

accumulate in these experimental conditions. In fact *N*-demethyldiazepam and oxazepam are obtained after incubating diazepam and *N*-methyloxazepam respectively, while *N*-demethyldiazepam and oxazepam are not furtherly metabolized and they are almost completely recovered as such. The rate of *N*-demethylation of diazepam at saturating concentrations is calculated as 1854 nmoles/g of tissue/hr. In the case of low concentrations of *N*-methyloxazepam the recovered amount of the unmetabolized product added to the respective formed metabolite does not account for the added substrate. Since unpublished studies showed a recovery of *N*-methyloxazepam added to guinea pig liver microsomes of about 90 per cent (the presented data are corrected for the respective recovery factor), the noticed loss of this substrate may suggest a possible alternate metabolic pathway which leads to the formation of unknown compounds.

The findings obtained for diazepam and *N*-demethyldiazepam are consistent with the *in vivo* studies showing that no C₃-hydroxylated metabolites accumulate in blood brain and adipose tissue.² It is interesting to notice that diazepam is metabolized by guinea pigs both *in vitro* and *in vivo*² in a different manner than by rats or mice. As far as the *in vitro* metabolism is concerned, *N*-demethyl-diazepam is slightly hydroxylated by rats and mice but not by guinea pigs while *N*-methyloxazepam is demethylated by mice and guinea pigs but not by rats. Oxazepam is not further metabolized *in vitro* by the liver microsomes of the three animal species here considered.¹

Acknowledgement—This work was supported by NIH Contract No. DHEW/PHS.NIH/PH 43-67-83. The technical assistance of Mr. Claudio Reschiotto is gratefully acknowledged.

Istituto di Ricerche Farmacologiche, Mario 'Negri',
Via Eritrea 62,
20157 Milan,
Italy

E. MUSSINI
F. MARCUCCI
R. FANELLI
S. GARATTINI

REFERENCES

1. F. MARCUCCI, R. FANELLI, E. MUSSINI and S. GARATTINI, *Europ. J. Pharmac.* **7**, 307 (1969).
2. F. MARCUCCI, A. GUAITANI, R. FANELLI, E. MUSSINI and S. GARATTINI, to be published in *Europ. J. Pharmac.* (1970).
3. R. KATO and M. TAKAYANAGHI, *Jap. J. Pharmac.* **16**, 380 (1966).
4. S. GARATTINI, F. MARCUCCI and E. MUSSINI, in *Gas Chromatography in Biology and Medicine, a Ciba Foundation Symposium* (Ed. R. PORTER), p. 161. Churchill, London (1969).
5. F. MARCUCCI, R. FANELLI and E. MUSSINI, *J. Chromat.* **37**, 318 (1968).

Biochemical Pharmacology, Vol. 20, pp. 2531-2534. Pergamon Press, 1971. Printed in Great Britain

Nachweis der 16-Hydroxylierung bei Pregnanen in Ratten nach Barbiturat-Gabe durch Radiospirometrie

(Received 3 December 1970; accepted 25 March 1971)

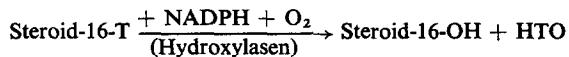
DAS PRINZIP der Stoffwechsel-labilen Tritium-Markierung verwendeten wir zur *in-vivo* Messung der Hydroxylierung bereits Hydroxylgruppen tragender Pregnanderivate bei Ratten. Untersucht wurden die folgenden Steroide,* die alle in Position 16 stabil mit Tritium markiert waren¹

3 α , 17 α , 20 β -Trihydroxy-5 β -pregnan (Trihydroxypregnан)
3 α , 17 α -Dihydroxy-20-oxo-5 β -pregnan (Dihydroxypregnан)
3 α -Hydroxy-20-oxo-5 β -pregnan(Pregnanolon)

* Für die Überlassung der Steroide haben wir Herrn Dr. J. Livet, Paris, zu danken (vergl. 1).

Die radioaktiven Steroide wurden durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Direktmessung mit dem "Dünnschicht-Scanner" (Labor Prof. Berthold, Wildbad) gereinigt, von der Platte eluiert und in Äthanol/physiol. Kochsalzlösung (30:70, v/v) gelöst. Der HTO-Anteil in diesen Lösungen lag nach einer Aufbewahrungszeit von 8 Wochen bei 0, 1–0,3%.

Falls diese Steroide an C₁₆ hydroxyliert werden setzen sie—bedingt durch ihre Tritium-Markierung an C₁₆—ein Mol HTO frei:



Da aufgrund der Synthese¹ nicht angegeben werden kann, ob das Tritium in 16α- oder 16β-Position eingebaut wird, ist hier eine Angabe über die Stereospezifität der Hydroxylase nicht möglich.

Um die Hydroxylierung an C₁₆ *in-vivo* zu messen, injiziert man den Versuchstieren das entsprechende Tritium-markierte Steroid. Das durch Hydroxylierung primär in der Leber gebildete HTO wird innerhalb kurzer Zeit im Körperwasser des Tieres gleichmäßig verteilt. Durch Aktivitätsmessung in einem Aliquot des Körperwassers kann der Gesamtgehalt an HTO im Körperwasser und damit der prozentuale Anteil der Hydroxylierung (bezogen auf die injizierte Steroidaktivität) berechnet werden:

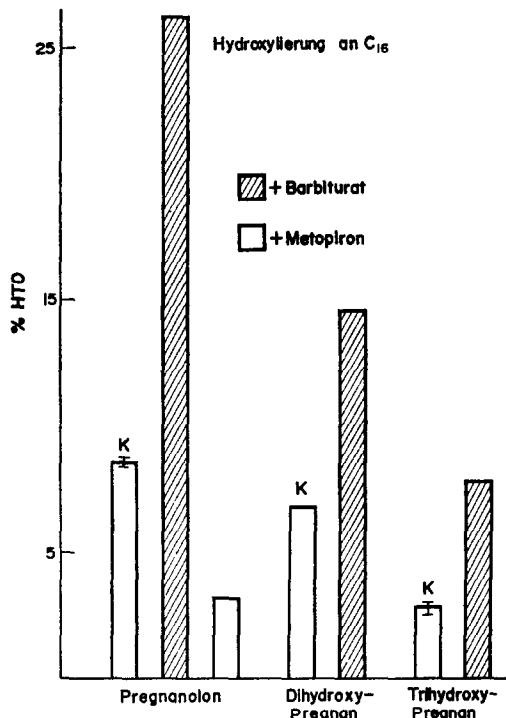


ABB. 1. Hydroxylierung von Pregnan-Derivaten an C₁₆, *in vivo* Nachweis durch HTO-Analyse im Körperwasser.

Geschlechtsreifen Rattenweibchen wurden 5 µg/kg (entsprechend 8,5 µc/Tier) der an C₁₆ mit Tritium-markierten Pregnanen (vergl. Text) injiziert und anschließend der Anteil von Tritium-Wasser im Gesamtkörperwasser bestimmt (2). Die Ordinaten geben den HTO-Anteil im Gesamtkörperwasser 7 Std. post inj. an.

K... Kontrollen.

Barbiturat... Die Versuchstiere erhielten zunächst 3 Tage lang täglich 40 mg Luminal pro kg. (1.–3. Versuchstag). Am 5. Versuchstag wurde das Tritium-markierte Steroid injiziert und die HTO-Bildung gemessen.

Metopiron... Die Versuchstiere erhielten im Zeitraum von 20 Std. vor Versuchsbeginn 5 mal 10 mg Metopiron/kg. Anschließend an die letzte Metopiron-Gabe wurde Pregnanolon-16-T injiziert.

$$\frac{\mu\text{c HTO/ml Körperwasser}}{\mu\text{c Steroid-16-T/ml Körperwasser}} \times 100 = \% \text{ Hydroxylierung an C}_{16}$$

Über Grundlagen und methodische Einzelheiten haben wir an anderer Stelle ausführlich berichtet.^{2,3} Im Rahmen dieser Arbeit sollten am Ganztier folgende Fragen geklärt werden:

- (a) Wie beeinflussen bereits vorhandene Hydroxylgruppen bei Pregnancen die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an C₁₆?
- (b) Wie ändern Barbiturat-induzierte Hydroxylasen diese Hydroxylierung?
- (c) Wird die Hydroxylierung an C₁₆ durch Metopiron gehemmt?

Die Ergebnisse entsprechender Experimente bei Rattenweibchen sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Danach fällt bei den drei Steroiden die Freisetzung des an C₁₆ gebundenen Tritiums in Form von HTO mit der Anzahl der bereits im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen. Mit anderen Worten: Pregnanc-Verbindungen werden *in-vivo* umso leichter hydroxyliert, je weniger Hydroxylgruppen sie bereits tragen.

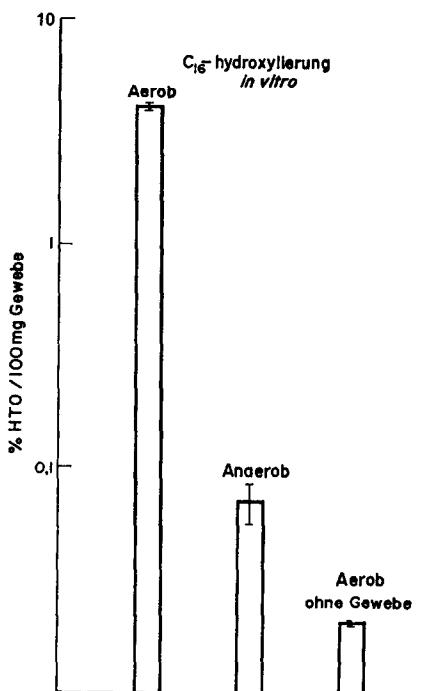


ABB. 2. HTO Bildung aus Pregnenolon-16-T durch Hydroxylierung *in vitro*. Je 1 µg Pregnenolon-16-T (8 µc) wurden in 3 ml Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst und unter folgenden Bedingungen 60 Minuten bei 37° mit 90 mg Leberschnitten inkubiert.

- (a) Aerob.
- (b) Unter 95% N₂/5% CO₂ (anaerob).
- (c) Aerob, ohne Leberschnitte.

Bei Versuch (b) wurde das Substrat erst aus einem Seitenarm eingeschwenkt, nachdem anaerobe Bedingungen hergestellt waren.

Nach 60 Minuten Inkubation wurde der Überstand von allen 3 Ansätzen einer Gefrierdestillation unterworfen und das Wasserdestillat auf den HTO-Anteil untersucht.

Die Ordinate gibt die prozentuale HTO-Bildung je 100 mg Leberschnitte (bei c) bezogen auf das Gesamtvolumen) in Bezug auf die eingesetzte Aktivität an Pregnenolon-16-T an.

* Ein Wandern des Tritiums im Molekül bei Hydroxylierung ohne HTO-Bildung (NIH-Shift) ist nur bei Aromaten-gebundenem Tritium bekannt.

Nach Jacobsen und Kuntzmann⁴ lassen sich durch Vorbehandeln mit Barbiturat in Ratten Enzyme induzieren, die *in vitro* zu einer vermehrten Hydroxylierung von Steroiden an C₁₆ führen. Diese induzierten Hydroxylasen sind auch noch nach Absetzen des Barbiturats einige Tage nachweisbar.²

Die Versuche gemäß Abb. 1 zeigen ebenfalls *in-vivo* eine vermehrte HTO-Bildung bei den C₁₆-markierten Steroiden nach Vorbehandeln mit Barbiturat. Wir postulieren daher, daß die HTO-Bildung aus den an C₁₆ mit Tritium markierten Pregnanan ein Maß für die Hydroxylierung an C₁₆ ist.*

Unterstützt wird diese Interpretation durch Versuche mit dem Inhibitor für Steroid-Hydroxylierungen "Metopiron" (Ciba AG, Basel). Gibt man den Versuchstieren zuerst Metopiron und injiziert anschließend 3-Hydroxy-20-oxo-pregnan-16-T, so sinkt die HTO-Ausbeute (und damit die Hydroxylierung) auf 1/3 des Kontrollwertes.

Durch einen *in-vitro* Versuch konnten wir darüberhinaus einwandfrei beweisen, daß die Bildung von HTO aus dem 3-Hydroxy-20-oxo-pregnan-16-T nur durch die Hydroxylierung bedingt ist.

Bei der Inkubation des Pregnanolon-16-T mit Leberschnitten mit hohem Gehalt an Steroidhydroxylase (durch Barbiturat Vorbehandlung) wurde anaerob nur 0,08 % HTO aus dem Steroid freigesetzt. Dagegen wurde bei Luftzutritt (aerobe Inkubation) etwa 40 mal mehr HTO gebildet, vergl. Abb. 2 (Logarithmische Skala der Ordinate).

Dieser Effekt des Luftsauerstoffs ist nur verständlich, wenn das Steroid an C₁₆ durch Hydroxylierung gemäß obiger Formel HTO freisetzt. Tritium, das labil am C₁₆ gebunden wäre, müßte auch unter anaeroben Verhältnissen freigesetzt werden und als HTO nachweisbar sein.

Die Stabilität des an C₁₆ gebundenen Tritiums beweist auch der extrem geringe HTO-Anteil in dem Kontrollversuch, bei dem das Steroid die gleiche Zeit in Puffer aerob—aber ohne Lebergewebe—inkubiert wurde.

Unsere Versuche zeigen, daß es mit Hilfe Stoffwechsel-labil markierter Steroide gelingt, *in vivo* die Hydroxylierung von Pregnanderivaten durch Analyse des Körperwassers auf HTO und die Induktion entsprechender Hydroxylasen durch Barbiturat nachzuweisen.

Anerkennung—Fr. Barbara Bollert danken wir für interessierte und fleissige Mitarbeit.

Biol.-chem. und Isotopenabteilung
Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin,
1 Berlin 33 (Dahlem), Germany

MARTIN WENZEL

LITERATUR

1. S. WEINMAN und J. LIVET, *J. Labelled Compounds* **4**, 344 (1968).
2. M. WENZEL, G. KÖSTER und J. HÖNICKE, *Z. Klin. Chem. Biochem.* **8**, 231 (1970).
3. M. WENZEL und H. J. STAHL, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 761 (1970).
4. M. JACOBSEN und R. KUNTZMAN, *Steroids* **13**, 327 (1969).