

Racemform von V aus; Einengen der Mutterlauge ließ noch weiteres inaktives V ausfallen; aus der Mutterlauge fiel nach starkem Einengen und auf Zugabe von Petroläther stark aktiviertes Material aus. Von ca. 50-proz. Aktivierung an lieferte erneutes Umkristallisieren aus Benzol auch ein optisch aktives Erstkristallisat: es wurde in weitere Fraktionierungen eingesetzt. Das in Benzol sehr viel besser lösliche Mutterlauge-Kristallisat wurde nunmehr aus Petroläther (Siedebereich 60 bis 70°) analog konsequent weiter fraktioniert.

Kieselgel-Chromatographie in Benzol und rasches Sublimieren (höchstens 0,1 g-Portionen!) bei 90° und 0,001 Torr gestattete die Abtrennung von den in den leichtest löslichen Fraktionen angereicherten Fremdbeimengungen, ohne daß Racemisation bemerkbar war. Anschließendes viermaliges Umkristallisieren, zuletzt aus Alkohol, erbrachte keine Änderung der Schmelzpunkts- und Drehwerte mehr. Aus insgesamt 70 g eingesetztem (\pm) V wurden so direkt je 600 mg der beiden V-Enantiomeren mit Höchstdrehung, ferner noch je rund 1 g (+)- bzw. (-)-Material mit $[\alpha]_{405}^{25}$ -Wer-

ten von (+)- bzw. (-)-900° bis 1100° isoliert. Die Hauptmenge lieferte bei weiterer Fraktionierung auf beschriebenen Wege größere Mengen der aktiven Formen. Die Eigenschaften der höchstrehenden Fraktionen sind in Tab. 2 angegeben.

Die thermische Racemisierung bei 120–130° (i. Vak. eingeschmolzen) führte beide Enantiomeren wieder in die hochschmelzende Racemform, Schmp. 161°, zurück. Über die thermodynamischen Daten wird in Kürze berichtet^{18a}.

Die PMR-Spektren (in CS₂ und CDCl₃) wurden im Varian DP 60 von Dr. H. FRIEBOLIN, Institut für Elektrowerkstoffe, Freiburg/Brsg., aufgenommen. Die Drehwerte wurden im photoelektrisch arbeitenden Polarmeter der Fa. C. Zeiss, Oberkochen, bestimmt.

Der Firma Rhodioceta AG, Freiburg (Dr. H. WEIGAND) danken wir für die Überlassung des Celluloseacetats, den Farbenfabriken Bayer AG und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Zur Wirkung von substituierten α -Liponsäuren auf die Lipoamidoxido-reduktase*-Reaktion

H. W. GOEDDE und W. SCHLOOT

Abteilung für Biochemische Genetik, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Freiburg/Br.

U. SCHMIDT und J. MALONE **

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg/Br.

(Z. Naturforschg. 22 b, 1300–1303 [1967]; eingegangen am 27. Februar 1967)

The reactions of various recently synthesized analogues of α -lipoic acid (especially with fluoride as substituent) with lipoic acid dehydrogenase from pig heart muscle were investigated. The influence of structural change on the reactivity of the various compounds, when reacting with lipoic acid dehydrogenase are discussed.

Die physiologische Hauptfunktion der Liponsäure (1,2-Dithiolan-3-valeriansäure) ist die Coenzymwirkung bei der oxydativen Decarboxylierung von α -Oxosäuren. Die Liponsäureenzyme haben besondere Bedeutung bei Transfer-Reaktionen von Acylgruppen (Abb. 1).

* (E. C. 1.6.4.3.)

** U. SCHMIDT u. J. MALONE, Unveröffentlichte Versuche; J. MALONE, Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Freiburg/Br. 1967.

¹ H. W. GOEDDE, Z. Vitaminforsch. 33, 1 [1963].

² U. SCHMIDT, P. GRAFEN u. H. W. GOEDDE, Angew. Chem. 4, 846 [1965].

³ B. M. GUIRARD, E. E. SNELL u. R. G. WILLIAMS, Arch. Biochemistry 9, 381 [1946].

Die Pyruvatoxydase und die α -Oxoglutaratoxydase sind Lipoyl-Proteinkomplexe mit hohem Molekulargewicht, die durch Oxydation der α -Oxosäuren die Bildung von Acylverbindungen, z. B. des Acetyl-Coenzym A, ermöglichen.

Neben Coenzym A sind Thiaminpyrophosphat (TPP), FAD, NAD und Mg²⁺-Ionen unmittelbar an den enzymatischen Umsetzungen beteiligt. Der nach Oxydation der α -Oxosäure entstandene Acyl-lipoyl-Komplex reagiert mit dem Coenzym A (Acyltransfer durch Lipoyltransacetylase); anschließend wird die reduzierte Liponsäure durch die FAD-enthaltende Lipoamidoxido-reduktase wieder zu Liponsäure oxidiert^{1, 2}.

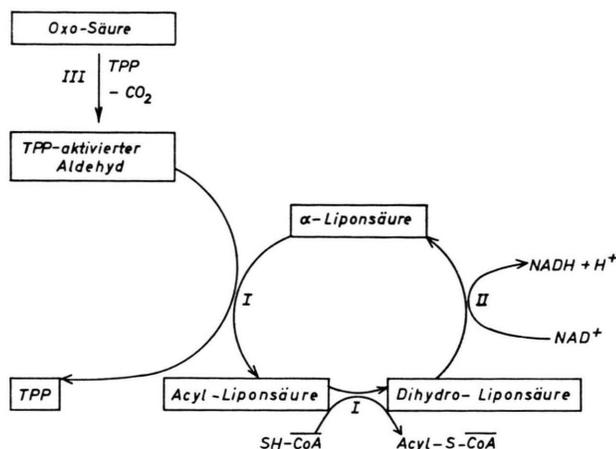


Abb. 1. Reaktionsschema zur Oxydation von Oxosäuren zu Acyl-Coenzym A. I: Lipoyltransacetylase (E. C. 2.3.1.12). II: Lipoamidoxidoreduktase (E. C. 1.6.4.3.). III: Decarboxylase.

Wie durch Arbeiten von GUIRARD et al.³, KLINE et al.⁴, REED et al.⁵ und andere nachgewiesen wurde, ist die Liponsäure für viele Mikroorganismen ein Wachstumsfaktor. Bis jetzt sind jedoch keine Untersuchungen bekannt, denen zufolge diese Substanz für die Ernährung höherer Organismen notwendig ist. Ausfallerscheinungen, wie z. B. Avitaminosen, unter Liponsäuremangel sind nicht beschrieben worden. Auch sind keine Stoffwechsellinien bekannt, die beim Fehlen von Liponsäure beschränkt werden könnten. Andererseits ist der vollständige Entzug von Liponsäure durch Mangeldiät sehr schwer durchführbar, da Liponsäure in der Nahrung weit verbreitet vorkommt; außerdem wird diskutiert, daß Liponsäure durch die Darmflora gebildet werden könne. Eine andere Möglichkeit zu prüfen, ob Liponsäure für höhere Organismen essentiell ist, besteht darin, die Wirkung der Liponsäure in vivo aufzuheben. Von SCHMIDT et al.^{6,7} wurden verschiedene strukturell abgeänderte Liponsäuren hergestellt und von GOEDDE et al.^{8,9} auf ihre Wirksamkeit getestet (Tab. 1). Bei in vivo-Untersuchungen mit *Streptococcus faecalis* 8043 wurde festgestellt, daß einige Liponsäurederivate das Wachstum dieser Mutante fördern (Tab. 1, Nr. 1, 10 und 11), andere es hem-

men (Nr. 7, 8, 9 und 12), oder inaktiv sind (Nr. 13, 14, 15)⁸.

Bei diesen Wachstumstesten an *S. faecalis* sowie durch enzymatische Untersuchungen zur Substratspezifität der Lipoamidoxidoreduktase mit Strukturanaloga der Liponsäure wurden keine starken Inhibitoren entdeckt^{8,9}. Die in Tab. 1, Abschnitt A, zusammengefaßten Daten zeigen, daß nur die 7-Methyl-liponsäure (7) und die 3-Thia-liponsäure (13)¹⁰ die Reduktion der Dihydro-liponsäure hemmen. Andere Analoga, wie die 2.4-Liponsäure (15), verhalten sich inert oder zeigen — wie die 7-Oxo-liponsäure (9) oder das Lipoamid (5) — ähnliche Affinität zur Lipoamidoxidoreduktase wie das physiologische Substrat.

Inzwischen sind weitere Liponsäure-Derivate entwickelt worden. Die Kohlenstoffatome der Liponsäure wurden in 2-, 7- und 8-Stellung durch Fluoratome und/oder Methylgruppen substituiert: 2-Fluor-liponsäure (16), 7.7-Difluor-liponsäure (17), 8-Methyl-7-fluor-liponsäure (18) und 8-Methyl-7.7-difluor-liponsäure (19) (s. Tab. 1, Abschnitt B). Diese Strukturanaloga zur α -Liponsäure wurden im spektrophotometrischen Test bezüglich ihrer Affinität zur Lipoamidoxidoreduktase und auf ihre Hemmwirkung geprüft.

⁴ L. KLINE u. H. A. BARKER, J. Bacteriol. **60**, 349 [1950].

⁵ L. J. REED, P. M. JOHNSON u. M. E. GETZENDANER, J. biol. Chemistry **192**, 851 [1951].

⁶ U. SCHMIDT, H. ALPES, J. C. LOEWENGUTH, P. GRAFEN u. H. W. GOEDDE, Liebigs Ann. Chem. **666**, 201 [1963].

⁷ U. SCHMIDT, P. GRAFEN u. H. W. GOEDDE, Liebigs Ann. Chem. **670**, 157 [1963].

⁸ H. W. GOEDDE, C. STAHLMANN, P. GRAFEN u. U. SCHMIDT, Arch. Mikrobiol. **45**, 359 [1963].

⁹ H. W. GOEDDE, P. GRAFEN u. U. SCHMIDT, Biochem. Z. **339**, 23 [1963].

¹⁰ A. LÜTTRINGHAUS u. D. SORG, unveröffentlichte Versuche; D. SORG, Dissertation der Naturwiss. Fakultät d. Universität Freiburg/Br. 1961.

Abgewandelte Liponsäuren	Nr.	Wachstum	Michaelis-Konstante [Mol/l · 10 ⁻³]	Wechselzahl · 10 ³	Inhibitor-Konstante K ₁	Art der Hemmung
A						
	H-Z-(CH ₂) ₄ -COOH	(1)	+	2,3	3,15	
	H-Z-(CH ₂) ₄ -CONH ₂	(5)		2,8	14,0	
	H-Z-(CH ₂) ₄ -CO-NH-CH ₂ -	(6)		1,54	—	
	Y-CH-(CH ₂) ₄ -COOH	(7)	—	—	—	2,8 · 10 ⁻³ kompetitiv
	Y = CH-CH ₃	(8)	—	—	—	
	Y = CO	(9)	—	3,7	4,65	
	H-Z-CH ₂ -O-(CH ₂ -COOH)	(10)	+	6,25	2,4	
	H-Z-CH ₂ -O-(CH ₂) ₂ -CONH ₂	(11)	+	4,0	13,1	
	H-Z-CH ₂ -CH(CH ₃)-(CH ₂) ₂ -COOH	(12)	—	11,0	2,54	
	H-Z-(CH ₂) ₂ -S-CH ₂ -COOH	(13)	inert	—	—	8,0 · 10 ⁻⁴ nicht-kompetitiv
	H-Z-CO-(CH ₂) ₃ -COOH	(14)	inert	5,0	0,96	
B	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -Z-COOH	(15)	inert	—	—	
	H-Z-(CH ₂) ₃ -CHF-COOH	(16)		3,2	9,87	
	Y = CF ₂	(17)		—	—	3,6 · 10 ⁻³ nicht-kompetitiv
	F-C-(CH ₂) ₄ -COOH	(18)		—	—	
		(19)		—	—	

Tab. 1. Wachstumstest an *S. faecalis* und Untersuchungen zur Umsetzung von abgewandelter Liponsäure durch die Lipoamid-oxidoreduktase.

Als einzige der untersuchten Fluor-liponsäuren wird die 2-Fluor-liponsäure (16) am Enzym umgesetzt. Die Affinität dieser Substanz (K_M $3,2 \cdot 10^{-3}$ M) entspricht ungefähr der des physiologischen Substrates, der α -Liponsäure (K_M $2,3 \cdot 10^{-3}$ M). Eine Hemmwirkung wird auf die enzymatische Reduktion der Liponsäure nicht ausgeübt. Erfolgt die Substitution durch Fluor am C-Atom in 7-Stellung (Dithiolanring) an beiden Wasserstoffatomen (7,7-Difluorliponsäure, 17), so erfolgt keine Reduktion mehr am Enzym. Andererseits wird der Umsatz des physiologischen Substrates Liponsäure nicht-kompetitiv gehemmt (K_1 $3,6 \cdot 10^{-3}$; s. Abb. 2).

Die durch Fluorsubstitution in 7-Stellung (17) erreichte Hemmwirkung auf die Lipoamidoxidoreduktase wird wieder aufgehoben, wenn neben der Fluorsubstitution in Stellung 7 am C-Atom 8 der α -Liponsäure Methylgruppen eingeführt werden: 8-Methyl-7-fluor-liponsäure (18) und 8-Methyl-7,7-difluor-liponsäure (19).

Nach den bisherigen Versuchen findet also nach Substitution im Dithiolanring durch eine oder mehrere Methylgruppen keine Umsetzung dieser Verbindungen am Enzym mehr statt (7, 18, 19); Substitution in 7-Stellung durch eine Methylgruppe bedingt kompetitive Hemmung (7), während nach Ein-

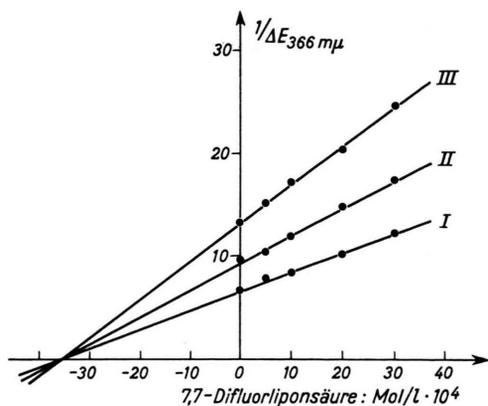


Abb. 2. Inhibitorstest mit 7.7-Difluor-liponsäure; Testsystem: $3 \mu\text{M}$ Titriplex III; 2 mg Rindereserumalbumin; $0,6 \mu\text{M}$ NADH; $0,5 \mu\text{M}$ NAD; $990 \mu\text{M}$ Phosphatpuffer, p_{H} 5,9; 10γ Diaphorase (Boehringer); $12,5$ (I)/ $8,75$ (II)/ $6,25$ (III) $\cdot 10^{-4} \text{ M}$ α -Liponsäure; $5-30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ 7.7-Difluor-liponsäure; $d=10 \text{ mm}$, 25°C , $366 \text{ m}\mu$, Gesamtvolumen $3,0 \text{ ml}$. Darstellung nach I. c. ¹¹.

führung einer Methylgruppe in die Valeriansäurekette die Aktivität am Enzym erhalten bleibt (12).

Für die Umsetzung der α -Liponsäure durch die Lipoamidoxidoreduktase dürfte demnach die Substitution am C_7 -Atom von besonderer Bedeutung sein:

1. Substitution durch eine CH_3 -Gruppe führt zu einer kompetitiven Hemmung (7).
2. Substitution durch eine Hydroxylgruppe bedingt Inaktivierung (8).
3. Nach Einführung einer Oxogruppe erfolgt Umsatz wie bei der α -Liponsäure bei ähnlicher Michaelis-Konstante (K_{M} $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) (9).
4. Einführung zweier Fluoratome bewirkt nicht-kompetitive Hemmung durch diese Verbindung (17).

¹¹ J. S. FRIEDENWALD u. G. D. MEANGWYN-DAVIES, in: The Mechanism of Enzyme Action, p. 154 (W. D. McELROY u. B. CLASS), The Johns Hopkins Press, Baltimore 1954.

Studies in Colloidal Behaviour and Absorption Spectra of Azoxine S Dyes

S. S. GOYAL and J. P. TANDON

Department of Chemistry, University of Rajasthan, Jaipur (India)

(Z. Naturforsch. **22 b**, 1303—1305 [1967]; eingegangen am 3. April 1967)

The colloidal nature of 7-Phenylazo-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid (A) and 7-(4-Sulphophenylazo)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid (B) in aqueous solution has been established by electrical conductance measurements. The curves obtained by plotting the square-root of concentration and molar conductance of the dyes are not linear. The temperature coefficient per degree centigrade per hundred units of conductance at 35° is below 2.0 in each case. The temperatures of zero conductance, determined by extrapolation are -20 and -25° in the dyes (A) and (B) respectively. The absorption spectra of eleven azoxine S dyes in acidic, alkaline and at $p_{\text{H}} \sim 4$ have been studied and their molar absorptivities at absorption maxima determined.

Azoxine S dyes are gaining importance in analytical chemistry, particularly as metallochromic indicators ¹⁻⁴. In view of their increasing analytical importance a detailed study of their colloidal behaviour and spectral characteristics was considered worthwhile. In the present paper, the colloidal behaviour of two representative dyes, 7-Phenylazo-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid (A) and 7-(4-sulphophenylazo)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid (B) has been studied by conductometric meas-

urements ⁵. Further, the spectral properties of eleven azoxine S dyes in acidic, alkaline and at $p_{\text{H}} \sim 4$ have been investigated.

Experimental

Azoxine S dyes were prepared and purified as described by UUSITALO ⁶. Their purity was further confirmed by elemental analysis and potentiometric titration against standard sodium hydroxide solution. The solutions of the dyes were prepared in double distilled water containing requisite amount of sodium hydroxide.

¹ J. S. FRITZ, W. J. LANE, and A. S. SUTTON, *Analyt. Chem.* **29**, 821 [1957].

² J. S. FRITZ, J. E. ABBINK, and M. A. PAYNE, *Analyt. Chem.* **33**, 1381 [1961].

³ A. I. BUSEV, L. L. TALIPOVA, and L. M. SKREKOVA, *Zh. Analit. Khim.* **17**, 180, 447, 831 [1962].

⁴ S. S. GOYAL and J. P. TANDON, *Talanta* (in press).

⁵ S. P. SANGAL, *Bull. chem. Soc. Japan* **36**, 1349 [1963].

⁶ E. UUSITALO, *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A II*, No. 8, 62 pp [1957].