

pas toutes été effectuées dans des conditions expérimentales identiques, cette différence peut être attribuée à la correction apportée à la concentration du ligand en solution par l'évaluation de  $[\text{NH}_3]_{\text{lib}}$ , puisque la diminution de  $[\text{NH}_3]$  produit une augmentation des valeurs des constantes de formation pour une solubilité donnée.

d) *Hydroxo-ammine-complexe*. Bien que l'existence des complexes mixtes avec  $\text{NH}_3$  n'ait pas été proposée jusqu'à maintenant, nous avons identifié l'espèce  $\text{Cd}(\text{OH})_2\text{NH}_3$  et déterminé sa constante de stabilité.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. O. Gübeli & J. Ste-Marie, *Canad. J. Chemistry* **46**, 1707 (1968); A. O. Gübeli, J. Hébert, P. A. Côté & R. Taillon, *Helv.* **53**, 1229 (1970).
- [2] F. J. C. Rossotti & H. Rossotti, «The Determination of Stability Constants», McGraw-Hill Book Company, Inc., London 1961.
- [3] B. E. Saltzman, *Analyt. Chemistry* **25**, 493 (1953).
- [4] L. G. Sillén, *Acta chem. scand.* **15**, 1981 (1961); **8**, 299, 318 (1954).
- [5] R. Reinmann, Dissertation, Berne 1948.
- [6] P. Schindler, *Helv.* **42**, 2736 (1959).
- [7] L. G. Sillén & A. E. Martell, «Stability Constants», The Chemical Society, London 1964, Spec. Publ. No 17.
- [8] G. Biedermann & L. Ciavatta, *Acta chem. scand.* **16**, 2221 (1962).
- [9] Y. Marcus, *Acta chem. scand.* **11**, 690 (1957).
- [10] N. B. Spivakovskii & L. P. Moisa, *Zh. Neorg. Khim.* **9**, 2287 (1964).
- [11] D. E. Ryan, J. R. Dean & R. M. Cassidy, *Canad. J. Chemistry* **46**, 999 (1968).
- [12] K. H. Gayer & L. Woontner, *J. physic. Chemistry* **61**, 364 (1957).
- [13] D. Dyrssen & P. Lumme, *Acta chem. scand.* **16**, 1785 (1962).
- [14] Y. D. Fridman & M. G. Levine, *Zh. neorg. Khim.* **12**, 2707 (1967).

## 276. Oxydative Demethylierung durch Leberhomogenat von Ratten nach Vitamin E-Mangel und nach Tocopherolgaben

von K. Bernhard, R. Markstein und W. Zimmerli  
 Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel

(14. X. 71)

*Zusammenfassung.* Das sauerstoffabhängige demethylierende Enzymsystem aus Leberhomogenat oder Lebermikrosomenpräparaten wird durch  $\alpha$ -Tocopherol nicht beeinflusst. Eine deutliche, aber langsamere verlaufende Enzyminduktion nach Angewöhnung mit dem Substrat (N-Methyl-glutethimid) ist indessen auch in durch Vitamin E-Mangel geschädigten Zellen nachweisbar.

Methylierungen und Demethylierungen mit Adenosyl-Methionin als Donator sind geläufige Stoffwechselreaktionen. Die Methylgruppe kann aber auch als Formaldehyd abgespalten werden. Dabei sind die Substrate vornehmlich körperfremde Substanzen wie Pharmaka oder pflanzliche Inhaltsstoffe. Dieser Reaktionsmechanismus ist nicht genau bekannt, benötigt indessen Sauerstoff, NADPH und NADH. Die Reaktion wird in der Zelle im endoplasmatischen *Reticulum* katalysiert und kann durch Bestimmung und Aktivitätsmessungen des aus der  $^{14}\text{C}$ -signierten Methylgruppe entstehenden Formaldehyds quantitativ verfolgt werden [1].

Wir haben früher am Substrat N-Methyl-glutethimid (N-Methyl- $\alpha$ -phenyl- $\alpha$ -äthyl-glutarimid = Methyl-Doriden oder MeD) eine solche Demethylierung unter-

Tabelle 1. Demethylierung von MeD durch Lebermikrosomen «angewöhnter» Tiere und Kontrollen

Tiere	erhaltener Formaldehyd					
	Aktivität c/min		Menge			
	A	B	$\gamma$	$\mu\text{mol}$	A	B
				A		
1	8275	2100	7,8	2,0	0,26	0,066
2	7355	2350	7,0	2,2	0,23	0,073
3	6030	2640	5,7	2,5	0,19	0,084
4	9645	2150	9,1	2,0	0,30	0,068
5	7070	2440	6,7	2,4	0,22	0,08
6	4940	1900	4,7	1,8	0,16	0,06
$\bar{x}$	7219	2263	6,8	2,15	0,227	0,072
s	1508	242	1,45	0,28	0,045	0,008

A = angewöhnte Tiere (10 mg MeD/100 g Körpergewicht und Tag) während 3 Wochen

B = Kontrollen

sucht und an diesem Beispiel auch einen Beitrag zur Deutung der Angewöhnung des Organismus an Pharmaka erbracht [2]. Mikrosomenpräparate aus der Leber von Ratten und Meerschweinchen, denen längere Zeit kleine Dosen von MeD verabreicht wurden, demethylieren infolge eintretender Enzyminduktionen diese Verbindung in stärkerem Ausmasse. Solche Versuche wurden unter verbesserten experimentellen Bedingungen wiederholt. Bei Ratten, welche mit einer normalen Diät während einigen Wochen täglich MeD erhielten, wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine um das drei- bis vierfach gesteigerte Demethylierungsrate festgestellt (s. Tab.1;  $p < 0,001$ ).

Wir prüften im folgenden, ob dieses sauerstoffabhängige Enzymsystem durch Vitamin E beeinflusst werde. Tocopherole sind biologische Antioxydantien. Sie könnten daher die Konzentration der Sauerstoffmolekeln in der Umgebung lipidhaltiger Enzymsysteme erniedrigen. Bei Vitamin-E-Mangel müsste demnach eine

Tabelle 2. Demethylierung von MeD durch Lebermikrosomen von E-Mangel- und E-erhaltenden Ratten

	Erhaltener Formaldehyd					
	E-Mangel-Diät			E-Zugaben <sup>a)</sup>		
Tier Nr.	1	2	3	4	5	6
$\mu\text{mol}$	0,021	0,016	0,030	0,020	0,021	0,358
Aktiv. c/min	4850	3649	6823	4665	4853	8286
spez. Aktiv <sup>b)</sup>	0,206	0,171	0,223	0,222	0,209	0,270

<sup>a)</sup> 3 mg pro Woche    <sup>b)</sup>  $\frac{\mu\text{mol Formaldehyd}}{\text{mg Protein}} \times 10^{-3}$

Steigerung der oxydativen Demethylierung zu erwarten sein. Die Tiere erhielten ein Vitamin-E-freies Futter, das bei den Kontrollen durch Zugabe von 3 mg  $\alpha$ -Tocopherol pro Woche und Tier ergänzt wurde. Aus Tab.2 geht jedoch hervor, dass E-Gaben

Tabelle 3. Demethylierung von MeD durch Lebermikrosomen «angewöhnter» E-Mangel- und E-erhaltender Ratten

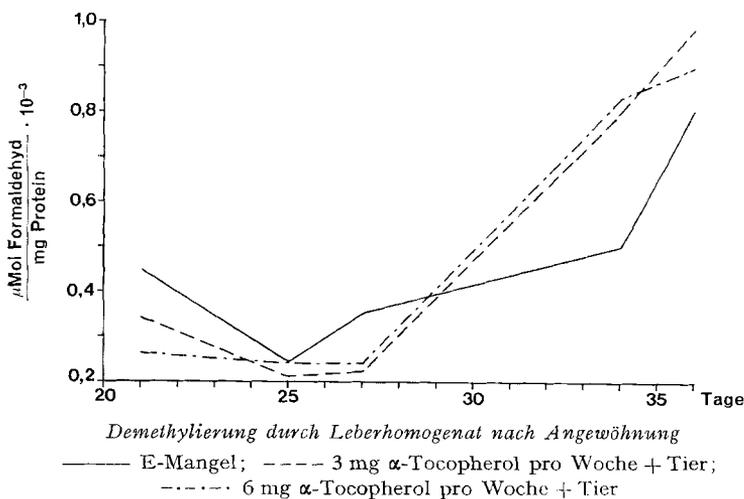
Gruppe	I		II		III	
	erhaltener Formaldehyd					
Tier Nr.	$\gamma$	$\mu\text{mol}$	$\gamma$	$\mu\text{mol}$	$\gamma$	$\mu\text{mol}$
1	3,1	0,103	5,4	0,180	8,7	0,289
2	3,6	0,120	8,3	0,275	8,8	0,292
3	3,2	0,107	5,5	0,185	10,7	0,355
4	3,8	0,126	6,3	0,209	7,1	0,236
5	1,9	0,063	4,1	0,137	7,3	0,242
6	7,0	0,230	4,5	0,151	6,8	0,225
7	1,4	0,047	2,9	0,097	–	–
$\bar{x}$	3,43	0,114	5,29	0,176	8,23	0,273
s	1,67	0,054	1,60	0,053	1,34	0,045

Gruppe I: E-Mangel-Diät + Vitamin E (3 mg pro Woche)

Gruppe II: E-Mangel-Diät und Angewöhnung an Methyl-Doriden

Gruppe III: E-Mangel-Diät + Vitamin E und Angewöhnung an Methyl-Doriden (10 mg MeD pro 100 g Körpergewicht und Tag während 5 Wochen)

ohne wesentlichen Einfluss bleiben, die Demethylierung verläuft bei den Mangel-tieren eher schlechter. Die Enzyminduktion durch Angewöhnung setzt aber auch bei Vitamin-E-Mangel ein (Tab.3). Die Ratten der Gruppe III, deren E-Mangel-Diät durch Zugabe von  $\alpha$ -Tocopherol vervollständigt und die während 38 Tagen an MeD angewöhnt wurden, wiesen Lebermikrosomen auf, die signifikant besser demethylieren als Präparate von Ratten, welche letztere nicht angewöhnt wurden (Gruppe I).



Ein signifikanter Unterschied ergibt sich auch zwischen Gruppe II und III. Aus der Leber angewöhnter Vitamin E-Mangeltiere erhielten wir Präparate mit geringerem Demethylierungsvermögen als von angewöhnten Ratten, die Vitamin-E-Zugaben erhalten hatten.

Um diese Enzyminduktion in ihrem zeitlichen Verlauf verfolgen zu können, wurden die Tiere in Intervallen nach Beginn der MeD-Verabreichung getötet. Das demethylierende System des Leberhomogenates zeigte dabei anfänglich eine verminderte Wirksamkeit, letztere nahm aber stetig zu, wobei das Maximum bei diesen Versuchen noch nicht erreicht war (s. Fig.). Eine Abhängigkeit von der Vitamin-E-Dosis (3 bzw. 6 mg pro Woche und Tier) konnte nicht festgestellt werden.

Die Induktion des sauerstoffabhängigen Enzymsystems erfolgt auch durch E-Mangel, ist aber bei mit  $\alpha$ -Tocopherol versorgten Tieren ausgeprägter. Ein direkter Einfluss dieses lipophilen Vitamins auf die Demethylierung ist nicht nachweisbar, in der durch E-Mangel geschädigten Zelle wird das Enzymsystem indessen vermindert gebildet.

**Experimentelles<sup>1)</sup>.** – Die Versuchstiere, mit Altromin-R ernährte männliche weiße *Whistar*-Ratten unseres Inzuchtstammes im Gewichte von 60 g, erhielten zur Ausbildung eines Vitamin-E-Mangels, der auf Grund des Hämolysetestes nach *Friedman* [3] sichergestellt wurde, eine E-freie Diät [4], die dann entweder weiter verfüttert oder durch  $\alpha$ -Tocopherolgaben (3 bzw. 6 mg pro Woche und Tier) ergänzt wurde. Zur «Angewöhnung» erhielten die Tiere während 3–5 Wochen wie aus den Tabellen ersichtlich täglich in E-freiem Öl gelöstes MeD.

*Gewinnung der Leberhomogenate bzw. Mikrosomenfraktionen* [5]. Die Tiere wurden unter Berücksichtigung der Biorhythmen am Morgen durch Herzpunktion bei leichter Narkose getötet, womit eine gute Entblutung der Leber erreicht wird. Dieselbe wird fein zerschnitten und mehrmals mit 0,25 M Saccharoselösung gewaschen. Nach Trocknung mit Filterpapier erfolgt die Homogenisierung mittels eines *Potter-Elvehjem*-Homogenisators bei 600 upm durch drei Auf- und Abbewegungen mit dem Teflonstempel. Dabei werden pro Gewichtsteil Leber 3 Teile Suspensionsmedium (0,25 M Saccharoselösung,  $2 \times 10^{-2}$  M Trispuffer (pH 7,6),  $6 \times 10^{-3}$  M  $MgCl_2$  und  $3 \times 10^{-3}$  M EDTA) verwendet. Man erhält auf diese Weise ein Homogenat mit einem Leber-Anteil von 25%. Durch Zentrifugieren des ersteren während 15 Min. in der Kälte ( $9000 \times g$ ) werden Kerne und Mitochondrien zurückgehalten. Der Überstand, gegen 0,01 M Phosphatpuffer dialysiert, wird als Mikrosomenpräparat eingesetzt.

*Demethylierung.* Von einer alkoholischen 10-mm-Lösung von MeD wird 1 ml mit 25  $\mu$ Mol  $MgCl_2$  und 50  $\mu$ Mol Nicotinsäureamid gelöst in 1 ml  $H_2O$  zusammengebracht. Dazu gibt man 0,1 ml einer frisch bereiteten wässrigen Lösung von 1  $\mu$ Mol NADP, 1  $\mu$ Mol NADH und 10  $\mu$ Mol Glucose-6-phosphat. Man verdünnt mit 3 ml  $H_2O$  und 3,9 ml 0,1 M Phosphatpuffer. Das Inkubationsröhrchen wird zuerst mit der MeD-Lösung beschickt, das Äthanol abgedampft und die genannten Aktivatoren zugefügt. Vom Leberhomogenat werden je 2 ml entsprechend 500 mg Leber mit 10  $\mu$ Mol MeD versetzt. [ $^{14}C$ ]-Methyldoriden wurde mit [ $^{14}C$ ]-Methyljodid hergestellt und besass eine Aktivität von  $2,057 \cdot 10^5$  cpm  $\mu$ Mol. Ein anderes Präparat verdanken wir Herrn Dr. K. Schmid (CIBA-GEIGY AG). Der Proteingehalt der Ansätze wurde nach der Biuretmethode bestimmt. Inkubation unter Luftzutritt während 2 Std. bei 37° in einem Thermostaten (eine längere Inkubationszeit ergibt keine höheren Demethylierungsraten). Gleichzeitiger Blindversuch ohne Homogenat.

*Bestimmung des Formaldehyds* kolorimetrisch mittels der Chromotropsäuremethode nach *MacFadyen* [6]: Dem Inkubationsansatz werden 100  $\mu$ Mol neutralisiertes Semicarbazid zugesetzt. Aus dem Semicarbazon wird der Aldehyd freigesetzt und in einen gefärbten Chromotropsäurekomplex übergeführt, der kolorimetrisch bestimmt wird.

Bei Anwendung [ $^{14}C$ ]-signierten Methyldoridens wird nach beendeter Inkubation durch Zugabe von 20-proz. Trichloressigsäure enteiweisst, zentrifugiert und der Überstand filtriert. Der

<sup>1)</sup> Teilweise mitbearbeitet von Frau Dr. phil. M. Knecht.

Rückstand wird mehrmals mit Wasser aufgeschwemmt, zentrifugiert und der Überstand jeweils mit dem zuerst erhaltenen vereinigt. Der radioaktive Formaldehyd liegt damit quantitativ im Filtrat vor, dem man 5 ml 5M Acetatpuffer (pH 4,5) und 0,5 ml einer 1M Formaldehydlösung als Träger zugibt. Sodann wird mit einer heissen wässerigen Lösung von 5,5-Dimethyldihydroresorzin (20% Überschuss) aller Formaldehyd als flockiges Dimedonat [7] gefällt. Man verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser und nutsch den Niederschlag nach 12 Std. ab. Er wird ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Radioaktivität des in Toluol gut löslichen Dimedonates bestimmten wir mittels des *Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometers* (Modell 3320).

Für einen Beitrag an die Anschaffung dieses Instrumentes sind wir der *SANDOZ-Stiftung* zu Dank verpflichtet.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *B. B. Brodie, J. Axelrod, J. R. Cooper, L. Gaudette, B. N. La Du, Ch. Mitoma & S. Udenfriend*, *Science* **121**, 603 (1955).  
 [2] *K. Bernhard & M. Knecht*, *Helv. physiol. Acta* **20**, C 34 (1962); *M. Knecht*, *Diss. phil. II*, Bascl 1964.  
 [3] *L. Friedman, W. Weiss, F. Wherry & O. L. Kline*, *J. Nutrition* **65**, 143 (1958).  
 [4] *U. Schwieter, R. Tamm, H. Weiser & O. Wiss*, *Helv.* **49**, 2297 (1966).  
 [5] *R. Markstein*, *Diss. phil. II*, Bascl 1971.  
 [6] *D. A. MacFadyen*, *J. biol. Chemistry* **158**, 107 (1945).  
 [7] *Houben-Weyl*, *Methoden der organ. Chemie* **2**, 456 (1953).

## 277. Lävulinsäureanilid und 5-Hydroxy-5-methyl-1-phenyl-2-pyrrolidon

von **O. Keller** und **V. Prelog**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule Zürich

(15. X. 71)

*Summary.* The hitherto unknown tautomer of levulinic acid anilide (Ia), 5-hydroxy-5-methyl-1-phenyl-2-pyrrolidone (IIa), has been obtained by filtration of a chloroform solution of Ia through acid ion-exchange columns. Ia and IIa show typical differences in NMR., IR. and MS. that can be used for their detection and determination in mixtures. Both tautomers are stable at room temperature in solid state and in neutral solutions but are equilibrated in acidic and basic solutions.

*Lukeš & Prelog* [1] [2] haben vor mehr als 40 Jahren versucht, mit den damals zur Verfügung stehenden unzureichenden Mitteln zu entscheiden, welche von den tautomeren Konstitutionen Ia, IIa oder IIIa das von ihnen durch Umsetzung von  $\alpha$ -Angelicalacton (IVa) bzw.  $\gamma$ -Acetoxy-valerolacton («Acetyl-lävulinsäure») (Va) mit Anilin erhaltene Produkt besitzt, und kamen auf Grund ihrer Versuche zum Schluss, dass es sich um das offenkettige Lävulinsäureanilid Ia handelt. Diese Schlussfolgerung wurde inzwischen sowohl angezweifelt [3] als auch bestätigt [4] [5].

Die drei analogen tautomeren Konstitutionen Ib, IIb und IIIb wurden zuerst von der *Beilstein*-Redaktion [6] für das von *Wolff* [7] aus  $\alpha$ -Angelicalacton und Ammoniak erhaltene nicht-substituierte Lävulinsäureamid in Erwägung gezogen. *Lukeš & Prelog* [1] haben das Produkt, das sie aus  $\alpha$ -Angelicalacton und Anilin erhielten (Weg A) mit dem Produkt verglichen, das durch Umsetzung von N-Phenylsuccinimid (VI) mit Methylmagnesiumbromid entsteht (Weg B). Wegen