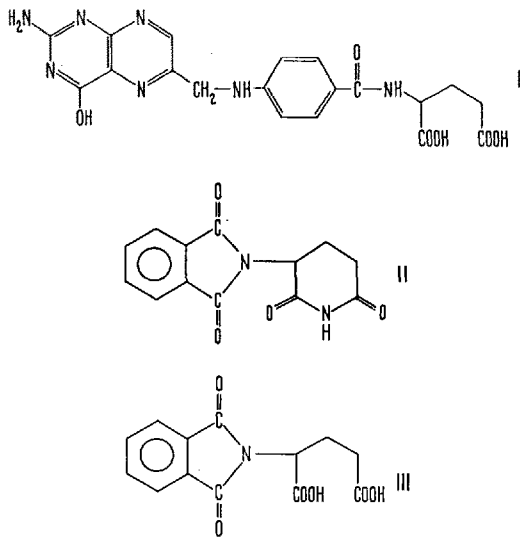


Intermolekulare Wechselwirkungen der Folsäure mit N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure. Ein Beitrag zur Frage der teratogenen Wirkung des Thalidomid

Über den Zusammenhang von Folsäuremangel mit embryonalen Missbildungen liegen bereits zahlreiche Beobachtungen vor (zusammenfassende Darstellung bei NELSON¹, siehe weiterhin²⁻⁴). Von verschiedenen Seiten wurde die Vermutung ausgesprochen, dass auch die teratogene Wirkung des Thalidomid auf einen Eingriff in den Folsäurestoffwechsel des embryonalen Organismus zurückzuführen ist⁵⁻⁸. Diese Vorstellungen liessen die Untersuchung der Frage interessant erscheinen, inwieweit Folsäure (I) mit Thalidomid (II) bzw. seinen metabolischen Abbauprodukten in eine intermolekulare Wechselwirkung zu treten vermag. Über die durch Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte des Thalidomid liegt bereits eine umfangreiche Literatur vor⁹⁻¹³. Unter den im menschlichen Organismus auftretenden Metaboliten des Thalidomid treten insbesondere N-Phthaloylglutaminsäureamide und N-Phthaloylglutaminsäure (III) auf.

In der folgenden Untersuchung wurde daher die Frage einer intermolekularen Wechselwirkung der Folsäure mit N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure untersucht.

Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Folsäure und N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure lassen sich durch Solubilisationsversuche in wasserfreiem Dioxan nachweisen (Figur 1).



Aus Figur 1 geht hervor, dass die in wasserfreiem Dioxan nur relativ schwer lösliche Folsäure (Löslichkeit $1,6 \times 10^{-5} M$) durch Zusatz von N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure solubilisiert wird. Dies lässt auf eine intermolekulare Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen schliessen. Es ergibt sich daraus eine Komplexbildungskonstante K von 5,5.

Für diese Wechselwirkung ist offenbar der N-(Aminobenzoyl)-Teil des Folsäuremoleküls verantwortlich. Dies ergibt sich aus analog durchgeführten Solubilisationsversuchen zwischen N-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure und N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure (Figur 2). Auch hier ergibt sich eine Steigerung der Löslichkeit der N-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure durch den Zusatz von N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure (Komplexbildungskonstante K = 4,5).

Was die Art der Wechselwirkungskräfte angeht, so scheinen Elektronen-Donor-Acceptor-(Charge-transfer)-

Wechselwirkungen beteiligt zu sein. Dafür spricht insbesondere der Umstand, dass Folsäure gegenüber typischen Elektronen-Akzeptoren als Elektronen-Donor auftreten kann. So lässt sich zeigen, dass Folsäure mit dem Elektronenakzeptor Tetrachlorchinon (Chloranil) einen Charge-Transfer-Komplex bildet, der sich durch eine Charge-Transfer-Bande ($\lambda_{max} = 550-560 \text{ nm}$) zu erken-

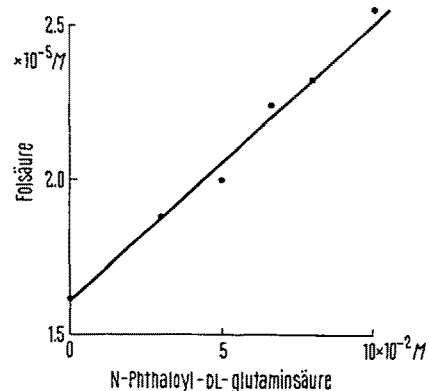


Fig. 1. Löslichkeitserhöhung der Folsäure in getrocknetem Dioxan durch N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure.

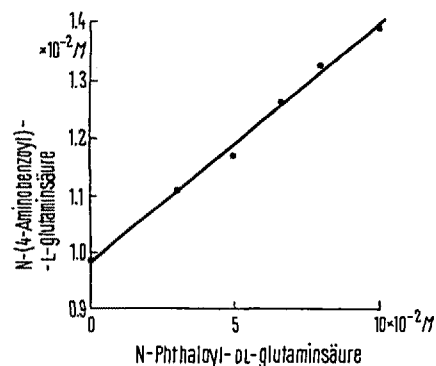


Fig. 2. Löslichkeitserhöhung der N-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure in getrocknetem Dioxan durch N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure.

¹ M. M. NELSON, Ciba Found. Symp., London 1960, p. 134.

² C. W. ASLING, Int. Z. Vitaminforsch. 34, 132 (1964).

³ B. M. HIBBARD, E. D. HIBBARD und T. N. A. JEFFCOATE, Acta obstet. gynec. scand. 44, 375 (1965).

⁴ E. D. HIBBARD und R. M. SMITHELLS, Lancet 1965, 1254.

⁵ F. KEMPER, Z. ges. exp. Med. 135, 454 (1962).

⁶ F. KEMPER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 246, 55 (1963).

⁷ C. NYSTROM, Scand. J. clin. Lab. Invest. 15, 102 (1963).

⁸ C. NYSTROM, 3rd Int. Congr. Chemotherapy, Proc., Stuttgart 1963, p. 372.

⁹ J. W. FAIGLE, H. KEBERLE, W. RIESS und K. SCHMIED, Experientia 18, 389 (1962).

¹⁰ R. BECKMANN, Arzneimittel-Forsch. 13, 185 (1963).

¹¹ S. FABRO, H. SCHUHMACHER, R. L. SMITH und R. T. WILLIAMS, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 39, 1921 (1963).

¹² H. SCHUHMACHER, R. L. SMITH und R. T. WILLIAMS, Br. J. Pharmac. 25, 324 (1965).

¹³ M. FIEDLER und W. HEINE, Acta biol. med. german. 13, 1 (1964).

nen gibt (Figur 3). Eine ganz analoge Charge-Transfer-Bande lässt sich auch durch eine Wechselwirkung von 5, 6, 7, 8-Tetrahydrofolsäure mit Chloranil beobachten. Im Falle der N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure würde die Phthalimidstruktur als Akzeptor anzunehmen sein.

Diese Befunde lassen es möglich erscheinen, dass die teratogene Wirkung des Thalidomid auf eine Wechselwirkung der als Metabolit auftretenden N-Phthaloyl-glutaminsäure (bzw. ihrer Amide) mit Folsäure oder Tetrahydrofolsäure zurückzuführen ist.

Experimentelle Angaben. 1. Solubilisationsversuche. Ein Überschuss von Folsäure (40 mg; für biochemische

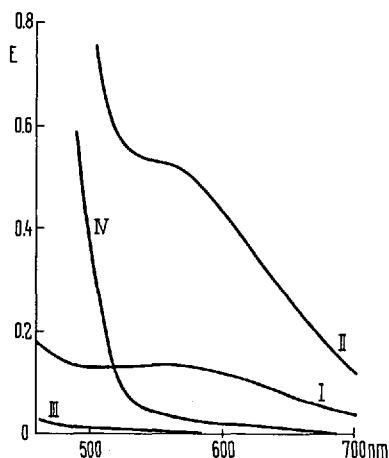


Fig. 3. Charge-Transfer-Banden der Komplexe Folsäure-Chloranil (I) und Tetrahydrofolsäure-Chloranil (II). Kurve III: Extinktion der Folsäure. Kurve IV: Extinktion der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure. Konzentration an Folsäure bzw. Tetrahydrofolsäure in allen Fällen $5,0 \times 10^{-3} M$. Konzentration an Chloranil $5,0 \times 10^{-2} M$. Lösungsmittel: N,N-Dimethylformamid.

Zwecke, Merck) wurde mit 0; 3; 5; 6,66; 8 und $10 \times 10^{-2} M$ Lösungen von N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure in getrocknetem Dioxan (Merck) 3 h bei $20^\circ C (\pm 0,1^\circ)$ geschüttelt. Die ersten 5 ml des Filtrats wurden verworfen. In 10 ml des Filtrats wurde in einem 25-ml-Kölbchen die Folsäuremenge nach Spaltung, Diazotierung und Kupplung der entstandenen N-(4-Aminobenzoyl)-glutaminsäure photometrisch bei 550 nm bestimmt¹⁴.

Im Falle der Solubilisierung der N-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure wurde unter Verwendung von 300 mg N-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure in gleicher Weise verfahren. 2 ml einer Verdünnung des Filtrats (5:1000) werden in einem 25-ml-Kolben diazotiert, gekuppelt¹⁵ und die Extinktion nach 10 min bei 550 nm bestimmt.

2. Charge-Transfer-Bande. Die Charge-Transfer-Banden von Folsäure bzw. Tetrahydrofolsäure mit Chloranil wurden in der Weise erhalten, dass gleiche Teile von Lösungen der Folsäure bzw. Tetrahydrofolsäure ($1 \times 10^{-2} M$) und Chloranil ($1 \times 10^{-1} M$) in N,N-Dimethylformamid 30 bis 60 min nach der Mischung gemessen wurden. Als Referenz diente eine gleichkonzentrierte Chloranil-Lösung.

Summary. With the addition of N-phthaloyl-DL-glutamic acid, a metabolite of thalidomide, the solubility of folic acid rises owing to greater complexity. These results could explain the teratogenic effect of thalidomide.

TH. ECKERT und N. W. DÖRR

Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität, Hittorfstrasse 58-62, D-44 Münster (Deutschland), 24. November 1970.

¹⁴ S. S. SCHIAFFINO, J. M. WEBB, H. W. LOY und O. L. KLINE, *J. Am. pharmac. Ass.* 48, 236 (1959).

¹⁵ A. C. BRATTON und E. K. MARSHALL, *J. biol. Chem.* 128, 537 (1939).

Chronic Ingestion of Rubidium without Toxicity: Implications for Human Therapy

Rubidium¹ has been found to alter the EEG and behavior of monkeys². On the basis of these and other observations, as well as analogous effects with lithium, it has been suggested that rubidium might have therapeutic application in the affective disorders of humans. Since such an application might require long-term ingestion of rubidium, it was imperative to determine the effect on animals of chronic rubidium ingestion. There are several reports³⁻⁹ indicating that repeated administration of rubidium to animals frequently ends in convulsions and death. The observations reported in this paper demonstrate the conditions under which rats can be maintained for at least 3 generations while chronically ingesting rubidium via the drinking water without deleterious effects on health.

Materials and methods. Sprague-Dawley rats, fed a normal Teklad chow, were given as their only source of drinking water a solution containing 10 mmoles each of RbCl and KCl per l of distilled water (group Rb + K). A control group was similarly supplied with a drinking water containing 20 mmoles per l of KCl (group K + K). Both groups were started on this water immediately after weaning. The drinking water was kept constant in composition for 3 generations, except as noted below.

Some animals from each group were retained for breeding. The resulting progeny were bred and became

in turn the source of a 3rd generation. All of the following data refer to the 3rd generation. Some of the 3rd generation were supplied with normal drinking water after weaning; the remainder were continued on the (Rb + K) or (K + K) water. Some of the (Rb + K) animals were killed and several of their organs assayed for Rb by atomic absorption spectrophotometry¹⁰ and for Na and K by flame photometry. A colony of rats raised under normal breeding conditions in the same facilities, approximately during the same time span, provided comparable breeding data.

Results. There were no statistically significant differences among the three groups, either with respect to weight of the litters at weaning, deaths prior to weaning, or the percentage of deaths that occurred within the year following weaning (Table I). When the (Rb + K) group was divided into 2 subgroups, 1 ($N = 20$) maintained on the normal water after weaning, and another ($N = 72$) maintained on the (Rb + K) water, it was found that the subgroups did not differ in mortality rates during the year following weaning.

Of the 5 organs examined for monovalent cation content (Table II) the liver showed the greatest, and the brain showed the least capacity to accumulate Rb. The ratio, Rb:K, averaged 0.32 for liver, 0.16 for kidney, 0.10 for lung, 0.08 for heart and 0.03 for brain.