

ÜBER DIE ENOL-KETO-TAUTOMERIE DER *p*-OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE

VON

THEODOR BÜCHER UND ERNST KIRBERGER

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität
Hamburg (Deutschland)*

Im Verlauf der Untersuchungen, welche in der voranstehenden Mitteilung* mitgeteilt worden sind, war es nötig, Klarheit über die Gleichgewichtslage und die Kinetik der tautomeren Umwandlung der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure zu gewinnen.

Das Problem wurde bereits vor einigen Jahren von PAINTER UND ZILVA¹ untersucht. In orientierenden Versuchen konnten wir die Befunde dieser Autoren qualitativ bestätigen; quantitativ fanden wir jedoch gewisse Abweichungen. Wir haben deshalb zu den von den Voruntersuchern verwandten indirekten Methoden der chemischen Enol- und Ketogruppen-Bestimmung den direkten photometrischen Nachweis der *p*-Oxyphenyl-Enol-Brenztraubensäure hinzugezogen. Im nahen Ultraviolett absorbiert nämlich von den beiden Tautomeren praktisch nur die Enolform, sodass *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure ein sehr geeignetes Objekt für diese vielfach bewährte Methodik darstellt.

Die photometrische Bestimmung ist bei geringen Enolkonzentrationen wesentlich zuverlässiger als die chemischen Bestimmungsmethoden, und es gelingt mit ihrer Hilfe, den gemessenen Werten für Gleichgewichte und Reaktionsgeschwindigkeiten einfache theoretische Ansätze zuzuordnen. Die tautomere Umwandlung wird durch zweiwertige Metallionen katalytisch beschleunigt.

METHODIK

Aus wässrigen Lösungen kristallisiert *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure, wie PAINTER UND ZILVA¹ gezeigt haben, (analog der von BOUGAULT UND HEMMERLÉ² untersuchten Phenylbrenztraubensäure) in der Enolform. Löst man also ein Präparat von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure, so enthält im ersten Moment der Lösung nur die Enolform, welche in Abhängigkeit vom pH und der Temperatur verschiedenen Gleichgewichtszuständen mit verschiedener Geschwindigkeit zustrebt.

10 mg eines 4mal aus Wasser unter Zusatz von etwas Aktiv-Kohle und 2mal aus Quarzdestilliertem Wasser ohne Zusatz umkristallisierten Präparats wurden in 8 ml *M*/16 Natriumpyrophosphat-Puffer (28 g Na₄P₂O₇ · 10 H₂O und 56 ml 2 *N* HCl pro Liter) innerhalb weniger Minuten gelöst und die Lösung durch Zusatz von 2 ml Wasser, welche entsprechende Mengen Natronlauge oder Salzsäure enthielten, auf das gewünschte pH gebracht. Durch dieses Verfahren wurde weitgehend vermieden, dass schon vor dem Versuch eine Umwandlung der Enolsäure, die als freie Säure nur schwer und langsam löslich ist, und in alkalischer Lösung rascher Umwandlung unterliegt, stattfand. Die Lösungen wurden während des Versuches konstant auf 25° gehalten.

Bei der Bestimmung der Ketosäure-Werte nach PENROSE UND QUASTEL³ sind wir so verfahren, wie es im methodischen Teil der vorangehenden Mitteilung beschrieben ist (wegen der Eichkurve vergleiche den Anhang dieser Arbeit).

Zur photometrischen Bestimmung der Enolform wurden 0.1 ml der Versuchslösung in 4.4 ml *N*/50 HCl einpipettiert und die Extinktion bei 334 mμ und *d* = 1 cm bestimmt. Der molare Ex-

* E. KIRBERGER UND TH. BÜCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 294.

tinktions-Koeffizient der *p*-Oxyphenyl-Enol-Brenztraubensäure bei dieser Wellenlänge beträgt $\varepsilon = 3.46 \cdot 10^6$ [cm² pro Mol] (dekadische Logarithmen); die Extinktion der Ketosäure ist um mehrere Grössenordnungen geringer. Zur Bestimmung der Extinktion verwandten wir das Photometer Eppendorf, ein direkt anzeigendes photoelektrisches Colorimeter, bei dem ausser den sichtbaren Quecksilberlinien auch einige ultraviolette Hg-Linien als monochromatische Messstrahlung zur Verfügung stehen.

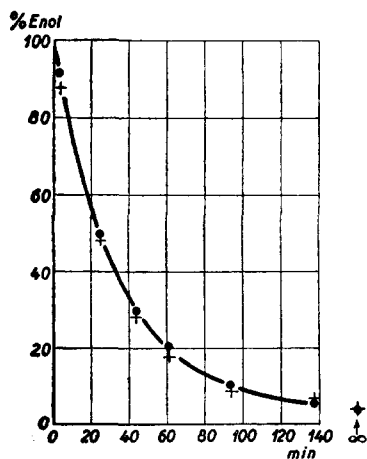
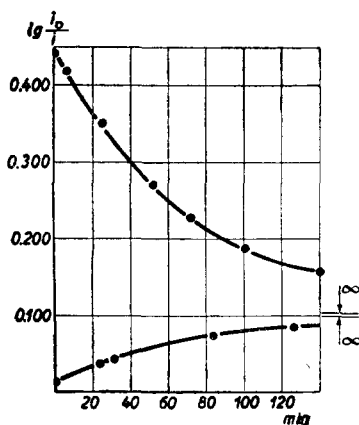
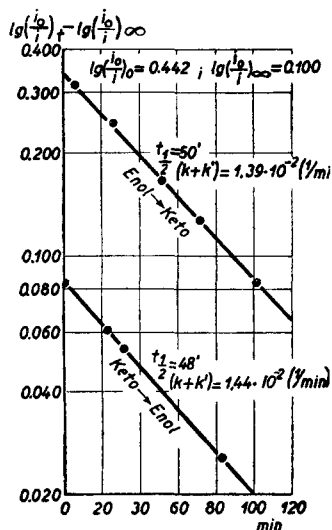


Fig. 1. Umwandlung der Enolform von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure ($c = 1$ mg/ml) in die Ketoform bei pH 6.25 und 25°. Ordinate: % Enolform, Abszisse: Zeit in Minuten. Punkte: photometrisch bestimmte Enolwerte, Kreuze: Differenz der nach PENROSE UND QUASTEL bestimmten Keto-werte gegen 100%



a



b

Fig. 2a und 2b. Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Enol- und Ketoform der *p*-Oxyphenyl-brenztraubensäure ($c = 1$ mg/ml) bei pH 1 und 25°

Fig. 2a. Ordinate: $\lg \left[\frac{i_0}{i} \right]_t$ bei 334 m μ ;

Fig. 2b. Ordinate: $\lg \left[\frac{i_0}{i} \right]_t - \lg \left[\frac{i_0}{i} \right]_\infty$ (logarithmischer Masstab); Abszisse: Zeit in Minuten (linearer Masstab)

REAKTIONSGLEICHGEWICHT

Im Versuch der Fig. 1, bei pH 6, findet weitgehende Umwandlung in die Ketoform statt. Höhere Anteile der Enolform im Gleichgewicht findet man im sauren Bereich. Fig. 2 zeigt einen Versuch bei pH 1, bei dem die Einstellung des Gleichgewichtes von beiden Seiten ausgehend photometrisch verfolgt wurde.

In Fig. 3 (Punkte) sind Messungen des Quotienten von Enol- zu Ketoform im Gleichgewicht bei verschiedenen pH-Werten eingetragen. Man erkennt, dass der Quotient im alkalischen und stark sauren Bereich pH-unabhängig ist, während er im Gebiet zwischen pH 3 und pH 1 eine Stufe durchschreitet. Eine Erklärung dieses Verhaltens findet man unter der Annahme, dass im Enol-Ketogleichgewicht in erster Linie die undissoziierten Anteile der Säuren wirksam sind (Fig. 3 ausgezogene Kurve).

Wir nennen in der folgenden mathematischen Ableitung den Quotienten der gesamten im Versuch befindlichen Enol- und Ketosäure-Konzentrationen Q_A , denjenigen der undissoziierten Anteile Q_U und bezeichnen die Konzentration des Enol-Anions mit $[E^-]$, die Konzentration des undissoziierten Enols mit $[E]$, die Konzentrationen der

analogen Zustände der Keto-Form mit $[K']$ bzw. $[K]$, schreiben also

$$Q_A = \frac{[E] + [E']}{[K] + [K']} ; \quad Q_U = \frac{[E]}{[K]} \quad (1a; 1b)$$

Substituiert man E' und K' mit Hilfe der Dissoziationskonstanten D_E und D_K für beide Säuren

$$D_E = \frac{[E'] [H^*]}{[E]} ; \quad D_K = \frac{[K'] [H^*]}{[K]} \quad (2a; 2b)$$

in Beziehung (1a) und bezeichnet die Differenz der beiden Dissoziationskonstanten als ΔD

$$D_E - D_K = \Delta D \quad (3)$$

dann erhält man aus (1a), (2a), (2b) und (3) folgende Beziehung zwischen Q_A und Q_U :

$$Q_A = \left(1 + \frac{\Delta D}{H^* + D_K} \right) \cdot Q_U \quad (4)$$

Man sieht, dass diese Beziehung entsprechend den gemessenen Resultaten für (relativ zu D_K) sehr grosse und sehr kleine Wasserstoffionen-Konzentrationen p_H -unabhängige Beziehungen zwischen Q_A und Q_U gibt. Es wird für

$$[H^*] \ll D_K; \quad Q_A = \left(1 + \frac{\Delta D}{D_K} \right) \cdot Q_U \quad (5)$$

$$[H^*] \gg D_K; \quad Q_A = Q_U \quad (6)$$

Man erkennt weiterhin, dass p_H -Abhängigkeit von Q_A nur gegeben ist, wenn die Dissoziationskonstante der Enolsäure und der Ketosäure voneinander verschieden sind. Dies ist in der Tat der Fall: das p_H einer ungepufferten, mit einem halben Äquivalent Lauge versetzten Lösung der Enolsäure sinkt im Verlauf der tautomeren Umwandlung von p_H 3.4 ausgehend um 0.6 p_H -Einheiten.

Die Dissoziationskonstante der Ketosäure errechnet sich aus der in der voranstehenden Abhandlung mitgeteilten Elektrotitrationskurve (unter Einbeziehung einer Korrektur für die Eigendissoziation der Säure) auf

$$D_K = 5 \cdot 10^{-3} \text{ [Mol/Liter]}$$

entsprechend $P_K = 2.3$. Die Dissoziationskonstante der Enolsäure ist schwierig zu messen, weil freie Enolsäure in ungepufferten Lösungen nur schwer und langsam löslich ist, ausserdem der tautomeren Umwandlung unterliegt. Aus halb quantitativen Messungen schätzen wir sie auf

$$D_E = 5 \cdot 10^{-4} \text{ [Mol/Liter]}$$

entsprechend $P_K = 3.3$, also $\Delta D = 4.5 \cdot 10^{-3}$. Setzt man diese Werte in Gleichung (4) ein und legt einen Wert von $Q_U = 0.3$ zugrunde, dann erhält man für die Abhängigkeit von Q_A vom p_H die in Fig. 3 eingezeichnete Kurve, welche angesichts der Fehlermöglichkeiten in den Schätzungen von ΔD und Q_U hinreichend mit den gemessenen Werten übereinstimmt. Unsere Ergebnisse sprechen also für die Richtigkeit der theoretischen Annahme unter der die Beziehung (4) abgeleitet worden ist, welche sich auch bei der

Literatur S. 406.

Erörterung anderer und physiologisch wichtigerer Enol-Keto-Gleichgewichte bewähren mag.

Für die in der voranstehenden Abhandlung behandelten Probleme ist zu ersehen, dass bei den dort in Betracht kommenden Wasserstoffionen-Konzentrationen der Enolanteil der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure gleichgewichtsmässig zu vernachlässigen ist; die Einstellung des Gleichgewichts geht, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, bei physiologischem p_H so geschwind vonstatten, dass eine Ausscheidung der Säure in der Enolform, wie sie von MEDES³ angegeben wurde, ausgeschlossen erscheint.

Die Verhältnisse bei der Phenylbrenztraubensäure sind analog. Wir fanden (Messungen bei 313 m μ)

$Q_U = 0.176$. Die Dissoziationskonstanten der Enol- und Ketoformen sind annähernd die gleichen wie diejenigen der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure.

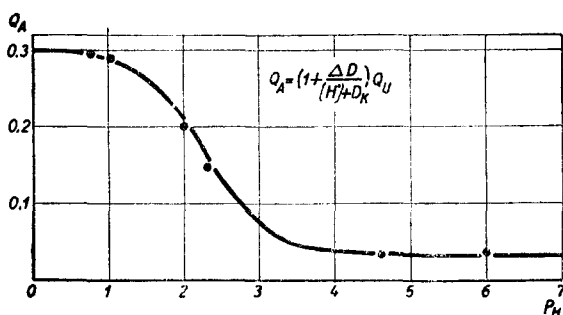


Fig. 3. Abhängigkeit des Enol-Keto-Gleichgewichtes vom p_H . Punkte: Messwerte; ausgezogene Kurve: nach Gleichung (4) berechnete Werte mit $Q_U = 0.30$ und $\Delta D = 4.5 \cdot 10^{-3}$ [Mol/Liter].

REAKTIONSKINETIK

Bezeichnet man die Konzentration der Enolform zu Anfang der Reaktion mit $[E]_0$, die Konzentration der Enolform zur Zeit t mit $[E]_t$, die Konzentration der Ketoform im gleichen Zeitpunkt mit $[K]_t$, dann ist, wenn die tautomere Umwandlung in beiden Richtungen monomolekular verläuft und die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion mit k und k' bezeichnet werden,

$$-\frac{d[E]}{dt} = k[E]_t - k'[K]_t = k[E]_t - k'([E]_0 - [E]_t) \quad (1)$$

Bezeichnet man weiterhin die Konzentration der Enolform im Endgleichgewicht mit E_∞ , dann ist nach der kinetischen Theorie des stationären Zustandes

$$\frac{k'}{k} = \frac{[E]_\infty}{[E]_0 - [E]_\infty}; \quad k' = \frac{[E]_\infty}{[E]_0} (k + k') \quad (2); (2a)$$

Substituiert man k' in Gleichung (1) mit Gleichung (2a) und integriert zwischen den Grenzen $t = 0$ und t , dann erhält man

$$\ln \frac{[E]_0 - [E]_\infty}{[E]_t - [E]_\infty} = (k + k') t \quad (3)$$

das Konzentrations-Zeit-Gesetz einer Reaktion, welche in erster Ordnung dem Gleichgewicht zustrebt.

In Fig. 2b sind die Versuche der Fig. 2a entsprechend der Beziehung (3) im logarithmischen Masstab aufgetragen. Man erkennt, dass die Kinetik der tautomeren Umwandlung dem oben entwickelten Gesetz gehorcht, denn die Kurven sind beide geradlinig und haben beide die gleiche Neigung. Die Halbwertszeiten entsprechen für die Um-

wandlung von Enol- in Ketosäure 50 Minuten, bei der Umwandlung von Keto- in Enolsäure 48 Minuten. Legt man die Werte für die Umwandlung von Enol- in Ketosäure, welche genauer zu messen ist, zugrunde, dann errechnet man bei $p_H = 1$:

$$k + k' = 1.39 \cdot 10^{-2} \text{ (I/Min)}$$

und nach Beziehung (2a):

$$k' = 0.31 \cdot 10^{-2} \text{ (I/Min)}$$

$$k = 1.1 \cdot 10^{-2} \text{ (I/Min)}$$

In der Umgebung des Neutralpunktes steigt die Geschwindigkeit der Umwandlung, wie bereits PAINTER UND SILVA¹ gezeigt haben, mit sinkender Wasserstoffionenkonzentration an. Sie ist bei p_H 7 dreimal so gross und bei p_H 8 fünfzehnmal so gross wie bei p_H 1.

KATALYTISCHE BESCHLEUNIGUNG DER TAUTOMEREN UMWANDLUNG

PAINTER UND SILVA¹ haben entdeckt, dass die tautomere Umwandlung der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure in Harn schneller vonstatten geht als in wässrigen Lösungen. Wir konnten den Effekt bestätigen und haben gefunden, dass das beschleunigende Prinzip anorganischer Natur ist. Modellversuche zeigten, dass die tautomere Umwandlung durch zweiwertige Metallionen beschleunigt wird. Tabelle I zeigt die Versuche, bei denen die Säure in *M*/50 Acetatpuffer aus Quarz-destillierter Essigsäure gelöst wurde.

TABELLE I

KATALYTISCHE BESCHLEUNIGUNG DER TAUTOMEREN UMWANDLUNG DURCH METALLIONEN

p-Oxyphenylbrenztraubensäure 1 mg pro ml in *M*/50 Acetatpuffer p_H 4.6

Zusatz	$(k + k') \cdot 10^2$	$\Delta (k + k') \cdot 10^2$
ohne Zusatz	0.65	—
Cu ⁺⁺ 1 γ/ml	1.32	0.67
Fe ⁺⁺ 1 γ/ml	1.02	0.47
Pb ⁺⁺ 1 γ/ml	0.85	0.18
Zn ⁺⁺ 1 γ/ml	0.95	0.30
Mg ⁺⁺ 10 γ/ml	0.87	0.22

ANHANG

Methodische Bemerkung zur Bestimmung der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure

Die teilweise Umwandlung der Ketoform der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure zur Enolform beim Ansäuern einer neutralen Lösung von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure durch Einstellung des Gleichgewichtes gibt eine Möglichkeit zur spezifischen photometrischen Bestimmung dieser Substanz. Wir konnten auf diese Weise den schon früher mitgeteilten Befund⁴ bestätigen, dass *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure in schwach alkalischer Lösung zerstört wird. Eine Lösung von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure, die 24 Stunden bei p_H 8 gestanden hatte, gab beim Ansäuern auf p_H 0.8 nur 58% der Extinktionszunahme, welche theoretisch zu erwarten gewesen wäre. Das Ergebnis ist wichtig für die Bereitung von Standardlösungen der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure für die kolorimetrische Bestimmung nach PENROSE UND QUASTEL. Wir empfehlen nach den Erfahrungen der vorstehenden Arbeit, die Substanz in *M*/20 Standard-Acetatpuffer zu lösen und diese Lösung vor

dem Gebrauch 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen zu lassen; sie enthält dann 96% der Säure in der Ketoform und ist im Eisschrank eine Woche haltbar. Eine mit dieser Lösung angelegte Eichkurve ist in unserem Photometer geradlinig, die Steigung beträgt 0.60 $[\text{Alg}(\frac{i_o}{i})]$ pro 1 mg Substanz] bei 546 m μ und $d = 0.5$ cm.

ZUSAMMENFASSUNG

Gleichgewicht und Kinetik der tautomeren Umwandlung von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure werden gemessen und die Messwerte einfachen theoretischen Ansätzen zugeordnet. Es wird gezeigt, dass die Reaktion durch zweiwertige Metallionen beschleunigt wird. Die Verhältnisse bei der Phenylbrenztraubensäure sind analog.

SUMMARY

The situation of the equilibrium and the kinetics of the tautomeric transformation of *p*-oxyphenylpyruvic acid have been measured. The values obtained from measurements were found to comply with simple theoretical considerations. The reaction was shown to be accelerated by bivalent metal ions. Analogous conditions have been found to exist for phenylpyruvic acid.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'équilibre et la cinétique de la transformation tautomère de l'acide *p*-hydroxy-phénylpyruvique. Nous avons trouvé que les valeurs mesurées correspondaient à des relations théoriques simples. La réaction est accélérée par des ions métalliques bivalents. Pour l'acide phénylpyruvique nous avons constaté des conditions analogues.

LITERATUR

- ¹ H. A. PAINTER UND S. S. ZILVA, *Biochem. J.*, 41 (1947) 520.
- ² J. BOUGAULT UND R. HEMMERLÉ, *Compt. rend.*, 160 (1915) 100.
- ³ G. MEDES, *Biochem. J.*, 26 (1932) 922.
- ⁴ E. KIRBERGER, *Klin. Wochschr.*, 27 (1949) 48, 211.
- ⁵ L. PENROSE UND J. H. QUASTEL, *Biochem. J.*, 31 (1937) 266.

Eingegangen den 26. April 1951