

MIKROSOMALE OXYDATIONEN AM STICKSTOFFATOM AROMATISCHER AMINE

H.-L. SCHMIDT, H. KEXEL und N. WEBER

Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

(Received 27 July 1971; accepted 6 January 1972)

Abstract—*p*-Thioanisidine is hydroxylized by rabbit liver microsomes to 4-methylmercapto phenylhydroxylamine. By secondary reactions this product yields 4,4'-bis-methylmercapto azoxybenzene. Investigations concerning these secondary reactions demonstrate that the end product contains only the oxygen atom incorporated by the primary enzymatic oxidation. This oxygen atom derives from O₂; therefore the formation of 4-methylmercapto phenylhydroxylamine is a mixed function oxidation on the nitrogen atom. It can be inhibited by CO; therefore cytochrome P-450 is assumed to be the oxygen activating enzyme. In the presence of *p*-chloromercury benzoate a microsomal oxidation of *N*-ethylaniline yielding nitroso benzene is probably not catalized by cytochrome P-450. The catalizing enzyme is apparently a microsomal flavoprotein. Nevertheless the introduction of oxygen from O₂ also in this reaction proves, that it is a mixed function oxidation, too. The activation of oxygen by the microsomal flavoprotein in comparison to the activation by cytochrome P-450 is discussed.

LEBERMIKROSOMEN katalysieren oxydative *N*-Entalkylierungen sowie Oxydationen am Stickstoff-Atom aromatischer Amine.¹ Die *N*-Entalkylierung ist durch Hemmstoffe wie 1.1-Diphenyl-butancarbonsäure-[2-diäthylaminoäthyl]-ester-hydrochlorid (SKF 525 A), Natrium-*p*-chlormercuribenzoat (PCMB), Cholsäure oder Desoxycholsäure hemmbar, während z.B. die mikrosomale Oxydation von Anilin oder *N*-Äthylanilin zu Nitrosobenzol oder von *N,N*-Dimethylanilin zu *N,N*-Dimethylanilinoxid durch diese Hemmstoffe z.T. sogar eine Steigerung erfährt.^{2–5} Die oxydative *N*-Entalkylierung ist auch durch CO zu hemmen; demgegenüber findet man bezüglich des Einflusses von CO auf die *N*-Oxydationen in der Literatur sich widersprechende Angaben.^{6,7}

Die CO-Hemmbarkeit einer mikrosomalen Oxydation spricht für ihre Katalyse durch Cytochrom P-450. Eine durch CO nicht hemmbare *N*-Oxydation könnte dagegen durch ein anderes mikrosomales Enzym, wahrscheinlich ein Flavoprotein, bewirkt werden. Ziegler und Mitarbb.⁸ Reicherten nämlich aus Mikrosomen ein Flavinenzym an, das unter Verbrauch von NADPH tertiäre Amine zu Aminoxiden oxydiert und sekundäre Amine oxydativ entalkyliert. Einige Flavinenzyme können mischfunktionell hydroxylieren, wobei Sauerstoff aus O₂ in das Oxydationsprodukt eingebaut wird.⁹ Andere Flavoproteide dehydrieren formal das Substrat mit dieser Reaktion ist ein Einbau von Hydroxylgruppen aus Wasser verbunden.^{10,11} Es war deshalb von Interesse zu prüfen, ob dem NADPH-Bedarf der verschiedenen mikrosomalen Oxydationen am Stickstoff entsprechend, Sauerstoff aus O₂ in die Produkte eingebaut wird.

MATERIAL UND METHODEN

Glucose-6-phosphat (Na-Salz), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und NADP^+ wurden von der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim bezogen, Natrium-*p*-chlormercuribenzoat (PCMB) von der Fa. Serva, Heidelberg. $^{18}\text{O}_2$ (90 Atom-% ^{18}O) und H_2^{18}O (5 Atom-% ^{18}O) stammten von der Fa. Miles-Yeda, Rehovot/Israel bzw. von der Fa. BIO-RAD Laboratories, München-Gräfelfing. 1.1-Diphenyl-butan-carbonsäure-[diäthylaminoäthyl]-ester-hydrochlorid (SKF 525 A) stellte uns die Fa. Smith, Kline u. French, Philadelphia/USA zur Verfügung. 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin (II), 4-Methylmercapto-nitrosobenzol (III), 4,4'-Bismethylmercapto-azoxybenzol (IV),¹² 4,4'-Bismethylmercapto-azobenzol (V)¹³ und Nitrosobenzol (VIII) wurden nach bekannten Methoden synthetisiert.

Zur *Mikrosomendarstellung* wurden die Lebern von Kaninchen in einer dem 9-fachen Gewicht entsprechenden Volumenmenge an 0,25 M Saccharoselösung, die 0,02 M an Tris/HCl pH 7,5 war, homogenisiert. Nach Entfernen der Kern- und Mitochondrienfraktion (20 min bei 10,000 g) wurde der 100,000 g-Niederschlag (1 Std.) gewonnen.

Für die *mikrosomale Oxydation von p-Thioanisidin* (vgl.¹⁴) suspendierte man den 100,000 g-Niederschlag in 0,2 M Tris-Maleat-Puffer pH 7,4 (2,5 ml/g Leber). Zu 4 ml dieser Suspension gab man bei 2° 13 ml des gleichen Puffers, der $4 \cdot 10^{-5}$ Mol Substrat, $1,15 \cdot 10^{-4}$ Glucose-6-phosphat, $5 \cdot 10^{-5}$ Mol Nicotinsäureamid, $1,3 \cdot 10^{-6}$ Mol NADP^+ und $2 \cdot 10^{-4}$ Mol MgCl_2 enthielt. Die Luft über dem Ansatz wurde durch $^{18}\text{O}_2$ (250 Torr) ersetzt und die Reaktion durch Zugabe von 14 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gestartet. Anschließend wurde 1 Std. bei 37° inkubiert, dann das $^{18}\text{O}_2$ zurückgewonnen. Bei Inkubationen in D_2O bzw. in H_2^{18}O wurden Ansätze ohne Substrat in normalem Wasser zusammengestellt und sofort lyophilisiert. Der Rückstand wurde in dem markierten Wasser aufgenommen und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet; das markierte Wasser gewann man durch Lyophilisation zurück.

Die Inkubationsansätze bzw. der nach ihrer Lyophilisation verbleibende trockene Rückstand wurden mit Chloroform extrahiert, die eingegangenen Extrakte (u.U. von mehreren Ansätzen) auf Dünnschichtplatten von Kieselgel GF₂₅₄ (Merck; Dicke 0,5 mm) mit dem Fließmittel Benzol-Methanol (65:35) aufgetrennt und die Produkte mit Benzol eluiert. Die Ausbeute an 4,4'-Bismethylmercapto-azoxybenzol (IV) bestimmte man aufgrund der Extinktion bei 380 nm in Chloroform. Die Lösung der Produkte (ca. 0,5 mg) versetzte man mit der 19-fachen Menge an Trägersubstanz und schloß dann 5 mg des Lösungsrückstandes mit HgCl_2 nach Rittenberg und Ponticorvo¹⁵ auf. Das dabei entstehende CO_2 wurde durch Vakuumsublimation gereinigt und dann massenspektrometrisch auf seinen ^{18}O -Gehalt untersucht.* Die Streuungen dieses Aufschluß- und Meßverfahrens liegen unter den hier vorliegenden Bedingungen bei $\pm 5\%$ rel.

Die Reaktionslösung zur *Autoxydation von 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin* in einer Atmosphäre von $^{18}\text{O}_2$ enthielt 3 mg NADP^+ , 7 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 18 mg Glucose-6-phosphat in 7 ml 0,2 M Tris-Maleat-Puffer pH 7,5; die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mg festen Substrats gestartet. Nach 60 Min. Inkubation bei 37° wurde wie bei der enzymatischen Reaktion aufgearbeitet. Die H_2O_2 -Bildung der Reaktion ermittelte man manometrisch in Warburg-Gefäßen:

* Wir danken Herrn Dr. M. Halmann, The Weizmann Institute of Science, Isotope Department, Rehovot/Israel, für die massenspektrometrischen Analysen des CO_2 .

Nach Verbrauch einer definierten Sauerstoff-Menge durch eine Suspension von II in 0,2 M Tris-Maleat-Puffer pH 7,5 wurde Katalase zu dem Reaktionsgemisch gegeben und der Druckanstieg gemessen. Der kinetische Isotopeneffekt der Autoxydation in H_2O bzw. D_2O (20° , pH = pD = 7,6) wurde spektrophotometrisch aus den Geschwindigkeiten der Extinktionszunahme bei 380 nm von Lösungen ermittelt, die 0,05 mg des Substrates (Zugabe in 0,01 ml Äthanol) in 2 ml des o.g. Puffers enthielten.

Eine direkte *Isolierung* kleiner Mengen von *Nitrosobenzol* aus Inkubationsmedien erwies sich als praktisch unmöglich, da die Substanz sich wegen ihres hohen Dampfdruckes beim Abdampfen aller Lösungsmittel vollständig verflüchtigte; aus dem gleichen Grund konnte die Substanz auch nicht durch Dünnschicht- oder Papierchromatographie gereinigt werden. Die Isolierung von Phenylhydroxylamin in Form des Eisen-Komplexes von Cupferron (*N*-Nitroso-phenylhydroxylamin)¹⁶ war für die vorliegenden Untersuchungen ungeeignet, da durch die Nitrosogruppe in das zu isolierende Produkt ein zweites Sauerstoffatom eingeführt worden wäre. Der Sauerstoff der Nitrosogruppe konnte aber nach der Inkubation auf eine nicht-flüchtige Verbindung übertragen werden.

Zur *mikrosomalen Oxydation von N-Äthylanilin* wurde der 100,000 g-Niederschlag zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert und erneut abzentrifugiert,¹⁷ schließlich in 0,2 M Tris-Maleat-Puffer pH 7,4 suspendiert (0,35 ml/g Leber). Zu 12 ml der Suspension fügte man 18 ml des gleichen Puffers, der $6,7 \cdot 10^{-5}$ Mol *N*-Äthylanilin (VI), $1,9 \cdot 10^{-4}$ Mol Glucose-6-phosphat, $8,4 \cdot 10^{-5}$ Mol Nicotinsäureamid, $2,2 \cdot 10^{-5}$ Mol NADP^+ , $3,3 \cdot 10^{-4}$ Mol MgCl_2 , $3 \cdot 10^{-5}$ Mol PCMB und 20 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase enthielt. Der Ansatz wurde 40 Min bei 37° unter $^{18}\text{O}_2$ inkubiert. Dann wurde die Lösung dreimal mit der volumengleichen Menge CCl_4 ausgeschüttelt (Extraktion des Nitrosobenzols). Nach Oxydation mit einigen Körnchen $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ wurde die Extraktion wiederholt (Isolierung des Phenylhydroxylamins als Nitrosobenzol). Die Extrakte wurden zur Abtrennung des nicht umgesetzten VI zweimal mit 20 ml 0,1 M H_2SO_4 gewaschen und dann getrocknet. Das Lösungsmittel destillierte man langsam bei Normaldruck ab, bis im Destillat merkliche Mengen Nitrosobenzol ($\sim 2 \mu\text{g/ml}$ entspr. $E = 0,15$ bei 305 nm) nachzuweisen waren. Dann wurde das Nitrosobenzol zusammen mit dem restlichen CCl_4 durch ca. 1-min. Wasserdampfdestillation in eine neue Vorlage übergetrieben. Nach Vereinigung der getrockneten organischen Phasen aus zwei Inkubationsansätzen (ca. 4 ml mit etwa 0,2 mg Nitrosobenzol und wenig Fremdstoffen) wurde mit einer 20-fachen Menge fester Trägersubstanz versetzt und in Bombenröhrchen unter Luftausschluß mit der äquiv. Menge Triphenylphosphin zur Reaktion gebracht (12 Std. bei 25° , 2 Std. bei 70°). Der Sauerstoff des Produktes war jetzt in Form von Triphenylphosphinoxid und Azoxybenzol festgelegt,^{18,19} und das Lösungsmittel konnte durch Überleiten von Stickstoff völlig abgedampft werden. Der braunrote Rückstand wurde wie vorher zur ^{18}O -Analyse aufgeschlossen.¹⁵

VERSUCHS ERGEBNISSE

1. Produkte der mikrosomalen Oxydation von *p*-Thioanisidin am Stickstoff

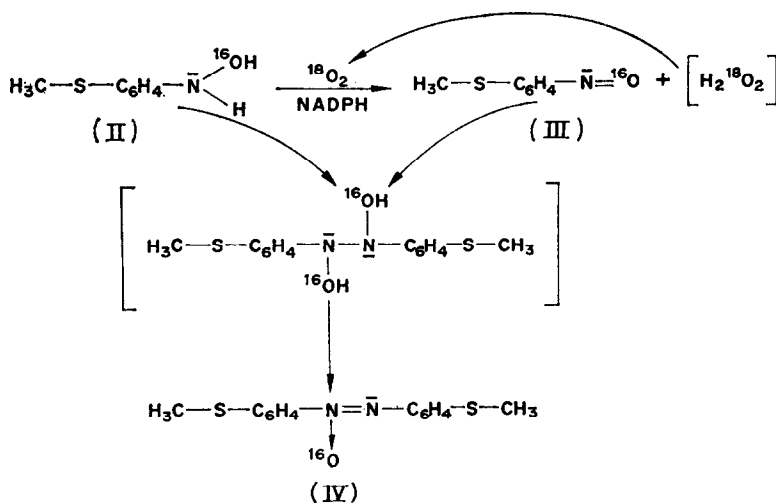
Neben der in der vorangegangenen Arbeit diskutierten Sulfoxydation¹⁴ bewirkten *Kaninchenlebermikrosomen* bei *p*-Thioanisidin (I) auch eine Oxydation am Stickstoff. Die farbigen Produkte dieser Oxydation waren Neutralstoffe (Hauptprodukt R_f 0,89, Nebenprodukt R_f 0,85 im Dünnschichtchromatogramm). Sie konnten durch Reduk-

tion mit Titan(III)chlorid oder Natriumdithionit in I überführt werden. Die Absorptionsspektren der Hauptkomponente in Methanol bzw. Benzol ($\lambda_{\max} = 248$ u. 380 nm) sowie in Äthanol/Schwefelsäure (1:1)²⁰ ($\lambda_{\max} = 430$ u. 520 nm) waren mit jenen von synthetischem 4,4'-Bismethylmercapto-azoxybenzol (IV) identisch. Eine schwache Blaufärbung der Fraktion ($\lambda_{\max} = 580$ nm) bei ihrer Lösung in 32-proz. Salzsäure²¹ zeigte jedoch, daß sie noch einige Prozent 4,4'-Bismethylmercapto-azobenzol (V) enthielt.

Bei dem Nebenprodukt mit dem R_f -Wert 0,85 waren chromatographisches Verhalten, Elektronenspektrum und Rotfärbung mit Äthanol/Schwefelsäure (1:1) wie bei synthetischem 4-Methylmercapto-nitrosobenzol (III).

2. Nicht-enzymatische Oxydation von 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin

Entsprechend den Ergebnissen der mikrosomalen Oxydation von Anilin²² mußten die vorgenannten Oxydationsprodukte über 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin (II) entstanden sein. Phenylhydroxylamin-Derivate sind autoxydabel; die oben beschriebenen stabilen Endprodukte der mikrosomalen Oxydation von I waren also wahrscheinlich ebenfalls infolge einer Autoxydation des nicht isolierbaren Zwischenproduktes II entstanden. Den Untersuchungen zum Einbau von Sauerstoff bei der enzymatischen Oxydation von I mußten also Versuche zum Einbau sowie zur Austauschbarkeit von Sauerstoff in den Folge-Reaktionen vorangehen. Die Ergebnisse entsprechender Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen (vgl. Reaktions-schema):



- (1) II autoxydiert zu III; III kann mit NADPH nicht-enzymatisch wieder reduziert werden. Bei dieser Reduktion bildet sich IV, wahrscheinlich durch Kondensation von II mit III. Die Ausbeute an IV aus III steigt wesentlich, wenn außer NADPH Mikrosomen im Reaktionsgemisch sind; die Reduktion kann dann auch bis zu I zurückführen. Möglicherweise wird diese Reduktion durch mikrosomale Nitro-Reduktasen¹ katalysiert.
- (2) Die bei der Autoxydation von II erwartete Bildung von H_2O_2 in äquivalenten Mengen war nicht nachzuweisen. Wahrscheinlich oxydiert das primär entstehende H_2O_2 seinerseits II zu III.²³

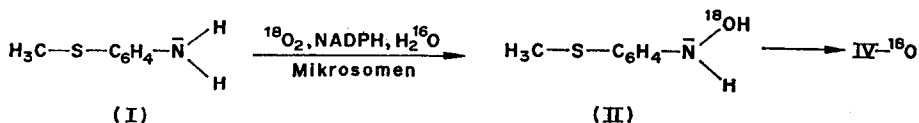
- (3) Die Autoxydation von II in Gegenwart von $^{18}\text{O}_2$ und NADPH führt zu IV mit natürlichem ^{18}O -Gehalt.
- (4) Bei der mikrosomalen Oxydation von I in H_2^{18}O entsteht IV mit nahezu natürlichem Isotopengehalt (s. dazu auch im Folgenden).
- (5) Die Autoxydation von II nach III in D_2O verläuft ohne kinetischen Isotopeneffekt. Dies entspricht der Abspaltung eines Elektrons im langsamsten Teilschritt der Reaktion; dieses Elektron wird auf Sauerstoff übertragen.²³

Damit ist der Einbau von Sauerstoff durch eine nicht-enzymatische Reaktion sowie der Austausch einmal in II eingebauten Sauerstoffs auf dem gesamten Weg von I nach IV weitgehend ausgeschlossen. Das Sauerstoffatom in IV muß infolgedessen das gleiche sein, das bei der enzymatischen Oxydation von *p*-Thioanisidin (I) zu 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin (II) in das Reaktionsprodukt gelangt. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen Untersuchungen zum Mechanismus der Kondensation von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol.²⁴

3. Enzymatische Oxydation von *p*-Thioanisidin

Wie vorher erwähnt, verläuft die Oxydation von *p*-Thioanisidin (I) in H_2^{18}O ohne Einbau von isotopem Sauerstoff in das Reaktionsprodukt IV. Dieses Ergebnis beweist, daß in der ganzen Reaktionsfolge von I bis IV kein Sauerstoffaustausch mit Wasser stattfindet. Darüberhinaus ist gezeigt, daß der erste Schritt, d.h. die enzymatische Oxydation von I, nicht über einen Elektronenentzug am Stickstoff und Einbau von OH^- -Gruppen aus Wasser in das Oxydationsprodukt verläuft.

Dementsprechend entstand auch bei der Inkubation von I mit Mikrosomen in einer Atmosphäre von $^{18}\text{O}_2$ IV, das Sauerstoff aus O_2 enthielt (Einbaurrate in einem Versuch 30, in einem zweiten 70% des theoretisch möglichen ^{18}O -Überschusses). Dieser Sauerstoff mußte also bei der mischfunktionellen enzymatischen Oxydation von I zu II eingebaut worden sein. Diese ist demnach wie folgt zu formulieren:



Die Bildung von IV aus I war durch CO hemmbar (30% bei 80 Vol-% CO); durch SKF-525 A wurde keine Hemmung, in einigen Fällen sogar eine Aktivierung der Reaktion erreicht. Die CO-Hemmung entspricht Ergebnissen von Kiese u. Mitarbb. bei der mikrosomalen Oxydation von Anilin am Stickstoff.⁷

In H_2O lief die Bildung von IV aus I 2,5-mal so schnell wie in D_2O . Es ist nicht bekannt, welcher Teilreaktion dieser kinetische Isotopeneffekt zuzuordnen ist. D_2O -Isotopeneffekte bei anderen mikrosomalen Oxydationen liegen zwischen 1,3 und 1,4; sie werden u.a. mit Veränderungen der Struktur der beteiligten Proteine interpretiert.²⁵

4. Enzymatische Entalkylierung von *N*-Äthylanilin

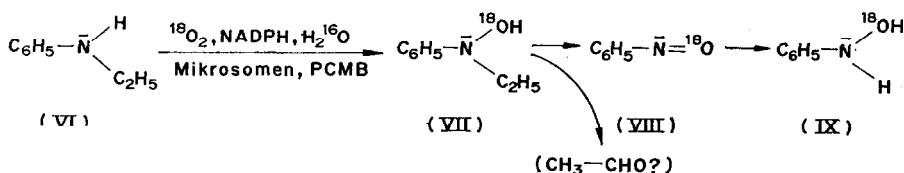
Kiese und Uehleke²⁶ hatten bei "gewaschenen", d.h. von löslichen Reduktasen aus dem Cytoplasma befreiten Kaninchenlebermikrosomen die Bildung von Nitrosobenzol (VIII) aus *N*-Methylanilin bzw. aus *N*-Äthylanilin (VI) gefunden; Primärprodukt der Reaktion soll Phenylhydroxylamin (VII) sein.¹⁶ Die Ausbeute an

Nitrosobenzol steigt unter der Einwirkung von SKF-525 A oder PCMB.² Da eine entsprechende Reaktion für das zu I gehörende sekundäre Amin, das *N*-Methyl-*p*-thioanisidin, weder mit intakten noch mit PCMB-gehemmten Kaninchenlebermikrosomen nachgewiesen werden konnte, wurden die folgenden Versuche mit *N*-Äthylanilin (VI) durchgeführt.

Unter den Bedingungen der Inkubation (10^{-3} M PCMB) war nach der Methode von Omura und Sato²⁷ kein natives Cytochrom P-450 in Form seines CO-Komplexes in den Mikrosomen mehr nachzuweisen; eine Oxydation mußte also jetzt durch ein anderes Enzym erfolgen.

Aus den PCMB enthaltenden Ansätzen wurde nach Inkubation in einer Atmosphäre von $^{18}\text{O}_2$ als Oxydationsprodukt von VI Nitrosobenzol (VIII) isoliert, das 50% des theoretisch möglichen Isotopengehaltes, entsprechend dem Einbau von 1/2 Atom Sauerstoff, enthielt. Der in Form von Phenylhydroxylamin vorliegende Anteil des Oxydationsproduktes enthielt nur 20% des theoretisch möglichen ^{18}O -Überschusses. Bei der Aufarbeitung der Produkte (Oxydation mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Wasserdampfdestillation) können allerdings Isotopenverluste eingetreten sein.

Die Oxydation von *N*-Äthylanilin verläuft also ebenfalls entsprechend den Kriterien für eine mischfunktionelle Oxydation. Als Sauerstoff-aktivierendes Enzym ist ein mikrosomales Flavoprotein anzusehen. Das hypothetische Zwischenprodukt VII dieser Reaktion müßte unter Verlust der Alkylgruppe⁸ zu VIII weiterreagieren, aus dem durch Reduktion IX gebildet werden könnte. IX wäre damit nicht, wie Kiese und Rauscher¹⁶ annehmen, Vorprodukt, sondern Folgeprodukt von VIII.



Im Falle der Oxydation von Äthylanilin wurde nicht auf einen Sauerstoffeinbau durch eine nicht-enzymatische Reaktion geprüft, da das wahrscheinliche Zwischenprodukt *N*-Äthyl-phenylhydroxylamin (VII), das sehr instabil ist,²⁸ nicht zur Verfügung stand; seine Autoxydation dürfte aber aus Analogiegründen bezüglich des Sauerstoff-Einbaues wie die von II verlaufen.

N-Methyl-phenylhydroxylamin ist unbeständiger als VII.^{28,29} Die Stabilität aller *N*-Alkyl-phenylhydroxylamin-Derivate wird darüberhinaus wesentlich durch Kernsubstituenten beeinflusst; so disproportioniert *N*-Äthyl-*p*-tolylhydroxylamin fast augenblicklich zu *N*-Äthyl-*p*-toluidin und Acetaldehyd-*p*-tolylnitron.³⁰ Das Ausbleiben der mikrosomalen Bildung von 4-Methylmercapto-nitrosobenzol aus *N*-Methyl-*p*-thioanisidin beruht deshalb wahrscheinlich darauf, daß primär entstehendes *N*-Methyl-*p*-methylmercapto-phenylhydroxylamin eine entsprechende Umlagerung erleidet; die Isolierung und Identifizierung des dabei entstehenden Formaldehyd-*p*-methylmercapto-phenylnitrons wurde bisher nicht versucht.

DISKUSSION

Sowohl bei der Oxydation von *p*-Thioanisidin (I) durch intakte Kaninchenlebermikrosomen als auch bei der Oxydation von *N*-Äthylanilin (VI) durch PCMB-

gehemmte Mikrosomen ist nach den vorliegenden Ergebnissen ein *enzymatischer Einbau* von Sauerstoff aus O_2 entsprechend den Kriterien für eine mischfunktionelle Oxydation in die Oxydationsprodukte nachzuweisen. Die CO-Hemmung bei der Oxydation von I spricht für eine Katalyse dieser Reaktion durch Cytochrom P-450. Bei einer Aktivierung durch dieses Enzym würde der Sauerstoff entsprechend dem für dieses Enzym⁹ diskutierten Mechanismus aus einer "Oxen"-Form³¹ reagieren, d.h. sich wie ein Carben in die NH-Bindung einschieben. Die durch Cytochrom P-450 katalysierte Oxydation von I am Stickstoffatom wäre somit als eine "*N*-Hydroxylierung"* zu bezeichnen.

Die trotz der Hemmung von Cytochrom P-450 stattfindende mischfunktionelle Oxydation von *N*-Äthylanilin (VI) zu Nitrosobenzol (VIII) durch die Mikrosomen entspricht der von Ziegler und Mitarbb.⁸ beschriebenen Oxydation von sekundären Aminen durch ein mikrosomales Flavoprotein. Diese Reaktion verläuft offenbar nicht über einen Elektronenentzug ("*N*-Dehydrierung") entsprechend dem Mechanismus der Oxydation durch einige Flavinenzyme,^{10,11} sondern sie ist eine mischfunktionelle Sauerstoff-Aktivierung, wie sie für einige andere Flavinenzyme beschrieben wird (vgl.⁹).

Das mikrosomale Flavoprotein kann tertiäre Amine nicht entalkylieren;⁸ es bildet daraus Aminoxide. Die Sauerstoff-Aktivierung durch das Enzym muß infolgedessen eine andere sein als die durch Cytochrom P-450. Hemmerich formuliert eine Flavin-Sauerstoff-Verbindung in Form eines Peroxids;³² aus dieser Struktur könnte auch im Falle des *mikrosomalen Flavoproteids* der Sauerstoff in Form eines OH^+ das Amin elektrophil am Elektronenpaar des Stickstoffs angreifen. Eine entsprechende Oxydation von Aminen zu Aminoxiden durch OH^+ aus tert-Butylperoxid wurde kürzlich beschrieben.³³ Die Reaktion müßte damit als eine "*N*-Oxydation" bezeichnet werden. Das Produkt der *N*-Oxydation eines sekundärenamins ist ein Hydroxylamin-Derivat, also identisch mit dem Produkt einer *N*-Hydroxylierung. Die eingangs diskutierte Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die mikrosomale Oxydation von Aminen müßte damit so gedeutet werden, daß die *N*-Hydroxylierung durch Cytochrom P-450 unter dem Einfluß bestimmter Hemmstoffe in eine *N*-Oxydation durch ein Flavoprotein übergeht.

Der von Baker und Mitarb.³⁴ bei der mikrosomalen Oxydation von Trimethylamin beobachtete Einbau von Sauerstoff aus O_2 in Trimethylaminoxid wird wahrscheinlich ebenfalls von dem mikrosomalen Flavoprotein katalysiert. Bei einer Sauerstoffaktivierung durch Cytochrom P-450 wäre neben der Bildung des *N*-Oxides eine oxydative Entalkylierung des Trimethylamins zu erwarten. Nach eigenen *in vivo*-Untersuchungen (unveröffentlicht) mit ^{14}C -markiertem Trimethylamin ist diese aber auszuschließen.

LITERATUR

1. J. R. GILLETTE, *Adv. Pharmac.* **4**, 219 (1966).
2. M. KIESE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **123**, 141 (1965).
3. E. ARRHENIUS, 4th FEBS-Meeting, Oslo 1967, Abstr. No. 554.
4. H. UEHLEKE, F. SCHNITGER und K.-H. HELLMER, *Z. physiol. Chem.* **351**, 1475 (1970).
5. D. M. ZIEGLER und F. H. PETTIT, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **15**, 188 (1964).
6. H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **250**, 1 (1965).
7. P. HLAVICA, M. KIESE, G. LANGE und G. MOR, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **263**, 269 (1968).

* Sinne Von Hayaishi⁹, zählt die Reaktion zu den von externen Monoxygenasen katalysierten Oxydationen.

8. D. M. ZIEGLER, C. H. MITCHELL und D. JOLLOU, in *Microsomes and Drug Oxidations*, u.a. (J. R. GILLETTE), S. 173. Academic Press, New York (1969).
9. O. HAYAISHI, *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 21 (1969).
10. R. BENTLEY und A. NEUBERGER, *Biochem. J.* **45**, 584 (1949).
11. K. N. MURRAY, J. G. WATSON und S. CHAYKIN, *J. biol. Chem.* **241**, 4798 (1966).
12. H. H. HODGSON, D. D. R. SIBBALD und E. W. SMITH, *J. chem. Soc.* 851 (1947).
13. K. BRAND und A. WIRSING, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **45**, 1765 (1912).
14. H. KEXEL und H.-L. SCHMIDT, diese Z., im Druck.
15. D. RITTENBERG und L. PONTICORVO, *Int. J. Appl. Rad. Isotopes* **1**, 208 (1956).
16. M. KIESE und E. RAUSCHER, *Biochem. Z.* **338**, 1 (1963).
17. H. KAMPFFMEYER und M. KIESE, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **244**, 375 (1963).
18. P. J. BUNYAN und J. I. G. CADOGAN, *J. chem. Soc.* 42 (1963).
19. R. A. ODUM und M. BRENNER, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 2074 (1966).
20. E. SAWICKI, *J. Org. Chem.* **22**, 1084 (1957).
21. R. SCHMIDT und H. MÖHLAU, *J. prakt. Chem.* **18**, 199 (1878).
22. H. UEHLEKE, *Fortschr. Arzneimittelforsch.* **8**, 195 (1965).
23. Y. OGATA, Y. SAWAKI, J. MIBAE und T. MORIMOTO, *J. Am. chem. Soc.* **86**, 3854 (1964).
24. S. OAE, T. FUKUMOTO und M. YAMAGAMI, *Bull. Chem. Soc. Japan* **36**, 728 (1963).
25. J. L. HOLTZMAN und M. L. CARR, *Life Sci.* **9**, 1033 (1970).
26. M. KIESE und H. UEHLEKE, *Naturwissenschaften* **48**, 379 (1961).
27. T. OMURA, R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL und R. W. ESTABROOK, *Fedn Proc.* **24**, 1181 (1965).
28. G. RENNER, *Z. analyt. Chem.* **193**, 92 (1963).
29. L. HESSE und A. BARKE, *Chem. Ber.* **77B**, 95 (1944).
30. G. E. UTZINGER und F. A. REGENASS, *Helv. chim. Acta* **37**, 1885 (1954).
31. G. A. HAMILTON, *Adv. Enzymol.* **32**, 55 und 80 (1969).
32. P. HEMMERICH, in *Biochemie des Sauerstoffs*, (Eds. B. HESS und HJ. STAUDINGER), S. 249. Springer Verlag, Berlin (1968).
33. G. R. HOWE und R. R. HIATT, *J. Org. Chem.* **35**, 4007 (1970).
34. J. R. BAKER und S. CHAYKIN, *J. biol. Chem.* **237**, 1309 (1962).

Zusammenfassung—Kaninchenlebermikrosomen hydroxylieren *p*-Thioanisidin zu 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin. Aus diesem primären Oxydationsprodukt bildet sich durch Folgereaktionen 4,4'-Bismethylmercapto-azoxybenzol. Durch Untersuchungen dieser sekundären Reaktionen wird sichergestellt, daß das Endprodukt nur das bei der primären enzymatischen Oxydation eingeführte Sauerstoffatom enthält. Dieses Sauerstoffatom stammt aus O₂; die Bildung von 4-Methylmercapto-phenylhydroxylamin ist deshalb eine mischfunktionelle Oxydation am Stickstoffatom. Da sie durch CO hemmbar ist, ist Cytochrom P-450 als das Sauerstoff-aktivierende Enzym anzusehen. In Gegenwart von *p*-Chlormercuribenzoat ist eine mikrosomale Oxydation von *N*-Äthylanilin zu Nitrosobenzol durch Cytochrom P-450 wahrscheinlich nicht möglich; sie wird vielmehr durch ein mikrosomales Flavoprotein katalysiert. Der Einbau von Sauerstoff aus O₂ auch bei dieser Reaktion zeigt, daß sie ebenfalls mischfunktionell verläuft. Die Sauerstoff-Aktivierung durch das mikrosomale Flavin-Enzym wird im Vergleich zur Aktivierung durch Cytochrom P-450 diskutiert.