

In einer vorläufigen Mitteilung² berichteten wir über den Nachweis eines 3 β -Hydroxy-17-KS im Harn von weiblichen Meerschweinchen. Dieser Befund wurde auch kurze Zeit später von Brooks et al.³ bestätigt. Auf Grund verschiedener Analysen glaubten wir damals, dass es sich bei dem nicht kristallinen β -Steroid um Epiandrosteron handelte. Brooks et al.³ erwähnten aber, dass das IR-Spektrum ihrer β -Fraktion geringe Abweichungen gegenüber dem von reinem Epiandrosteron aufwies.

In Fortsetzung unserer Untersuchungen über die Ausscheidung von 17-KS-Konjugaten im Meerschweinchenharn beobachteten wir später, dass durch heisse Säurehydrolyse wesentlich mehr β -Steroid freigesetzt wird, als durch die angewandte schonende Hydrolysekombination: β -Glucuronidase- und kalte Säurehydrolyse. Daraufhin lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der von uns als Epiandrosteron bezeichneten Fraktion auch um einen Artefakt eines höher oxygenierten β -Steroids handeln könnte.

Zunächst versuchten wir, das höher oxygenierte 3 β -Hydroxy-17-KS aus 11 l Harn von weiblichen Meerschweinchen nach kontinuierlicher Ätherextraktion bei pH 7 darzustellen. Es gelang uns tatsächlich, in der Fraktion VII einer Gradienten-Elutions-Chromatographie an Aluminiumoxyd (Benzol-Äthanol) ein mit Digitonin fällbares 17-KS nachzuweisen und auf chromatographischem Wege (Papierchromatographie: Propylenglykol-Ligroin, 120 h absteigend; Celite-Säulenchromatographie mit Bush-BI-System⁴) zu reinigen. Auf Grund verschiedener mikrochemischer Umsetzungen (zum Beispiel Acetylierung und Chromoxyd-Oxydation) und dem papierchromatographischen Verhalten der daraus resultierenden Substanzen nahmen wir an, dass VII- β ein 3 β -Hydroxy-17-KS ist, das am C-11 eine weitere Hydroxylgruppe besitzt. Diese Vermutung wurde dann durch das IR-Spektrum von kristallinem VII- β bestätigt. Es war identisch mit dem Spektrum von kristallinem 11 β -Hydroxy-Epiandrosteron (freundlicherweise von Herrn Dr. KLYNE, London, zur Verfügung gestellt), das unter den gleichen Bedingungen hergestellt worden war. Auch der Schmelzpunkt von VII- β (235–239°C) stimmt mit dem Schmelzpunkt von reinem 11 β -Hydroxy-Epiandrosteron (234–235°C, siehe auch⁵) überein.

Nachdem es uns gelungen war, das höher oxygenierte β -Steroid als 11 β -Hydroxy-Epiandrosteron zu identifizieren, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem oben erwähnten Artefakt dann um Δ 9(11)-Epiandrosteron handeln konnte, denn bekanntlich entstehen durch Säurehydrolysen aus 11 β -Hydroxy-17-KS deren Δ 9(11)-Artefakte. So versuchten wir nun, den Artefakt aus 2 l Harn von weiblichen Meerschweinchen nach kalter und heisser Säurehydrolyse darzustellen. Hierzu reichte aber die früher verwendete Chromatographie an Aluminiumoxyd und in Propylenglykol-Ligroin nicht aus. Deshalb wurde die Fraktion II- β an einer Celite-Säule mit Bush-System A⁴ weiter gereinigt, wodurch wir einen semikristallinen Rückstand erhielten. Mit Hilfe der Pincus-⁶ und Zimmermann-Reaktion⁷ gelang es uns nachzuweisen, dass II- β zu 100% aus einem ungesättigten 17-KS besteht. Dieses ungesättigte Steroid verhielt sich papierchromatographisch ähn-

lich wie Epiandrosteron, wies aber im IR-Spektrum Abweichungen gegenüber reinem Epiandrosteron auf. Auch der Schmelzpunkt von II- β mit 170,5°C stimmte nicht mit dem Schmelzpunkt von reinem Epiandrosteron (177°C) überein. Dagegen fanden wir eine gute Übereinstimmung mit dem Schmelzpunkt von Δ 9(11)-Epiandrosteron, der in der Literatur mit 171°C angegeben wird⁵. Das Kurvenbild des IR-Spektrums von II- β (in KBr) stimmte weitgehend mit dem Kurvenbild von Δ 9(11)-Epiandrosteron im Steroid-Atlas von Roberts et al.⁸ überein. Trotz weitgehender Übereinstimmung der IR-Spektren möchten wir bei unserer II- β -Fraktion nicht von einer eindeutigen Identifizierung sprechen; leider konnten wir kein Vergleichsspektrum unter unseren Bedingungen anfertigen, weil uns die Referenzsubstanz « Δ 9(11)-Epiandrosteron» nicht zur Verfügung stand.

Eine weitere Stütze unserer Annahme, dass es sich bei II- β um Δ 9(11)-Epiandrosteron handelt, brachte ein weiterer Versuch, bei dem wir die gereinigte und als 11 β -Hydroxy-Epiandrosteron identifizierte Substanz VII- β durch heisse Säurehydrolyse in II- β überführen konnten. Das IR-Spektrum der gereinigten Fraktion stimmte im ganzen Bereich von 2–15 μ mit der aus weiblichem Meerschweinchenharn isolierten Substanz II- β überein.

Kürzlich berichteten Brooks⁹ und unabhängig davon auch Schubert¹⁰, dass sie im Harn von Meerschweinchen 11 β -Hydroxy-Epiandrosteron und den Artefakt Δ 9(11)-Epiandrosteron isoliert und identifiziert haben. Unsere Versuche wurden unabhängig von den beiden Autoren in der Zeit von Oktober 1960 bis April 1961 durchgeführt.

Summary. 11 β -hydroxy-epiandrosterone was isolated and identified from urine of normal untreated female guinea pigs. After cold and hot acid hydrolysis of the urine, we found another 3 β -hydroxy-17-oxosteroid. Its character was investigated by several methods and we suppose this steroid is Δ 9(11)-epiandrosterone, an artificial product of 11 β -hydroxy-epiandrosterone.

W. STAIB und K. DÖNGES

Physiologisch-chemisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf (Deutschland), 15. Februar 1962.

² W. STAIB, W. TELLER und W. SCHMIDT, *Exper.* 15, 188 (1959).

³ R. V. BROOKS, B. E. CLAYTON und J. E. HAMMANT, *J. Endocrinology* 20, 24 (1960).

⁴ I. E. BUSH, *Biochem. J.* 50, 370 (1952).

⁵ R. REUBER und J. SCHMIDT-THOME in HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, *Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse* (Springer Verlag, Heidelberg 1955), Bd. III/2, p. 1451 und p. 1550.

⁶ G. PINCUS, *Endocrinology* 32, 176 (1943).

⁷ W. ZIMMERMANN, H. U. ANTON und D. PONTIUS, *Hoppe-Seylers Z.* 289, 91 (1952).

⁸ G. ROBERTS, R. S. GALLAGHER und R. N. JONES, *Infrared Absorption Spectro of Steroids, an Atlas* (New York und London 1958), vol. II, Spektrum 433.

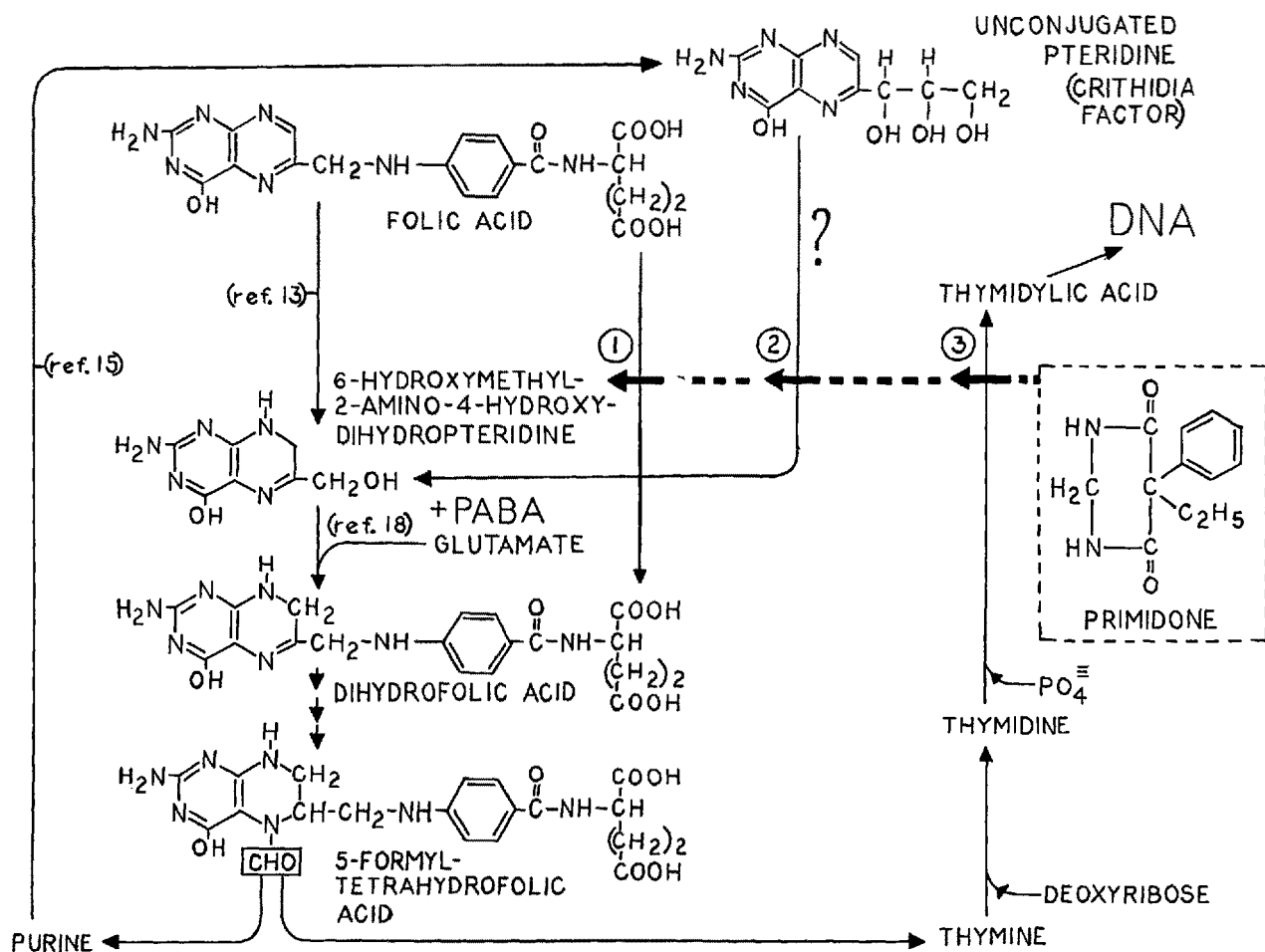
⁹ R. V. BROOKS, *Biochem. J.* 79, 33p (1961).

¹⁰ K. SCHUBERT und K. WEHRBERGER, *Hoppe-Seylers Z.* 326, 242 (1961).

Lesions in Folic Acid Metabolism Induced by Primidone¹

In review of the haematological complications of anticonvulsant therapy with hydantoin derivatives^{2–4}, a

¹ This work was aided by grants from the National Vitamin Foundation, National Association for Mental Health, American Cancer Society, and U.S. Public Health Service. We thank Dr. TH. ROBITCHER, Ayerst Laboratories, New York, for aid and gifts of primidone and Dr. E. PATTERSON of the American Cyanamid Co., Pearl River, New York, for the gifts of unconjugated pteridine.



total of 53 patients were reported up to 1960⁵ with an anemia characterized by megaloblastic bone marrow⁶. The anticonvulsants, diphenylhydantoin (Dilantin), primidone (Mysoline), and also phenobarbital derivatives may cause such anemias; the mechanism is unclear. These anemias merit investigation because primidone and diphenylhydantoin are used extensively in the treatment of 'grand mal'; they control seizures refractory to other anticonvulsants. Primidone (Figure) anemia is not caused by malabsorption of B₁₂ or folic acid⁴, but can be alleviated by folic acid^{6,7} and occasionally by vitamin B₁₂².

Primidone, a congener of phenobarbital, has a structural resemblance to pyrimidines and to the pteridine portion of folic acid, and this suggested that its adverse effects might be due to its interference with folic acid metabolism. This paper describes a competition between primidone and folic acid in the nutrition of several microorganisms, differing in patterns of pteridine requirements. Since folic acid has multiple metabolic connections with vitamin B₁₂ in the megaloblastic anemias as well as in nutrition of protists⁸, several microorganisms with different patterns of vitamin B₁₂ requirement were also studied. The microorganisms used were: (a) *Crithidia fasciculata* (Culex strain). This trypanosomid flagellate has a folic acid requirement which may also be satisfied by unconjugated pteridines⁹. For this study *C. fasciculata* was grown in a medium containing a synthetic *Crithidia*-active 2-amino-4-hydroxy-6-(1', 2', 3'-trihydroxypropyl)-pteridine⁹. (b) *Lactobacillus casei*, ATCC 7469, the classic folic-acid requirer¹⁰, (c) *Ochromonas malhamensis*, *Euglena gracilis* and *Lactobacillus leichmannii*: representing the B₁₂-re-

quirers¹¹ and (d) *Escherichia coli* I, a thymine- or thymidine-requiring mutant (supplied by Dr. S. ZAMENHOFF). Growth of all organisms was recorded in optical density (O.D.) units. An O.D. of 1.0 equals 0.5–0.55 g of dried organism/l.

A solution of primidone (10 mg/ml) was prepared by suspending the drug in 50% ethanol and adding a few drops of 10% KOH until primidone dissolved; further dilutions were made with distilled water.

Our results showed that the folic acid requirement of *L. casei* and the B₁₂ requirement of *O. malhamensis*, *E. gracilis*, and *L. leichmannii* were not affected by primidone in concentrations up to 1.0 mg/ml, confirming observations

² R. MANNHEIMER, F. PAKESCH, E. E. REIMER, and H. VELTER, *Med. Klin.* 47, 1397 (1952).

³ K. GYDELL, *Acta haemat.* 17, 1 (1957).

⁴ C. F. HAWKINS and M. J. MEYNELL, *Quart. J. Med.* 27, 45 (1958).

⁵ J. M. FLEXNER and R. C. HARTMANN, *Amer. J. Med.* 28, 386 (1960).

⁶ W. N. CHRISTENSEN, J. E. ULTMANN, and D. M. ROSEMAN, *J. Amer. med. Assoc.* 163, 940 (1957).

⁷ L. CHANARIN, P. C. ELMES, and D. L. MOLLIN, *Brit. med. J.* 2, 80 (1958).

⁸ S. H. HUTNER, H. A. NATHAN, and H. BAKER, *Vitamins and Hormones* 17, 1 (1959).

⁹ H. A. NATHAN, S. H. HUTNER, and H. L. LEVIN, *Nature* 178, 741 (1956).

¹⁰ H. BAKER, V. HERBERT, O. FRANK, I. PASHER, S. H. HUTNER, L. R. WASSERMAN, and H. SOBOTKA, *Clin. Chem.* 5, 275 (1959).

¹¹ H. BAKER, O. FRANK, I. PASHER, and H. SOBOTKA, *Clin. Chem.* 6, 578 (1960).

with other folic acid and B₁₂ requirers⁵. Further data are therefore limited to the effect of primidone on the growth of *C. fasciculata* and *E. coli*.

C. fasciculata: Vitamin B₁₂, *p*-aminobenzoylglutamic acid, thymine, thymidine, or thymidylic acid did not overcome the inhibition; therefore these results were not tabulated. The unconjugated pteridine and folic acid annulled the growth inhibition induced by primidone; the inhibition index (concentration of inhibitor causing 50% inhibition: concentration of metabolite) was 40–110 for folic acid and 1100–11 000 for the unconjugated pteridine. While the inhibition indices for a given metabolite are not constant in this and the following instance, they give an approximate notion of the forces operating between inhibitor and metabolite (Table I).

E. coli I: This bacterium was grown in a chemically defined medium¹². Some effects of primidone on purine and pyrimidine utilization are given in Table II. The inhibition index for primidone was 200–1000 for thymine and thymidine, but 20–30 times higher (4000–30 000) for thymidylic acid. The values for the purine-pyrimidine mixture were between 3 and 12. This bears out the efficiency of the thymidylic acid in overcoming the toxic effect of primidone, and points to the location of the lesion in the phosphorylating mechanism of the deoxynucleoside

(reaction 3, Figure). Unconjugated pteridine did not affect the inhibition of growth by primidone. The results with *E. coli* are compatible with our assumption that interference with pyrimidine metabolism is mainly responsible for primidone effects in man. Primidone, because of its resemblance to the pyrimidines, could then be a direct pyrimidine antagonist.

If results with these microbes apply to man, primidone might interfere with pyrimidine, and unconjugated pteridine metabolism as well as with folic acid. The successful therapy with folic acid^{6,7} suggests primidone interferes primarily with the familiar catalysis by folic acid of pyrimidine synthesis. This could lead to impairment of nucleic acid synthesis and so produce a megaloblastic bone marrow. These biochemical lesions are shown in reaction 1 (Figure).

Evidence has accumulated that some pteridines are by-products of folic acid cleavage into unconjugated pteridine and *p*-aminobenzoylglutamic acid¹³, (reaction 2, Figure); and that some pteridines are derived from purines^{14,15}. Portions of radioactive purines have been incorporated in the pteridines of some amphibian larvae¹⁴. There is yet no direct evidence that unconjugated pteridines serve as precursors of the pteridine ring of folic acid in higher animals, although they may do so in bacteria^{15–17}. Recently it was shown that an enzymatically catalyzed condensation of 6-hydroxymethyl-2-amino-4-hydroxy-5,6-dihydropteridine with *p*-aminobenzoylglutamic acid yielded dihydrofolic acid¹⁸ (Figure). Since unconjugated pteridines can overcome primidone toxicity for *C. fasciculata*, it might be thought that unconjugated pteridines could also be convertible to dihydrofolic acid through this reaction. If two cycles (reactions 1 and 2, Figure) for dihydrofolic acid synthesis exist in man, it may explain why anemia is not always observed under prolonged primidone therapy. Anemia only becomes evident when both cycles are crippled by primidone.

These results show that primidone essentially interferes with three stages in folic acid metabolism: (a) the reduction of folic acid to dihydrofolic acid (reaction 1, Figure), (b) unconjugated pteridine metabolism (reaction 2, Figure) and (c) the phosphorylation of thymidine to thymidylic acid (reaction 3, Figure).

Résumé. Les auteurs ont étudié le mécanisme de la toxicité de la primidone (Mysoline) chez certains microorganismes. Ces recherches montrent que le métabolisme de l'acide folique est inhibé par la primidone et cela en trois étapes: (a) la réduction de l'acide folique en acide dihydrofolique, (b) le métabolisme des pteridines nonconjuguées et (c) la phosphorylation de la thymidine.

H. BAKER, O. FRANK, S. H. HUTNER,
S. AARONSON, H. ZIFFER, and H. SOBOTKA

Division of Hepatic Metabolism and Nutrition, Seton Hall College of Medicine, Jersey City; Haskins Laboratories, New York; and Department of Chemistry, Mount Sinai Hospital, New York (USA), January 10, 1962.

¹² P. R. BURKHOLDER, *Science* **114**, 459 (1951).

¹³ D. G. JOHNS, S. SPERTI, and A. S. BURGEN, *Can. med. Assoc. J.* **84**, 77 (1961).

¹⁴ A. ZIEGLER-GUNDER, S. SIMON, and A. WACKER, *Z. Naturforsch.* **11b**, 82 (1956).

¹⁵ E. VIEIRA and E. SHAW, *J. biol. Chem.* **236**, 2507 (1961).

¹⁶ G. M. BROWN, *Physiol. Rev.* **40**, 331 (1960).

¹⁷ S. AARONSON and E. RODRIGUEZ, *J. Bacteriol.* **75**, 660 (1958).

¹⁸ G. M. BROWN, R. A. WEISMAN, and D. A. MOLNAR, *J. biol. Chem.* **236**, 2534 (1961).

Tab. I. Effects of pteridine and folic acid on growth of *C. fasciculata*

Additions (μg/ml)	Primidone (mg/ml)		
	None	0.3	0.6
None	0	0	0
Folic acid	3	0.32	0.18
Folic acid	10	0.58	0.48
Folic acid	30	0.76	0.7
Folic acid	100	0.76	0.74
2-Amino-4-hydroxy-6-	0.03	0.32	0.18
(1',2',3') trihydroxypropyl	0.1	0.5	0.36
pteridine	0.3	0.62	0.58
	1.0	0.66	0.63
	3.0	0.72	0.76

Tab. II. Effect of primidone on growth of *Escherichia coli* I

Additions (μg/ml)	Primidone (mg/ml)				
	None	0.1	0.3	0.6	1.0
None	0	0	0	0	0
Thymine	1.0	0.68	0.62	0.70	0.58
Thymine	3.0	1.00	1.18	0.86	0.8
Thymine	10	1.22	1.2	1.22	0.92
Thymidine	1.5	0.42	0.5	0.52	0.38
Thymidine	3.0	0.84	0.76	0.76	0.36
Thymidine	10	1.34	1.24	1.34	1.18
Thymidylic acid*	0.03	0.42	0.4	0.38	0.24
Thymidylic acid	0.1	0.52	0.48	0.40	0.36
Thymidylic acid	0.3	1.00	0.90	0.96	0.78
Thymidylic acid	1.0	1.32	1.28	1.00	0.96
Thymidylic acid	3.0	1.40	1.42	1.20	1.0
Purine-pyrimidine mix ^b	0.4	1.58	1.46	1.30	0.66
(ml/100 ml of medium)	2.0	1.60	1.48	1.40	0.50
	10	1.58	1.54	1.40	1.30

* Added as the calcium salt.

^b Added in presence of a minimal amount of thymidine (0.4 μg/ml). This amount of thymidine overcomes the toxicity of uridine. 1 ml of purine-pyrimidine mix contains: 0.1 mg each of adenine, adenosine, guanine, guanosine, hypoxanthine, inosine, xanthine, xanthosine, cytosine, cytidine, uracil, uridine.