

# Über die Synthese von Radio-4-dimethylaminoazobenzol aus 1-<sup>14</sup>C-Anilin\*.

Von

O. Hromatka und L. H. Schlager.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 8. Dez. 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 17. Dez. 1953.)

Für tierexperimentelle Untersuchungen wurde ein im Benzolkern durch <sup>14</sup>C markiertes p-Dimethylaminoazobenzol benötigt. Es wird ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung in kleinen Mengen aus 1-<sup>14</sup>C-Anilin beschrieben.

Seit der Entdeckung der cancerogenen Wirkung des 4-Dimethylaminoazobenzols, das als „Buttergelb“ in der Nahrungsmittelindustrie Verwendung gefunden hatte, durch *Kinosita*<sup>1</sup>, hat eine rege Forschung über die Verteilung dieses Farbstoffes im tierischen Organismus, über Abbau, Ausscheidung und Wirkungsweise eingesetzt. Die bei diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse bringen *J. A. Miller* und *E. C. Miller* in ihrem umfassenden Referat „The Carcinogenic Aminoazo Dyes“<sup>2</sup>.

Seit dem Jahre 1949 hat sich dieser Forschungsrichtung durch die Verwendung von Isotopen eine neue Perspektive eröffnet. *Fones* und *White*<sup>3</sup> synthetisierten alle drei p-Dimethylaminoazobenzole, in denen die verschiedenen N-Atome teilweise durch <sup>15</sup>N ersetzt waren. *Berenbom* und *White*<sup>4</sup> berichten über den Abbau von <sup>15</sup>N-p-Dimethylaminoazobenzol im

---

\* Herrn Prof. Dr. A. Franke zum 80. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> *R. Kinosita*, Gann. (Jap.) **30**, 423 (1936); Trans. Soc. Path. Japon. **27**, 665 (1937).

<sup>2</sup> *J. A. Miller* und *E. C. Miller*, Advances in Cancer Research, Bd. 1, S. 339—396. New York: Academic Press Inc. 1953.

<sup>3</sup> *W. S. Fones* und *J. White*, Arch. Biochemistry **20**, 118 (1949); Chem. Abstr. **1950**, 1047.

<sup>4</sup> *M. Berenbom* und *J. White*, J. Ntl. Cancer Inst. (Bethesda, Md) **12**, 583 (1951).

Tierversuch. In einer weiteren Arbeit von *Fones* und *White*<sup>5</sup> wurde die Markierung einer Methylgruppe des Dimethylamino-Restes mit <sup>13</sup>C erreicht. *Boissonnas*, *Turner* und *du Vigneaud*<sup>6</sup> verwendeten bereits <sup>14</sup>C zur Markierung an derselben Stelle. Die von *Mackenzie*<sup>7</sup> angestellten Untersuchungen beziehen sich ebenfalls auf diese <sup>14</sup>C-markierte Verbindung. Das homologe 3'-Methyl-4-dimethyl-<sup>14</sup>C-aminoazobenzol wurde von *E. C. Miller*, *Plescia*, *J. A. Miller* und *Heidelberger*<sup>8</sup>, sowie von *MacDonald*, *Plescia*, *E. C. Miller* und *J. A. Miller*<sup>9</sup> zu Tierversuchen herangezogen. Es hatte sich dabei eine leichte Abspaltbarkeit der N-Methylgruppen gezeigt. Eine prinzipiell andere Art der Markierung wurde von *Salzberg*, *Ney* und *Griffin*<sup>10</sup> mit der Darstellung des 3'-<sup>14</sup>C-Methyl-4-dimethyl-aminoazobenzols beschritten. Der Abbau dieser Verbindung im Tierversuch wurde von *Salzberg*, *Hane* und *Griffin*<sup>11</sup> verfolgt.

Zu einem von Herrn Prof. *H. Chiari* (Patholog.-anatomisches Institut der Universität Wien) angeregten Tierversuch sollte ein p-Dimethyl-aminoazobenzol eingesetzt werden, das in einem der Benzolkerne mit <sup>14</sup>C markiert ist. Für die ersten Untersuchungen wurden 10 bis 20 mg dieser Verbindung mit einer Aktivität von 1  $\mu$ c in 4 mg benötigt, die den Ratten in Form einer Öllösung peroral appliziert werden sollte.

Als Ausgangsmaterial stand uns 1-<sup>14</sup>C-Anilin-hydrochlorid der Firma *Tracerlab, Inc.* (130 High St., Boston 10, Mass., USA.) mit einer Aktivität von 0,1 mc pro 34,6 mg zur Verfügung. Es ergab sich zwar, daß zur Synthese eine Verdünnung des markierten Anilinhydrochlorids mit gewöhnlichem im ungefähren Verhältnis 1 : 5 vorgenommen werden konnte. Trotzdem erforderte die Herstellung so geringer Mengen p-Dimethyl-aminoazobenzol von verhältnismäßig hoher Aktivität eine spezielle Versuchsmethodik. In 14 Modellversuchen mit inaktivem Material wurde zunächst in Anlehnung an allgemeine Angaben über Diazotierung und

<sup>5</sup> *W. S. Fones* und *J. White*, *J. Ntl. Cancer Inst. (Bethesda, Md)* **10**, 663 (1949); *Chem. Abstr.* **1950**, 5322.

<sup>6</sup> *R. A. Boissonnas*, *R. A. Turner* und *V. du Vigneaud*, *J. Biol. Chem.* **180**, 1053 (1949).

<sup>7</sup> *C. G. Mackenzie*, *Biological Antioxidants*, *Josiah Macy, Jr., Foundation* 4th Conference, New York, 45 (1950).

<sup>8</sup> *E. C. Miller*, *A. M. Plescia*, *J. A. Miller* und *C. Heidelberger*, *Cancer Res.* **11**, 268 (1951); *J. Biol. Chem.* **196**, 863 (1952).

<sup>9</sup> *J. C. MacDonald*, *A. M. Plescia*, *E. C. Miller* und *J. A. Miller*, *Cancer Res.* **12**, 280 (1952).

<sup>10</sup> *D. A. Salzberg*, *W. Nye* und *A. C. Griffin*, *Arch. Biochemistry* **27**, 243 (1950).

<sup>11</sup> *D. A. Salzberg*, *S. Hane* und *A. C. Griffin*, *Cancer Res.* **11**, 276 (1951).

Kupplung von *Fierz-David* und *Blangey*<sup>12</sup> eine präparative Methode entwickelt, die es gestattet, chromatographisch gereinigtes p-Dimethylaminoazobenzol in einer Ausbeute von zirka 95% d. Th., bezogen auf das eingesetzte Anilin, zu erhalten. Da diese Methode nicht nur für den vorliegenden, sondern auch für ähnlich gelagerte Fälle von Interesse sein dürfte, soll sie im experimentellen Teil genau beschrieben werden.

### Experimenteller Teil.

1,212 mg 1-<sup>14</sup>C-Anilin-hydrochlorid und 6,861 mg inaktives Anilin-hydrochlorid wurden nebeneinander auf einer Polythenfolie eingewogen, diese zu einer Tüte gedreht und in die Öffnung eines *Emich*-Bechers gesteckt. Durch Auftropfen von 1 ml 2 n HCl aus einer Pipette wurde die Substanz in den *Emich*-Becher gespült. Dieser wurde sodann in ein Eisbad gesetzt und der Inhalt mit einem magnetischen Rührer gerührt. Zu der kalten Lösung wurden nun 0,124 ml 0,5 n Natriumnitritlösung getropft. 5 Min. nach Beendigung des Zutropfens wurden 0,094 ml einer Lösung von Dimethylanilin in 2 n HCl zugesetzt, die pro ml 80,13 mg Dimethylanilin enthielt. Das Rühren wurde noch 1 Std. fortgesetzt, hierauf 1 g Natriumacetat zugegeben und noch weitere 30 Min. gerührt. Dann wurde der *Emich*-Becher gekippt, die Lösung in eine Absaugeprouvette gesaugt und der auf der Sinterplatte des *Emich*-Bechers verbliebene Farbstoff mit 3 ml Wasser gewaschen. Um gelöste Farbstoffreste zu gewinnen, wurde das Filtrat zweimal mit je 2 ml Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt. Dabei wurde jeweils die wäßrige Epiphase mit einer Kapillare abgesaugt und die Tetrachlorkohlenstoffschicht mit Wasser gewaschen. Die vereinten Tetrachlorkohlenstofflösungen dienten zur Extraktion des Farbstoffes aus dem *Emich*-Becher. Der Becher wurde schließlich noch mit 2 ml Tetrachlorkohlenstoff nachgewaschen. Die Lösung des Farbstoffes in Tetrachlorkohlenstoff wurde an einer 8,5 cm hohen Säule von 8,3 g Aluminiumoxyd (Merck, standardisiert nach *Brockmann*) chromatographiert. Der Farbstoff zog als 3 cm breite Zone durch die Säule. Geringe Verunreinigungen, die in der obersten Zone zurückblieben, wurden vor dem Eluieren mechanisch abgetragen. Der Vorlauf wurde so lange entfernt, bis der Farbstoff fast das untere Ende der Säule erreicht hatte. Er wurde dann mit 14 ml einer Mischung von Methanol-Tetrachlorkohlenstoff (1:9) eluiert. Der Farbstoffgehalt des Eluats wurde im Zeiß-Stufenphotometer kolorimetrisch bestimmt und betrug 13,3 mg oder 94,89% d. Th. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. bei Raumtemperatur wurde der Farbstoff für die Zwecke der Tierversuche in 3,3184 g Olivenöl gelöst (3,992 mg p-Dimethylaminoazobenzol/g).

Die erhaltenen 13,3 mg Farbstoff mußten theoretisch eine Aktivität von 3,321  $\mu$ c haben. Zur Messung der Aktivität wurde die oben erhaltene Olivenöllösung noch 100fach verdünnt, das heißt 0,0212 g der ursprünglichen Lösung wurden mit 2,0179 g Olivenöl vermischt. Die Messung der Aktivität erfolgte nach der Verbrennung zu CO<sub>2</sub> im Gaszählrohr. Zur Berechnung war die Kenntnis des C-Gehaltes des verwendeten Olivenöles erforderlich, der von Herrn Dr. H. Wagner im Mikroanalytischen Laboratorium des I. Chemischen Universitätslaboratoriums mit 77,42% gefunden wurde.

<sup>12</sup> H. E. *Fierz-David* und L. *Blangey*, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, 8. Aufl. Wien: Springer-Verlag, 1952.

32 Hromatka u. Schlager: Radio-4-dimethylaminoazobenzol aus 1-<sup>14</sup>C-Anilin.

Die berechnete Stoßzahl, bezogen auf 1 g der verdünnten Olivenöllösung, beträgt 23,250; die experimentell gefundene 25,100.

Die Messung der Radioaktivität wurde in unserem Institut von Herrn Pd. Dr. *E. Broda* durchgeführt, dem die Autoren darüber hinaus auch viele Anregungen und Ratschläge zu verdanken haben.

Die Österreichische Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Krebskrankheit hat aus den Mitteln der *Sonnleithner*-Stiftung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften die vorliegende Arbeit in dankenswerter Weise finanziell unterstützt.