

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. A. DIRSCHERL) ausgeführt. Wir danken den Herren Dr. F. BURKHARDT für die Bestimmung des Molekulargewichtes und der Drehungen, Dr. H. WALDMANN für die Aufnahme des Kristallbildes und Dr. C. VON PLANTA für die Aufnahme der DEBYE-SCHERRER-Diagramme.

#### SUMMARY

The isolation of a new quinone from leaves is described. Its structure has been established as an *o*-dimethylbenzoquinone derivative with a vitamin K<sub>2</sub>-like isoprenoid side chain of 50 carbon atoms.

Chemische Forschungsabteilung der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG., Basel

### 137. Hemmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase und deren Reaktivierung durch isoprenartige Verbindungen

von F. Weber und O. Wiss

(25. IV. 59)

Frühere Untersuchungen<sup>1)</sup> haben ergeben, dass die Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase, die nach einer von NASON & LEHMAN<sup>2)</sup> beschriebenen Methode durch Isooctan-Behandlung inaktiviert worden ist, durch Zusatz isoprenartiger Verbindungen reaktiviert werden kann. Es wurde festgestellt, dass dieser Effekt der Vitamine E, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> und des Ubichinons unabhängig vom Redoxsystem ist.

Diese Reaktivierung durch Isoprenabkömmlinge wird durch deren Kettenlänge modifiziert. Eine deutliche Abhängigkeit liess sich in der Reihe der Isoprenologen der Vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> nachweisen; das Maximum der Wirksamkeit liegt bei 20 bzw. 25 Kohlenstoffatomen<sup>3)</sup>.

NASON und Mitarbeiter<sup>4)</sup> haben angenommen, dass der Inaktivierung der Cytochrom-c-Reduktase durch Isooctan-Behandlung eine Extraktion von Lipiden zugrunde liegt, die für den Elektronentransport in der Atmungskette benötigt werden. Diese Hypothese wird vor allem dadurch gestützt, dass auch durch Zusatz des mit Isooctan extrahierten Materials eine Reaktivierung zustande kommt.

DEUL *et al.*<sup>5)</sup> hingegen vermuteten, dass die Inaktivierung von Enzymsystemen der Atmungskette durch Isooctan-Behandlung möglicherweise nicht auf eine Extraktion von Lipiden, sondern auf eine Adsorption von Isooctan an die Enzymoberfläche zurückzuführen ist. Tocopherol und andere fettlösliche Substanzen würden demnach durch Desorption des Isooctans von der Enzymoberfläche reaktivieren.

<sup>1)</sup> F. WEBER, U. GLOOR & O. WISS, *Helv.* **41**, 1038 u. 1046 (1958).

<sup>2)</sup> A. NASON & I. R. LEHMAN, *Science* **122**, 19 (1955); *J. biol. Chemistry* **222**, 511 (1956).

<sup>3)</sup> F. WEBER & O. WISS, *Helv.* **42**, 217 (1959).

<sup>4)</sup> K. O. DONALDSON, A. NASON, I. R. LEHMAN & A. NICKON, *J. biol. Chemistry* **233**, 566 (1958); K. O. DONALDSON, A. NASON & R. H. GARRETT, *ibid.* **233**, 572 (1958).

<sup>5)</sup> D. DEUL, E. C. SLATER & L. VELDSTRA, *Biochim. biophys. Acta* **27**, 133 (1958).



einstimmung mit den früheren Beobachtungen am extrahierten Enzymsystem erwiesen sich auch bei Isooctan-Zusatz Vitamin A und Stearinsäure als unwirksam, während Cholesterinzusatz eine geringe Reaktivierung zur Folge hat.

Um weitere Anhaltspunkte über den Wirkungsmechanismus des Isooctan-Effektes zu erhalten, wurde eine Reihe weiterer Kohlenwasserstoffe auf Hemmwirkung geprüft.

In der Alkanreihe war eine deutliche Abhängigkeit des Hemmeffektes von der Kettenlänge feststellbar. Das Optimum der Wirkung liegt beim n-Heptan (Fig. 1).

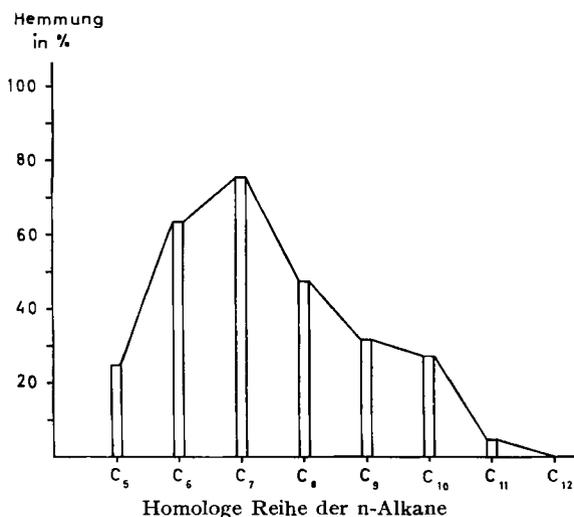


Fig. 1. Hemmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch n-Alkane

C <sub>5</sub> : n-Pentan	C <sub>9</sub> : n-Nonan
C <sub>6</sub> : n-Hexan	C <sub>10</sub> : n-Decan
C <sub>7</sub> : n-Heptan	C <sub>11</sub> : n-Undecan
C <sub>8</sub> : n-Octan	C <sub>12</sub> : n-Dodecan

Alle n-Alkane wurden in einer Konzentration von 1,28  $\mu$ Mol/ml eingesetzt.

Einführung einer Hydroxylgruppe verringert die Hemmwirkung. Auch hier besteht eine Abhängigkeit von der Kettenlänge. Der wirksamste Vertreter dieser Reihe ist der n-Decylalkohol (Fig. 2).

In der Alkylbromid-Reihe sind n-Hexyl- und n-Heptylbromid am wirksamsten. Im Vergleich zu den unsubstituierten Alkanen ist die Aktivität der Bromderivate deutlich erhöht (Fig. 3).

Aus Tab. 3 geht hervor, dass Hexanol und 3,5,5-Trimethylhexanol einerseits, Pentan und Isooctan andererseits gleich wirksam sind. Es zeigt sich somit auch in diesen Versuchen, dass die Kettenlänge für die Hemmung ausschlaggebend ist.

Aus den in den Tab. 1 bis 3 und Fig. 1 bis 3 dargelegten Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Hemmwirkung der untersuchten Kohlenwasserstoffe von bestimmten Strukturen abhängig ist. Dass es sich nicht um einen einfachen Löslichkeitseffekt handelt, geht auch daraus hervor, dass organische Lösungsmittel wie Methanol, Aceton, Äthyläther, Essigester und Benzol in vergleichbaren Konzentrationen unwirksam sind.

In früheren Untersuchungen<sup>3)</sup> wurde beobachtet, dass das Isoprenologe des Vitamins K<sub>2</sub> mit 5 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphthochinon) die mit Isooctan extrahierte Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduk-

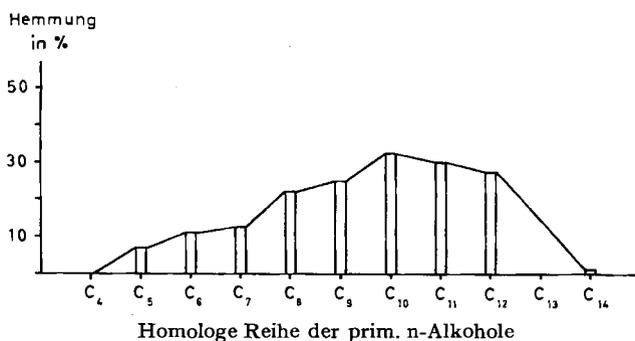


Fig. 2. Hemmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch primäre Alkohole

- |                                  |                                     |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| C <sub>4</sub> : n-Butylalkohol  | C <sub>10</sub> : n-Decylalkohol    |
| C <sub>5</sub> : n-Amylalkohol   | C <sub>11</sub> : n-Undecylalkohol  |
| C <sub>6</sub> : n-Hexylalkohol  | C <sub>12</sub> : n-Laurylalkohol   |
| C <sub>7</sub> : n-Heptylalkohol | C <sub>13</sub> : n-Tridecylalkohol |
| C <sub>8</sub> : n-Octylalkohol  | (nicht geprüft)                     |
| C <sub>9</sub> : n-Nonylalkohol  | C <sub>14</sub> : n-Myristylalkohol |

Alle Alkohole wurden in einer Konzentration von 1,28 µMol/ml eingesetzt.

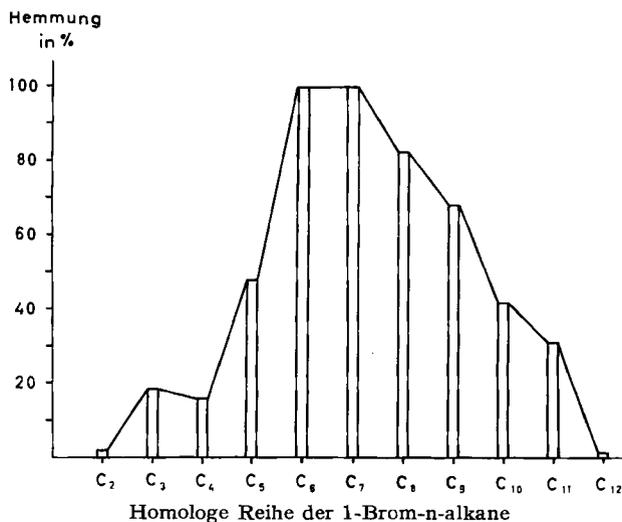


Fig. 3. Hemmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch 1-Brom-n-alkane

- |                                 |                                   |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| C <sub>2</sub> : Äthylbromid    | C <sub>8</sub> : n-Octylbromid    |
| C <sub>3</sub> : n-Propylbromid | C <sub>9</sub> : n-Nonylbromid    |
| C <sub>4</sub> : n-Butylbromid  | C <sub>10</sub> : n-Decylbromid   |
| C <sub>5</sub> : n-Amylbromid   | C <sub>11</sub> : n-Undecylbromid |
| C <sub>6</sub> : n-Hexylbromid  | C <sub>12</sub> : n-Dodecylbromid |
| C <sub>7</sub> : n-Heptylbromid |                                   |

Alle Alkylbromide wurden in einer Konzentration von 1,28 µMol/ml eingesetzt.

tase vollständig hemmt. Es zeigte sich nun, dass diese Wirkung auch am nicht extrahierten Enzymsystem zu beobachten ist. Die Hemmung dieses Vitamin-K<sub>2</sub>-Analoges ist jedoch über 30 Mal grösser als die des Isooctans. Für eine 50-proz. Hemmung des Enzyms werden 2,56  $\mu$ Mol Isooctan pro ml benötigt, während schon 0,08  $\mu$ Mol des Vitamin-K<sub>2</sub>-Isoprenologes das Enzym bereits zu 60 bis 70% hemmen.

Tabelle 3. Vergleich der hemmenden Wirkung von methylsubstituierten und unverzweigten Alkanderivaten

Zusätze (1,28 $\mu$ Mol/ml)	Enzymaktivität
—	100%
n-Hexanol(1) . . . . .	79,4%
3, 5, 5-Trimethyl-hexanol(1) . . . . .	81,4%
n-Pentan . . . . .	67,9%
Isooctan (2, 2, 4-Trimethyl-pentan) . . . . .	69,5%

Die durch dieses Vitamin-K<sub>2</sub>-Isoprenologe verursachte Hemmung lässt sich in gleicher Weise wie die Isooctan-Hemmung durch Vitamin K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, E, Ubichinon(50) Phytol und Squalen verhindern (Tab. 4). Glycerintristearat, Stearyl bromid und n-Octadecan zeigten, verglichen auf molarer Basis, eine geringe reaktivierende Wirkung (Tab. 5).

Tabelle 4. Reaktivierung der mit 2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphtochinon gehemmten Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch isoprenoide Substanzen

Zusätze (0,32 $\mu$ Mol/ml)	Enzymaktivität bei Inhibitor-Zusatz <sup>a)</sup>
—	34,5% <sup>b)</sup>
Vitamin K <sub>1</sub> . . . . .	95,7%
Phytol . . . . .	77,9%
Vitamin K <sub>2(30)</sub> . . . . .	92,4%
Squalen . . . . .	89,8%
dl- $\alpha$ -Tocopherol . . . . .	104,5%
Ubichinon(50) . . . . .	102,1%

<sup>a)</sup> 0,08  $\mu$ Mol 2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphtochinon/ml.  
<sup>b)</sup> Aktivität des nicht gehemmten Enzyms = 100%.

Tabelle 5. Reaktivierungsversuch der durch 2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphtochinon gehemmten Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase mit Glycerintristearat, Stearyl bromid und n-Octadecan

Zusätze (0,32 $\mu$ Mol/ml)	Enzymaktivität bei Inhibitor-Zusatz <sup>a)</sup>
—	31,1% <sup>b)</sup>
Glycerintristearat . . . . .	39,2%
Stearyl bromid . . . . .	37,4%
n-Octadecan . . . . .	36,5%

<sup>a)</sup> 0,08  $\mu$ Mol 2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphtochinon/ml.  
<sup>b)</sup> Aktivität des nicht gehemmten Enzyms = 100%.

**Experimentelles.** – Aufarbeitung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase aus den Sarkosomen von Schweineherzmuskeln und Durchführung der Aktivitätsmessungen haben wir bereits früher beschrieben<sup>1)</sup>. Sowohl die auf Hemmung als auch die auf Reaktivierung geprüften Substanzen wurden in Alkohol gelöst, mit Rinderserumalbumin suspendiert und auf äquimolarer Basis in den jeweils bei den Tab. und Fig. angegebenen Konzentrationen zu den für die Aktivitätsmessungen vorbereiteten Enzymsätzen zugegeben. Die Suspensionen wurden wie in den früheren Untersuchungen dargestellt<sup>1)</sup>. Die Enzymsätze ohne Zufügung eines Inhibitors oder reaktivierender Substanzen enthielten die gleiche Menge an Alkohol-Rinderserumalbumin-Lösung wie die Enzymsätze mit den entsprechenden Zusätzen.

Die prozentuale Aktivität der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase berechneten wir so, dass von je zwei bis vier Aktivitätsmessungen des unbehandelten Enzymsystems die durchschnittliche Extinktionszunahme bei 546  $\mu\mu$  nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Sek. jeweils als 100% gesetzt wurde. Die Durchführung dieser Bezugsmessungen des Enzyms ohne Inhibitor-Zusätze erfolgte bei jeder Versuchsserie. Bei Zugabe von Inhibitoren oder reaktivierender Substanzen zu den Enzymsätzen wurde in gleicher Weise aus zwei bis vier Aktivitätsmessungen die durchschnittliche Extinktionszunahme bei den gleichen Zeitpunkten ermittelt und nach den Bezugsmessungen in Prozent umgerechnet. Der auf diese Weise aus jeweils sechs Einzelmessungen ermittelte Durchschnitt der Enzymaktivität in Prozent ist in den Tab. 1 bis 5 eingetragen. Ein Beispiel für die Berechnung ist in Tab. 6 für die Hemmwirkung des n-Heptans gezeigt. Die Hemmwirkung von Inhibitoren (Fig. 1 bis 3) ergibt sich aus der Differenz der Aktivität des gehemmten Enzyms gegenüber der Aktivität von 100% des nicht gehemmten Enzymsystems.

Die Streuung der Aktivitätsmessungen lag innerhalb des Bereiches von  $\pm 5\%$ .

Tabelle 6. Hemmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch n-Heptan

Minuten	Enzymaktivität <sup>a)</sup>		Enzymaktivität bei n-Heptan-Zusatz in % der ursprünglichen Aktivität
	ohne Zusatz	mit n-Heptan <sup>b)</sup>	
0,5	0,0190	0,0047	24,7
1	0,0455	0,0100	22,0
1,5	0,0745	0,0173	23,2
2	0,1055	0,0257	24,4
2,5	0,1385	0,0373	26,9
3	0,1735	0,0470	27,1

Mittelwert  
24,7%<sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Dargestellt durch die zunehmende Extinktion bei 546  $\mu\mu$  als Mass für die Reduktion des Cytochroms c. Die Zahlen sind Durchschnittswerte aus je 4 Einzelmessungen.

<sup>b)</sup> 1,28  $\mu\text{Mol/ml}$  Enzymsatz.

<sup>c)</sup> Hemmwirkung des n-Heptans = 75,3%.

#### SUMMARY

Isooctane and other hydrocarbons inhibit the succinic-cytochrome c reductase of a *mitochondria* preparation. This inhibition is not only due to the lipid solubility of these substances, but is caused, moreover, by other structural properties. A distinct dependence on the length of the side-chain has been observed. Side-chains with 6 to 7 carbon atoms are the most active ones. Introduction of a hydroxyl group into the n-alkanes decreases the inhibitory effect, whereas it is increased by bromine substitution.

The vitamin K<sub>2</sub> analogue with a side-chain of one isoprene unit only is as inhibitor 30 times as active as isooctane.

In all cases the inhibition could be counteracted by isoprene-like substances, and this action, too, is dependent on the length of the side-chain. For an effective activation, however, longer chains are needed. Besides the length of the chains the activation is also dependent on the branching and the saturation degree. Saturated isoprenologues or such ones with isolated double bonds possess a marked activating effect. Unbranched chains, as well as branched ones with conjugated double bonds (vitamin A), show a weak activity or are entirely inactive. Such a selectivity is especially striking in the counteraction of the inhibition, caused by the above mentioned vitamin K<sub>2</sub> isoprenologue.

These results suggest that isoprene-like compounds are essential elements of the structure of the *mitochondria*.

Abteilung für Vitamin- und Ernährungs-Forschung der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG., Basel

---

### 138. Thermodynamische Funktionen von Propen

von H. Fuhrer und Hs. H. Günthard

(25. IV. 59)

**1. Einleitung.** – KILPATRICK & PITZER<sup>1)</sup> veröffentlichten die erste statistische Berechnung der thermodynamischen Funktion von Propen im idealisierten Gaszustand. Für den rotatorischen Anteil benützten sie ein aus Analogien mit andern Molekeln hergeleitetes Modell; die Schwingungsanteile wurden mit Hilfe von teils aus Beobachtungen, teils aus Analogien stammenden Grundtönen bestimmt, und schliesslich wurde die Potentialbarriere durch Vergleich kalorimetrischer Messungen der spezifischen Wärme<sup>2)</sup> und der Entropie<sup>3)</sup> bestimmt. In neuerer Zeit wurde das Mikrowellenspektrum des Propens eingehender untersucht<sup>4)</sup>. Die Analyse desselben lieferte genauere Hauptträgheitsmomente und zudem einen fast direkt gemessenen Wert für die Rotationsbarriere. Auch über das Schwingungsspektrum wurden mehrere eingehendere Arbeiten bekannt, von welchen wir nur diejenigen von SVERDLOV<sup>5)</sup> erwähnen. Diese letztere zeigt eine gute Übereinstimmung der Normalkoordinaten-Analyse mit den beobachteten und als Grundtöne zugeordneten Schwingungsübergängen. Es darf daher angenommen werden, dass die Zuordnung der Grundtöne keine wesentlichen Änderungen mehr erfahren wird. Ausgehend von diesen neuen Daten berechneten wir die thermodynamischen Funktionen des Propens in der Näherung des starren Rotators und harmonischen Oscillators erneut. Die neuen Zahlenwerte sind von den früheren nicht erheblich verschieden und stimmen mit den kalorimetrischen Messungen befriedigend überein.

---

<sup>1)</sup> J. E. KILPATRICK & K. S. PITZER, J. Research Natl. Bur. Standards **37**, 163 (1946).

<sup>2)</sup> G. B. KISTIAKOWSKY & W. W. RICE, J. chem. Physics **8**, 610 (1940).

<sup>3)</sup> T. M. POWELL & W. F. GIAUQUE, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2366 (1939).

<sup>4)</sup> D. R. LIDE & D. E. MANN, J. chem. Physics **27**, 867 (1957).

<sup>5)</sup> M. SVERDLOV, Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. **106**, 80 (1956).