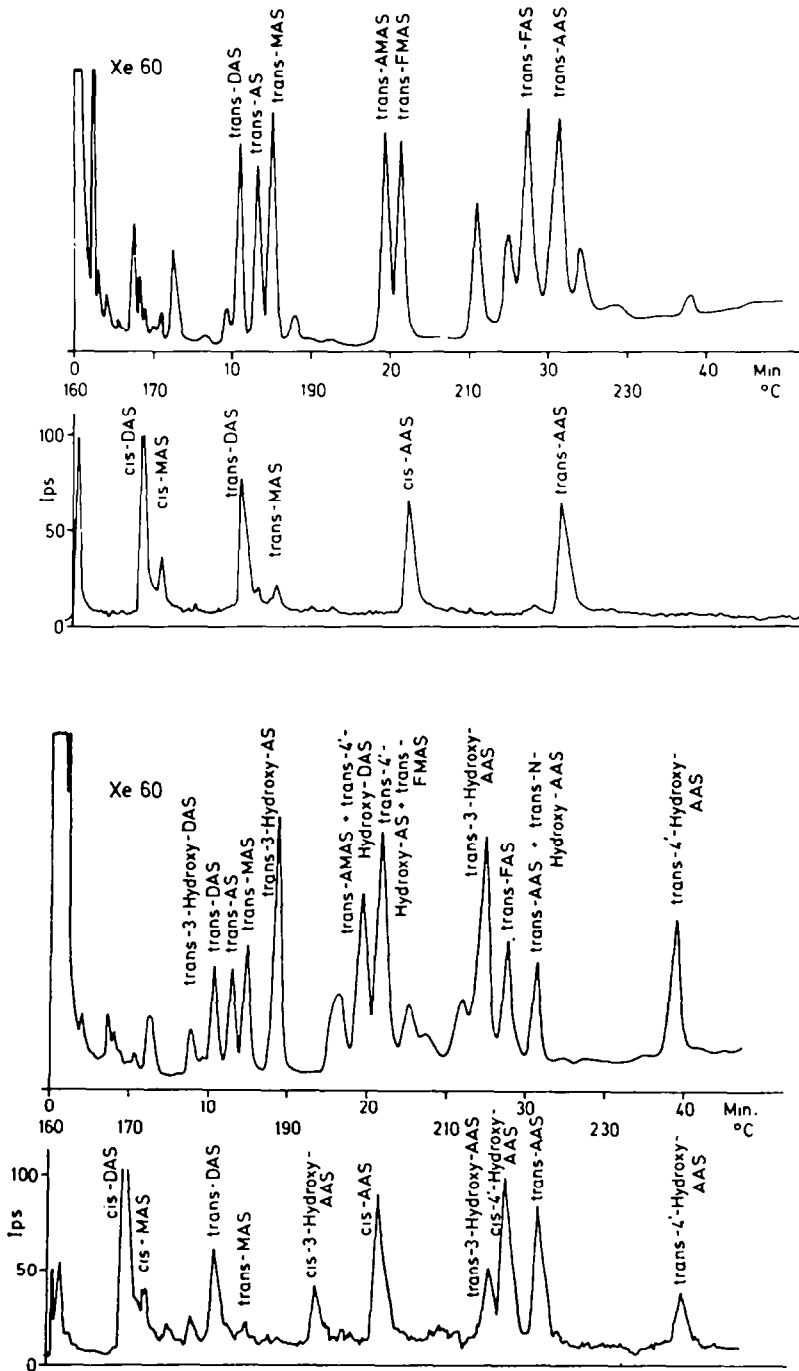


Abb 6. Gaschromatogramm und Radiogaschromatogramm der unkonjugierten Metaboliten aus Rattenfaeces. 24 Std nach Verfüttern von 1-2 mg *trans*-DAS vor (oben) und nach (unten) Umsetzen mit TMSA.

Als Beispiel für die Anwendung der Methode sind in Abb. 6 die Chromatogramme der unkonjugierten Metaboliten aus Rattenfaeces, 24 Std nach Verfütterung von 1.2 mg *trans*-DAS wiedergegeben. Der getrocknete Rückstand eines Teiles der diese Fraktion enthaltenden Lösung⁴⁰ wurde in 100 µl Benzol gelöst—bei anderen Fraktionen wurde häufig Acetonitril verwendet—und das Gemisch mit 40 µl einer Lösung der direkt gaschromatographierbaren Referenzsubstanzen (Tab. 1, Gruppe a, 0.1 mMol/ml) in Acetonitril versetzt. Im Gaschromatogramm einer Probe davon an XE 60 sind die Signale der 7 zugesetzten *trans*-Stilbene aufgrund eines Gaschromatogramms der Lösung der reinen Referenzsubstanzen gut zuzuordnen. Die Signale der *cis*-Isomeren sind kaum zu sehen, da es sich um eine frisch zubereitete Lösung der *trans*-Verbindungen handelte. Im Radiogaschromatogramm sind einige ungeschützt gaschromatographierbarer Metaboliten enthalten und auch zu identifizieren.

Darauf wurde das Lösungsmittel abdestilliert und zum Rückstand ein Gemisch der Referenzsubstanzen der Gruppe b (Tabelle 1) in 100 µl mit TMSA gesättigtem Acetonitril gegeben. Nach erfolgter Umsetzung (über Nacht bei Raumtemperatur) treten nunmehr im Gaschromatogramm zusätzlich die Signale aller geschützten Referenzsubstanzen, im Radiogaschromatogramm einige ihnen entsprechender, markierter Metaboliten auf.

Die Summe der Integrationsstufen für die Signale der markierten Verbindungen entspricht unter Berücksichtigung des durch die Aufteilung des Gasstroms bedingten Splittingverhältnisses (täglich mit HTO bestimmt) der gaschromatographierbaren Radioaktivität des injizierten Probenvolumens. Das gleiche Volumen in den Direktinlass des Radiogaschromatographen injiziert ergibt eine Integrationsstufe, die der gesamten Radioaktivität dieses Probenvolumens zukommt. Die nicht gaschromatographierbare Radioaktivität folgt aus der Differenz. Sie ist hauptsächlich auf polare Metaboliten zurückzuführen, die selbst nach Umsetzung mit TMSA nicht flüchtig genug sind. Sie kann aber auch durch Zersetzung im Injektor oder auf der Säule, oder durch unvollständige Derivatisierung bedingt sein.

Vor allem zur Kontrolle dieser polaren Radioaktivität wurde als Ergänzung der Radiogaschromatographie die Radiodünnschichtchromatographie eingesetzt.

Radiodünnschichtchromatographie

War alle Radioaktivität gaschromatographierbar, wurde im Dünnschichtchromatogramm keine Aktivität am Start gefunden. Nicht gaschromatographierbare "polare" Aktivität stimmte im allgemeinen recht gut mit der Startaktivität im entsprechenden Radiodünnschichtchromatogramm überein. Dies spricht einerseits wieder für die Vollständigkeit der Trimethylsilylierung, andererseits für die Existenz polarer Metaboliten.

Da der dünnschichtenchromatographische Nachweis von N-Hydroxy-Verbindungen durch Schwanzbilden erschwert ist, wurde versucht, die Fähigkeit dieser Substanzen zur Bildung von Metallkomplexen auszunützen. Das gelang nicht sehr gut mit Kupfersulfat-impregnierten Platten. Wird die Startzone jedoch dreimal mit einer äthanolischen Kobalt-(II)-acetat-Lösung getränkt, bleibt N-Hydroxy-AAS beim Entwickeln mit Essigester oder Aceton am Start zurück, während alle anderen Substanzen nicht beeinflusst werden. Zur Unterscheidung von den "polaren" Metaboliten kann die Platte anschliessend mit Chloroform:Essigester:Eisessig

6:3:1 entwickelt werden. Darin wandert dann auch N-Hydroxy-AAS. N-Hydroxy-AABB bleibt unter den genannten Bedingungen nicht am Start zurück. Die R_f -Werte in den drei Laufmitteln, die für alle Referenzsubstanzen getestet worden sind, sind in Tabelle 2 und 3 angegeben (Bedingungen s. Versuchssteil).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die UV-Spektren wurden gemessen mit dem selbstregistrierenden BECKMAN-Spektrophotometer DK 2, die IR-Spektren mit dem selbstregistrierenden PERKIN-ELMER Spektralphotometer 225 (als Kaliumjodid-Presslinge), die Kernresonanz-Spektren mit dem NMR-Spektrometer VARIAN A 60 bzw. HA 100 (ppm-Werte auf Tetramethylsilan = O als innerer Standard bezogen), die Massenspektren mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer SM 1 der Firma VARIAN-MAT (Elektroneneinflussenergie 70 eV) aufgenommen. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Stickstoffanalysen (nur für die erstmals dargestellten Substanzen) wurden vom Mikroanalytischen Labor des Max-Planck-Instituts für Eiweiß- und Lederforschung in München angefertigt.

Synthese der Referenzsubstanzen

(A) *Kondensation von p-Nitrophenylessigsäure mit dem entsprechend substituierten Benzaldehyd unter Piperidin-Katalyse.*^{20, 41}

(B) *Reduktion der Nitrogruppe.* 0,5–2 mMol der Nitroverbindung wurden in Äthanol oder Essigester suspendiert und das Gemisch nach Zusatz einer Spatel-pitze Raney-Nickels und eines 20fachen Überschusses an Hydrazinhydrat bei Raumtemperatur oder im Eisbad solange gerührt, bis sich dünn-schichtchromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachweisen liess (10–90 Min.). Dann wurde vom Katalysator abfiltriert und der Rückstand der Lösung umkristallisiert. Dabei wurden auch die gelegentlich durch Reduktion der Doppelbindung als Nebenprodukt auftretenden Bibenzyl-Verbindungen abgetrennt.

(C) *Formylieren.* Eine Lösung von 1 mMol des Amins in 15 ml Benzol und 4 ml Ameisensäure wurde langsam am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde nach Abdestillieren der Ameisensäure dünn-schichtchromatographisch geprüft. Falls nötig, wurden nochmals 4 ml Ameisensäure zugesetzt und der Vorgang bis zur quantitativen Umsetzung wiederholt.

(D) *Acetylieren.* Sämtliche Acetylierungen wurden durch halbstündiges Erhitzen mit Acetanhydrid: Pyridin 3:1 durchgeführt. Nach Einengen des Reaktionsgemisches am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand umkristallisiert.

(E) *Methylieren.* 1 mMol des Amins wurde mit 0,5 mMol trockener Soda und 10 mMol (0,7 ml) Methyljodid in 10 ml Methanol unter Stickstoff im Einschussrohr 1 Std. auf 100° erhitzt. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand 5 Min. mit 4 ml Äthanolamin unter Stickstoff zum Sieden erhitzt. Nach Versetzen mit 50 ml Wasser wurde mehrfach mit 50 ml Benzol ausgeschüttelt und die vereinigten benzolischen Lösungen mit Wasser gewaschen. Der Rückstand der Lösungen wurde mit Benzol an Kieselgel chromatographiert.

(F) *Hydrieren.* Die Hydrierungen wurden bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck mit 5% Palladium auf Kohle als Katalysator in Äthanol durchgeführt.

Zur Darstellung von **36** und **48** aus den Nitro-Vorstufen wurde dem Ansatz Essigsäureanhydrid und etwas Triäthylamin zugefügt.

(G) 10 mMol des Natriumsalzes von **14** wurden in 100 ml absolutem Benzol mit 0,83 ml frisch destilliertem α -Chlordimethyläther (Org.Synth.Vol.I, S.377) 30 Min. zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsprodukt ging dabei in Lösung. Nach Filtrieren wurde der Rückstand noch einmal mit der gleichen Menge des Reagens umgesetzt. Der Rückstand der vereinigten Filtrate wurde in Äther gelöst, die Lösung 4mal mit 5 proz. KOH und 2 mal mit Wasser ausgeschüttelt.

(H) 1 mMol **20** wurde in 8 ml trockenem Pyridin 18 Std unter Lichtausschluss mit 4 mMol Pyridinsulfat⁴² gerührt. Nach Abdestillieren des Pyridins i.Vak., Suspendieren des Rückstandes in Wasser, Neutralisieren mit Natriumhydrogencarbonat und zweimaligem Ausschütteln der Lösung mit Äther wurde die wässrige Phase mit 2 n NaOH alkalisch gemacht und 4mal mit je 50 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, der Rückstand umkristallisiert.

(J) Zur Darstellung von **22** wurden äquimolare Mengen von trockenem Natriumphenylacetat und 3-Hydroxy-4-nitrobenzaldehyd⁴³ 5 Std in Acetanhydrid unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Zerset-

zen mit der 5fachen Menge Wasser wurde die Fällung in 1 n NaOH gelöst und die Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Darauf wurde mit konz. Salzsäure gefällt.

10 mMol der Säure **22** wurden in 60 ml Chinolin mit 1 g Kupferchromit (Org. Synth. II, S.142) 1 Std auf 220° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde darauf in 400 ml 1 n Salzsäure gegeben. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit Äther wurden die vereinigten Lösungen eingeeengt und der Rückstand an Kieselgel mit Petroläther: Benzol 1:1 chromatographiert.

5 mMol von dabei erhaltenem *cis*-**23** wurden zur Isomerisierung in 30 ml Nitrobenzol mit katalytischen Mengen Jod 1 Std zum Sieden erhitzt. Nitrobenzol wurde durch Wasserdampfdestillation entfernt und der Rückstand an Kieselgel wie oben chromatographiert.

5 mMol *trans*-**24** wurden darauf in 50 ml Dimethylsulfoxyd mit 50 mMol wasserfreiem Kaliumcarbonat und 100 mMol Benzylbromid 3 Std bei Raumtemp. geschüttelt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels, Aufnehmen des Rückstandes in Äther, Waschen der Lösung mit 10%iger Kalilauge und Wasser wurde **25** durch Umkristallisieren des Rückstandes der organischen Phase erhalten. *trans*-3-Hydroxy-4-dimethylaminostilben liess sich daraus durch Erhitzen mit konz. Salzsäure unter Stickstoff (15 Min. Rückfluss) gewinnen. Die ziemlich luftempfindliche Substanz wurde nach Übersichten des Rückstandes mit Äther. Lösen in Wasser und Neutralisieren mit Bicarbonat durch mehrfache Ätherextraktion erhalten.

(K) Verbindung **31** wurde aus der peracetylierten Verbindung **20** durch Rühren einer Essigester-Lösung mit halbkonz. Ammoniak gewonnen. Die Verbindung wurde zur Reinigung aus einem alkalischen Extrakt mit Säure gefällt.

(L) 1 mMol **42** wurde unter Erwärmen in 0.6 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Nach Abkühlen auf 0° wurde das Gemisch mit einer Lösung von 1 mMol Natriumnitrit tropfenweise unter Kühlen versetzt. Gegen Ende der Reaktion wurde die Lösung leicht gelb. Nach Verkochen auf dem Wasserbad schieden sich beim Abkühlen und noch vermehrt beim Neutralisieren mit Natronlauge Kristalle ab, die sich in Äther lösten. Nach Trocknen und Einengen der ätherischen Phase lieferte der Rückstand beim Umkristallisieren aus Cyclohexan unter Zusatz von Aktivkohle reinweisses **43**.

Tritium-markierte Substanzen

3-Hydroxy-4-(³H)-acetylaminostilben. 5.1 mg *trans*-**29** wurden in einem Zentrifugenglas mit 30 µl ³H-Acetanhydrid (0.50 mC/mg, New England Nuclear Corporation) und 40 µl frisch über KOH dest. Pyridin versetzt, wobei sich das Amin in wenigen Min. löste. Nach 17 Std im Kühlschrank wurden 0.5 ml Wasser zugesetzt, 20 Min. mit einem kleinen Rührmagneten gerührt, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Rückstand wurde mit 1 ml Wasser kurz durchgerührt, zentrifugiert, nach Abpipettieren der flüssigen Phase mit 2 ml 2 n KOH und 2 ml Äther versetzt und bis zur völligen Lösung gerührt. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit 2 ml Äther gewaschen, nach Entfernen der Ätherreste mit Stickstoff mit 3 ml Methylenchlorid unterschichtet und unter kräftigem Rühren mit 10%iger Salzsäure tropfenweise neutralisiert. Die wässrige Schicht wurde verworfen, die organische nochmals mit 2 ml Wasser gewaschen, mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet und über 1 g Aluminiumoxyd (Woelm, Akt I, basisch) filtriert. Nachgewaschen wurde mit 2 ml Methylenchlorid, eluiert mit 10 ml Äthanol. Ausbeute 45% d.Theorie.

Zur Darstellung von 4'-Hydroxy-4-(³H)-acetylaminostilben wurden 3.2 mg *trans*-**19** unter Rühren in 100 µl trockenem Pyridin gelöst. Bei Zusatz von 20 µl ³H-Acetanhydrid fiel nach wenigen Min. ein weisser Niederschlag aus. Nach 15 Std im Kühlschrank wurde wie oben aufgearbeitet. Allerdings ist das Kaliumsalz in Wasser schwer löslich und erscheint als kristalliner Niederschlag, was die Aufarbeitung aber nicht stört. Wegen der schlechteren Löslichkeit von 4'-Hydroxy-AAS in Methylenchlorid wurden davon beim Neutralisieren 5 ml, beim Nachwaschen 3 ml verwendet. Ausbeute 36% d.Th.

Als Ausgangsverbindung für N-Hydroxy-4-(³H)-acetylaminostilben diente N-Hydroxy-4-aminostilben. Bei der Reduktion von *trans*-4-Nitrostilben³ wurde ein Gemisch erhalten, das neben dem gewünschten Produkt noch etwas Nitro- und vor allem Aminostilben enthielt. 34 mg dieses Gemisches wurden mit 50 µl ³H-Acetanhydrid und 150 µl trockenem Pyridin 30 Min. gerührt. Nach 16 Std im Kühlschrank wurden unter Rühren 1 ml Wasser und nach 10 Min. 4 ml 2 n KOH und 5 ml Methylenchlorid zugesetzt. Die wässrige Phase wurde noch 2mal mit je 5 ml Methylenchlorid, dann 3mal mit je 5 ml Äther extrahiert und nach Filtrieren mit 20%iger Salzsäure auf p_H3 angesäuert. Der ausfallende reinweisse Niederschlag wurde abzentrifugiert, 3mal mit Wasser gewaschen und ergab nach kurzem Trocknen mit stickstoffgespültem Äthanol eine klare und farblose Lösung. Ausbeute 7% d.Th.

Der Rückstand der vereinigten Methylenchlorid- und Ätherextrakte wurde zur Abrennung von N-

Hydroxy-AAS-Resten in Äthanol gelöst über 30 g Aluminiumoxyd (Woelm, Akt.I. neutral) filtriert. Anschliessende Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform ergab 4-(³H)-Acetylaminostilben. Ausbeute 8% d.Th.

Aus dem markierten N-Hydroxy-AAS war durch Acetylieren mit Acetanhydrid/Pyridin N-Acetoxy-N-(³H)-acetylaminostilben zugänglich.

Die dargestellten markierten Verbindungen waren alle dünn-schichtchromatographisch und radio-gaschromatographisch rein.

Gaschromatographie. Es wurde der Gaschromatograph Modell 1200 der Firma VARIAN mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Injektortemperatur 250°, Detektortemperatur 300°, Trägergas Helium, 30 ml/Min., stainless steel Säulen, 5 ft, $\frac{1}{8}$ in, Trägermaterial Chromosorb W A/W DMCS-treated, 60/80 mesh mit 5%, der-stationären Phase belegt (VARIAN Aerograph).

Stationäre Phasen und Temperaturprogramm

	Stilbene	Bibenzyle
XE 60	160-260°, 2°/Min.	140-260°, 2°/Min.
Apiezon L	180-300°, 2°/Min.	160-300°, 2°/Min.
Se 30	160-250°, 2°/Min.	140-250°, 2°/Min.
Versamid 900	190-300°, 2°/Min.	170-300°, 2°/Min.
Carbowax 20 M	240° isotherm	210° isotherm

Radiogaschromatographie. Durchflussreaktor Modell RGC 170 der Firma BERTHOLD mit 10 ml Proportionaldurchflusszählrohr, Doppellinienschreiber und Elektronik, Messplatz der Firma Berthold. Temperaturen: Verbindung zum Gaschromatographen 300°, Einlassrohr 400°, Reaktorofen 600°, Zählrohr 200°. Methan und Wasserstoff wurden mit 25 ml/Min. eingespeist. Als Katalysator für die hydrierende Crackung wurden 10 Gewichtsteile des Fe-Ni-Mischkatalysators (Perkin Elmer) mit 1 Gewichtsteil Chromosorb G vermischt verwendet.

Dünn-schichtchromatographie. Die in den Tabellen angegebenen R_f -Werte wurden unter den von Stahl⁴⁴ empfohlenen Standardbedingungen ermittelt: Glasplatten (20 x 20 cm) wurden mit Kieselgel H der Firma MERCK unter Zusatz von 1% Leuchtstoff Super (Riedel De Haen) beschichtet (0.25 mm, nass), 3 Std an der Luft vorgetrocknet, 45 Min. bei 110° aktiviert und über Blaugel aufbewahrt. Die Substanzen wurden in 15 mm breiten Streifen aufgetragen und die Platten unter Kammer-sättigung entwickelt. Lauf-richtung und Streichrichtung waren identisch. Ausser durch Fluoreszenzlöschung und Eigenfluoreszenz wurden die Substanzen durch Anfärben sichtbar gemacht:

FeCl₃/K₃Fe(CN)₆: Blaufärbung von Phenolen und Aminen;

HNO₂/α-Naphthol: Rotfärbung von primären arom Aminen;

FeCl₃: Rotfärbung von Hydroxamsäuren.

2,6-Dibromchinonchlorimid: Blaufärbung der 3-Hydroxy-Verbindungen.

Dünn-schichtchromatogramme von radioaktiven Substanzen wurden mit dem Dünn-schichtscanner der Firma Berthold ausgewertet.

Herrn Professor Dr. H. Dannenberg möchten wir für die kritische Unterstützung der Arbeit danken, den Herren Dr. W. Schäfer, Dr. J. Sonnenbichler und Dr. H. J. Gross für die Diskussion der Massen-, NMR- und UV-Spektren. Aufgenommen wurden die Spektren von den Damen J. Bürger, I. Köhler, G. Schild, E. Seifert und L. Nölle. Für die Auswertung der NMR-Spektren sind wir Fr. G. Schild besonders dankbar.

Dr. Hans-Günter Neumann

jetzt: Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Universität Würzburg
87 Würzburg, Koellikerstrasse 2

LITERATUR

- ¹ J. A. Miller and E. C. Miller, *Progr. exp. Tumor Res.* **11**, 273 (1969)
- ² H.-G. Neumann, M. Metzler, J. Brachmann and C. Thomas, *Z. Krebsforsch.* **74**, 200 (1970)
- ³ R. A. Andersen, M. Enomoto, E. C. Miller and J. A. Miller, *Canc. Res.* **24**, 128 (1964)
- ⁴ R. W. Baldwin and W. R. D. Smith, *Brit. J. Canc.* **19**, 433 (1965)
- ⁵ R. W. Baldwin and M. G. Romeril, *Ibid.* **23**, 536 (1969)
- ⁶ K. Sato, L. A. Poirier, J. A. Miller and E. C. Miller, *Canc. Res.* **26**, 1678 (1966)
- ⁷ M. Watanabe and M. Ishidate, *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1461 (1967)
- ⁸ M. Ishidate, M. Watanabe and S. Odashima, *Gann* **58**, 267 (1967)
- ⁹ E. Boyland and D. Manson, *Biochem. J.* **101**, 84 (1966)
- ¹⁰ G. T. Davis and D. R. Rosenblatt, *Tetrahedron Letters* 4085 (1968)
- ¹¹ H.-G. Neumann, Unveröffentlicht
- ¹² O. H. Wheeler and H. N. Batle de Pabon, *J. org. Chem.* **30**, 1473 (1965)
- ¹³ L. F. Fieser and M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Wiley, New York (1967)
- ¹⁴ M. Metzler, Dissertation Universität München (1970)
- ¹⁵ A. Haddow, R. J. C. Harris, G. A. R. Kohn and E. M. F. Roe, *Phil Trans. Roy. Soc. S.B.* **241**, 147 (1948)
- ¹⁶ H. D. Scharf, *Fortschritte chem. Forsch.* **11**, 216 (1968)
- ¹⁷ G. S. Hammond, J. Saitli, A. A. Lamola, N. J. Turro, J. S. Bradshaw, D. C. Cowan, R. C. Counsell, V. Vogt and C. Dalton, *J. Am. Soc.* **86**, 3197 (1964)
- ¹⁸ M. Syz and H. Zollinger, *Helv. Chim. Acta* **48**, 517 (1965)
- ¹⁹ F. Sachs and L. Sachs, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **38**, 511 (1905)
- ²⁰ P. Pfeiffer and S. Sergiewskaja, *Ibid.* **44**, 1109 (1911)
- ²¹ G. Drefahl and J. Ulbricht, *Liebigs Ann.* **598**, 174 (1956)
- ²² E. N. Morgan, P. J. Palmer, L. Kruszynaka and W. R. N. Williamson, *J. Chem. Soc.* 3887 (1965)
- ²³ A. Masserani, *Farmaco, Patia Ed. Sci.* **12** 380 (1957)
- ²⁴ P. Pfeiffer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **48**, 1777 (1916)
- ²⁵ J. Cullinane, *J. Chem. Soc.* 2055 (1923)
- ²⁶ H.-G. Neumann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 313 (1967)
- ²⁷ R. N. Beale and E. M. F. Roe, *J. Chem. Soc.* 2755 (1953)
- ²⁸ L. Doub and J. M. Vandenbelt, *J. Am. Soc.* **69**, 2714 (1947)
- ²⁹ E. Clar, *Polycyclic Hydrocarbons* Academic Press, London u. New York und Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964)
- ³⁰ C. N. R. Rao, *Chem. Ind.* 1239 (1957)
- ³¹ R. W. Taft, *Steric Effects in Organic Chemistry* (Herausgegeben von M. S. Newman) S. 556 Wiley, New York (1956)
- ³² L. Doub and J. M. Vandenbelt, *J. Am. Soc.* **71**, 2414 (1949)
- ³³ R. W. A. Johnstone and B. J. Millard, *Z. Naturforsch.* **21a**, 604 (1966)
- ³⁴ H. Güsten and M. Salzwedel, *Tetrahedron* **23**, 187 (1967)
- ³⁵ H. Güsten and L. Klasinc, *Tetrahedron Letters* 2923 (1967)
- ³⁶ L. J. Bellamy, *Ultrarot-Spectrum und Chemische Konstitution* (Deutsche Übersetzung von W. Brügel) Steinkopff-Verlag, Darmstadt (1966)
- ³⁷ M. B. Lipsett, *Gaschromatography of Steroids in Biological Fluids* Plenum Press, New York (1965)
- ³⁸ J. F. Klebe, H. Finkbeiner and D. M. White, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3390 (1966)
- ³⁹ L. Birkhofer, A. Ritter and H. Dickopp, *Chem. Ber.* **96**, 1473 (1963)
- ⁴⁰ M. Metzler and H.-G. Neumann, *Z. Krebsforsch.* im Druck
- ⁴¹ D. Jambotkar and R. Ketcham, *J. Org. Chem.* **28**, 2182 (1963)
- ⁴² A. E. Sobel, I. J. Dreker and S. Natelson, *J. Biol. Chem.* **115**, 381 (1936)
- ⁴³ P. Friedländer and O. Schenk, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **47**, 3040 (1914)
- ⁴⁴ E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie 2. Auflage*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)