

achtung ist jedoch nicht geeignet, etwas über die Vitaminwirkung des *d*- α -Tocopherol im Vergleich zum *dl*- α -Tocopherol auszusagen. Wenn von der Annahme ausgegangen wird, dass das Vitamin E auch durch sein Redoxsystem wirkt, muss es durch Ringspaltung in ein Benzochinonderivat vom Typ des Tocopherylchinons übergeführt werden. Tocopherylchinon, dargestellt aus *dl*- α -Tocopherol, ist jedoch in dieser Versuchsanordnung noch wirksamer als *d*- α -Tocopherol.

Im Gegensatz dazu haben *Nason & Lehman*³⁾ bei Verwendung von DPNH-Cytochrom-c-Reduktase nur für das *d*- α -Tocopherol, nicht aber für *dl*- α -Tocopherol und Tocopherylchinon eine aktivierende Wirkung feststellen können.

SUMMARY.

1. Cytochrome-c reductase, inactivated by extraction, can be reactivated not only by α -tocopherol but also by its acetate.

2. Likewise, not only vitamin K₁ but also di-O-acetyl-dihydro vitamin K₁ has been found to be active, as well as vitamin K₂.

3. Phytol and squalene are reactivating to the same extent as vitamin K₁ resp. K₂. Isophytol and phytanoic acid are also active.

4. Stearic acid, oleic acid, linoleic acid, vitamin A and cholesterol are inactive.

From these data we may conclude that under the conditions indicated it is not the redox system of vitamins E and K, but their isoprene side chain which is responsible for the reactivation of succinate-cytochrome-c reductase.

Biochemische Forschungsabteilung
der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel.

119. Die Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch Vitamin K₁, 2-Methyl-1,4-naphtochinon und Ubichinon

von **F. Weber**, **U. Gloor** und **O. Wiss**.

(28. IV. 58.)

*Nason & Lehman*¹⁾ haben gezeigt, dass die Cytochrom-c-Reduktase nach schonender Extraktion mit Iso-octan durch Vitamin E reaktiviert werden kann. Wirksamer als Vitamin E erwies sich ein Bestandteil des extrahierten Materials. Auch *Marinetti et al.*²⁾ isolierten aus Schweineherzen-Mitochondrien verschiedene Lipidfraktionen, die sich in diesem Test als wirksam erwiesen. Über die Struktur dieser Stoffe ist Sicheres nichts bekannt.

¹⁾ *A. Nason & I. R. Lehman*, J. biol. Chemistry **222**, 511 (1956).

²⁾ *G. V. Marinetti, J. Kochen, J. Erbland & E. Stotz*, J. biol. Chemistry **229**, 1027 (1957).

In einer früheren Untersuchung³⁾ wurde mitgeteilt, dass die Reaktivierung der extrahierten Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase aus Schweineherzen durch die Vitamine E und K unabhängig vom Redoxsystem erfolgt und dass ausschliesslich die isoprenartige Seitenkette dafür verantwortlich ist. Eine grössere Anzahl anderer isoprenartiger Verbindungen, ohne Redoxsystem, erwies sich als gleich wirksam.

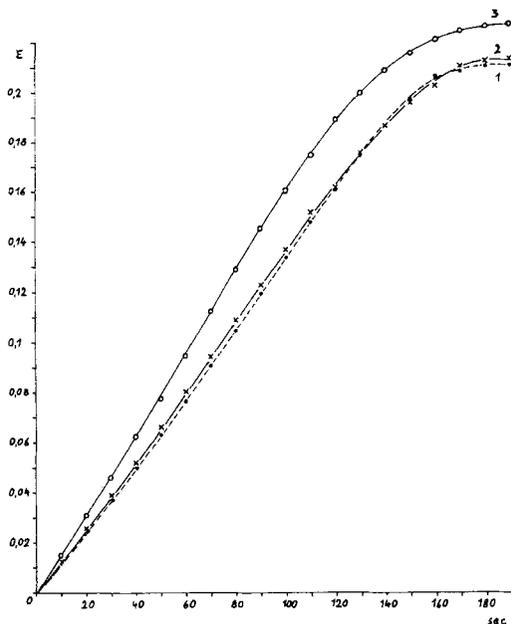


Fig. 1.

Aktivierungsversuch am nicht extrahierten Enzym mit Vitamin K₁ und 2-Methyl-1,4-naphthochinon.

- 1) Nicht extrahiertes Enzym
- 2) Nicht extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K₁
- 3) Nicht extrahiertes Enzym + 0,16 $\mu\text{Mol/ml}$ 2-Methyl-1,4-naphthochinon.

Andererseits hat nun die Prüfung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) in dieser Versuchsanordnung ergeben, dass es, obwohl die erwähnte typische Struktur fehlt, auch eine aktivierende Wirkung hat. Dieser Effekt steht vermutlich mit dem Redoxsystem des 2-Methyl-1,4-naphthochinons in Zusammenhang. Er ist auf Grund von Untersuchungen von Slater und Mitarb.⁴⁾ dadurch zu erklären, dass 2-Methyl-1,4-naphthochinon den Wasserstoff von der Bernsteinsäure-Dehydrogenase übernimmt und in nicht enzymatischer Reaktion das Cytochrom c dann reduziert.

Es wurde versucht, zwischen diesen beiden Aktivierungseffekten zu unterscheiden. Dies gelang am nicht extrahierten Enzym. Vitamin K₁, das auf Grund seiner isoprenartigen Seitenkette wirkt, ist in diesem Falle unwirksam,

³⁾ F. Weber, U. Gloor & O. Wiss, *Helv.* **41**, 1038 (1958).

⁴⁾ J. P. Colpa-Boonstra & E. C. Slater, *Biochim. biophys. Acta* **27**, 122 (1958).

während 2-Methyl-1,4-naphtochinon, das durch das Redoxsystem wirkt, eine Aktivitätssteigerung verursacht (Fig. 1). Diese Beobachtung stimmt überein mit der Vorstellung, dass die Wirkung des Vitamin K_1 auf einer Ergänzung der durch Extraktion geschädigten Struktur beruht, während beim 2-Methyl-1,4-naphtochinon, das als unspezifischer Redox-Katalysator wirkt, eine Aktivitätssteigerung des intakten Systems plausibel ist.

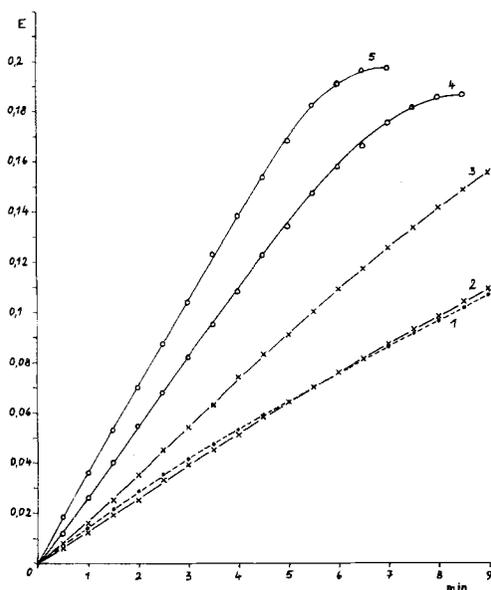


Fig. 2.

Aktivierung des extrahierten Enzyms durch Vitamin K_1 und durch 2-Methyl-1,4-naphtochinon.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,02 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K_1
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,05 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K_1
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,02 $\mu\text{Mol/ml}$ 2-Methyl-1,4-naphtochinon
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,05 $\mu\text{Mol/ml}$ 2-Methyl-1,4-naphtochinon.

Der Unterschied der beiden Aktivierungsmechanismen zeigt sich auch dadurch, dass das Methylnaphtochinon in viel kleineren Konzentrationen als Vitamin K_1 wirkt (Fig. 2).

Ein weiterer Beweis für den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus ergibt sich aus dem Vergleich der entsprechenden Dihydro-naphtochinon-diacetate am extrahierten Enzymsystem. Beim Vitamin K_1 ist das Diacetat der Dihydro-Form gleich wirksam wie die chinoide Form; im Gegensatz dazu ist das Diacetat des 2-Methyl-1,4-naphtohydrochinons völlig unwirksam (Fig. 3).

Von Crane *et al.*⁵⁾ wurde aus Mitochondrien eine Substanz isoliert, der eine Chinonstruktur zugeschrieben wird und die sich als Aktivator mit Iso-octan

⁵⁾ F. L. Crane, Y. Hatefi, R. L. Lester & C. Widmer, Biochim. biophys. Acta **25**, 220 (1957).

extrahierter Bernsteinsäureoxydase erwies. Die bisherige Charakterisierung lässt vermuten, dass diese Substanz mit dem von *Morton*⁶⁾ isolierten Ubichinon (Ubiquinone) identisch ist. Es schien deshalb von Interesse, ein nach der Vorschrift von *Morton* hergestelltes Ubichinon an der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase zu prüfen. Es hat sich ergeben, dass das extrahierte Enzymsystem sich damit reaktivieren lässt (Fig. 4). Auf Grund der oben angegebenen Krite-

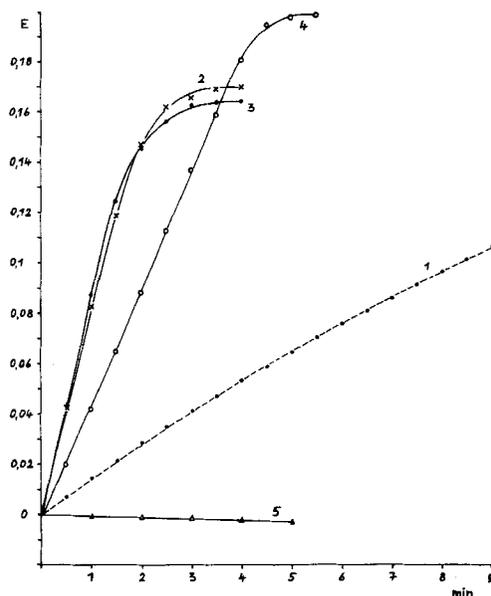


Fig. 3.

Aktivierung des extrahierten Enzyms durch Di-O-acetyl-dihydro-vitamin K_1 und Di-O-acetyl-2-methyl-1,4-naphtohydrochinon.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Vitamin K_1
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Diacetyl-dihydro-vitamin K_1
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml 2-Methyl-1,4-naphtochinon
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml Di-O-acetyl-2-methyl-1,4-naphtohydrochinon.

rien war die Möglichkeit gegeben zu untersuchen, ob für die reaktivierende Wirkung das Redoxsystem oder eventuell vorhandene isoprenartige Strukturen verantwortlich sind. Aus Fig. 5 ist zu entnehmen, dass am nicht extrahierten System keine zusätzliche Aktivierung möglich ist; ausserdem konnte gezeigt werden, dass bei Überführung des Chinons in das entsprechende Dihydrodiacetat die Aktivität voll erhalten bleibt (Fig. 6). Diese Versuche können somit als Hinweis dafür gewertet werden, dass dem Ubichinon eine isoprenartige Struktur zukommt⁷⁾, wobei nicht unterschieden werden kann, ob sie gesättigt-

⁶⁾ R. A. Morton, G. M. Wilson, J. S. Lowe & W. M. F. Leat, *Chemistry & Ind.* **1957**, 1649.

⁷⁾ Nach persönlicher Mitteilung ist Prof. *Morton* auf Grund anderer Beobachtungen zu der gleichen Schlussfolgerung gekommen.

ter oder ungesättigter Natur ist. Immerhin ist ein konjugiert ungesättigtes System auszuschliessen⁸⁾.

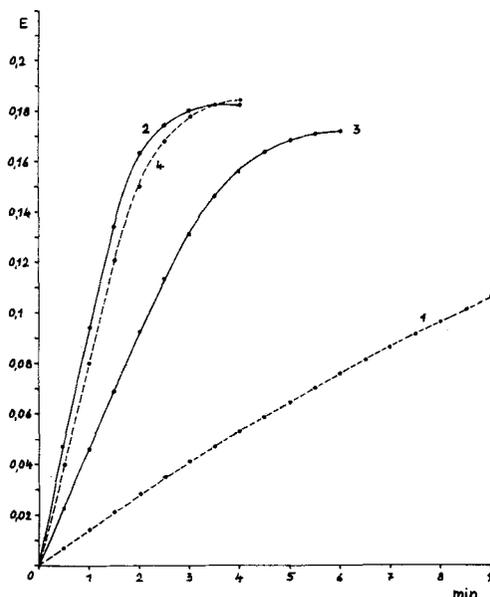


Fig. 6.

Aktivierung des extrahierten Enzyms durch Di-O-acetyl-dihydro-ubichinon.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 180 μ /ml Diacetyl-dihydro-ubichinon
- 3) Extrahiertes Enzym + 90 μ /ml Diacetyl-dihydro-ubichinon
- 4) Nicht extrahiertes Enzym.

Bei der Fraktionierung von Iso-octan-Extrakten aus Schweineherzmuskeln hat sich gezeigt, dass noch andere, in dieser Versuchsanordnung wirksame Stoffe vorliegen, die nicht mit Ubichinon, Vitamin K und E identisch sein können.

Experimentelles. Die Bereitung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase und die Durchführung der Aktivierungsversuche wurde früher beschrieben³⁾. Das Ubichinon wurde aus Schweineherz nach den Angaben von *Morton*⁶⁾ isoliert (Smp. 47°).

Zur Überführung in das Dihydro-diacetat wurden 200 mg Ubichinon in 20 ml hochsiedendem Petroläther gelöst und mit einer Spatelspitze *Lindlar*-Katalyt⁸⁾ versetzt. Unter einem Druck von ca. 50 cm Wassersäule wird mit Wasserstoff unter Rühren in ca. 15 Min. hydriert. Die farblose Lösung wird unter CO₂ (Vorsicht, oxydiert sich sehr leicht zurück!) filtriert und mit 5 ml Pyridin und 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt, 24 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen, die Lösung wird mit Natriumcarbonatlösung (10-proz.), mit 1-n. HCl und mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der nur schwach gelb gefärbte Rückstand wird an einer Säule von SiO₂ chromatographiert; die spontan kristallisierenden Fraktionen werden zusammen aus absolutem Alkohol bis zur Erreichung des Smp. 37° korr. (weisse Kristalle) umkristallisiert.

⁸⁾ *H. Lindlar*, *Helv.* **35**, 446 (1952).

SUMMARY.

1. Two mechanisms can be admitted for the reactivation of the succinate-cytochrome-c reductase system. An earlier described reactivation of the extracted system by isoprene-like substances (vitamins E and K) is to be distinguished from an unspecific reactivation by 2-methyl-1,4-naphthoquinone, which is caused by the redox system.

2. Ubiquinone, described by *Morton*, does not reactivate by its redox system but probably by its isoprene like-side chain.

Biochemische Forschungsabteilung
der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel.

120. Heilmittelchemische Studien in der heterocyclischen Reihe.

22. Mitteilung ¹⁾).

Pyrazolo-pyrimidine II ²⁾).**Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine mit Koffein-ähnlicher Struktur
und Wirkung**

von **P. Schmidt, K. Eichenberg^{er}** und **J. Druey**.

(28. IV. 58.)

In einer früheren Arbeit ²⁾ berichteten wir über einen einfachen Weg zur Herstellung von Pyrazolo[3,4-d]pyrimidinen. Dieses Ringsystem wurde inzwischen eingehend untersucht, und es gelang uns unter anderem, die dem Koffein isomeren Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine herzustellen, welche sowohl in Bezug auf Herzaktivität als auch Diurese ähnliche Wirkungen zeigen wie die in der Natur vorkommenden Methylierungsprodukte des Xanthins.

Gegenstand der vorliegenden Mitteilung ist die Herstellung und Struktur-aufklärung der beiden isomeren Tri-N-methyl-4,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine III und IV. Gleich wie bei den Purinen sind auch in der Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Reihe zwei isomere Tri-N-methyl-Derivate möglich. Das eine – III – erhielten wir bei der Methylierung des 4,6-Dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-pyrazolo[3,4-d]pyrimidins (I) ³⁾, das andere – IV – aus dem 1-Methyl-Derivat II ⁴⁾, welches durch Kondensation von 2-Methyl-3-amino-4-carbamyl-pyrazol ⁵⁾ mit Harnstoff zugänglich war. Die aus dem unsubstituierten Pyrazolo-pyrimidin I bereitete Verbindung III ergab bei der *Zeisel*-Bestimmung drei N-Methyle und kein O-Methyl, das aus 1-Methyl-4,6-dioxo-

¹⁾ 21. Mitt., s. *P. Schmidt, Kd. Meier & J. Druey*, *Ang. Chem.* **70**, 344 (1958).

²⁾ *P. Schmidt & J. Druey*, *Helv.* **39**, 986 (1956). Gilt als Pyrazolo-pyrimidine I.

³⁾ *R. K. Robins*, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 784 (1956).

⁴⁾ *H. E. Skipper, R. K. Robins et al.*, *Cancer Res.* **17**, 579 (1957).

⁵⁾ *C. C. Cheng & R. K. Robins*, *J. org. Chemistry* **21**, 1240 (1956).