

Prom. Nr. 3467

Über die Umwandlung des Vitamin E im Tierkörper

Von der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte

PROMOTIONSARBEIT

vorgelegt von

EMIL FÜRER

dipl. Naturwissenschaftler ETH
von Waldkirch (Kt. St. Gallen)

Referent: Herr Prof. Dr. C. Martius

Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Eschenmoser

Juris-Verlag Zürich
1963

Leer - Vide - Empty

**Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**

Leer - Vide - Empty

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. C. Martius,

**bin ich für seine grosszügige Hilfe und das mir entgegen-
gebrachte Wohlwollen zu grossem Dank verpflichtet.**

Leer - Vide - Empty

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	9
THEORETISCHER TEIL	
I. Synthesen der radioaktiven Substanzen	10
A. Allgemeines	10
B. 3,4- ³ H (bzw. ¹⁴ C)-dl- α -Tokopherol	10
C. (2-Methyl), 1', 3', 4', 7', 8', 11', 12'- ³ H-dl- α -Tokopherol	11
D. ³ H-Polyisoprenalkohole	11
E. ³ H-2, 5, 7, 8, -Tetramethyl-2-(β -carboxy-äthyl)- acetoxychroman und ³ H-Tokopheronolacton	12
F. ³ H-2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-carboxyl-6-oxychroman	13
II. Biochemische Umsetzungen	14
A. Versuche mit ³ H-Trimethyl-geranyl-geranyl-1,4-benzo- chinon an Kaninchen	14
B. Versuche mit ³ H-dl- α -Tokopherol an Hühnern	16
C. Versuche mit ³ H-Tokopheronolacton und verwandten Derivaten	21
D. Ueber die Struktur der Umwandlungsprodukte des α -Tokopherols	26
E. Ueber die Umwandlung des E ₂ (20) und E ₂ (25) im Huhn	28
F. Zur Bildung von E ₂ (50)	30
G. Versuche mit verschieden markiertem α -Tokopherol	32
H. Versuche mit d- ¹⁴ C- α -Tokopherol	42
I. Versuche mit Tritium-markiertem E ₂ (50)	44
EXPERIMENTELLER TEIL	45
I. Synthesen	45
II. Biochemische Methoden und analytische Hilfsmittel	50

Tiermaterial	50
Applikation, Aufarbeitung und Extraktion der Organe	51
Analytische Methoden und Hilfsmittel	52
Dünnschichtchromatogramm	53
Papierchromatogramme	54
ZUSAMMENFASSUNG	55
LITERATURVERZEICHNIS	56

EINLEITUNG

Das Vitamin E wurde zu Beginn der zwanziger Jahre durch Evans und Bishop [1] und Mattill und Conklin [2] entdeckt. Anlass zu dieser Entdeckung gaben Fütterungsversuche mit einer Kost, welche die Vitamine A, B und D, sowie alle unentbehrlichen Nährstoffe in ausreichender Menge enthielt, die aber trotzdem bei Ratten zu einer teilweisen Unfruchtbarkeit in der ersten und zur vollständigen Unfruchtbarkeit in der zweiten Generation führten. Auf Grund der Bedeutung dieses neuen Vitamins für die Fortpflanzung, erhielt es den Namen Tokopherol, der sich aus dem griechischen "tokos" (= Geburt) und dem Verb "pherein" (= bringen) zusammensetzt. Die Endung -ol deutet auf den Phenolcharakter der Substanz hin (vgl. Lit. [3]).

Reindarstellung, Strukturaufklärung und Synthese des Vitamin E wurden von Evans und Emerson, Fernholz, Karrer und Todd durchgeführt [4], [5], [6] und [7].

Bei der Erforschung der physiologischen Bedeutung des Vitamin E, stiess man auf eine grosse Anzahl von Mangelkrankheiten, die künstlich hervorgerufen werden können. Aber bis heute ist es nicht gelungen, die Ursache dieser Vitamin-E-Mangelsymptome auf die Störung bestimmter, biochemischer Reaktionen, an denen das Vitamin E in irgend einer Form beteiligt ist, zurückzuführen.

Es scheint, dass dem Vitamin E in verschiedenen biochemischen Reaktionsabläufen eine Rolle zukommt. Als Antioxydans hat es für den Schutz leicht oxydabler Verbindungen im Organismus sicher seine Bedeutung. Wichtiger allerdings scheint seine Beteiligung in irgend einer Form an der Zellatmung zu sein. Die leichte Oxydierbarkeit zu Chinonen und deren strukturelle Aehnlichkeit mit den K-Vitaminen und den Ubichinonen stützen diese Annahme. Verschiedene Autoren berichten von Befunden, die eine Beteiligung des Vitamin E an den Oxydationsprozessen in der Zelle vermuten lassen und sogar den Wirkungsort in der Aftmungskette zu lokalisieren scheinen [8], [9], [10], [11].

Die vorliegende Arbeit wurde im Anschluss an die Dissertation von J. Gosteli [12] ausgeführt. Mit Hilfe Isotopenmarkierter Tokophole soll der Metabolismus des Vitamin E untersucht werden, um mit dessen Kenntnis Aussagen über die biochemischen Funktionen des Vitamins zu machen. Die Untersuchungen beschränkten sich nicht nur auf das α -Tokopherol, sondern sie wurden auf eine Reihe von bekannten und hypothetischen Abbau-Produkten des Vitamin E ausgedehnt. Besonders eingehende Untersuchungen galten dem Stoffwechsel verschieden substituierter Trimethylbenzochinone.

THEORETISCHER TEIL

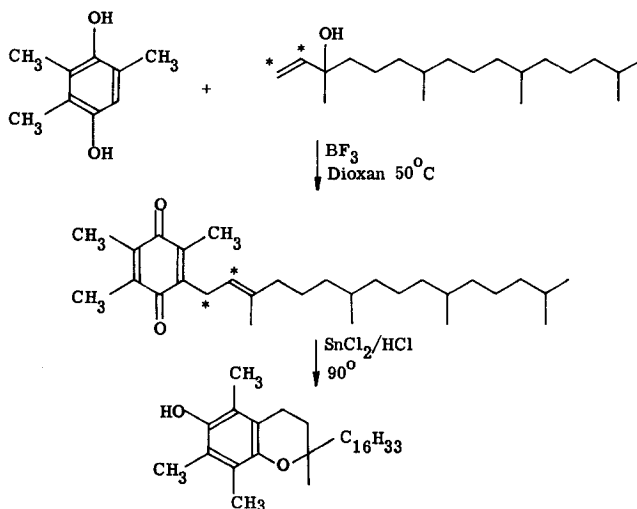
I. Synthesen der radioaktiven Substanzen

A. Allgemeines

Die Synthesen wurden im allgemeinen nach bekannten Vorschriften durchgeführt, die lediglich kleinere Modifikationen für Mikromengen oder für die Einführung der Isotopen erforderlich machten.

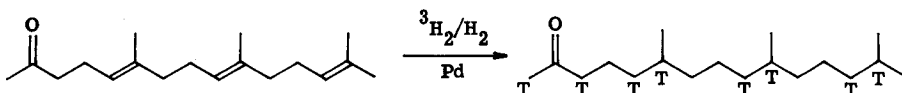
B. 3,4-³H (bzw. ¹⁴C)-dl- α -Tokopherol

3,4-³H-dl- α -Tokopherol wurde dargestellt durch Kondensation mittels BF₃-Aetherat von ³H-, bzw. ¹⁴C-Isophytol mit Trimethyl-hydrochinon nach Vorschriften von Isler und Billeter [13], [14], [15] zu Trimethylphytylbenzochinon, das sich sehr leicht reinigen lässt durch Chromatographie an Alox (II, sauer). Durch saure Reduktion mit Zinn-II-chlorid bei 90°C erhält man dl- α -Tokopherol.



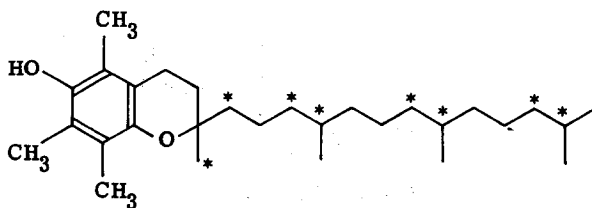
C. (2-Methyl), 1', 3', 4', 7', 8', 11', 12'-³H-dl- α -Tokopherol

(2-Methyl)-1', 3', 4', 7', 8', 11', 12'-³H-dl- α -Tokopherol wurde ausgehend von Farnesylaceton hergestellt, das mittels eines Palladiumkatalysators mit einem ³H₂/H₂-Gemisch zur perhydro-Verbindung tritiiert wurde.



Bei der Hydrierung des Farnesylacetons wurden nicht nur die Stellen 5, 6, 9, 10, 11 und 12 markiert sondern auch die Positionen 1 und 3, die etwa 15 - 25 % der Gesamt-³H-menge enthielten. Perhydro-Farnesylaceton liess sich ohne weiteres recht hoch markieren durch Behandeln mit einem Pd/Kat in einem ³H₂/H₂-Gemisch.

Aus diesem triierten Perhydrofarnesylaceton gelangte man mit einer Acetylen-synthese zum Dehydroisophytol, das mit Lindlarkatalysator zu Isophytol partiell hydriert wurde. Die Kondensation mit Trimethylhydrochinon ergab, wieder in der üblichen Weise durchgeführt, Trimethylphytylchinon und schliesslich dl- α -Tokopherol. In der untenstehenden Formel sind die Positionen mit Tritium mit einem Sternchen bezeichnet:

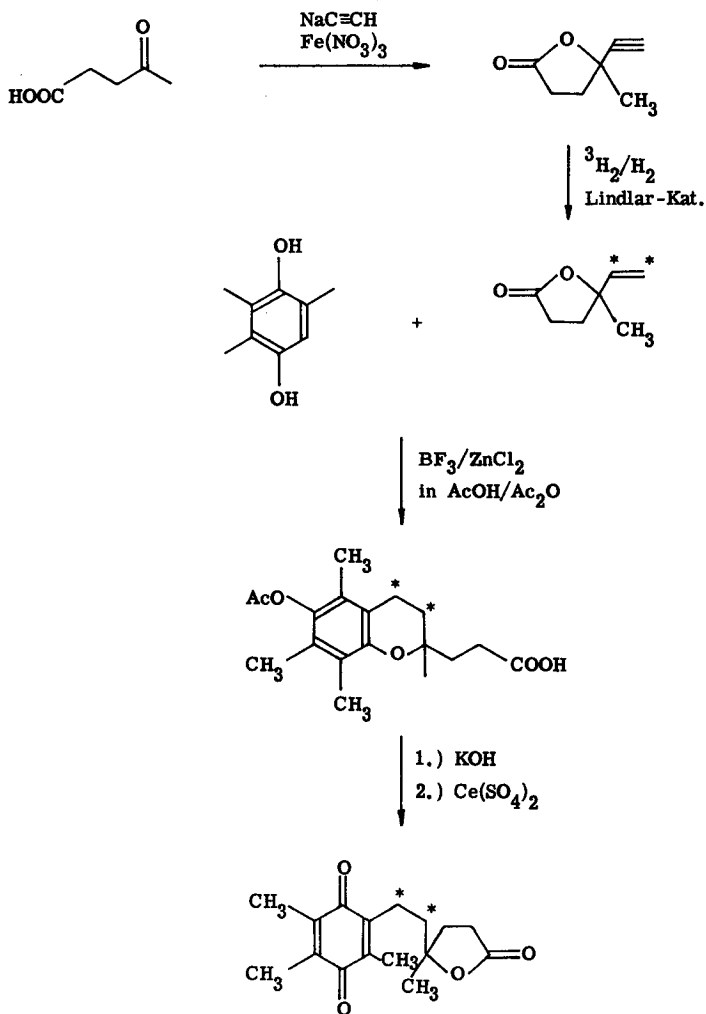


D. ³H-Polyisoprenalkohole

Die Synthese für Polyisoprenalkohole nach Ruzicka [16] war für uns ausgezeichnet geeignet, da sich das Tritium immer in der letzten Stufe einführen lässt: durch Partialhydrierung der Dreifachbindung mittels des Lindlarkatalysators [17], [18].

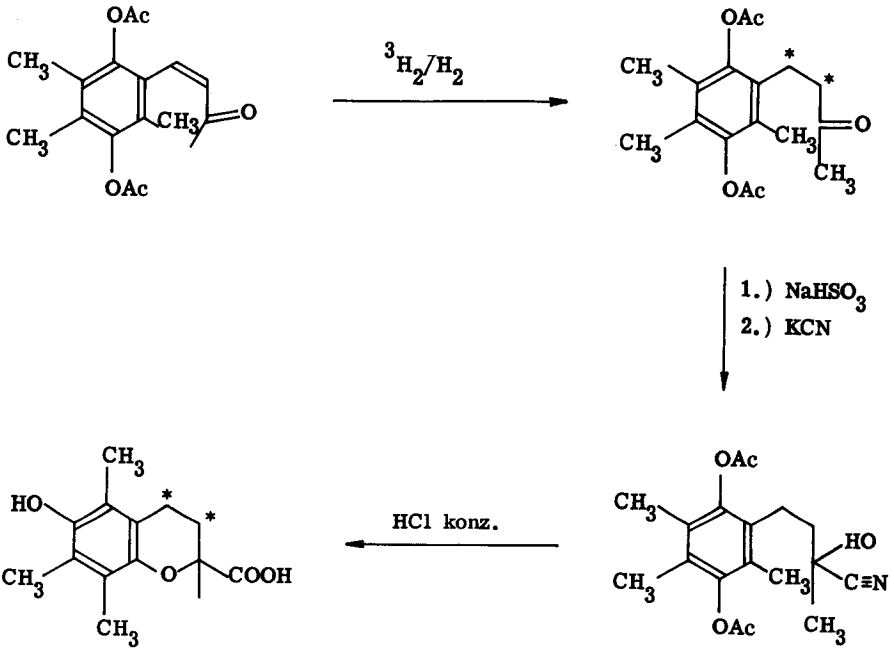
E. ³H-2,5,7,8-Tetramethyl-2-(β-carboxy-äthyl)-acetoxychroman und ³H-Tokopheronolacton

³H-2,5,7,8-Tetramethyl-2-(β-carboxy-äthyl)-acetoxychroman und ³H-Tokopheronolacton wurden nach dem Schema von Weichert et al. [19] synthetisiert:



F. ³H-2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-carboxyl-6-oxychroman

³H-2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-carboxyl-6-oxychroman wurde ausgehend von 2, 4, 5-Trimethyl-3, 6-diacetoxy-benzylidenaceton durch Tritierung der Doppelbindung, Ueberführung ins Cyanhydrin und anschliessende saure Hydrolyse erhalten. Dieser Weg lieferte jedoch nur bescheidene Ausbeuten.



II. Biochemische Umsetzungen

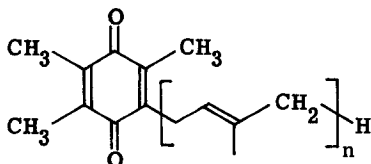
A. Versuche mit ^3H -Trimethyl-geranyl-geranyl-1,4-benzochinon¹⁾ an Kaninchen

Auf Grund von Versuchen in der Vitamin K-Reihe, die eine Umwandlung von Vitamin K_1 , mit der Phytylseitenkette, in Vitamin $\text{K}_{2(20)}$ mit der Geranylgeranylseitenkette ergaben [15] war es naheliegend Versuche mit einem α -Tokopherol mit ungesättigter Seitenkette, dem 5,7,8-Trimethyltocotrien (3',7',11')-ol auszuführen. Es zeigte sich aber sehr bald, dass diese Substanz nicht ohne weiteres synthetisiert werden konnte, weshalb die Versuche mit tritiummarkiertem $\text{E}_{2(20)}$ ¹⁾, das einem Oxydationsprodukt des α -Tokotrienols entspricht und strukturell dem Vitamin $\text{K}_{2(20)}$ sehr nahe verwandt ist, ausgeführt wurden. Für die Versuche wurden Hasenkaninchen verwendet, die kurz nach der Entwöhnung, die Vitamin E-freie Kost nach Göetsch und Pappenheimer bekamen [20]. Die dadurch verursachte Muskeldystrophie wurde durch Messung des ausgeschiedenen Kreatins im Harn verfolgt. In den wenigen, mit $\text{E}_{2(20)}$ unternommenen Versuchen konnte eine deutliche, präventive wie kurative Wirkung auf die Muskeldystrophie beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Umwandlung des $\text{E}_{2(20)}$ im Kaninchen bekamen Vitamin-E-freie Tiere, mit weit fortgeschrittener Muskeldystrophie, 3 - 5 mg $\text{E}_{2(20)}$ oral verabreicht und wurden 24 Std. später geschlachtet. Die Lipidextrakte von Herz, Leber, Skelettmuskulatur, Nieren und Blut wurden mit Hilfe der Gegenstromverteilung untersucht.

Das Resultat dieser Versuche zeigen die Verteilungsdiagramme, die in Abb. 1a-e wiedergegeben sind und die in allen Organen eine deutliche Umwandlung des in Stellung 1', 2' der Seitenkette markierten $\text{E}_{2(20)}$ in ein stärker lipophiles Produkt mit dem Verteilungsmaximum auf Stufen 29/30 erkennen lassen. Da weder ein Einfluss von LiAlH_4 noch von kochender Natronlauge auf dieses Umwandlungsprodukt festgestellt

- 1) Zur Benennung der Trimethylchinone mit ungesättigter, isoprenoider Seitenkette, von verschiedener Länge werden analog der Vitamin K_2 -Reihe folgende Abkürzungen gebraucht:



- Für $n = 1$: $\text{E}_2(5)$
 " $n = 2$: $\text{E}_2(10)$
 " $n = 9$: $\text{E}_2(45)$
 " $n = 10$: $\text{E}_2(50)$

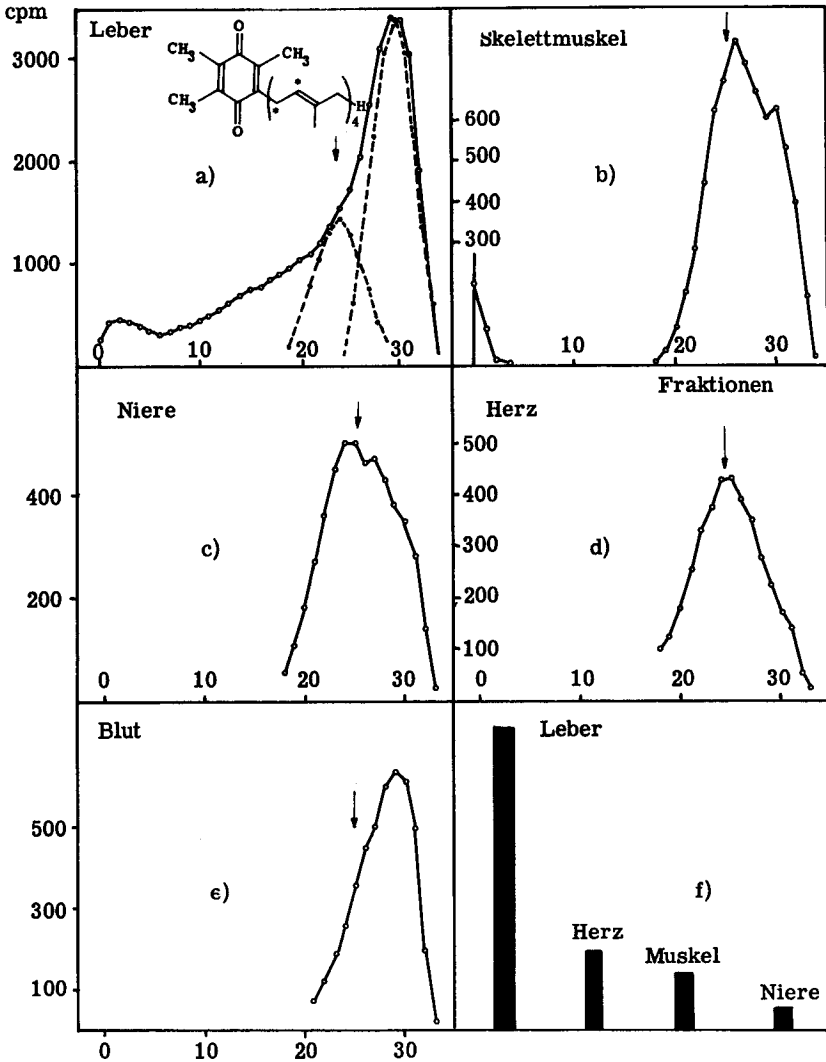


Abb. 1a-e Verteilungsdiagramme der Organextrakte eines Kaninchens das tritiummarkiertes $\text{E}_2(20)$ per os bekommen hatte. Mit Pfeilen ist die Lage der Spitzenfraktionen der Ausgangssubstanz angedeutet. Die Spitzenfraktion des Umwandlungsproduktes liegt auf den Stufen 29 - 30. In Abb. 1a sind die theoretischen Kurven (----) der Ausgangssubstanz und des Umwandlungsproduktes angegeben.

Abb. 1f Relative Menge an Umwandlungsprodukt pro Gramm Trockengewicht der Organe.

wurde, kann es sich nicht um einen Ester handeln. Versuche mit im Chinonkern markiertem $E_{2(20)}$ zeigten dieselben Resultate, was eine Abspaltung der Geranylgeranyl-Seitenkette vom Chinonkern ausschloss. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Umwandlung um eine Verlängerung der Seitenkette des $E_{2(20)}$ um vier oder fünf Isopreneinheiten. Eine nähere Beschreibung dieses Vorganges erfolgt im Kapitel E (S. 28) die auch den Zusammenhang mit der Umwandlung des α -Tokopherols beleuchten soll.

Bei der Analyse des Harns wurde nach saurer Hydrolyse ein Ausscheidungsprodukt gefunden, das sich ganz analog dem von Simon und Milhorat gefundenen Metaboliten des α -Tokopherols verhält [21] und mit diesem wahrscheinlich identisch ist.

B. Versuche mit $^3\text{H-dl-}\alpha$ -Tokopherol an Hühnern

Besonders wichtig für Stoffwechseluntersuchungen ist die Wahl des Versuchstieres. Bei Ratten, die auch gegen Vitamin E-Mangel nicht besonders empfindlich sind, laufen Umwandlungsreaktionen des α -Tokopherols äusserst langsam ab. Dasselbe konnte auch bei Kaninchen beobachtet werden, die zwar bedeutend stärker und mit viel bedrohlicheren Ausfallserscheinungen als die Ratten auf Vitamin E-Mangel reagieren. Am geeignetsten für unsere Versuche erwiesen sich Hühner, die auf der von Dam [22] angegebenen lebertranreichen Diät gehalten worden waren.

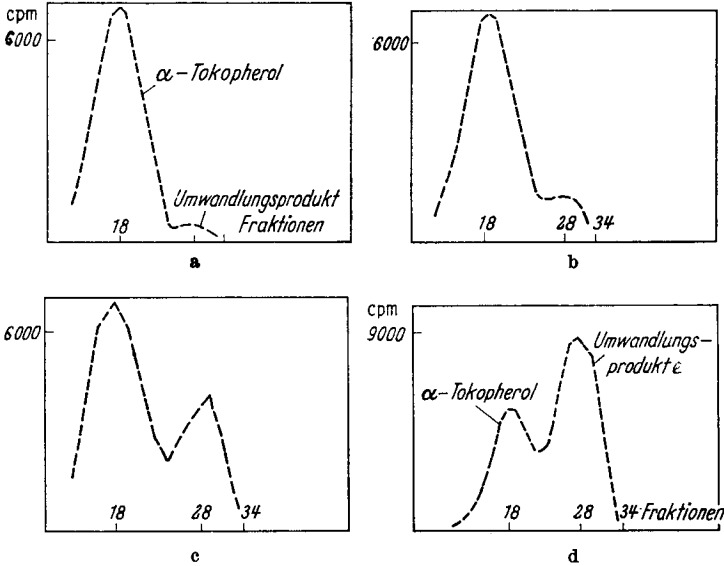


Abb. 2a-d Craig-Verteilungsdiagramme (35 Stufen, Methylglykol/Heptan) von Hühnerleberextrakten nach Verfütterung von ^3H -Tokopherol.
a) nach 24 Std. c) nach 7 Tagen
b) nach 3 Tagen d) nach 14 Tagen

Die Abb. 2a-d geben den zeitlichen Ablauf der Umwandlung des Tokopherols im Huhn wieder. Mehreren Hühnern wurde je 1 mg Tritium-markiertes α -Tokopherol oral verabreicht und der Gehalt der Leber an Ausgangsstoff und Endprodukt mittels Craig-Verteilung eines Aetherextraktes nach verschiedener Zeit untersucht. Während nach einem Tag sich erst sehr wenig Umwandlungsprodukt gebildet hat und auch nach drei Tagen das markierte Tokopherol noch stark überwog, so war nach ein bis zwei Wochen das Tokopherol etwa zur Hälfte umgewandelt worden. Offenbar ist der Tokopherolbedarf schon beim jungen Huhn ziemlich gross und wird jedenfalls durch die besondere Diät noch erhöht. Die Umwandlung des α -Tokopherols wird jedoch nur unwesentlich vom Gehalt der Diät an ungesättigten Fettsäuren beeinflusst, wie spätere Versuche zeigten, in denen an Stelle des Lebertrans, der reich an ungesättigten Fettsäuren ist ein völlig gehärtetes Fett verwendet wurde ^{*)}.

*) Aus Gründen der Kürze wird im Folgenden die lebertranreiche Diät nach Dam (siehe Seite 50) als Diät A und die gleiche Diät, die aber an Stelle des Lebertrans ein gehärtetes Fett enthält als Diät B bezeichnet.

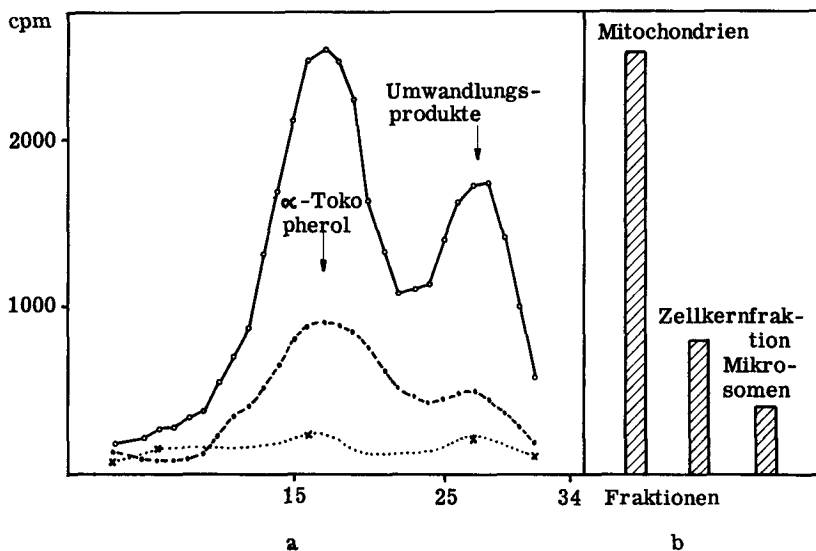


Abb. 3a Verteilungsdiagramme der Lipidextrakte der Zellfraktionen der Leber eines Huhnes, das $3,4\text{-}^3\text{H}\text{-dl-}\alpha$ -Tokopherol per os bekommen hatte. $\circ\text{---}\circ$ Mitochondrien, $\text{---}\text{---}$ Zellkernfraktion, $\times\text{---}\text{---}\times$ Mikrosomen.

Abb. 3b Verteilung der Umwandlungsprodukte in den Zellfraktionen pro Gramm Trockengewicht.

Ueber den Gehalt der Leberzellfraktionen an Ausgangs- und Umwandlungsprodukten gibt Abb. 3a und b Auskunft. Wie die Verteilungsdiagramme des Mitochondrien-, Zellkern- und des Mikrosomenextraktes zeigen, ist die Hauptmenge an Tokopherol und Umwandlungsprodukt in den Mitochondrien lokalisiert.

Die Frage nach der Struktur der Umwandlungsprodukte ist in späteren Kapiteln eingehend beschrieben, jedoch sei hier schon bemerkt, dass die Umwandlung des α -Tokopherols bedeutend komplexer sein muss als die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Umwandlung des $\text{E}_2(20)$. Während dort in allen Organen dasselbe Umwandlungsprodukt zu finden war, so ist dies beim Vitamin E in keiner Weise der Fall. Wie das Verteilungsdiagramm des Skelettmuskelextraktes (Abb. 4) zeigt, liegt hier das Verteilungsmaximum des Umwandlungsproduktes nicht auf Stufe 28/29, sondern auf Stufe 23, was die Verschiedenheit der Umwandlungsprodukte in Leber und Muskel klar zeigt.

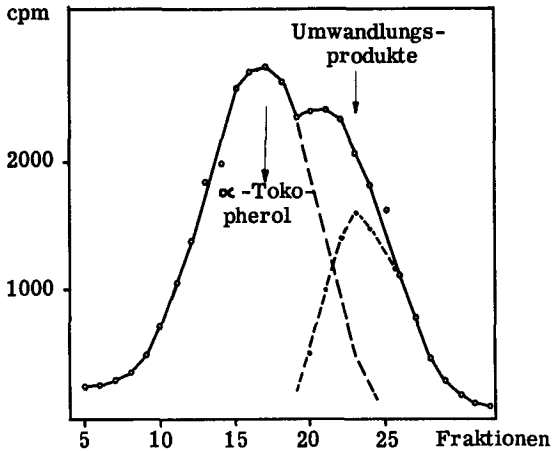


Abb. 4 Verteilungsdiagramm eines Skelettmuskelextraktes eines Hühnchens, das $3,4\text{-}^3\text{H-dl-}\alpha\text{-Tokopherol}$ i. v. injiziert erhalten hat. o—o gemessene Kurve der Radioaktivität, ----- Differenzkurve (berechnet), 34 Stufen, System Methylglycol/Heptan.

Ein interessantes Umwandlungsprodukt des $\alpha\text{-Tokopherols}$, das sich sehr rasch bildet, konnte im Blut von Hühnern gefunden werden. Schon zwei Stunden nach der oralen Verabreichung von $3,4\text{-}^3\text{H-dl-}\alpha\text{-Tokopherol}$ ist beinahe sämtliche Radioaktivität in einem Umwandlungsprodukt mit Verteilungsmaximum auf Stufe 25 zu finden, was in Abb. 5a dargestellt ist. Die folgenden Verteilungsdiagramme [Abb. 5b - d] zeigen, dass nach 20 Stunden neben dem lipophilen noch hydrophilere Umwandlungsprodukte mit den Maximumfraktionen auf Stufen 13 und 15 auftreten, während nach 14 Tagen nur noch wenig vom lipophileren Umwandlungsprodukt zu finden war. Die Bedeutung dieser Umwandlung ist noch unklar. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Oxydation des $\alpha\text{-Tokopherols}$. Nach reduktiver Acetylierung dieses Umwandlungsproduktes verschiebt sich das Radioaktivitätsmaximum in der Gegenstromverteilung nach der linken, hydrophileren Seite, was charakteristisch für Chinone ist, Abb.[6] während sich bei der Acetylierung von Phenolen, Chromanolen, Alkoholen oder Hydrochinonen eine Verschiebung des Substanzmaximums nach rechts, also nach der lipophileren Seite, ergibt. Sicher handelt es sich hier weder um das Tokopherylchinon, noch um das Trimethylphytylchinon. Hingegen besteht eine sehr grosse Aehnlichkeit mit dem von Martius und Eilingsfeld [23]

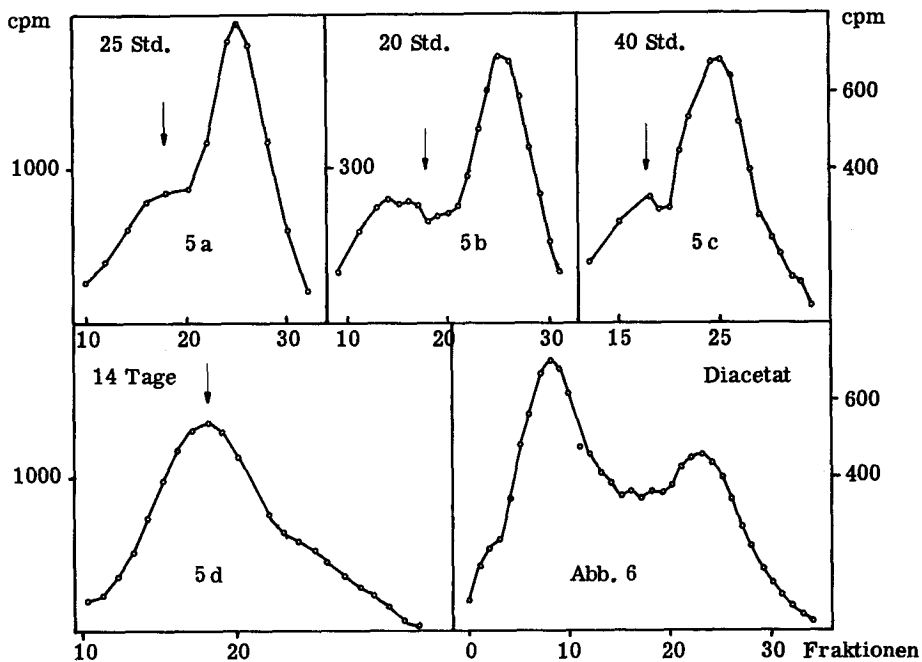


Abb. 5a-d Verteilungsdiagramme der Lipidextrakte des Blutes eines Hahnes, der 3,4-³H-Tokopherol per os erhalten hatte und dem je 1 Milliliter Blut nach 2, 20 und 40 Stunden aus der Flügelvene entnommen wurde. Nach 14 Tagen wurde das Tier geschlachtet. Der Pfeil gibt die Lage der Spitzenfraktionen von α -Tokopherol an.

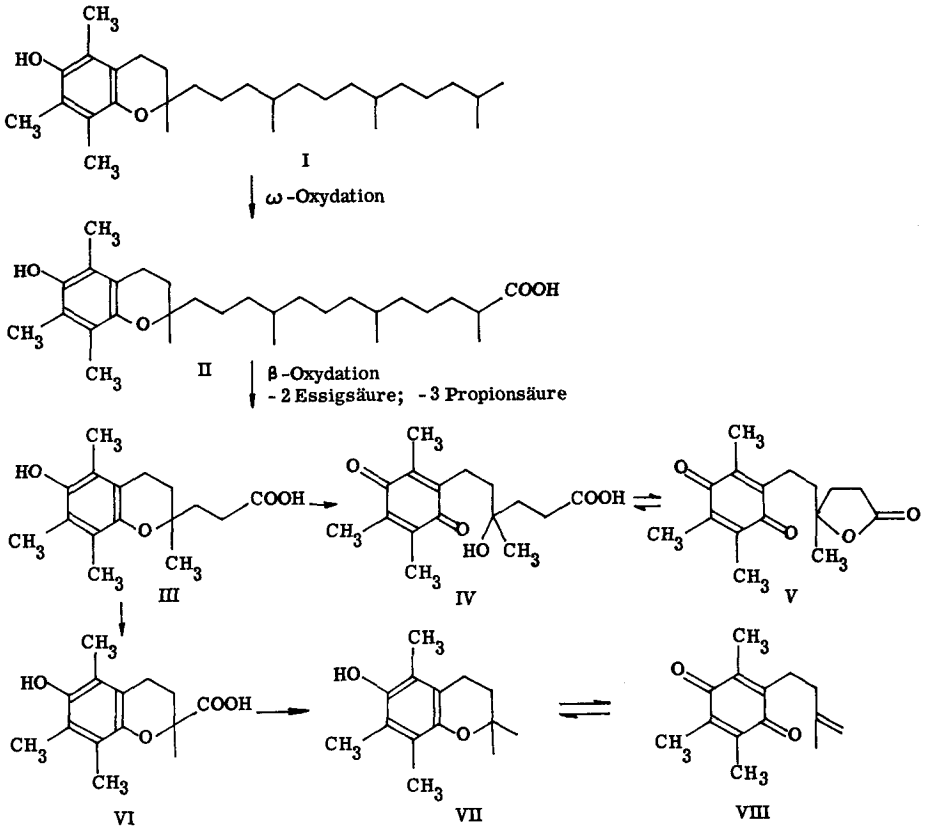
Abb. 6 Fraktionen 22 - 30 aus Abb. 1a nach reduktiver Acetylierung.

beschriebenen Tokopheroxyd und der im Formelschema IV mit Oxydationsprodukt III bezeichneten Substanz.

C. Versuche mit ^3H -Tokopheronolacton und verwandten Derivaten

Die ersten Stoffwechseluntersuchungen mit radioaktiv markiertem Vitamin E sind von Milhorat [21] unternommen worden und führten zur Isolierung eines im Harn von Kaninchen ausgeschiedenen Abbauproduktes, des α -Tokopherols. Formelschema 1 zeigt den Abbauweg des α -Tokopherols, der durch ω -Oxydation zu II, durch fünfmalige β -Oxydation zur Chromanolsäure III und schliesslich zu den im Harn gefundenen Ausscheidungsprodukten IV und V führt [vgl. 24 und 25]. Die Produkte VI, VII und VIII sind hypothetische Zwischenprodukte, die wahrscheinlich zur gleichen Reaktionskette gehören (siehe nächste Kapitel).

Abbau des Tokopherols



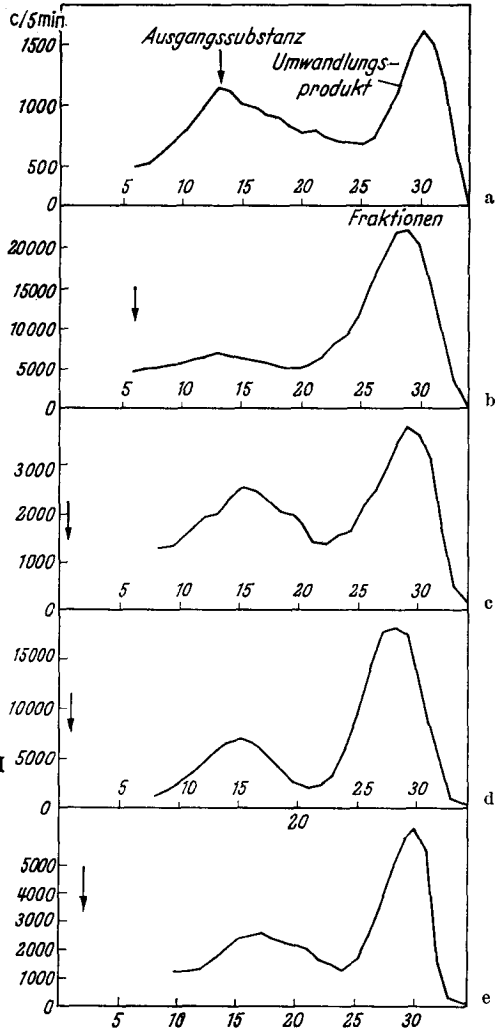
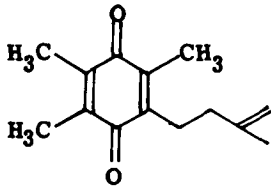


Abb. 7a-e Craig-Verteilungsdiagramme von Hühnerleberextrakten nach Verfütterung der links aufgeführten ^3H -markierten Substanzen. Die Lage der Maximumfraktion der Ausgangssubstanzen ist mit einem Pfeil bezeichnet, die Maxima rechts entsprechen dem $\text{E}_2(50)$, die Maxima bei Fraktion 14-16 in Abb. 7b-e stammen von einem noch nicht identifizierten Zwischenprodukt.

Die stark veränderte Struktur der Produkte IV und V liess eine Vitamin E-Wirksamkeit von vornherein als unwahrscheinlich erscheinen. Allerdings muss man bei der Frage nach dem Mechanismus der Vitamin E-Wirkung vorsichtig sein, da dem Vitamin E mehrere Funktionen zukommen können und es in mehreren Wirkformen auftreten kann, so dass man bei den verschiedenen Tests der Vitamin E-Wirksamkeit darüber im Unklaren ist, welche Funktion und Wirkform gemessen wird. Ebenso spielt natürlich auch die Absorption, Ausscheidung und Assimilation beim Test in vivo eine grosse Rolle.

Den Anstoss zu Versuchen mit einer Reihe von radioaktiv markierten Abbauprodukten des Vitamin E [Formelschema I, III, V, VI, VII, VIII] gaben die Arbeiten von Green [26] der einen starken Einfluss von α -Tokopherol und besonders der Verbindungen IV und V auf die Ubichinonkonzentration im Herzen feststellte.

Eine Auswahl aus den Ergebnissen dieser sowie einiger anschliessender Versuche ist in Abb. 7a-e dargestellt. Sie zeigen Verteilungsdiagramme von Lipidextrakten der Lebern von Hühnern, denen je 1 mg der in der linken Spalte angegebenen Substanzen per os gegeben worden war und die 24 Stunden später geschlachtet wurden. Die Pfeile bezeichnen die Positionen der Ausgangssubstanzen. Die in den Kurven 7b-e in der Mitte bemerkbaren Maxima gehören zu Umwandlungsprodukten, deren Struktur noch nicht abgeklärt ist. Es könnte sich um Chromanole handeln, was durch das Verhalten der Derivate wahrscheinlich gemacht werden konnte. Entsprechend der Lage, des Maximums in der Gegenstromverteilung könnte es sich um ein Tokopherol mit der dreifach ungesättigten isoprenoiden Seitenketten, dem von Green isolierten 5,7,8-Trimethyl-tokotrien-(3',7',11')-ol, handeln [27, 28].

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von Schwarz [29] von Interesse, welcher die zehnfache Wirkung des Tokotrienols gegenüber dem α -Tokopherol in der Verhütung des "Respiratory-Decline" von Leberschnitten fand. Auch die Simon-Milhorat-Metaboliten des α -Tokopherols zeigten eine recht beachtliche Wirkung, die vielleicht mit einer Umwandlung in das Tokotrienol erklärt werden könnte.

Versuche mit der Chromanolsäure III des Formelschemas 1 zeigen tatsächlich, dass eine Umwandlung in das präsumptive Tokotrienol sehr rasch geht.

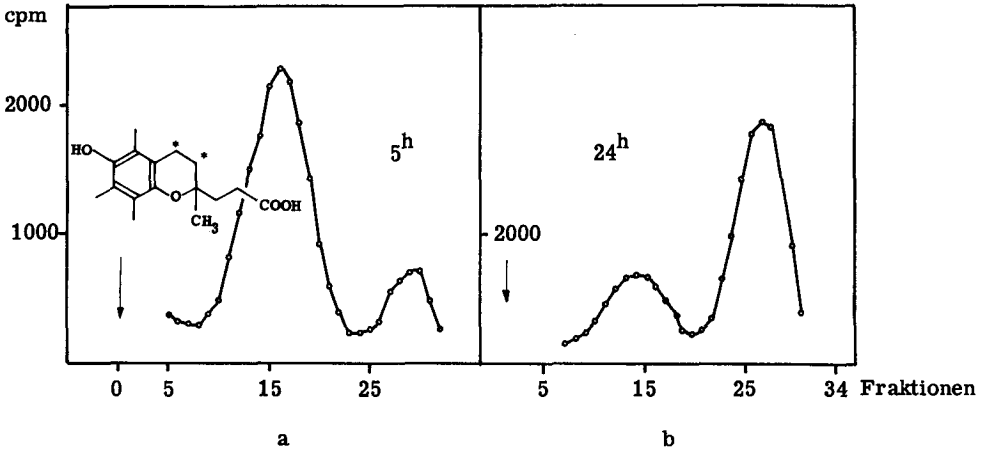


Abb. 8a Verteilungsdiagramm eines Hühnerleberextraktes nach Verfütterung von Tritium-markiertem 2,5,7,8-Tetramethyl-2-(β-carboxy-äthyl)-acetochroman. Versuchsdauer 5 Stunden. Mit dem Pfeil ist die Lage der Spitzenfraktion der Ausgangssubstanz angegeben.

Abb. 8b Versuchsdauer 24 Stunden.

In Abb. 8a und b sind die Verteilungsdiagramme zweier Leberextrakte von Hühnern wiedergegeben, die die Substanz III per os appliziert bekamen und nach 5 bzw. 24 Stunden geschlachtet wurden. Das Verteilungsmaximum des Tokotrienols liegt auf den Stufen 14, 15 wo sich auch die Hauptmenge der Radioaktivität nach fünfständiger Versuchsdauer befindet.

Auf Grund der Lage der Verteilungsmaxima der Umwandlungsprodukte, der in den Abb. 7a-e angegebenen Diagramme auf den Stufen 28-30, wurde angenommen, dass diese mit den aus α-Tokopherol entstandenen identisch sind. Versuche, in denen Hühner ¹⁴C-markiertes α-Tokopherol per os erhielten und eine Woche später die Tritium-markierten Substanzen III, IV, VII bekamen und 24 Stunden darauf geschlachtet wurden, ergaben nach der üblichen Aufarbeitung die in Abb. 9a-c angegebenen Verteilungsdiagramme, die eine auffallende Übereinstimmung der Kurven der ¹⁴C- und ³H-Aktivität zeigen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass die Metaboliten, IV und V nicht nur als "harnfähig" gemachte Abbauprodukte des Vitamin E angesehen werden dürfen, sondern dass es sich hier vielmehr um wichtige Zwischenprodukte in einer langen Reaktionskette handelt, die als Ausscheidungsprodukte auch die Regulation des Vitamin E Stoffwechsels übernehmen.

Die mögliche Struktur der Umwandlungsprodukte mit den **Maximalfraktionen** auf Stufen 28 - 30 in der 34-stufigen Gegenstromverteilung wird in den nächsten Kapiteln diskutiert.

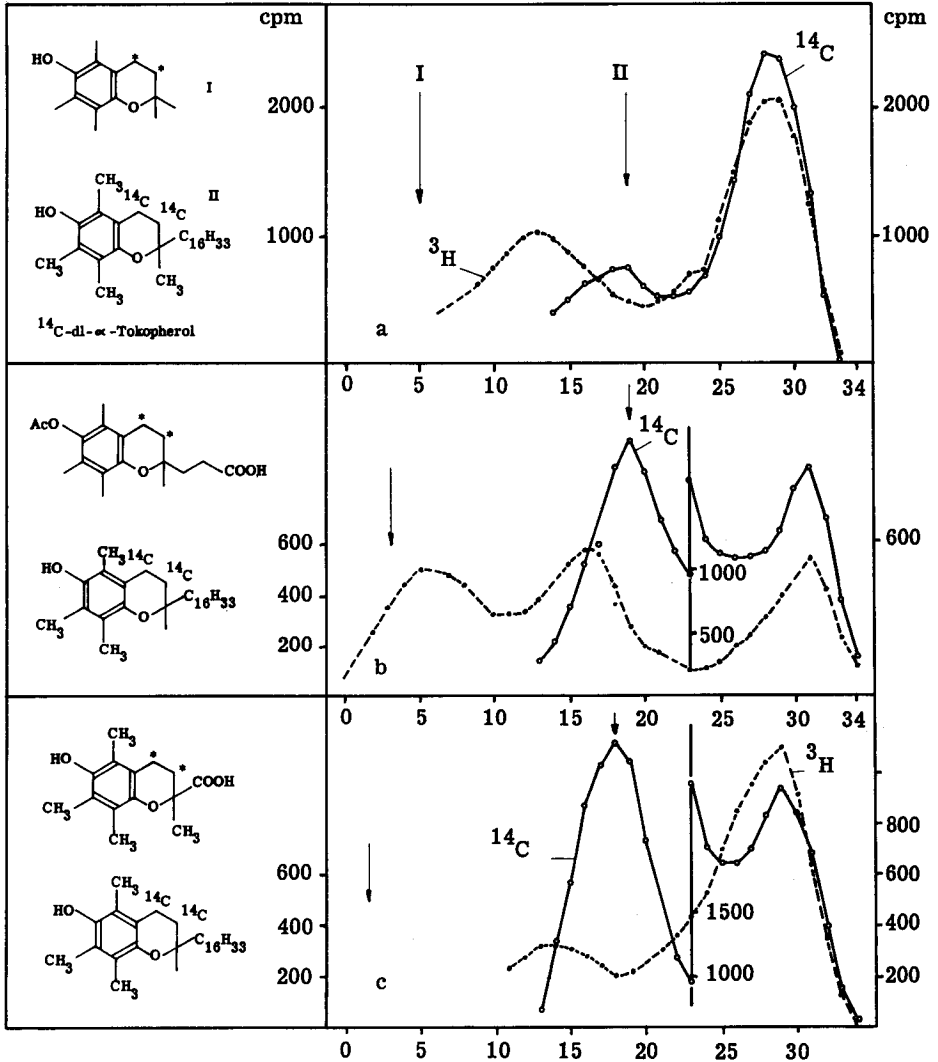


Abb. 9a-c Verteilungsdiagramme von Hühnerleberextrakten nach Verfütterung der in der linken Spalte angegebenen ^{14}C und ^3H -markierten Substanzen.
 ○——○ ^{14}C -Aktivität ○-----○ ^3H -Aktivität
 Die Pfeile geben die Lage der Ausgangssubstanzen an.

D. Ueber die Struktur der Umwandlungsprodukte des α -Tokopherols

Eine Strukturaufklärung der in diesen Versuchen nachgewiesenen Umwandlungsprodukte ist äusserst schwierig und lässt sich mit den üblichen chemischen und physikalischen Hilfsmitteln nicht durchführen, da man es im allgemeinen nur mit Bruchteilen von Mikrogrammen oder bestenfalls mit wenigen Mikrogrammen zu tun hat, die mit der mehrtausendfachen Menge verunreinigt sind. Man kennt wohl die Ausgangssubstanz, kennt die markierten Stellen im Ausgangsmolekül, die sich natürlich variieren lassen und kann auf Grund biochemischer Erfahrungen verschiedene Theorien über mögliche Umwandlungsreaktionen aufstellen. Auf Grund solcher Hypothesen, wobei man natürlich das Verhalten der zu untersuchenden Umwandlungsprodukte in verschiedenen chromatographischen Systemen mit einbezieht, werden die in Frage kommenden Substanzen synthetisiert und mit den radioaktiven Umwandlungsprodukten auf verschiedene Arten verglichen. Dass dieser Methode immer etwas Unsicheres anhaftet, da niemals Messungen an der reinen zu untersuchenden Substanz selbst durchgeführt werden können, ist ohne weiteres einzusehen.

Wie die Gegenstromverteilung zeigte, musste es sich beim Umwandlungsprodukt aus α -Tokopherol um einen stark lipophilen Stoff handeln. Dünnschicht- und Papierchromatogramme zeigten, dass es sich nicht um eines, sondern um mehrere Produkte handeln musste, die mit Hilfe der 34-stufigen Craig-Verteilung nicht aufgetrennt wurden, da ihre Spitzenfraktionen alle ungefähr an derselben Stelle liegen, nämlich auf den Stufen 28 - 30. Auf Grund der Untersuchungen über Umwandlungsmechanismen beim Ubichinon und Vitamin K, die beim Ubichinon einen sehr interessanten Mechanismus der Seitenkettenverlängerung [30] aufzeigten und auch durch das Auffinden von langkettigen K-Vitaminen bei niederen Tieren, schien es aussichtsreich, auch im Falle der Umwandlungsprodukte des Vitamin E nach langkettigen Trimethylchinonen zu suchen. Tatsächlich gelang es ein Umwandlungsprodukt des Vitamin E mittels der Gegenstromverteilung mit Trimethylfarnesyl-farnesyl-geranylgeranyl-benzochinon ($E_{2(50)}$) zu identifizieren wie die Abb. 10a-c zeigen.

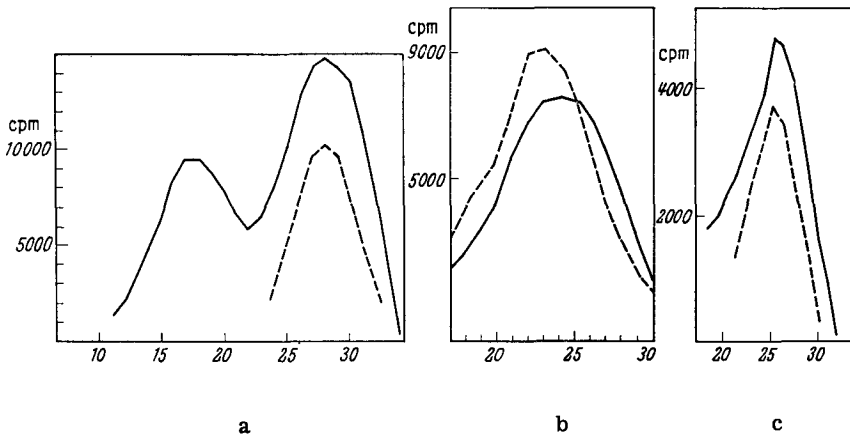


Abb. 10a Craig-Verteilungsdiagramm eines Hühnerleberextraktes nach Verfütterung von markiertem Tokopherol (Maximum bei Frakt. 17/19), Bildung des lipophilen Umwandlungsproduktes (Maximum bei Frakt. 28/30). Zum Vergleich synthetisches "E₂(45)" -----

Abb. 10b Fraktion 25 - 32 aus Versuch Abb. 10a nach reduktiver Acetylierung neu verteilt.

Abb. 10c Vergleich des Umwandlungsproduktes von Tokopherol mit synthetischem "E₂(50)" nach reduktiver Acetylierung.

Ein Vergleich mit synthetisch hergestelltem E₂(45) zeigt zwar Uebereinstimmung der radiometrisch gemessenen Kurve mit der Kurve die sich durch Messung der Extinktion bei 259 m μ ergab. Reduktive Acetylierung verschob jedoch das Maximum der Verteilungskurve des synthetischen Chinons etwas weiter nach der hydrophilen Seite hin [Abb. 10b]. Der Vergleich mit synthetischem E₂(50) ergab sowohl die Uebereinstimmung des Chinons, wie des Diacetates Abb. 10c. Auch die Tatsache, dass die Isoprenseitenketten von Trimethylchinonen, (E₂(20), E₂(25)) nach dem gleichen Mechanismus wie die Ubichinone verlängert werden [30], bekräftigte diesen Befund (siehe nächstes Kapitel). Gegen diese Annahme spricht allerdings die Tatsache, dass es bisher nicht gelang, das E₂(50) aus Schweinelebern und Schweineherzen in Substanz zu isolieren [31].

E. Ueber die Umwandlung des $E_2(20)$ und $E_2(25)$ im Huhn

Jungen, mit der Diät A aufgezogenen Hühnern wurde, in der Position 1', 2' der Seitenkette tritiummarkiertes $E_2(20)$ oder $E_2(25)$ intravenös appliziert. Während das $E_2(20)$ nach ca. 24 Stunden zu 70 - 80 % umgesetzt worden war, so war dies beim $E_2(25)$ nach 48 Stunden erst zu ca. 40 % geschehen, wie dies aus der Abb. 11a und b zu sehen ist, die je ein Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes eines Huhnes, das $E_2(20)$ bzw. $E_2(25)$ erhalten hatte wiedergeben. Es ist zu beachten, dass im Falle des $E_2(20)$ das radioaktive Umwandlungsprodukt einen etwas kleineren R_f -Wert besitzt, als das authentische, zugesetzte $E_2(50)$, das heisst, es handelt sich hier in der Hauptmenge um das $E_2(40)$, während im Falle des $E_2(25)$ die Radioaktivität des Umwandlungsproduktes ganz genau mit synthetischem $E_2(50)$ parallel läuft. In den folgenden Abbildungen sind die Versuche wiedergegeben, die den Beweis, dass aus $E_2(25)$ im Huhn $E_2(50)$ entsteht, erbringen. Abb. 12a zeigt ein Verteilungsdiagramm eines Hühnerleberextraktes mit zugesetztem, synthetischem $E_2(50)$, dessen Verteilungskurve durch opt. Messung bei 260 m μ bestimmt wurde. Nach reduktiver Acetylierung erhält man die erwartete Kurve der Abb. 12b, mit der Spitzenfraktion auf Stufe 25, für das Diacetat des $E_2(50)$.

Wird das Diacetat wieder mit $LiAlH_4$ verseift und anschliessend mit Silberoxyd oxydiert, so erhält man die Verteilungskurve der Abb. 12. Die radiometrisch gemessene Kurve deckt sich wieder mit der optisch gemessenen Kurve von authentisch zugesetztem $E_2(50)$.

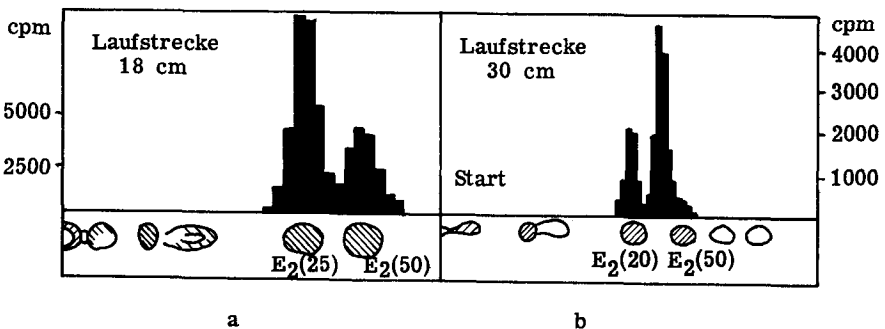


Abb. 11a Dünnschichtchromatogramm des Leberextraktes eines Hühnchens, das $^3H-E_2(25)$ i. v. erhalten hatte und nach 48 Stunden geschlachtet wurde. Laufmittel: Benzol abs.

Abb. 11b Dünnschichtchromatogramm des Leberextraktes eines Hühnchens, dem $^3H-E_2(20)$ intravenös injiziert worden war und das nach 24 Stunden geschlachtet wurde. Laufmittel: Benzol abs.

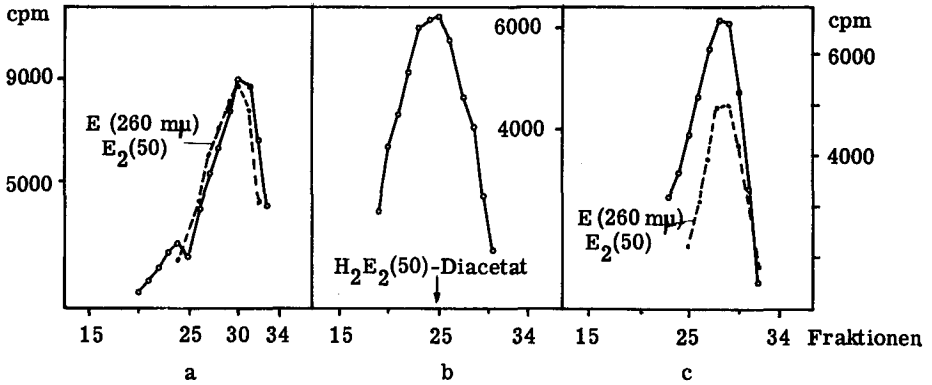


Abb. 12a Verteilungsdiagramm von E₂(50), das im Huhn aus E₂(25) gebildet worden war. o—o

Zum Vergleich synthetisches E₂(50) o-----o

Abb. 12b Fraktionen 26 - 33 aus Abb. 12a nach reduktiver Acetylierung erneut verteilt.

Abb. 12c Fraktionen 16 - 30 aus Abb. 12b mit LiAlH₄ verseift, mit Silberoxyd oxydiert und erneut verteilt.

o—o radioaktiv gemessene Kurve o-----o synthetisches E₂(50) optisch gemessen bei 260 mμ.

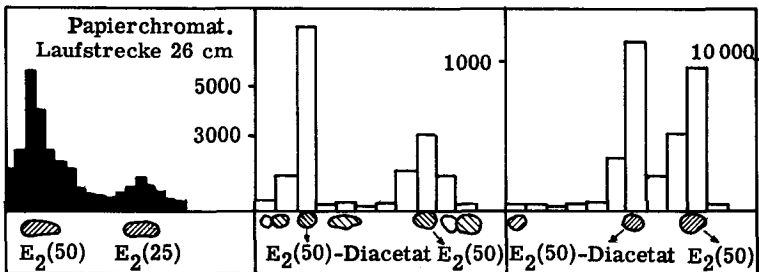


Abb. 13

Abb. 14a

Abb. 14b

Abb. 13 Papierchromatogramm eines Hühnerleberextraktes nach Verfütterung von ³H-E₂(25). Die Flecken stammen von zugesetztem authentischem E₂(50) und E₂(25). Lösungsmittel: Alkohol abs.

Abb. 14a Dünnschichtchromatogramm eines Hühnerleberextraktes nach i. v. Injektion von ³H-E₂(25), nach Abtrennung des Ausgangsproduktes und reduktiver Acetylierung zusammen mit synthetischem E₂(50)-Diacetat und E₂(50). Mit abs. Benzol entwickelt.

Abb. 14b Mit Benzol : Isooktan = 1 : 1 + 4 % Aceton entwickelt.

Auch auf dem Papierchromatogramm ist Uebereinstimmung der Radioaktivität mit zugesetztem $E_{2(50)}$ zu sehen [Abb. 13]. Abb. 14a und b zeigen Dünnschichtchromatogramme, die mit verschiedenen Laufmitteln entwickelt wurden und volle Identität des radioaktiven Hydrochinon- $E_{2(50)}$ -diacetates mit synthetischem ergaben.

F. Zur Bildung von $E_{2(50)}$

Im Formelschema 1 ist der Abbau des Tokopherols angegeben. In einer weiteren Versuchsserie wurde dann gezeigt, dass es sich bei den Substanzen III, IV, V, VI etc. dieses Schemas nicht nur um Abbau- und Ausscheidungsprodukte des α -Tokopherols handelt, sondern vielmehr um Zwischenprodukte einer langen Reaktionskette die, wenn sie zu $E_{2(50)}$ als Endprodukt führen soll über das von uns so benannte Iso $E_{2(5)}$ [Formelschema II, Formel II] gehen muss [24], da wie schon Stoffel und Martius zeigten, das Trimethylbenzochinon im Gegensatz zum Ubichinon (0) nicht alkyliert wird [32].

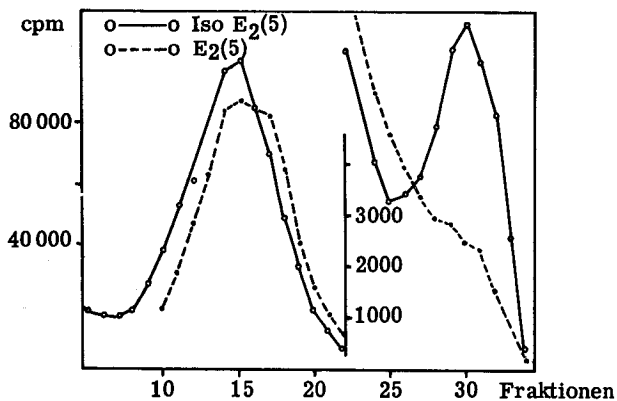


Abb. 15 Verteilungsdiagramme der Aetherextrakte zweier Ansätze mit Bact. Subtilis in einer Nährlösung mit 3H - $E_{2(5)}$ o-----o bzw. 3H -Iso $E_{2(5)}$ o——o Dauer: 3 Tage.

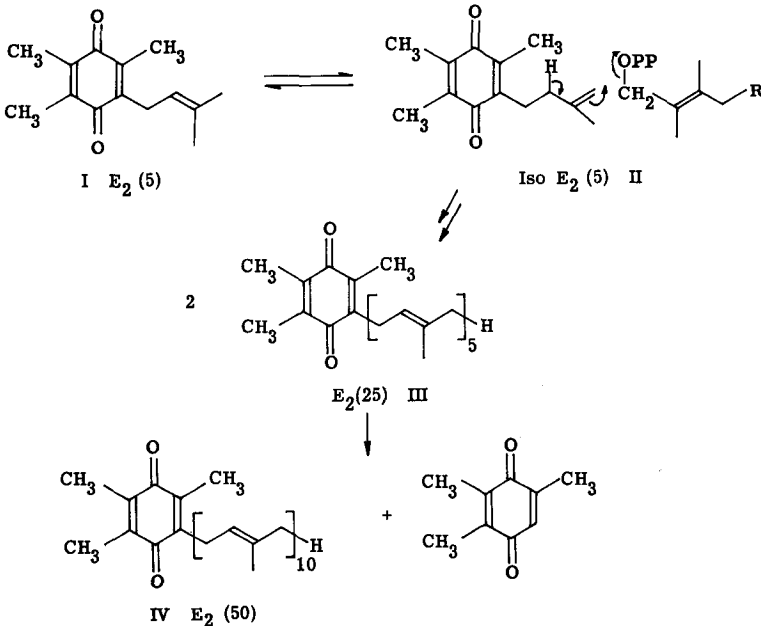
Gleichzeitig in unserem Labor durchgeführte Versuche mit Bakterium Subtilis [30] das mit Tritium-markiertem Iso- $E_{2(5)}$ oder $E_{2(5)}$ [I] wachsen gelas-

sen wurde, liessen eine wesentlich höhere Reaktionsbereitschaft des Iso $E_2(5)$ feststellen, was in den Verteilungsdiagrammen der Abb. 15 deutlich zum Ausdruck kommt. Neben sehr viel Ausgangsprodukt (Stufe 15) liess sich beim Iso $E_2(5)$ (ausgezogene Kurve) ein deutliches Maximum auf den Stufen 29/30 erkennen, während beim $E_2(5)$ (gestrichelte Kurve) nur eine schwache Schulter unterscheidbar ist.

Die Bildung von $E_2(50)$ vollzieht sich also, wie im Formelschema II angegeben ist, über das Iso $E_2(5)$ (II) aus dem möglicherweise durch Anlagerung von Farnesylpyrophosphat $E_2(20)$ entsteht, bzw. von Geranyl-geranylpyrophosphat $E_2(25)$ (III). Dieser erste Schritt kann sich natürlich auch stufenweise durch drei- bzw. viermalige Anlagerung von Isopentenylpyrophosphat vollziehen [33, 34]. Durch Koppelung von zwei Molekülen $E_2(25)$ oder von $E_2(25)$ mit $E_2(20)$ entsteht $E_2(50)$ (V) oder $E_2(45)$.

Dieser letzte Schritt wurde von Bosshardt [30] bei der Untersuchung der Biosynthese der Ubichinone gefunden und gilt wie im vorangehenden Kapitel gezeigt wurde, auch für die Trimethylchinone.

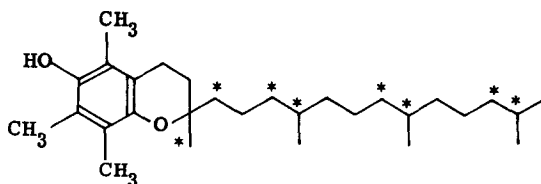
Formelschema II



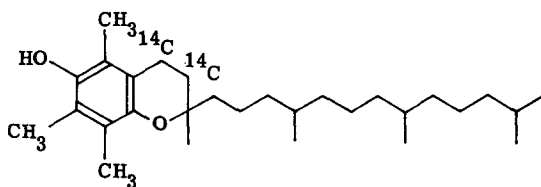
G. Versuche mit verschieden markiertem α -Tokopherol

Um einen bessern Einblick in den Stoffwechsel des Vitamin E zu erhalten, wurde eine Reihe von Tierversuchen mit verschieden markiertem α -Tokopherol durchgeführt. Im Formelschema III sind die verschieden markierten Tokopherole wiedergegeben: Bei der Verbindung (I) handelt es sich um dl- α -Tokopherol, das in den mit * bezeichneten Stellen mit Tritium markiert ist, bei (II) handelt es sich ebenfalls um dl- α -Tokopherol, das in den Positionen 3 und 4 mit ^{14}C markiert ist und bei (III) handelt es sich um das natürliche d- α -Tokopherol, das in der Methylgruppe an Stellung 5 mit ^{14}C markiert ist.

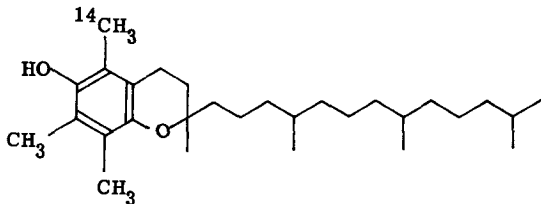
Formelschema III



I



II



III

Im besondern erlaubte diese Art der Markierung, Umwandlungsprodukte des α -Tokopherols zu unterscheiden, die durch direkte Oxydation des α -Tokopherols entstehen, [35, 36] von solchen deren Bildung einen Abbau der Seitenkette des Vitamin E voraussetzt, wie dies auch für das E₂(50) der Fall ist.

Als Versuchstiere dienten junge, auf den Diäten A und B gehaltene Hühner, denen eine Mischung der Tokopherole (I) und (II) oral oder intravenös verabreicht wurde. Nach 10 Tagen wurden die Tiere geschlachtet und die Lipidextrakte der Lebern mit Hilfe der Gegenstromverteilung auf Umwandlungsprodukte und deren Isotopenverhältnis ($^{14}\text{C} : ^3\text{H}$) untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abb. 16 - 19 wiedergegeben. Die ausgezogenen Verteilungskurven zeigen den Verlauf der Tritiumaktivität und die gestrichelten den der ^{14}C -Aktivität. Das Säulenpaar links stellt das Isotopenverhältnis ($^{14}\text{C} : ^3\text{H}$) der Ausgangssubstanz dar, während mit dem Säulenpaar rechts das Isotopenverhältnis der Umwandlungsprodukte angegeben wird.

Für die Versuche der Abb. 16 und 17 wurden auf der Diät A gehaltene Tiere verwendet, die zusätzlich täglich 2 mg Santoquin¹⁾, ein künstliches Antioxydans erhielten. Beiden Hühnern wurde je ein Milliliter einer Lösung von Cremophor El, ca. 10 % Feinsprit und Wasser, die je ein Milligramm einer Mischung der Substanzen I und II enthielt oral (Abb. 16) oder intravenös (Abb. 17) verabreicht.

Es scheint, dass die Diät A die Bildung von Oxydationsprodukten, die ohne Veränderung der Seitenkette, sondern nur durch Dimerisation des oral verabreichten α -Tokopherols entstanden, begünstigt, trotz der täglichen Gaben von Santoquin. Aus dem Isotopenverhältnis lässt sich ungefähr abschätzen, dass ca. 80 % der Umwandlungsprodukte Oxydationsprodukte des Vitamin E mit intakter Seitenkette sind. Dass das Santoquin hier keinen besonders grossen Einfluss auf die Verhütung der Oxydation des α -Tokopherols hatte, wie aus parallel-Versuchen ohne Santoquin hervorgeht, könnte auf die Art der Absorption dieses Antioxydans zurückzuführen sein. Wie Wiss [37] zeigte, sind einmalige Gaben nur kurze Zeit wirksam, während kontinuierlich zugeführte, kleinere Mengen wahrscheinlich bessere Effekte zeitigen würden.

1) Santoquin = EMQ (6-äthoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylchinolin).

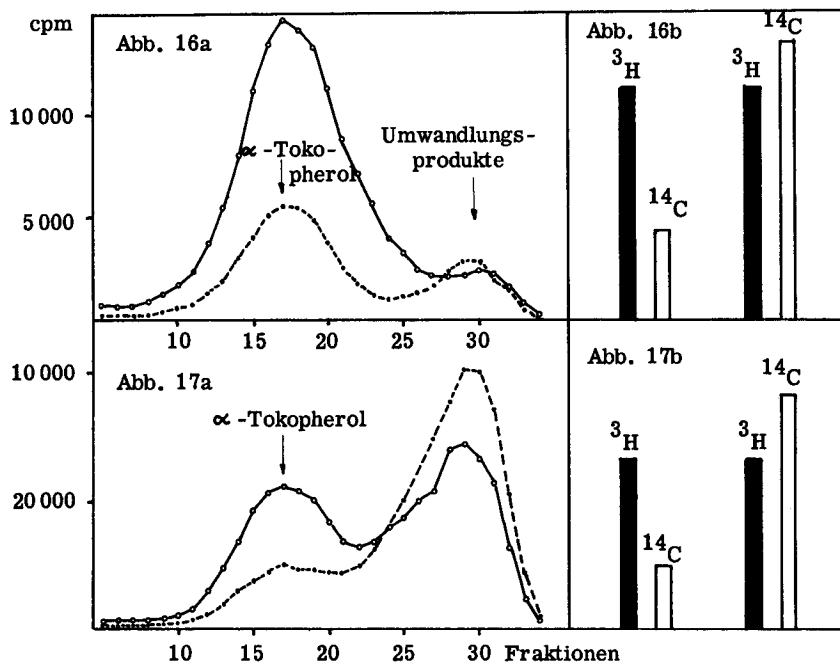


Abb. 16-17b Verteilungsdiagramme von Leberextrakten von Hühnern, die auf den Diäten A oder B gehalten wurden und die ein Gemisch von α -Tokopherol I und II oral oder i.v. erhalten hatten.

o—o ^3H -Aktivität o-----o ^{14}C -Aktivität

Abb. 16 a Huhn auf Diät B, Fütterung des α -Tokopherols per os

Abb. 16b, 17, b, 18b, 19b linkes Säulenpaar Isotopenverhältnis der Ausgangssubstanz, rechtes Säulenpaar Isotopenverhältnis der Umwandlungsprodukte.

Abb. 17a Huhn auf Diät B, Applikation des α -Tokopherols i.v.

Im Gegensatz zur oralen Verabreichung, bilden sich bei intravenöser Applikation des α -Tokopherols bedeutend weniger Oxydationsprodukte (Abb. 17). Wie es sich aus dem Isotopenverhältnis berechnen lässt, entfallen nur etwa 24 % auf Oxydationsprodukte, während etwa 76 % der Umwandlungsprodukte nach Abbau der Seitenkette, wie es in vorhergehenden Kapiteln diskutiert wurde, entstehen.

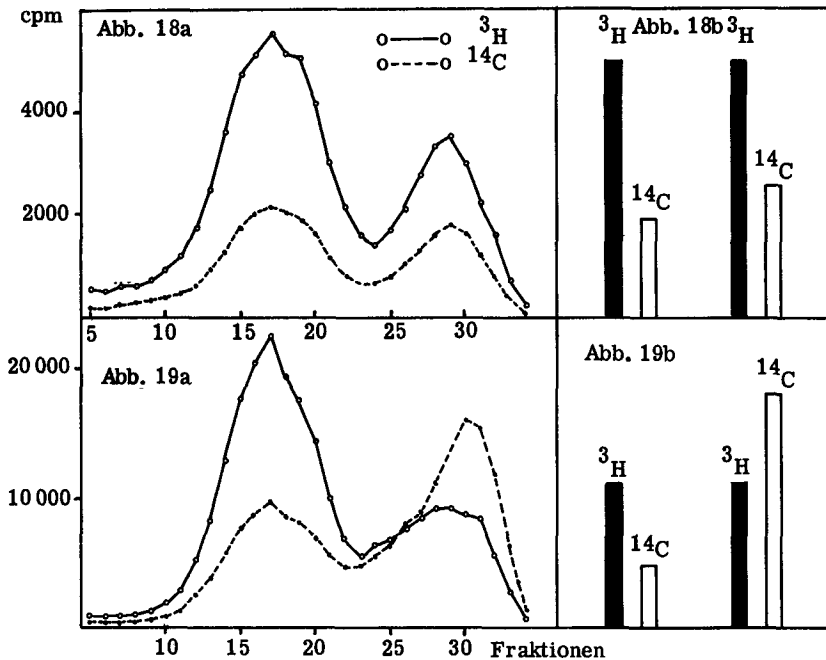


Abb. 18a Huhn auf Diät A, Applikation des α -Tokopherols per os

Abb. 19a Huhn auf Diät A, Applikation des α -Tokopherols i. v.

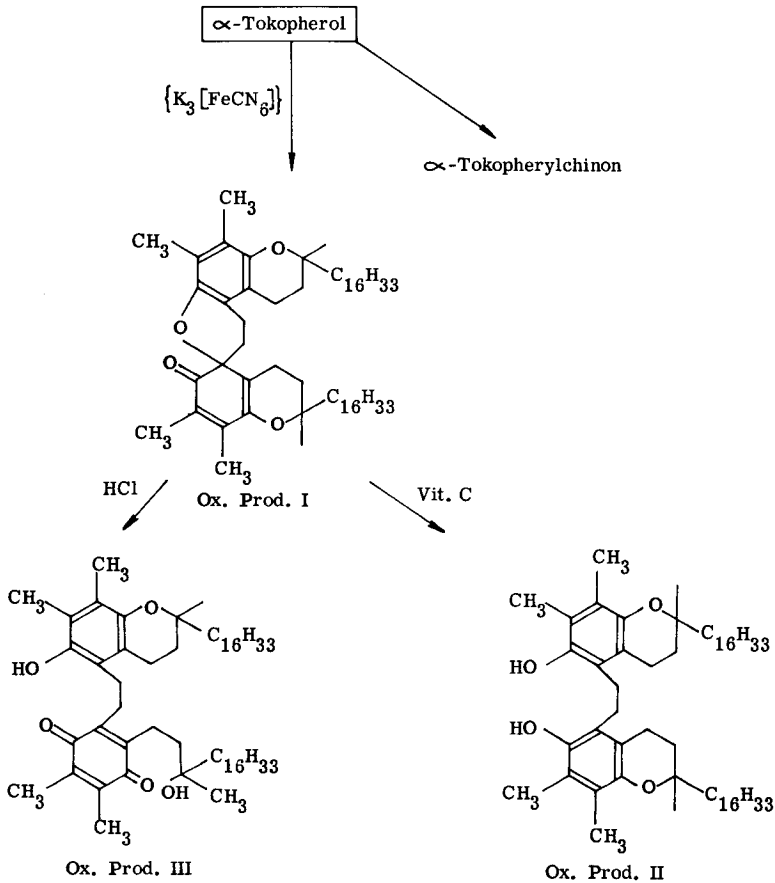
Die Versuche der Abb. 17 und 18, für die Hühner verwendet wurden, die an Stelle des Lebertrans, der reich an ungesättigten Fettsäuren ist, ein voll gehärtetes Fett in ihrer Diät (B) erhielten, zeigten, dass sich hier nur wenig direkte Oxydationsprodukte des α -Tokopherols bilden. Nur etwa 30 % der Umwandlungsprodukte entfallen sowohl bei oraler wie bei intravenöser Applikation des Vitamin E auf solche Oxydationsprodukte.

Bei den Versuchen [Abb. 18 und 19] ist besonders auffallend, dass sich bezüglich des noch unveränderten α -Tokopherols, nach intravenöser Verabreichung

eine bedeutend grössere Menge Umwandlungsprodukte bildet, als nach oraler Verabreichung. Zur Auftrennung der verschiedenen Umwandlungsprodukte des α -Tokoferols erwies sich die Dünnschichtchromatographie als gutes und einfaches Hilfsmittel. Dazu waren allerdings spezifisch hoch markierte Ausgangssubstanzen und hohe Ausbeuten an Umwandlungsprodukten erforderlich, die man besonders bei intravenöser Applikation erhielt.

Es wurde eine Reihe möglicher Oxydationsprodukte als Vergleichssubstanzen hergestellt [39]:

Formelschema IV



Aus Abb. 20 ist das Verhalten einer Reihe von verwendeten Verbindungen im Dünnschichtchromatogramm, das mit abs. Benzol entwickelt wurde ersichtlich.

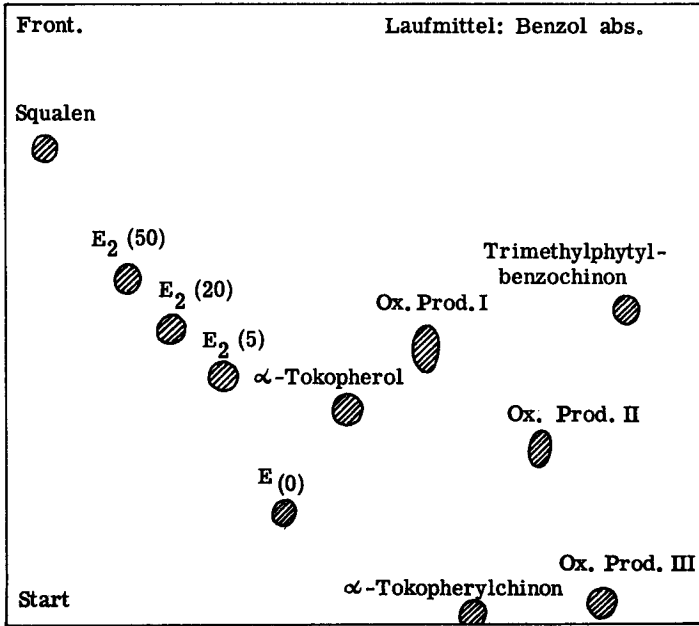


Abb. 20

Tierversuche: Ein junges Huhn, das einige Zeit die Diät A erhalten hatte, bekam ein Milligramm einer Mischung der Substanzen I und II des Formelschemas III intravenös injiziert und wurde sieben Tage später geschlachtet. Ein Teil des Lipidextraktes der Leber wurde, gelöst in Hexan auf einer Reihe von Punkten auf einer Dünnschichtplatte, zusammen mit Vergleichssubstanzen aufgetragen und mit abs. Benzol entwickelt. Das Resultat dieses Chromatogramms ist in Abb. 21 wiedergegeben und zeigt ein ganzes Spektrum von Umwandlungsprodukten des α-Tokopherols.

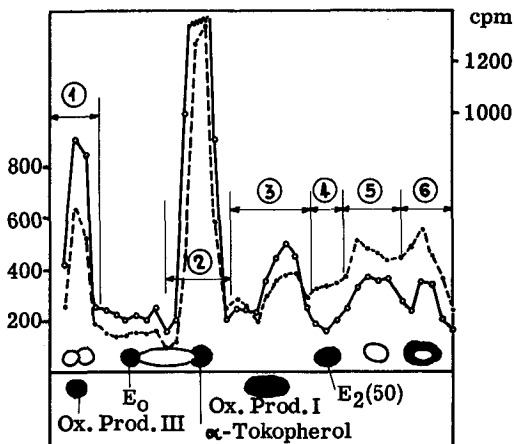


Abb. 21 Dünnschichtchromatogramm des Leberextraktes eines Huhnes, das markiertes α -Tokopherol I und II erhalten hatte. Versuchsdauer: 7 Tage. \circ — \circ ^3H -Aktivität \circ - - - - \circ ^{14}C -Aktivität. 2 ist unveränderte Ausgangssubstanz, 1, 3, 4, 5, 6 sind Umwandlungsprodukte. Die schwarzen Flecken stammen von synthetischen, als Vergleichssubstanzen zugesetzten Proben.

Wie aus dem Verlauf der Kurven der ^{14}C - und ^3H -Aktivität zu entnehmen ist, sind deutlich 6 Maxima der ^{14}C -Aktivität und 5 der ^3H -Aktivität zu unterscheiden, die im Folgenden stets mit 1, 2, 3, 4, 5, 6, wie dies in Abb. 21 angegeben ist, bezeichnet werden.

Nur in den Substanzen 1, 2 und 3 findet sich das Isotopenverhältnis der Ausgangsmischung wieder. Bei 2 handelt es sich um unverändertes α -Tokopherol. Bei 1 und 3 dürfte es sich um direkte Oxydationsprodukte des α -Tokopherols handeln, die mit den Oxydationsprodukten II bzw. mit I [siehe Formelschema IV] parallel laufen.

Ganz anders ist die Situation bei den Umwandlungsprodukten 4, 5 und 6, die eine gegenüber der Ausgangssubstanz um 70 - 80 % verminderte ^3H -Aktivität aufweisen.

Die Verteilung der gesamten ^{14}C -Aktivität, die aus der 3, 4-Stellung des dl- α -Tokopherols stammt, auf die Produkte 1, 2, 3, 4, 5, 6 ist aus der Tabelle 1, Spalte A ersichtlich, die zeigt, dass 74 % der ^{14}C -Aktivität auf die Umwandlungsprodukte 1, 3, 4, 5 und 6 entfallen, während dies im Falle der Tritiumaktivität nur 52,5 % ausmacht.

Wie die Bilanzrechnung zeigt, fehlen bezüglich des Ausgangsisotopenverhältnisses des verfütterten ^{14}C - und ^3H -Tokopherols, in den Umwandlungsprodukten ca. 60 % der ^3H -Aktivität, die durch Abbau der Seitenkette verlorengegangen sein muss.

Die Kenntnis der Strukturen der Umwandlungsprodukte und deren Entstehungsmechanismen könnten wahrscheinlich sehr viel zur Erforschung von Funktion und Wirkung des Vitamin E beitragen.

Etwas näher untersucht wurde die Substanz 1, die im Dünnschichtchromatogramm parallel mit dem Oxydationsprodukte III und α -Tokopherylchinon und die Substanz 4, die parallel mit $\text{E}_2(50)$ läuft. Zu diesem Zwecke wurde möglichst viel eines Leberextraktes eines Huhnes, das die verschieden markierten Tokopherole I und II des Formelschemas III erhalten hatte mit Hilfe der Dünnschichtmethode chromatographiert, anschliessend das Kieselgel mit der Substanz 4 abgekratzt, mit abs. Aether eluiert, das Lösungsmittel eingengt und nochmals auf einer Dünnschichtplatte analysiert. Das Resultat dieser Chromatographie ist in Abb. 22 zu sehen und zeigt eine sehr genaue Uebereinstimmung der Radioaktivität mit dem Fleck des synthetischen $\text{E}_2(50)$. Auch das Isotopenverhältnis bestätigt die Hypothese, dass $\text{E}_2(50)$ über ein Zwischenprodukt gebildet wird, das durch Abbau der Seitenkette des α -Tokopherols entsteht. Die noch vorhandene, geringe ^3H -Aktivität stammt aus der Methylgruppe in Stellung 2 des Chromanolkernes und aus der Position 1' der Seitenkette des α -Tokopherols.

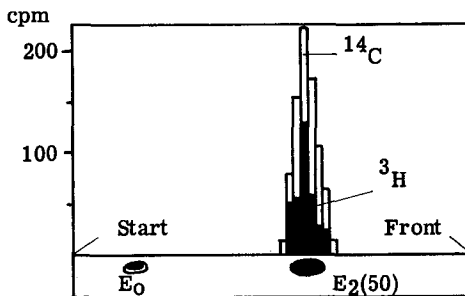


Abb. 22 Dünnschichtchromatogramm der Substanz 4 zusammen mit synthetischem $\text{E}_2(50)$. Weisse Säulen ^{14}C -Aktivität, schwarze Säulen ^3H -Aktivität. Laufmittel: Benzol abs.

In analoger Weise wurde auch die Substanz 1 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen auf Dünnschichtplatten untersucht und sowohl mit dem Oxydationsprodukt III als auch mit Tokopherylchinon verglichen [Abb. 23a und b].

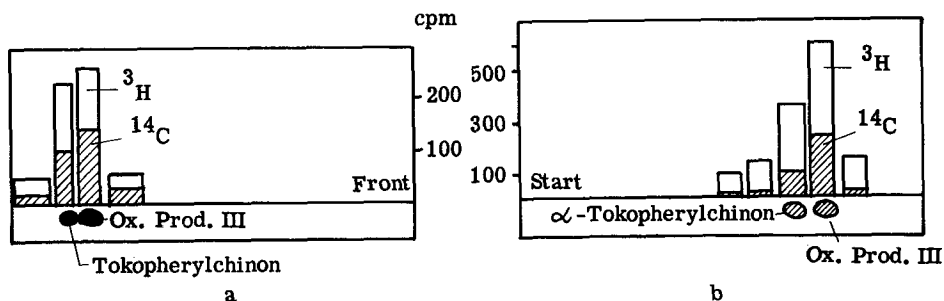


Abb. 23a Dünnschichtchromatogramm des Umwandlungsproduktes 1 zusammen mit synth. Oxydationsprodukt III und α -Tokopherylchinon. Weiße Säulen: ^3H -Aktivität, schwarze Säulen: ^{14}C -Aktivität. Laufmittel: Benzol : Isooktan = 1 : 1 + 2,5 % Aceton.

Abb. 23b Laufmittel: Benzol : Essigester = 1 : 1.

Abb. 23a und b zeigen, dass ungefähr 40 % der Radioaktivität mit Tokopherylchinon und 60 % mit dem Oxydationsprodukt III parallel laufen.

Die eigenartige Struktur dieses Oxydationsproduktes, welches das Redoxpaar Chromanol - Chinon in einem Molekül vereinigt, gibt zur Frage Anlass, ob dieses Dimerisationsprodukt nur als Folge der Antioxydanzwirkung des Vitamin E zu betrachten ist, oder ob es nicht eine besondere Funktion, möglicherweise in der Atmungskette, zu erfüllen hat. Auch der Befund, dass diese Substanz im Rattenresorptionstest nur ca. 2 % der Wirkung des α -Tokopherols aufweist, [38] spricht nicht gegen eine Beteiligung an der Atmungskette, da die Funktion des α -Tokopherols bei der Fortpflanzung unabhängig von einer Beteiligung in irgend einer Form an der Atmungskette sein kann.

Eine ganze Reihe von analogen Versuchen mit jungen Hühnchen ergaben immer wieder ganz ähnliche Resultate, die in der Tabelle 2 zusammengefasst sind. Aus dieser Tabelle ist die prozentuale Verteilung auf die 6 Radioaktivitätsmaxima die aus den Dünnschichtchromatogrammen der Leberextrakte von Hühnchen erhalten wurden, nach verschiedener Versuchsdauer und bei Verwendung der Diäten A und B ersichtlich.

Tabelle 1 Prozentualer Anteil der Umwandlungsprodukte 1 - 6 bei verschiedener Versuchsdauer und Diäten, berechnet aus den Kurven der Dünnschichtchromatogramme.

Umwandlungsprodukte aus Dünnschichtchromatogramm	Diät A + dl- α -Tokopherol I+II % - Verteilung		Diät B + dl- α -Tokopherol II % - Verteilung		
1	12,2	15,3	14,1	16,2	16,1
zwischen 1 und 2	5,1	5,7	5,2	5,5	5,9
2 = Vit. E	26,0	12,2	30	23,9	14,8
3	19,4	26,2	14	15,9	18,2
4 = E ₂ (50)	7,1	9,2	8	10,9	11,2
5	30,3	31,4	28,7	27,8	33,9
6					
Versuche	a	b	c	c	d
Versuchsdauer	7 Tage	21 Tage	9 Tage	7 Tage	21 Tage

Bei den Versuchen a, b und c handelt es sich um Versuche mit den Tokopherolen I und II (Formelschema III) bei d und e mit einer Mischung von 3,4 ¹⁴C-Tokopherol (II) und ³H-E₂(50). Die Zahlen beziehen sich alle auf die gemessene ¹⁴C-Aktivität, die aus dem 3,4-¹⁴C-dl- α -Tokopherol (II) stammt. Wie die Versuche a - e zeigten, tritt das Produkt 1 immer in ungefähr derselben, relativen Konzentration auf, während sich vom Produkt 3 in den Versuchen a und b mit der Diät A deutlich mehr bildet als in den Versuchen c, d, e mit der Diät B. Die Umwandlungsprodukte 4, 5 und 6 treten bei allen Versuchen in vergleichbaren Mengen auf.

Die relative Abnahme an α -Tokopherol (2) ist bei den Diäten A und B ungefähr dieselbe.

H. Versuche mit d-¹⁴C- α -Tokopherol

In jüngster Zeit unternommene Versuche mit jungen Hühnchen, die d- α -Tokopherol, das in der 5-Methylgruppe des Kernes mit ¹⁴C markiert war, i.v. injiziert erhalten hatten ergaben zum Teil überraschende Ergebnisse. Bei der Untersuchung der Organextrakte mit Dünnschichtchromatographie konnten wiederum die 5 Umwandlungsprodukte gefunden werden, aber zum Teil in viel geringerem Mass als dies nach Verfütterung von 3,4-³H-dl- α -Tokopherol der Fall war. Besonders die Bildung der Umwandlungsprodukte 3, 5 und 6 ist stark zurückgedrängt. Abb. 24a zeigt das Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes eines Hühnchens, das eine Mischung von d-¹⁴C- α -Tokopherol und 3,4-³H-dl- α -Tokopherol i.v. erhalten hatte. (Versuchsdauer: 6 Tage). Hier ist der Unterschied zwischen den beiden Formen des α -Tokopherols besonders eindrücklich. Auch aus dem Verteilungsdiagramm der Abb. 24b desselben Leberextraktes ist der Unterschied klar ersichtlich.

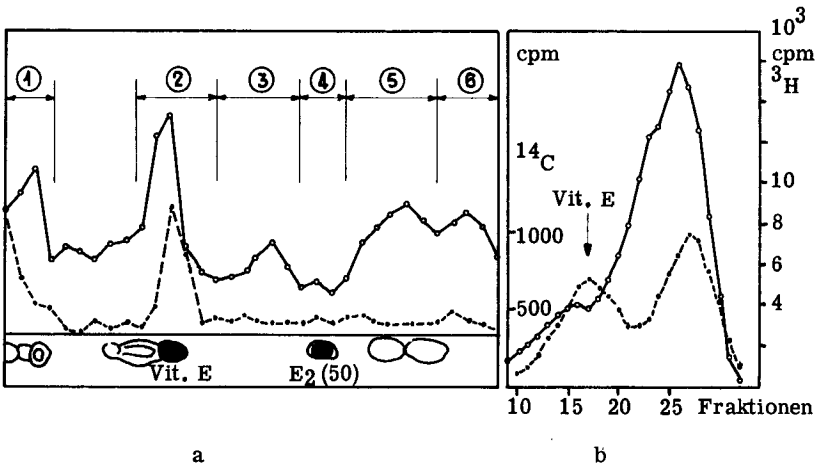


Abb. 24a Dünnschichtchromatogramm des Leberextraktes eines Huhns, das eine Mischung von 3,4-³H-dl- α -Tokopherol und (5-Methyl ¹⁴C)-d- α -Tokopherol i.v. injiziert bekommen hatte. o—o ³H-Aktivitätskurve, o----o ¹⁴C-Aktivitätskurve, 2 = Ausgangssubstanz.

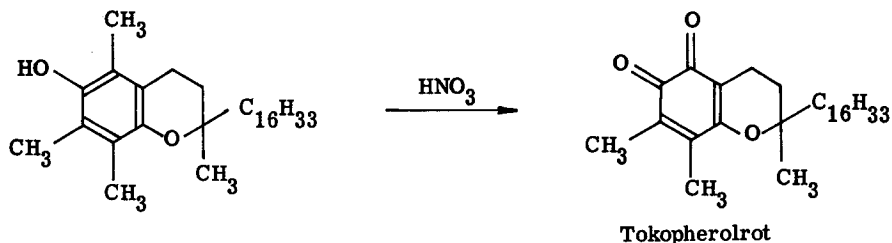
Abb. 24b Verteilungsdiagramm desselben Extraktes über 34 Stufen im System Methylglycol/Heptan. o----o ¹⁴C-Aktivität, o—o ³H-Aktivität.

In Tabelle 2 sind die prozentualen Anteile der Umwandlungsprodukte 1 - 6 angegeben nach 7 bzw. 14-tägiger Versuchsdauer. Die Versuche wurden mit d-¹⁴C- α -Tokopherol bzw. mit einer Mischung von d-¹⁴C- α -Tokopherol mit 3,4-³H-dl- α -Tokopherol durchgeführt. In beiden Versuchen ist die Umwandlung des d-Tokopherols in die Produkte 3, 5 und 6 stark zurückgedrängt [vgl. Tabelle 1].

Tabelle 2 Prozentualer Anteil der Umwandlungsprodukte 1 - 6 nach 7 und 14-tägiger Versuchsdauer berechnet aus den Kurven der ¹⁴C bzw. ³H-Aktivität der Dünnschichtchromatogramme.

Umwandlungsprodukt (aus Dünnschichtchromatogrammen)	Diät A + d- ¹⁴ C- α -Tokopherol (II) % Verteilung	Diät A + d- ¹⁴ C- α -Tokopherol (III) + 3,4- ³ H-dl- α -Tokopherol % Verteilung	
		¹⁴ C	³ H
1	41,7	30,1	14,3
zwischen 1 und 2	5,3	8,1	9
2 = Vit. E	40,7	24,6	15,2
3	4,2	13,9	17,7
4 = E ₂ (50)	3,9	11,3	9,8
5	} 4,2	12	34
6			
Versuchsdauer	7 Tage	14 Tage	

Für die anders verlaufende Umwandlung des d- α -Tokopherols kann es verschiedene Gründe geben: Es könnte sich bei den Produkten 3, 5 und 6 um Umwandlungsprodukte handeln, die vorwiegend aus der 1-Form des α -Tokopherols entstehen. Eine weitere Möglichkeit wäre die, dass im Verlaufe der Umwandlungsreaktion, die zu den Produkten 3, 5 und 6 führt, die 5-Methylgruppe verschwindet. Tatsächlich lässt sich die 5-Methylgruppe sehr leicht oxydativ entfernen durch Behandeln von α -Tokopherol mit Salpetersäure unter Bildung des "Tokopherolrotes" [39], [40].



Auch beruhen auf der leichten Oxydierbarkeit zu diesem Orthochinon verschiedene kolorimetrische Bestimmungsverfahren der Tokopherole [41, 42].

I. Versuche mit Tritium-markiertem $E_2(50)$

Versuche mit jungen Hühnchen, denen in der Seitenkette und im Kern markiertes $E_2(50)$ oral und intravenös verabreicht wurde, sollten über einen allfälligen Umbau des $E_2(50)$ im Tier Auskunft geben. Das Ergebnis dieser Versuche war ein deutlicher Umbau des $E_2(50)$ bei oraler Applikation während bei intravenöser Injektion nur verschwindend kleine Mengen umgebaut wurden [Abb. 25a und b]. Aus der Lage des Maximums in der Gegenstromverteilung und aus der Verschiebung der Spitzenfraktion nach reduktiver Acetylierung zu schliessen, handelt es sich bei dieser Umwandlung um den Abbau der Seitenkette, wahrscheinlich durch Darmbakterien zu $E_2(10)$ oder $E_2(15)$.

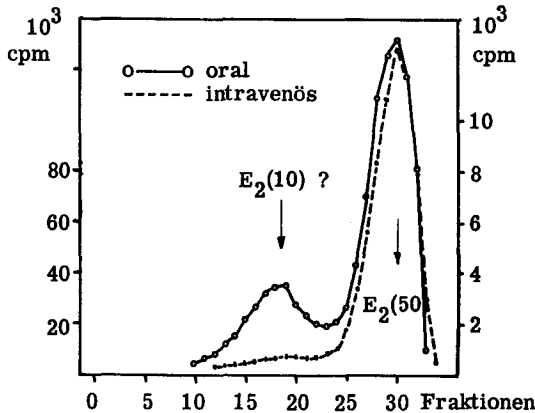


Abb. 25 Verteilungsdiagramme von Leberextrakten zweier Hühner, die $E_2(50)$ oral (o—o) und intravenös (o-----o) erhalten hatten und 24 Stunden später geschlachtet wurden. 34-Stufen. System: Methylglykol/Heptan. Skala links für gestrichelte Kurve. Skala rechts für ausgezogene Kurve.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Synthesen

Trimethylchinon erhielt man durch Oxydation von 2,3,5-Trimethylphenol mit Fremysalz in einer Ausbeute von 70 - 80 % nach einer analogen Vorschrift von Weygand et al. [43].

Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren des Hydrochinons in hochsiedendem Petroläther.

³H-markiertes Trimethylchinon, wurde nach Vorschriften von Billeter und Stoffel [14, 15, 32] für die Herstellung von ³H-Menadion und ³H-Ubichinon (0) dargestellt, durch Bromierung des 2,5,6-Trimethyl-hydrochinon-diacetates mit N-Bromsuccinimid und anschließender Tritiiierung der bromierten Verbindung mit einem Palladium-Katalysator. Das tritiierte Diacetat wurde mit LiAlH₄ verseift und mit Silberoxyd oxydiert. Die Reinigung erfolgte an der 100-fachen Menge Alox sauer II. Das Trimethylchinon wurde mit Hexan und 1 - 3 % Aether eluiert. Die Ausbeuten sind nicht besonders hoch und betragen kaum mehr als 20 % der Theorie.

Spezifische Aktivität: 50'000 cpm/ μ g.

6,7,10,11,14,15 - ³H-Isophytol

1 g Farnesylaceton (3,8 mMol) wurde in 10 ml 1,2-Dimethoxyäthan gelöst und mittels Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) in einer speziellen, von uns modifizierten Tritiumapparatur tritiiert.

Es wurde ein ³H₂/H₂ Gemisch verwendet, das ungefähr 0,9 C³H enthielt.

Zur Abtrennung des Katalysators wurde nach beendeter Wasserstoffaufnahme (ca. 3 Stunden) durch Celit abgenutscht und das Lösungsmittel vorsichtig am Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Das zurückgebliebene radioaktive 6,10,14-Trimethylpentadecanon wurde zur Trocknung zweimal mit absolutem Alkohol versetzt und wieder eingedampft.

Acetylsynthese

In einem 100 ml Schliffgrundkolben, mit einem Dreihalsaufsatz, wurden direkt aus einer Bombe ca. 70 ml flüssiger Ammoniak vorgelegt und mit einem Magnetrührer

gerührt. In diesem Ammoniak wurde 95 mg sauberes Natrium gelöst (4,1 mMol). Durch die tiefblaue Lösung wurde getrocknetes Acetylen geleitet. Nachdem sich die Lösung entfärbt hatte, wurde unter weiterem Durchleiten von Acetylen das radioaktive ^3H -Trimethylpentadecanon, gelöst in 10 ml Petroläther, vorsichtig zugetropft. (Dauer ca. 30 Minuten). Danach wurde mit wenig Petroläther nachgespült, das Reaktionsgefäß mit einem Plastikdeckel mit kleiner Oeffnung verschlossen und über Nacht in einem Stahlzylinder dicht eingeschlossen. Anderntags wurde das Stahlgefäß auf -30°C gekühlt, vorsichtig geöffnet und der flüssige Ammoniak abgedampft. Die Aufarbeitung des Rückstandes erfolgte in der üblichen Weise im Reaktionskolben selbst, durch Verdünnen mit ca. 30 ml Heptan, Waschen mit Wasser, 1 n Salzsäure und wieder Neutralwaschen, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen des Lösungsmittels. Das so erhaltene ^3H -Dehydroisophytol wurde mit Lindlarkatalysator zu Iso-phytol reduziert. An Hand der Wasserstoffaufnahme errechnete man die Ausbeute der Acetylsynthese, die 95 % betrug. Das Isophytol wurde direkt für die Kondensation mit Trimethylhydrochinon verwendet.

Trimethyl-phytyl-1,4-benzochinon

Ein 10 ml Schliffkolben, mit Magnetrührer und aufgesetztem Rückflusskühler, durch den Stickstoff ein- und ausgeleitet werden konnte, enthielt 592 mg (2 mMol) ^3H -Isophytol in ca. 5 ml reinem absolutem Dioxan gelöst. Möglichst rasch und in inerter Atmosphäre erfolgte der Zusatz von 304 mg (4 mMol) Trimethylhydrochinon, das unter Stickstoff gelöst wurde, worauf in der gleichen Art und unter Rühren 0,1 ml Bortrifluoridätherat zugesetzt wurde. Unter Rühren und ständigem Spülen mit Stickstoff wurde das Reaktionsgemisch während 1 Stunde auf $50^{\circ} - 55^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Darauf wurde das Gemisch abgekühlt und mit ca. 40 ml Aether in einen 100 ml Langhals-Rundkolben gespült. Zwecks Entfernung von nicht umgesetztem Trimethylhydrochinon wurde einmal mit Claisenlauge gewaschen, die ätherische Lösung wieder neutralisiert, mit Natriumsulfat getrocknet und mit einem Ueberschuss an Silberoxyd oxydiert (2 - 3 Stunden). Darnach wurde vom Silberoxyd abgetrennt, das Lösungsmittel abgedampft, mit möglichst wenig Heptan aufgenommen und an der hundertfachen Menge Alox sauer II chromatographiert. Die gelbe Zone mit dem Trimethyl-phytylbenzochinon wurde mit Heptan eluiert. Die Ausbeuten dieser Kondensation schwanken zwischen 30 und 40 % der Theorie. Das so erhaltene Trimethylphytylbenzochinon erwies sich, sowohl radiochemisch als auch chemisch als sehr rein, was

mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und Gegenstromverteilung nachgeprüft wurde. Spezifische Aktivität: 200'000 cpm/ μ g.

Diese Kondensation und die Chromatographie wurden im Dunkeln ausgeführt.

^3H -dl- α -Tokopherol [12]

120 mg reines ^3H -Trimethylphytylchinon wurden in 5 ml Aethanol und 2 ml Dioxan gelöst. Dazu gab man ca. 100 mg Zinn (II)-chlorid und 0,5 ml konzentrierte Salzsäure. Das farblose Gemisch wurde während 3 - 4 Stunden bei 90°C unter Stickstoff gerührt, daraufhin abgekühlt, mit Aether verdünnt, neutral gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Das so gewonnene α -Tokopherol erwies sich praktisch als rein. Spuren von nicht umgesetztem Ausgangsprodukt wurden durch Chromatographie auf Alox neutral II abgetrennt. Ausbeute 95 - 100 % der Theorie. Spezifische Aktivität: 200'000 cpm/ μ g. Das Tritium befindet sich in der Methylgruppe an der Stelle 2 des Moleküls und in den Positionen 1', 3', 4', 7', 8', 11', 12' der Seitenkette. Alle Operationen wurden im Dunkeln ausgeführt.

$E_{2(20)}$, $E_{2(25)}$, $E_{2(45)}$ und $E_{2(50)}$, die isoprenologen Trimethylbenzochinone wurden nach der gleichen Vorschrift wie das Trimethylphytylbenzochinon durch Kondensation der entsprechenden Polyisoprenalkohole mit Trimethylhydrochinon dargestellt ¹⁾.

$E_{2(5)}$, 3-Dimethylallyl-2,5,6-trimethylbenzochinon, wurde erhalten durch Kondensation von Trimethylhydrochinon mit 1,2- ^3H -Methylbutenol-(3) mittels Bortrifluorid-ätherat, analog der Vorschrift für die Herstellung von Ubichinon (5) [30]. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Alox sauer II. UV: Max. 259/268 m μ ; Min. 263 m μ . Goldgelbes Oel, spezifische Aktivität: 150'000 cpm/ μ g. 1,2- ^3H -3-Methylbutenol-(3) wurde durch Hydrierung von 3-Methylbutin- $\Delta(1,2)$ -ol-(3) mit einem Tritium-Wasserstoff-Gemisch mittels Lindlar-Katalysator gewonnen.

Iso $E_{2(5)}$, 2,5,6-Trimethyl-3-isopentenyl-1,4-benzochinon, wurde durch H. P. Bosshardt [30] in unserem Labor synthetisiert. Spezifische Aktivität: 130'000 cpm/ μ g.

1) Solanesol, Farnesyl-farnesyl-geranyl-linalool und Geranyl-geranyl-aceton wurden von der Firma Hoffmann-La Roche in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-(β -carboxy-äthyl)-acetoxy-chroman wurde dargestellt durch Kondensation von Trimethyl-hydrochinon mit Tritium-markiertem γ -Vinyl- γ -oxy-valerian-säurelacton mittels Bortrifluorid-ätherat und wasserfreiem Zinkchlorid in Eisessig und Essigsäureanhydrid bei 80° - 90°C nach der Vorschrift von Weichet [19]. Das markierte γ -Vinyl- γ -oxy-valeriansäurelacton wurde durch Tritieren der γ -Aethinylverbindung mittels Lindlar-Katalysator in thiophenfreiem Benzol, gewonnen. Die γ -Aethinylverbindung wurde nach [44] Kreimeier dargestellt. Spezifische Aktivität des Endproduktes 50'000 cpm/ μg , pK (gemessen in Methylglycol) 7,15.

Das Tokopheronolacton wurde ebenfalls nach Angaben von Weichet [19] aus dem 2, 5, 7, 8-Tetra-methyl-2-(β -carboxy-äthyl)-6-acetoxychroman durch Verseifen mit methanolischer Kalilauge und anschliessender Oxydation mit Cersulfat dargestellt. Die Reinigung des radioaktiven Lactons erfolgte an der 100-fachen Menge Alox neutral, Stufe II. Spezifische Aktivität: 58'000 cpm/ μg .

2, 2', 5, 7, 8-Pentamethyl-6-oxychroman ($3, 4\text{-}^3\text{H}$), erhielt man fast quantitativ durch Behandeln von Dimethylallyltrimethylbenzochinon ($\text{E}_{2(5)}$) mit Zinn (II)-chlorid und konz. Salzsäure in Dioxan : Alkohol (10 : 3) bei 80° - 90° während 2-3 Std. Die Reinigung des inaktiven Produktes erfolgte durch Umkristallisieren aus Methanol und Wasser. Das radioaktive Produkt wurde durch Chromatographie an Alox neutral (II) gereinigt. Spezifische Aktivität: 150 000 cpm/ μg .

FP: 90°C ; UV: max. 292 m μ ; Min. 257 m μ .

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-carboxyl-6-oxychroman wurde dargestellt aus ^3H ($1', 2'$), 2, 4, 5-Trimethyl-3, 6-diacetoxy-benzylidenaceton, das mit konzentrierter Na-hydrogensulfidlauge (während 48 Std. geschüttelt) in die Hydrosulfit-Additionsverbindung übergeführt wurde, aus der man mit konzentrierter KCN-Lösung das Cyanhydrin erhielt, das direkt anschliessend mit konzentrierter Salzsäure durch Kochen am Rückfluss hydrolysiert wurde, was direkt das Endprodukt lieferte. Die Reinigung erfolgte mit K-Bicarbonat über das K-Salz und anschliessend durch Umkristallisieren aus Methanol/Wasser. Die Ausbeute ist sehr niedrig und beträgt nur ca. 10 %. Spezifische Aktivität: 70'000 cpm/ μg .

FP: 179°C ; UV: Max. 292 m μ ; Min. 257 m μ .

pK gemessen in Aethylenglycolmonomethyläther: 6,58.

Das Tritium-markierte 2,4,5-Trimethyl-3,6-diacetoxy-benzylaceton wurde erhalten durch Tritiierung von 2,4,5-Trimethyl-3,6-diacetoxybenzylidenaceton, welches uns von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt wurde.

3,4-¹⁴C-dl- α -Tokopherol wurde nach der schon beschriebenen Vorschrift für ³H-dl- α -Tokopherol aus ¹⁴C-Isophytol dargestellt.

Spezifische Aktivität: 20'000 cpm/ μ g.

d-¹⁴C- α -Tokopherolacetat mit einer spez. Aktivität von 1,7 μ c/mg und ¹⁴C-Isophytol erhielten wir in freundlicher Weise von der Firma Hoffmann-La Roche.

Die Oxydationsprodukte I, II und III des α -Tokopherols (siehe Formelschema IV) wurden nach den Vorschriften von NeI an [38] dargestellt.

dl- α -Tokopherylchinon, wurde durch Oxydation von α -Tokopherol mit Bleitetraacetat erhalten [45].

II. Biochemische Methoden und analytische Hilfsmittel

Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten vorzugsweise Hühner im Alter von 6 - 8 Wochen und mit einem Gewicht von etwa 250 - 300 gr. Diese wurden von der 2. oder 3. Lebenswoche an auf der von H. Dam und Mitarbeiter [22] angegebenen lebertrreichen Diät A (Diät 97) oder einer Diät B die sich gleich zusammensetzte, aber an Stelle des Lebertranes ein gehärtetes Astrafett enthielt, gehalten.

Zusammensetzung:

<u>Diät A</u>		<u>Diät B</u>
Casein unextr.	150 g	
Hefe getr. (Aetherextr.)	100 g	
Sucrose	449 g	
Gelatine	80 g	
Salzmischung (nach Hubel-Wakemann)	50 g	
Cholin-Chlorid	1 g	
Lebertran	100 g	gehärtetes Astrafett
Vitamin K	10 mg	

Für die Versuche mit Kaninchen dienten ca. 8 - 10 Wochen alte Hasenkaninchen, die kurz nach der Entwöhnung eine Vitamin E-freie Kost [20] erhielten. Die Kreatininbestimmung im Harn dieser Tiere erfolgte nach der Methode von Eggleton et al. [46].

Applikation, Aufarbeitung und Extraktion der Organe

Soweit die zu verfütternden Substanzen einigermaßen wasserlöslich waren, wurden sie in Feinsprit : Wasser 1 : 5 gelöst, andernfalls wurden sie mit Hilfe von möglichst wenig Cremophor EL (BASF, Ludwigshafen) in Lösung gebracht.

Die Applikation erfolgte mittels einer Pipette per os, oder wurde intravenös in die Flügelvene injiziert (Menge Lösung 0,5 - 1 ml).

Die zu untersuchenden Organe wurden möglichst rasch aus den toten Tieren herauspräpariert und in flüssigen Stickstoff gegeben. Zusammen mit Trockeneis wurden die hartgefrorenen Organe in einer Reibschale zerrieben, in eine Petrischale gegeben und lyophilisiert. Die getrockneten Organe wurden im Bühler-Homogenisator bei RT mit absolutem, peroxydfreiem Aether dreimal extrahiert. Die Aetherauszüge wurden durch Celit filtriert, am Wasserstrahlvakuum eingengt und der Rückstand entweder sofort weiterverarbeitet, oder dann bei -20°C , später sogar bei -60°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Untersuchung der Extraktionsausbeuten, je einer Hühnerleber, die zuerst in der beschriebenen Art mit Aether, anschliessend dreimal mit Chloroform : Methanol 3 : 1 extrahiert wurde und der Geweberückstand nach Rutschmann und Kalberer [47] verbrannt und das Tritiumwasser gezählt wurde, ergaben bei einem drei Wochen dauernden Versuch mit Seitenketten markiertem α -Tokopherol und markiertem $\text{E}_{2(50)}$ folgendes Resultat:

Versuche mit Seitenketten markiertem Vitamin E	Versuche mit $^3\text{H-E}_{2(50)}$
Extraktionsausbeute	Extraktionsausbeute
Aether 60,3 %	90 %
CHCl_3 : MeOH = 3:1 24,4 %	7 %
Rest-Aktivität im Gewebe 15,3 %	3 %

Die Gewinnung der Lebermitochondrien erfolgte nach Hogeboom und Schneider [48]. Die Extraktion der verschiedenen Zellfraktionen wurde wie oben mit abs. Aether durchgeführt.

Analytische Methoden und Hilfsmittel

Die Gegenstromverteilung wurde in einer 34-stufigen Apparatur, die von der Firma Bühler in Tübingen geliefert wurde und die pro Element je 3 ml Ober- und Unterphase fasste, im System Methylglycol/Heptan ausgeführt [49].

Tabelle 3 zeigt das Verhalten einiger Substanzen in der 34-stufigen Gegenstromverteilung im System Methylglycol/Heptan.

Tabelle 3

Substanz	Maximum-Fraktion
α -Tokopherol	17 - 19
α -Tokopherylchinon	17
Phytol	17
α -Tokotrienol	14/15
E ₂₍₄₅₎ -Chromanol	23
Trimethylbenzochinon (E ₀)	10
E ₂₍₅₎ , Iso E ₂₍₅₎	14
E ₂₍₁₀₎	17 - 18
E ₂₍₁₅₎	21
E ₂₍₂₀₎	24
E ₂₍₄₅₎	28/29
E ₂₍₅₀₎	28/29
E ₂₍₄₅₎ -diacetat	23
E ₂₍₅₀₎ -diacetat	24/25
Trimethylphytylchinon	26/27
α -Tokopherol-acetat	23
Oxydationsprodukt I	29/30
Oxydationsprodukt II	28/29
Oxydationsprodukt III	24/25
Geranyl-geraniol	14/15
Solanesol	23
α -Tokopheronolacton	2
2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(β -carboxy-äthyl)- acetoxo-chroman	2
2, 2', 5, 7, 8-Pentamethyl-6-oxy-chroman	5
2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-carboxyl-6-oxy- chroman	1

Dünnschichtchromatogramm

Als besonders vorteilhaft für die Analyse der Organextrakte erwies sich die Dünnschichtchromatographie nach Stahl [50]. Der Kieselgelschicht wurde stets etwas Fluorescein zugesetzt zur bessern Sichtbarmachung von im UV absorbierenden Substanzen, vor allem von Chinonen und Chromanolen. Die Kieselgelschicht wurde mit Hilfe des Streichgerätes oder mittels einer Spritzpistole mit Druckluft aufgespritzt. Als Laufmittel wurde vorzugsweise absolutes Benzol verwendet. Die R_F -Werte lassen sich im allgemeinen nicht genau reproduzieren, weshalb immer mit Vergleichssubstanzen gearbeitet wurde, die entweder dem Extrakt direkt zugesetzt oder aber parallel dazu aufgetragen wurden.

Um genügend Radioaktivität auf der Platte zu haben, wurden 10 - 15 Punkte auf derselben Platte parallel aufgetragen. Mit Hilfe von speziellen, verschieden breiten Spateln wurde dann die Kieselgelschicht in Streifen von 3 mm, 5 mm, usw. je nach den Erfordernissen abgekratzt und direkt in Zählgläschen gegeben, mit Zählösung versetzt [5 ml Toluol mit 0,3 % 2,5-Diphenyloxazol, "PPO"] und in einem Tri-Carb Liquid Scintillation-Spectrometer der Firma Packard Instrument Co., La Grange, Illinois, mit dem alle in dieser Arbeit vorkommenden Radioaktivitätsmessungen durchgeführt wurden, gezählt [14].

Papierchromatogramme

Papierchromatogramme wurden im absteigenden Verfahren mit paraffiniertem Watmann I-Papier mit absolutem Alkohol als Laufmittel ausgeführt. Das Papier wurde mit einer Petrolätherlösung die 3 % Paraffinöl enthielt paraffiniert. Anschliessend wurde das Papier mit einer wässrigen Fluoreszeinlösung behandelt, zur Sichtbarmachung von ungesättigten Verbindungen mit Bromdämpfen und zur besseren Erkennung von im UV absorbierenden Substanzen.

Bei der Untersuchung der radioaktiven Organextrakte wurde stets zusammen mit inaktiven Vergleichssubstanzen chromatographiert. Für die Bestimmung der Radioaktivität wurden die zu untersuchenden Stellen herausgeschnitten und in kleinen Papierschnitzeln direkt in die Zählgläschen zusammen mit der Zählösung gegeben.

Für die fachgemässe Betreuung der Versuchstiere und für zuverlässige Mit-
hilfe bei Tierversuchen möchte ich unserem Tierwärter, Herrn H. Friedrich
bestens danken.

Fräulein Ursula Kohler, Fräulein Rosemarie Aeschbacher,
Fräulein Ursula Huber und Fräulein Bärbel Rücker danke ich für ihre
zuverlässige Mitarbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von verschieden markiertem α -Tokopherol wurde der Stoffwechsel des Vitamin E im Tier untersucht und es wurde in verschiedenen Organen eine Reihe von Umwandlungsprodukten gefunden.

Besonders bemerkenswert ist die Bildung kleiner Mengen $E_{2(50)}$, des Trimethyl-farnesyl-farnesyl-geranyl-geranyl-1,4-benzochinons aus dem α -Tokopherol. Wahrscheinlich hängt diese Umwandlung mit der biochemischen Funktion des α -Tokopherols zusammen. Die grosse strukturelle Aehnlichkeit des $E_{2(50)}$ mit Ubichinon (50) und den K-Vitaminen lassen eine Beteiligung an den oxydativen Prozessen in der Zelle vermuten.

Mit Hilfe verschiedener Markierungen konnte der angenommene Bildungsmechanismus des $E_{2(50)}$, der einen Abbau der Seitenkette des α -Tokopherols voraussetzt, gestützt werden. Der Aufbau des $E_{2(50)}$ vollzieht sich durch Verlängerung der Isoprenseitenketten von Trimethylchinonen, was für $E_{2(20)}$ und $E_{2(25)}$ nachgewiesen wurde.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. M. Evans und S. Bishop, *Am. J. Physiol.* 63, 396 (1923).
- [2] H. A. Mattill und R. E. Conklin, *J. Biol. Chem.* 44, 137 (1920).
- [3] H. M. Evans, *Vitamins and Hormones*, Bd. 20, p. 379 (1962).
- [4] H. M. Evans, O. H. Emerson und G. A. Emerson, *J. Biol. Chem.* 113, 319, 328 (1936).
- [5] E. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* 60, 700 (1938).
- [6] P. Karrer et al., *Helv. Chim. Acta*, 21, 520 (1938).
- [7] A. R. Todd et al., *J. chem. Soc.*, 1938, 1382.
- [8] C. Martius, 3e Congr. Int. Biochim. (Bruxelles 1955), Conf. 1.
- [9] A. Nason et al., *Bioch. Bioph. Acta*, 26, 665 (1957).
- [10] A. T. Milhorat et al., *Arch. Bioch. Bioph.* 57, 496 (1955).
- [11] O. B. Houchin und H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.* 146, 301, 309 (1942).
- [12] J. Gosteli, *Dissertation ETH*, Zürich (1960), Prom. Nr. 2998.
- [13] O. Isler und K. Döbel, *Helv. chim. Acta* 37, 230 (1954).
- [14] M. Billeter, *Dissertation ETH*, Zürich (1961), Prom. Nr. 3176.
- [15] M. Billeter und C. Martius, *Biochem. Z.* 333, 430 (1960).
- [16] L. Ruzicka und G. Firmenich, *Helv. chim. Acta* 22, 392 (1939).
- [17] H. Lindlar, *Helv. chim. Acta* 35, 446 (1952).
- [18] R. Ruegg, U. Gloor, A. Langemann, M. Koffler, C. von Planta, G. Ryser und O. Isler, *Helv. chim. Acta* 43, 1745 (1960).
- [19] J. Weichet, L. Blàka und B. Kakác, *Collection* 24, 1689 - 1894 (1959).
- [20] M. Goetsch und A. M. Pappenheimer, *J. exp. Med.* 54, 145 (1931).
- [21] E. J. Simon, C. S. Gross und A. T. Milhorat, *J. biol. chem.* 221, 797, 807 (1956).
- [22] H. Dam. J. Kruse, J. Prange und E. Sondergaard, *Biochem. biophys. Acta* 2, 501 (1948).
- [23] C. Martius und H. Eilingsfeld, *Liebigs Ann. Chem.* 607, 159 (1957).
- [24] C. Martius, *Vitamins and Hormones* 20, 457 (1962).
- [25] C. Martius und E. Fürer, *Biochem. Z.* 336, 106 (1962).
- [26] J. A. Green, T. Diplock, J. Burnyan, E. E. Edwin and D. Mac Hale, *Nature (Lond.)* 190, 318 (1961).

- [27] J. Green und S. Marienkiwicz, *Analyt.* 85, 297 (1959).
J. Green et al., *Chem. u. Ind.* p. 73 (1960).
- [28] A. L. Badarach and J. Green, *Chem. u. Ind.* 1961, p. 2135.
- [29] K. Schwarz, *Vitamins and Hormones* 20, 463 (1962).
- [30] H. - P. Bosshardt, *Dissertation ETH, Zürich* (1963) im Druck.
- [31] K. Müller, *ETH, Zürich*, unveröffentlichte Versuche.
- [32] W. Stoffel und C. Martius, *Biochem. Z.* 333, 400 (1960).
- [33] F. J. Lynen *Cell cong. Physiol.*, 54, suppl. I p. 33 und *Ciba Foundation Symposium*, London 1961, p. 244.
- [34] F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning und J. Kessel, *Angew. Chem.* 70, 738 (1958).
- [35] P. Alaupovic et al., *Am. J. Clin. Nutrition* 9, p. 76 (1961).
- [36] A. Saari, C. Sallany and H. H. Draper, *Arch. of Biochem.* 100, 335 (1963).
- [37] O. Wiss, R. H. Bunnell and U. Gloor, *Vitamins and Hormones* 20, 441 (1962).
- [38] D. R. Nelan and Ch. D. Robeson, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 2963 (1962).
- [39] L. L. Smith, W. B. Irvin and H. E. Ungnade, *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2424 (1939).
- [40] M. Furter und R. E. Meyer, *Helv. chim. Acta* 22, 240 (1939).
- [41] J. R. Chipault, W. O. Lundbery and G. O. Burr, *Arch. Biochem.* 8, 321 (1945).
- [42] J. G. Baxter, C. D. Robeson, J. D. Taylor and R. W. Lehmann, *J. Am. chem. Soc.* 65, 918 (1943).
- [43] F. Weygand, H. Weber und E. Markawa, *Ber.* 90, 1879 (1957).
- [44] O. R. Kreimeier, *US Pat.* 2 122 719; *Chem. Z.* 1839 II 4311.
- [45] A. Issidorides, *J. Am. chem. Soc.* 73, 5147 (1951).
- [46] P. Eggleton, S. R. Elsdon und N. Gough, *Bioch. J.* 37, 526 (1943).
- [47] F. Kalberer und J. Rutschmann, *Helv. chim. Acta* 44, 1956 (1961).
- [48] W. C. Schneider und H. H. Hogeboom, *J. Biol. Chem.* 183, 133 (1950).
- [49] E. Hecker, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag Chemie, Weinheim, p. 34 (1955).
- [50] E. Stahl, *Chemiker Z.* 82, 323 (1958).

LEBENS LAUF

Am 30. Oktober 1936 wurde ich in St. Gallen am Bodensee geboren. Als Zweitältester von sieben Geschwistern wuchs ich in St. Gallen auf, wo ich auch die Schulen besuchte. Nach sechs Jahren Primarschule, zwei Jahren Gymnasium und viereinhalb Jahren Oberrealschule erhielt ich im Jahre 1955 das Maturitätszeugnis, Typ C. Im Herbst 1956 wurde ich an der Abteilung für Naturwissenschaften (X) der Eidgenössischen Technischen Hochschule immatrikuliert und diplomierte im Herbst 1960 in chemisch physikalischer Richtung. Seither bin ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Martius an der Ausarbeitung meiner Dissertation am Biochemischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule beschäftigt.