

## KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENZYMATISCHE HYDROXYLIERUNG VON PHENAZON, OXYDATIVE O-DEMETHYLIERUNG VON KODEIN UND N-DEMETHYLIERUNG VON AMINOPHENAZON DURCH RATTENLEBERMIKROSOMEN

A. NEUGEBAUER, F.-K. SPLINTER, D. HÄFKE, R. KOBER, H. SCHIRLITZ und  
W. KLINGER

Aus dem Institut für Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

(Received 18 November 1968; accepted 17 January 1969)

**Abstract**—Hydroxylation of phenazone and aminophenazone-*N*-, and codeine-*O*-demethylation was determined in liver supernatants (9000 *g* for 20 min) of adult male rat in relation to enzyme and substrate concentrations, incubation times and temperatures, concentrations of glucose-6-phosphate, DPN and nicotinamide, type of buffer and its concentration and pH, and also storage times at room temperature.

The activities were proportional to the volume of supernatant used. On exceeding the optimum substrate concentration of phenazone hydroxylation was inhibited. This inhibition was slight for degradation of aminophenazone and not detected for codeine.

Addition of glucose-6-phosphate and DPN had no effect, nicotinamide increased only the breakdown of aminophenazone. Pre-treatment with nicotinamide *in vivo* was also effective. The three reactions studied also differed in response to different buffers and storage of whole liver or supernatant at room temperature. The best incubation conditions differed somewhat for the different substrates and a "standard incubation system" for several enzymatic reactions is not easy to formulate. The results presented support the view that several DPNH<sub>2</sub>-dependent oxidases with mixed functions are present in liver microsomes. Generalizations of the results obtained for one substrate must be qualified even for the same type of reaction.

FÜR UNTERSUCHUNGEN über die altersabhängige Biotransformation von Arzneimitteln bei der Ratte durch Lebermikrosomen *in vitro* wählten wir das methodische Vorgehen von Jóhannesson, Rogers, Fouts und Woods.<sup>14, 15</sup> Die genannten Autoren bezeichnen ihre Versuchsbedingungen als supraoptimal, ohne daß vollständige quantitative Angaben oder entsprechende Literaturhinweise in ihren Arbeiten darüber zu finden sind. Auch in vergleichbaren Versuchsanordnungen anderer Arbeitsgruppen werden die Versuchsbedingungen ohne oder ohne vollständige Begründung beschrieben. Dabei finden sich sehr unterschiedliche Angaben über Gewinnung und Konzentration der Mikrosomenfraktion, über Substratkonzentrationen z. B. von Phenazon, Aminophenazon und Kodein, über die Inkubationsdauer und -temperatur, über die Art und Konzentration der zugesetzten Kofaktoren, über die Art, Molarität und pH der Puffersysteme sowie über die Aktivitätsminderung durch Aufbewahrung der Mikrosomenfraktion unter verschiedenen Bedingungen, vergl. u.a. 6, 7, 10, 14–16, 24–29, 32, 33, 35, 37, 39. Da für die von uns geplanten altersabhängigen Induktionsversuche mit den zu erwartenden Aktivitätssteigerungen um das

mehrfache, die optimalen Reaktionsbedingungen vorher quantitativ erfaßt werden mußten, untersuchten wir, ausgehend vom Versuchsansatz von Jóhannesson *et al.*<sup>14, 15</sup> am  $9000g \times 20$  min-Überstand (im folgenden nur Überstand genannt), die Abhängigkeit der Phenazonhydroxylierung, Aminophenazon-*N*- und Kodein-*O*-demethylierung von den genannten Faktoren. Die drei Reaktionen wurden parallel am gleichen Überstand untersucht und die Versuche mehrfach wiederholt, um den Anteil jedes Faktors an der Variation der Enzymaktivitäten unter den ermittelten Standardbedingungen zu erfassen.

Diese Untersuchungen können zugleich zur Klärung der Frage dienen, ob die mischfunktionelle NADPH<sub>2</sub>-abhängige Oxydase der Lebermikrosomen als ein substratspezifisches Enzym zu betrachten ist oder ob es sich dabei um mehrere Oxydasen handelt.

## METHODEN

### 1. Tier- und Enzymmaterial

Wir verwendeten ♂ Wistar-Ratten der institutseigenen Koloniezucht im Alter von 110–130 Tagen, die unter gleichbleibenden Bedingungen gehalten wurden: Gruppenhaltung bei 22–25° Raumtemperatur, relative Luftfeuchtigkeit > 50%, Standardfutterwürfel der Arbeitsgruppe Versuchstierzucht Berlin und Wasser ad libitum. Nach Dekapitation in Äthernarkose wurden die Lebern sofort herauspräpariert, mit eiskaltem Aqua dest. abgespült, abgetupft, gewogen und in KCl-Lösung (1.5 ml 1.15% ige KCl-Lösung auf 1 g Leber) unter Eiskühlung in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel homogenisiert, wobei der Stempel mit maximal 1500 U/min rotierte und dreimal langsam unter Einschaltung von Pausen auf und ab bewegt wurde. Das Homogenat von 1 g Leber wurde mit 1.5% iger KCl-Lösung auf 3 ml aufgefüllt und anschließend 20 min bei 9000 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge K 14, Janetzki, Engelsdorf; Temperatur im Innenraum der Zentrifuge –7°), der Überstand abgegossen und sofort für die Untersuchung verwendet. Nur für die Verteilungsstudien wurde der Niederschlag zweimal im halben Ausgangsvolumen mit 1.15% iger KCl-Lösung resuspendiert und erneut bei  $9000g \times 20$  min zentrifugiert. Die in der Überstands- und Niederschlagsfraktion sowie in der vereinigten Waschflüssigkeit bestimmte Glukose-6-Phosphatase-Aktivität wurde zur jeweils gemessenen Bio-transformations-Aktivität in Beziehung gesetzt.

Jedes Homogenat wurde aus 2–3 Lebern hergestellt.

### 2. Versuchssubstanzen

Phenazon, Aminophenazon und Kodeinphosphat, Rezeptursubstanz DAB 6 Glukose-6-phosphat, Na-Salz, 87% ig, VEB Arzneimittelwerk Dresden NADH=β-TPN 82.5 %ig, VEB Arzneimittelwerk Dresden NADPH<sub>2</sub> der Fa. Boehringer und Söhne/Mannheim.\*

### 3. Inkubationsansätze

3.1. Die Hydroxylierung von Phenazon und die *N*-Demethylierung von Aminophenazon wurden in Anlehnung an die von Jóhannesson *et al.*<sup>14, 15</sup> beschriebene Methode in folgenden Ansätzen bestimmt:

\* Wir danken Herrn Dr. F. Schmidt von der Fa. Boehringer und Söhne/Mannheim für die Überlassung von Versuchsmengen an NADPH<sub>2</sub>.

1·8 ml Überstand

0·2 ml Aqua bidest. mit  $1 \times 10^{-5}$  mol Phenazon bzw.  
 $2 \times 10^{-5}$  mol Aminophenazon,  
 2·0 ml Aqua bidest. mit  $2·75 \times 10^{-7}$  mol NADP,  
 $1·25 \times 10^{-5}$  mol Glukose-6-Phosphat  
 $5·00 \times 10^{-5}$  mol Nikotinsäureamid u.  
 $1·25 \times 10^{-5}$  mol  $\text{MgSO}_4$

1·0 ml 0·1 M Phosphatpuffer pH 7·84 für die Phenazonhydroxylierung bzw. 7·62 für die Aminophenazondemethylierung, so daß im Ansatz von 5 ml Gesamtvolumen ein pH von 7·4 herrschte. Die Ansätze wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben 30 min bei 37° im Wasserbad unter Luftzutritt geschüttelt (Schüttelfrequenz: 84/min, seitliche Auslenkung: 2·3 cm) und die Reaktion durch Zugabe von 15 ml 7%iger bzw. 5 ml 20%iger Trichloressigsäure gestoppt.

3.2. Die O-Demethylierung von Kodein wurde in Anlehnung an die von Leadbeater beschriebene Methode<sup>24</sup> im folgenden Ansatz bestimmt:

1·0 ml Überstand

0·5 ml Aqua bidest. mit  $1 \times 10^{-5}$  mol Kodeinphosphat  
 2·0 ml Aqua bidest. mit  $5 \times 10^{-7}$  mol NADP  
 $2·2 \times 10^{-5}$  mol Glukose-6-Phosphat  
 $1 \times 10^{-4}$  mol Nikotinsäureamid und  
 $2·5 \times 10^{-5}$  mol  $\text{MgSO}_4$

2·5 ml 0·15 M Phosphatpuffer pH 7·6, so daß im Ansatz von 6 ml ein pH von 7·4 vorlag.

Die Ansätze wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben 40 min bei 37° im Wasserbad unter Luftzutritt geschüttelt und die Reaktion durch Zugabe von 0·3 ml 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und 5 minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad gestoppt.

In den kinetischen Untersuchungen wurden für die Inkubation wesentliche Faktoren einzeln variiert. Dies wird im Ergebnisteil beschrieben.

#### 4. Bestimmung von Phenazon, 4-Aminophenazon, Morphin, Glukose-6-Phosphatase-Aktivität und Eiweiß

Im Filtrat des denaturierten Inkubationsansatzes wurden das nicht umgewandelte Phenazon, das aus Aminophenazon gebildete 4-Aminophenazon bzw. aus Kodein gebildete Morphin bestimmt:

Phenazon wurde nach Brodie *et al.*<sup>4</sup> nach Nitrosierung spektrophotometrisch gemessen, nur wurde mit Trichloressigsäure gefällt und Phenazon direkt im Filtrat ermittelt. Die Wiederfindungsrate zeigt dabei eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Überstandsmenge, sie beträgt für 1,8 ml Überstand im Inkubationsansatz durchschnittlich 80 %. 4-Aminophenazon wurde nach Brodie *et al.*<sup>5</sup> in der Modifikation nach Jóhannesson *et al.*<sup>14, 15</sup> nach Diazotierung und Kupplung an 2-Naphthol spektrophotometrisch bestimmt.

Morphin wurde nach Snell und Snell spektrophotometrisch, wie bei<sup>14, 15</sup> angegeben, ermittelt.

Die Wiederfindungsrate für 4-Aminophenazon und Morphin war vom Eiweißgehalt im Inkubationsansatz unabhängig. In allen Versuchen wurden Leerwerte mitgeführt, in denen das jeweilige Substrat durch Aqua bidest. ersetzt war.

Außerdem wurden täglich Eichwerte bestimmt.

Die Glukose-6-Phosphatase-Aktivität wurde in Anlehnung an Swanson<sup>38</sup> in

0.05–0.2 ml Gewebefraktion nach Zusatz von 0.5 ml Na-Glukose-6-Phosphat, 0.08 M, 0.1 ml EDTA-Lösung, 0.01 M und 0.2 ml Imidazolpuffer pH 6.5 durch 30 min Inkubation bei 37° und Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarrow ermittelt. Eiweiß wurde nach der Kjeldal-Methode bestimmt.

### 5. Darstellung und statistische Auswertung der Versuche

Die Ergebnisse werden auf g Leber-Frischgewicht oder g Eiweiß der Überstansfraktion berechnet, mit arithmetischem Mittelwert und Standardfehler angegeben. In geeigneten Versuchsanordnungen wurden die Regressionsgleichungen I. Grades mit Standardabweichungen errechnet und der Korrelationskoeffizient bestimmt. Statistische Vergleiche erfolgten mit dem *t*-Test bei einer vorgegebenen Signifikanzgrenze von  $P \leq 0.05$ .

## ERGEBNISSE

### 1. Verteilung der Enzymaktivitäten

In drei Versuchen wurden dem Standardinkubationsansatz 1.8 ml bzw. 1 ml Gesamthomogenat, Überstand, Niederschlag oder Waschflüssigkeit als Enzymquellen zugesetzt und die entsprechenden Aktivitäten bestimmt. Der Anreicherungsfaktor (Quotient aus Enzymaktivität in % der Gesamtaktivität und dem Eiweißanteil in % am Gesamtprotein) für die Phenazonhydroxydase, die Aminophenazon-*N*-demethylase und die Kodein-*O*-demethylase war deutlich unterschiedlich und deckte sich in keinem Falle mit der Verteilung der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität.

### 2. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Den Inkubationsansätzen wurden Überstandsfraktionen in geometrischer Verdünnung zugefügt. Bei der Untersuchung der Phenazonhydroxylierung wurde das Enzym eines entsprechenden Teils des Überstandes durch Kochen inaktiviert und damit der aktive Überstand verdünnt, um den durch die Fällung der Rückbestimmung entgehenden Phenazonanteil innerhalb der Grenzen der Variation der Eiweißwerte konstant zu halten, vergl. 2.4. Bei der Untersuchung der *N*-Demethylierung wurde sowohl mit 1.15 %iger KCl-Lösung als auch mit gekochtem Überstand verdünnt. Es zeigten sich keine Differenzen. In den Versuchen über die *O*-Demethylierung wurde lediglich mit 0.15 M Phosphatpuffer pH 7.6 verdünnt.

Alle Aktivitäten sind im untersuchten Konzentrationsbereich von der eingesetzten aktiven Überstandsmenge (0.125–1.8 ml) statistisch signifikant linear abhängig.

### 3. Abhängigkeit von der Substratkonzentration

In den Inkubationsansätzen wurde die Substratkonzentration variiert.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 1 dargestellt.

Für alle drei Substrate steigt der Umsatz mit zunehmender Substratkonzentration erwartungsgemäß linear an. Bei der Phenazonhydroxylierung zeigt sich nach Überschreiten einer optimalen Substratkonzentration eine Substrathemmung, die beim Aminophenazonabbau nur geringfügig und beim Kodienabbau nicht nachweisbar ist. Aus unseren Ergebnissen lassen sich folgende  $K_m$ -Werte nach *Eadie-Hofstee* errechnen:

Hydroxylierung von Phenazon:	$2.12 \times 10^{-3}$ mol/l.
<i>N</i> -Demethylierung von Aminophenazon:	$1.45 \times 10^{-3}$ mol/l.
<i>O</i> -Demethylierung von Kodein:	$0.63 \times 10^{-3}$ mol/l.

#### 4. Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Für die Dealkylierungsreaktionen konnte bis zu einer Inkubationsdauer von 30 min eine lineare Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit festgestellt werden, bei der Phenazonhydroxylierung besteht Linearität zwischen der 10 und 30 min.

#### 5. Abhängigkeit von der Temperatur

Die Phenazonhydroxylase und die Aminophenazon-*N*-demethylase zeigen bei 37° den höchsten Umsatz, während die Aktivität der Kodein-*O*-demethylase zwischen 37° und 44° ein Optimum hat, s. Abb. 2.

#### 6. Abhängigkeit von der Konzentration an Glukose-6-Phosphat, NADP und Nikotinsäureamid

##### 6.1. Abhängigkeit von der Konzentration an Glukose-6-Phosphat.

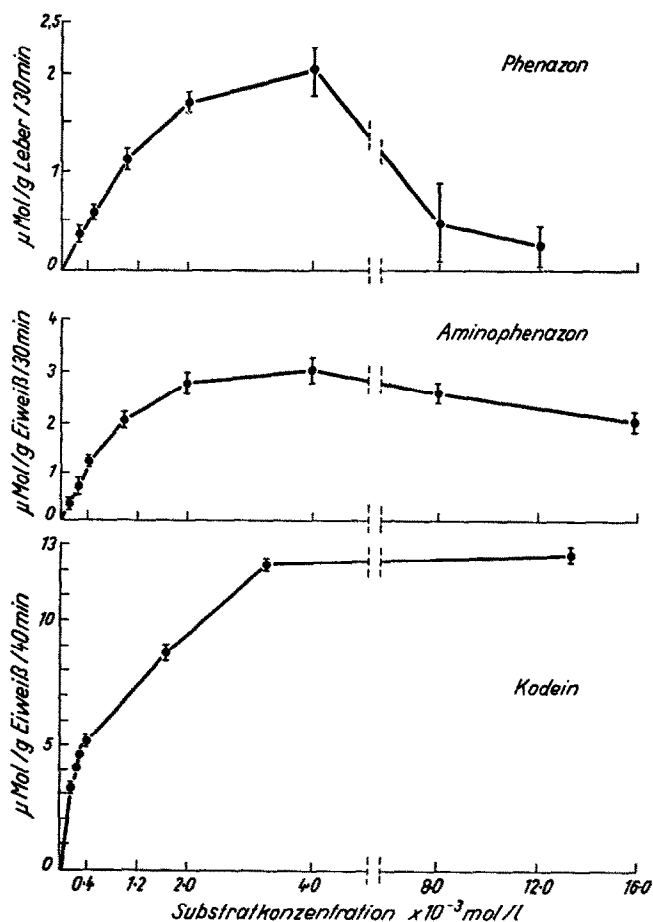


Abb. 1. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat/g Eiweiß bzw. g Leber/ Inkubationszeit in min) von der Substratkonzentration ( $0.125\text{--}16.0 \times 10^{-3}$  mol/l.). Die Substratmenge wurde jeweils in 0.5 ml bzw. in 0.2 ml Aqua bidest. zum Standardinkubationsansatz zugesetzt.

Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_x$ ;  $n = 4$ .

Im geprüften Konzentrationsbereich von  $0.04\text{--}5.0 \times 10^{-3}$  mol/l. zeigt sich bei allen drei Reaktionen keine statistisch zu sichernde Abhängigkeit der Aktivität von den eingesetzten Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen.

### 6.2. Abhängigkeit von der NADP-Konzentration.

Der Umsatz von Phenazon, Aminophenazon und Kodein zeigt keine statistisch zu sichernde Abhängigkeit vom zugesetzten NADP (Konzentrationsbereich von  $0.09\text{--}11 \times 10^{-5}$  mol/l.)

### 6.3. Abhängigkeit von der Nikotinsäureamid-Konzentration

Für den Phenazon- und Kodeinabbau besteht im untersuchten Bereich keine Abhängigkeit von der Nikotinsäureamid-Konzentration. Vorbehandlung der Tiere mit Nikotinsäureamid war ohne Einfluß. Die Aminophenazon-*N*-demethylase zeigt mit zunehmenden Konzentrationen bis zu  $4 \times 10^{-2}$  mol/l. eine Aktivitätserhöhung. Durch eine Vorbehandlung mit Nikotinsäureamid *in vivo* ließ sich eine

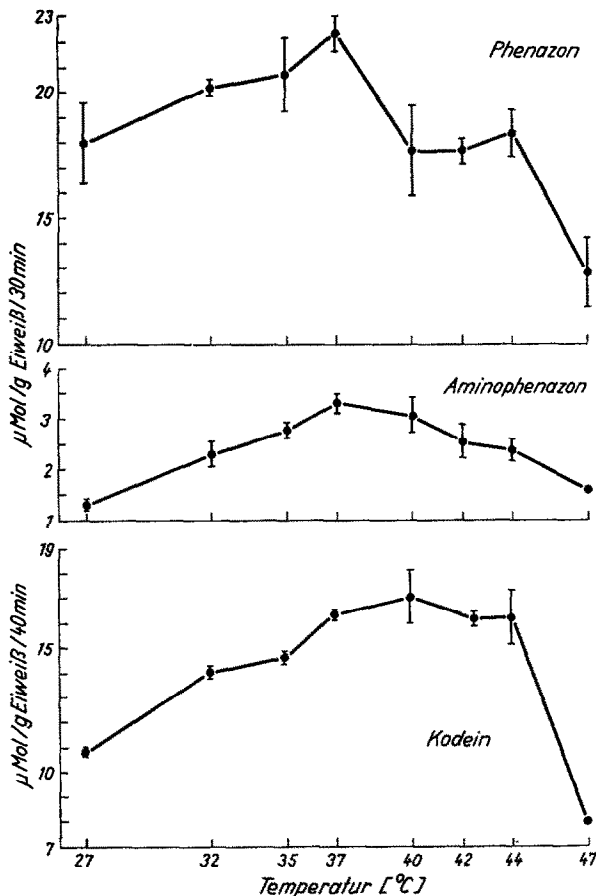


Abb. 2. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetzt Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) von der Inkubationstemperatur (in  $^{\circ}\text{C}$ ).

Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$   $n = 6\text{--}21$ .

dosiesabhängige Aktivitätssteigerung erzielen, *in vitro* war dann eine Sättigung des Systems mit entsprechend kleineren Mengen an Nikotinsäureamid möglich.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

### 7. Abhängigkeit von Art, Molarität und pH des zugesetzten Puffers

Alle Reaktionen wurden unter Zusatz von 0.2 M Tris-Maleat-NaOH-Puffer im pH-Bereich von 6.0–8.6 und von 0.1 M sowie 0.2 M Phosphatpuffer im pH-Bereich von 6.2–8.0 untersucht. Die pH-Abhängigkeiten sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

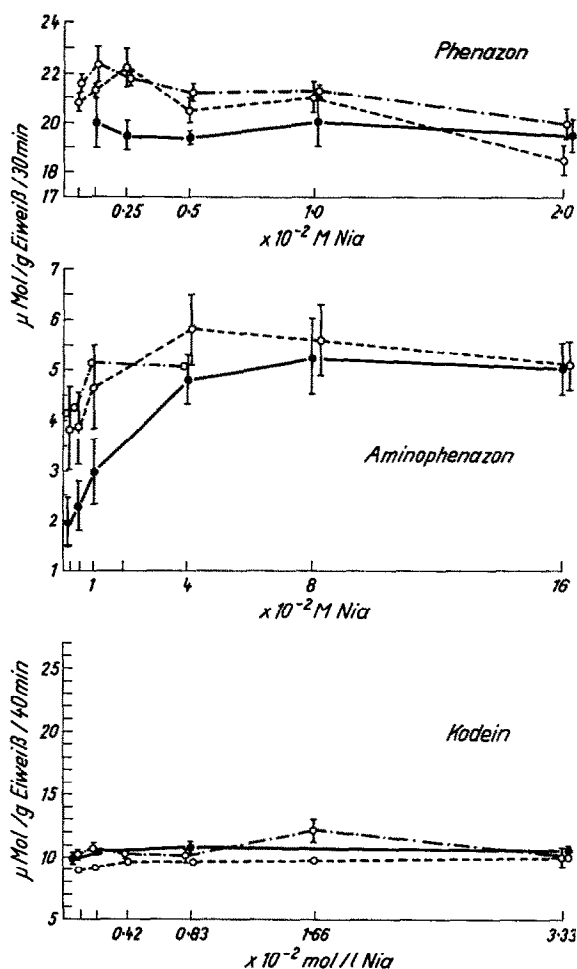


ABB. 3. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) von der Nikotinsäureamid-Konzentration im Inkubationsansatz ( $0.125\text{--}16.0 \times 10^{-2} \text{ mol/l.}$ ) mit und ohne Vorbehandlung mit Nikotinsäureamid *in vivo*. Es wurde jeweils in 0.5 ml Aqua bidest. dem Standardinkubationsansatz zugesetzt. Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_x$   $n = 4$ .

- — ● : ohne Vorbehandlung
- — · — ○ : 2.0 g Nikotinsäureamid/kg KG i.p. 2 h vor Leberentnahme
- - - - ○ : 0.5 g Nikotinsäureamid/kg KG i.p. 2 h vor Leberentnahme

Alle pH-Angaben beziehen sich auf das aktuelle pH im Inkubationsansatz. Während der Inkubation bei optimalen pH-Werten verschob sich das pH unwesentlich.

Die pH-Optima und maximalen Substratumsätze sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Konzentration des zugesetzten Phosphatpuffers ist aus Abb. 6 ersichtlich.

Während die Phenazonhydroxylase bereits bei Erhöhung der Pufferkonzentration auf 0.2 M und 0.3 M mit einem deutlichen Aktivitätsverlust reagiert, nimmt die Aktivität der Demethylasen mit steigender Konzentration zu. Die Aktivität der Kodein-O-demethylase erreicht bei 0.5 M Phosphatpuffer ein Maximum, die der

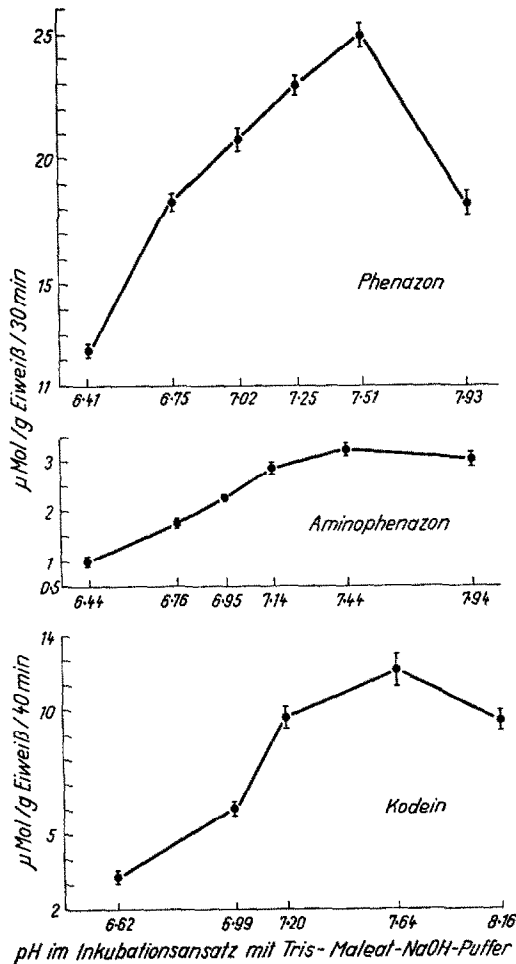


ABB. 4. Abhängigkeit der Enzymaktivität (μmol umgesetztes Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) vom pH im Inkubationsansatz bei Verwendung 0.2 M Tris-Maleat-NaOH-Puffers. 1 bzw. 2.5 ml 0.2 M Tris-Maleat-NaOH-Puffer pH 6.0–8.6 wurden dem Standardinkubationsansatz statt Phosphatpuffer zugesetzt.

Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_x$ ;  $n = 5$ .



Aminophenazon-*N*-demethylase nimmt dagegen bis zu Pufferkonzentrationen von 1.0 M stetig zu.

Eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Inkubationsansatz durch Zusatz von 0.5 M NaCl-Lösung führt zu keiner wesentlichen Veränderung der Aktivität, die unter Standardbedingungen erzielt wird.

#### 8. Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Gesamtleber und des Überstandes bei Zimmertemperatur

Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

Die Inaktivierung erfolgte mit zunehmender Lagerungsdauer für die drei gemessenen

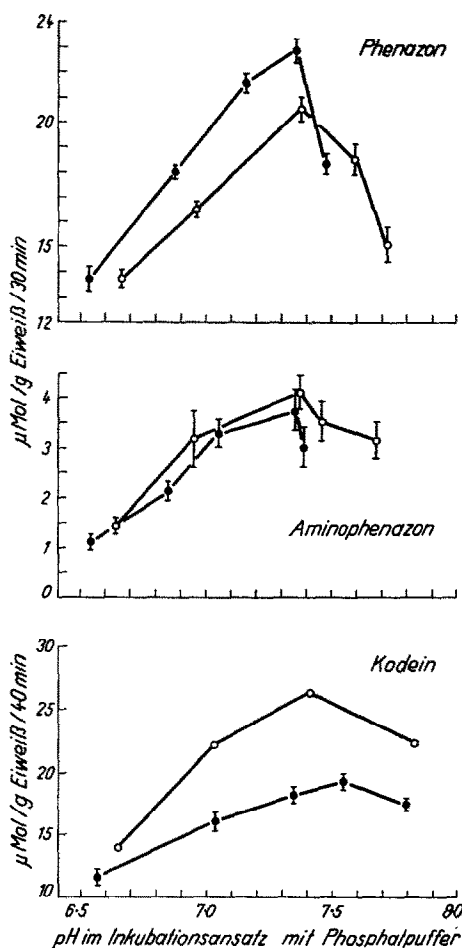


Abb. 5. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) vom pH im Inkubationsansatz bei Verwendung von 0.1 und 0.2 M Phosphatpuffer. 1 bzw. 2.5 ml 0.1 oder 0.2 M Phosphatpuffer pH 6.5–8.0 wurden dem Standardinkubationsansatz zugesetzt. Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ;  $n = 5$ .

● — ● : 0.1 M Phosphatpuffer  
○ — ○ : 0.2 M Phosphatpuffer

TABELLE 1.

	Phenazon- Hydroxylierung	Aminophenazon- N-Demethylierung	Kodein O-Demethylierung
Trispuffer 0.2 M pH—Optimum Umsatz ( $\mu\text{mol/g Eiw.}/\text{min}$ )	7.51 $0.83 \pm 0.02$	7.44 $0.11 \pm 0.01$	7.64 $0.41 \pm 0.01$
Phosphatpuffer 0.1 M pH—Optimum Umsatz ( $\mu\text{mol/g Eiw.}/\text{min}$ )	7.35 $0.76 \pm 0.02$	7.37 $0.12 \pm 0.01$	7.60 $0.49 \pm 0.02$
Phosphatpuffer 0.2 M pH—Optimum Umsatz ( $\mu\text{mol/g Eiw.}/\text{min}$ )	7.38 $0.68 \pm 0.02$	7.38 $0.14 \pm 0.01$	7.41 $0.88 \pm 0.03$

Jedem Mittelwert liegen je 6 Einzelversuche zugrunde

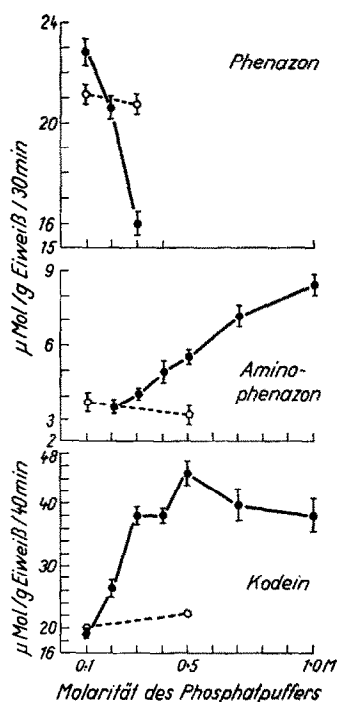


ABB. 6. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) von der Konzentration des Phosphatpuffers. 1 bzw. 2.5 ml 0.1–1.0 M Phosphatpuffer pH 7.4 werden dem Standardinkubationsansatz zugesetzt. Zum Vergleich wird die Osmolarität 0.1 M

Phosphatpuffers pH 7.4 mit NaCl auf 0.5 mol/l erhöht Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_x$ ;  $n = 5$ .

● — ● : Molarität des Phosphatpuffers pH 7.4

○ — — ○ : mit NaCl auf 0.5 M erhöhte Osmolarität des 0.1 M Phosphatpuffers pH 7.4.

Aktivitäten unterschiedlich schnell, wobei die Phenazonhydroxylierung bei Aufbewahrung des Überstandes schneller abfiel als in der gelagerten Gesamtleber; die Aktivitäten der Dealkylierungsreaktionen fielen bei Aufbewahrung der Gesamtleber steiler ab.

### BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Technik des Homogenisierens beeinflusst die Aktivität und Haltbarkeit mikrosomaler Enzyme.<sup>8, 11, 13</sup> Unsere Methode wurde daher in allen Versuchen streng beibehalten.

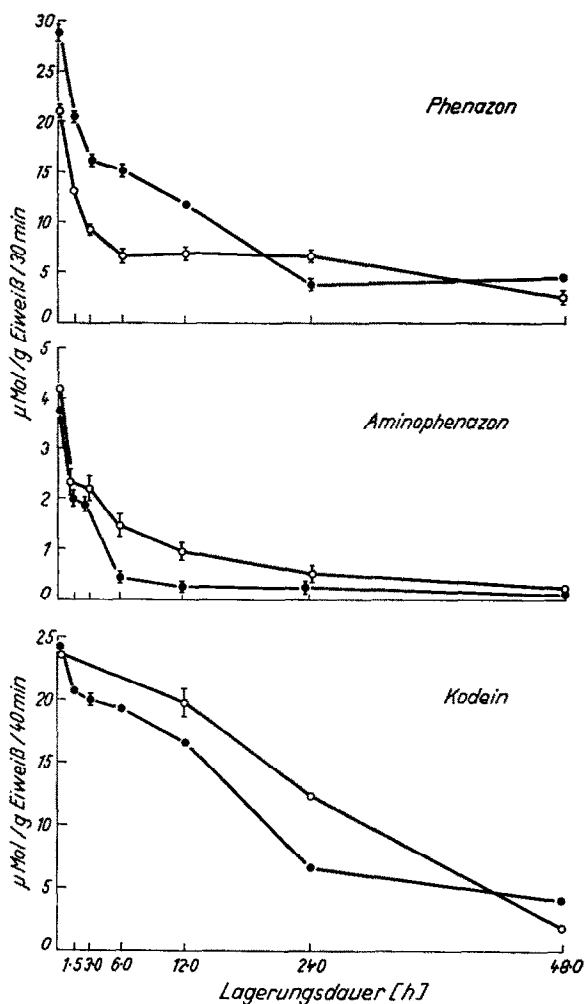


Abb. 7. Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat/g Eiweiß/Inkubationszeit in min) von der Lagerungsdauer.

● — ● : der Leber  
○ — ○ : des Überstandes  
bei Zimmertemperatur (in Stunden).  
Dargestellt sind:  $\bar{x} \pm s_x$ ;  $n = 5$ .

Nach den Untersuchungen von Kato *et al.*<sup>21</sup> ergibt die Homogenisation in 1·15 %iger KCl-Lösung (1 g Leber in 3 ml Homogenat) optimale Aktivitäten beim Hexobarbitalabbau durch den 9000 g-Überstand.

Diese Technik wurde von den meisten Untersuchern (vergl. Einleitung) geübt und von uns ebenfalls übernommen. Die Angaben verschiedener Untersucher über die Zentrifugationsbedingungen liegen zwischen  $8500\text{ g} \times 10\text{ min}^7$  und  $10,000\text{ g} \times 20\text{ min}^{24}$  bzw.  $20,000\text{ g} \times 10\text{ min}^1$  bei Homogenatverdünnungen von 1:2–1:10 in verschiedenen Medien.

Wir schlossen uns der Mehrzahl der Untersucher an, die nach einer Homogenisation 1:3 in 1·15 %iger KCl-Lösung (vergl. Kato *et al.*<sup>21</sup> 20 min bei 9000 g zentrifugierten. Dabei zeigte sich für die verschiedenen von uns untersuchten Reaktionen eine unterschiedliche Anreicherung.

Die optimalen Homogenisations- und Zentrifugationsbedingungen für die von uns untersuchten mikrosomalen Leberenzyme sind unterschiedlich und schwer zu standardisieren. v. Jagow *et al.*<sup>13</sup> berichten über ähnliche Erfahrungen.

Eine optimale Auswaschung der mikrosomalen Enzyme aus dem 9000 g-Niederschlag ist möglich, führt aber zu einer starken Verdünnung der verwendeten Überstandsfraction und wurde von uns deshalb nicht durchgeführt.

2. Der Abbau der von uns eingesetzten Substrate Phenazon, Aminophenazon und Kodein nimmt mit zunehmender Verdünnung der Überstandsfraction linear ab. Mit unterschiedlich konzentrierten Mikrosomenpräparationen gewonnen Ergebnisse sind somit direkt vergleichbar. Analoge Beobachtungen machten Orrenius,<sup>33</sup> Rubin *et al.*<sup>37</sup> und Gram *et al.*<sup>10</sup> Andere Untersucher fanden in isolierten Mikrosomenfraktionen eine Auto-Inhibition, wenn die Konzentration niedriger oder höher als diejenige im Homogenat war<sup>19</sup> bzw. nur bei höheren Konzentrationen eine Hemmung.

3. Sättigung mit den von uns verwendeten drei Substraten tritt bei unterschiedlichen Konzentrationen ein, eine Substrathemmung im untersuchten Konzentrationsbereich ist nur für Phenazon signifikant. Eine vergleichbare Sättigungskurve für das Aminophenazon beschreibt auch Orrenius,<sup>33</sup> Sättigungskurven mit anderen Substraten wurden mehrfach mitgeteilt. Eine Substrathemmung fanden dabei Kampffmeyer und Kiese<sup>19</sup> für die Hydroxylierung von Anilin. Nach Kuntzman *et al.*<sup>23</sup> liegen die  $K_m$ -Werte für Enzyme der oxydativen Arzneimittelbiotransformation in der Größenordnung von  $10^{-4}\text{ mol/l}$ .

4. Die Angaben über die Inkubationszeiten schwanken in der Literatur zwischen 5 min<sup>32</sup> und 5 Std.,<sup>39</sup> wobei die Mehrzahl der Untersucher Inkubationszeiten zwischen 10 und 30 min und Fouts und Mitarb.<sup>14, 15</sup> 120 min angeben (vergl. Einl.). Linearität des Umsatzes findet sich speziesabhängig und substratspezifisch<sup>10</sup> nur innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. Angaben über den Zeit-Umsatz-Verlauf der von uns untersuchten Phenazonhydroxylierung fanden wir nicht.

Für Aminophenazon wird ein linearer Umsatz mit der Zeit bis zu 50 min<sup>33</sup> und für Kodein "für mindestens 30 min"<sup>24</sup> angegeben.

Unter den von uns festgelegten Standardbedingungen finden sich lineare Beziehungen bis zu einer Inkubationsdauer von 30 min für alle 3 Substrate. Die Zugabe von eiskaltem Überstand zur Kofaktoren-Substratmischung von 37° zu Inkubationsbeginn wirkt sich auf die Anfangsgeschwindigkeit der Phenazonhydroxylierung meßbar aus. Bei den anderen Reaktionen ist die initiale Verzögerung nicht meßbar.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschien die Arbeit von Gram und Fouts,<sup>10</sup> die für verschiedene Biotransformationsreaktionen die Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit bei Einsatz einer 9000 g-Leberfraktion (Dauer der Zentrifugation nicht angegeben) von Maus, Ratte und Kaninchen bei Einsatz von, auch nach unseren Ergebnissen, supraoptimalen Konzentrationen an Kofaktoren und Substraten untersuchten. Für die Kodein-*O*-demethylierung fanden sie bei der Ratte bereits nach weniger als 15 min eine Abweichung vom linearen Umsatz, eine Plateaubildung aber erst nach 60 min. Unter unseren Versuchsbedingungen ist der Abbau 30 min linear, eine Plateaubildung finden wir ebenfalls nach 60 min. Abweichend von unseren Ergebnissen bei der Aminophenazon-*N*-demethylierung mit einer linearen Reaktion bis zu 30 min und einer anschließenden Plateaubildung beobachteten Gram und Fouts<sup>10</sup> einen über 90 min praktisch linearen Umsatz.

Die von Jóhannesson *et al.*<sup>14, 15</sup> angegebene Inkubationsdauer von 120 min ist sowohl nach den später publizierten Ergebnissen des gleichen Arbeitskreises als auch nach unseren Ergebnissen bei Einsatz von Rattenlebermikrosomen zu lang. Um einerseits den Substratumsatz im Bereich der linearen Abhängigkeit von der Zeit und andererseits in optimalen Mengen zu messen, legten wir die Standardinkubationszeit mit 30 bzw. 40 min fest.

5. In allen uns bekannten Untersuchungen wird eine Inkubationstemperatur von 37° gewählt. Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit der Aktivität mikrosomaler, arzneimittelabbauender Enzyme sind uns von Leadbeater und Davies,<sup>24</sup> Kerékjártó *et al.*<sup>22</sup> und von Creaven *et al.*<sup>9</sup> bekannt.

Für die Phenazonhydroxylierung und die Aminophenazon-*N*-demethylierung finden wir ein Maximum in einem relativ engen Bereich um 37°, während die Kodein-*O*-demethylierung zwischen 37 und 44° optimal verläuft. Der Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei Steigerung der Inkubationstemperatur von 27 auf 37° verläuft bei allen drei Reaktionen linear, er ist für die Phenazonhydroxylierung am flachsten und für die Aminophenazon-*N*-demethylierung am steilsten. Oberhalb von 44° findet sich bei allen drei Reaktionen ein erheblicher Aktivitätsverlust. Unsere Standardansätze wurden bei 37° inkubiert.

6.1. Die Abhängigkeit der von uns untersuchten Reaktionen von dem NADPH<sub>2</sub>-regenerierenden System ist seit langem bekannt,<sup>2, 30</sup> Wird NADP aus dem Inkubationsansatz weggelassen bzw. durch NAD ersetzt, resultiert je nach Enzymquelle eine verschieden starke Verminderung<sup>9, 33</sup> der Aktivität. Entsprechend wird in allen uns bekannten in vitro-Untersuchungen NADPH<sub>2</sub> oder NADP zusammen mit einem NADPH<sub>2</sub>-regenerierenden System zugegeben (vergl. Einl.). Die zugesetzten NADP-Mengen bewegen sich dabei je nach Art und Menge des Enzym- und Substratzusatzes zwischen  $2 \times 10^{-5}$  mol/l.<sup>32</sup> und  $10^{-3}$  m (m = molar oder Mol<sup>23</sup>). Die Mehrzahl der Untersucher verwendet Konzentrationen von  $1-9 \times 10^{-4}$  mol/l., Fouts und Mitarb.<sup>10, 14, 15</sup> zwischen  $5.7 \times 10^{-4}$  und  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/l. Kinetische Untersuchungen sind uns nur vereinzelt bekannt. Mueller und Miller<sup>30</sup> finden bei Verwendung von Homogenat bei 50 µg NADP (=  $2.25 \times 10^{-5}$  mol/l.) Substratsättigung.

Orrenius<sup>33</sup> bestimmt bei Umsatz von Aminophenazon (5 mM) durch Rattenlebermikrosomen (2 mg Protein) unter optimalen Bedingungen für NAD eine  $K_m$  von  $2.5 \times 10^{-5}$  mol/l.

In unseren Versuchen ist die NADP-Konzentration nicht limitierend,  $K_m$ -Werte

lassen sich in unsrem System nicht ermitteln, da im Gegensatz zu Orrenius<sup>33</sup> mit Leberüberstand gearbeitet wurde und mit dem Überstand jeweils nicht bekannte und sicher unterschiedlich hohe Konzentrationen an endogenem NADP zugesetzt wurden. So erklärt sich auch, daß bei vergleichsweise sehr niedrigen NADP-Konzentrationen Sättigungsbedingungen bestehen.

In einem orientierenden Versuch wurde an Stelle von NADP und Glukose-6-phosphat NADPH<sub>2</sub> zugesetzt. Die Endkonzentration an NADPH<sub>2</sub> im Standardinkubationsansatz wurde zwischen  $0.035\text{--}4.4 \times 10^{-4}$  mol/l. variiert. Bei höheren Konzentrationen (ab  $0.14 \times 10^{-4}$  mol/l.) trat eine Hemmung der Phenazonhydroxylierung und Aminophenazon-*N*-demethylierung auf. Eine Hemmung der Aminophenazon-*N*-demethylierung durch Lebermikrosomen in Gegenwart von NADPH<sub>2</sub> bei NADP-Zusatz wurde durch Orrenius<sup>33</sup> beschrieben.

Möglicherweise lag auch in unseren Versuchen eine Substrathemmung der NADPH<sub>2</sub>-Oxydase vor.

6.2. Eine Abhängigkeit der Aktivität von der Glukose-6-Phosphat-Konzentration konnte in unserer Versuchsanordnung nicht gesichert werden. Creaven u. Mitarb.<sup>9</sup> halten den Zusatz für entbehrlich. Unter Normalbedingungen sind die Substratmengen für das regenerierende System offener ausreichend. Liebecq<sup>25</sup> fand jedoch bei der hungernden Ratte eine verminderte Phenazonhydroxylierung, die durch Glukose-6-Phosphat-Zusatz wieder normalisiert werden konnte. Da bisher keine Substrathemmung beobachtet wurde, setzten wir unseren Standardansätzen stets gleiche Mengen an Glukose-6-Phosphat zu, um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten und evtl. Hungereffekte bei den geplanten Induktionsversuchen auszuschalten.

Nach dem vorliegenden Ergebnis crübrigt sich ein Zusatz von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dieses Enzym wird mit dem Leberüberstand in ausreichenden Mengen zugesetzt.

6.3. Nikotinsäureamid schützt NADP vor dem enzymatischen Abbau durch die im Leberüberstand enthaltene NADP-Glykohydrolase (EC 3.2.2.6).<sup>33</sup> In den uns bekannten Arbeitsvorschriften wird mit Nikotinsäureamid-Konzentrationen zwischen  $1 \times 10^{-3}$  und  $5 \times 10^{-2}$  mol/l. gearbeitet. Unsere Versuche ergaben eine verminderte Aminophenazon-*N*-demethylierung bei Nikotinsäureamid-Konzentrationen unterhalb  $4 \times 10^{-2}$  mol/l., während die Phenazonhydroxylierung und die Kodein-*O*-demethylierung im geprüften Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit von der Nikotinsäureamid-Konzentration zeigen. Dies Ergebnis legt den Schluß nahe, daß Nikotinsäureamid nicht nur als NADP-Schutz wirkt, da in diesem Falle alle 3 Reaktionen in gleichem Maße beeinflußt werden müßten, sondern außerdem in einer für die 3 Reaktionen unterschiedlichen Weise eingreift. Ein Mangel an endogenem NADP, dessen Bildung durch die *in vivo*-Vorbehandlung mit Nikotinsäureamid begünstigt werden könnte, wird durch supraoptimalen NADP-Zusatz ausgeglichen und müßte sich außerdem bei allen 3 Reaktionen gleichsinnig zeigen.

Eine Steigerung der Demethylierung von Trimethadon durch i.p.-Vorbehandlung mit Nikotinsäureamid wurde bereits von Butler<sup>6</sup> beschrieben. Es ist denkbar, daß es sich dabei um eine Induktionswirkung handelt, die 2 h nach Nikotinsäureamid-Behandlung schon meßbar sein könnte; das verwandte Nikethamid ist als guter Induktor bekannt (vergl. Remmer<sup>36</sup>).

7. In den einschlägigen Untersuchungen werden vorwiegend Tris-HCl-oder Phosphatpuffersysteme verwendet, die Molarität des zugesetzten Puffers schwankt

dabei zwischen 0.05 und 0.5 M, die aktuelle Konzentration des Puffers im Inkubationsansatz ist vielen Arbeiten nicht zu entnehmen. Soweit sie sich aus methodischen Angaben errechnen läßt, liegt sie meist zwischen 0.02 und 0.07 mol/l. und nur in Ausnahmefällen über 0.1 mol/l.<sup>6</sup> bzw. über 0.2 mol/l.<sup>27, 28</sup>

Art und Molarität des verwendeten Puffers beeinflussen die maximale Umsatzrate und das pH-Optimum in den 3 von uns untersuchten Reaktionen unterschiedlich. Bei Einsatz von 0.2 M Phosphatpuffer liegen die Umsatzraten für die Demethylierungsreaktionen höher und für die Phenazonhydroxylierung niedriger als mit 0.1 M Phosphat- und mit 0.2 M Trispuffer.

Die *O*- und *N*-Demethylierung konnten wir mit weiterer Erhöhung der Molarität erheblich weiter steigern, während sich bei der Hydroxylierung mit der Erhöhung der Pufferkonzentration ein zunehmender Hemmeffekt zeigte. Kato und Mitarb.<sup>21</sup> konnten die Hydroxylierung von Hexobarbital ebenfalls steigern, wenn sie statt in 0.1 in 0.2 M Phosphatpuffer homogenisierten. Creaven und Mitarb.<sup>9</sup> fanden jedoch übereinstimmend mit unserem Befund über die Phenazonhydroxylierung für die Hydroxylierung von Kumarin eine Umsatzhemmung bei Steigerung der Konzentration des Phosphatpuffers über 0.01 mol/l. im Inkubationsansatz. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen steht die relative Aktivitätsminderung der Kumarinhydroxylase in Trispuffer gegenüber äquimolarem Phosphatpuffer. Die aktuelle Pufferkonzentration unserer Standardinkubationsansätze liegt mit 0.02 mol/l schon außerhalb des nach Creaven und Mitarb.<sup>9</sup> optimalen Bereiches.

Die Umsatzsteigerung der Demethylierungsreaktionen ist auf eine Steigerung der Phosphationenkonzentration zurückzuführen, da eine Erhöhung der Ionenkonzentration durch Zugabe von NaCl keinen Einfluß hatte. Der Phosphationeneffekt läuft sicher nicht über eine Anreicherung von Glukose-6-phosphat durch Endprodukt-hemmung der Glukose-6-phosphatase, da eine Glukose-6-phosphat-Konzentrationssteigerung zu keiner Aktivitätssteigerung führt.

Die Phenazonhydroxylierung hat Liebecq<sup>25</sup> in Phosphatpuffer bei pH 7.5 gemessen, während für die Hydroxylierung anderer Substrate die Angaben zwischen einem pH von 6.9<sup>8</sup> und einem pH von 8.5 für eine große Anzahl von Substraten<sup>29</sup> schwanken. Ganz allgemein geht die hydroxylierende Aktivität bei einem pH von 7.0 und darunter schnell verloren.<sup>29</sup> Die pH-Optima unserer 3 Reaktionen differieren zwischen 7.35 und 7.51, sie liegen in Tris-Maleat-NaOH-Puffer stets etwas höher als in 0.1 und 0.2 M Phosphatpuffer. Auch Creaven und Mitarb.<sup>9</sup> finden für die Hydroxylierung von Kumarin in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und in Trispuffer bei pH 7.5–8.0 einen optimalen Umsatz. Die unterschiedlichen pH-Optima für die Hydroxylierung verschiedener Substrate sind daher teilweise mit der Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme zu erklären. Andererseits teilten Mao und Mitarb.<sup>26</sup> für die Demthyllierung von Erythromycinen ein substratabhängig unterschiedliches pH-Optimum zwischen 7.5 und 8.0 mit, so daß anzunehmen ist, daß der für den Umsatz optimale pH allgemein substratabhängig ist.

Für unsere drei Substrate wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse einheitlich Phosphatpuffer mit einem pH von 7.4 im Inkubationsansatz verwendet.

8. Schließlich wurde der Einfluß einer unterschiedlich langen Langerung der Gesamtleber vor der Homogenisation und des fertiggestellten Überstandes bei Zimmertemperatur auf die Enzymaktivitäten überprüft. Wie aus den Inkubationsversuchen zu erwarten, kam es zu einem schnellen Aktivitätsschwund, am langsamsten bei der Kodein-*O*-demethylierung. Die Inaktivierung erfolgte bei Aufbewahrung der

Gesamtleber bei den drei Reaktionen unterschiedlich schnell. Entsprechende Ergebnisse teilen Juchau und Mitarb.<sup>16</sup> für den Aktivitätsverlust der Benzpyren und Zoxaxolamin-hydroxylase bei Lagerung der Leber *in situ* bei Zimmertemperatur mit. Auch Lagerung bei  $-40^{\circ}$  führt noch zu einem allmählichen Aktivitätsverlust.<sup>24</sup>

Die Lebern wurden daher unter Eiskühlung aufgearbeitet und der Überstand sofort nach Fertigstellung verwendet.

9. Beim Studium der Ergebnisse fallen die relativ großen Standardfehler auf. Das ist auf die von Tag zu Tag differierenden Enzymaktivitäten zurückzuführen, da die an ein und demselben Tag gemessenen Werte untereinander geringe Abweichungen zeigen. Rattenlebermikrosomen sind gegenüber Manipulationen bei der Zubereitung der Enzympräparation sehr empfindlich; dies wurde an Hand von zeitabhängigen Inkubationsversuchen und auch elektronenoptisch festgestellt.<sup>10, 11, 24</sup> Die Aminophenazon-*N*-demethylase ist dabei ganz besonders empfindlich.<sup>11</sup>

Es ist denkbar, daß bei den von uns geübten Homogenisations und Zentrifugationsbedingungen (Verzicht auf den Waschvorgang) kleine Schwankungen beim Dekantieren der Überstände die täglichen Streuungen mit bedingen. Auch bei den gleichen Arbeitsgängen lassen sich Streuungen insbesondere bei der Bestimmung der *N*-Demethylierung unter unseren Versuchsbedingungen daher kaum vermeiden.

### *Schlußbemerkungen*

1. Die von uns ausgewählten Substrate sollten als repräsentativ für eine ganze Klasse von Stoffen gelten, die dem jeweils gleichen mikrosomalen Umbau unterliegen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch ebenso wie ihr Vergleich mit Befunden anderer Untersucher, daß die Bedingungen für den mikrosomalen Umbau substratspezifisch sehr unterschiedlich sind. Offensichtlich handelt es sich, wie bisher mehrfach geäußert,<sup>12, 17-20, 34, 35</sup> bei der sog. NADP-abhängigen mischfunktionellen Oxydase in Lebermikrosomen um eine Gruppe verschiedener Enzyme bzw. Enzymsysteme, die unterschiedliche Substrate unter sehr unterschiedlichen Bedingungen umbauen. Es ist daher nicht möglich, Ergebnisse, die bei der Untersuchung eines oder auch mehrerer Enzyme gewonnen werden, als repräsentativ für die Leistungen aller mikrosomalen arzneimittelabbauenden Enzyme zu betrachten.

2. Bei den mitgeteilten Befunden handelt es sich um Ergebnisse von Voruntersuchungen für Ansätze zur Bestimmung der Aktivität mikrosomaler Leberenzyme, die auch unter den Bedingungen einer induktiven Aktivitätssteigerung auf das mehrfache noch als optimal zu betrachten sind. Die Eigenschaften der mikrosomalen arzneimittelabbauenden Enzyme werden durch Induktion nicht geändert.<sup>31, 37</sup>

Die von Jóhannesson *et al.*<sup>14, 15</sup> als supraoptimal mitgeteilten Versuchsbedingungen erfüllen bei geringfügiger Änderung der Kofaktorenkonzentration und einer erheblichen Verkürzung der Inkubationszeit die genannten Voraussetzungen.

Vergleiche zwischen den von Jóhannesson *et al.*<sup>15</sup> und uns erzielten Enzymaktivitäten an Leberüberständen unbehandelter erwachsener männlicher Ratten sind infolge des methodisch etwas voneinander abweichenden Vorgehens nicht möglich.

3. Ein "Standardinkubationsansatz" für mehrere enzymatische Reaktionen des gleichen Typs bietet den einzelnen Reaktionen nicht gleichermaßen optimale Bedingungen. Dieses Vorgehen stellt in jedem Falle einen Kompromiß dar.

Die vorgelegte Arbeit wurde auf Wunsch der Redaktion gekürzt. Weitere Literaturangaben können von den Autoren angefordert werden.



**Zusammenfassung**—Im Leberüberstand ( $9000\text{ g} \times 20\text{ min}$ ) von erwachsenen männlichen Ratten wurden die Phenazonhydroxylierung, Aminophenazon-*N*- und Kodein-*O*-demethylierung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration, der Substratkonzentration, der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur, von der Konzentration an Glukose-6-Phosphat, NADP und Nikotinsäureamid, von der Art, Konzentration und dem pH des eingesetzten Puffers sowie von der Lagerungsdauer bei Zimmerterperatur bestimmt.

Für die verschiedenen Reaktionen zeigte sich eine unterschiedliche Anreicherung im Überstand, die Aktivitäten sind von der Überstandsmenge linear abhängig. Beim Überschreiten des Substratoptimums zeigt sich bei der Phenazonhydroxylierung eine Substrathemmung. Sie ist beim Aminophenazonabbau wenig und beim Kodeinabbau nicht nachweisbar. Eine lineare Abhängigkeit der Umsätze von der Zeit besteht in den ersten 30 min, die höchsten Aktivitäten werden bei  $37^\circ$  gemessen. Auch hierbei zeigen die drei Reaktionen Unterschiede.

Glukose-6-Phosphat- und NADP-Zusätze hatten keinen Einfluß, Nikotinsäureamid steigerte nur den Aminophenazonabbau. Auch eine Nikotinsäureamidvorbehandlung *in vivo* war hierbei wirksam. Die drei geprüften Reaktionen unterschieden sich weiterhin in ihrer Beeinflussbarkeit durch verschiedene Puffer und durch Lagerung der Gesamtleber oder des Überstandes bei Zimmertemperatur. Es wurden Inkubationsbedingungen ermittelt, die auch für Untersuchungen an mit Arzneimitteln induzierten Tieren geeignet sind. Sie differieren etwas von Substrat zu Substrat, ein "Standardinkubationsansatz" für mehrere verschiedene enzymatische Reaktionen ist problematisch. Die vorgelegten Ergebnisse stützen die Ansicht, daß mehrere NADPH<sub>2</sub>-abhängige mischfunktionelle Oxydasen in den Lebermikrosomen vorhanden sind. Verallgemeinerungen von Ergebnissen, die mit einem Substrat gewonnen wurden, sind selbst für den gleichen Reaktionstyp nur mit Einschränkungen möglich.

#### LITERATUR

1. E. ACKERMANN, *Acta biol. med. german.* **17**, 498 (1966).
2. J. AXELROD, *Pharm. J.* **117**, 322 (1956).
3. H. C. BENÖHR, W. FRANZ und K. KRISCH, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **255**, 163 (1966).
4. B. B. BRODIE, J. AXELROD, R. SOBERMAN und B. LEVY, *Biochem. J.* **179**, 25 (1949).
5. B. B. BRODIE und J. AXELROD, *Pharm. J.* **99**, 171 (1950).
6. T. C. BUTLER, W. J. WADDELL und D. T. POOLE, *Biochem. Pharmac.* **14**, 937 (1965).
7. A. H. CONNEY, C. DAVISON, R. GASTEL und J. J. BURNS, *Pharm. J.* **130**, 1 (1960).
8. J. R. COOPER, J. AXELROD und B. B. BRODIE, *Pharm. J.* **112**, 55 (1954).
9. P. J. CREAVEN, D. V. PARK und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **96**, 390 (1965).
10. T. E. GRAM und J. R. FOUTS, *Pharm. J.* **152**, 363 (1965).
11. T. E. GRAM, L. A. ROGERS und J. R. FOUTS, *Pharm. J.* **155**, 479 (1967).
12. J. F. HENDERSON und P. MAZEL, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1471 (1964).
13. R. v. JAGOW, H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **250**, 261 (1965).
14. T. JOHANNESSON, L. A. ROGERS, J. R. FOUTS und L. A. WOODS, *Acta pharmac. Tox.* **22**, 107 (1965).
15. *ibid.*, *ibid.*, **22**, 255 (1965).
16. M. R. JUCHAU, R. L. CRAM, G. L. PLAA und J. R. FOUTS, *Biochem. Pharmac.* **14**, 473 (1965).
17. H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **244**, 375 (1963).
18. H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **246**, 397 (1964).
20. H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **251**, 112 (1965).
21. R. KATO, P. VASANELLI, G. FRONTINO und E. CHIESARA, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1037 (1964).
22. B. v. KERÉKJÁRTO, F. KRATZ, H. STAUDINGER, *Biochem. Z.* **339**, 460 (1964).
23. R. KUNTZMAN, D. LAWRENCE, A. H. CONNEY, *Molekul. Pharmac.* **1**, 163 (1965).
24. L. LEADBEATER und D. R. DAVIES, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1607 (1964).
25. C. LIEBECQ, *Arch. int. pharmacodyn.* **157**, 219 (1965).
26. J. C.-H. MAO und P. L. TARDREW, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1049 (1965).
27. P. MAZEL, J. F. HENDERSON und J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **143**, 1 (1964).

28. P. MAZEL und J. F. HENDERSON, *Biochem. Pharmac.* **14**, 92 (1965).
29. C. MITOMA, H. S. POSNER, H. C. REITZ und S. UDENFRIEND, *Arch. biochem. biophys.* **61**, 431 (1956).
30. G. C. MEULLER und J. A. MILLER, *J. biol. Chem.* **202**, 579 (1953).
31. K. J. NETTER und G. SEIDEL, *Pharm. J.* **146**, 61 (1964).
32. D. NEUBERT und D. MAIBAUER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **235**, 291 (1959).
33. S. ORRENIUS, *J. cell. Biol.* **26**, 713 (1965).
34. D. PARK und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **63**, 12P (1956).
35. H. S. POSNER, C. MITOMA und S. UDENFRIEND, *Arch. biochem. biophys.* **94**, 269 (1961).
36. H. REMMER, *Excerpta med. Internat. Congress Series* 81, Vol. 4, 57 (1964).
37. A. RUBIN, T. R. TEPHLY und G. J. MANNERING, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1007 (1964).
38. M. A. SWANSON, *Methods of Enzymology* **2**, (Eds. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN) p. 541 Academic Press, New York, (1955).
39. T. TERHO und K. HARTIALA, *Biochem. Pharmac.* **16**, 598 (1967).