

## DIE BILDUNG OPTISCH AKTIVER SULFOXIDE IM STOFFWECHSEL VON *p*-THIOANISIDIN

H. KEXEL und H.-L. SCHMIDT\*

Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

(Received 27 July 1971; accepted 8 October 1971)

**Abstract**—Metabolites of *p*-thioanisidine identified in the urine of mice, rats, guinea-pigs and rabbits contain, besides unchanged starting material, *p*-thioanisidine sulfoxide, *p*-thioanisidine sulfone and the *N*-acetyl derivatives and conjugates of these substances. The sulfoxides are dextro-rotatory and have R-configuration on the sulfur atom. The formation of the optically active sulfoxides seems to be of indirect origin, probably because of secondary transformations of the S-isomer *in vivo*. The microorganism *Aspergillus niger*, which is known to synthesize optically active sulfoxides from thioethers, is able to reduce preferably the S-enantiomer of *p*-thioanisidine sulfoxide. The sulfoxidation of *p*-thioanisidine by mammals is a microsomal mixed function oxidation, which is not stereospecific. On the other hand rat liver microsomes oxidize S(–)-*p*-thioanisidine sulfoxide more rapidly than R(+)-*p*-thioanisidine sulfoxide. Similarly the 100 000 *g* supernatant of rat liver homogenate is containing a protein, which reduces predominantly S(–)-*p*-thioanisidine sulfoxide. Both stereoselective reactions seem to be the cause of the formation of optically active sulfoxides *in vivo*.

UNTER den Stoffwechselreaktionen körperfremder Substanzen kennt man nur wenige Beispiele für stereospezifische Oxydationen. McMahan und Mitarbb.<sup>1,2</sup> fanden z.B. eine stereospezifische Hydroxylierung von Äthylbenzol zu Methyl-phenyl-carbinol unter der Einwirkung von Rattenlebermikrosomen. Die Bildung optisch aktiver Sulfoxide aus Thioäthern durch *Aspergillus niger* wird von Auret und Mitarbb.<sup>3</sup> auf eine stereospezifische Sulfoxydation zurückgeführt. Eine derartige Sulfoxydation könnte bei höheren Organismen ebenfalls möglich sein; Dayton und Mitarbb.<sup>4</sup> konnten nämlich im Harn von Versuchspersonen, die 4-[2-Phenylmercaptoäthyl]-1,2-diphenyl-pyrazolidindion-(3.5) erhalten hatten, eine schwach rechtsdrehende Sulfoxid-Fraktion nachweisen.

Optisch aktive Sulfoxide könnten sich *in vivo* aus Thioäthern allerdings auch auf indirektem Wege bilden, z.B. durch eine auf die Sulfoxydation folgende stereoselektive Sekundärreaktion. In einigen Fällen wurden nämlich im Stoffwechsel enantiomerer körperfremder Stoffe verschieden schnelle oder völlig verschiedene Veränderungen für die beiden Antipoden nachgewiesen.<sup>1,5–7</sup> Untersuchungen zum sterischen Verlauf der enzymatischen Sulfoxydation setzen also die Kenntnis möglicher Sekundärveränderungen der dabei entstehenden Sulfoxide im Metabolismus voraus.

*p*-Thioanisidin ist ein einfacher, unsymmetrisch substituierter Thioäther guter Lipidlöslichkeit. Rose und Mitarb.<sup>8</sup> fanden, daß Säugetiere aus dieser Substanz das Sulfon und dessen *N*-Acetyl-Derivat bilden; als Vorprodukte dieser Metabolite sind Sulfoxide zu erwarten. Andere Reaktionen im Stoffwechsel von *p*-Thioanisidin dürften jenen von Anilin-Derivaten, vor allem von Phenacetin<sup>9</sup> entsprechen. Im folgenden sollen jedoch besonders die im Zusammenhang mit der Sulfoxydation stehenden Stoffwechselreaktionen untersucht werden.

\* Herrn Prof. Dr. H.-J. Bielig in Dankbarkeit zum 60. Geburtstag gewidmet.

## MATERIAL UND METHODEN

Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, NADP<sup>+</sup> und Glucuronidase/Sulfatase wurden von der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen. D-Dibenzoyl-weinsäure und *p*-Thioanisidin (I) stammten von der Fa. Fluka, Buchs/Schweiz, L-Dibenzoyl-weinsäure von der Fa. Koch-Light, Colnbrook, Bucks, England. In Anlehnung an bekannte Methoden oder in Analogie zur Darstellung ähnlicher Präparate wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert: *p*-Thioanisidinsulfoxid (II),<sup>10</sup> *p*-Thioanisidinsulfon (III),<sup>11</sup> *N*-Acetyl-*p*-thioanisidin (IV),<sup>12</sup> *N*-Acetyl-*p*-thioanisidinsulfoxid (V),<sup>13</sup> *N*-Acetyl-*p*-thioanisidinsulfon (VI).<sup>11</sup>

Die *Antipodentrennung* von racem. II führten wir über ein diastereomeres Salzpaar aus. Die für eine ähnliche Trennung benutzte Camphersulfonsäure<sup>14</sup> sowie Chinsäure führten nicht zum Erfolg; hingegen gelang die Trennung mit Dibenzoyl-weinsäure: In eine Lösung von 7,75 g (50 m-mole) II in 1 l. Wasser von 65° wurden 8,5 g (28 m-mole) D-Dibenzoyl-weinsäure in kristalliner Form eingerührt. Aus der von einer geringen Menge eines Öls dekantierten klaren Lösung schieden sich beim Abkühlen bis auf 0° Kristalle aus, deren Ausbeute durch Einengen der Mutterlauge erhöht wurde. Das Kristallisat wurde bis zur konstanten Drehung der Base aus 65° heißem Wasser umkristallisiert und dann mit 1 N NaOH zerlegt. Die mit Chloroform aufgenommene Base wurde aus CHCl<sub>3</sub>/Petroläther (1:1) umkristallisiert. Ausbeute 0,45 g (12% d.Th.), Schmp. 103–104°,  $[\alpha]_D^{22} = +195 \pm 5^\circ$  (c = 1, Methanol). Mit L-Dibenzoyl-weinsäure wurden in analoger Weise aus 3,1 g II 0,26 g des (–)-Antipoden gewonnen. Schmp. 102°,  $[\alpha]_D^{22} = -175 \pm 5^\circ$  (c = 1, Methanol). – Das (+)-*N*-Acetyl-*p*-thioanisidinsulfoxid wurde durch Acetylierung des (+)-*p*-Thioanisidinsulfoxids synthetisiert. Schmp. 161°,  $[\alpha]_D^{22} = +162 \pm 5^\circ$  (c = 1, Methanol).

Zur *Bestimmung der absoluten Konfiguration der Präparate* wurde synthetisches (–)-*p*-Thioanisidinsulfoxid durch Diazotierung und Sandmeyer-Reaktion zu *p*-Jodphenyl-methyl-sulfoxid umgesetzt: Dabei erhielt man ein linksdrehendes Reaktionsprodukt, das also S-Konfiguration hat.<sup>15</sup> Damit war für die linksdrehenden Antipoden von II und V ebenfalls S-Konfiguration nachgewiesen. Alle polarimetrischen Messungen wurden mit dem Halbschatten-Polarimeter LM der Fa. Schmidt u. Haensch, Berlin, durchgeführt.

*Tierversuche.* Die Versuche wurden mit Mäusen (Stamm NMRI), Ratten (Sprague-Dawley) und mit Meerschweinchen und Kaninchen verschiedener Rassen durchgeführt. Die Versuchssubstanzen wurden als Hydrochloride in mit NaCl isoton gemachter wäßriger Lösung i.p. injiziert; die Dosen waren bei der Maus 200–250 mg/kg, bei der Ratte 100 mg/kg, beim Meerschweinchen 90 mg/kg und beim Kaninchen 70 mg/kg. Der bis 6 Stdn. nach der Injektion gesammelte Urin der Versuchstiere wurde auf pH 9–10 eingestellt und dann 5-mal mit der volumengleichen Menge an CHCl<sub>3</sub> ausgeschüttelt.

*Präparation von Lebermikrosomen.* Die Lebern nicht-induzierter oder induzierter<sup>16</sup> Ratten und Kaninchen (je 90 mg Phenobarbital-Na/kg Ratte bzw. je 50 mg Phenobarbital-Na/kg Kaninchen in isoton gemachter Lösung an 5 aufeinander folgenden Tagen) wurden in der 9-fachen (Reduktionsversuche: 4-fachen) Menge einer 0,25 m Saccharose-Lösung, die 0,02 m an Tris (pH 7,5) war, homogenisiert. Nach Abzentrifugation der Kern- und Mitochondrien-Fraktion (20 Min bei 10 000 g) wurde der 100 000-g-Niederschlag (1 Std.) als Mikrosomen-Fraktion gewonnen. Der Niederschlag wurde in der dem 2,5-fachen Leberfrischgewicht entsprechenden Volumen-

menge an 0,2 m Tris-Maleat-Puffer (pH 7,5) suspendiert. Proteinbestimmungen nach der Biuret-Methode<sup>17</sup> ergaben zwischen 8 und 12 mg Protein/ml Suspension.

*Inkubationen mit Lebermikrosomen.* Der Inkubations-Ansatz enthielt in 1,4 ml Tris-Maleat-Puffer (pH 7,4):  $4 \cdot 10^{-6}$  mole Substrat,  $1,15 \cdot 10^{-5}$  mole Glucose-6-phosphat,  $5 \cdot 10^{-6}$  mole Nicotinsäureamid,  $1,3 \cdot 10^{-6}$  mole NADP<sup>+</sup>, 1,4 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase,  $2 \cdot 10^{-5}$  mole MgCl<sub>2</sub>; dazu kamen 0,4 ml der Mikrosomen-Suspension. In den Blindwerten fehlte das NADPH-erzeugende System oder das Substrat. Es wurde 0,5–1 Std. bei 37° an Luft inkubiert, anschließend wurde der Ansatz dreimal mit je 3 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert.

*Die Kultivierung von Aspergillus niger* NRRL 337 (neue Bezeichnung *Aspergillus foetidus*, US Dept. of Agriculture, Agricult. Res. Service, Northern Utilization Research and Development Division, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604) und die Substrat-Inkubation mit diesem Pilz wurden entsprechend den Angaben von<sup>3</sup> bei 30° oder bei 22° durchgeführt. Mycel und Kulturmedium wurden zur Gewinnung von Metaboliten mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert.

*Chromatographische Methoden.* Die in CHCl<sub>3</sub> gelösten Metabolite wurden auf Kieselgel GF<sub>254</sub> (Merck) mit dem Fließmittel Benzol-Methanol (65:35) aufgetrennt. Die Substanzen wurden zunächst aufgrund ihrer Fluoreszenzlöschung lokalisiert. Dann wurden sie mit J<sub>2</sub><sup>18</sup> bzw. *p*-Dimethylamino-benzaldehyd<sup>19</sup> angefärbt (*R<sub>f</sub>*-Werte: I—0,72, II—0,53, III—0,63, IV—0,69, V—0,51, VI—0,60). Mikropräparative Anreicherungen einzelner Metabolite wurden wie oben beschrieben dünnschichtchromatographisch oder durch Chromatographie des CHCl<sub>3</sub>-Extraktes an einer Säule (1 × 20 cm) von Kieselgel ASTM (Merck, 70–325 mesh) mit dem Fließmittel Benzol-Methanol (95:5) durchgeführt. Die primären Amine in den Eluatzen bestimmte man in Anlehnung an eine Vorschrift von Morris<sup>20</sup> mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd.

### In vivo-Versuche bei Säugetieren

*A. Untersuchungen zum Stoffwechsel von p-Thioanisidin.* Im Chloroform-Extrakt des Urins von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, denen *p*-Thioanisidin (I) injiziert worden war, konnten sechs chromatographisch trennbare Metabolite nachgewiesen werden. Drei der Metabolite waren primäre Amine (Extrahierbarkeit aus CHCl<sub>3</sub>-Lösung mit wäßriger HCl, Reaktion mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd); bei den drei anderen handelte es sich um Neutralstoffe, die durch Hydrolyse mit 1 N HCl (30 Min, 50°) in die Amine übergeführt werden konnten. Durch chromatographischen Vergleich mit synthetischen Produkten konnten die Amine als *p*-Thioanisidin (I), *p*-Thioanisidinsulfoxid (II) und *p*-Thioanisidinsulfon (III) identifiziert werden. Bei den Neutralstoffen handelte es sich um die entsprechenden *N*-Acetyl-Verbindungen IV–VI. V konnte kristallin erhalten und durch IR-Spektrum charakterisiert werden; die Sulfoxide II bzw. V waren mit TiCl<sub>3</sub> in die Thioäther I bzw. IV zu reduzieren.

Die oben beschriebenen CHCl<sub>3</sub>-löslichen Metabolite entsprachen nur einem Teil des injizierten I. Nach Inkubation des extrahierten Urins mit Glucuronidase/Sulfatase wurde weiteres II und III nachgewiesen; diese Substanzen lagen also auch als Konjugate vor. Auf Produkte einer *in vivo*-Oxydation von I am Stickstoff, einer *S*-Demethylierung bzw. einer Hydroxylierung des aromatischen Kerns, die aus Analogiegründen

zu erwarten waren,<sup>9</sup> wurde in diesem Zusammenhang nicht geprüft. Die Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen zur Oxydation von *p*-Thioanisidin am Stickstoff werden gesondert mitgeteilt.<sup>21</sup>

Die Chloroform-löslichen Substanzen I–VI wurden im Urin der Versuchstiere auch nach Injektion von II bzw. V nachgewiesen. Damit ist sichergestellt, daß einerseits die *Sulfone über die Sulfoxide* entstehen und daß andererseits eine *Reduktion der Sulfoxide in vivo* möglich ist.

B. *Optische Aktivität der ausgeschiedenen Sulfoxide.* Die aus dem Urin der Versuchstiere nach Injektion von I gewonnenen Sulfoxide II und V waren rechtsdrehend, enthielten also einen Überschuß an R(+)-Antipoden (Tabelle 1). Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zum Stoffwechsel von I lassen indessen offen, ob die Entstehung dieser optischen Aktivität direkt oder indirekt zustandekommt. Zur Klärung dieser Frage wurden den Tieren deshalb racem. II sowie dessen beide Antipoden injiziert. Die Drehungen der dann aus dem Harn isolierten Sulfoxide sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Nach Injektion der oben genannten Substanzen war stets – soweit dies überhaupt möglich war – eine relative Zunahme der Rechtsdrehung, d.h. der Menge an R-Antipoden, bei dem aus Harn isolierten *p*-Thioanisidinsulfoxid festzustellen; die immer gleichzeitig entstehende *N*-Acetyl-Verbindung IV wurde nur in zwei Fällen isoliert. Aus racem. II entstand ein Produkt mit geringerer spezif. Drehung als aus I; dies erklären wir durch die im Vergleich zu I bessere Wasserlöslichkeit und damit schnellere Ausscheidung von II.

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnisse machen als Ursache für die Bildung der rechtsdrehenden Sulfoxide *in vivo* eine *Sekundärreaktion* wahrscheinlich; diese Reaktion muß ausschließlich oder vorwiegend den *S-Antipoden verbrauchen*. Aus den zuvor beschriebenen Stoffwechselreaktionen kommen dafür Oxydation und Reduktion von II in Frage. Tatsächlich wurde nach Injektion von S(–)-*p*-Thioanisidinsulfoxid relativ viel, nach Gabe von R(+)-*p*-Thioanisidinsulfoxid relativ wenig *p*-Thioanisidin ausgeschieden. Damit konnte die *Reduktion von II* als *stereoselektive* Sekundärreaktion angesehen werden. Im Falle der Entstehung von optisch aktivem V konnte nicht entschieden werden, ob diese Substanz vorwiegend durch Acetylierung von R(+)-II oder durch Reduktion von racem. V gebildet wird.

#### *Einwirkung von Aspergillus niger auf Thioäther und auf Sulfoxide*

Auret und Mitarbb.<sup>3</sup> hatten aus dem Inkubationsmedium von *A. niger* NRRL 337 als Stoffwechselprodukte verschiedener Thioäther optisch aktive Sulfoxide mehr oder weniger hoher optischer Reinheit isoliert. Bei der Inkubation von I und von IV mit diesem Pilz konnte zwar eine *Bildung von Sulfoxiden* nachgewiesen werden, jedoch war auch nach längerer Adaptation des Pilzes an diese Thioäther die Ausbeute an den Produkten so gering, daß eine Messung ihrer Drehung nicht möglich war. Das Ausgangsmaterial wurde z.T. unverändert zurückgewonnen, ein anderer Teil ging auf einem bisher nicht geklärten Weg verloren.

*A. niger* reduzierte aber bei 30° sowohl S(–)- als auch R(+)-*p*-Thioanisidinsulfoxid zu *p*-Thioanisidin. Die Geschwindigkeit der Reduktion des *S-Antipoden* war dabei etwa 10-mal so groß wie die des R-Antipoden. Die spezif. Drehung von nach Versuchsende zurückgewonnenen Sulfoxiden war nicht verändert. Offenbar ist also die

TABELLE 1. DREHWERTE VON INJIZIERTEN UND AUS HARN VON MÄUSEN (a) BZW. RATTEN (b) ISOLIERTEN DERIVATEN DES *p*-THIOANISIDINS. ERGEBNISSE AUS 2 VERSUCHEN MIT JE 12 (a) BZW. EINEM VERSUCH MIT 4 (b) TIEREN

Injiziert			Isoliert		
Substanz	$[\alpha]_D^{25}$ [°]	Antipoden- verhältnis R:S	Substanz	$[\alpha]_D^{25}$ [°]	Antipoden- verhältnis- R:S
<i>p</i> -Thioanisidin (a)	—	—	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+160 ± 25	91:9
			<i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -thio- anisidinsulfoxid	+65 ± 25	71:29
<i>p</i> -Thioanisidin (b)	—	—	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+150 ± 25	89:11
<i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -thio- anisidin (a)	—	—	<i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -thio- anisidinsulfoxid	+60 ± 25	69:31
<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid (a)	0	50:50	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+100 ± 25	76:24
<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid (b)	0	50:50	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+70 ± 25	68:32
S(–)- <i>p</i> -Thioanisi- dinsulfoxid (a)	–175 ± 5	5:95	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	–25 ± 25	44:56
S(–)- <i>p</i> -Thioanisi- dinsulfoxid (b)	–175 ± 5	5:95	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	–20 ± 25	45:55
R(+)- <i>p</i> -Thioanisi- dinsulfoxid (a)	+195 ± 5	100	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+180 ± 25	96:4
R(+)- <i>p</i> -Thioanisi- dinsulfoxid (b)	+195 ± 5	100	<i>p</i> -Thioanisidin- sulfoxid	+200 ± 25	100

Geschwindigkeit der *Reduktion beider Antipoden des Sulfoxids größer als eine Oxydation des Thioäthers*. Damit fände die zuvor beschriebene geringe Ausbeute bei den Versuchen zur Sulfoxydation von I und IV eine zwanglose Erklärung. Neben der von Auret und Mitarbb.<sup>3</sup> angenommenen stereospezifischen Sulfoxydation könnte also nach unseren Befunden vor allem auch die sekundäre stereoselektive Reduktion eines primär gebildeten Sulfoxid-Racemates zur Bildung optisch aktiver Sulfoxide durch *A. niger* führen.

#### *Inkubationen von Thioäthern und Sulfoxiden mit Fraktionen aus Leberhomogenaten*

A. *Oxydationen durch Lebermikrosomen*. Bei der Einwirkung von Rattenlebermikrosomen auf *p*-Thioanisidin (I) entstand *p*-Thioanisidinsulfoxid (II); aus II wurde das Sulfon III gebildet. Für diese Oxydationen benötigten die Mikrosomen NADPH und O<sub>2</sub>. Zur Untersuchung der Stereospezifität der genannten mischfunktionellen Oxydationen isolierten wir II aus einem 25-fachen Inkubationsansatz von I. Das Produkt (1,2 mg) hatte innerhalb der Meßfehlergrenze keine Drehung (Meßwert in 0,5 ml Methanol 0 ± 0,05°; reiner R-Antipode unter den gleichen Bedingungen 0,48 ± 0,05°). Die *mikrosomale Sulfoxydation* des Thioäthers war damit *nicht stereospezifisch*, was der Interpretation der Bildung optisch aktiver Sulfoxide *in vivo* als einer indirekten Reaktion entsprach.

Anders verhielt es sich mit der *Weiteroxydation der Sulfoxid-Antipoden* zum Sulfon: Hier war in der gleichen Reaktionszeit der Umsatz des *S-Antipoden* durch die

Mikrosomen um *ca.* 50% *höher* als der des R-Antipoden. Dieses Ergebnis findet eine Parallele in den eingangs erwähnten Beispielen anderer mikrosomaler Oxydationen,<sup>5-7</sup> bei denen verschieden schnelle oder gar völlig verschiedene Umsetzungen für die beiden Antipoden eines Racemats beobachtet worden waren; im Falle einer Sulfoxydation war eine solche Reaktion allerdings bisher nicht bekannt.

Eine Parallele zwischen dieser unterschiedlichen Geschwindigkeit der Oxydation der beiden Antipoden einerseits und den Extinktionen der *Differenzspektren des Cytochrom-P-450-Substratkomplexes* und Cytochrom P-450 andererseits, wie sie im Falle der Antipoden des Hexobarbitals gefunden worden war,<sup>7</sup> war für die Antipoden von II nicht nachzuweisen.

**B. Reduktionen durch Leberfraktionen.** Als eine der Ursachen für die Bildung optisch aktiver Sulfoxide sowohl im Säugetierorganismus also auch bei *A. niger* war eine sekundäre Reduktion des Sulfoxids erkannt worden, die offenbar vorwiegend den S-Antipoden betrifft. Dieser Befund konnte auch durch *in vitro*-Versuche mit Fraktionen aus Rattenleberhomogenat erhärtet werden. Die *Reduktion von S(-)-p-Thioanisidinsulfoxid* durch den 700 g-Überstand dieses Homogenats verlief nämlich 1,7-mal *schneller* als die entsprechende Reduktion von R(+)-*p*-Thioanisidinsulfoxid (Tabelle 2).

TABELLE 2. RELATIVE AKTIVITÄTEN VERSCHIEDENER FRAKTIONEN AUS RATTENLEBERHOMOGENAT BEI DER REDUKTION VON *p*-THIOANISIDINSULFOXID. ANSÄTZE ENTSPRECHEND 1,6 ml VOLL-HOMOGENAT MIT 0,2 ml 0,2 m TRIS-MALEAT-PUFFER (pH 7,5) UND  $4 \cdot 10^{-6}$  mole *p*-THIOANISIDINSULFOXID IN N<sub>2</sub>-ATMOSPHERE

Leberhomogenat-Fraktion	Reduzierendes System Coenzym	Relative Ausbeute an <i>p</i> -Thioanisidin
Vollhomogenat	NADH	100 ± 20
700-g-Überstand	NADH	100 ± 20
700-g-Überstand	—	70 ± 20
10 000-g-Überstand	NADH	100 ± 20
10 000-g-Niederschlag	NADH	0
100 000-g-Überstand	NADH	100 ± 20
100 000-g-Überstand (5 Min erhitzt, 100°)	NADH	0
100 000-g-Niederschlag	NADH	0

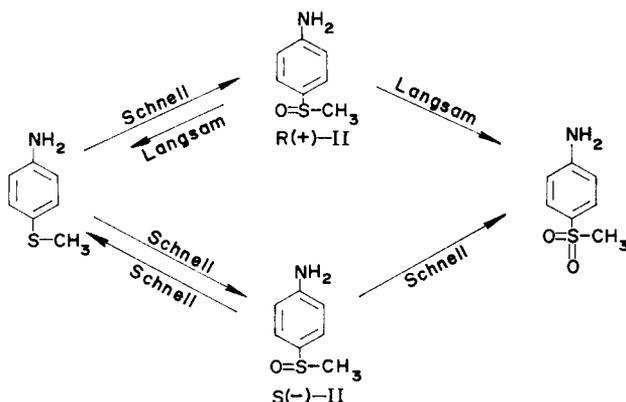
Die Reduktion wurde auch durch den *Partikel-freien* 100 000-g-Überstand des Homogenates katalysiert. Das Hitze-labile lösliche Protein benötigt wahrscheinlich für die Reduktion NADH als Elektronendonator. Außer *p*-Thioanisidinsulfoxid wurden durch den 700-g-Überstand des Rattenleberhomogenates *N*-Acetyl-*p*-thioanisidinsulfoxid und *N*-Methyl-*p*-thioanisidinsulfoxid reduziert, nicht jedoch 4-Amino-4'-methyl-diphenylsulfoxid.

#### DISKUSSION

Rose und Mitarb.<sup>8</sup> hatten als Stoffwechselprodukte von *p*-Thioanisidin (I) *N*-Acetyl-*p*-thioanisidin (IV), *p*-Thioanisidinsulfon (III) und dessen *N*-Acetyl-Derivat VI gefunden. Außer diesen Metaboliten konnten die als Zwischenprodukte eingangs

postulierten Sulfoxide II und V nachgewiesen werden; ihre relative Menge übertraf die der Sulfone III und VI, so daß anzunehmen ist, daß die oben genannten Autoren<sup>8</sup> mit ihrer Nachweismethode (Azokupplung) ein Gemisch von II und III als "Sulfon" erfaßt hatten.

Die optische Aktivität der Sulfoxide II und V entsteht eindeutig durch sekundäre Veränderungen des primär gebildeten Racemates. Bei den *in vivo*-Versuchen und mit Hilfe ergänzender *in vitro*-Experimente wurden stereoselektive Oxydationen und Reduktionen als diese sekundären Veränderungen erkannt. Aufgrund der verschiedenen Geschwindigkeiten dieser Reaktionen ist die *in vivo*-Bildung der hier gefundenen optisch aktiven Sulfoxide durch folgendes Schema darzulegen:



Als Ort der offenbar mischfunktionellen Oxydation sowohl der Thioäther als auch der Sulfoxide wurde das endoplasmatische Reticulum der Leber erkannt. Während die Bildung von Sulfoxiden aus Thioäthern eine bekannte mikrosomale Reaktion ist,<sup>22</sup> wurde eine Weiteroxydation bisher nur im Falle von Dimethylsulfoxid<sup>23</sup> sowie von Methyltetrahydrofurfuryl-sulfoxid<sup>24</sup> beschrieben.

Für die Bildung optisch aktiver Sulfoxide durch *A. niger* wird u.a. eine *direkte stereospezifische Sulfoxydation* von Thioäthern diskutiert.<sup>3</sup> Diese Reaktion konnte für die Sulfoxydation von *p*-Thioanisidinsulfoxid durch Mikrosomen ausgeschlossen werden; eine stereospezifische Sulfoxydation wurde auch außer in dem genannten Fall<sup>3</sup> bisher nur für Schwefel-haltige Aminosäure-Derivate—also für Substrate mit bereits vorhandenem Asymmetriezentrum—beschrieben.<sup>25,26</sup> Eine endgültige Entscheidung darüber, ob und wo es stereospezifische Sulfoxydationen von Thioäthern gibt, wird erst nach Isolierung entsprechender Enzymsysteme möglich sein.

Die Weiteroxydation der hier beschriebenen Sulfoxide durch Mikrosomen verläuft stereoselektiv. Diese *stereoselektive Oxydation von Sulfoxiden* durch Lebermikrosomen wurde hier erstmalig nachgewiesen. Neben der direkten stereospezifischen Sulfoxydation von Thioäthern wird sie auch für die Bildung optisch aktiver Sulfoxide durch *A. niger* verantwortlich gemacht.<sup>27</sup> Möglicherweise ist die Reaktion aber neben der im folgenden diskutierten Reduktion die Hauptursache für die Entstehung der optischen Aktivität von Sulfoxiden im Säugetierorganismus.

Die bei den hier beschriebenen Untersuchungen nachgewiesene Reduktion von Sulfoxiden körperfremder Stoffe ist bis auf wenige Ausnahmen<sup>23,28</sup> eine ebenfalls relativ unbekanntere Reaktion. Besonders die *stereoselektive Reduktion* von Sulfoxiden

ist bisher lediglich im Falle eines aus Hefe angereicherten Enzymsystems beschrieben; dieses reduziert spezifisch L-Methioninsulfoxid, also wieder ein Aminosäure-Derivat.<sup>29</sup> Nach unseren Ergebnissen ist aber die stereoselektive Reduktion von Sulfoxiden sowohl im Säugetierorganismus als auch bei *A. niger* für die indirekte Entstehung optisch aktiver Sulfoxide mitverantwortlich. Auret und Mitarbb.<sup>27</sup> zogen allerdings diese Reaktion nicht in Betracht; sie interpretierten vielmehr die Bildung optisch aktiver Materials aus racemischem Methyl-*p*-tolyl-sulfoxid unter der Einwirkung von *A. niger* vorwiegend durch dessen stereoselektive Oxydation zum Sulfon. Der Umsatz dieser oxydativen Reaktion reicht jedoch nicht aus, die Drehung des restlichen Sulfoxids zu erklären. Dies ist nur mittels einer zweiten stereoselektiven Reaktion möglich, die nach unseren Ergebnissen die Reduktion sein muß.

Aufgrund unserer Resultate ist auch eine Interpretation der Befunde von Dayton und Mitarbb.<sup>4</sup> möglich: Obgleich die Autoren nach Injektion von 4-[2-Phenylmercaptoäthyl]-1,2-diphenyl-pyrazolidindion-(3,5) im Harn von Versuchspersonen eine schwach rechtsdrehende Sulfoxid-Fraktion erhalten hatten, wurde racemisches Sulfoxid nach der Injektion unverändert ausgeschieden. Vermutlich war die Geschwindigkeit der Ausscheidung des Sulfoxids größer als eine stereoselektive Umwandlung, während diese Sekundärreaktion im Falle der langsamen Bildung des Sulfoxids aus dem Thioäther wirksam werden konnte. Wie bei den hier beschriebenen Untersuchungen fanden die Autoren keine Änderung der Drehung, wenn sie rechtsdrehendes Sulfoxid applizierten. Der wichtigere linksdrehende Antipode stand ihnen offenbar nicht zur Verfügung.

Die hier diskutierten stereoselektiven Umsetzungen von Sulfoxiden betreffen in den meisten Fällen den linksdrehenden Antipoden, der außerdem, sofern dies untersucht wurde, S-Konfiguration hat. Künftige Untersuchungen mit geeigneten Modells-substanzen bekannter absoluter Konfiguration sollten daher, vor allem nach Isolierung der entsprechenden Enzyme, Aussagen über die aktiven Enzymzentren ermöglichen.

**Zusammenfassung**—Als Metabolite von *p*-Thioanisidin werden im Harn von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen neben unverändertem Ausgangsprodukt *p*-Thioanisidinsulfoxid, *p*-Thioanisidinsulfon, deren *N*-Acetyl-derivate sowie Konjugate nachgewiesen. Die Sulfoxide sind rechtsdrehend und haben am S-Atom R-Konfiguration. Sie entstehen wahrscheinlich auf indirektem Wege, offenbar weil der linksdrehende Antipode bevorzugt weiter umgewandelt wird.

Analog ergibt sich, daß auch der Mikroorganismus *Aspergillus niger*, für den die Bildung optisch aktiver Sulfoxide aus Thioäthern beschrieben ist, bevorzugt S(-)-*p*-Thioanisidin reduziert.

Die Sulfoxydation der Substrate durch Säugetiere ist eine mischfunktionelle mikrosomale Oxydation, die nicht stereospezifisch verläuft. Andererseits oxydieren Lebermikrosomen S(-)-*p*-Thioanisidinsulfoxid schneller zum Sulfon als den R(+)-Antipoden. Der 100 000-g-Überstand von Rattenleberhomogenat enthält außerdem ein Protein, das unter Verbrauch von NADH bevorzugt den (-)-Antipoden von *p*-Thioanisidinsulfoxid reduziert. Damit sind diese beiden sekundären Umwandlungen der Sulfoxide die Ursache für die Bildung optisch aktiver Sulfoxide *in vivo*.

#### LITERATUR

1. R. E. McMAHON und H. R. SULLIVAN, in *Microsomes and Drug Oxidations* (Ed. J. R. Gillette), S. 239, Academic Press, New York (1969).
2. R. E. BILLINGS, H. R. SULLIVAN und R. E. McMAHON, *Biochemistry*, **9**, 1256 (1970).
3. B. J. AURET, D. R. BOYD, H. B. HENBEST und S. ROSS, *J. chem. Soc. (C)* 2371 (1968).
4. P. G. DAYTON, L. E. SICAM, M. LANDRAU und J. J. BURNS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **132**, 287 (1961).
5. A. E. TAKEMORI und G. J. MANNERING, *J. Pharmac. exp. Ther.* **123**, 171 (1958).

6. H. KEBERLE, W. RIESS und K. HOFMANN, *Archs int. Pharmacodyn. Ther.* **142**, 117 (1963).
7. E. DEGKWITZ, V. ULLRICH, HJ. STAUDINGER und W. RUMMEL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 547 (1969).
8. F. L. ROSE und A. SPINKS, *Biochem. J.* **43**, VII (1948).
9. H. BÜCH, K. PFLEGER, W. RUMMEL, V. ULLRICH, D. HEY und HJ. STAUDINGER, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2247 (1967).
10. S. GHERSETTI und M. PALOTTI, *Gazz. chim. ital.* **93**, 1012 (1963).
11. E. LARSSON, *Chalmers Tekn. Högskolas Handl.* **94**, 3 (1950). *zit. nach C.A.* **45**, 2892 (1951).
12. H. PLEININGER und C. E. CASTRO, *Chem. Ber.* **87**, 1760 (1954).
13. TH. ZINCKE und P. JÖRG, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **42**, 3370 (1909).
14. P. W. HARRISON, J. KENYON und H. PHILLIPS, *J. chem. Soc.* 2081 (1926).
15. P. BICKART, M. AXELROD, J. JACOBUS und K. MISLOW, *J. Am. chem. Soc.* **89**, 697 (1967).
16. L. ERNSTER und S. ORRENIUS, *Fedn Proc.* **24**, 1190 (1965).
17. E. ROWSELL, *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWICK und N. D. KAPLAN), Bd. 5, S. 685. Academic Press, New York (1962).
18. E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., S. 476. Springer-Verlag, Berlin (1967).
19. H. M. HAJI und K. MAČEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, S. 751. Fischer-Verlag, Jena (1958).
20. C. J. O. MORRIS, *Biochem. J.* **35**, 954 (1941).
21. H.-L. SCHMIDT, H. KEXEL und N. WEBER, *Biochem. Pharmac.*
22. J. R. GILLETTE und J. J. KAMM, *J. Pharmac. exp. Ther.* **130**, 262 (1960).
23. E. GERHARDS und H. GIBIAN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **141**, Art. 1, 65 (1967).
24. T. FUJITA und SUZUOKI-SIRO, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **28**, 827 (1967).
25. G. P. EBBON und P. CALLAGHAN, *Biochem. J.* **110**, 33P (1968).
26. N. M. SKLAN und E. A. BARNSLEY, *Biochem. J.* **107**, 217 (1968).
27. B. J. AURET, D. R. BOYD und H. B. HENBEST, *J. chem. Soc. (C)* 2374 (1968).
28. J. J. KAMM, J. R. GILLETTE und B. B. BRODIE, *Fedn Proc.* **17**, 382 (1958).
29. S. BLACK, E. M. HARTE, B. HUDSON und L. WARTOFSKY, *J. biol. Chem.* **235**, 2910 (1960).