

# ÜBER DEN EINFLUSS VON SUBSTITUENTEN AUF DIE MIKROSOMALE ENTALKYLIERUNG AROMATISCHER *N*-, *O*- UND *S*-ALKYLVERBINDUNGEN\*

HANNS-LUDWIG SCHMIDT, MANFRED R. MÖLLER† und NORBERT WEBER  
Fachrichtung Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

(Received 23 February 1973; accepted 30 May 1973)

**Abstract**—Dealkylation of aromatic *N*-, *O*- and *S*-alkyl compounds by rat liver microsomes was investigated in relation to the physical and chemical properties of the substrates. The relative rate of demethylation of some of the aniline derivatives tested was only dependent on their lipid solubility and basicity. In other derivatives tested steric effects also influenced the reaction. Generally the highest demethylation rate was found at the *O*-alkyl or *N*-alkyl group when a second substituent was in 2-position. *N*-Demethylation was the primary reaction. The results are discussed in relation to the binding and orientation of the substrates in the microsomal lipid membrane.

DIE OXIDATIVE Abspaltung von *N*-, *O*- und *S*-Alkylgruppen ist eine häufig beobachtete Veränderung körperfremder Stoffe im Säugetierorganismus.<sup>1</sup> Nach enzymatischer Hydroxylierung der Substanzen in  $\alpha$ -Stellung zum Heteroatom trennt sich die Alkylgruppe als Carbonylverbindung ab. Die Hydroxylierung ist eine NADPH- und Sauerstoff-abhängige mischfunktionelle Oxidation, bei der ein Sauerstoff-Atom aus  $O_2$  in das Reaktionsprodukt eingebaut wird.<sup>2</sup> Die Sauerstoff-Aktivierung erfolgt durch ein mikrosomales Elektronen-Transportsystem mit der End-Oxidase Cytochrom P-450.<sup>3</sup>

Wegen der Lokalisation der mikrosomalen Oxidasen in den Lipoproteid-Membranen des endoplasmatischen Retikulums werden ausschließlich lipidlösliche Substrate hydroxyliert.<sup>4</sup> Eine ausgeprägte Substrat- oder Reaktions-Spezifität wurde bei der Hydroxylierung von Steroiden,<sup>5</sup> kaum jedoch im Falle der Oxidation körperfremder Substanzen beobachtet. Einige stereoselektive Hydroxylierungen optischer Antipoden<sup>6,7</sup> sowie die stereospezifische Substitution von Äthylbenzol<sup>8</sup> machen jedoch anisotrope Bindungen körperfremder Substrate im endoplasmatischen Retikulum wahrscheinlich. In den vorliegenden Untersuchungen werden daher Beziehungen zwischen physikalischen Eigenschaften und Struktur einiger *N*-, *O*- und *S*-Alkylverbindungen einerseits und ihrer Demethylierung durch Rattenleber-Mikrosomen andererseits geprüft.

## MATERIAL UND METHODEN

**Biochemikalien und markierte Ausgangsverbindungen.** NADH, NADP<sup>+</sup>, Glucose-6-phosphat (G-6-P), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) und Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (ADH-L) stammten von der Firma Boehringer Mann-

\* Herrn Prof. D. Yerchel zum 60. Geburtstag freundlich gewidmet.

† Derzeitige Anschrift: 665 Homburg/Saar, Institut für Rechtsmedizin.

heim, GmbH.  $D_3CJ$  und  $LiAlD_4$  wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt,  $^{14}CH_3J$  wurde von der Firma NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain bezogen.

Nicht käufliche Anilin-Derivate wurden in Anlehnung an bekannte Vorschriften oder in Analogie dazu im mMol-Bereich durch Alkylierung primärer oder sekundärer Anilin-Derivate<sup>9-12</sup> in Bombenrohren oder durch Substitution tertiärer Anilin-Derivate<sup>13-15</sup> synthetisiert. Die Reinheitskontrolle der Produkte geschah durch Elementaranalyse, Vergleich von Siede- und Schmelzpunkten sowie durch Dünnschicht-Chromatographie (Kieselgel GF<sub>254</sub>, Fließmittel Benzol/Methanol 80:20).

Zur Bestimmung der relativen *Lipidlöslichkeit* wurden jeweils 10 mg Base in 20 ml *n*-Hexan gelöst, und die Extinktion wurde in einem aliquoten Teil der Lösung gemessen. Die Lösung schüttelte man mit einem passenden Volumen an 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0 und bestimmte anschließend spektrophotometrisch die in der organischen Phase verbliebene Base. Aus dem Verhältnis der Konzentrationen und der Flüssigkeitsvolumina ergab sich der in Tabelle 1 aufgenommene Verteilungskoeffizient P.

*N,N-Dimethylanilin-[N(  $^{14}CH_3$ )<sub>2</sub>] und N,N-Dimethylanisidine-[N(  $^{14}CH_3$ )<sub>2</sub>].* 0,25 mCi  $^{14}CH_3J$  wurden in einer Vakuumapparatur zu soviel Trägersubstanz in 4 ml Dioxan kondensiert, daß eine Lösung von 0,125 mMol Methyljodid/ml der spezif. Aktiv. 0,5 mCi/mMol entstand. 1,6 ml der Lösung (0,2 mMol) wurden mit 0,3 mMol *N*-Methylanilin in 0,4 ml Dioxan 48 Stdn. im Bombenrohr auf 100° erhitzt. Den Inhalt des Bombenrohres versetzte man bei 0° mit 3,6 ml H<sub>2</sub>O und 3 ml Äther, machte das Gemisch mit 0,1 ml 10 N NaOH alkalisch und schüttelte es 12 Stdn. mit 30 µl (0,3 mMol) Chlorameisensäureäthylester. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase noch dreimal mit je 2 ml Äther ausgeschüttelt. Aus den vereinigten ätherischen Phasen wurde das Amin mit 1 ml 1 N HCl extrahiert, daraus mit 0,2 ml 10 N NaOH wieder freigesetzt und in frischem Äther aufgenommen. Aus der getrockneten ätherischen Lösung fällte man das Hydrochlorid durch einen Überschuß an ätherischer HCl. Ausbeute 23,3 mg (74 Prozent d. Th.), spezif. Aktiv. 0,38 mCi/mMol. Die Substanz war dünnschichtchromatographisch einheitlich und hatte einen *R<sub>f</sub>*-Wert 0,64 (System s.o.) wie authentische Vergleichssubstanz.—Ausgangsmaterial zur Darstellung der  $^{14}C$ -markierten *N,N*-Dimethylanisidine waren die entsprechenden *N*-Methylanisidine. Die Umsetzung von je 0,15 mMol eines sekundären Amins mit je 0,1 mMol  $^{14}CH_3J$  geschah analog zu der Darstellung des markierten *N,N*-Dimethylanilins. Die Ausbeute an *N,N*-Dimethyl-*o*-anisidin-[*N*( $^{14}CH_3$ )<sub>2</sub>] (spezif. Aktiv. 0,35 mCi/mMol) betrug 57 Prozent, die der *m*-Verbindung (spezif. Aktiv. 0,37 mCi/mMol) 65 Prozent und die der *p*-Verbindung (spezif. Aktiv. 0,37 mCi/mMol) 79,5 Prozent d.Th.. Alle drei Präparate waren chemisch und radiochemisch einheitlich und hatten in dem o. g. Fließmittel die gleichen *R<sub>f</sub>*-Werte wie die entsprechenden Vergleichssubstanzen (0,58 bzw. 0,73 bzw. 0,62).

*N-Methyl-p-anisidin-[N-CD<sub>3</sub>] und N,N-Dimethyl-p-anisidin[N( CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].* *p*-Anisidinurethan wurde nach<sup>16</sup> hergestellt. Durch Reduktion von 45 mMol der Verbindung mit 50 mMol LiAlD<sub>4</sub> in ätherischer Lösung wurden 1,6 g (25 Prozent d.Th.) *N*-Methyl-*p*-anisidin-[N-CD<sub>3</sub>] gewonnen. Das Produkt entsprach in Schmp. (37°) und Sdp.<sup>19</sup> (135–136°) normalem *N*-Methyl-*p*-anisidin.<sup>17</sup>—2 mMol des deuterierten sekundären Amins wurden mit der äquiv. Menge D<sub>3</sub>CJ in 4 ml Dioxan 72 Stdn. auf 100° im Bombenrohr erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte analog der des  $^{14}C$ -markierten Präparates. Ausbeute an *N,N*-Dimethyl-*p*-anisidin-[N( CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 60 Prozent d.Th., Schmp. 44°. Durch Titration mit 0,1 N HCl wurden die *K<sub>a</sub>*-Werte der deuterierten

und der normalen Base in Dioxan/Wasser (1:2) bestimmt. Als Isotopen-Effekt ergab sich  $K_{aH}/K_{aD} = 1,12$ ; die deuterierte Verbindung ist also eine etwas stärkere Base als die normale.

*Mikrosomenpräparation und Inkubationsansätze* (Normalansatz 2 ml) wurden früher beschrieben.<sup>18</sup> Die Demethylierungsrate (Inkubationsdauer: 30 Min. bei 37°) wurde durch die Bestimmung der CH<sub>2</sub>O-Menge nach Nash<sup>19</sup> in den mit Trichloressigsäure denaturierten Ansätzen bestimmt. Als Leerwerte dienten komplettete Inkubationsansätze mit nicht demethylierbaren Substraten wie Anilin oder Acetanilid. Jeder Versuch wurde je dreimal mit Lebermikrosomen von je drei nicht induzierten Ratten durchgeführt; die maximale Abweichung der Einzelwerte von den in den Tabellen angegebenen Mittelwerten war ± 10 Prozent rel. *Die gleichzeitige Entmethylierung an N und O* wurde an den <sup>14</sup>C-markierten Anisidinen gemessen. In einem aliquoten Teil des Überstandes der denaturierten Inkubationslösung (4-facher Ansatz) bestimmte man den Gesamt-Formaldehyd. 4 ml der Lösung wurden mit einer bekannten Menge CH<sub>2</sub>O sowie 0,1 ml 70-proz. HClO<sub>4</sub> zur Bindung der Basen versetzt und dann lyophilisiert. Die spezif. Radioaktivität des CH<sub>2</sub>O im Lyophilisat (als 2,4-Dinitrophenylhydrazone) ergab seine spezif. Aktivität im Inkubationsansatz und damit seine Verdünnung durch Formaldehyd aus der nicht markierten O-Methylgruppe. Als Bezugs-Substanz ohne O-CH<sub>3</sub>-Gruppe wurde *N,N*-Dimethylanilin-[N(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] entsprechend inkubiert. Die Inkubationsansätze (12 ml) zur Bestimmung der *Abspaltung der verschiedenen Alkylreste vom gleichen N-Atom* (*N*-Methyl-*N*-äthylanilin bzw. *N*-Methyl-*N*-benzyylanilin) wurden nach 40-min. Inkubation unter Eiskühlung mit 0,5 ml einer halbkonz. HClO<sub>4</sub> [70-proz. HClO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O = 1:1,2 (v/v)] denaturiert. 4 ml des Überstandes wurden mit 2 ml einer 1,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung versetzt (End-pH-Wert 6,5–6,7).<sup>20</sup> Je 2 ml dieser Lösung wurden in zwei 1 cm-Küvetten pipettiert. Zu der Lösung in der Meßküvette fügte man 0,1 ml NADH-Lösung (3 mg NADH/ml 1-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung), zu der Vergleichslösung 0,115 ml H<sub>2</sub>O. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,015 ml ADH-L-Suspension gestartet und die Extinktionsänderung bei 339 nm nach 1 Min. gemessen. Nach dieser Reaktionszeit (CH<sub>2</sub>O war zu diesem Zeitpunkt kaum, der andere Aldehyd praktisch quantitativ reduziert) versetzte man beide Proben mit 2 ml Nash-Reagenz<sup>19</sup> und erhitzte sofort auf 80°, nach 5 Min. wurde abgekühlt und filtriert. Die Extinktion der Lösung ohne ADH-L bei 422 nm ergab die Gesamtmenge CH<sub>2</sub>O (Benzaldehyd und Acetaldehyd stören nicht), die Differenz der beiden Proben den durch das Enzym reduzierten Formaldehyd. Um dessen Menge wurde der enzymatisch bestimmte Acetaldehyd- bzw. Benzaldehydwert ( $E_{339}$ ) korrigiert. *Die Demethylierung der Deuterium-markierten Anisidin-Derivate* wurde wie die aller anderen Substanzen mit Nash-Reagenz<sup>19</sup> bestimmt. *Die Substrat-Bindungsspektren* der Modell-Substanzen an Cytochrom P-450 wurden nach Schenckmann *et al.*<sup>21</sup> gemessen, der Cytochrom P-450-Gehalt der Mikrosomen nach Omura *et al.*<sup>22</sup>

#### VERSUCHSERGEBNISSE

##### (1) Substituenten-Effekt und mikrosomale Demethylierung von Modellsubstanzen.

Nachdem Gaudette und Brodie<sup>4</sup> eine Abhängigkeit der Entalkylierung von Aminen durch Lebermikrosomen von ihrer Lipidlöslichkeit gefunden hatten, zeigten systematische Untersuchungen von McMahon *et al.*<sup>23,24</sup>, daß auch die Basizität dieser Substrate von starkem Einfluß auf ihre Umsetzung war. Eine mathematische Beschreibung der Demethylierungsrate von Aminen als Funktion ihrer Lipidlöslichkeit und

Basizität<sup>25</sup> war nur begrenzt gültig. Aliphatische Amine scheinen für solche Untersuchungen ungeeignet zu sein, da sie als starke Basen beim pH-Wert der Inkubationen (pH 7,5) in wässriger Phase zum größten Teil als Ammoniumsalze vorliegen.

Die in den eigenen Untersuchungen an Anilin-Derivaten gemessenen Entmethylierungsrationen wurden zunächst mit den aus Lipidlöslichkeit und Basizität nach Hansch *et al.*<sup>25</sup> (Gleichung 1) berechneten verglichen (Tabelle 1). Bei der Angabe der relativen Demethylierungsrationen ist die Zahl der  $\alpha$ -ständigen Wasserstoff-Atome berücksichtigt, deren Substitution durch eine OH-Gruppe zur Bildung von Formaldehyd führen kann.

$$\log BR = 0,099 \log P + 0,190 (pK_a - 9,5) + 0,354 \quad (1)$$

(BR = biological response (Demethylierungsrate), P = Lipidlöslichkeit, ausgedrückt als Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen *n*-Hexan und 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0).

TABELLE 1. EXPERIMENTELLE UND AUS LIPIDLÖSLICHKEIT UND BASIZITÄT NACH GL. (1) BERECHNETE RELATIVE UMSÄTZE (*N,N*-DIMETHYLANILIN, DMA = 100) DER MIKROSMALEN ENTMETHYLIERUNG VON *p*-SUBSTITUIERTEN ANILIN-DERIVATEN. BR = ENTMETHYLIERUNGSRATE, *k* = GESCHWINDIGKEITSKONSTANTE

R	R'	$p\text{-R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)\text{R}'$	Verteil.-koeff.	$\frac{\text{BR}}{\text{BR}_{\text{DMA}}} = \frac{k}{k_{\text{DMA}}}$			
				P	$pK_a^{26}$	ber.	gef.
-H	-CH <sub>3</sub>		240	5,07	1,00	1,00	
-Br	-CH <sub>3</sub>		1580	4,23	0,91	1,00	
-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		390	6,02	1,65	1,42	
-H	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		1680	4,00	0,88	0,92	
-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		840	1,79*	0,19	0,20	
-H	-CO-CH <sub>3</sub>		0,4	0,0	0,08	0,15	
-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		90	5,85	1,27	0,85	
-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		600	5,50	1,12	0,95	
-SCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		1590	4,35	0,96	1,25	
-CN	-CH <sub>3</sub>		41	1,78	0,13	0,70	
-CHO	-CH <sub>3</sub>		7	1,58	0,09	0,75	
-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		0,2	1,37*	0,13	0,75	
-NO <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>		24	0,67	0,12	0,40	

\*  $pK_a$ -Werte der primären Amine.

Die relative *N*-Demethylierungsrate der untersuchten Modell-Substanzen wird durch Gleichung (1) nur dann zufriedenstellend beschrieben, wenn der aromatische Ring keine weiteren polaren Substituenten trägt; analoge Beobachtungen hatten McMahon *et al.*<sup>24</sup> bei Phenyl-alkylaminen gemacht.

Nach Uneyama *et al.*<sup>27</sup> folgen radikalische Wasserstoff-Abspaltungen aus *N*-, *O*- und *S*-Methylgruppen an aromatischen Verbindungen einer Hammett-Beziehung; der Substituenten-Effekt im aromatischen Ring setzt sich bei diesen Substanzen demnach in die  $\alpha$ -ständige C-H-Bindung fort. Wenn deren Reaktivität auch für die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion von Bedeutung ist, müßte sich für diese ebenfalls eine Hammett-Beziehung finden lassen. Nach Abb. 1 scheint dies nur für einige der

untersuchten Substanzen zuzutreffen; offenbar beruht die Wirkung der Zweit-Substituenten nicht allein auf einer Aktivierung der  $\alpha$ -C-H-Bindung für die Hydroxylierung.

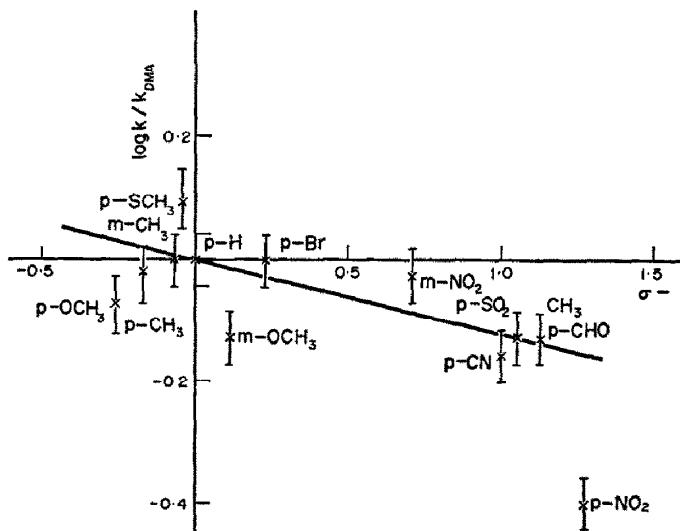


ABB. 1. Hammett-Beziehung für die mikrosomale *N*-Demethylierung von Derivaten des *N,N*-Dimethylanilins.  $\sigma$ -Werte nach,<sup>28</sup> relative Demethylierungsgeschwindigkeiten nach Tabelle 1 und Tabelle 3 unter Berücksichtigung der experimentellen Streuung von  $\pm 10$  Prozent.

Möglicherweise bewirkt die relative Affinität von Substituenten zu funktionellen Gruppen in der Lipid-Membran eine Orientierung der Methylgruppen relativ zum "aktiven Sauerstoff". Eine *O*- bzw. *S*-Demethylierung von Derivaten des Anisidins bzw. Thioanisidins unterbleibt nämlich, wenn deren Stickstoff-Atom basisch ist (*p*-Anisidin, *N,N*-Dimethyl-*p*-anisidin, *p*-Thioanisidin) (Tabelle 2); nach Acetylierung des *N*-Atoms (*N*-Acetyl-*p*-anisidin, *N*-Acetyl-*p*-thioanisidin, *N*-Methyl-*N*-acetyl-*p*-thioanisidin) ist eine *O*- bzw. *S*-Demethylierung festzustellen. Für basischen Stickstoff scheint also eine Bindestelle in der Membran zu existieren.

TABELLE 2. RELATIVE DEMETHYLIERUNGSRÄTEN AN *O*- UND *S*-METHYLVERBINDUNGEN DURCH RATTENLEBER-MIKROSOMEN, BEZOGEN AUF DIE FORMALDEHYD-BILDUNG AUS *N,N*-DIMETHYLANILIN = 100

<i>O</i> -Demethylierung		<i>S</i> -Demethylierung	
<i>p</i> -R-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>3</sub>	Relat. Umsatz	<i>p</i> -R-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -S-CH <sub>3</sub>	Relat. Umsatz
R		R	
H <sub>2</sub> N-	0	H <sub>2</sub> N-	0
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-	2	H <sub>3</sub> C-CO-NH-	24
H <sub>3</sub> C-CO-NH-	13	H <sub>3</sub> C-CO-N   CH <sub>3</sub>	24

## (2) Orientierung von Substituenten und mikrosomale Entmethylierung.

Die Folgerungen aus den vorher beschriebenen Resultaten mit *p*-substituierten Anilin-Derivaten legten nahe, den Einfluß von Substituenten auf die Demethylierungsrate in Abhängigkeit von ihrer relativen Stellung zur oxidierbaren Gruppe zu untersuchen (Tabelle 3). Unabhängig von der Art der Substituenten wurde fast stets die größte Entmethylierungsgeschwindigkeit bei *o*-Substitution gefunden. Dieses Resultat kann ebenfalls nur durch einen Orientierungs-Effekt der Substituenten erklärt werden. Eine Beziehung zu einer durch die Geometrie der Substitution bedingten Größe wie z.B. dem Dipol-Moment der Substrate war allerdings nicht herzustellen.

TABELLE 3. RELATIVE *O*- BZW. *N*-DEMETHYLIERUNG DURCH RATTEN-LEBER-MIKROSOMEN VON ISOMEREN (*o*, *m*, *p*)-DISUBSTITUIERTEN ANILIN-DERIVATEN (FORMALDEHYDBILDUNG AUS *N,N*-DIMETHYLANILIN = 100)

Substrat	Relative <i>O</i> -Demethy- lierung			Relative <i>N</i> -Demethy- lierung		
	<i>o</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	<i>o</i>	<i>m</i>	<i>p</i>
$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	—	—	—	116	95	40
$\text{NC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	—	—	—	103	—	70
$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	—	—	—	140	100	95
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$	12	2	2	85	75	85
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$	13	0	0	—	—	—
$\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$	9	11	13	—	—	—
CH <sub>3</sub>						

Substituenten am Stickstoff beeinflußten die Abspaltung einer Methylgruppe von diesem Atom über die Lipidlöslichkeit und die Basizität des Substrates (s. Tabelle 1). Inwieweit Substituenten am  $\alpha$ -ständigen C-Atom selbst auf dessen Hydroxylierung Einfluß nehmen, sollte durch eine Bestimmung der relativen Geschwindigkeit der Abspaltung verschiedener Alkylgruppen vom gleichen *N*-Atom zu ermitteln sein (Tabelle 4). Da in jedem Fall eine Hydroxylierung der CH<sub>3</sub>-Gruppe deutlich bevorzugt

TABELLE 4. RELATIVE GESCHWINDIGKEITEN DER ABSPALTNUNG VERSCHIEDENER ALKYLGRUPPEN VOM GLEICHEN *N*-ATOM DURCH MIKROSOMALE OXIDATION *N,N*-DISUBSTITUIERTER ANILIN-DERIVATIVE

$p\text{-R}^1\text{-C}_6\text{H}_4-\text{N}$	$\text{R}^2$	$\text{R}^3$	Abspaltung
$-\text{R}^1$	$-\text{R}^2$	$-\text{R}^3$	$-\text{R}^2/\text{-R}^3$
—H	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub>	4–7
—H	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	10
—OCH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub> (CD <sub>3</sub> )	—CH <sub>3</sub> (CD <sub>3</sub> )	1*
—OCH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub> (CD <sub>3</sub> )	—H	1, 2*

\* Intermolekulares Verhältnis der Demethylierungsrate der reinen Protium- bzw. Deuterium-Verbindung.

war, ist ein induktiver Effekt von Substituenten am Kohlenstoff-Atom für dessen Hydroxylierung ohne Bedeutung. Neben einer Spezifität der mischfunktionellen Oxidasen für Methylgruppen sind wieder räumliche Faktoren zur Interpretation der Resultate in Erwägung zu ziehen.

### DISKUSSION

Lipidlöslichkeit und Basizität der untersuchten Modellsubstanzen sowie die Reaktivität der  $\alpha$ -ständigen C-H-Bindung können allein den Unterschied in der Geschwindigkeit ihrer mikrosomalen Entalkylierung an Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel nicht erklären. Die Reaktion scheint auch durch die Bindung und Orientierung der Substrate in der mikrosomalen Lipid-Membran beeinflußt zu werden. Dabei handelt es sich nicht um eine Bindung an Cytochrom P-450, denn Typ und Amplitude von Substrat-Bindungsspektren<sup>21</sup> mit diesem Cytochrom waren mit den Demethylierungsraten nicht in Beziehung zu bringen. Alle darauf untersuchten Modellsubstanzen ergaben z.B. ein Bindungsspektrum vom Typ I, wenn sie tertiären Stickstoff enthielten, vom Typ II, wenn eine freie Aminogruppe vorlag.

Bindung und Orientierung der Substrate in der Membran werden durch die Substituenten bedingt; McMahon<sup>29</sup> vermutete einen Zusammenhang mit deren Größe. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist eher auf eine polare und/oder unpolare Wechselwirkung mit der mikrosomalen Lipid-Membran zu schließen. Stark orientierende Wirkung scheint basischer Stickstoff zu haben; er verhindert die Entmethylierung vor allem *p*-ständiger *O*-Alkyl- bzw. *S*-Alkylgruppen. Die entsprechenden *N*-Acetyl-Verbindungen werden dagegen entmethyliert. Daly<sup>30</sup> fand sogar—allerdings mit Mikrosomen Methylcholanthren-induzierter Ratten—eine im Vergleich besonders hohe Demethylierung des *p*-Isomeren.

Axelrod<sup>31</sup> erhielt für die mikrosomale *O*-Demethylierung von Anisol-Derivaten von den hier für die *N*-Demethylierung beschriebenen abweichende Substituenteneinflüsse; wegen der unterschiedlichen Polarität von *O*-Alkyl- und *N*-Alkylgruppen ist allerdings ein gleicher Effekt der Orientierung durch Zweit-Substituenten bei diesen Substanzen auch nicht zu erwarten. Konkurrieren beide Alkylgruppen im gleichen Molekül, so wird eine überwiegende *N*-Entalkylierung beobachtet. Die bevorzugte Hydroxylierung der Methylgruppe ist ebenfalls sterisch zu interpretieren. Eine Verbesserung der analytischen Methodik wird erlauben, weitere Beispiele gerade zu dieser Frage zu untersuchen.

### LITERATUR

1. J. R. GILLETTE, *Fortschr. Arzneimittel-Forsch.* **6**, 11 (1963).
2. R. E. MCMAHON, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3389 (1969).
3. R. W. ESTABROOK und B. COHEN, in *Microsomes and Drug Oxidations* (Eds J. R. GILLETTE, A. H. CONNEY, G. J. COSMIDES, R. W. ESTABROOK, J. R. FOUTS und G. J. MANNERING), S. 95, Academic Press, New York (1969).
4. L. GAUDETTE und B. B. BRODIE, *Biochem. Pharmac.* **2**, 89 (1959).
5. C. J. SIH, *Science, Washington* **163**, 1297 (1969).
6. H. KEBERLE, W. RIESS und K. HOFMANN, *Arch. int. Pharmacodyn.* **142**, 117 (1963).
7. E. DEGWITZ, V. ULLRICH, HJ. STAUDINGER und W. RUMMEL, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **350**, 547 (1969).
8. R. E. MCMAHON und H. R. SULLIVAN, in *Microsomes and Drug Oxidations* (Eds J. R. GILLETTE, A. H. CONNEY, G. J. COSMIDES, R. W. ESTABROOK, J. R. FOUTS und G. J. MANNERING), S. 239, Academic Press, New York (1969).
9. E. THIELEPAPE, *Ber.* **68**, 751 (1935).
10. J. MEISENHEIMER, *Liebigs Ann. Chem.* **428**, 252 (1922).
11. E. WEDEKIND, *Ber.* **32**, 519 (1899).
12. P. GRAMMATIKAKIS, *Bull. Soc. chim. France* **1953**, 211.

13. N. P. BUU-HOI, *Liebigs Ann. Chem.* **556**, 1 (1944).
14. H. PLIENINGER und C. E. CASTRO, *Chem. Ber.* **87**, 1760 (1954).
15. H. M. FITSCH, C. F. H. ALLAN und J. A. VAN ALLAN, *Org. Syntheses* **27**, 62 (1947).
16. R. L. DANNLEY, M. LUKIN und J. SHAPIRO, *J. org. Chem.* **20**, 92 (1955).
17. J. HALBERKANN, *Ber.* **54**, 1667 (1921).
18. H. KEXEL und H.-L. SCHMIDT, *Biochem. Pharmac.* **21**, 1009 (1972).
19. T. NASH, *Biochem. J.* **55**, 416 (1953).
20. H.-U. BERGMAYER, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, S. 1457. Verlag Chemie, Weinheim (1971).
21. J. B. SCHENKMAN, R. REMMER und R. W. ESTABROOK, *Molec. Pharmac.* **3**, 113 (1967).
22. T. OMURA, R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL und R. W. ESTABROOK, *Fedn. Proc.* **24**, 1181 (1965).
23. R. E. McMAHON und N. R. EASTON, *J. med. Chem.* **4**, 437 (1961).
24. R. E. McMAHON, *J. med. Chem.* **4**, 67 (1961).
25. C. HANSCH, A. R. STEWARD und J. IWASA, *J. med. Chem.* **8**, 868 (1965).
26. D. D. PERRIN, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solutions*, Butterworths, London (1965).
27. K. UNEYAMA, H. NAMBA und S. OAE, *Bull. chem. Soc. Japan* **41**, 1928 (1968).
28. H. H. JAFFÉ, *Chem. Rev.* **53**, 191 (1953).
29. R. E. McMAHON und H. R. SULLIVAN, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1085 (1965).
30. J. DALY, *Biochem. Pharmac.* **19**, 2979 (1970).
31. J. AXELROD, *Biochem. J.* **63**, 634 (1956).

**Zusammenfassung**—Die Entalkylierung aromatischer *N*-, *O*- und *S*-Alkylverbindungen durch Rattenleber-Mikrosomen wird in Abhängigkeit von physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substrate untersucht. Die relative Geschwindigkeit der Demethylierung wird nur bei einigen der untersuchten Anilin-Derivate allein durch ihre Lipidlöslichkeit und ihre Basizität bestimmt; bei anderen scheinen sterische Effekte zusätzlich Einfluß auf die Reaktion zu nehmen. Im allgemeinen wird die höchste Entmethylierungsraten bei *N*- oder *O*-Methylgruppen gefunden, wenn Zweit-Substituenten in *o*-Stellung zu diesen stehen. Die Abspaltung der Methylgruppe vom *N*-Atom ist gegenüber der anderer Alkylgruppen bevorzugt. Die Ergebnisse werden als Effekt einer Bindung und Orientierung des Substrates in der mikrosomalen Lipid-Membran diskutiert.