

Die Abhängigkeit der Betriebszahl n_w , welche notwendig ist, um von einer gegebenen (relativen) Ausgangskonzentration γ_0 bei gegebenem Trennparameter δ und bei beliebig gewähltem Rücklaufverhältnis R eine bestimmte Endkonzentration γ_e zu erreichen, ist für ein konkretes Beispiel in Fig. 3 wiedergegeben. Dagegen ist die effektive Trennstufenzahl n_{eff} , welche verbleibt, wenn bei gegebener Betriebszahl n_w und gegebenen γ_0 und δ das Rücklaufverhältnis geändert wird, wiederum für ein konkretes Beispiel, in Fig. 4 und 5 wiedergegeben.

Die Überlegungen und Beziehungen sind, wenn die Parameter entsprechend angepasst werden, auf die andern nach dem Haarnadelgegenstromprinzip arbeitenden Verfahren zu übertragen.

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

215. Über die Beeinflussung tuberkulostatischer Wirkungen durch Cu^{++}

Metallionen und biologische Wirkung, 7. Mitteilung¹⁾

von E. Sorkin, W. Roth und H. Erlenmeyer.

(16. VI. 52.)

Wir berichten im folgenden über tuberkulostatisch wirksame Verbindungen, die sich als „ähnlich“ zu einer Gruppe zusammenstellen lassen, und zwar auf Grund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung einer Chelatbindung mit bestimmten Metallionen. Die Wirkung ist dementsprechend auch — soweit aus den bisherigen Versuchen entnommen werden kann — bei einigen Verbindungen dieser Gruppe weitgehendst an das Vorhandensein solcher Metallionen gebunden; bei anderen lässt sich durch Zusatz von Cu^{++} eine deutliche Wirkungssteigerung beobachten.

Ein erster Vertreter dieser Gruppe wurde im 8-Oxychinolin bekannt. *Rubbo, Albert & Gibson*²⁾ konnten zeigen, dass bei einem Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung des Oxins auf Kulturen von *Staph. aureus* in einem normal bereiteten Milieu mit der Wirkung auf Kulturen in einem Cu^{++} -armen Milieu³⁾ die Aktivität des Oxins im letzteren stark herabgesetzt ist.

¹⁾ 1. Mitt.: *L. A. Binswanger, H. Erlenmeyer, E. Sorkin & E. Suter*, *Helv.* **31**, 1975 (1948). 2. Mitt.: *E. Sorkin, W. Roth & H. Erlenmeyer*, *Exp.* **7**, 64 (1951). 3. Mitt.: *E. Sorkin & W. Roth*, *Helv.* **34**, 427 (1951). 4. Mitt.: *W. Roth, F. Zuber, E. Sorkin & H. Erlenmeyer*, *Helv.* **34**, 430 (1951). 5. Mitt.: *E. Sorkin, W. Roth, V. Kocher & H. Erlenmeyer*, *Exp.* **7**, 257 (1951). 6. Mitt.: *W. Roth, E. Sorkin & H. Erlenmeyer*, *Schweiz. Zschr. f. Path. u. Bakt.*, im Druck (1952).

²⁾ *S. D. Rubbo, A. Albert & N. I. Gibson*, *Brit. J. exptl. Path.* **31**, 425 (1950).

³⁾ Durch Behandeln mit Oxin hergestellt, wobei natürlich auch andere Ionen der „Oxingruppe“ entfernt werden, vgl. *R. Berg*: Die analytische Verwendung von o-Oxychinolin (Oxin) und seiner Derivate, F. Enke, Stuttgart 1938, S. 8.

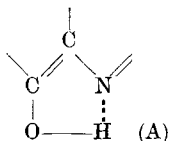
Wir haben früher¹⁾ eine entsprechende Abhängigkeit der Oxinwirkung von der Konzentration der Cu^{++} in der Nährlösung auch bei Tbc-Kulturen nachgewiesen.

Eine weitere Verfolgung dieses Problems hat sodann gezeigt, dass bei gewissen Verbindungen, die mit Oxin strukturverwandt sind, die tuberkulostatische Wirkung durch Cu^{++} eine ganz ähnliche Steigerung erfährt. Besonders charakteristisch ist das Verhalten des 5-Oxychinoxalins²⁾, das in *Kirchner*-Nährlösung ohne Cu^{++} erst in einer Konzentration von m/1000 wachstumshemmend wirkt, während es in Gegenwart von m/5000 Cu^{++} bereits in einer Grenzkonzentration von m/200 000 hemmt.

Neue Versuche erlauben, eine entsprechende Beziehung auch in vivo festzustellen³⁾. 5-Oxychinoxalin allein zeigt am Meerschweinchen in Dosen von 20–30 mg/kg keine antituberkulöse Wirkung. Durch gleichzeitige subkutane Gaben von Kupfersulfat, 5mg/kg, lässt sich ein deutlicher Effekt erzielen, der mindestens der Wirkung von 50 mg/kg Streptomycin entspricht.

Diese Versuche lassen sich so deuten, dass — im Gegensatz zum 8-Oxychinolin — für 5-Oxychinoxalin die zur Entfaltung der Wirkung notwendige Konzentration des Cu^{++} über der natürlichen „Allgegenwartskonzentration“ dieses Ions liegt, so dass hier erst bei einem künstlichen Zusatz von Cu^{++} eine Aktivität auftritt.

Der damit sichtbar gewordene Unterschied innerhalb der Reihe der mit Oxin direkt isosteren Verbindungen belegt, dass die Gruppe



in ihrer Ausbildung, d. h. Azidität, Basizität, Winkelung usw., stark von der Struktur des Molekelrestes abhängig ist. Deutlicher wird diese aus den Eigenschaftsunterschieden abzuleitende und mit der klassischen Strukturchemie nicht zu beschreibende Differenzierungsmöglichkeit der Gruppe (A) noch durch vergleichende Untersuchungen mit 4-Oxybenzoxazol und mit 4-Oxybenzimidazol.

4-Oxybenzoxazol wurde aus 2-Aminoresorcin⁴⁾ durch Kondensation mit Ameisensäure erhalten. Als Nebenprodukt der Kondensation lässt sich die vermutliche Vorstufe des Endproduktes, das 2-Formylaminoresorcin, gewinnen.

¹⁾ Vgl. z. B. 2. Mitteilung.

²⁾ Vgl. auch *F. E. King, N. G. Clark & P. M. H. Davis, Soc. 1949, 3012; S. K. Freeman & P. E. Spoerri, J. Org. Chem. 16, 438 (1951).*

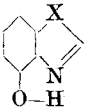
³⁾ Die biologische Bewertung wurde durch die *CIBA Aktiengesellschaft* durchgeführt, der wir auch an dieser Stelle für diese Untersuchungen bestens danken.

⁴⁾ Erhalten aus 2-Nitroresorcin durch katalytische Hydrierung. Siehe auch *B. H. Kauffmann & E. de Pay, B. 37, 725 (1904); 39, 329 (1906); C. B. Jaeger, U. S. Pat. 2.385.282; Chem. Abstr. 40, 1883 (1946).*

4-Oxybenzimidazol wurde durch Umsetzung von 2,3-Diaminophenol¹⁾ mit wasserfreier Ameisensäure in Gegenwart von Acetanhydrid hergestellt und als Formiat sowie als Hydrochlorid isoliert.

4-Oxybenzoxazol und 4-Oxybenzimidazol zeigen auch in Gegenwart von Cu⁺⁺ keine tuberkulostatische Aktivität. Die Wirkungen aller Verbindungen dieser Reihe sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

 , X =	-CH=CH-	-N=CH- ²⁾	-O-	-S- ²⁾	-NH-
<i>Lockemann-Nährlösung</i> } ohne Cu ⁺⁺ tot. hemm. Grenzkonz. } + Cu ⁺⁺ m/5000	m/ 50000	m/ 1000	> m/1000	m/1000	> m/1000
	m/400000	m/200000	m/1000	m/2000	m/1000

Belegt ist aber durch diese Versuche, dass mit dem Vermögen, Cu⁺⁺ komplex zu binden, die Möglichkeit einer tuberkulostatischen Aktivität verbunden sein kann. Die Vorstellung, dass beide Eigenschaften mit dem Vorhandensein der Gruppe (A) in Zusammenhang zu bringen sind, führte uns dazu, andere in dem einleitend erörterten Sinne ähnliche Verbindungen auf ihre tuberkulostatische Wirkung hin zu untersuchen.

Eine Gruppe von Verbindungen, die das angegebene Strukturprinzip aufweisen, lässt sich durch Kondensation von Aldehyden mit o-Aminophenol gewinnen. Der Grundkörper dieser Reihe, das o-Benzalamino-phenol (I), ist bereits von *Pictet & Ankersmit*³⁾ beschrieben worden. In vitro fanden wir bei I eine Wachstumshemmung, die durch einen Zusatz von m/5000 Cu⁺⁺ um das Vierfache gesteigert wird (Tab. 2).

Als weitere Verbindung dieser Reihe sei das o-(p-Nitrobenzalamino)-phenol (II) erwähnt, das sich ähnlich verhält (Tab. 2).

Tabelle 2.

Verbindung	<i>Lockemann-Nährlösung</i>	
	ohne Cu ⁺⁺	+ Cu ⁺⁺ m/5000
I	m/50000	m/200000
II	m/50000	m/100000

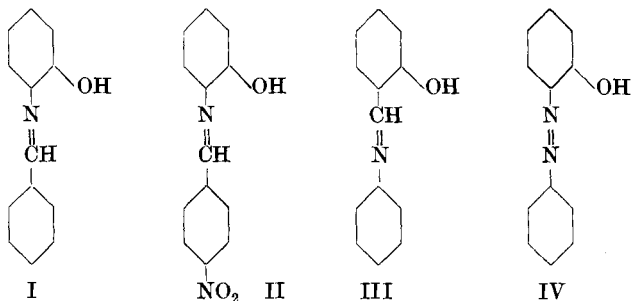
¹⁾ Vgl. *E. Sorkin & W. Roth*, *Helv.* **34**, 427 (1951); *C. H. Ingold & E. K. Ingold*, *Soc.* **1926**, 1310; *Ch. Sannié & H. Lapin*, *Bl.* **1952**, 369.

²⁾ Vgl. *E. Sorkin & W. Roth*, *loc. cit.*

³⁾ *A. Pictet & H. J. Ankersmit*, *A.* **266**, 138 (1891).

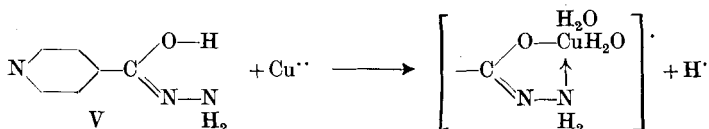
In *Kirchner*-Nährlösung ohne Cu^{++} erhält man mit (I) eine totale Wachstumshemmung bei $m/50\,000$.

Die Besonderheit der Struktur dieser Verbindungen wird deutlich durch die vergleichende Prüfung der beiden mit I isosteren Verbindungen Salicylal-anilin (III) und o-Oxyazobenzol (IV).



Von diesen ist von Verbindung III auf Grund der Struktur nur die Bildung eines 6-Rings zu erwarten, während von IV sowohl ein 5- als auch ein 6-Ring sich ableiten lässt. Diese Verbindungen III und IV zeigen in *Kirchner*-Nährlösung sowohl ohne wie mit Cu^{++} -Zusatz erst in einer Konzentration von $m/1000$ eine tuberkulostatische Wirkung.

Erwähnt sei noch, dass auch das neuerdings ein besonderes Interesse beanspruchende Isonicotinsäurehydrazid möglicherweise in diese Gruppe von komplexbildenden Verbindungen einzureihen ist. Wir fanden, dass Cu^{++} durch Isonicotinsäurehydrazid komplex gebunden wird, wobei die Analyse des isolierten Cu-Salzes und die pH-Änderung, die die Reaktion begleitet, es wahrscheinlich machen, dass die tautomere Form V — die isoster mit der angegebenen Gruppierung (A) wäre — salzbildend ist.



Fassbar als schwer lösliches Salz ist dieser Cu-Komplex des Isonicotinsäurehydrazids bei Gegenwart von SO_4^{--} . Nach den Analysen liegt eine mit $2\text{H}_2\text{O}$ kristallisierende Verbindung $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}_3\text{SCu}$ vor, über deren Struktur später berichtet werden soll¹⁾. Die Fällung ist nahezu quantitativ. Der hellblau gefärbte Niederschlag ist sulfathaltig.

Die Prüfung *in vitro* mit Tuberkelbazillen in *Kirchner*-Nährlösung ergab, dass die Wirkung des Isonicotinsäurehydrazids durch Cu^{++} bis auf das Zehnfache gesteigert werden kann.

¹⁾ Vom Benzhydrazid ist ein Cu-Salz beschrieben (Soc. 1929, 1945), dem auf Grund der Analysen die Formel $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{N}_4\text{SCu}$ zukommt. Bei diesem tiefblau gefärbten Salz dürfte es sich um einen einfachen Ion-Dipol-Komplex handeln.

Abschliessend sei noch erwähnt, dass die mit dem Isonicotinsäurehydrazid isostere Hydroxamsäure¹⁾, die, wie wir fanden, gleichfalls fähig ist, Cu^{++} komplex zu binden, in entsprechenden in-vitro-Versuchen ohne und mit Cu^{++} -Zusatz unwirksam ist.

Experimenteller Teil²⁾.

4-Oxybenzoxazol. 21 g 2-Aminoresorcin, erhalten aus 25 g 2-Nitroresorcin durch katalytische Reduktion, wurden mit 50 cm³ wasserfreier Ameisensäure 30 Min. am Rückfluss gekocht. Darauf wurde noch 1 Std. auf 150° erhitzt, wobei die Ameisensäure z. T. verdampfte. Einengen im Vakuum bei 100° lieferte 21 g Rohprodukt. Bei der Destillation erhielt man aus diesem ein bei 275° übergehendes Produkt (18,4 g), das bald erstarrte; aus Essigester-Alkohol (10:1) umkristallisiert, Smp. 180—181°. Ausbeute 11,8 g (54% d. Th. bez. auf Nitroresorcin). Die Verbindung wurde zur Analyse bei 140° Badtemperatur im Hochvakuum sublimiert.

4,498 mg Subst. gaben 14,31 mg CO₂ und 1,37 mg H₂O

3,565 mg Subst. gaben 0,340 cm³ N₂ (24°, 739 mm)

C₇H₅O₂N Ber. C 62,22 H 3,73 N 10,37%

Gef. „ 62,55 „ 3,41 „ 10,66%

2-Formylamino-resorcin. In einem weiteren Ansatz konnte diese vermutlich als Zwischenprodukt bei der 4-Oxybenzoxazol-Kondensation auftretende Verbindung wie folgt isoliert werden: Nach der Umsetzung mit Ameisensäure und Verdampfen derselben wurde das Rohprodukt fraktioniert im Vakuum sublimiert: a) bei 140° (Bad) Oxybenzoxazol, b) bei 170° (Bad) Formylamino-resorcin.

Die bei 170° übergehende Verbindung wurde zur Reinigung wiederholt im Hochvakuum sublimiert.

4,621 mg Subst. gaben 9,81 mg CO₂ und 2,02 mg H₂O

3,121 mg Subst. gaben 0,253 cm³ N₂ (24°, 753 mm)

C₇H₇O₃N Ber. C 55,00 H 4,57 N 9,15%

Gef. „ 54,98 „ 4,89 „ 9,23%

4-Oxybenzimidazol. *Formiat*: Das aus der Hydrierung von 1 g 3-Nitro-2-aminophenol erhaltene, luftempfindliche 2,3-Diaminophenol wurde sogleich nach der Aufarbeitung mit 2 cm³ wasserfreier Ameisensäure und 1 cm³ Acetanhydrid 30 Min. am Rückfluss gekocht. Nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurde in Methanol (1 Teil) aufgenommen, mit Chloroform (10 Teile) und schliesslich mit Petroläther (10 Teile) versetzt. Das bald in Form von Nadeln kristallisierende Formiat des 4-Oxybenzimidazols wurde zur Analyse im Hochvakuum sublimiert (140° Badtemperatur) und nochmals umkristallisiert. Smp. 151—152°. Ausbeute 42% d. Th.

3,760 mg Subst. gaben 7,380 mg CO₂ und 1,695 mg H₂O

2,020 mg Subst. gaben 0,284 cm³ N₂ (24°, 733 mm)

C₈H₈O₃N₂ Ber. C 53,60 H 4,50 N 15,51%

Gef. „ 53,56 „ 4,55 „ 15,58%

Hydrochlorid: Wurde das Formiat mit wenig konz. HCl kurz erwärmt und erkalten gelassen, so wurde das Hydrochlorid in feinen Nadeln vom Smp. 275—278° erhalten.

3,660 mg Subst. gaben 6,606 mg CO₂ und 1,600 mg H₂O

C₇H₇ON₂Cl Ber. C 49,02 H 4,10% Gef. C 49,02 H 4,89%

Kupfer(II)-Salz von Isonicotinsäurehydrazid. 1,6 g Isonicotinsäurehydrazid werden in 100 cm³ Wasser gelöst und diese Lösung mit 4 cm³ 2-n. Schwefelsäure und einer Lösung von 2,6 g CuSO₄·5 H₂O in 50 cm³ Wasser versetzt. Es fallen nach einigen Min. hellblaue Kristalle aus, die nach halbstündigem Stehen abfiltriert und sorgfältig mit

¹⁾ T. Gadner, E. Wenis & F. A. Smith, Am. Soc. **73**, 5455 (1951).

²⁾ Die Schmelzpunkte sind korrigiert.

Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wurden. Zur Analyse wurde 3 Std. im Hochvakuum bei 20° getrocknet.

4,398 mg Subst. gaben 3,45 mg CO₂ und 1,33 mg H₂O

4,700 mg Subst. gaben 0,517 cm³ N₂ (23°, 743 mm)

4,51 mg Subst. verbrauchten 1,36 cm³ 0,02-n. J₂-Lösung

C₆H₁₁O₇N₃SCu Ber. C 21,65 H 3,33 N 12,63 S 9,63%

Gef. „ 21,40 „ 3,38 „ 12,40 „ 9,58%

Pyridin-4-hydroxamsäure¹⁾. Eine aus 7,1 g Hydroxylamin-hydrochlorid in 40 cm³ Methanol und 8,4 g KOH in 25 cm³ Methanol bereitete Lösung wurde mit 7,5 g Pyridin-4-carbonsäure-äthylester umgesetzt, wie dies analog für Benzhydroxamsäure beschrieben ist²⁾. Nach 2 Std. tritt Kristallisation ein. Man lässt 24 Std. reagieren, engt im Vakuum stark ein und filtriert das K-Pyridin-4-hydroxamat ab. Ausbeute 4,8 g. Dieses Salz wird mit 20 cm³ 1,25-n. Essigsäure versetzt und die entstandene Lösung im Vakuum eingengt und eisgekühlt. Aus Essigester feine Nadeln, Smp. 168–170°. Ausbeute 2,8 g. Mit FeCl₃-Lösung blutrote Färbung.

3,695 mg Subst. gaben 7,098 mg CO₂ und 1,420 mg H₂O

C₆H₆O₂N₂ Ber. C 52,17 H 4,38% Gef. C 52,17 H 4,30%

Eine wässrige Lösung von Pyridin-4-hydroxamsäure gibt mit einer Kupfersulfatlösung in nahezu quantitativer Ausbeute grüngefärbte Nadeln eines Cu-Salzes.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft (Dr. H. Gysel).

Zusammenfassung.

Eine Reihe von Verbindungen, die fähig sind, Metalle komplex zu binden, wird auf ihre tuberkulostatische Wirkung untersucht. Es zeigt sich, dass bei einigen in vitro und beim 5-Oxychinoxalin auch in vivo durch Cu⁺⁺ eine Steigerung der Aktivität zu erzielen ist.

Anstalt für anorganische Chemie
und Hygienische Anstalt der Universität Basel.

216. Über das Vorkommen von Vitamin B₁₂ in Mycobakterien.

Metallionen und biologische Wirkung, 8. Mitteilung³⁾

von V. Kocher und E. Sorkin.

(18. VI. 52.)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkung von Metallionen auf Mikroorganismen in Gegenwart von Metallkomplexbildnern³⁾ interessierte es uns, einige Mycobakterien auf die Fähigkeit zur Synthese von Vitamin B₁₂ zu prüfen. Es war dies von besonderem Interesse, da wir gefunden hatten, dass die Wirkung des Oxins auf

¹⁾ T. Gadner, E. Wenis & F. A. Smith, loc. cit., beschrieben kürzlich das Hydrochlorid dieser Verbindung.

²⁾ Org. Synth. Coll. Vol. II, 67 (1947).

³⁾ 7. Mitteilung: E. Sorkin, W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **35**, 1736 (1952).