

4) Die phänomenologische Betrachtungsweise *Darkens* beruht grundsätzlich auf richtigen Überlegungen, insofern sie die wandernde Schweißnahtmarkierung als Bezugs- punkt für die partiellen Diffusionskoeffizienten wählt. Der Zusammenhang zwischen radioaktiv gemessenen partiellen Diffusionskoeffizienten und den aus Markierungsbewegun- gen bestimmten partiellen Diffusionskoeffizienten durch die Gleichung

$$D_i = D_i^* \cdot \left(1 + \frac{\partial \ln f_i}{\partial \ln N_i} \right)$$

wurde experimentell nachgeprüft. Man erhält übereinstimmende Werte, wenn man in einem Konzentrationsintervall arbeitet, bei dem die Volumenänderung innerhalb der Meßfehler liegt.

5) Bei allen von uns untersuchten Systemen mit unterschiedlichen partiellen Diffusionskoeffizienten änderte sich die Gitterebenzahl parallel und senkrecht zur Diffusionsrichtung. Daher muß angenommen werden, daß die bisher üblichen Auswerteverfahren von c-x-Kurven zur Ermittlung der chemischen gemeinsamen Diffusionskoeffizienten und damit auch der partiellen Diffusionskoeffizienten keine exakten Werte liefern können. Die Änderung des Berüh-

rungssquerschnittes der Diffusionskörper macht sich jedoch nur bei Diffusionen mit relativ großen Konzentrationsintervallen bemerkbar.

6) Die beobachtete Lochbildung und der sie verursachende Massefluß machen wahrscheinlich, daß es sich bei Substitutionsmischkristallen im wesentlichen um Fehlstellendiffusion handelt.

7) Das Wandern von Markierungen wurde im System Cu-Zn bei der Diffusion über verschiedene Phasen untersucht. Alle Phasen des Messing-Systems bildeten sich deutlich aus. Die Schweißnaht verlief während der gesamten Diffusionszeit in der ϵ -Phase. Bei einer Temperatur von 395° C bewegten sich in 213 h die Schweißnahtmarkierungen um eine Strecke von 1.3 mm zur zinkreichen Seite der Diffusionsprobe hin. Diese Beobachtung lässt auf einen sehr großen Unterschied der partiellen Diffusionskonstanten des Cu und des Zn in der ϵ -Phase schließen.

Zur Ausführung der Untersuchungen standen uns Apparate der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung. Den Firmen: Deutsche Gold- und Silber-Scheideanstalt (Degussa), Frankfurt/M., und Duisburger Kupferhütte sind wir für Materialien und Hilfeleistung zu Dank verpflichtet.

Eingeg. am 31. März 1952 [A 428]

Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe

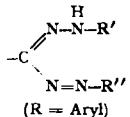
Von Dr. W. RIED, Frankfurt/M.

Organisch-Chemisches Institut der Universität Frankfurt/M.

Durch die grundlegenden Arbeiten von R. Kuhn und D. Jerchel über die Verwendbarkeit der Tetrazoliumsalze als Reduktionsindikatoren für biologische und biochemische Prozesse erlangten die vor über einem halben Jahrhundert von H. v. Pechmann und P. Runge entdeckten Tetrazoliumsalze in den letzten 10 Jahren steigende Bedeutung. Durch phytochemische Reduktion werden die farblosen, wasserlöslichen Tetrazoliumsalze in die tiefgefärbten, luftbeständigen, wasserunlöslichen Formazane übergeführt. Es wird über die Chemie und die Verwendung dieser Verbindungen als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe in Biochemie und Biologie berichtet.

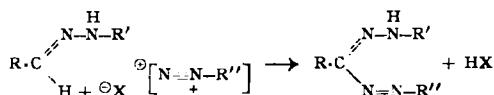
Entdeckung und Synthesen

1892 entdeckten *H. v. Pechmann*¹⁾ und unabhängig von ihm *Eug. Bamberger* und *E. Wheelwright*²⁾ die Formazyl-Verbindungen. Das Charakteristikum dieser Substanzklasse bildet die Atomanordnung, für die *H. v. Pechmann*

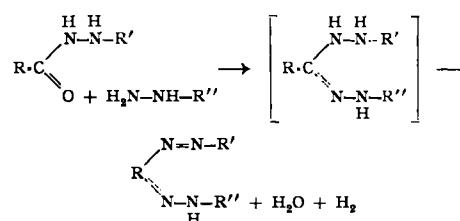


zur Vereinfachung die Bezeichnung „Formazyl-Gruppe“ prägte. Die Formazane stellen gleichzeitig Hydrazone und Azofarbstoffe dar. Sie bilden intensivfarbige, in der Regel rote, gut kristallisierende Substanzen, die in Wasser nur wenig, in organischen Lösungsmitteln dagegen gut löslich sind. Zu ihrer Herstellung sind im wesentlichen drei Verfahren üblich, die bereits von *H. v. Pechmann*³⁾ gefunden wurden.

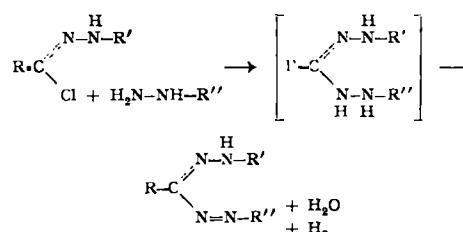
1) Die alkalische Kupplung von Aldehyd-phenylhydrazen mit Diazoniumsalzen führt direkt zu Formazanen.



2) Bei der Umsetzung von Säurephenylhydraziden mit Phenylhydrazin bilden sich über die Stufe der unbeständigen Hydrazidine die Formazane.

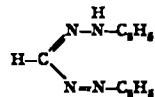


3) Die den Imidchloriden entsprechenden Phenylhydrazidchloride setzen sich mit Phenylhydrazin ebenfalls über die Stufe der Hydrazidine zu den Formazanen um.



Der unter 1) genannte Weg eignet sich am besten zur Darstellung und wird dementsprechend im allgemeinen beschritten.

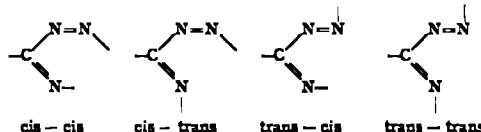
Das einfachste Formazan stellt der gelbe Formazyl-wasserstoff¹⁾ dar; er entsteht bei der alkalischen Kupplung von Malonsäure mit Phenyl-diazonium-acetat.



Durch Variation der Reaktionspartner wurden im Laufe der Zeit eine große Zahl neuer Formazyl-Verbindungen synthetisiert^{2).}

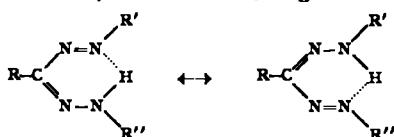
Formazane und Licht

Als Farbstoffe haben die Formazyl-Verbindungen wegen der ungenügenden Lichtechnik keine praktische Bedeutung. In neuester Zeit konnten I. Haussner, D. Jerchel und R. Kuhn³⁾ zeigen, daß sich rotes Triphenyl-formazan in benzolischer Lösung in eine gelbe Form umwandelt, die aber nur im Licht beständig ist und sich im Dunkeln sofort wieder in die rote Form zurücklagert. C-Alkyl-substituierte Formazane lösen sich gelb in Benzol; jedoch werden zeitliche Änderungen der Absorptionsspektren ihrer benzolischen Lösungen festgestellt. Diese Erscheinungen werden auf eine cis-trans-Isomerie zurückgeführt. Von den vier klassisch möglichen cis-trans-isomeren Formen wurden bis jetzt nur zwei Formen (gelb und rot) gefunden.



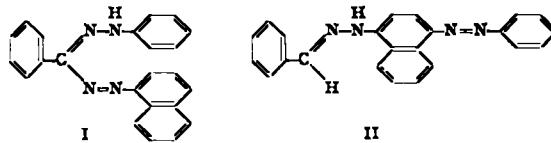
Beim C-Aethyl-N,N'-diphenyl-formazan konnten die beiden stereoisomeren Formen kristallin erhalten werden. (Gelbe Form: aus Methanol orange Nadeln, Fp 102–103°; rote Form: aus Benzin rote Nadeln, Fp 73–75°).

H. v. Pechmann⁴⁾ und später L. Hunter und C. B. Roberts⁵⁾ beobachteten, daß die bekannten Formazane, bei denen R = Alkyl oder Aryl und R' von R'' verschieden sind, nur in einer Form isoliert wurden. Im Zusammenhang mit der Betrachtung der Isomerie bei den Formazanen geben I. Haussner, D. Jerchel und R. Kuhn³⁾ für diese auffällige Tatsache folgende einleuchtende Erklärung. Sie nehmen an, daß das H-Atom im Formazyl-Rest nicht einem N-Atom fest zugeordnet ist, sondern durch Chelierung (Nebervalenz-Ringbildung und Wasserstoff-Brücke) beiden Stickstoff-Atomen zugleich angehört. Bei den chellierten Formazanen spielt unter dem Gesichtspunkt der Mesomerie die Frage nach der Lokalisation der Doppelbindungen keine Rolle mehr. An Modellberechnungen zeigen Haussner, Jerchel und Kuhn, daß bei nicht ebenem Bau der Molekel eine H-Brücke auch dann bei Formazanen in Betracht zu ziehen ist, wenn die Azo-Gruppe nicht trans-, sondern cis-Konfiguration einnimmt.



I. Haussner, D. Jerchel und R. Kuhn³⁾ fanden eine weitere Isomerie zwischen N-Naphthyl-formazanen und 4-Benzolazo-phenylhydrazen. Bei der Kupplung von Benzaldehyd-phenylhydrazen mit diazotiertem α -Naphthylamin

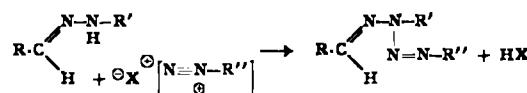
erhielten sie das erwartete Formazan (I); kuppelten sie dagegen Benzaldehyd- α -naphthylhydrazen mit diazotiertem Anilin, dann trat die Azokomponente in p-Stellung in den Naphthyl-Ring ein. Es entstand das Benzaldehyd-(4-benzolazo-naphthyl-1)-hydrazen (II).



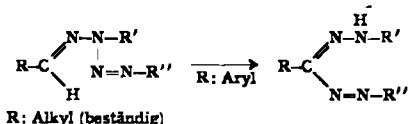
Beide Verbindungen unterschieden sich deutlich durch ihr Absorptionsspektrum.

Reaktionsmechanismus der Formazan-Bildung

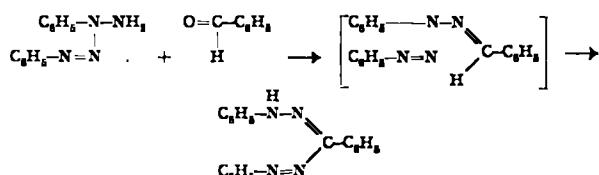
Schon H. v. Pechmann⁶⁾ war es aufgefallen, daß sekundären Hydrazinbasen entstammende Hydrazone sich nicht mit Diazoniumsalzen zu Formazanen umsetzen lassen; rein formal sollte dies auf Grund des eingangs diskutierten Reaktions-Schemas möglich sein. Acylierte Hydrazone dagegen lassen sich in Gegenwart von viel überschüssigem Alkalii mit Diazoniumsalzen kuppeln. Unter dem Einfluß des starken Alkalis wird der Acyl-Rest zuerst verseift, so daß das freie Hydrazon vorliegt. M. Busch und Mitarbeiter⁷⁾ haben dies Verhalten aufgeklärt. Sie fanden, daß das Diazoniumsalz zuerst immer am Imin-Wasserstoff angreift und ein Diazo-hydrazen bildet.



Ist R ein Alkyl-Rest, dann kann das Diazo-hydrazen als beständige Verbindung isoliert werden, ist R dagegen ein Aryl-Rest, dann findet sofort Umlagerung in das stabile Formazan statt.



Den experimentellen Beweis für die Richtigkeit dieser Deutung lieferten M. Busch und H. Pfeiffer⁸⁾, indem sie bei der Einwirkung von Diazobenzol-phenylhydrazid auf Benzaldehyd Triphenylformazan erhielten.



Eine von E. Bamberger vertretene Ansicht¹⁰⁾, wonach Benzalmethyl-phenylhydrazen mit freiem p-Nitro-isodiazobenzol-hydroxyd zu dem entsprechenden Formazan reagierte, wurde von M. Busch und R. Schmidt¹¹⁾ widerlegt. Sie fanden, daß die Diazokomponente in die p-Stellung der Phenyl-Gruppe des Hydrazons eingetreten war.

Die Formazyl-Verbindungen haben die Neigung, mit Schwermetallen wie Kupfer, Cobalt, Nickel tiefgefärbte, gut kristallisierte Komplexverbindungen zu bilden,

¹⁾ a) Eug. Bamberger, Liebigs Ann. Chem. 446, 260 [1925], dort findet sich eine Zusammenstellung seiner sämtl. Arb. über Formazane.

b) Eug. Bamberger, O. Billerer, Helv. Chim. Acta 14, 231 [1931].

c) F. R. Fichter, E. Schieß, Ber. dtach. chem. Ges. 33, 747 [1900].

²⁾ Ber. dtach. chem. Ges. 82, 515 [1949].

³⁾ Ebenda 27, 1679 [1894]; 28, 878 [1895].

⁴⁾ J. chem. Soc. [London] 1941, 820.

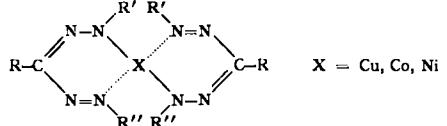
⁵⁾ Ber. dtach. chem. Ges. 84, 651 [1951].

⁶⁾ Ebenda 69, 1162 [1926]; 63, 1950 [1930]; J. prakt. Chem. (II) 129, 151 [1930]; 131, 182 [1931].

⁷⁾ Ber. dtach. chem. Ges. 89, 1387 [1898].

⁸⁾ Ebenda 63, 1951 [1930].

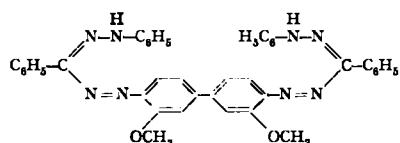
die von L. Hunter¹²), D. Jerchel, H. Fischer¹³) und R. Wizinger und V. Biro¹⁴) näher untersucht wurden.



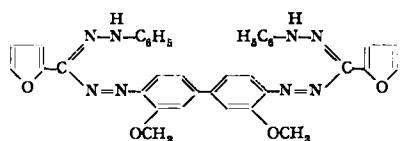
Sämtliche in der Literatur beschriebene Formazane waren mehr oder weniger intensiv gelb bis rot.

Es hat, im Hinblick auf die später zu erörternden biologischen Untersuchungen nicht an Versuchen gefehlt, durch geeignete Wahl der Ausgangskomponenten oder durch Einführen neuer Substituenten möglichst tieffarbige (blaue oder blauschwarze) Formazane herzustellen^{15, 16}). Die diesbezüglichen Versuche führten zu besonders tiefroten, sehr schwer löslichen Diphenylformazanen und Di-formazanen. Auch die Heranziehung von heterocyclischen Aminen als Kupplungskomponenten, wie verschiedene Amino-chinoline, Amino-thiazole, Amino-carbazole oder Dehydro-thio-p-toluidin, brachten keinen neuen Farbton in die Verbindungsklasse¹⁶). Ein von E. Ludolph¹⁷) in der Pyrimidin-Reihe dargestelltes Formazan zeigte ebenfalls keine farblichen Besonderheiten.

Erst als W. Ried und H. Gick¹⁸) Diamine, wie Benzidin, Diamino-diphenylamin und o-Dianisidin, als Basen bei ihren Versuchen heranzogen, kamen sie dem gesteckten Ziel näher. Sie fanden im o-Dianisidin, das in der Farbstoffchemie als Blaubase bekannt ist, die Komponente, welche bei der Kupplung mit Benzaldehyd-phenylhydrazone ein Di-formazan lieferte, das blaustichige Farblösungen gab. Dieses Formazan wurde auch von A. M. Rutenburg, A. M. Seligmann, R. Gofstein¹⁸) beschrieben.



Die Formazane aus Acetaldehyd-phenylhydrazone oder Brenztraubenaldehyd-phenylhydrazone und o-Dianisidin zeigen keine Spur von Blauästichtigkeit ihrer Lösungen mehr. Dagegen löst sich das Formazan aus Furfurol-phenylhydrazone und o-Dianisidin mit rein blauer Farbe.



Dieses Formazan dürfte das erste bekannte Formazan mit rein blauer Lösungsfarbe sein. Terephthalaldehyd-bis-phenylhydrazone und o-Dianisidin lieferten ein Formazan mit nahezu schwarzer Lösungsfarbe.

Eine interessante Synthese zur Darstellung heterocyclicisch substituierter Formazane fanden jüngst¹⁹) W. Ried und R. Hoffschmidt, als sie heterocyclicisch substituierte Brenztraubensäureester in ammoniakalischer Lösung mit Diazoniumsalzen umsetzten. Unter Abspaltung von Oxamid bildet sich das heterocyclicisch substituierte Formazan.

¹²) J. chem. Soc. [London] 1941, 873.

¹³) Liebigs Ann. Chem. 563, 200 [1949].

¹⁴) Helv. Chim. Acta 32, 906 [1949].

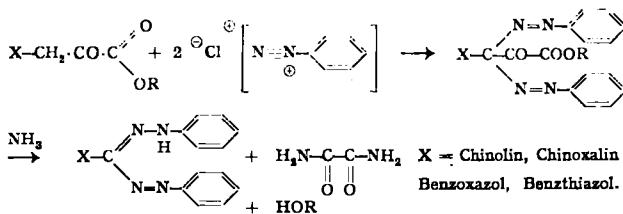
¹⁵) D. Jerchel, H. Fischer, Liebigs Ann. Chem. 563, 208 [1949].

¹⁶) W. Ried u. H. Gick (unveröffentlicht), Diplomarbeit H. Gick 1951, Frankfurt-M.

¹⁷) Ber. dtsch. chem. Ges. 84, 385 [1951].

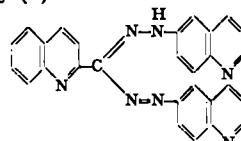
¹⁸) Cancer Res. 10, 113 [1950].

¹⁹) Diplomarbeit R. Hoffschmidt, Frankfurt-M. 1952.

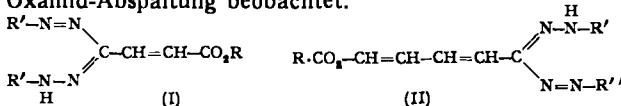


(In natron-alkalischer oder essigsaurer Lösung setzen sich die substituierten Brenztraubensäureester mit Diazoiumsalzen zu Phenylhydrazen um).

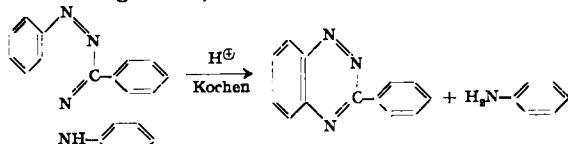
Das neue Verfahren ist verallgemeinerungsfähig und macht die Darstellung der oft schwer zugänglichen heterocyclischen Aldehyde überflüssig. In guter Ausbeute konnten Formazane erhalten werden, die am C-Atom durch folgende Heterocyclen substituiert waren: Chinolin, Chinoxalin, Benzoxazol und Benzthiazol. Durch Kombination mit heterocyclischen Aminen wurden rein heterocyclicisch substituierte Formazane erhalten, z. B. C-Chinolyl-(2)-N,N'-dichinolyl(6)-formazan.



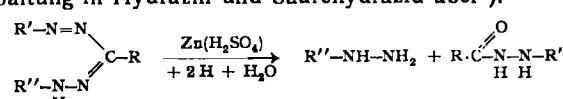
Beim Oxalo-crotonsäureester (I) haben B. Prager²⁰) und beim Oxalo-sorbinsäureester (II) W. Borsche und R. Mantheuffel²¹) in ammoniakalischer Lösung bei der Kupplung mit Diazoniumsalzen ebenfalls Formazan-Bildung unter Oxamid-Abspaltung beobachtet.



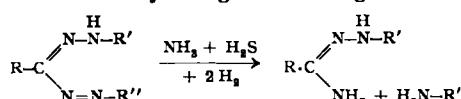
Durch Kochen mit Säuren werden die Formazane unter Abspaltung von Anilin oder der entspr. Base in Phenyl-triazine übergeführt⁶).



Mit Zinkstaub und Schwefelsäure gehen sie unter Aufnahme von 2 H-Atomen unter gleichzeitiger Hydrazon-Spaltung in Hydrazin und Säurehydrazid über⁶).



Eug. Bamberger und P. de Gruyter²²) fanden, daß Schwefelammonium Formazane im Sinne einer Azospaltung in Amidrazone und die jeweilige Base zerlegt.



Nur bei gleichen R' und R'' ist bei der Reduktion mit definierten Produkten zu rechnen.

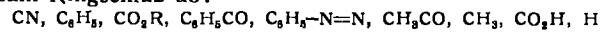
Tetrazolium-Verbindungen

H. v. Pechmann und P. Runge²³) entdeckten 1894, daß sich die Formazane unter spezifischen Oxydationsbedingungen zu Tetrazolium-Verbindungen cyclodehydrieren lassen. Als Oxydationsmittel verwandten sie gelbes Quecksilberoxyd in alkoholischer Lösung und gelangten zu den Tetrazoliumbasen. Mit Isoamylnitrit und Salzsäuregas führte

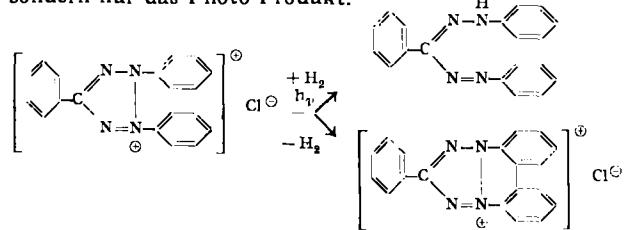
²⁰) Liebigs Ann. Chem. 338, 360 [1905]. ²¹) Ebenda 505, 177 [1933].

²²) Ber. dtsh. chem. Ges. 28, 2783 [1893]. ²³) Ebenda 27, 2920 [1894].

die Oxydation in Chloroform-Lösung zu den Tetrazoliumchloriden. In neuerer Zeit haben R. Kuhn und D. Jerchel²⁴⁾ ein verbessertes Dehydrierungsverfahren mittels Bleitetraacetat in Chloroform-Lösung angegeben. W. Ried und W. Storbeck²⁵⁾ fanden, daß sich vor allem die aromatisch substituierten Formazane durch H_2O_2 und Salzsäure in Gegenwart von katalytischen Mengen Vanadipentoxyd in die Tetrazoliumchloride überführen lassen. Nach E. Wedekind und L. Stauve²⁶⁾ sind die Substituenten am C-Atom verantwortlich für die Leichtigkeit, den Ringschluß zu den Tetrazolium-Verbindungen einzugehen. In folgender Reihenfolge der Substitution nimmt die Neigung zum Ringschluß ab:



Die Tetrazolium-Verbindungen sind farblose, in der Regel gut wasserlösliche Substanzen mit ausgesprochen bitterem Geschmack. Sie sind giftig. Wie schon H. v. Pechmann und P. Runge²³⁾ fanden, verfärbten sie sich am Licht rasch nach Gelb. I. Haussner, D. Jerchel und R. Kuhn²⁷⁾ untersuchten die Lichteinwirkung auf Triphenyl-tetrazoliumchlorid. Sie fanden, daß beim Bestrahlen einer 1 proz. wäßrigen, nicht fluoreszierenden Lösung viel Formazan ausfällt. Aus dem himmelblau fluoreszierenden Filtrat isolierten sie ein schön kristallisiertes Photo-Derivat, das sie als 2,3-Diphenylen-5-phenyl-tetrazoliumchlorid erkannten. Beim Bestrahlen der alkoholischen Lösung von Triphenyl-tetrazoliumchlorid entstand fast kein Formazan, sondern nur das Photo-Produkt.



Triphenyl-tetrazoliumchlorid wirkt als Wasserstoff-Acceptor, wenn es in das Triphenyl-formazan übergeht, als Wasserstoffdonator, wenn sich daraus das Diphenylen-Derivat bildet. Bemerkenswert ist auch, daß sich beim Belichten von Triphenylformazan in abs. Alkohol mit UV-Licht die Lösung nahezu entfärbt und das himmelblau fluoreszierende Kation auftritt. Diese interessante Lichtreaktion ist Gegenstand eingehender reaktionskinetischer und quantenmechanischer Untersuchungen geworden^{28,29)}.

F. Weygand und J. Frank³⁰⁾ haben die Lichtempfindlichkeit der Tetrazoliumsalze zur Herstellung von Lichtbildern ausgenutzt und dem Verfahren den Namen „Tetrazolium-Typie“ gegeben.

Während sich die Dehydrierung der Formazane zu den Tetrazolium-Verbindungen nur unter Anwendung besonderer Kunstgriffe vollziehen läßt, geht die reduktive Aufspaltung des Tetrazol-Ringes zu den Formazanen spielend leicht vor sich. Man beobachtet bereits bei der Zugabe von einigen Zink-Flittern zur wäßrigen Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Lösung an der Zink-Oberfläche Formazan-Abscheidung. Mit Reduktionsmitteln allgemein, wie Schwefelwasserstoff, Ascorbinsäure in soda-alkalischer Lösung findet unter mildesten Bedingungen Ringaufspaltung statt; bei der Einwirkung von katalytisch erregtem Wasserstoff oder Natriumdithionit bleibt die Reduktion

²⁴⁾ Ebenda 74, 941 [1941], s. a. M. A. Matson, C. O. Jensen u. R. A. Dutcher, J. Amer. Chem. Soc. 70, 1284 [1948].

²⁵⁾ Unveröffentlicht.

²⁶⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 31, 1746 [1898].

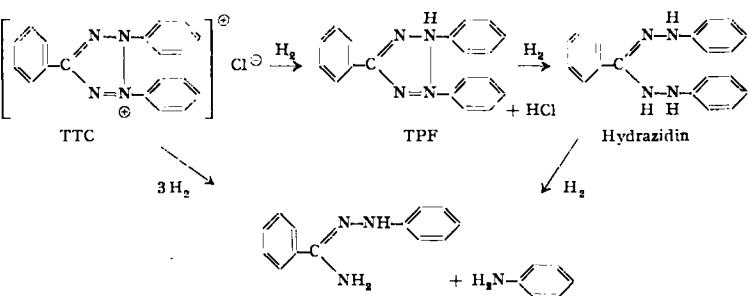
²⁷⁾ Ebenda 82, 195 [1948].

²⁸⁾ K. H. Haussner, Z. Naturforsch. 6a, 41 [1950]; K. H. Haussner, Naturwiss. 36, 313 [1949].

²⁹⁾ I. Haussner, Naturwiss. 36, 315 [1949].

³⁰⁾ Z. Naturforsch. 3b, 377 [1948].

aber nicht auf der Formazan-Stufe stehen. Kuhn und Jerchel zeigten in ihrer Arbeit³¹⁾, „Über die stufenweise Hydrierung der Tetrazoliumsalze“, daß die Formazan-Stufe durchschritten wird und die N=N-Doppelbindung einer hydrierenden Azospaltung anheimfällt. Beim Triphenyl-formazan wird die unbeständige Hydrazidin-Stufe durchlaufen und ω -Phenyl-benzamidrazon und Anilin isoliert. Wenn R am C-Atom einen Alkyl-Rest darstellt, ist das Hydrazidin beständiger und kann isoliert werden.



Unter schärferen Reduktionsbedingungen mit Natriumamalgam wird Triphenyl-tetrazoliumchlorid bis zum Benzaldehyd-phenylhydrazone reduziert. Die katalytische Reduktion mit PtO_2 im Überschuß hatte eine Wasserstoffaufnahme von 14 Mol zur Folge. Ein definiertes Endprodukt konnte hierbei nicht erhalten werden.

Da der Übergang der Tetrazoliumsalze in die Formazane einen irreversiblen Vorgang darstellt, der nur unter sehr speziellen Bedingungen rückgängig gemacht werden kann, darf man bei dem System Triphenyl-tetrazoliumchlorid \rightarrow Triphenylformazan nicht von einem Redoxsystem sprechen, für das sich auf dem üblichen Wege das Reduktions-Oxidations-Potential bestimmen läßt. D. Jerchel und W. Möhle³²⁾ haben unter Zugrundelegung der von J. B. Conant³³⁾ und L. F. Fieser³⁴⁾ für irreversibel verlaufende Oxidations- und Reduktionsvorgänge gegebenen gedanklichen und praktischen Voraussetzungen das Reduktionspotential der Tetrazoliumsalze bestimmt, indem sie zu dem Gemisch von reduzierter und oxydierter Form eines reversiblen Indikatorsystems die der vorhandenen Leukostufe äquimolare Menge an unbekannter Substanz (Tetrazoliumsalz) zugaben. Es stellte sich dabei ein neuer Gleichgewichtszustand zwischen bekanntem und unbekanntem Redoxsystem ein, aus dem das Reduktionspotential der unbekannten Substanz ermittelt werden konnte. Das Reduktionspotential liegt bei $-0,083$ Volt und ist stärker negativ als das des Methylenblaues, welches bei $+0,011$ Volt liegt; d. h. also, daß Triphenyl-tetrazoliumchlorid ein schwächerer Wasserstoff-Acceptor als Methylenblau ist. Für seine Verwendung als Reduktionsindikator bei biologischen Prozessen ist dies, wie noch gezeigt wird, von ausschlaggebender Bedeutung.

Tetrazoliumsalze als Reduktionsindikatoren

Es ist das große Verdienst von R. Kuhn und D. Jerchel³⁵⁾, erkannt zu haben, daß die Tetrazoliumsalze in besonderer Weise zur Sichtbarmachung biologischer Reduktionsvorgänge geeignet sind. Im Rahmen ihrer Untersuchungen über Invertseifen²⁴⁾ stellten sie auch Tetrazoliumsalze her, die am C-Atom durch einen Fetrest substituiert waren. Tetrazoliumsalze, bei denen der Substituent am C-Atom eine lineare Kette von mindestens 6 C-Atomen darstellt, schäumen in wäßriger Lösung; sie fallen Eiweiß, wenn der pH -Wert der Lösung größer als der des

³¹⁾ Liebigs Ann. Chem. 568, 189 [1950].

³²⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 591 [1944]. ³³⁾ Chem. Rev. 3, 1 [1926].

³⁴⁾ J. Amer. Chem. Soc. 52, 5204 [1930].

³⁵⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 948 [1941].

isoelektrischen Punktes des Proteins ist. *Kuhn* und *Jerchel* beobachteten, daß diese Tetrazoliumsalze auf Mikroorganismen ähnlich bakterizid wirken wie die Invertseifen. Darüber hinaus fiel ihnen auf, daß die behandelten Bakterien mehr oder weniger intensiv rot angefärbt wurden. Sie zogen daraus den Schluß, daß die Tetrazoliumsalze in den Bakterienleib eingedrungen und dort durch fermentative Reduktion in die Formazane übergeführt worden sein mußten. Weitere Versuche bestätigten ihre Vermutungen. Von gärender Hefe und keimendem Samen wurden die Tetrazoliumsalze ebenfalls zu den Formazanen reduziert. *F. Moewus*³⁸⁾ gelang es, an pflanzlichen Objekten Mutanten zu erzeugen. Als er Samen der Gartenkresse auf Filtrerpapier brachte, das mit 1 proz. 2,3-Diphenyl-5-n-undecyl-tetrazoliumchlorid-Lösung getränkt war, fand normale Keimung statt. Die Keimblätter der jungen Pflänzchen und die Vegetationszonen der Wurzeln waren nicht grün, sondern tiefrot gefärbt.

Es ist eine in der organischen Chemie seltene und für die Verwendung als Reduktionsindikatoren in der Biologie sehr wertvolle Eigenschaft der Tetrazoliumsalze, daß die Oxydationsstufe farblos und die reduzierte Form, die sog. „Leuko-Stufe“ gefärbt ist. Im Gegensatz zu den bekannten Reduktionsindikatoren (Methylenblau) erweist sich die gefärbte „Leuko-Stufe“ als absolut luft- und sauerstoff-unempfindlich und ist bei entsprechender Substitution in Wasser praktisch unlöslich.

*G. Lakon*³⁷⁾ entwickelte mit Hilfe der phytochemischen Tetrazol-Reduktion einen topographischen Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte. Aus den Getreide- oder Maiskörnern werden die Embryonen herauspräpariert und mit 1 proz. wäßriger Tetrazoliumsalz-Lösung übergossen. Bei noch vorhandener Keimfähigkeit tritt schon nach wenigen Stunden Rotfärbung der Keimlinge auf. Dieser Keimtest stellt ein rasches und zuverlässiges Verfahren dar und bietet wesentliche Vorteile gegenüber dem älteren Verfahren mit Natrium-biselenit (NaHSeO_3), bei dem sich die Keimfähigkeit des Gutes durch Abscheidung von rotem, amorphem Selen kundtut.

A. M. Mattson, C. O. Jensen und *R. A. Dutcher*³⁸⁾ zeigten, daß auch Äpfel, Citronen, Orangen, Pilze, junge Blätter, bestäubte Blütengriffel, Stiersperma, Blastoderme von Eiern in neutraler Reaktion Triphenyl-tetrazoliumchlorid zu Triphenylformazan reduzieren. Verantwortlich für die Reduktion sind die in diesen Objekten vorhandenen Enzym-Systeme, vor allem das Dehydrogenase-System (Cozymase I und II). Andere Zellinhaltsstoffe, wie Glutathion, Cystein und Ascorbinsäure oder Zucker kommen, wie *R. Kuhn* und *Jerchel*³⁹⁾ gezeigt haben, als reduzierende Faktoren in neutraler Lösung nicht in Frage, da sie erst bei einem p_H über 9 auf die Tetrazoliumsalze reduzierend wirken. In neutraler Lösung scheint Triphenyl-tetrazoliumchlorid als Wasserstoff-Acceptor gegenüber der Pyridinium-nukleotid-dehydrogenase zu wirken. Das Holoenzym Dehydrogenase-coenzym I reduziert Triphenyl-tetrazoliumchlorid bei p_H 6,6. Die reduzierenden Enzym-Systeme sind im lebenden Gewebe weit verbreitet.

*H. v. Haye*³⁹⁾ injizierte Meerschweinchen Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Lösungen und stellte nach dem Töten der Tiere fest, daß die einzelnen Organe unterschiedlich intensiv durch Formazan-Bildung angefärbt worden waren. Organe mit erhöhter Fermentaktivität (Leber und Niere) wurden stärker angefärbt. Ähnliche Beobachtungen mach-

ten in anderem Zusammenhang *W. Doerr* und *E. v. Lüttichau*⁴⁰⁾ sowie *A. M. Rutenburg, A. M. Seligman* und *R. Gofstein*⁴¹⁾. Im Fettgewebe fand man in der Regel eine Anreicherung von Formazan, das aber dort nicht durch Reduktion entstanden sein dürfte; es dürfte vielmehr dort hin verschleppt worden sein, wo es von den Lipoiden aufgelöst wurde.

Vitalfärbungen am Zentralnervensystem mittels Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Reduktion führten *H. Becker* und *G. Quadbeck*⁴²⁾ durch. Auffällig bei diesen Versuchen war, daß die graue Hirnsubstanz stärker als die weiße durch Formazan angefärbt wurde.



Bild 1*). Tetanusbazillen, Reduktionsorte nach Gegenfärbung der Bakterien mit Methylenblau. Man sieht, daß die Reduktionsorte innerhalb des Zell-Leibes liegen

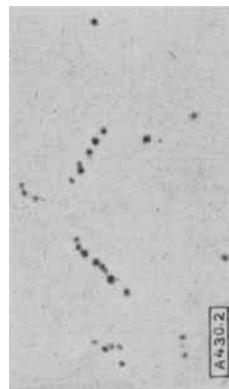


Bild 2. Reduktionsorte in Tetanusbazillen, die nicht mit Methylenblau gegengefärbt wurden



Bild 3. *Bact. Subtilis*, Reduktionsorte,
1. Phase der Entfärbung



Bild 4. *Bacillus Botulinus*,
Reduktionsorte

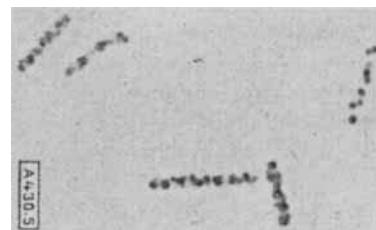


Bild 5
Gasbrandbazillus, Reduktionsorte infolge Formazan-Bildung rot

H. J. Bielig, G. A. Kausche und *H. Haardick*⁴³⁾ und unabhängig von diesen *R. Siegert*⁴⁴⁾ zeigten, daß sich bei Mikroorganismen, in pflanzlichen und tierischen Zellen die Formazan-Bildung, wie schon von *R. Kuhn* und *Jerchel*

*) Die Aufnahmen 1–6 verdanke ich Herrn Prof. Dr. R. Siegert, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut „Georg-Speyer-Haus“, Frankfurt/M., dem ich auch an dieser Stelle herzlich danke.

⁴⁰⁾ Klin. Wschr. 1949, 754. ⁴¹⁾ CancerRes. 10, 113 [1950].

⁴²⁾ Naturwiss. 37, 565 [1950]; s. a. G. Quadbeck, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 285, 83 [1950].

⁴³⁾ Z. Naturforsch. 4b, 80 [1950].

⁴⁴⁾ Diese Ztschr. 61, 258 [1949].

vermutet worden war, intracellulär an bestimmten Reduktionsorten vollzieht. Bei Mäuse-Ascites-Tumorzellen liegen die Reduktionsorte perinuklear um die Zellkerne angeordnet (*R. Siegert*) und stehen im Zusammenhang mit den Mitochondrien, wie durch entsprechende Isolierungsversuche und färberische Methoden nachgewiesen wurde.

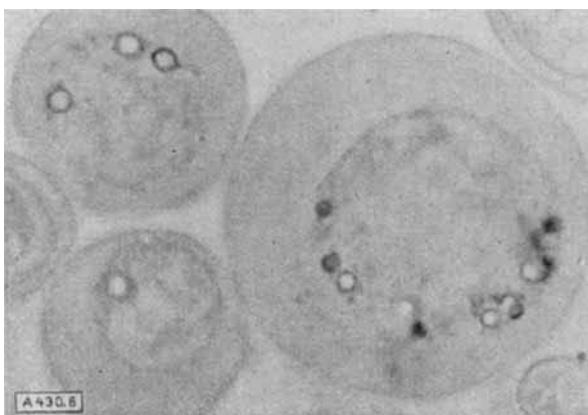


Bild 6

Mäuse-Ascites-Tumorzellen, die schwarzen Punkte und Kreise rings um die Zellkerne stellen die durch Formazan gefärbten Reduktionsorte dar

Der Versuch, mit Hilfe der Tetrazol-Reduktion eine Tumor-Frühdiagnose zu entwickeln (*F. H. Straus, N. D. Cheronis und E. Straus⁴⁵*) führte zu keinem befriedigenden Ergebnis, da die Reaktion keinesfalls die erforderlichen qualitativen Voraussetzungen für eine Tumordiagnose besitzt. Auch die von *F. H. Straus* und Mitarbeitern angegebenen quantitativen Voraussetzungen, wonach Tumorgewebe Tetrazoliumsalze infolge ihres vermehrten Zymohexase-Gehaltes schneller als normales fermentaktives Gewebe reduzieren müsse, reichen nicht für eine sichere Diagnose aus.

Tri- und Tetrazoliumsalze wurden von *H. J. Bielig* und *H. Querner⁴⁶* zur Untersuchung von Meerestieren in verschiedenen Entwicklungsstadien angewandt.

Die Zuverlässigkeit des antibiotischen Testes mit Diffusionsplatten wird durch die Tetrazolium-chlorid/Triphenylformazan-Reduktion wesentlich erhöht, wie *K. H. Wallhäuser* und *A. Rippel-Baldes⁴⁷* zeigten. Die durch ein Antibiotikum geschädigten Zonen färben sich im Gegensatz zu den nicht geschädigten nach Tetrazol-Zugabe nicht mehr rot.

R. Siegert, K. W. Brückel und *W. Ried⁴⁸* zeigten in Zusammenarbeit mit *K. Dittmar*, daß bestimmte Anaerobier und auch Mäuse-Ascites-Tumorzellen in vivo Formazan durch weitere Reduktion entfärben können. Entsprechende Beobachtungen machte ebenfalls *E. F. Möller⁴⁹*. Die Azo-Gruppe der Formazan-Molekel wird reduktiv in ω -Phenylbenzamidazon und Anilin gespalten. Es ist dies derselbe Vorgang, wie er auch im chemischen Modellversuch durch katalytisch erregten Wasserstoff erreicht wird. Durch Punktion gewonnene Tumorzellen sind *in vitro*, wie *Dittmar* zeigte, zu dieser Reduktion nicht mehr befähigt. Die mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid bis zur Formazan-Bildung behandelten Tumorzellen erwiesen sich bei sofortiger Übertragung auf gesunde Mäuse unvermindert tumorzeugend. Sie hatten also keinerlei Schädigung erlitten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erfahrungen überein, die *H. Lettre⁵⁰* mit anderen Reduktionsindikatoren bei Mäuse-

Ascites-Tumorzellen machte. Er konnte dabei ebenfalls keine Hemmwirkungen feststellen. Hühnerherzfibroblasten und embryonales Darmgewebe dagegen wurde durch Triphenyl-tetrazoliumchlorid bereits bei einer Konzentration von 1:100000 im Wachstum gehemmt, ohne daß eine Reduktion durch Formazan-Bildung in Erscheinung trat. *Siegert, Brückel* und *Ried⁴⁸* untersuchten die reduzierenden Eigenschaften des menschlichen Blutes mit Hilfe der Tetrazol-Formazan-Reduktion. Sie stellten fest, daß das Reduktionsvermögen des Blutes vorwiegend als eine Funktion der weißen Blutzellen aufgefaßt werden muß. Zellfreies Plasma oder Erythrocyten allein sind nicht zur Reduktion des Triphenyl-tetrazoliumchlorids befähigt. Auffallend war bei den Untersuchungen, daß das Blut von Tumorträgern und bestimmten Infektionskranken gegenüber dem Blut von Gesunden eine erhebliche Steigerung der Reduktionsfähigkeit zeigte. Als spezifisches Tumordiagnosticum kann die Tetrazolreduktion im Blut jedoch nicht angesehen werden. Wenn sie auch keinen krebspezifischen diagnostischen Wert besitzt, so scheint sie doch allgemeine Hinweise geben zu können, die für die Beurteilung der Wirkungsweise und Dosierungsprobleme der bei der Tumorbehandlung heute im Vordergrund stehenden cytostatischen Substanzen von Wert sind. Es wurde nämlich beobachtet, daß bei Behandlung mit mitosehemmenden Stoffen sowohl das Reduktionsvermögen des Blutes als auch, wie *H. A. Hoelscher⁵¹* mitteilte, das der Tumorzellen stark abgeschwächt wurde.

Bei der Soorhefe demonstrierte *W. Seyfarth⁵²*, daß die Chondriosomen der Sproßzellen in der Lage sind, die Tetrazol-Formazan-Reduktion durchzuführen. Mit Hilfe dieser Reaktion konnte er in einfacher Weise die Chondriosomen nach der Übertragung auf gesunde Mäuse *in vivo* verfolgen.

Angeregt durch die Beobachtungen von *H. A. Hoelscher⁵³*, wonach sich nach Einwirkung von Triphenyl-tetrazoliumchlorid die lichtbrechenden Granula der Tumorzellen infolge Formazan-Bildung rot färben, während Cytoplasma und Kern farblos bleiben, untersuchte *W. Seyfarth⁵⁴* die viel diskutierte Frage, ob die Mitochondrien als Zellbestandteile oder als Eigenkörper zu werten sind. Seine Untersuchungen zeigten, daß die Mitochondrien im Gegensatz zu den übrigen Zellbestandteilen durch 20% Kalilauge und Antiformin nicht angegriffen wurden. Diese Beobachtungen ließen ihn zu der Überzeugung kommen, daß die Mitochondrien keine Zellbestandteile, sondern Eigenkörper sind.

Schließlich sei noch auf eine Anwendung der Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Reduktion hingewiesen, die wir *K. Wallenfels⁵⁵* verdanken. Reduzierende Zucker hydrieren, wie schon erwähnt, Triphenyl-tetrazoliumchlorid zum Triphenylformazan. Die Reaktion läßt sich im Papierchromatogramm zum quantitativen Nachweis reduzierender Zucker verwenden.

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über das Gebiet der Formazane und Tetrazolium-Verbindungen gegeben. Seit den klassischen Untersuchungen von *H. v. Pechmann* und *Eug. Bamberger* vor 60 Jahren haben diese Substanzen eine damals nicht vorauszuhahnende Bedeutung bei der Sichtbarmachung und Aufklärung des Zellgeschehens erlangt. Es besteht die berechtigte Hoffnung, daß wir mit Hilfe dieser wichtigen Reaktion noch weitere wesentliche Einblicke in die Vorgänge des Lebens erhalten werden.

Eingeeg. am 21. März 1952 [A 430]

⁴⁵ Science (Lancaster, Pa.), 108, 113 [1948].

⁴⁶ Z. Naturforsch. 4b, 21 [1949]. ⁴⁷ Naturwiss. 37, 450 [1950].

⁴⁸ Z. ges. exp. Med. 117, 626 [1951].

⁴⁹ D. Jerchel, Fiat Review 39, 65 [1946]. ⁵⁰ Z. Krebsforschg. 57, 1 [1950].

⁵¹ Z. Krebsforschg. 56, 587 [1950].

⁵² Naturwiss. 39, 91 [1952] 1. Artikel. ⁵³ Z. Krebsforschg. 57, 361 [1951].

⁵⁴ Naturwiss. 39, 91 [1952] 2. Artikel. ⁵⁵ Naturwiss. 37, 491 [1950].