

Zur Bildung von Mercaptursäuren bei der Entgiftung von 1,1-Diäthoxy-4-hydroxy-2-penten*

Von

H. Esterbauer, N. Scholz und H. Sterk

Aus dem Institut für Biochemie und dem Institut für Organische Chemie
der Universität Graz, Österreich

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 31. Januar 1972)

Mercapturic Acid Formation During Detoxication of 1,1-Diethoxy- 4-hydroxy-2-pentene

Following intraperitoneal administration to rats 1,1-diethoxy-4-hydroxy-2-pentene is rapidly resorbed and metabolized. Among six metabolites excreted in rat urine two have been identified as the diastereomeric mercapturic acids, N-acetyl-S-(D-1-diethoxymethyl-3-oxo-butyl)-L-cysteine and N-acetyl-S-(L-1-diethoxymethyl-3-oxobutyl)-L-cysteine. The metabolic formation of these compounds is discussed.

Injiziert man Ratten i. p. 1,1-Diäthoxy-4-hydroxy-2-penten, so wird die Verbindung rasch resorbiert und metabolisiert. Im Harn können 6 Metaboliten nachgewiesen werden. Zwei davon wurden als diastereomere Mercaptursäuren identifiziert, nämlich als die N-Acetyl-S-(D- bzw. L-1-diäthoxymethyl-3-oxobutyl)-L-cysteine. Der Bildungsweg dieser Verbindungen wird besprochen.

Verschiedene körperfremde Substanzen werden in vivo zu Mercaptursäuren (d. s. Derivate des N-Acetylcysteins) metabolisiert und im Harn ausgeschieden. Die Ausscheidung von Mercaptursäuren im Harn wurde beobachtet bei der Entgiftung von aromatischen Nitro- und Halogenverbindungen^{1, 2}, kondensierten Aromaten³, Methyljodid und anderen Alkylhalogeniden⁴, Arecolin und Arecaidin (Alkaloide der Betelnuß)⁵ sowie bei verschiedenen Derivaten des 1-Methyl-naphthalins⁶. Der erste Schritt bei diesem Entgiftungsmechanismus ist die durch Glutathiontransferasen unterschiedlicher Spezifität katalysierte Bindung der körperfremden Substanz an Glutathion⁷; die Glutathionkonjugate werden über einige Zwischenstufen (vgl. Schema 1) zu Mercaptursäuren

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Otto Kratky mit den besten Wünschen zum 70. Geburtstag gewidmet.

metabolisiert. *Boylard et al.*⁸ konnten zeigen, daß in der Leber und Niere verschiedener Säugetiere auch Glutathion-S-Alkyltransferasen existieren, die die Reaktion von α,β -ungesättigten Carbonylen mit Glutathion katalysieren. Ob α,β -ungesättigte Carbonyle im Harn als Glutathionverbindungen oder als Mercaptursäuren ausgeschieden werden, wurde nicht untersucht.

Bei unseren Untersuchungen⁹ über die biologischen Wirkungen des 4-Hydroxy-2-pentenals (*HPE*) und seiner Derivate fanden wir, daß 1,1-Diäthoxy-4-hydroxy-2-penten, das Diäthylacetal des *HPE*, in vivo rasch metabolisiert und im Harn ausgeschieden wird. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Hauptmetaboliten diastereomere Mercaptursäuren sind. Wahrscheinlich ist die Bildung von Mercaptursäuren der allgemeine Entgiftungsweg zur Ausscheidung von α,β -ungesättigten Alkoholen (wie *HPE*-Acetal), die enzymatisch zu α,β -ungesättigten Oxoverbindungen dehydriert werden können.

Material und Methoden

[4,5-¹⁴C]-1,1-Diäthoxy-4-hydroxy-2-penten (*HPE*-Acetal)

500 μ C [1,2-¹⁴C]-Acetaldehyd mit spezif. Aktivität von etwa 50 μ C/1 mg wurden mit 0,15 Mol Acetaldehyd (Merck) in 50 ml *THF* verdünnt. Die Aktivität dieser Lösung bestimmten wir zu $6,2 \cdot 10^6$ dpm/mMol. Dieser Acetaldehyd wurde nach dem schon beschriebenen Verfahren¹⁰ zu 1,1-Diäthoxy-4-Hydroxy-2-pentin umgesetzt. Reduktion der Dreifachbindung mit LiAlH_4 zur *trans*-Doppelbindung ergab das gewünschte ¹⁴C-markierte *HPE*-Acetal. Die Reinigung erfolgte durch multiplikative Verteilung in einer 30-Stufen-Apparatur nach *Hecker*; Oberphase: Hexan—Äther 4 : 1, gesätt. mit Unterphase; Unterphase: 0,2M-NaHCO₃-Lösung, gesätt. mit Oberphase; Volumen der beiden Phasen: je 50 ml. Die Ausbeute betrug 5 g dünnstichtchromatographisch einheitliches *HPE*-Acetal mit einer spezif. Aktivität von 8240 dpm/mg, $1,43 \cdot 10^6$ dpm/mMol. Auf Grund der Aktivität des [1,2-¹⁴C]-Acetaldehyds wäre an sich eine Aktivität von $6,2 \cdot 10^6$ dpm/mMol zu erwarten gewesen; die wesentlich niedrigere Markierung des *HPE*-Acetals kann nur eine Folge der Unreinheit des ¹⁴C-Acetaldehyds (vermutlich hoher Paraldehydgehalt) sein. Das von NEN Chemicals GmbH, Frankfurt/M, gelieferte Präparat war bei -80° fest (Schmp. von Acetaldehyd: -113°). Das *HPE*-Acetal wurde, gelöst in CHCl_3 , über Na_2CO_3 sicc. bei 4°C aufbewahrt. Noch nach einem Jahr war das Präparat vollkommen unverändert.

Tierversuche: Für die Versuche wurden etwa 250 g schwere, gesunde, normal ernährte Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Markiertes *HPE*-Acetal, gelöst in 1 ml m/15 Phosphatpuffer, pH 7,4, wurde in einer Dosis von 120 mg/kg Körpergewicht i. p. injiziert. Die Ratten wurden einzeln 24 Stdn. in Stoffwechsellkäfigen gehalten; während dieser Zeit erhielten sie Trinkwasser, aber keine Nahrung. Die innerhalb von 24 Stdn. anfallenden Harnproben wurden vereinigt, filtriert und bis zur Auftrennung bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung der Verteilung der ¹⁴C-Aktivität in den Organen wurden je zwei Ratten 15 Min. bzw. 24 Stdn. nach i. p.-Injektion von

HPE-Acetal enthauptet und entblutet. Die Organe wurden bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert. Von jedem Organ wurden je zwei Aktivitätsbestimmungen gemacht.

Bestimmung der Radioaktivität

Alle Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Liquid-Szintillation-Spektrometer (Beckman, Modell LS 230) durchgeführt.

Wäßr. *HPE*-Acetal-Lösungen, Harnproben, Eluate von Säulentrennungen: 0,05 bis 0,5 ml wäßr. Lösung in 10 bis 15 ml Toluol—Methanol 1 : 1; Butyl-*PBD* 4 g/l.

Organe: mit NaOH nach der von Stevens¹¹ beschriebenen Methode hydrolysiert und mit *BBS*-2- oder *BBS*-3-Toluol in Lösung gebracht.

Vollblut: 0,15 ml Citratblut mit 0,5 ml NaOH bei 50°C hydrolysiert, entfärbt mit 0,1 ml 35proz. H_2O_2 , neutralisiert mit Essigsäure und gelöst mit 15 ml *BBS*-3-Toluol-Cocktail.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Harns

Kieselgel G (Merck); Schichtdicke 250 μm ; Laufstrecke 15 cm; aufgetragene Menge: 5 bis 10 μl unverdünnter Harn; Laufmittel: CHCl_3 —Eisessig 10 : 3; Anfärbung: entwickeltes Chromatogramm 5 Min. bei 120°C getrocknet, besprüht mit Naphthoresorcinreagens (0,2 g 1,3-Naphthalindiol in 100 ml *EtOH*, vor dem Gebrauch 1 : 1 mit 20proz. H_2SO_4 gemischt), nach 2 bis 3 Min. Erhitzen bei 120° blaue Flecken bei R_f 0,63, 0,45 und 0,38. Zur Bestimmung der Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf der *DC*-Platte wurde nach Anfärbung mit Naphthoresorcinreagens das Kieselgel abgeschabt und die Aktivität in Methanol—Toluol (Butyl-*PBD*) gemessen. 90 bis 95% der aufgetragenen dpm konnten nachgewiesen werden, die Zählflasche betrug 75—80%.

Bei R_f 0,25 gibt sowohl Probeharn als auch Kontrollharn einen rosa Fleck, der als Harnstoff identifiziert wurde. Durch Auftrennen des Harns mit dem Laufmittel Hexan—Äther 1 : 1 (Kieselgel, Anfärbung mit Dinitrophenylhydrazinreagens) wurde festgestellt, daß das injizierte *HPE*-Acetal bzw. der freie Aldehyd (*HPE*) im Harn nicht vorkommen. Die Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität auf der *DC*-Platte ergab die in Tab. 2 angegebenen Prozentwerte. Danach ist ein Hauptteil der ^{14}C -Aktivität des Harns Metaboliten zuzuschreiben, die sich im Startgebiet (R_f 0,0—0,2) des *DC* befinden und sich mit Naphthoresorcinreagens nicht anfärben lassen.

Auftrennung des Harns über DEAE-Sephadex

Der 24 Stdn. gesammelte Harn von zwei Ratten (etwa 250 000 cpm) wurde lyophilisiert. Das trockene Produkt wurde in 6 ml 0,05M-Triäthanolaminpuffer pH 7,0 gelöst und auf *DEAE*-Sephadex A 25 (Pharmacia) getrennt. Säule: Durchmesser 2,5 cm, 40 cm gefüllt, äquilibriert mit 0,05M-Triäthanolaminpuffer pH 7,0. Elutionsmittel 1): 400 ml 0,05M-Triäthanolaminpuffer pH 7,0 und 400 ml 0,05M-Triäthanolaminpuffer pH 7,0, 0,4M-NaCl. Der NaCl-Gradient wurde linear von 0,0 auf 0,4 Mol/l erhöht. 2): 500 ml Triäthanolaminpuffer pH 7,0; 2,0M-NaCl. Die Durchflußgeschwindigkeit war 1 ml/min, im Eluat wurde kontinuierlich E_{280} ($d = 0,3$ cm) gemessen. Es wurden 10 ml-Fraktionen gesammelt, von jeder Fraktion wurde an einem Aliquot (0,1—0,5 ml) die ^{14}C -Aktivität bestimmt. Abb. 1 zeigt eine typische Elutionskurve. Entsprechend den 5 Aktivitätsmaxima der Elutionskurve

wurden die folgenden Fraktionen vereinigt: Nr. 12—27: Metabolit 1; Nr. 37—43: Metaboliten 2 a und 2 b; Nr. 44—50: Metabolit 3; Nr. 50—56: Metabolit 4; Nr. 71—77: Metabolit 5. Bei allen Trennungen konnten 95 bis 100% der aufgetragenen ^{14}C -Aktivität im Eluat nachgewiesen werden. Die Bestimmung des prozentuellen Anteils der bei der *DEAE*-Trennung isolierten Metaboliten 1—5 erfolgte aus den peak-Flächen der Aktivitätskurven: 100% = Summe der Flächen.

Der Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen (V_e) der einzelnen Metaboliten bei der *DEAE*-Trennung und ihren R_f -Werten bei der *DC*-

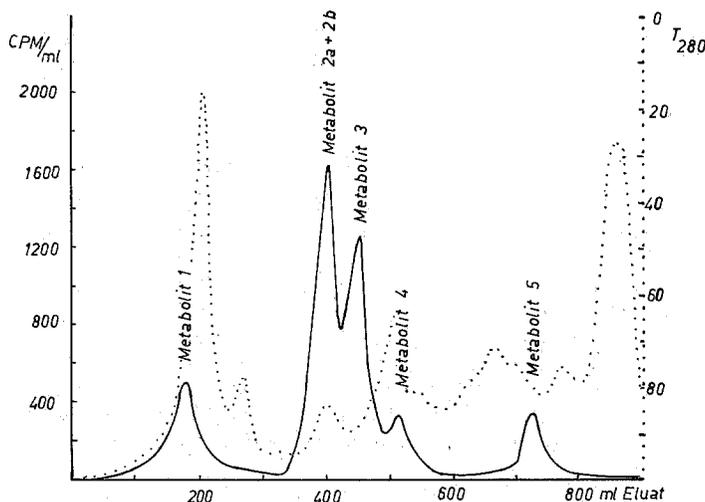


Abb. 1. Auftrennung der radioaktiven Metaboliten des Rattenharns nach i. p.-Injektion von ^{14}C -HPE-Acetal mit *DEAE*-Sephadex A 25. Ausgezogene Kurve: Radioaktivität des Eluats. Punktierter Kurve: Transmission des Eluats bei 280 nm.

Trennung zeigt Tab. 2. Das zweite Aktivitätsmaximum bei $V_e = 410$ ml enthält, wie die *DC*-Überprüfung ergibt, tatsächlich also zwei Metaboliten, wir bezeichnen sie mit 2 a und 2 b. Aus der *DC*- und *DEAE*-Trennung geht hervor, daß im Harn von Ratten, denen i. p. ^{14}C -HPE-Acetal injiziert wurde, sechs verschiedene radioaktive Metaboliten vorkommen, ihre prozentuelle Verteilung enthält Tab. 2.

Für die weitere Reinigung und schließlich Identifizierung schienen uns die Metaboliten 2 a und 2 b am geeignetsten, weil sie einerseits Hauptmetaboliten der Entgiftung sind und weil sie sich andererseits durch *DC* leicht und sicher nachweisen lassen, so daß jeder weitere Reinigungsschritt nach der *DEAE*-Trennung leicht verfolgt werden kann. Durch chromatographische Trennung mit Kieselgel konnten für die Analyse ausreichende Mengen von 2 a und 2 b isoliert werden. Aus dem 24 Stdn. gesammelten Harn von 6 Ratten erhielten wir zunächst 12 mg dünn-schichtchromatographisch einheitliche Substanz 2 a und 13 mg 2 b. Mit diesen Proben wurden die ersten, orientierenden Analysen (spezif. Aktivität, NaOH-Verbrauch,

IR-Spektrum, Löslichkeiten) durchgeführt. Bei der späteren Aufarbeitung des 24 Stdn.-Harns von 20 Ratten konnten 57 mg **2 a** und 46 mg **2 b** isoliert werden. Mit diesen Proben wurden die im folgenden beschriebenen Strukturuntersuchungen gemacht.

Isolierung der Metaboliten 2 a und 2 b

Die wäbr. Lösung des bei *DEAE*-Trennung isolierten Gemisches von Metabolit **2 a** und **2 b** wurde im Vak. auf 30 ml eingengt, 3 ml Essigsäure zugefügt und 4mal mit je 50 ml CHCl_3 extrahiert. Die CHCl_3 -Lösung wurde im Vak. eingedunstet und der Rückstand, gelöst in 5 ml CHCl_3 —Eisessig 9 : 1, auf den Kopf einer Kieselgel-Säule aufgebracht. Säule: Durchmesser 1,5 cm, 20 cm hoch gefüllt mit Kieselgel 0,05 bis 0,2 mm (Merck), äquilibriert mit dem Elutionsmittel: 500 ml CHCl_3 (p. A.)—Eisessig 9 : 1; Durchfließgeschwindigkeit: etwa 0,5 ml/min, 10 ml-Fractionen. Die Fractionen wurden dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel, CHCl_3 —Eisessig 5 : 1, Anfärbung mit Naphthoresorcin) überprüft. Fraction Nr. 16—23 enthielt Metabolit **2 a**, Fraction Nr. 24—27 enthielt **2 a** und **2 b** und Fraction 28—36 enthielt Metabolit **2 b**.

Zur Isolierung der Substanzen **2 a** und **2 b** aus den Eluaten der Säulentrennung wurde zunächst die CHCl_3 —Eisessig-Lösung einmal mit 10 ml H_2O extrahiert; dabei gehen polare Zersetzungsprodukte, die sich bei der Trennung teilweise bildeten (hauptsächlich Aldehyde, die den Substanzen **2 a** und **2 b** entsprechen) in die Wasserphase. Das CHCl_3 wurde dann im Vak. abdestilliert und der Rückstand zur Entfernung der Essigsäure 24 Stdn. im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur Entfernung von Kieselgelspuren wurde der Rückstand 2mal mit etwa 10 ml CHCl_3 gelöst, zentrifugiert und wieder getrocknet.

Untersuchung der Metaboliten 2 a und 2 b

Titration mit NaOH: 45,9 mg **2 a** bzw. 42,50 mg **2 b** wurden mit 0,05N-NaOH titriert; Verbrauch 2,70 bzw. 2,5 ml (Titrigraph TTT 2 und Autoburette ABU, Radiometer). Aus den titrierten Lösungen wurden, wie vorher beschrieben, nach Ansäuern mit Eisessig die entsprechenden freien Säuren **2 a** bzw. **2 b** durch Extraktion mit CHCl_3 wieder isoliert.

Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone: Etwa 20 ml **2 a** bzw. **2 b** in 10 ml H_2O + 2 ml *DNPH*-Reagens (2 g Dinitrophenylhydrazin, 150 ml *EtOH*, 15 ml konz. H_2SO_4). Der Hydrazonniederschlag wurde nach 30 Min. abzentrifugiert, mit H_2O reagens- und säurefrei gewaschen und in 10 ml 0,1M-Phosphatpuffer, pH 7,0 gelöst. Zur Entfernung von Verunreinigungen wurde die Pufferlösung 2mal mit 2 ml CHCl_3 extrahiert. Durch Ansäuern mit 0,5N-HCl wurde das Hydrazon wieder ausgefällt, nach 4mal. Waschen mit H_2O wurde die Hydrazonsuspension lyophilisiert.

Die Drehwinkel wurden mit dem Kreispolariometer 0,01° der Firma Zeiss in 0,5 dm Polarmeterküvetten gemessen. Lösungsmittel war Methanol, die Konzentration betrug 47 mg/ml bei **2 a**, 79 mg/ml bei **2 b**.

NMR-Spektren: Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-A 60 A-Gerät aufgenommen. Die chemical shifts sind in δ -Werten angegeben, bezogen auf *TMS* als inneren Standard.

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät, Modell 221, die UV-Spektren mit einem Zeiss Spektralphotometer M 4 Q III d aufgenommen.

Versuchsergebnisse

Verteilung und Ausscheidung der ^{14}C -Aktivität

Wird ^{14}C -HPE-Acetal i. p. verabreicht, so ist die Aktivität bereits 15 Min. nach der Injektion im ganzen Körper verteilt. Wie die Werte in Tab. 1 zeigen, läßt sich sowohl in den Organen als auch im Muskelgewebe Aktivität nachweisen. Blut, Leber und Niere haben deutlich höhere Aktivität als die übrigen Gewebe. Da sich im Intrapertonealraum

Tabelle 1. Verteilung der Radioaktivität in Ratten nach i. p.-Injektion von ^{14}C -HPE-Acetal (120 mg/kg Körpergewicht):
% der gegebenen Dosis in 1 g Feuchtgewicht

	Zeit nach der Injektion	
	15 Min.	24 Stdn.
Blut	1,3	0,13
Leber	1,1	0,15
Niere	1,1	0,16
Lunge	0,8	0,13
Milz	0,5	—
Herz	0,6	—
Muskel, Oberschenkel	0,4	0,14
Muskel, Bauchdecke	0,6	0,12
Harn, gesamt	—	62,0
Faeces, gesamt	—	3,4

nach Spülen mit isotoner NaCl-Lösung nur weniger als 1% der gegebenen Aktivität nachweisen lassen, kann angenommen werden, daß HPE-Acetal zu 100% in der Bauhöhle resorbiert wird.

Die deutliche Akkumulierung der Aktivität in der Leber und in der Niere deutet bereits darauf hin, daß HPE-Acetal in der Leber metabolisiert und über die Niere ausgeschieden wird. Tatsächlich läßt sich schon im ersten Rattenharn, der 2—3 Stdn. nach der Injektion anfällt, etwa 10% der gegebenen Aktivität nachweisen. Innerhalb von 24 Stdn. werden 62% (Mittelwert von 6 Tieren) der ^{14}C -Aktivität mit dem Harn ausgeschieden. Nach 24 Stdn. erfolgt die Ausscheidung nur noch langsam, obwohl in allen Organen noch ^{14}C -Aktivität nachgewiesen werden kann (Tab. 1). Nach 48 Stdn. sind 63—70% ausgeschieden. Die Faeces-Exkretion ist mit 3,5% der Gesamtaktivität (in 24 Stdn.) gering.

Identifizierung der Metaboliten 2 a und 2 b

Alle durchgeführten Untersuchungen sprechen dafür, daß die isolierten Metaboliten **2 a** und **2 b** diastereomere Verbindungen sind, nämlich: N-Acetyl-S-(D-1-diäthoxymethyl-3-oxobutyl)-L-cystein bzw.

N-Acetyl-S-(L-1-diäthoxymethyl-3-oxobutyl)-L-cystein. Welchem der beiden Metaboliten die LL- bzw. LD-Konfiguration zuzuschreiben ist, konnte nicht festgestellt werden.

Die Titration mit NaOH ergab folgende Molgewichte und pK -Werte: **2 a**: $MG = 340$, $pK = 3,38$; **2 b**: $MG = 340$, $pK = 3,40$; MG (ber.) = 335.

Die Bestimmung der spezif. Aktivität ergab 3980 dpm/mg für **2 a** und 3920 dpm/mg für **2 b**; daraus errechnet sich mit der molaren Aktivität des *HPE*-Acetals ($1,43 \cdot 10^6$) ein Molgewicht von 360 (**2 a**) bzw. 356 (**2 b**).

Die elementaranalytische Bestimmung des Schwefels, durchgeführt an dem Na-Salz der beiden Substanzen, ergab: **2 a**: $S_{\text{gef}} 8,57\%$; **2 b**: $S_{\text{gef}} 8,56\%$; $C_{14}H_{24}O_6NNaS$: $S_{\text{ber}} 8,94\%$.

Die Metaboliten **2 a** und **2 b** unterscheiden sich charakteristisch durch ihre optische Aktivität. Die Bestimmung der spezif. Drehung in Methanol als Lösungsmittel ergab: **2 a**: $[\alpha]_D = -34^\circ$; **2 b**: $[\alpha]_D = -7,6^\circ$.

Wertvolle Hinweise auf die Struktur der Substanzen brachten die NMR-Spektren (Tab. 3): sie zeigen die auf Grund der Formel (Schema 1) zu erwartenden Signale, die Intensitäten stimmen mit der Zahl der jeweiligen Protonen überein. Auffallend ist die bei den Metaboliten **2 a** und **2 b** unterschiedliche Lage der NH- und COOH-Signale. Nach Zusatz von D_2O tritt in den Spektren beider Substanzen das NH- bzw. COOH-Signal nicht mehr auf. In Substanz **2 b** gibt die Methylgruppe von OCH_2CH_3 ein Sechsbanden-Signal, in Substanz **2 a** das übliche Dreibandensignal (Lösungsmittel $CDCl_3$). Die Spektren der Na-Salze in D_2O und die Spektren der Na-Salze bzw. der freien Säuren in *DMSO* zeigen für diese Methylgruppe ein Dreibandensignal. Bemerkenswert ist auch die unterschiedliche Lage des Signals einer CH_3CO -Gruppe. Die Unterschiede im NMR-Spektrum von **2 a** und **2 b** bezüglich Lage und Koppelung der erwähnten COOH-, NH- und CH_3 -Gruppen führen wir auf die unterschiedliche Konformation der beiden diastereomeren LL- bzw. DL-Formen zurück.

Die Metaboliten **2 a** und **2 b** geben nahezu gleiche IR-Spektren ($CHCl_3$, $d = 0,1$ cm). Die charakteristischen Absorptionsbanden stimmen mit der Formel in Schema 1 überein: 2,90 μ NH und OH, stark; 3,40 μ CH_2 , stark; 5,95 μ C=O von COOH und Amid I, intensivste Bande; 6,20 μ Amid II, stark; 6,45–6,75 μ , schwache breite Bande, Zuordnung fraglich; 7,25 μ CH_3 , stark; 8,85 und 9,40 μ C—O, stark; 5,78 μ C=O von Keton, stark.

Die Amid-II-Bande ist bei **2 a** veränderlich und in verd. Lösungen (2 mg/ml) deutlicher ausgeprägt als in konzentrierten. Bei **2 b** ist sowohl in konz. als auch in verdünnten Lösungen die 6,20 μ -Bande unverändert.

In den IR-Spektren der Na-Salze ($CHCl_3$, $d = 0,1$) findet man bei **2 a** und **2 b** die folgenden Banden: 2,65 μ und 2,90 μ NH und OH; 3,40 μ CH_2 ; 5,78 μ C=O von Keton; 6,0 μ Amid I, Schulter; 6,20 μ

C=O von COO⁻ und Amid II; 6,55 μ schwache breite Bande, Zuordnung fraglich; 7,25 μ CH₃; 8,85 μ und 9,40 μ C—O.

Nachdem auf Grund des NMR-Spektrums sicher war, daß die Substanzen **2 a** und **2 b** noch die Acetalgruppe haben, setzten wir beide Substanzen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu den Hydrazonen um, dabei reagiert nicht nur die Acetalgruppe, sondern auch die Ketogruppe, so daß man die Bisdinitrophenylhydrazone (Bis-*DNPH*) erhält. Im *DC* (Kieselgel, CHCl₃—Eisessig 10 : 3) haben die *DNPH* von **2 a** und **2 b** den gleichen *R_f*-Wert (0,33). Daß es sich um Bis-dinitrophenylhydrazone handelt, geht vor allem aus der spezif. Aktivität hervor: Beim *DNPH* von **2 a** fanden wir 2180 dpm/mg (Mittel aus drei Bestimmungen), beim *DNPH* von **2 b** 2050 dpm/mg. Mit der spezif. Aktivität des *HPE*-Acetals ($1,43 \cdot 10^6$ dpm/ μ Mol) errechnen sich daraus für die *DNPH* von **2 a** bzw. **2 b** Molekulargewichte von 655 bzw. 695 (Theorie für C₂₂H₂₃O₁₁N₉S · 1 H₂O: 639). Beide *DNPH* sind instabil und zersetzen sich leicht (vermutlich durch Abspaltung von N-Acetylcystein) in ein unpolares Hydrazon mit *R_f* 0,8. Werden die *DNPH* aus wäßr. Suspension durch Lyophilisieren getrocknet, so erhält man Produkte mit scharfen Schmelzpunkten: 129 °C (Hydrazon von **2 a**) bzw. 129—130 °C (Hydrazon von **2 b**). Wird eine CHCl₃-Lösung der *DNPH* zur Trockene gebracht, so hat der Rückstand einen unscharfen Schmelzbereich von 100 bis 140 °C. Die Elementaranalyse der lyophilisierten Bis-dinitrophenylhydrazone ergab folgende Werte:

DNPH von **2 a**: Gef. C 41,7; H 4,41; N 17,0; S 4,64.

DNPH von **2 b**: Gef. C 41,4; H 3,92; N 17,6; S 4,80.

C₂₂H₂₃O₁₁N₉S · H₂O: Ber. C 41,3; H 3,95; N 19,7; S 5,03.

Die beiden Bis-dinitrophenylhydrazone geben in Methanol und methanol. KOH das gleiche UV-Absorptionsspektrum:

MeOH: $\gamma'_{\max} = 27900 \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon' = 60,2$ (**2a**) bzw. 59,5 (**2b**)

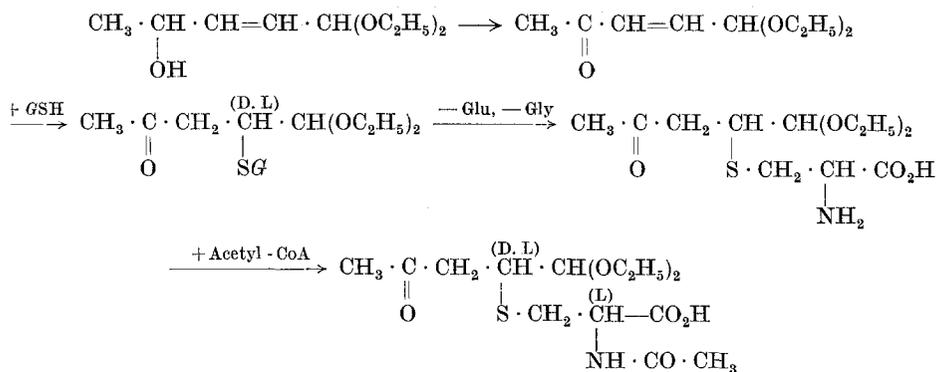
MeOH — 1N-KOH: $\gamma'_{\max} = 23000 \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon' = 46,5$ (**2a**) bzw. 46,8 (**2b**).

Diskussion

Injiziert man Ratten i. p. 1,1-Diäthoxy-4-hydroxy-2-penten (*HPE*-Acetal), so wird die Substanz in sehr kurzer Zeit im Bauchraum vollständig resorbiert und wahrscheinlich über die Leber in den Blutkreislauf transferiert. 15 Min. nach der Injektion ist die Verbindung im ganzen Organismus verteilt (Tab. 1). Als körperfremde, unphysiologische Substanz wird *HPE*-Acetal rasch entgiftet und ausgeschieden, innerhalb von 24 Stdn. werden etwa 65% der gegebenen ¹⁴C-Aktivität im Harn und etwa 2—5% im Faeces gefunden. Nimmt man für das Blut-

volumen 7% des Körpergewichtes an, so ergibt sich aus den Zahlen in Tab. 1, daß sich etwa 15 Min. nach i. p.-Injektion von ^{14}C -*HPE*-Acetal etwa 25% der gegebenen Dosis in der Blutbahn befinden, nach 24 Stdn. ist der Wert auf 2,5% gesunken. Aber nur ein kleiner Teil davon (nach 15 Min. 3% der verabreichten Menge) ist unverändertes *HPE*-Acetal¹². Da *HPE*-Acetal im sauren Medium leicht zum cytostatisch wirksamen *HPE* hydrolysiert wird (Halbwertszeit der Hydrolyse bei pH 6,0: 2,2 Stdn.; bei pH 7,4: 55 Stdn.¹³), würde es an sich eine geeignete Transportform darstellen, aus der bevorzugt in übersäuertem Tumorgewebe¹⁴ die tumorhemmende Substanz *HPE* freigesetzt wird. Da aber der Großteil des *HPE*-Acetals in sehr kurzer Zeit metabolisiert wird, ist *HPE*-Acetal in vivo ebenso instabil wie der freie Aldehyd *HPE*, so daß therapeutisch wirksame Konzentrationen in der Blutbahn über längere Zeit nicht aufrechterhalten werden können.

Schema 1

Metabolit **2a**bzw. **2b**

GSH = Glutathion, Glu = Glutaminsäure, Gly = Glycin.

Der Harn enthält sechs Metaboliten (Tab. 2), aber kein unverändertes *HPE*-Acetal. Daß es sich bei den zwei als diastereomere Mercaptursäuren identifizierten Hauptmetaboliten N-Acetyl-S-(D-1-diäthoxymethyl-3-oxobutyl)-L-Cystein und N-Acetyl-S-(L-1-diäthoxymethyl-3-oxobutyl)-L-Cystein nicht um Stellungsisomere handelt, geht eindeutig aus den NMR-Spektren (Tab. 3) hervor.

Die Entgiftung des *HPE*-Acetals und die Bildung der beiden diastereomeren Mercaptursäuren erfolgt wahrscheinlich nach dem in Schema 1 gezeigten Abbauweg, auf Grund dessen die Bildung der DL- und LL-Konfiguration zu erwarten ist. Der erste Schritt wäre demnach die enzymatische Dehydrierung der sek. Alkoholgruppe zur Ketogruppe.

Tabelle 2. Prozentanteil und chromatographische Eigenschaften der Metaboliten in Rattenharn nach i. p.-Injektion von ^{14}C -HPE-Acetal

Metabolit	DC-Trennung*			DEAE-Trennung**	
	%	R_f	Farbe	%	V_e , ml
1	10	0,63	blau	11	170
2a	22	0,45	blau	} 44	410
2b	21	0,38	blau		
3	} 48	0,0—0,2	—	26	460
4			—	9	530
5			—	7	730

* Mittelwerte aus 3 Trennungen verschiedener Harne; Kieselgel, CHCl_3 —Eisessig 5 : 1; Naphthoresorcin.

** Mittelwerte aus 5 Trennungen verschiedener Harne, V_e = Elutionsvolumen in ml bis zum Aktivitätsmaximum der Metaboliten (vgl. Abb. 1).

Tabelle 3. NMR-Spektren der Metaboliten **2a** und **2b** in CDCl_3

Proton	δ -Wert bei Metabolit 2a	δ -Wert bei Metabolit 2b
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$	1,05—1,30 (6) T	1,05—1,30 (6) M
$\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$	2,10 (3) S	2,05 (3) S
$\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$	2,15 (3) S	2,15 (3) S
CHCH_2S	2,75—2,80 (2) D	2,75—2,85 (2) D
$\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$	3,08—3,15 (2) D	3,08—3,15 (2) D
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$	} 3,3—3,8 (5) M	} 3,3—3,8 (5) M
CH_3CHS		
$\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$	4,35—4,45 (1) D	4,35—4,45 (1) D
CH_2CHNH	4,7—5,0 (1) M	4,55—4,80 (1) M
NH	7,35 (0,5)! S	6,9—7,1 (1) D
COOH	7,5 (1,5)! S	7,85 (1) S

S = Singlett; D = Dublett; M = Multipllett; in (): Zahl der angezeigten Protonen.

Verschiedene Autoren¹⁵ zeigten, daß Leber-Alkohol-Dehydrogenase eine breite Spezifität gegenüber niederen aliphatischen Alkoholen hat. Auch die OH-Gruppe des HPE-Acetals scheint sehr schnell dehydriert zu werden, da bereits 15 Min. nach der i. p.-Injektion nur mehr 3% der vorhandenen ^{14}C -Aktivität auf das unveränderte Acetal zurückzuführen ist. Das bei der Dehydrierung gebildete α,β -ungesättigte Keton reagiert, wie alle vinylogenen Carbonylverbindungen, leicht mit nucleophilen SH-Verbindungen, vor allem mit Glutathion, da nur dieses in ausreichender Menge und höherer Konzentration im Blut und in der Leber vorliegt. Bei dieser Addition entsteht am C-2 des Pentylrestes ein neues Asym-

metriezentrum mit der D- bzw. L-Konfiguration. Kinetische Untersuchungen zeigten¹², daß α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone bei pH 7,4 sehr schnell und annähernd quantitativ mit Glutathion reagieren. *Boylard et al.*⁸ konnten in der Leber und Niere von Säugetieren Glutathion-S-Alkyltransferasen nachweisen, die Glutathion auf α,β -ungesättigte Carbonyle übertragen. Wenn die an sich schnell ablaufende Reaktion von 1,1-Diäthoxy-4-oxo-2-penten mit Glutathion zusätzlich noch durch eine Glutathion-S-Transferase katalysiert wird, wirkt dieses Enzym sicher nicht stereospezifisch, da sich ja die beiden diastereomeren Mercaptursäuren nahezu in gleichen Mengen bilden (vgl. Tab. 2).

Entsprechend dem allgemeinen Entgiftungsmechanismus⁷ von Mercaptursäure-bildenden Stoffen wird das Glutathionderivat nach Schema 1 zu einer N-Acetylcystein-Verbindung abgebaut. Die übrigen vier *HPE*-Acetal-Metaboliten im Harn sind mit größter Wahrscheinlichkeit Zwischenprodukte dieses Abbaus. Über diesbezügliche Untersuchungen sowie über die synthetische Darstellung der beiden diastereomeren N-Acetylcystein-Derivate werden wir noch berichten.

Die Autoren erlauben sich, Herrn Prof. Dr. *E. Schauenstein* für sein Interesse an dieser Arbeit und für die vielen Diskussionen und wertvollen Anregungen verbindlichst zu danken. Der eine von uns (*N. Scholz*) dankt der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft für die Gewährung eines Arbeitsstipendiums.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, durchgeführt.

Literatur

- ¹ *E. Baumann* und *C. Preusse*, Ber. dtsch. chem. Ges. **12**, 806 (1879).
- ² *H. G. Bray*, *S. P. James* und *W. V. Thorpe*, Biochem. J. **65**, 483 (1957); **70**, 570 (1958); *H. G. Bray*, *Z. Hybs*, *S. P. James* und *W. V. Thorpe*, Biochem. J. **53**, 266 (1953).
- ³ *M. C. Bourne* und *L. Young*, Biochem. J. **28**, 803 (1934).
- ⁴ *E. A. R. Thompson*, *G. A. Maw* und *L. Young*, Biochem. J. **69**, 23 P (1958); *T. H. Grenby* und *L. Young*, Biochem. J. **75**, 28 (1960); *M. K. Johnson*, Biochem. J. **98**, 44 (1966).
- ⁵ *E. Boyland* und *R. Nery*, Biochem. J. **113**, 123 (1969).
- ⁶ *J. J. Clapp* und *L. Young*, Biochem. J. **118**, 765 (1970).
- ⁷ *T. Nakashima*, J. Biochem. [Tokio] **19**, 281 (1934); *M. M. Barnes*, *S. P. James* und *P. B. Wood*, Biochem. J. **71**, 680 (1959); *H. G. Bray*, *T. J. Franklin* und *S. P. James*, Biochem. J. **71**, 690 (1959); *J. Booth*, *E. Boyland* und *P. Sims*, Biochem. J. **79**, 516 (1961).
- ⁸ *E. Boyland* und *L. F. Chasseaud*, Biochem. J. **104**, 95 (1967); **109**, 651 (1968).

⁹ *E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer*, Mh. Chem. **95**, 180 (1964); *E. Schauenstein, B. Wünschmann und H. Esterbauer*, Z. Krebsforsch. **71**, 21 (1968); **72**, 325 (1968); **75**, 90 (1971); **76**, 140 (1971).

¹⁰ *H. Esterbauer und W. Weger*, Mh. Chem. **98**, 1994 (1967).

¹¹ *A. Stevens, E. Estrada, M. Pollay und R. Kaplan*, Anal. Biochem. **37**, 1 (1970).

¹² Dissertation *N. Scholz*, Univ. Graz, 1972.

¹³ Dissertation *M. Binder*, Univ. Graz, 1969.

¹⁴ *H. M. Rauen*, Z. Naturforsch. **22 b**, 1080 (1967); *M. v. Ardenne und F. Rieger*, Z. Naturforsch. **21 b**, 472 (1966).

¹⁵ *H. Theorell*, Experientia **21**, 553 (1965); *S. G. Hedlund und K. Kiessling*, Acta pharmacol. toxicol. **27**, 381 (1969).