

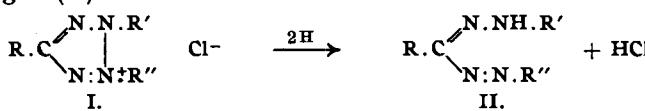
**122. Richard Kuhn und Dietrich Jerchel: Über Invertseifen,
VIII. Mitteil.: Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien,
gärende Hefe und keimende Samen.**

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 16. April 1941.)

Salze, deren seifenähnlicher Charakter durch die Capillaraktivität der Kationen bedingt wird (Invertseifen), sind befähigt, Proteine zu fällen und Symplexe zu spalten¹⁾. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß ihr hohes Desinfektionsvermögen ursächlich mit diesen Eigenschaften zusammenhängt, d. h. daß sie lebenswichtige eiweißartige Zellbestandteile der Bakterien außer Funktion setzen. Ob derartige Vorgänge sich im Innern der Bakterienzellen oder lediglich an deren Oberflächenmembran abspielen, konnte zunächst nicht entschieden werden. Es fehlte an einer Möglichkeit zu entscheiden, ob Invertseifen überhaupt in lebende Zellen einzudringen vermögen. Die vorliegende Mitteilung erbringt nun für längerkettige Tetrazoliumsalze den Nachweis, daß diese in lebende Zellen tatsächlich eindringen.

Hr. Dr. F. Moewus hatte festgestellt, daß 1-Dodecyl-3-äthyl-benztriazoliumbromid bei Einwirkung auf die Gameten einer Grünalge Mutanten erzeugt²⁾. Mit den in der voranstehenden Mitteilung³⁾ beschriebenen Tetrazoliumsalzen wurden daraufhin von ihm Mutationsversuche an weiteren pflanzlichen Objekten in Angriff genommen. Als er Samen der Gartenkresse (*Lepidium sativum*) auf Filterpapier brachte, das mit 1-proz. Lösungen von 2,3-Diphenyl-5-methyl- und 2,3-Diphenyl-5-n-undecyl-tetrazoliumchlorid in Wasser getränkt war, fand normale Keimung statt. Die Blätter der jungen Pflänzchen wurden aber nicht grün wie sonst, sondern tief rot! Von Chlorophyll war nichts mehr zu erkennen. Auch die Wurzeln färbten sich in den Vegetationszonen rot.

Es ist nun schon von dem Entdecker der Tetrazoliumsalze, H. v. Pechmann⁴⁾, beschrieben worden, daß sich diese farblosen Verbindungen (I) durch Reduktionsmittel wie Zinkstaub und Schwefelammon in rote Formazan-Verbindungen (II) überführen lassen:



Hier liegt der in der organischen Chemie sehr seltene Fall vor, daß die Reduktionsstufe einer Verbindung farbig, die Oxydationsstufe farblos ist. Die rote Farbe der Blätter bei der Gartenkresse kommt durch phytochemische Reduktion des aus der Lösung aufgenommenen Tetrazoliumsalzes zustande. Ascorbinsäure, Cystein und Glutathion (SH), die als reduzierende Zellbestandteile geprüft wurden, sind für den beschriebenen Effekt wohl nicht verantwortlich zu machen, da sie in neutraler Lösung ohne Einwirkung sind und erst in alkalischer Lösung ($\text{p}_\text{H} \geq 9$) Formazanbildung bewirken. Es ist auffallend, daß die Keimfähigkeit und die Entwicklung der Kressenpflänzchen unter dem Einfluß der Tetrazoliumsalze nicht nennenswert leiden.

Auch an *Hefe* läßt sich zeigen, daß 2,3-Diphenyl-5-n-hexyl-tetrazoliumchlorid in die Zellen eindringt und dort der Reduktion zum Formazan

¹⁾ B. 78, 1080 [1940]. ²⁾ R. Kuhn u. O. Westphal, B. 78, 1111 [1940].

³⁾ R. Kuhn u. D. Jerchel, B. 74, 941 [1941].

⁴⁾ H. v. Pechmann u. P. Runge, B. 27, 2920 [1894].

anheimfällt. Eine Lösung von 70 g Rohrzucker und 50 g *prim.* Natriumphosphat in 1 l Wasser wurde mit 200 g Löwenbräuhefe, die in 1 l Wasser aufgeschwemmt war, versetzt⁵⁾. Nach 5 Min. war die Gärung deutlich im Gang, worauf wir 6.7 g Diphenyl-hexyl-tetrazoliumchlorid in 400 ccm Wasser langsam zutropfen ließen. Die Gärung ging stetig weiter. Nach 10 Min. hatte sich das Gärungsgemisch rosarot gefärbt, die Farbe vertiefte sich im Laufe der ersten Stunde noch weiter. Am folgenden Tag war der Zucker vergoren, und es wurde eine Probe mit Butanol durchgeschüttelt, in das die freie Hexyl-formazanverbindung glatt übergeht. Aus dem Gärungsgemisch konnten aber nur Spuren von Farbstoff ausgeschüttelt werden. Beim Abzentrifugieren zeigte es sich, daß aller Farbstoff an die Hefe gebunden war und sich weder durch Äther noch durch Butanol daraus in Lösung bringen ließ. Es war notwendig, die abzentrifugierte rosarote Hefe zunächst der Autolyse zu unterwerfen. Nach 24-stdg. Schütteln mit 800 ccm Wasser und 200 ccm Xylol war praktisch alles Formazan im Kohlenwasserstoff. Dieser wurde getrocknet, verdampft und der Rückstand in absolut. Alkohol aufgenommen. Die Absorptionsbande, lichtelektrisch gemessen, lag bei $\sim 410 \text{ m}\mu$ in Übereinstimmung mit derjenigen der Hexyl-formazanverbindung (II, $R = C_6H_{11}$, R' und $R'' = C_6H_5$) vom Schmp. 76° ; die stufenphotometrische Bestimmung ergab, daß 3 mg Formazan entstanden waren. Versuche mit obergäriger Hefe verliefen gleichartig.

Hrn. Dr. E. F. Möller verdanken wir den folgenden Versuch mit Milchsäurebakterien (*Streptobacterium plantarum*). Zu je 5 ccm synthetischer Nährösung⁶⁾, in der sich die Bakterien bereits reichlich vermehrt hatten, wurden je 0.04 ccm 1-proz. Lösung von 2,3-Diphenyl-5-n-hexyl-tetrazoliumchlorid gegeben (1:10000). Nach 2 Tagen (27°) waren die Bakterien schön rot gefärbt, die überstehenden Lösungen nahezu farblos.

Frl. Dr. M. v. Czernicki-Hrebeljanowitsch hat festgestellt, daß *Staphylokokken*, *Bact. coli*, *Friedländer*-Bazillen, *Paratyphus*-Bakterien u. a. in einer mit Tetrazoliumsalzen versetzten Nährösung Reduktion zu den Formazanverbindungen bewirken. Dabei färben sich nicht nur die Bakterien selbst, sondern es fallen überdies in dicken roten Flocken aus der Lösung die Formazanverbindungen aus. Der Effekt ist schon nach wenigen Minuten sehr deutlich, wenn man z. B. bei 20° zu 6 ccm dichter Staphylokokkensuspension in Bouillon 0.6 ccm einer 1-proz. Lösung von 5-n-Hexyl-2,3-diphenyl-tetrazoliumchlorid gibt. Ohne Bakterien ist keine Reaktion zwischen Bouillon und Tetrazoliumsalz festzustellen. Die mit n-Hexyl-tetrazoliumsalz 1:1000 behandelten Staphylokokken (Stamm I. G. Farben-Elberfeld) wuchsen nach Überimpfung auf Blutplatten, Bouillon-Agar und Bouillon nicht weiter. Ging man mit der Konzentration dieses Tetrazoliumsalzes auf 1:10000 und 1:100000 herunter, so zeigte es sich, daß die Bakterien trotz kräftiger Rotfärbung noch voll wachstumsfähig geblieben waren. Die Formazanverbindungen scheinen für die pathogenen Erreger ebenso wie für die Gartenkresse auffallend ungiftig zu sein.

Nach Hasegawa⁷⁾ lassen sich keimfähige Getreidesamen von nicht keimfähigen dadurch unterscheiden, daß nur die ersten imstande sind, Lösun-

⁵⁾ Vergl. F. G. Fischer u. O. Wiedemann, A. 518, 271 [1934].

⁶⁾ E. F. Möller, Angew. Chem. 58, 204 [1940].

⁷⁾ On the determination of vitality in seed by reagents, Mitt. Internat. Ver. f. Samenk. 7, 148 [1935]; G. Lakon, Ber. dtsch. bot. Ges. 57, 191 [1939]: Tiré à part des C. r. de l'Assoc. internat. d'essais de semences Nr. 1, 1 [1940].

gen von NaHSeO_3 zu rotem Se zu reduzieren. Auch keimende Samen der Gartenkresse reduzieren Selenit zu Selen, spurenweise sogar bis zu Selenwasserstoff. Die Selenverbindungen erweisen sich aber als sehr giftig, so daß die Entwicklung der Pflänzchen aus den mit 0.02—0.2-proz. NaHSeO_3 behandelten Samen hinter derjenigen der unbehandelten Kontrollen sehr stark zurückbleibt. Nach Behandlung der Samen mit 1-proz. Tetrazoliumsalzlösung war demgegenüber keine Hemmung der Entwicklung zu erkennen.

Es ist zu erwarten, daß Tetrazoliumsalze auch an tierischen Objekten in gewissen Fällen als Reduktions-Indicatoren von Wert sein werden⁸⁾. Wir haben uns bemüht, die Lage des anscheinenden Reduktionspotentials $I \rightleftharpoons II$ im Hinblick auf biologische Anwendungsmöglichkeiten zu bestimmen. Zur Bestimmung eines „anscheinenden Reduktionspotentials“ (ARP) kann man nach J. B. Conant⁹⁾ folgendermaßen vorgehen: Man reduziert eine reversible Verbindung von bekanntem Redoxpotential (z. B. Methylenblau) zur Hälfte, gibt die zu prüfende nicht reversible Substanz (z. B. Nitrobenzol) zu und stellt fest, ob sich das Potential in Richtung auf den Anfangswert verschiebt oder nicht. Tritt eine Änderung des Potentials ein, so wiederholt man den Versuch mit einem zweiten reversiblen Redoxsystem von höherem Potential usw. bis man ein System ausfindig macht, dessen Potential durch Zusatz der zu prüfenden Substanz eben nicht mehr verändert wird. So kann man feststellen, zwischen welchen Redoxpotentialen das gesuchte ARP liegen muß.

Im Falle der Tetrazoliumsalze ist man nun in der günstigen Lage, ohne Potentialmessungen die Bestimmung des ARP durch Farbwahrnehmung im Reagensglas vornehmen zu können: Man reduziert $m/100$ -Lösungen bekannter reversibler Farbstoffe im $m/10$ -Phosphatpuffer von $p_{\text{H}} 7$ mit Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) etwa zur Hälfte, gibt das in $m/10$ -Phosphat gelöste Tetrazoliumsalz ($m/100$) hinzu und stellt fest, ob Reduktion zum Formazan (Rotfärbung und Trübung) stattfindet. Aus den Versuchen der folgenden Tafel ergibt sich, daß das ARP von 2,3-Diphenyl-5-n-hexyl-tetrazoliumchlorid bei $p_{\text{H}} 7$ und 20° zwischen $E'_0 = -0.17$ Volt (Kresylviolett) und $E'_0 = -0.26$ Volt (Janusgrün), also in der Nähe von -0.20 Volt liegt.

Halbreduzierter Farbstoff	E'_0 (Volt)	Lit.	Formazan-Bildung
Methylenblau	+0.011	¹⁰⁾	nein
Indigotetrasulfonat	-0.046	¹⁰⁾	nein
Gelbes Ferment (alt)	-0.060	¹¹⁾	nein
Indigodisulfonat	-0.125	¹⁰⁾	nein
Kresylviolett	-0.167	¹²⁾	nein
Janusgrün	-0.258	¹³⁾	ja
Neutralrot	-0.341	¹⁰⁾	ja
Phenosafarin	-0.525	¹⁰⁾	ja

⁸⁾ Vergl. z. B. Die Vitalfärbung von Amphibienkeimen, F. G. Fischer u. H. Hartwig, Ztschr. vergl. Physiol. 24, 1 [1936]; H. Piepho, Biol. Zbl. 58, 90 [1938].

⁹⁾ Zusammenfassung: Chem. Reviews 8, 1 [1927].

¹⁰⁾ L. Michaelis, Oxydations-Reduktionspotentiale, 2. Aufl., Berlin 1933.

¹¹⁾ R. Kuhn u. P. Boulanger, B. 69, 1557 [1936].

¹²⁾ L. Rapkine, A. P. Struyk u. R. Wurmser, Journ. Chim. physique 26, 346 [1929].

In $n/10$ -Natronlauge haben wir entsprechende Versuche auch mit Lactoflavin ($E'_0 = -0.186$ Volt) und Lumilactoflavin ($E'_0 = -0.207$ Volt) ausgeführt. Es ergab sich, daß auch diese Iso-alloxazine im halb reduzierten Zustande befähigt sind, das Tetrazoliumsalz zum Formazan zu reduzieren.

Als biologische Reduktions-Indicatoren bieten die Tetrazoliumsalze vor den bekannten Farbstoffen mit ähnlichem Potential den Vorteil, daß die rote „Leukostufe“ gegen Sauerstoff beständig ist, so daß man mit ihnen — anders als mit Methylenblau, Lactoflavin u. a. — auch unter aeroben Bedingungen arbeiten kann.

123. Yasuhiko Asahina und Tyunosin Ukita:
Über das Temisin (II. Mittell. *)).

[Aus d. Pharmazeut. Institut d. kaiserl. Universität Tokio.]
(Eingegangen am 7. April 1941.)

Früher haben Nakamura, Ohta und Hukuti¹⁾ in santoninfreien Wurmsamen²⁾ zwei krystalline Substanzen, Temisin $C_{15}H_{20}O_3$ und Dihydro-iso-temisin $C_{15}H_{22}O_3$, entdeckt. Nach den genannten Forschern ist das Temisin ein Lacton mit einer sekundären Alkohol-Gruppe, indem es bei milderer Oxydation in ein Keton, Temison $C_{15}H_{18}O_3$, übergeführt wird. Bei der katalytischen Hydrierung gehen sowohl Temisin als auch Temison in Tetrahydro-Derivate über, wodurch das Vorhandensein von zwei Doppelbindungen bewiesen wurde. Beim Selen-Abbau des Temisins erhielten die genannten Autoren einen Kohlenwasserstoff $C_{13}H_{14}$, dessen Pikrat und Styphnat übereinstimmend mit den entsprechenden Verbindungen des 1-Methyl-7-äthyl-naphthalins bei 96° bzw. bei 126° schmolzen. Aus diesem Grunde nahmen sie für das Temisin-Skelett den Eudalin-Typus an und erteilten ihm, aus Analogie mit Santonin und Alantolacton, die folgende Konstitution:



* I. Mittell.: Asahina, Nakamura u. Ukita, Journ. pharmac. Soc. Japan **60**, 72 [1940] (C. 1940 II, 1879).

¹⁾ Proceed. Imp. Acad. [Tokyo] **9**, 91 [1933]; **10**, 215 [1934].

²⁾ Nach S. Seki, Journ. pharmac. Soc. Japan **53**, 1273 [1933], der die Droge pharmakognostisch untersucht hat, ist ihre Morphologie von echten Wurmsamen kaum verschieden. Wegen Mangel an Santonin färbt sich aber ihr Pulver durch Natriummethylat nur gelb (nicht rotbraun).