

Das IR-Spektrum in KBr (Abb. 1) zeigt die Banden für die drei verschiedenen Carbonylfunktionen: Pyruvat-carbonyl 1720 cm^{-1} , Thioester-carbonyl 1680 cm^{-1} , Amid-carbonyl 1645 cm^{-1} (Amid I) und weitere charakteristische Hauptbanden bei 3300 (NH) , 1545 (Amid II) , $890\text{ cm}^{-1}\text{ (C-S?)}$.

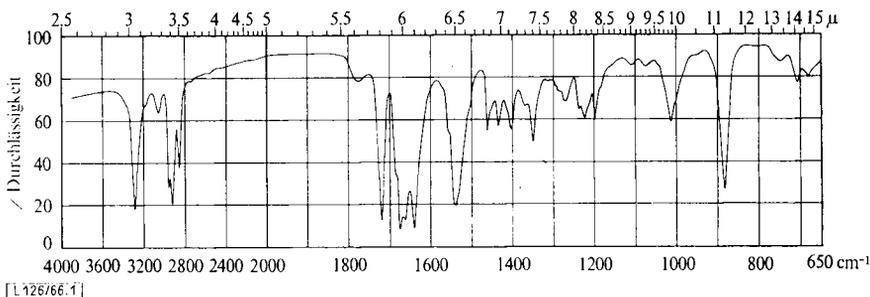


Abbildung 1. IR-Spektrum (in KBr) von *S*-Pyruvoyl-*N*-octanoyl-cysteamin

Das UV-Spektrum (Abb. 2) weist — wie auch die Spektren der Thioester von β -Oxo- und α,β -ungesättigten Carbonsäuren⁷⁾ — zwei Banden auf; die Maxima liegen bei $238\text{ (}\epsilon = 2900\text{)}$ und $285\text{ m}\mu\text{ (}\epsilon = 820\text{)}$.

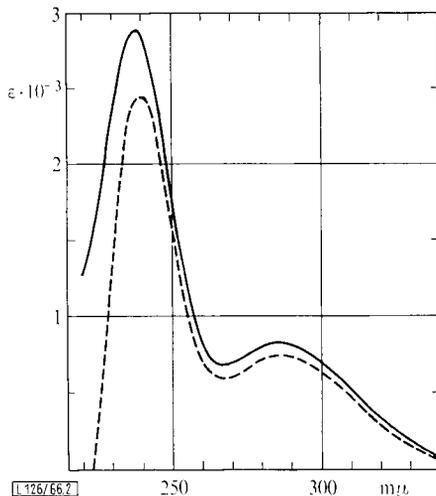


Abbildung 2. UV-Spektrum von *S*-Pyruvoyl-*N*-octanoyl-cysteamin in $0,1\text{ m}$ Phosphat pH 6, 10-proz. Äthanol (— — — Differenzspektrum gegen Hydrolyseprodukte)

Erwartungsgemäß werden die Thioester der Brenztraubensäure bereits bei neutralem pH rasch hydrolysiert. Die durch Absorptionsmessung bei $238\text{ m}\mu$ im Bereich

⁷⁾ Vgl. K. Decker, Die aktivierte Essigsäure, S. 84, Enke-Verlag, Stuttgart 1959.

pH 6.8 bis 8.5 ermittelten RG-Konstanten 1. Ordnung sind der OH-Ionen-Konzentration direkt proportional (Abb. 3). Die daraus berechnete RG-Konstante 2. Ordnung für die alkalische Hydrolyse von **2** (25°; 10-proz. Tetrahydrofuran) beträgt $6.9 \cdot 10^4$ [$l \cdot \text{Mol}^{-1} \text{Min.}^{-1}$]. Sie ist um den Faktor ca. 10^4 größer als die RG-Konstante für einen ähnlichen Thioester der Propionsäure. Den gleichen Faktor, der auf die α -Oxogruppe zurückgeht, findet man auch in der O-Ester-Reihe (Tabelle 1).

Tabelle 1. RG-Konstanten der alkalischen Hydrolyse bei 25°

Verbindung	k_2 [$l \cdot \text{Mol}^{-1} \text{Min.}^{-1}$]	Lit.
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	5.9	8)
$\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	$1.1 \cdot 10^5$	$4.8 \cdot 10^4$ 8) 9)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COSCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	6.5	10)
$\text{CH}_3\text{COCOSCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	$6.9 \cdot 10^4$ a)	—

a) in THF/Wasser (1:9).

Bei der zu analytischen Zwecken oft benutzten Umsetzung der Thioester mit Hydroxylamin wird **2** in α -Oximino-propionyl-hydroxamsäure übergeführt. Bei pH 7 ist die Reaktion an der α -Oxogruppe nicht wesentlich langsamer als die Hydroxylaminolyse der Thioesterbindung, da auch mit limitierenden Mengen Hydroxylamin überwiegend die Oximhydroxamsäure und nur sehr wenig Pyruvoyl-hydroxamsäure entsteht.

Durch Umesterung⁶⁾ läßt sich **2** mit Coenzym A in *S*-Pyruvoyl-Coenzym A überführen, wobei die Gleichgewichtseinstellung bei neutralem pH binnen weniger Minuten erreicht wird.

Versuche, das Substratpaar Pyruvoyl-Coenzym A/Lactoyl-Coenzym A mit NADH/NAD¹¹⁾ an der Alkoholdehydrogenase der Bäckerhefe zur Reaktion zu bringen, sind uns nicht gelungen; obwohl Lactoyl-Coenzym A als Substrat dieses Enzyms beschrieben wurde^{2, 12)}. Zusammen mit dem bekannten Gleichgewicht für Pyruvat + NADH \rightleftharpoons Lactat + NAD würde die Kenntnis dieses Redoxgleichgewichts einen Aufschluß über den Aktivierungsgrad der Brenztraubensäure im Pyruvoyl-Coenzym A (ΔG der Hydrolyse) geben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen.

8) A. Skrabal, F. Pfaff und H. Airoidi, Mh. Chem. **45**, 141 (1924).

9) J. Barthel und G. Bäder, Z. physik. Chem. **48**, 109 (1966).

10) H. Eggerer, Dissertation Univ. München 1957; der für 15° angegebene Wert wurde mit $\Delta H^* = 14$ Kcal auf 25° extrapoliert.

11) NAD, NADH = oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid.

12) R. Rabin, R. E. Megraw, H. C. Reeves und S. J. Aji, Life Sciences **4**, 1233 (1965).

Beschreibung der Versuche

Zur *Papier-* und *Dünnschichtchromatographie* dienten a) *n*-Amylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:5, obere Phase); b) sek. Butanol/HCOOH/Wasser (75:13:12); c) Benzol/Eisessig/Cyclohexan (10:2:10); d) Petroläther/Essigester/Eisessig (130:30:5). Sprühreagentien waren 0.1-proz. KMnO_4 für Thioalkohole, Thioester, Disulfide; 0.01 *m* 5.5'-Dithio-bis-[2-nitrobenzoat] unter Einwirkung von NH_3 -Gas (Thioalkohole, Thioester); 5-proz. FeCl_3 in äthanol. HCl (Hydroxamsäuren); oder 1 *m* NH_2OH , dann FeCl_3 (Thioester).

S-Pyruvoyl-*N*-octanoyl-cysteamin (**2**). — 2.9 ccm (42 mMol) *Brenztraubensäure* in 160 ccm wasser- und peroxidfreiem Tetrahydrofuran wurden mit 5.8 ccm (42 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert und bei -30° innerhalb 15 Min. mit 3.86 ccm (42 mMol) POCl_3 versetzt. Nach erneuter Zugabe von wenig *Triäthylamin* bis zur Neutralreaktion wurde bei -20° die Lösung von 3.5 g (17 mMol) *N*-Octanoyl-cysteamin⁶⁾ in 20 ccm Pyridin eingetropf und 1 Sde. gerührt. Es wurde in Eiswasser gegeben, sofort mit HCl angesäuert und 2 mal mit Essigester extrahiert. Nach Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen verblieben 7.5 mMol (44%) **2** als gelbes Öl, das in Essigesterlösung über Al_2O_3 (2×14 cm; Aktiv-Stufe III, sauer; Woelm) filtriert, 2.3 g Rohprodukt lieferte. — Zur anschließenden Säulenchromatographie wurde Silikagel (0.05 bis 0.2 mm; Merck) mit 20-proz. Essigsäure gründlich gewaschen, 3 Stdn. bei 120° getrocknet und mit 8% Wasser deaktiviert. Mit Benzol und steigendem Essigesterzusatz wird **2** bei 2–6%, restliches *N*-Octanoyl-cysteamin bei 5–10% Essigester eluiert. Günstiger war die vorherige Oxydation des Thioalkohols. Hierzu wurde das 0.9 mMol *RSH* enthaltende Rohprodukt in 12 ccm Eisessig mit 2.5 ccm (1.2 mg-Atome) *Brom* in Eisessig versetzt (bleibende Bromfarbe); dann wurde etwas Wasser zugefügt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde in Benzol auf Silikagel (2×7 cm) gegeben und **2** mit Benzol/Essigester (2–6%) eluiert. Zweimalige Kristallisation aus Essigester/Petroläther lieferte 980 mg (21%) schwach gelbliches **2** vom Schmp. 41° ; leicht löslich in THF, Benzol, Essigester, Eisessig, Alkohol. — Die Isolierung wurde durch DC an Kieselgel-HF (Merck) in den Fließmitteln c) bzw. d) überprüft; $R_F = 0.17$ bzw. 0.25; für *N*-Octanoyl-cysteamin 0.21 bzw. 0.30; für *N,N'*-Diocanoyl-cystamin 0.06 bzw. 0.07.

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}$ (273.4) Ber. C 57.11 H 8.48 N 5.12 Gef.¹³⁾ C 57.37 H 8.54 N 5.14

Die *RG-Konstanten der Hydrolyse von 2* wurden diskontinuierlich bei 238 $m\mu$ (Thioester) ermittelt. Aus dem unter Argon gehaltenen Gemisch von 18 ccm Puffer und 2 ccm der Lösung von ca. 10 μMol **2** in THF wurden jeweils 1.5 ccm zu 1.5 ccm 0.5 *n* H_2SO_4 gegeben und die Extinktion im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen (E_t). Der Endwert E_∞ wurde nach 6 Halbwertszeiten oder durch Erwärmen auf 50° ermittelt. Die pH-Messung erfolgte mit der Glaselektrode in der THF-haltigen Reaktionsmischung. Abb. 3 und Tab. 2 enthalten die *RG-Konstanten* 1. Ordnung für das betreffende pH, Tab. 1 bimolekulare *RG-Konstanten*. — In 0.02 *n* HCl hydrolysiert **2** binnen 5 Stdn. (25°) zu ca. 2%.

Umsetzung mit Hydroxylamin: Zur quantitativen Bestimmung¹⁴⁾ von **2** oder Pyruvoyl-Coenzym A werden Anteile der wäßr. oder THF-Lösung zu 0.5 ccm 2 *m* NH_2OH (pH 7)

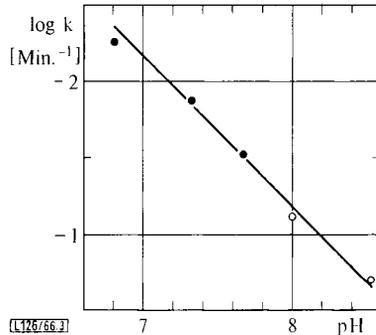
¹³⁾ Mikroanalytisches Laboratorium I. Beetz, 864 Kronach.

¹⁴⁾ E. R. Stadtman, in S. P. Colowick und N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, Bd. 3, S. 938, Academic Press, New York 1957.

Tabelle 2. Hydrolyse von **2** bei 25° in 0.09 *m* Phosphat pH 7.32 (10% THF); $k = 1.33 \cdot 10^{-2}$ [Min.⁻¹]; $t_{1/2} = 52$ Min.

t [Min.]	$E_t - E_\infty$	$\log \frac{E_0 - E_\infty}{E_t - E_\infty}$	$10^2 \cdot k$ [Min. ⁻¹]
0	0.645	0	—
7	0.590	0.039	1.29
17	0.510	0.102	1.38
27	0.450	0.156	1.33
57	0.300	0.333	1.33
87	0.200	0.509	1.34
117	0.140	0.664	1.31

Abbildung 3
pH-Abhängigkeit der Hydrolyse
von **2** bei 25° (● 0.09 *m* Phosphat, ○ 0.09 *m*
Pyrophosphat; 10% THF)



gegeben; nach 10 Min. (30°) ergänzt man mit Wasser auf 1.5 ccm und versetzt mit 1.5 ccm FeCl_3 -Lösung¹⁴⁾. Ausgefallenes *N*-Octanoyl-cysteamin wird mit wassergesätt. Essigester extrahiert. $\Delta E_{546}^{1\text{cm}} = 0.205/\mu\text{Mol}$. Der gleiche Wert wird auch mit NH_2OH -Lösungen von pH 6 und pH 8 erhalten; demnach fällt die simultane Hydrolyse nicht ins Gewicht.

Als Produkt der Umsetzung mit überschüssigem NH_2OH wurde α -Oximino-propionyl-hydroxamsäure¹⁵⁾ isoliert; Schmp. 155°, Zers. (Lit.-Schmp. 161°, Zers.); R_F auf Papier Whatman Nr. 1 im System a) 0.59, b) 0.67.

Pyruvoyl-hydroxamsäure. — In 0.5 ccm Pyridin/Wasser (1:1; mit Essigsäure auf pH 7 abgepuffert) wurden 41 mg (150 μMol) **2** mit 0.15 ccm 1 *m* NH_2OH (pH 7) umgesetzt. Nach 5 Min. wurde mit Essigsäure angesäuert und der gesamte Ansatz, der ca. 60 μMol Hydroxamsäuren enthielt, auf Papier Whatman Nr. 3 im System a) aufgetrennt. Als Hauptprodukt (FeCl_3 -positiv) war α -Oximino-propionyl-hydroxamsäure (ca. 50 μMol) zu erkennen, daneben

¹⁵⁾ C. Gastaldi, Gazz. chim. ital. **54**, 215 (1924).

zwei weitere Zonen, die nach Elution und Rechromatographie auf Whatman Nr. 1 im System a) $R_F = 0.49$ und 0.15 aufwiesen. Sie ließen sich als Isomere der Pyruvoyl-hydroxamsäure identifizieren durch Umsetzung mit NH_2OH zu α -Oximino-propionyl-hydroxamsäure und durch Reduktion mit KBH_4 zu Lactoyl-hydroxamsäure ($R_F = 0.34$). Beim Aufbewahren in Lösung wird die Verbindung mit $R_F = 0.15$ teilweise in die mit $R_F = 0.49$ umgelagert.

Bestimmung von Pyruvoyl-thioestern neben Thioalkoholen (Ellman-Test¹⁶): Zu 2.8 ccm 0.1 m Phosphat- oder Pyrophosphatpuffer und 0.05 ccm 0.01 m 5.5'-Dithio-bis-[2-nitro-benzoat] gibt man 0.15 ccm der Meßlösung und verfolgt die Bildung des gelben 5-Mercapto-2-nitro-benzoat-Ions bei $405\text{ m}\mu$, $d = 1\text{ cm}$. Bei $\text{pH } 7-8$ ist die Reaktion mit Thioalkoholen in 0.5 bis 2 Min. beendet; die Thioester reagieren verzögert, entsprechend der Hydrolyse (Abb. 4). Durch kinetische Differenzierung ist die simultane Bestimmung beider Verbindungen möglich. $\Delta E = 0.42/0.1\text{ }\mu\text{Mol}$.

Bestimmung von Pyruvoyl-thioestern neben Pyruvat (mit Lactatdehydrogenase¹⁷): Im Ansatz von 1 ccm Phosphatpuffer, 0.03 ccm 0.1 m NADH, $3\text{ }\mu\text{g}$ Lactatdehydrogenase und 0.1 ccm Meßlösung verfolgt man die Abnahme der NADH-Absorption; $\epsilon_{366} = 3300$. Mit freiem Pyruvat kommt die Reaktion in 0.5 Min. zum Stillstand; mit Pyruvoyl-thioestern ist sie verzögert, entsprechend der Hydrolyse (Abb. 5).

S-Pyruvoyl-Coenzym A. — Die Lösung von $22\text{ }\mu\text{Mol}$ Coenzym A (freie Säure) in 0.5 ccm 80 -proz. Pyridin (mit Essigsäure auf $\text{pH } 7$ abgepuffert) wurde 5 Min. mit 50 mg ($180\text{ }\mu\text{Mol}$) **2** bei Raumtemperatur stengelassen, dann mit Eisessig versetzt und i. Vak. eingeeengt. Aus der wäßr. filtrierten Lösung wurde restliches Pyridin durch Filtration über 2 ccm Dowex- 50×8 (H^{\oplus} -Form) entfernt. Nach 3 stdg. Perforieren mit peroxidfreiem Äther unter Eiskühlung und Einengen auf 1 ccm enthielt die Lösung $12\text{ }\mu\text{Mol}$ (55%) Pyruvoyl-Coenzym A (gemessen als Hydroxamat).

Vor der weiteren Reinigung wurde mit KHCO_3 auf $\text{pH } 7$ gestellt (0°) und mit $10\text{ }\mu\text{Mol}$ Maleinimid versetzt, um restliches Coenzym A (CoA-SH) in das leichter abtrennbare Additionsprodukt überzuführen. Nach 5 Min. wurde mit HCl auf $\text{pH } 4$ gestellt und der gesamte Ansatz bei 4° auf Papier Whatman Nr. 3 (20 cm) mit 0.1 m Acetat $\text{pH } 4.0/\text{Äthanol}$ ($1:1$) 11 Std. aufsteigend chromatographiert. Das Papier wurde im kalten Luftstrom getrocknet und dabei wiederholt über HCl -Gas gehalten, um Acetat auszutreiben und Alkalisierung zu vermeiden. Von 4 im UV erkennbaren Zonen wurde die mit $R_F = 0.57$ mit Wasser eluiert; sie zeigte als einzige eine positive Reaktion mit Ellman-Reagens. Ausbeute $8\text{ }\mu\text{Mol}$ Pyruvoyl-Coenzym A.

Zur Analyse und Charakterisierung dienten 1) Ellman-Test (Abb. 4) zur Bestimmung von Pyruvoyl-thioester und Thioalkohol; 2) Reaktion mit NADH (Abb. 5) zur Bestimmung von Pyruvoyl-thioester und Pyruvat; 3) Hydroxylaminolyse; 4) Bestimmung des Gesamt-Coenzym A (nach Hydrolyse) mittels Phosphotransacetylase¹⁸); 5) Differenzspektrum gegen

¹⁶ G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 70 (1959).

¹⁷ Th. Bücher, R. Czok, W. Lamprecht und E. Latzko, in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 253, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962.

¹⁸ G. Michal und H. U. Bergmeyer, in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 517, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.

hydrolysierte Probe (vgl. Abb. 2), $\Delta\epsilon_{240} = 2450$; 6) Bestimmung des Adenosingehalts aus E_{258} mit $\epsilon = 15400$ unter Berücksichtigung der Thioesterabsorption mit dem bei 5) ermittelten Wert, $\epsilon_{258} = 940$. Die damit erhaltenen Zahlen verhielten sich wie $1.08^* : 0.95^* : 1.05 : 0.89 : 1.00 : 0.97$. (* Die Mengen an freiem Thioalkohol bzw. Pyruvat lagen unter 3%.)

Abbildung 4
 Bildung von 5-Mercapto-2-nitro-benzoat¹⁶⁾
 (--- pH 7; — pH 8)

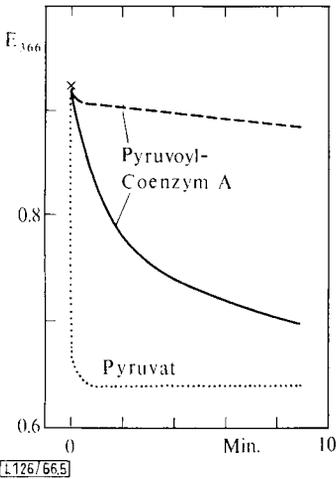
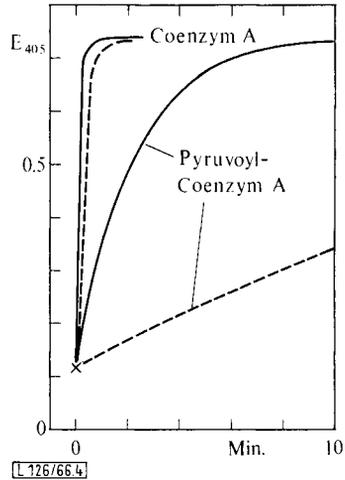


Abbildung 5
 Bestimmung mit Lactatdehydrogenase
 (--- pH 7
 — pH 8, pH 7 und 8)

Verglichen mit 2 wird Pyruvoyl-Coenzym A ca. 5mal schneller hydrolysiert; $t_{1/2}$ bei pH 8 (25°) ca. 1.5 Min.

Die *Versuche mit Alkoholdehydrogenase* aus Bäckerhefe wurden bei Raumtemperatur, $\lambda = 366 \text{ m}\mu$, Gesamtvolumen 1 ccm vorgenommen. Mit $0.4 \mu\text{Mol DL-Lactoyl-Coenzym A}$ (dargestellt über DL-Lactoyl-thiophenol¹⁹⁾ in Anlehnung an die Vorschrift²⁰⁾, $1 \mu\text{Mol NAD}$ und 0.3 mg Enzym erfolgte bei pH 7 und pH 8.5 keine Reduktion des Nucleotids; sie müßte infolge der raschen Spontanhydrolyse von Pyruvoyl-Coenzym A selbst bei ungünstiger Gleichgewichtslage bemerkbar sein. Nachweisgrenze: 0.001 % der Reaktionsgeschwindigkeit mit 0.1 m Äthanol.

¹⁹⁾ Th. Wieland und H. Köppe, Liebigs Ann. Chem. **588**, 15 (1954).

²⁰⁾ P. R. Vagelos, in S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, Bd. 6, S. 544, Academic Press, New York 1963.