

SUMMARY

The synthesis of a number of tocopheramines and N-alkyl-tocopheramines is described. The biological activity of the tocopheramines in the hemolysis test is shown to be similar to that of the corresponding tocopherols. N-Methylation has a varying influence. In the case of *d,l*- α -tocopheramine, the biological activity is reduced to less than a tenth by monomethylation, with *d,l*- β - and *d,l*- γ -tocopheramine however it is increased about fivefold and even surpasses the biological activity of *d,l*- α -tocopherol. N-Dimethylation leads in all cases to inactivation. N-Monomethyl-*d,l*- γ -tocopheramine was found to be inactive or at least much less active than the N-monomethyl derivative.

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

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. MAYER, P. SCHUDEL, R. RÜEGG & O. ISLER, *Helv.* **46**, 963 (1963).
- [2] P. SCHUDEL, H. MAYER, J. METZGER, R. RÜEGG & O. ISLER, *Helv.* **46**, 333 (1963), Fussnote 6.
- [3] O. HROMATKA, DRP 703957 (1941); USA-Patent 2358286 (1944); L. I. SMITH, W. B. RENFROW JR. & J. W. OPIE, *J. Amer. chem. Soc.* **64**, 1082 (1942).
- [4] L. FRIEDMAN, W. WEISS, F. WHERRY & O. L. KLINE, *J. Nutr.* **65**, 143 (1958).
- [5] G. S. HAMMOND, C. E. BOOZER, C. E. HAMILTON & J. N. SEN, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3238 (1955); G. SCOTT, *Chemistry & Ind.* **1963**, 271.
- [6] U. GLOOR, H. WEISER & O. WISS, *Federation European Biochemical Soc., 2nd Meeting, Abstracts*, Vienna 1965.

267. Resorption, Retention, Verteilung und Stoffwechsel des *d,l*- α -Tocopheramins, *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramins und des γ -Tocopherols im Vergleich zum *d,l*- α -Tocopherol bei der Ratte

von U. Gloor, J. Würsch, U. Schwieter und O. Wiss

(3. IX. 66)

Es konnte gezeigt werden, dass Stickstoffanaloge der Tocopherole Vitamin-E-Wirkung besitzen. Während der Ersatz der Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe die biologische Aktivität wenig beeinflusst, hat N-Methylierung im Falle des α -Tocopheramins eine Inaktivierung, im Falle des β - und γ -Tocopheramins eine erhebliche Steigerung der Vitamin-E-Wirkung zur Folge [1]. Untersuchungen über Resorption, Retention und Verteilung dieser Verbindungen sollten ermöglichen, Aufschluss über mögliche Ursachen dieses Verhaltens zu bekommen.

Experimenteller Teil

1. *Synthese der ¹⁴C-markierten Tocopheramine.* – *d,l*- α -Tocopheramin-3,4-^{[14}C]. Eine Mischung von 600 mg 2,3,5-Trimethyl-4-formylamino-phenol und 1,0 g Isophytol-1,2-^{[14}C] [2] in 5 ml 100-proz. Ameisensäure wurde unter Rühren und Argonbegasung 22 Std. unter Rückfluss im Bad von 130° erhitzt. Es bildeten sich zwei Schichten. Nach Abkühlung im Eisbad setzte man 20 ml Eiswasser zu und extrahierte mit Äther. Der Ätherextrakt wurde von Ameisensäure durch Ausschüteln befreit und lieferte nach dem Eindampfen 1375 mg N-Formyl- α -tocopheramin-3,4-^{[14}C].

Die Hälfte davon verseifte man durch vierstündiges Erhitzen unter Rückfluss in einer Lösung von 3 ml Alkohol und 0,9 ml konz. Salzsäure. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Wasserstrahlvakuum arbeitete man mit Chloroform auf. Das Rohprodukt wurde an Silicagel chromatographiert. Kleinere Mengen von Verunreinigungen liessen sich mit Petroläther und Benzol auswaschen. Das α -Tocopheramin wurde schliesslich mit Äther eluiert und nach Abdampfen des Lösungsmittels im Kragenkölbchen im Hochvakuum destilliert: 400 mg (54% d. Th., bezogen auf Isophytol) eines Produktes mit $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 79,5$ (300 nm, Feinsprit) und einer spez. Aktivität von 5,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Im Dünnschichtchromatogramm (Silicagel; Laufmittel Äther-Petroläther 8:2; Sprühmittel Phosphormolybdänsäure oder α, α' -Dipyridyl- Fe^{III} -chlorid) erwies es sich als frei von radioaktiven und nicht-radioaktiven Verunreinigungen.

d,1-N-Methyl- γ -tocopheramin-3,4- ^{14}C . 2,3-Dimethyl-4-formylamino-phenol wurde auf gleiche Weise, wie bei α -Tocopheramin beschrieben, mit Isophytol-1,2- ^{14}C zu N-Formyl- γ -tocopheramin-3,4- ^{14}C umgesetzt. Die Hälfte des erhaltenen Rohproduktes (690 mg) wurde über Nacht mit 150 mg Lithiumaluminiumhydrid in 10 ml reinem Tetrahydrofuran unter Rückfluss gekocht, anschliessend wurde im Eisbad gekühlt und mit Wasser zersetzt. Das Gemisch wurde mit Chloroform extrahiert und das rohe N-Methyl- γ -tocopheramin an Silicagel chromatographisch vorgereinigt. Man destillierte im Hochvakuum bei 200° Badtemperatur (0,001 Torr) und unterzog das Destillat einer Feinchromatographie an Silicagel, wobei alle Eluate dünn-schichtchromatographisch geprüft wurden. Die reinen Fraktionen (248 mg) zeigten $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 77$ (306 nm, Feinsprit), spez. Aktivität 5,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

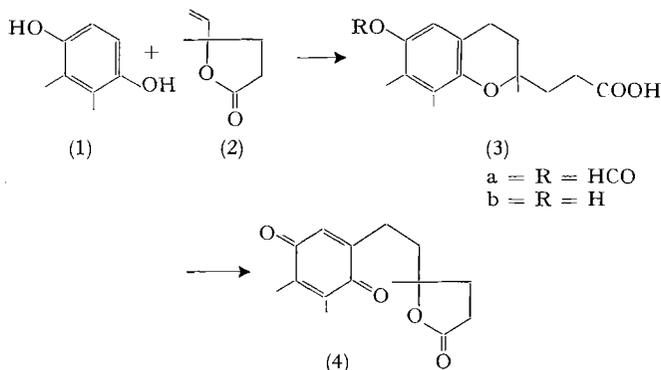
2. *Synthese der ^{14}C -markierten Tocopherole.* – d,1- α -Tocopheryl-3,4- ^{14}C -acetat. In einem trockenen 4-Hals-Sulfierkolben von 50 ml mit Rührer, Rückflusskühler, Tropftrichter und Gaseinleitungsrohr legte man 350 mg Trimethylhydrochinon und 55 mg wasserfreies Zinkchlorid in 5 ml hochsiedendem Petroläther vor. Unter kräftigem Rühren leitete man über konz. Schwefelsäure getrockneten Chlorwasserstoff ein, erwärmte auf 85° und liess innert 45 Min. 700 mg Isophytol-1,2- ^{14}C , gelöst in 1 ml hochs. Petroläther, eintropfen. Nach Nachspülen mit 1 ml Petroläther rührte man noch 2 Std. bei 90° unter ständigem Einleiten von Chlorwasserstoff. Dann kühlte man ab, spülte das Gemisch mit Petroläther und 85-proz. Methanol in einen Scheidetrichter, extrahierte dreimal mit 85-proz. Methanol, wusch die Petrolätherschicht zweimal mit Wasser und dampfte ab. Es blieben 1010 mg Rohtocopherol, die in 3 ml Acetanhydrid 4 Std. auf 140° erwärmt wurden. Alle 20 Min. wurden einige Tropfen des Lösungsmittels abdestilliert zur Entfernung entstandener Essigsäure. Dann nahm man in Petroläther auf, entfernte im Wasserstrahlvakuum bei 80° alle Lösungsmittel und destillierte den Rückstand im Hochvakuum (0,001 Torr) bei 200–210°: 945 mg Tocopheryl-3,4- ^{14}C -acetat von 98% Reinheit (Dünnschichtchromatographie) mit einer spez. Aktivität von 13,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; Ausbeute 85%, bezogen auf Isophytol-1,2- ^{14}C .

d,1- γ -Tocopherol-3,4- ^{14}C . Zu 358 mg 2,3-Dimethylhydrochinon in 2 ml 100-proz. Ameisensäure wurden unter Rückfluss und Rühren innert 1 Std. 700 mg Isophytol-1,2- ^{14}C getropft; man kochte noch 3 Std. unter Rückfluss, destillierte dann die Ameisensäure im Wasserstrahlvakuum ab und verseifte den Rückstand durch 2stdg. Erhitzen unter Rückfluss mit 0,7 ml 50-proz. Schwefelsäure und 3,5 ml Methanol. Nach Abkühlen und Verdünnen mit Wasser extrahierte man mit Petroläther, wusch die Petrolätherphase mit 80-proz. Methanol und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wurde an Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe 11 chromatographiert, wobei nach den mit Petroläther und Benzol eluierten Verunreinigungen das reine γ -Tocopherol mit Äther erschien. Man destillierte die Hauptfraktion im Hochvakuum bei ca. 200° Badtemperatur und erhielt 534 mg reines γ -Tocopherol-3,4- ^{14}C mit einer spez. Aktivität von 4,5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

3. *Synthese von 2- β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)-äthyl)-5,6-dimethyl-p-benzochinon* (*γ-SIMON-Metabolit*). Zu einer siedenden Lösung von 50 g 2,3-Dimethylhydrochinon (1) in 350 ml Ameisensäure wurden unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre 50 g γ -Vinyl- γ -valerolacton (2) innerhalb von einer Stunde getropft. Nach drei Stunden weiterem Erhitzen wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das rohe 2,7,8-Trimethyl-2-(β -carboxyäthyl)-6-formylöxychroman (3a) wurde mit 200 ml 50-proz. Schwefelsäure und 600 ml Methanol zwei Std. zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene 2,7,8-Trimethyl-2-(β -carboxyäthyl)-6-hydroxychroman (3b) (99 g)

wurde an 3 kg Kieselgel (MERCK, 0,2–0,5 mm, zur Säulenchromatographie) chromatographiert. In Benzol aufgetragen, wurde mit Petroläther (Sdp. 40–45°) mit steigendem Ätherzusatz eluiert. Die bis 40% Ätherzusatz erhaltenen Eluate (9,1 g) wurden verworfen. Anschliessend wurde mit Äther eluiert: 65,3 g.

38 g dieses Eluates wurden in 2500 ml Methanol gelöst und unter Rühren bei 0° mit einer Lösung von 35 g Cer(IV)-sulfat und 40 ml konz. Schwefelsäure in 1600 ml Wasser tropfenweise



versetzt. Eine halbe Stunde nach beendetem Zutropfen wurden 600 g Ammoniumchlorid zugegeben. Es wurde mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt mehrfach mit gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen, getrocknet, filtriert und eingedampft.

Den Rückstand (26,3 g) chromatographierte man an 800 g Kieselgel. Äther eluierte das 2-[[β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)-äthyl]-5,6-dimethyl-*p*-benzochinon (4) (14,6 g), das aus Äthanol umkristallisiert wurde; gelbe Nadeln, Smp. 47–48,5°, Abs.-Max. bei 255 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 735$ (in Feinsprit).

4. *Isolierungsversuche.* Es wurden männliche Ratten von ca. 150 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden vor der oralen Applikation der verschiedenen Substanzen über Nacht nüchtern gehalten. Für die Verteilungsstudien in den verschiedenen Organen und für die quantitative Bestimmung der Ausscheidung im Urin wurden je 2 mg/Tier verabreicht. Für die Isolierung und Identifizierung der Metabolite aus der Leber und dem Urin erhielten die Tiere 10–15 mg in ein- oder mehrmaliger Dosierung.

Die einzelnen Dosen der verschiedenen Substanzen wurden den Tieren als Emulsion in 0,5 bzw. 1 ml Tween 80/physiol. NaCl-Lösung (5% Tween-80-Endkonzentration) verabreicht.

Die Radioaktivität sowohl der Frischorgane und des Urins als auch der isolierten Metabolite bzw. deren Derivate wurde nach Verbrennung [3] und Messung im Tri-Carb-Scintillationszähler 314 A bei einer Zählausbeute von 43% für ^{14}C bestimmt.

Für die Ausscheidungsversuche wurden die Tiere drei bis vier Tage in Stoffwechsellkäfigen gehalten und der Urin unter Trockeneiskühlung gesammelt.

Die Metabolite wurden mittels Isotopen-Verdünnungsmethode isoliert. Die «SIMON-Metabolite» wurden bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert. Beim Versuch, eventuell intermediär gebildetes α -Tocopherol nachzuweisen, wurde nach Zusatz von Träger das *p*-Phenylazobenzoat dargestellt. Das α -Tocopherolchinon wurde nach katalytischer Hydrierung und anschliessender Cyclisierung zum Tocopherol ebenfalls als *p*-Phenylazobenzoat, das α -Tocopheramin in Form seines *p*-Nitrobenzamids als kristallines Derivat nachgewiesen.

Ia) *Versuch zur Isolierung von α -Tocopherol aus der Leber nach Verabreichung von ^{14}C -*d,l*- α -Tocopheramin.* Zwei Ratten erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je 3 mg ^{14}C -*d,l*- α -Tocopheramin (spez. Aktivität: 5,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$).

Sechs Std. nach der letzten Gabe wurden die Tiere durch Decapitieren getötet. Nach Zusatz von 1 g *d,l*- α -Tocopherylacetat wurden die frisch entnommenen Lebern mit der doppelten Menge methanolischer 30-proz. Kalilauge und einem Überschuss an Pyrogallol unter N_2 unter Rückfluss während 30 Min. verseift. Das Unverseifbare wurde mit Äther extrahiert und ergab einen Rückstand von 960 mg, der 4,1% der verabreichten Radioaktivität enthielt.

Chromatographie des Unverseifbaren an 30 g Alox I + 7% H₂O: Mit den Lösungsmittelgemischen Petroläther/Äther 95/5 und 90/10 wurden 485 mg dünn-schichtchromatographisch ziemlich reines Tocopherol erhalten.

Veresterung mit p-Phenylazobenzoylchlorid: Die gereinigten Tocopherol-Fractionen wurden in abs. Benzol gelöst und mit 0,8 g p-Phenylazobenzoylchlorid, ebenfalls in abs. Benzol gelöst, und 4 ml abs. Pyridin versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschliessend noch 1½ Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wurden Petroläther/Äther und Wasser zugegeben und die festen Teile abgenutscht. Das Filtrat wurde mit 5-proz. NaHCO₃, 0,3N HCl und dann mit Wasser neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels verblieben 804 mg dunkelrotes Öl. Durch Chromatographie an 25 g Alox I + 7% H₂O und Elution mit Petroläther/Äther liessen sich 265 mg dünn-schichtchromatographisch einheitlicher Ester gewinnen, der viermal aus Benzol/Äthanol erst bei 4°, dann bei -20° bis zum konstanten Schmelzpunkt von 70–71° umkristallisiert wurde. Alle vier Kristallisate waren inaktiv.

Ib) *Versuch zur Isolierung von α-Tocopherol aus Leber und Niere von Vitamin-E-Mangel-Ratten nach Verabreichung von [¹⁴C]-d,l-α-Tocopheramin*. Der Versuch Ia wurde mit zwei Ratten wiederholt, die seit vier Monaten auf Vitamin-E-freier Diät gehalten worden waren, in der Annahme, dass möglicherweise die Bildung von α-Tocopherol aus α-Tocopheramin durch Mangel induziert würde.

Die Tiere erhielten *per os* an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 5 mg [¹⁴C]-d,l-α-Tocopheramin und wurden 4 Std. nach der letzten Gabe getötet. Die Lebern und Nieren wurden entnommen und je mit 1 g d,l-α-Tocopherylacetat versetzt. Verseifung und Extraktion erfolgten analog Versuch Ia.

Im Leber-Unverseifbaren wurden 17,1%, im Nieren-Unverseifbaren 0,18% der verabreichten Radioaktivität gefunden.

Reinigung des Tocopherols durch Chromatographie und anschliessende Veresterung erfolgten auf gleiche Weise wie in Versuch Ia. Sowohl die Kristallisate aus der Leber als auch die aus der Niere waren inaktiv.

IIa) *Isolierung von α-Tocopherolchinon aus der Leber nach Verabreichung von [¹⁴C]-d,l-α-Tocopheramin*. Zwei Ratten wurden zweimal im Abstand von 2 Std. je 5 mg [¹⁴C]-d,l-α-Tocopheramin verabreicht.

Vier Std. nach der zweiten Gabe wurden die Tiere getötet und ihre Lebern entnommen.

Extraktion des α-Tocopherolchinons: Da α-Tocopherolchinon in alkalischem Milieu zerstört wird, konnte das Fett nicht verseift werden.

Die beiden Lebern wurden nach Zusatz von 1 g α-Tocopherolchinon mit der vierfachen Menge Na₂SO₄ im Mörser verrieben. Das Pulver wurde mit 150 ml Äther über Nacht unter Stickstoff stehengelassen. Nach Abnutschen des Filtrats wurde nochmals mit 100 ml Äther versetzt, eine Std. stehengelassen und wieder abgenutscht. Die vereinigten Filtrate ergaben 1,58 g Rückstand, der 9% der verabreichten Radioaktivität enthielt.

Chromatographie des Fettextraktes: 1,58 g Extrakt wurden an 45 g Alox I + 7% H₂O chromatographiert. Es wurden mit den Lösungsmittelgemischen Petroläther/Äther 98/2, 95/5 und 80/20 je zwei Fractionen zu je 100 ml entwickelt, deren Aktivitäten bestimmt wurden. Eine erste Radioaktivitätsspitze wurde mit 98/2 eluiert (ca. die Hälfte der Gesamtaktivität), die dem unveränderten α-Tocopheramin zukommt (vgl. Versuch IV). Mit 80/20 wurde das α-Tocopherolchinon eluiert, wobei die Aktivitätskurve parallel zur Gewichtskurve verlief. Die dünn-schichtchromatographisch reinsten Fractionen ergaben einen Rückstand von 860 mg.

Katalytische Reduktion und Cyclisierung des Hydrochinons: Die gereinigten α-Tocopherolchinon-Fractionen wurden in 150 ml Petroläther, Sdp. 60–90°, gelöst und mit 5 g Pd/BaSO₄ (nicht vorhydriert) reduziert. Die H₂-Aufnahme war nach ca. 15 Min. beendet. Der Katalysator wurde mit Hyflo Supercel abgenutscht und mit Methylenchlorid nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit 3 ml BF₃-Ätherat versetzt und 1 Std. unter Rückfluss bei 90° gekocht. Dann wurde neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand von rohem Tocopherol (830 mg) wurde an 24 g Alox I + 7% H₂O chromatographiert. Mit Petroläther/Äther 98/2 und 95/5 wurden 595 mg dünn-schichtchromatographisch ziemlich reines Tocopherol eluiert, dessen spezifische Aktivität gemessen wurde. Umgerechnet auf die 1000 mg als Träger zugesetztes Chinon würde die dem α-Tocopherolchinon zukommende Aktivität ca. 25% der Gesamtaktivität im Leberextrakt ausmachen.

Die Veresterung mit *p*-Phenylazobenzoylchlorid erfolgte analog Versuch Ia. Die vier erhaltenen Kristallisate hatten einen konstanten Smp. und eine konstante spezifische Aktivität, die der molaren spezifischen Aktivität des oben genannten Tocopherols entsprach.

II b) *Kontrollversuch: Zusatz von [¹⁴C]-d, l- α -Tocopheramin zu Rattenleber und anschließende Isolierung von α -Tocopherolchinon.* Um zu untersuchen, ob es sich bei dem in Versuch IIa gebildeten α -Tocopherolchinon nicht um ein Autoxydationsprodukt handelt, wurden 2 mg *d, l- α -Tocopheramin* (spez. Aktivität ca. 0,4 μ Ci/mg) und 1 g inaktives α -Tocopherolchinon einer frisch entnommenen Leber zugesetzt. Extraktion, Chromatographie des Chinons, Reduktion und Cyclisierung des Hydrochinons sowie Veresterung erfolgten wie in Versuch IIa.

Die vier Kristallisate zeigten bei konstantem Smp. eine konstante spezifische Aktivität, die jedoch sechsmal tiefer lag als diejenige aus dem *in-vivo*-Versuch IIa, so dass es sich bei dem α -Tocopherolchinon in Versuch IIa sicher um ein Intermediärprodukt des Tocopheramins handelt.

III) *Isolierung von γ -Tocopherolchinon nach Verabreichung von [¹⁴C]-d, l-N-Methyl- γ -tocopheramin.* Zwei Ratten wurden im Abstand von 2 Std. je 5 mg [¹⁴C]-*d, l-N-Methyl- γ -tocopheramin* (spez. Aktivität 5,3 μ Ci/mg) verabreicht. Die Tiere wurden 4 Std. nach der zweiten Gabe getötet. Den frisch entnommenen Lebern wurde 1 g γ -Tocopherolchinon als Träger zugesetzt und analog Versuch IIa nach Reduktion und Cyclisierung das *p*-Phenylazobenzooat des γ -Tocopherols als kristallines Derivat dargestellt.

Die vier Kristallisate zeigten bei konstantem Smp. eine konstante spezifische Aktivität, die jedoch tiefer lag als nach Verabreichung von *d, l- α -Tocopheramin*.

IV) *Isolierung von α -Tocopheramin aus Rattenleber nach Verabreichung desselben.* Die aus Versuch Ia stammenden α -Tocopheramin-Fractionen nach Chromatographie an Alox I + 7% H₂O, die 80% der Gesamtaktivität im Leber-Unverseifbaren enthielten, wurden nach Zusatz von 490 mg *d, l- α -Tocopheramin* als Träger an 20 g Silicagel chromatographiert (Elution mit Petroläther/Äther 90/10 und Äther). Die Äther-Fractionen ergaben einen Rückstand von 320 mg, der dünn-schichtchromatographisch als reines α -Tocopheramin identifiziert wurde.

Darstellung des p-Nitrobenzamids: Eine Lösung von 320 mg *d, l- α -Tocopheramin* in abs. Benzol wurde mit 350 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid versetzt, 20 Min. unter Rückfluss gekocht, nach Abkühlen mit je 5 ml 2-proz. Na₂CO₃, 2-proz. HCl und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ filtriert. Das Filtrat wurde an 15 g Alox I + 7% H₂O chromatographiert und mit Benzol eluiert. Eine zitronengelbe, das Amid enthaltende Bande ergab einen Rückstand von 267 mg, der aus Äthanol bei 4° viermal umkristallisiert wurde.

Die Kristallisate zeigten bei einem konstanten Smp. von 146–150° eine konstante spezifische Aktivität.

V) *Isolierung von 2-[β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)-äthyl]-3,5,6-trimethyl-benzochinon (α -SIMON-Metabolit).* Zwei Ratten wurden je 10 mg [¹⁴C]-*d, l- α -Tocopheramin* verabreicht. Der Urin wurde drei Tage bei Trockeneiskühlung gesammelt, durch Decalite Speedex filtriert und auf 50 ml konzentriert.

Spaltung des Konjugates und Extraktion: 50 ml Urin-Konzentrat wurden nach Zusatz von 20 mg α -SIMON-Metabolit [4] als Träger mit 50 ml 6N HCl unter Rückfluss 1½ Std. unter N₂ gekocht. Nach Abkühlen wurde viermal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigester-Extrakte wurden neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft: 144 mg. Rund 80% der ausgeschiedenen Radioaktivität lag nun im Essigester-Extrakt vor.

Präparative Abtrennung des α -SIMON-Metaboliten auf Dünnschichtplatten: Der Essigester-extrakt-Rückstand wurde quantitativ auf 6–7 Silicagel-Platten mit 2% Leuchtstoff ZS Super in dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Äther/Äthanol 16/4/3 aufgetrennt, der SIMON-Metabolit-Streifen unter der kurzwelligen UV.-Lampe bezeichnet, abgekratzt und mit Äthanol eluiert. Die Hauptaktivität lag¹ in diesem Streifen vor. Anhand des UV.-Spektrums wurde der Gehalt an SIMON-Metabolit bestimmt. Es zeigte sich, dass durch die hydrolytische Spaltung rund 50% des als Träger zugesetzten Metaboliten zerstört werden. Parallel zu dem Verlust an Träger geht ein Verlust an Radioaktivität. Es wurden nochmals ca. 120 mg Träger zugesetzt und viermal aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert.

Die Kristallisate zeigten einen konstanten Smp. von 65,5–67° und eine konstant bleibende spezifische Aktivität.

VI) *Versuch zur Isolierung des α -SIMON-Metaboliten nach Verabreichung von $[^{14}\text{C}]$ -d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin.* Zwei Ratten wurden je 10 mg $[^{14}\text{C}]$ -d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin (spez. Aktivität 5,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) verabreicht. Der Urin wurde drei Tage gesammelt und analog Versuch V aufgearbeitet. Alle vier Kristallisate waren inaktiv.

VII) *Isolierung des γ -SIMON-Metaboliten nach Verabreichung von $[^{14}\text{C}]$ -d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin.* Zwei Ratten wurden je 10 mg $[^{14}\text{C}]$ -d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin verabreicht. Der Urin wurde drei Tage gesammelt, filtriert und auf 50 ml konzentriert. Zur hydrolytischen Spaltung des Glucuronids wurden diesmal 50 ml nur 3 N HCl zugesetzt, da sich der γ -SIMON-Metabolit in stärker saurem Milieu zersetzt. Die Hydrolyse wurde bei 75–80° durchgeführt. Die Extraktion und weitere Aufarbeitung erfolgten analog Versuch V. Der gereinigte γ -SIMON-Metabolit wurde viermal aus 80-proz. Äthanol bei –20° kristallisiert.

Die vier Kristallisate zeigten bei einem konstanten Smp. von 48–50° eine konstante spezifische Aktivität.

VIII) *Isolierung des γ -SIMON-Metaboliten [5] nach Verabreichung von $[^{14}\text{C}]$ -d,l- γ -Tocopherol.* Zwei Ratten wurden je 10 mg $[^{14}\text{C}]$ -d,l- γ -Tocopherol (spez. Aktivität 4,5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) verabreicht. Der γ -SIMON-Metabolit wurde aus dem Drei-Tage-Urin analog Versuch VII isoliert. Die vier Kristallisate zeigten ebenfalls eine konstante spezifische Aktivität.

Ergebnisse

1) *Resorption und Retention.* α -Tocopherol wird unvollständig resorbiert. Verschiedenheit der Resorption zwischen den Tocopheraminen könnte zumindest teilweise für die unterschiedliche biologische Wirksamkeit verantwortlich sein. Für die Beurteilung der Resorption des α -Tocopherols und seiner Derivate schien es im Hinblick auf die verhältnismässig langsame Resorption und die selektive Anreicherung in einzelnen Organen zweckmässig, den Gesamtgehalt im Körper zu ermitteln, anstatt ihre Konzentration im Blut zu verfolgen. Zu diesem Zweck wurden radioaktiv markierte Substanzen verabreicht und die Aktivitäten der wichtigsten Organe und Gewebe, mit Ausnahme derjenigen des Magendarmtraktes, summiert.

In Tabelle I sind die Ergebnisse über die Resorption und Retention von d,l- α -Tocopherylacetat, d,l- α -Tocopheramin, d,l- γ -Tocopherol und d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin zusammengestellt; Tabelle II enthält die Ausscheidungswerte bis zu 72 Stunden.

Die maximalen Resorptionswerte liegen bei ca. 10% der verabreichten Dosis. Der etwas tiefere Wert von 8,1% für das γ -Tocopherol mag dadurch bedingt sein, dass

Tabelle I. *Resorption und Retention nach oraler Verabreichung von je 2 mg d,l- α -Tocopherylacetat, d,l- α -Tocopheramin, d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin und d,l- γ -Tocopherol (% der verabreichten Dosis, gefunden im Körper). Durchschnittswerte von je zwei Tieren*

Zeit	d,l- α -Tocopherylacetat	d,l- α -Tocopheramin	d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin	d,l- γ -Tocopherol
1/2 h	0,3	0,4	0,5	1,6
2 h	4,8	7,0	8,0	3,7
4 h	11,3	8,1	8,1	8,1
8 h	10,0	11,3	9,8	5,0
24 h	9,2	8,6	8,4	1,5
4 Tage	4,2	8,6	–	1,1
8 Tage	6,3	7,6	4,4	0,95
11 Tage	3,2	5,6	2,0	0,9
18 Tage	2,7	4,4	1,6	1,3

Tabelle II. *Ausscheidung im Harn von Ratten nach oraler Verabreichung von je 2 mg d,l- α -Tocopherol, d,l- α -Tocopheramin, d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin und d,l- γ -Tocopherol in % der verabreichten Dosis*
Durchschnittswerte von je zwei Tieren

Std.	<i>d,l-α-Tocopherol</i>	<i>d,l-α-Tocopheramin</i>	<i>d,l-N-Methyl-γ-tocopheramin</i>	<i>d,l-γ-Tocopherol</i>
0-24	4,65	2,2	2,4	10,5
24-48	2,32	6,0	1,6	4,2
48-72	0,43	0,2	0,3	0,3
Total	7,4	8,4	4,3	15,0

Resorption und Ausscheidung sich möglicherweise überschneiden, da das *d,l- γ -Tocopherol* erheblich schneller ausgeschieden wird als die übrigen (Tabelle II).

Die Zweistundenwerte der resorbierten Mengen (Tabelle I) zeigen, dass die Tocopheramine etwas schneller resorbiert werden als die Tocopherole.

Bei der Messung der Retention über längere Zeitperioden fällt auf, dass sie bei *d,l- γ -Tocopherol* viel kürzer ist als bei den drei übrigen. Minimalwerte von ca. 1% der verabreichten Dosis, entsprechend einer Durchschnittskonzentration von 0,1-0,2 ppm in den Geweben, scheinen über sehr lange Zeit, d. h. über mehrere Wochen, bei allen vier Substanzen erhalten zu bleiben. Solche Minimalwerte sind beim *d,l- γ -Tocopherol* schon nach ca. 24 Std. erreicht, während dies bei den übrigen erst nach mehreren Tagen der Fall ist. *d,l- γ -Tocopherol* ist biologisch ca. fünfmal weniger aktiv als *d,l- α -Tocopherol*, *d,l- α -Tocopheramin* und *d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin*. Die mitgeteilten Ergebnisse zeigen, dass dieser Unterschied nicht durch verschiedene Resorption, wohl aber durch verminderte Retention des *d,l- γ -Tocopherols* in den Geweben bedingt sein kann.

2. *Verteilung*. In früheren Untersuchungen hat sich ergeben, dass sich α -Tocopherol hinsichtlich Verteilung in den verschiedenen Organen ungewöhnlich verhält. Auf eine anfängliche Anreicherung in der Leber, deren Maximum nach wenigen Stunden erreicht ist, folgt ein späterer Anstieg in anderen Organen, wobei die Nebennieren so bevorzugt werden, dass die Konzentration Werte erreicht, die ca. hundertmal höher liegen als jene anderer Organe, wie Muskel, Herz und Hirn. Im Hinblick auf die unterschiedliche biologische Aktivität haben wir die Verteilung von *d,l- α -Tocopheramin*, *d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin* und *d,l- γ -Tocopherol* mit jener von *d,l- α -Tocopherol* verglichen (Tab. III). Die Ergebnisse zeigen, dass *d,l- α -Tocopheramin* und *d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin* sich grundsätzlich gleich verhalten wie *d,l- α -Tocopherol*. Die beobachteten Abweichungen können im Hinblick auf die Grösse der biologischen Schwankungen nicht als signifikant betrachtet werden. Eindeutige Unterschiede ergaben sich jedoch zum *d,l- γ -Tocopherol*. Wohl besteht insofern eine Übereinstimmung, als zuerst der Gehalt in der Leber ansteigt, gefolgt von einer gewissen Anreicherung in anderen Organen. Mit Ausnahme der Leber bleiben aber die Werte erheblich tiefer und fallen viel schneller ab.

3. *Stoffwechsel*. Im Zusammenhang mit der Beobachtung der erheblichen Vitamin-E-Wirksamkeit des *d,l- α -Tocopheramins* bzw. des *N-Methyl- γ -tocopheramins* schien es von Interesse, den Stoffwechsel dieser Verbindungen zu untersuchen. Vorerst war zu klären, ob die biologische Aktivität auf intermediäre Umwandlung in α -Tocopherol zurückgeführt werden kann. Im Falle des α -Tocopheramins wäre ein Ersatz der

Tabelle III. Verteilung in verschiedenen Organen nach oraler Verabreichung von je 2 mg *d,l*- α -Tocopherylacetat, *d,l*- α -Tocopheramin, *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin und *d,l*- γ -Tocopherol ($\mu\text{g/g}$ Organ-Frischgewicht)

Verbindung	Organ	2 Std.	4 Std.	8 Std.	24 Std.	4 Tage	8 Tage
<i>d,l</i> - α -Tocopherol	Leber	8,9	17,2	10,2	7,6	1,5	1,3
	Herz	0,7	1,1	1,2	1,9	1,6	2,3
	Muskel	0,22	0,28	0,3	0,6	0,4	0,48
	Hirn	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,6
	Nebennieren	3,2	12,5	21,5	64,5	10,9	2,7
<i>d,l</i> - α -Tocopheramin	Leber	23,1	24,1	26,6	6,0	4,7	2,9
	Herz	1,2	1,0	1,5	2,1	3,1	2,6
	Muskel	0,08	0,2	0,4	0,6	0,8	0,8
	Hirn	0,07	0,13	0,2	0,3	0,3	0,4
	Nebennieren	4,1	15,0	37,0	50,0	36,9	12,5
<i>d,l</i> -N-Methyl- γ -tocopheramin	Leber	26,5	37,4	24,2	10,7	2,4	1,9
	Herz	1,5	1,6	1,0	1,9	1,2	1,4
	Muskel	0,1	0,3	0,8	0,5	0,3	0,5
	Hirn	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
	Nebennieren	9,6	12,8	24,2	53,2	10,6	4,6
<i>d,l</i> - γ -Tocopherol	Leber	12,3	25,8	11,9	1,2	0,4	0,1
	Herz	1,4	2,7	1,5	0,9	0,6	0,3
	Muskel	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
	Hirn	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,05
	Nebennieren	3,8	10,2	18,9	11,6	1,5	0,5

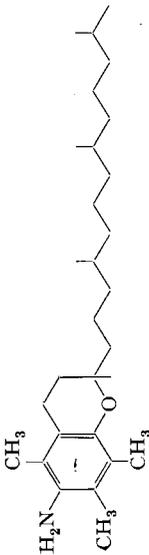
Amino- durch eine Hydroxylgruppe, im Falle des N-Methyl- γ -tocopheramins vor- gängig eine Transferierung der N-Methyl-Gruppe in die 5-Stellung, nötig gewesen. Mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode durch Verwendung von [^{14}C]-*d,l*- α -Tocopheramin konnte gezeigt werden, dass weder *d,l*- α -Tocopheramin noch N-Methyl- γ -tocopheramin in Tocopherol umgewandelt werden. Die verwendete Methode hätte es erlaubt, neu gebildetes α -Tocopherol nachzuweisen, auch wenn erheblich weniger als 1% der verabreichten Menge der Tocopheramine umgewandelt worden wäre.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass α -Tocopherol im Stoffwechsel zum Tocopherolchinon und nach oxydativer Verkürzung der Seitenkette um 13 C-Atome zum sogenannten SIMON-Metaboliten abgebaut werden kann, der als Konjugat, vermutlich als Glucuronid, im Harn ausgeschieden wird [6]. Nach Verabreichung von ^{14}C -markiertem *d,l*- α -Tocopheramin und *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin und durch Verwendung der entsprechenden synthetisch hergestellten Tocopherolchinone und SIMON-Metabolite als Träger konnte mit der Isotopenverdünnungsmethode gezeigt werden, dass diese als Metabolite gebildet werden. Es ist somit die in folgendem Schema dargestellte Reaktionsfolge im Stoffwechsel anzunehmen.

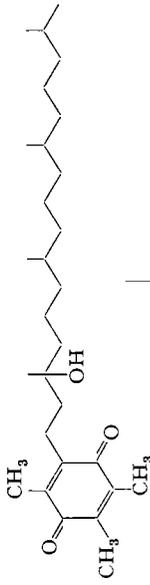
Diskussion. – Die gegenwärtigen Kenntnisse über den Mechanismus der biologischen Wirkung des α -Tocopherols auf molekularer Ebene lassen noch viele Fragen offen. Mit einiger Sicherheit scheint festzustehen, dass die antioxydative Wirkung zumindest für einen Teil seiner biologischen Aktivität verantwortlich ist. Weitgehend ungeklärt erscheint jedoch die ausgeprägte Selektivität der α -Tocopherolwirkung,

Metabolisierungsschema

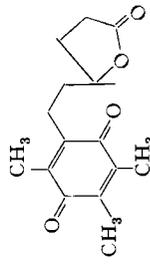
d,l- α -Tocopheramin



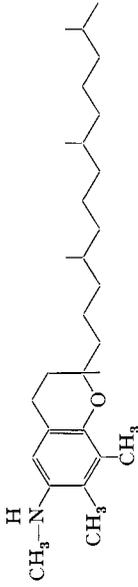
α -Tocopherolchinon



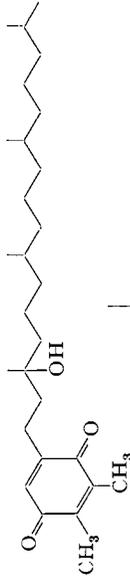
« α -SIMON-Metabolit»



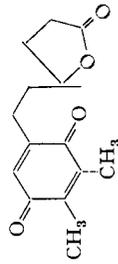
d,l-N-Methyl- γ -tocopheramin



γ -Tocopherolchinon



« γ -SIMON-Metabolit»



insofern als Antioxydantien von anderer chemischer Struktur, wenn überhaupt, viel geringer wirksam sind. Mit den Tocopheraminen wurde zum erstenmal eine Verbindungsklasse gefunden, die eine gleiche, z. T. sogar höhere Vitamin-E-Wirksamkeit besitzt als die α -Tocopherole [1].

d,l- α -Tocopheramin und *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin werden im Stoffwechsel nicht in α -Tocopherol umgewandelt. Es muss deshalb angenommen werden, dass ihnen als solche Vitamin-E-Wirkung zukommt. Die Endprodukte ihres Stoffwechsels sind jedoch identisch mit jenen der entsprechenden Tocopherole.

In früheren Untersuchungen [7] war aufgefallen, dass sich α -Tocopherol im Gegensatz zum 6-Äthoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin (EMQ), einem unnatürlichen Antioxydans mit einer gewissen Vitamin-E-Wirksamkeit, in verschiedenen Organen anreichert und über lange Zeit retiniert wird. Der Vergleich des biologisch weniger wirksamen *d,l*- γ -Tocopherols mit den hoch wirksamen *d,l*- α -Tocopherol, *d,l*- α -Tocopheramin und *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin zeigt Unterschiede der Retention in dem erwarteten Sinne: Das *d,l*- γ -Tocopherol wird schlechter retiniert und rascher eliminiert als die übrigen. Das Verteilungsmuster ist ähnlich wie jenes des *d,l*- α -Tocopherols; so konnte z. B. auch die selektive Anreicherung in den Nebennieren nachgewiesen werden. Die Werte liegen jedoch erheblich niedriger. *d,l*- γ -Tocopherol hat qualitativ die gleiche Vitamin-E-Wirksamkeit wie *d,l*- α -Tocopherol, sie ist nur quantitativ erheblich geringer. Unnatürliche Antioxydantien, wie z. B. EMQ, hingegen sind auch qualitativ verschieden wirksam. Es besteht somit insofern eine Korrelation zwischen biologischer Wirksamkeit und Verteilung, als das Verteilungsmuster von EMQ qualitativ verschieden ist von jenem der Tocopherole [7].

SUMMARY

1. *d,l*- α -Tocopheramine and *d,l*-N-methyl- γ -tocopheramine, which exhibit high vitamin E activity, present similar absorption and retention in the body and similar distribution in the various organs. *d,l*- γ -Tocopherol with much less biological activity is absorbed to the same extent but eliminated in much shorter time, so that its concentration in the organs decreases much more rapidly.

2. The vitamin E activity of *d,l*- α -tocopheramine and *d,l*-N-methyl- γ -tocopheramine cannot be ascribed to a transformation into α -tocopherol.

3. *d,l*- α -Tocopheramine and *d,l*-N-methyl- γ -tocopheramine are degraded to the same metabolic end products as the corresponding tocopherols.

Forschungsabteilung

F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. SCHWIETER, R. TAMM, H. WEISER & O. WISS, *Helv.* **49**, 2297 (1966).
- [2] J. WÜRSCH, *Atompraxis* **7**, 463 (1961).
- [3] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
- [4] J. WEICHET, L. BLÁHA & B. KOKÁČ, *Coll. czech. chem. Comm.* **24**, 1689 (1959).
- [5] O. ISLER, H. MAYER, R. RÜEGG & J. WÜRSCH, *Vitamins Hormones* **24** (1966), im Druck.
- [6] E. J. SIMON, C. S. GROSS & A. T. MILHORAT, *J. biol. Chemistry* **221**, 797 (1956); E. J. SIMON, A. EISENGART, L. SUNDHEIM & A. T. MILHORAT, *ibid.* **221**, 807 (1956).
- [7] O. WISS, R. H. BUNNELL & U. GLOOR, *Vitamins Hormones* **20**, 44 (1962).