

238. Coenzym A:

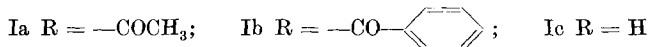
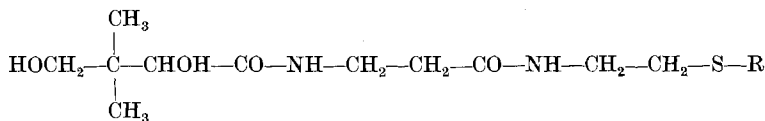
Eine einfache Synthese von S-Acylderivaten des Pantetheins

von R. Schwyzer.

(20. VIII. 52.)

Die Vorstellung von der Verwendung von C₂-Einheiten (Essigsäurereste) bei der biologischen Synthese des Steringerüstes¹⁾ erscheint heute als gesichert²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. Dabei geht die Essigsäure mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit als S-Acetyl-coenzym A (aktivierte Essigsäure) in die Reaktion ein.

Die grundlegende Bedeutung der S-acylierten Formen des Coenzym A für die Biosynthese der Sterine⁶⁾ und vieler anderer Verbindungen war mir Anlass zur Synthese von (+)-S-Acetyl- und (+)-S-Benzoyl-pantethein (Ia und Ib).



Diese beiden Derivate des Pantetheins⁷⁾ (Ic, lactobacillus-bulgaricus-Faktor), dinucleotidartig mit Adenyl-pyrophosphorsäuren verbunden⁸⁾, sind Bausteine der unmittelbar aktiven, acylübertragenden Formen des Coenzym A⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾.

¹⁾ K. Miescher & P. Wieland, *Helv.* **33**, 1847 (1950).

²⁾ K. Bloch, Recent Progress in Hormone Research (Proc. Laurentian Hormone Conference) **6**, 111 (1951); J. Wuersch, R. L. Huang & K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **195**, 439 (1952); R. C. Ottke, E. L. Tatum, I. Zabin & K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **189**, 429 (1951).

³⁾ R. O. Brady & S. Gurin, *J. Biol. Chem.* **189**, 371 (1951).

⁴⁾ G. L. Curran, *J. Biol. Chem.* **191**, 775 (1951).

⁵⁾ R. G. Langdon & K. Bloch, *Am. Soc.* **74**, 1869 (1952).

⁶⁾ Vgl. Bloch, loc. cit.; H. N. Little & K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **183**, 33 (1950); H. P. Klein, *Fed. Proc.* **10**, 209 (1951), und *J. Biol. Chem.* (im Druck); M. E. Dunn & E. P. Ralli, *Fed. Proc.* **9**, 34 (1950); vgl. H. F. Hailman, Recent Progress in Hormone Research (Proc. Laurentian Hormone Conference) **6**, 127 (1951).

⁷⁾ Vgl. Snell u. Mitarbeiter, *Am. Soc.* **72**, 5349 (1950); Th. Wieland & E. Bokelmann, *Naturwiss.* **38**, 384 (1951); J. Baddiley & E. M. Thain, *Soc.* **1952**, 800.

⁸⁾ Vgl. Brown, Craig & Snell, *Arch. Bioch.* **27**, 473 (1950); Baddiley & Thain, *Chem. and Ind.* **1951**, 337; *Soc.* **1951**, 2253; Lipmann und Mitarb., *Am. Soc.* **74**, 854 (1952).

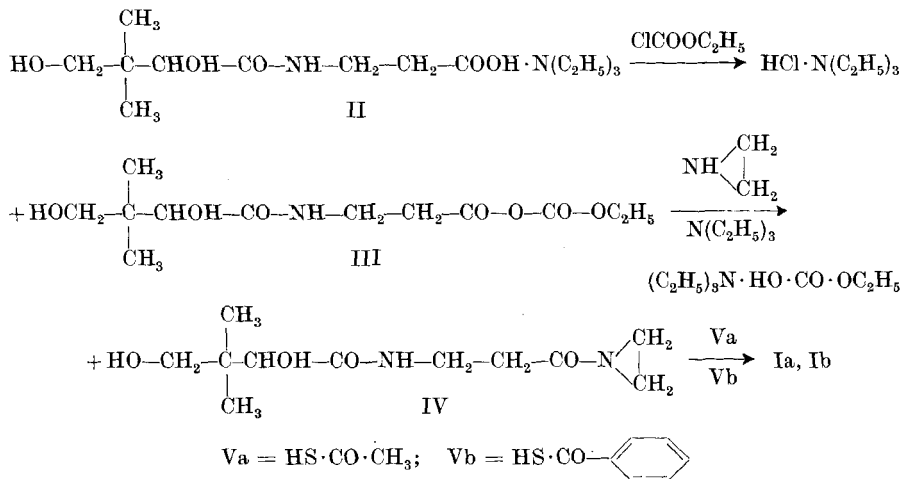
⁹⁾ F. Lynen, E. Reichert & L. Rueff, *A.* **574**, 1 (1951).

¹⁰⁾ H. Chantrenne, *J. Biol. Chem.* **189**, 227 (1951).

¹¹⁾ A. E. Braunshtein & E. F. Etinotchkina, *Chem. Abstr.* **44**, 7948d (1950).

S-Benzoyl- und S-Acetyl-coenzym A sind Zwischenprodukte bei der enzymatischen Übertragung auf andere Verbindungen des Benzoesäurerestes^{1) 2)} (Hippursäuresynthese) und vor allem des Restes der Essigsäure, der C₂-Einheit, welche im Mittelpunkt des Stoffwechselgeschehens steht^{3) 4)}.

Die Darstellung der beiden Verbindungen Ia und Ib gelingt leicht (Ausbeuten ca. 50% d. Th.) und in kürzester Zeit (Arbeitsaufwand für Ib etwa 1–2, für Ia etwa 2–3 Arbeitstage) ausgehend von Triäthylammonium-pantothenat (II) über das Esterkohlen-säureanhydrid III (vgl. *Wieland*⁵⁾ und *Boissonnas*⁶⁾) und das Äthylenimid der Pantothensäure⁷⁾ durch Aufspaltung dieser letzteren Verbindung mittels entsprechender Thiosäuren (Va und Vb). Die ganze Reaktionsfolge wird vorzugsweise unter 0° durchgeführt; Zwischenprodukte brauchen nicht isoliert zu werden. Die Isolierung der Endprodukte (Ia und Ib) in hohem Reinheitsgrad (ca. 80%) gelingt durch Ausnützung der besonderen Löslichkeitsverhältnisse, und die endgültige Reinigung erfolgt durch Kristallisation (Ib) oder durch Chromatographie (Ia).



(+)-S-Benzoyl-pantethein kristallisiert aus Essigester in Form farbloser, zugespitzter Kristalle vom Smp. 116°. Die Verbindung

¹⁾ *H. Chantrenne*, J. Biol. Chem. **189**, 227 (1951).

²⁾ *A. E. Braunshtein & E. F. Etinockkina*, Chem. Abstr. **44**, 7948d (1950).

³⁾ *F. Lynen, E. Reichert & L. Rueff*, A. **574**, 1 (1951).

⁴⁾ Vgl. *H. Holzer*, Angew. Ch. **64**, 248 (1952).

⁵⁾ *Th. Wieland & R. Sehring*, A. **569**, 122 (1950); *Th. Wieland & H. Bernhard*, A. **572**, 190 (1951).

⁶⁾ *R. A. Boissonnas*, Helv. **34**, 874 (1951).

⁷⁾ Um störende Nebenreaktionen bei der Umsetzung von III mit Äthylenimid zu verhindern (Aufspaltung des Äthylenimidringes durch die entstehende Esterkohlen-säure?), muss eine starke, tertiäre Base zugefügt werden. Dazu hat sich Triäthylamin als geeignet erwiesen.

dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts ($[\alpha]_D^{27} = +31^\circ \pm 4^\circ$, Alkohol, $c = 1$). Sie ist löslich in Alkoholen, Wasser, Essigester und Chloroform. Die wässrige Lösung gibt mit Nitroprussidnatrium und Ammoniak eine „verzögerte“ Blaurotfärbung, welche auf das langsame Freiwerden von $-SH$ -Gruppen im alkalischen Milieu zurückzuführen ist (vgl. *Lynen & Reichert*, loc. cit.).

Bemerkenswert ist die benzoylierende Wirkung auf verschiedene Verbindungen:

Lässt man S-Benzoyl-pantethein in verdünntem wässrigem Ammoniak stehen, so bilden sich Benzamid und Pantethein (Ic). Der Verlauf der Ammonolyse konnte durch Titration¹⁾ des entstehenden Pantetheins verfolgt werden. Eine 2-proz. Lösung in Ammoniak 1 : 1 ist schon nach 30 Min. zu 95% gespalten (20°).

Methanol wird schon in der Kälte durch S-Benzoylpantethein und Ammoniak oder Natriumacetat zu Benzoessäure-methylester verestert.

Zur Darstellung von Pantethein (lactobacillus-bulgaricus-Faktor) aus kristallisiertem S-Benzoylpantethein benützt man am besten eine kalte, gesättigte Lösung von NH_3 in Methanol. Schon nach 2 Std. hat die Lösung ihre benzoylierende Wirkung auf NH_2OH ($pH = 5,4$) vollständig verloren. Nach Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum wird das Pantethein durch Waschen mit Äther von Benzamid und Benzoessäure-methylester befreit. Papierchromatographie des Pantetheins ergab $R_F = 0,75$ (Butanol-Wasser-Eisessig 4 : 5 : 1; Nachweis mit Nitroprussidnatrium und Kaliumcyanid). Erst nach längerem Stehen (24 Std.) mit Methanol-Ammoniak treten tiefergreifende Veränderungen ein: ein nicht näher untersuchtes Abbauprodukt mit $-SH$ -Gruppen wird papierchromatographisch nachweisbar ($R_F = 0,47$).

S-Acetyl-pantethein konnte bisher nur als farbloses, klares Öl, $[\alpha]_D^{26} = +39^\circ \pm 4^\circ$, ($c = 0,8$ in Alkohol), gefasst werden. Verteilungs-chromatographie an einer Cellulosesäule mit Essigester-Wasser lieferte ein Präparat von ca. 85–90% Reinheit. Eine bessere Reinigung (ca. 95–99%) konnte erreicht werden durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd der Aktivität IV (Fabrikat der Fa. *Woelm*, Eschwege) mit Essigester.

Chemisch verhält sich die Verbindung weitgehend gleich wie das Benzoylderivat des Pantetheins — mit dem Unterschiede, dass die acylierende Wirkung noch verstärkt erscheint. Schon in neutraler wässriger Lösung findet teilweise Hydrolyse zu Pantethein statt, ebenfalls bei der Papierchromatographie mittels Butanol-Wasser-Eisessig. Wird jedoch Essigester-Wasser als Entwicklungsflüssigkeit verwendet, so lässt sich keine Hydrolyse nachweisen.

Nach eigenen Beobachtungen ist die Methode zur Darstellung von Ia und Ib weitgehend verallgemeinerungsfähig. Durch Aufspaltung von N-Acylderivaten des Äthylenimins mittels Thiosäuren

¹⁾ *R. Kuhn, L. Birkofer & F. W. Quackenbush, B. 72, 407 (1939).*

lassen sich auf schonende Weise die verschiedensten N,S-Diacyl-derivate des Cysteamins (β -Mercaptoäthylamins) darstellen. Damit ist ein weiterer Weg zur Erforschung dieser interessanten, nur wenig bekannten¹⁾ Stoffgruppe eröffnet worden.

Experimenteller Teil.

(+)-S-Benzoyl-pantethein (Ib): 10 g (+)-Calcium-pantothenat wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit 10 ml Triäthylamin versetzt. Das Calcium wurde mit einer genau äquivalenten Menge einer wässrigen Oxalsäurelösung gefällt. Nach Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels hinterblieben 12,5 g sirupöses Triäthylammonium-pantothenat. Die Verbindung wurde in 25 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und auf -5° abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden nun 4,1 g Chlorkohlensäure-äthylester, in 20 ml Essigester gelöst, tropfenweise eingerührt. Nach 10 Min. wurde die entstandene Mischung, ungeachtet des auskristallisierten Triäthylammonium-chlorids, unter Rühren in eine auf -5° gekühlte Lösung von 2 g Äthylenimin und 5 g Triäthylamin in 50 ml Essigester schnell eingetropf. Nach 20 Min. wurde dieses entstandene Gemisch in kalte Thiobenzoesäurelösung (7 g Thiobenzoesäure in 100 ml Essigester) eingegossen. Nachdem die (gelbe) Mischung 30 Min. bei 0° gestanden hatte, wurde sie filtriert und bei tiefer Temperatur, zuerst im Wasserstrahlvakuum, dann im Hochvakuum (0,05 mm Hg), von Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wurde in 1 l Wasser gelöst und zuerst mit Äther (3mal 500 ml) extrahiert. (+)-S-Benzoyl-pantethein wurde durch Extraktion der wässrigen Phase mit Essigester (5mal 500 ml) isoliert und durch Kristallisation aus trockenem Essigester gereinigt. Ausbeute 8 g, Smp. 116° . Aus den Ätherextrakten schied sich nach dem Trocknen mit Natriumsulfat beim Aufbewahren im Kühlschrank (-10°) eine weitere Menge der kristallisierten Verbindung aus. Zur Analyse wurde 3mal aus Essigester umkristallisiert und bei 0,05 mm Hg 5 Std. bei 60° getrocknet. Farblose, flache Nadeln, Smp. 116° .

$C_{18}H_{26}O_5N_2S$ Ber. C 56,52 H 6,85 N 7,33 S 8,38%

Gef. „ 56,74 „ 7,02 „ 7,25 „ 8,38%

$[\alpha]_D^{26} = +31^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (c = 1 in Äthanol)

(+)-S-Acetyl-pantethein (Ia): Unter Ersatz der Thiobenzoesäure durch einen Überschuss an Thioessigsäure wurden in genau gleicher Weise, wie für (+)-S-Benzoyl-pantethein beschrieben, 4,7 g Triäthylammonium-pantothenat zum S-Acetyl-derivat umgesetzt. Die Aufarbeitung geschah durch Aufnehmen des von den Lösungsmitteln befreiten Reaktionsproduktes in 200 ml mit Kochsalz halb gesättigtem Wasser, Extraktion mit Äther und Isolierung des (+)-S-Acetyl-pantetheins durch Ausschütteln mit 5mal 200 ml Essigester (+10% Methanol). Die vereinigten Auszüge wurden mit 50 ml halbgesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und verdampft (im Wasserstrahlvakuum). Der farblose Rückstand (4 g) wurde aus Essigester an 120 g neutrales Aluminiumoxyd (Fa. Woelm, Eschwege) der Aktivität IV chromatographiert. 6 Fraktionen zu je 100 ml Essigester eluierten 2,3 g Acetylverbindung. Nach 8stündigem Trocknen über P_2O_5 bei 25° und 0,05 mm Hg wurde der sehr dicke, farblose Sirup analysiert.

$C_{13}H_{24}O_5N_2S$ Ber. C 48,73 H 7,55 N 8,74 S 10,01 CH_3CO 13,43%

Gef. „ 48,29; 48,05 „ 7,57; 7,65 „ 8,11; 8,04 „ 10,45; 10,30 „ 13,73%

$[\alpha]_D^{26} = +40^{\circ}, +38^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (c = 0,8 in Äthanol)

Durch Essigester-Methanol liessen sich aus der Säule weitere Mengen eines trüben Öles eluieren, welches nicht näher untersucht wurde.

Kolorimetrischer Vergleich von S-Acetyl- und S-Benzoyl- in Ia und Ib nach Lipmann & Tuttle (loc. cit.): 6,04 mg Ia + 0,5 ml Methanol + 1,0 ml NH_4OH -Lösung + 1,0 ml Acetatpuffer (pH = 5,4) wurden 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, darauf mit 1,0 ml HCl-Lösung, 1,0 ml $FeCl_3$ -Lösung und 5,0 ml Wasser versetzt.

¹⁾ R. Kuhn & G. Quadbeck, B. **84**, 844 (1951).

²⁾ J. Baddiley & E. M. Thain, Soc. **1951**, 3425.

Kolorimetrieren im Lumetron-Kolorimeter ($l = 1$ cm; $\lambda = 515$ m μ): Durchlässigkeit 38,7%.

6,16 mg Ib genau gleich behandelt: Durchlässigkeit 38,7%.

Umsatz von (+)-S-Benzoyl-pantethein mit Ammoniak: a) *Mit wässrigem Ammoniak*: 100 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein wurden in 2 ml Methanol gelöst und mit konz. NH_3 -Wasser (1 : 1) auf 5 ml aufgefüllt. Nach 1, 6, 16 und 31 Min. (Zimmertemperatur 28°) wurde jedesmal 1,0 ml der Flüssigkeit in 9 ml 0,01-n. Jodlösung (Eisessig) hineinpipettiert und nach *Kuhn* (loc. cit.) mit 0,01-n. Thiosulfatlösung zurücktitriert.

t	1'	6'	16'	31'
Verbrauch an 0,01-n. J_2 (ml) . .	1,0	2,6	4,1	5,0
Umsatz	19%	49,5%	78%	95,5%

200 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein in gleicher Weise umgesetzt ergaben durch Ausschütteln mit Essigester, Lösen in Wasser, Behandeln mit Tierkohle und Ausschütteln mit Essigester 60 mg (90% d. Th.) kristallisiertes Benzamid. Umkristallisieren aus Benzol; Smp. 125°, keine Depression mit einem Vergleichspräparat vom Smp. 125°.

b) *Mit methanolischem Ammoniak*: 20 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein wurden in 1 ml mit NH_3 gesättigtem Methanol gelöst. Nach 2 Std. sind nach *Lipmann & Tuttle* (loc. cit.) keine S-Benzoyl-gruppen mehr nachweisbar. Chromatographie an *Whatman*-Papier Nr. 1 mit Butanol-Wasser-Eisessig 4:5:1 bei 29° Trocknen 5 Min. bei 100°, Besprühen mit 2-proz. Nitropussidnatrium gefolgt von 2-n. KCN.

Ammonolysedauer: 2 Stunden: 1 Flecken $R_F = 0,75$

24 „ 1 „ $R_F = 0,75$ + kleiner Flecken $R_F = 0,47$

Der R_F -Wert der erhaltenen Substanz entspricht demjenigen des Pantetheins unter gleichen Bedingungen, vgl. *Baddiley & Thain* (loc. cit.); das Produkt des weiteren Abbaus ($R_F = 0,47$) wurde nicht weiter untersucht.

(+)-S-Acetyl-pantethein erleidet mit methanolischem Ammoniak in analoger Weise Abbau zu Pantethein.

Umsatz von (+)-S-Benzoyl-pantethein mit Methanol: 100 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein wurden mit 3 ml Methanol und 5 mg Natriumacetat (wasserfrei) 5 Std. gekocht. Dann wurde der Ansatz mit 10 ml Äther versetzt und die Mischung gründlich mit Wasser gewaschen. Die Ätherschicht wurde mit Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde im Reagensglas im Vakuum destilliert und die farblosen Tropfen untersucht. Nachgewiesen wurde die Esternatur (Umsatz mit alkoholischem NH_2OH) und das Methanol nach Verseifen mit Phosphorsäure (Oxydation zu Formaldehyd, Nachweis des Formaldehyds mit Chromotropsäure- H_2SO_4) — beides nach *Feigl*¹⁾.

Herrn Dr. *K. Miescher* verdanke ich wertvolle Diskussionen betreffend die Biosynthese der Steroide. Die Elementaranalysen wurden in unseren mikroanalytischen Laboratorien unter der Leitung von Dr. *H. Gysel* durchgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird eine einfache Methode zur Herstellung von (+)-S-Acetyl-pantethein (Ia) und (+)-S-Benzoyl-pantethein (Ib) beschrieben. Durch Ammonolyse des kristallisierten Ib lässt sich leicht freies Pantethein (Ic, *lactobacillus-bulgaricus*-Faktor) darstellen.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

¹⁾ *F. Feigl*, Qualitative Analysis by Spot Tests, Elsevier 1947, 3rd Ed., S. 358 u. 396.