

# Chemische und biochemische Charakterisierung von $\alpha$ -Benzyl- $\alpha$ -brommalonitril (BBMD) als Oxidationsmittel

Chemical and Biochemical Characterization of  $\alpha$ -Benzyl- $\alpha$ -bromo-malononitrile (BBMD) as Oxidizing Agent

J. Rieser, A. Höckendorf, G. Abou-Elenien und K. Wallenfels

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg

(Z. Naturforsch. **32c**, 150–157 [1977]; eingegangen am 21. Januar 1977)

$\alpha$ -Benzyl- $\alpha$ -bromo-malononitrile, Electrochemical Behaviour, Redox-Reactions

The behaviour of  $\alpha$ -benzyl- $\alpha$ -bromo-malononitrile (BBMD) as oxidizing agent was characterized.

The dependence of the electrochemical reduction potentials of BBMD on the pH-values of the solutions was examined. BBMD is reduced in a two-electron wave with half-wave potentials between +230 and +312 mV vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>.

BBMD is able to oxidize different organic compounds with OH-, SH-, NH- and CH-groups as well as a series of biological reducing agents as ubihydroquinone, plastohydroquinone, dihydro-lipoic acid, FADH<sub>2</sub>, NADPH and NADH.

In all these cases BBMD is reduced to benzylmalononitrile. Kinetic investigations of this reduction process using NADH as reducing agent and also NMR-investigations using deuterated NADH-models showed that BBMD is directly reduced to benzylmalononitrile without producing benzylidenemalononitrile as intermediate.

The reduction of BBMD with reduced pyridine nucleotides as well as that of benzylidene-malononitrile were accelerated by an enzyme which was concentrated from human erythrocytes, using 2-chloro-benzylidenemalononitrile (CS) as substrate.

## Einleitung

$\alpha$ -Benzyl- $\alpha$ -brommalonitril (BBMD)<sup>1–5</sup> wurde in verschiedenen biologischen Systemen als wirksam gefunden. Es ist toxisch für Ratten mit der LD<sub>100</sub> von 60 mg/kg<sup>5</sup>, hemmt das Wachstum verschiedener Pilzstämme in Konzentrationen von M/1000 – M/2500, das von Tuberkelbazillen und Trichomonaden mit M/5000<sup>5</sup>. Bei Hefe wird die Atmung mit M/5000 vollständig blockiert, die Glukose-Vergärung mit M/1000 beträchtlich gehemmt<sup>6</sup>.

In jüngster Zeit sind mehrere Arbeiten über die Wirkung von BBMD auf die Photosynthese von isolierten Chloroplasten erschienen, wobei die Meinungen über den speziellen Angriffspunkt der Verbindung unterschiedlich sind. Brandon und Elgersma<sup>7</sup> nehmen an, daß BBMD als Elektronenacceptor im Photosystem II interferiert, während Wolff, Büchel und Renger<sup>8</sup> den primären Angriffspunkt im Photosystem I sehen, darüber hinaus aber auch eine hemmende Wirkung auf Photosystem II postulieren. Obwohl Übereinstimmung darin besteht, daß BBMD als Elektronenacceptor, d. h. als Oxidationsmittel wirksam wird, bleiben zwei Fragen offen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Wallenfels, Chemisches Laboratorium der Universität, Albertstr. 21, D-7800 Freiburg/Brsg.

Zunächst: Welches ist der eigentliche Elektronendonator, d. h. das Reduktionsmittel auf Seiten des biologischen Systems? Hierfür sollten die reduzierten Stufen aller Redoxsysteme in Frage kommen, die am Elektronenfluß im photosynthetischen Apparat beteiligt sind, sofern deren Redoxpotentiale dies erlauben. Die Potentiale können sehr verschieden sein. Während z. B. Photosystem I durch Umwandlung von NADP<sup>+</sup> in NADPH ein Reduktionsmittel mit stark negativem Potential (–0,32 V) produziert, wird im Photosystem II ein Reduktionsmittel mit ca. 0,4 V positivem Potential erzeugt, charakterisiert durch das Plastochinon-Plastohydrochinon-Paar.

Die zweite offene Frage ist: Welches Reduktionsprodukt entsteht aus BBMD und auf welchem Wege wird dieses gebildet? Wolff, Büchel und Renger<sup>8</sup> haben zum Mechanismus zwei Möglichkeiten vorgeschlagen: Erstens, die Reduktion einer Nitrilgruppe mit anschließender Hydrolyse zum Aldehyd und zweitens, die Reduktion zu Benzylmalonitril, die sie als „reductive bromo-elimination“ bezeichnen. Dabei wird offen gelassen, ob das BBMD selbst, wahrscheinlich am positivierten Bromatom, die Elektronen aufnimmt, oder ob aus BBMD durch HBr-Abspaltung zunächst Benzylidenmalonitril ge-



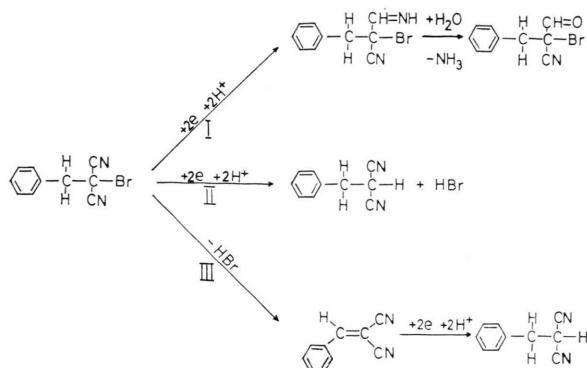
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

bildet wird, das dann der eigentliche Elektronen-acceptor wäre.



Wolff et al.<sup>8</sup> favorisieren den Reaktionsweg I. Dabei soll der zunächst gebildete Aldehyd durch einen sich anschließenden Oxidationsschritt in die Carbonsäure überführt werden.

Neben der direkten Reduktion zu Benzylmalonitril (Reaktionsweg II), sollte auch die intermediäre Bildung von Benzylidenmalonitril und dessen Reduktion einen möglichen Reaktionsweg darstellen, denn einerseits geht BBMD, besonders bei Einwirkung von Basen, leicht in Benzylidenmalonitril über, andererseits ist Benzylidenmalonitril bekannt als Stammverbindung einer Substanzklasse von vielfältiger biologischer Aktivität. Die Stammverbindung selbst sowie zahlreiche Derivate sind Reizstoffe der Schleimhäute von Mund, Nase und Augen<sup>9</sup>. Die wirksamsten Verbindungen sind halogensubstituiert, so auch das als „riot control agent“ verwendete 2-Chlorbenzylidenmalonitril (CS). Andere Derivate wie z. B. das 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxibenzylidenmalonitril gehören zu den am stärksten wirksamen Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung<sup>10</sup>.

Zur Klärung der aufgezeigten Fragen haben wir die Elektronenaufnahme des BBMD und die sich anschließende chemische Veränderung elektrochemisch untersucht, seine Wirksamkeit als Oxidationsmittel gegenüber verschiedenen organischen Reagenzien getestet, seine Reaktivität gegenüber den reduzierten Stufen einer Reihe der wichtigsten biologischen Redoxkatalysatoren analytisch und präparativ studiert, sein Reduktionsprodukt isoliert und charakterisiert, den Reduktionsmechanismus mit deuterierten NADH-Modellen untersucht sowie die beschleunigende Wirkung eines aus menschlichen Erythrozyten angereicherten Enzyms auf die BBMD- und Benzylidenmalonitril-Reduktion gemessen.

## Material und Methoden

$\alpha$ -Benzyl- $\alpha$ -brommalonitril (BBMD) wurde durch Bromierung von Benzylmalonitril in basischer Lösung dargestellt<sup>2</sup>. Um optimale Ausbeuten zu erhalten, sollte dabei die Temperatur unter  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gehalten werden. Nach mehrmaliger Kristallisation aus absol. Äthanol war das Produkt gaschromatographisch einheitlich mit einem Schmelzpunkt von  $119-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Die elektrochemischen Messungen wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Britton-Robinson-Puffer (0,04 M wäßrige Lösung an Phosphorsäure, Phenylessigsäure und Borsäure – pH-Einstellung mit 1 N NaOH) und Äthanol (Uvasol der Fa. Merck AG, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 (v/v) durchgeführt, mit 0,1 M  $\text{KNO}_3$  als Leitsalz. Die Arbeitselektrode war eine rotierende (DC-Voltammetrie) bzw. stationäre (Cycl. Voltammetrie) Pt-Scheibenelektrode von 1,3 mm Durchmesser, bei der Coulometrischen Messung ein Pt-Blech von  $5\text{ cm}^2$  Oberfläche. Als Gegenelektrode diente ein Pt-Draht im jeweiligen Lösungsmittelgemisch und als Referenzelektrode  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ . Die Pt-Scheibenelektrode belegt sich schnell, sie wurde vor jeder Messung geschliffen und poliert. Zur Aufnahme der DC- und Cycl. Voltammogramme wurden jeweils 8 mg BBMD in 30 ml sauerstofffreiem Äthanol/Puffer unter kräftigen Röhren (10–15 min) gelöst. Für die Coulometrie wurden 20 mg BBMD zunächst in 20 ml sauerstofffreiem Äthanol gelöst, dann mit 20 ml Puffer pH 5 versetzt.

Als Meßgeräte wurden verwendet: Spannungsquelle: Voltage Scan Generator VSG 72; Potentiostat: Potential Control Amplifier PCA 72C und Integrator: Wenking SST 70 der Fa. Bank Elektronik, Göttingen. Schreiber: Servogor XY der Fa. Metrawatt, Nürnberg.

$\text{FADH}_2$  wurde durch Reduktion von FAD (Fa. Hoffmann-La Roche, Basel) mit Dithionit<sup>11</sup>, Dihydroliponsäure ( $\text{LAH}_2$ ), Ubihydrochinon ( $\text{UQH}_2$ ) und Plastohydrochinon ( $\text{PQH}_2$ ) aus Liponsäure (LA), Ubichinon 10 (UQ) bzw. Plastochinon 9 (PQ) der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, durch Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$ <sup>12, 13</sup> gewonnen, NADH und NADPH wurden als Handelsprodukte der Firma Boehringer, Mannheim, verwendet.

Die Oxidationen von  $\text{UQH}_2$ ,  $\text{PQH}_2$  und  $\text{LAH}_2$  wurden in Äthanol (Uvasol, Merck) unter  $\text{N}_2$  durchgeführt, die Umsetzung mit  $\text{FADH}_2$  in M/20 Phosphatpuffer pH 6 unter  $\text{N}_2$ , die Reaktionen mit NADPH und NADH in M/20 Phosphatpuffer pH 6 und 7,5.

Zur dünnenschichtchromatographischen Verfolgung der Oxidationen von  $\text{UQH}_2$  und  $\text{PQH}_2$  wurden die

Lösungsmittelkombinationen LI:Benzol/n-Heptan/Acetonitril 3:2:1 (v/v/v) und LII:Benzol/Methanol 9:1 (v/v) benutzt, als Platten kamen die DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Fa. Merck) zur Anwendung. Die übrigen Reaktionen wurden elektro-nenspektroskopisch durch Messung der Zu- bzw. Abnahme charakteristischer Banden als Funktion der Zeit mit folgenden Meßgeräten verfolgt: Spektralphotometer der Fa. Beckman, Modell 25 mit Schreiber und Zeiss-Gerät PM 4 mit Transmission-Konzentrationsrechner und XP 2 Drucker.

Die gaschromatographischen Analysen wurden durchgeführt mit einem Gerät von Hewlett Packard, Modell 76W Research Chromatograph mit FID-Detektor bei 280 °C, Einspritzblocktemp. 200 °C und He als Trägergas. Säule 1: 3 ft. Glassäule mit 15% Apiezon L auf Gaschrom P, Arbeitstemp. 140 °C und Säule 2: 12 ft Glassäule mit 5% SE 52 auf Chromosorb WAW DMCS 100 – 200 mesh, Arbeitstemp. 140 °C.

Säule 2 trennt BBMD ( $R_t$ : 10,8 min) von Benzyl- ( $R_t$ : 13,5 min) und Benzylidenmalonitril ( $R_t$ : 16,4 min), bei Verwendung von Säule 1 haben BBMD und Benzylmalonitril identische Retentionszeiten (17,6 min), gute Trennung von Benzylidenmalonitril ( $R_t$ : 29,45 min).

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät Infra-cord 137 NaCl, die NMR-Spektren mit einem Varian-Gerät A 60 aufgenommen.

## Ergebnisse und Diskussionen

In den cyclischen Voltammogrammen (Abb. 1) beobachtet man keinen Oxidationspeak. Dies deutet darauf hin, daß nach der Elektronenaufnahme eine schnelle irreversible chemische Reaktion eintritt, wobei das Reaktionsprodukt im Meßbereich nicht weiter elektrochemisch verändert wird.

Das DC-Voltammogramm (Abb. 2) zeigt nur eine Reduktionsstufe, die nach der logarithmischen Analyse<sup>14</sup>

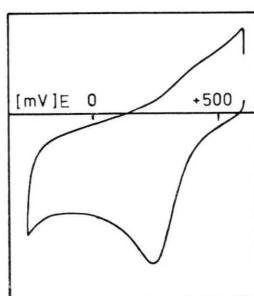


Abb. 1. Cyclisches Voltammogramm,  $1,13 \times 10^{-3}$  M BBMD in 30 ml Äthanol/Britton-Robinson-Puffer pH 5 (1:1), Geschwindigkeit 50 mV/sec.

irreversibel ist ( $s = 102 - 105$ ). Während die Form der Reduktionswelle vom pH-Wert der verwendeten Pufferlösungen nahezu unabhängig ist, verschiebt sich das Halbstufenpotential um ca. 20 mV pro pH Einheit (Tab. I).

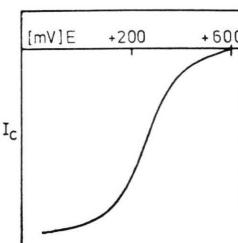


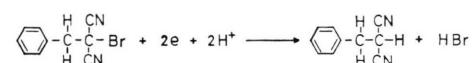
Abb. 2. DC-Voltammogramm,  $1,13 \times 10^{-3}$  M BBMD in 30 ml Äthanol/Britton-Robinson-Puffer pH 5 (1:1).

Tab. I. Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale der BBMD-Reduktion in Äthanol/Britton-Robinson-Puffer (1:1) vom pH-Wert des Puffers, Referenzelektrode Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>.

pH des Puffers	3	4	5	6	7
$E_{1/2} \pm 10$ mV	312	292	270	248	230
$S = dE/d \log (I/I_d - I)$	102	105	103	103	104

Pro Mol BBMD werden zur Reduktion zwei Elektronen benötigt. Dies ergab die Coulometrische Messung, deren Fortgang DC-polarographisch an der Abnahme des Grenzstromes verfolgt wurde. Als Reduktionsprodukt entsteht ausschließlich Benzylmalonitril. Es konnte durch Extraktion mit Äther isoliert werden und wurde im Vergleich mit einer durch Reduktion von Benzylidenmalonitril mit NaBH<sub>4</sub> hergestellten authentischen Probe<sup>15</sup> identifiziert.

Die elektrochemische Reduktion läßt sich durch folgendes Formelschema charakterisieren:



Es war zu erwarten, daß BBMD ein relativ starkes Oxidationsmittel ist, da es im Sinne der O-C(CN)<sub>2</sub>-Analogie<sup>16</sup> als analoges Benzylhypobromit aufzufassen ist.



Im Gegensatz zu den instabilen Hypobromiten, die unter HBr-Abspaltung in die Aldehyde über-

Tab. II. Oxidationen mit BBMD.

Ausgangsprodukt	Lösungsmittel	Temp. [°C]	Zeit [h]	Reaktionsprodukt	Ausb. % d. Th.	Benzylmalonitril Ausb. % d. Th.
Hydrochinon	Benzol	80	1	<i>p</i> -Benzochinon	55 a	60 a
Thioglykolsäure	Aceton	20	2	Thiodiglykolsäure	20 b	75 a
Hydrazobenzol	Benzol	80	1	Azobenzol c	15 d	50 a
Dihydroanthracen	Dichlormethan	20	16	Anthracen	60 a	60 a
Leukomalachitgrün	Dichlormethan	20	16	Malachitgrün	50 b	75 a
Cycloheptatrien	Acetonitril	82	1	Tropyliumbromid	28 b	80 a, e
N-BzL-NAH <sub>2</sub> f	Dichlormethan	20	2	N-BzL-NAH-bromid g	96 h	88 b
N-DCB-NAH <sub>2</sub> i	Dichlormethan	20	2	N-DCB-NAH-bromid k	95 h	83 b

a, GC-chromatographisch bestimmt; b, nach Abdest. des Lösungsmittels aus dem Rückstand isoliert; c, teilweise Benzidin-umlagerung, Benzidiniumbromid fällt aus; d, DC-chromatographisch bestimmt; e, beim Erhitzen von BBMD in Acetonitril ohne Cycloheptatrien (1 h) tritt nach der GC-Analyse in 8–12% Ausb. Reduktion zu Benzylmalonitril ein; f, N-Benzyl 1,4-dihydronicotinsäureamid; g, N-Benzyl-nicotinsäureamid-bromid; h, fällt bei der Umsetzung aus und wird abfiltriert; i, N-(2,6-Dichlorbenzyl)-1,4-dihydro-nicotinsäureamid; k, N-(2,6-Dichlorbenzyl)-nicotinsäureamidbromid.

gehen, ist BBMD bei Raumtemperatur beständig. Die analoge HBr-Abspaltung unter Bildung von Benzylidenmalonitril tritt erst bei langerem Erhitzen über den Schmelzpunkt ein<sup>1</sup> oder beim Behandeln der Lösungen mit Basen wie z. B. Triäthylamin oder Pyridin. Bei der Einwirkung wäßriger basischer Lösungen hydrolysiert das zunächst gebildete Benzylidenmalonitril zu Benzaldehyd<sup>2</sup>.

Wir konnten mit BBMD eine Reihe von OH-, SH-, NH- und CH-Verbindungen oxidieren. Die Ergebnisse sind in Tab. II zusammengestellt.

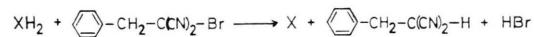
Als Reaktionsprodukt des BBMD entsteht in allen Fällen Benzylmalonitril. BBMD ist vergleichbar mit dem vielfach verwendeten Oxidationsmittel N-Bromsuccinimid (NBS), wird jedoch von diesem in der Oxidationswirkung übertroffen (El/2 bei pH 5 750 mV gegen SCE<sup>17</sup>).

Besonders auffallend ist der Reaktivitätsunterschied gegenüber primären und sekundären Alkoholen. So konnten wir bei der Umsetzung von BBMD mit Cyclohexanol oder Benzylalkohol auch nach mehrstündigem Erhitzen in Benzol keine, bei der Umsetzung mit Benzhydrol und Fluorenol nur Spuren der entsprechenden Oxidationsprodukte nachweisen. Bei NBS wird die primäre Bildung einer Hypobromit-Zwischenstufe diskutiert<sup>18</sup>, die nach HBr-Abspaltung dann zum Aldehyd bzw. Keton führt. Offenbar ist es diese Umwandlung ins Hypobromit, die bei der BBMD-Reaktion nicht eintritt. Wir vermuten, daß das Potential hierfür nicht ausreicht, es wird nämlich umgekehrt Benzylmalonitril von frisch hergestelltem Methylhypobromit<sup>19</sup> in BBMD überführt.



BBMD ist verglichen mit NBS ein schlechtes Bromierungsmittel. Cyclohexen wird in Tetrachlormethan unter Zusatz von Benzoylperoxid zu 10 bis 14% in  $\alpha$ -Stellung bromiert<sup>2</sup>, die analoge Reaktion mit 2,6-Dichlortoluol ergibt 8–10% 2,6-Dichlorbenzylbromid.

BBMD oxidiert die reduzierte Form einiger biologischer Redoxsysteme nach folgendem Schema:



Tab. III. Halbstufenpotentiale der verwendeten Redoxsysteme.

X/XH <sub>2</sub>	E <sub>0'</sub> mV
Ubichinon 10 (UQ) / Ubihydrochinon (UQH <sub>2</sub> )	+100 <sup>20</sup> , +89 <sup>21a</sup>
Plastochinon 9 (PQ) / Plasto hydrochinon (PQH <sub>2</sub> )	+25 <sup>21b</sup>
FAD/FADH <sub>2</sub>	-219 <sup>20</sup>
Liponsäure (LA) / Dihydroliponsäure (LAH <sub>2</sub> )	-290 <sup>20</sup> , -320 <sup>22</sup>
NAD <sup>+</sup> /NADH	-320 <sup>20</sup>
NADP <sup>+</sup> /NADPH	-324 <sup>20</sup>

PQH<sub>2</sub> und UQH<sub>2</sub> wurden in Äthanol ( $2 \times 10^{-4}$  M) unter N<sub>2</sub> mit BBMD versetzt ( $8 \times 10^{-4}$  M) und bei Raumtemperatur oder 40 °C oxidiert. Die DC-chromatographische Analyse zeigt neben Benzylmalonitril und dem entsprechenden Chinon keine weiteren Reaktionsprodukte. PQH<sub>2</sub> wird schneller oxidiert als UQH<sub>2</sub>. Bei einer Reaktionstemperatur

Substanz	UQ	UQH <sub>2</sub>	PQ	PQH <sub>2</sub>	BBMD	Benzylmalononitril
<i>R<sub>F</sub></i> mit LI	0,67	0,64	0,71	0,60	0,52	0,38
<i>R<sub>F</sub></i> mit LII	0,77	0,72	0,74	0,61	0,63	0,57

Tab. IV. *R<sub>F</sub>*-Werte (DC-Chromatographie),  
LI: Benzol/n-Heptan/Acetonitril (3:2:1),  
LII: Benzol/Methanol (9:1).

von 40 °C ist bis zum Verschwinden des PQH<sub>2</sub> im DC-Chromatogramm eine Reaktionszeit von 35 bis 45 min, bei UQH<sub>2</sub> von 180–200 min zu beobachten.

UV-spektroskopische Verfolgung der Reaktionen ist nicht möglich, da sich im entscheidenden Meßbereich von 250–300 nm, den Absorptionsmaxima von Chinon und Hydrochinon ( $\lambda_{\text{max}}$  in Äthanol: UQ = 275, UQH<sub>2</sub> = 290, PQ = 254, PQH<sub>2</sub> = 290 nm)

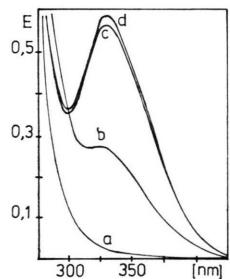


Abb. 3. LAH<sub>2</sub>+BBMD, Änderung des Elektronenspektrums nach Zugabe von BBMD, Lösungsmittel: Äthanol, Konzentrationen: LAH<sub>2</sub>  $4,61 \times 10^{-3}$  M, BBMD  $9,20 \times 10^{-3}$  M, a: Ausgangslösung LAH<sub>2</sub>, b: 15 sec, c: 3 min nach Zugabe, d: Kontrolllösung LA.

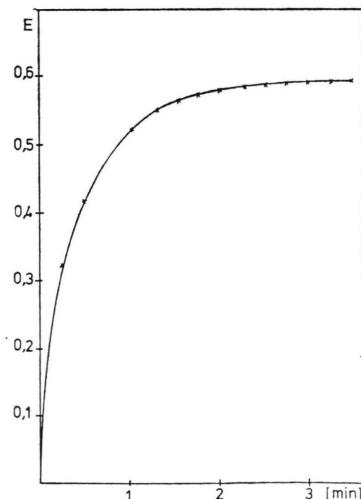


Abb. 4. LAH<sub>2</sub>+BBMD, Extinktionsänderung bei 333 nm als Funktion der Zeit, Lösungsmittel: Äthanol, Konzentrationen: LAH<sub>2</sub>  $4,61 \times 10^{-3}$  M, BBMD  $9,20 \times 10^{-3}$  M.

starke Restabsorptionen von BBMD und Benzylmalononitril überlagern.

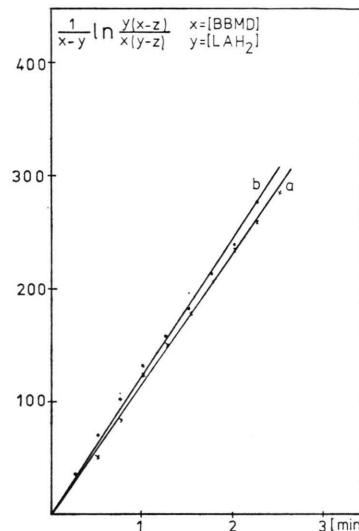


Abb. 5. LAH<sub>2</sub>+BBMD, graphische Darstellung der Reaktion 2. Ordnung, Lösungsmittel: Äthanol, a: Konzentrationsverhältnis LAH<sub>2</sub>:BBMD = 1:2, LAH<sub>2</sub>  $4,61 \times 10^{-3}$  M, BBMD  $9,20 \times 10^{-3}$  M, b: LAH<sub>2</sub>:BBMD = 2:1, LAH<sub>2</sub>  $9,60 \times 10^{-3}$  M, BBMD  $4,78 \times 10^{-3}$  M.

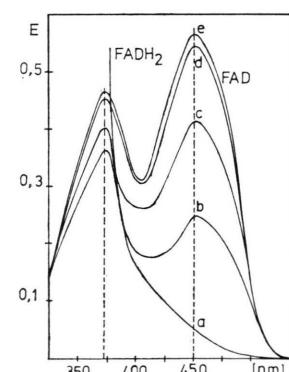


Abb. 6. FADH<sub>2</sub>+BBMD, Änderung des Elektronenspektrums nach Zugabe von BBMD, Konzentrationen im Test: FADH<sub>2</sub>  $5,1 \times 10^{-5}$  M, BBMD  $2,55 \times 10^{-4}$  M, Stammlösungen: FADH<sub>2</sub> in 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, BBMD in Äthanol (Uvasol), Stammlösungen werden mit M/20 Phosphatpuffer pH 6 1:30 verdünnt, a: Ausgangslösung FADH<sub>2</sub>, b: 15 sec, c: 1 min, d: 10 min nach Zugabe, e: Kontrolllösung FAD.

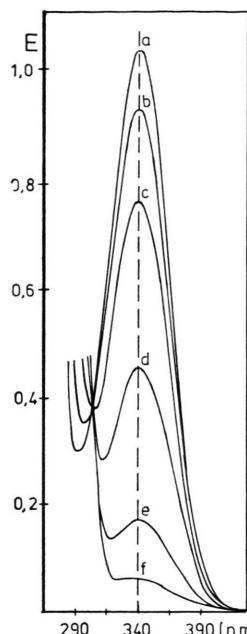


Abb. 7. NADH + BBMD, Änderung des Elektronenspektrums nach Zugabe von BBMD, Konzentrationen im Test: NADH  $2,7 \times 10^{-4}$  M, BBMD  $2 \times 10^{-4}$  M, Stammlösung NADH in M/20 Phosphatpuffer pH 6 wird 1:20, Stammlösung BBMD in Äthanol (Uvasol) 1:40 mit M/20 Phosphatpuffer pH 6 verdünnt, a: Ausgangslösung NADH, b: 3 min, c: 13 min, d: 33 min, e: 63 min, f: 100 min nach Zugabe

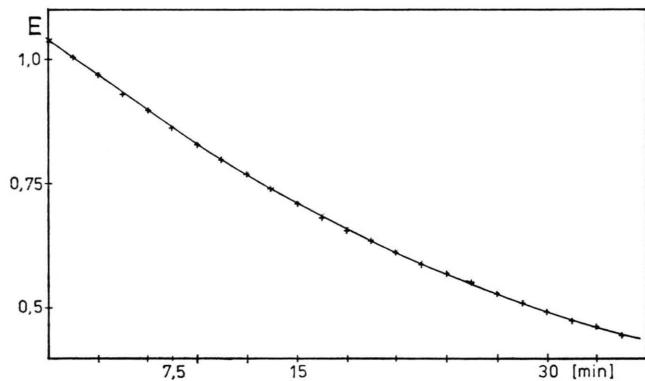


Abb. 8. NADH + BBMD, Extinktionsänderung bei 340 nm als Funktion der Zeit, Konzentrationen siehe Abb. 7.

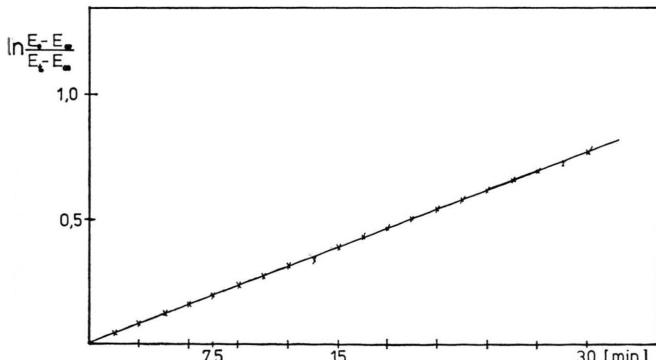


Abb. 9. NADH + BBMD, graphische Darstellung der Abnahme an NADH nach einer Kinetik 1. Ordnung, Konzentrationen siehe Abb. 7.

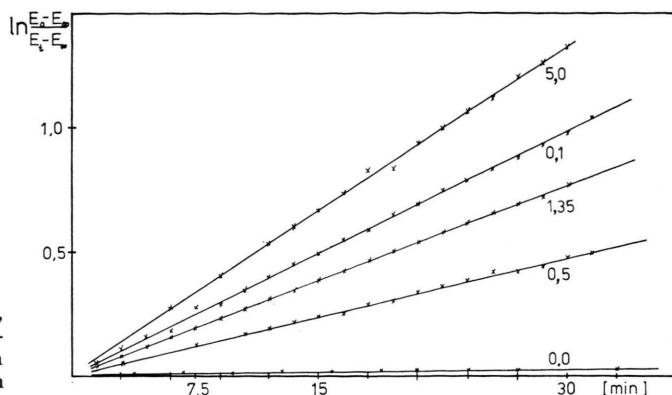


Abb. 10. NADH + BBMD, Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vom Konzentrationsverhältnis BBMD:NADH, Lösungsmittel: M/20 Phosphatpuffer pH 6.

Erwartungsgemäß wird die Dihydroliponsäure ( $\text{LAH}_2$ ) erheblich leichter oxidiert als  $\text{PQH}_2$  bzw.  $\text{UQH}_2$ . Benzylmalonitril ist gaschromatographisch leicht nachzuweisen, die Bildung der Liponsäure (LA) kann bequem UV-spektroskopisch verfolgt werden (Abbn. 3 und 4). Es ist eine Reaktion 2. Ordnung (Abb. 5) mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von  $2751 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Auch die Oxidation von  $\text{FADH}_2$  ist spektroskopisch leicht zu verfolgen: Dabei überlagern sich, wie Abb. 6 zeigt, im Bereich von 350 – 500 nm die Extinktionen des abnehmenden  $\text{FADH}_2$  und die des entstehenden FAD.

Die Oxidation der reduzierten Pyridinnucleotide NADPH und NADH mit BBMD wurde in M/20 Phosphatpuffer pH 6 und 7,5 durchgeführt. Das Benzylmalonitril lässt sich, wie bei allen Oxidationen, DC- oder GC-chromatographisch nachweisen, bei Ansätzen mit hohen Konzentrationen kann es auch durch Extraktionen mit Äther isoliert werden. Die Abnahme an NADH bzw. NADPH wurde UV-spektroskopisch bei 340 nm (Abbn. 7 und 8) gemessen. Sie erfolgt formal nach 1. Ordnung (Abb. 9).

Die Geschwindigkeitskonstanten sind abhängig vom Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner (Abb. 10) und in geringerem Maße auch vom pH-Wert (Abb. 11).

BBMD spaltet, wie oben ausgeführt, insbesondere bei Einwirkung von Basen HBr ab und bildet Benzylidenmalonitril. Man könnte vermuten, daß der eigentliche Reaktionspartner von NADPH bzw. NADH das Benzylidenmalonitril ist, das in einer vorgelagerten HBr-Abspaltung unter dem Einfluß

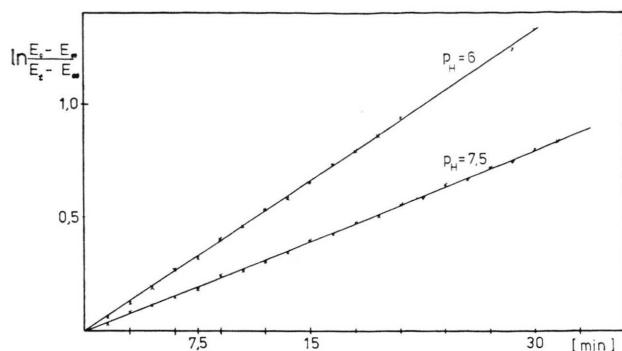


Abb. 11. NADH + BBMD, Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vom pH-Wert der Lösung (m/20 Phosphatpuffer) bei einem Konzentrationsverhältnis BBMD : NADH = 5 : 1.

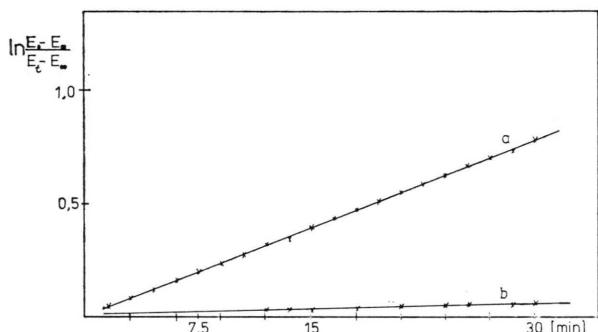


Abb. 12. Vergleich der Gleichgewichtskonstanten NADH + BBMD (a) und NADH + Benzylidenmalononitril (b), Lösungsmittel m/20 Phosphatpuffer pH 6, Konzentrationen im Test: NADH  $2,7 \times 10^{-4}$  M, BBMD bzw. Benzylidenmalononitril  $2 \times 10^{-4}$  M, Extinktionsänderung gemessen bei 366 nm.

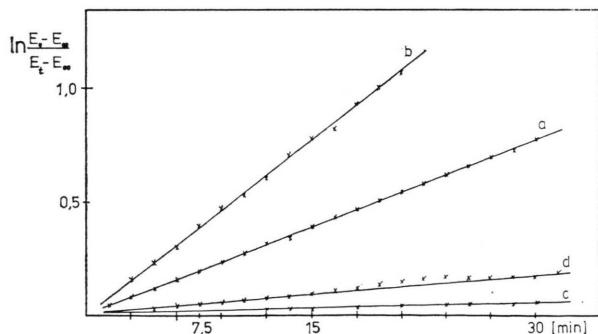
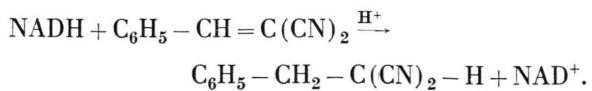


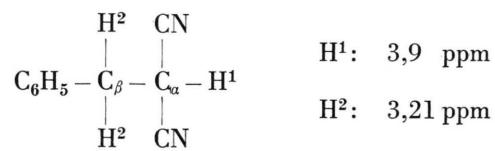
Abb. 13. Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der enzymatisch beschleunigten mit den nicht beschleunigten Reaktionen NADH + BBMD und NADH + Benzylidenmalononitril, Lösungsmittel: m/20 Phosphatpuffer pH 6, Konzentrationen im Test: NADH  $2,7 \times 10^{-4}$  M, BBMD bzw. Benzylidenmalononitril  $2 \times 10^{-4}$  M, Stammlösungen: NADH  $4,3 \times 10^{-3}$  M in m/20 Phosphatpuffer pH 6, BBMD  $11,55 \times 10^{-3}$  M und Benzylidenmalononitril  $11,6 \times 10^{-3}$  M in Äthanol (Uvasol), Extinktionsänderung gemessen bei 366 nm, a: NADH + BBMD, b: a + 0,11 U CS-Reduktase, c: NADH + Benzylidenmalononitril, d: c + 0,11 U CS-Reduktase.

des basischen Reduktionsmittels gebildet und dann reduziert wird nach folgendem Schema:



Diese Reaktion, die man bei Verwendung von authentischem Benzylidenmalononitril beobachten kann, verläuft jedoch erheblich langsamer als die entsprechende BBMD-Reaktion. Bei den angegebenen Bedingungen (Abb. 12) ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten  $2,6 \times 10^{-2} : 1,6 \times 10^{-3} = 16,23 : 1$ .

Bei der Reaktion von BBMD mit NADH-Modellen, wie N-Benzyl-1,4-dihydronicotinsäureamid oder N-(2,6-Dichlorbenzyl)-1,4-dihydronicotinsäureamid in absol. Dichlormethan beginnt nach kurzer Zeit das Pyridiniumbromid auszufallen, nach 10–15 min sind schon 80–90% Umsatz festzustellen. Benzylidenmalononitril reagiert unter diesen Bedingungen nicht, erst nach Zusatz von Säuren, und auch dann recht langsam. Schnelle Reaktion erfolgt in stark polaren Lösungsmitteln, z. B. Äthanol/Eisessig (9 : 1)<sup>23</sup>. Dabei wird der Wasserstoff in  $\beta$ -Stellung zu den Cyangruppen aufgenommen, ohne daß ein Austausch mit Protonen des Mediums stattfindet. Demgegenüber wird am  $\alpha$ -C-Atom ein Proton aus dem Medium addiert. Die NMR-Spektroskopie erlaubt es, diesen Reaktionsverlauf bequem nachzuweisen, indem N-Benzyl-1,4-dideuteronicotinsäureamid als Reduktionsmittel benutzt wird<sup>23</sup>. Setzt man dagegen BBMD mit deuterierten NADH-Modellen wie N-Benzyl-dideuteronicotinsäureamid um, so beobachtet man Deuterierung am  $\alpha$ -Kohlenstoff des Reduktionsprodukts.



Die Markierung ist allerdings selbst in absol. Dichlormethan nicht vollständig. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Malonitrilderivate sowohl thermodynamisch als auch kinetisch sehr starke Säuren sind<sup>24</sup>, sodaß ein konkurrierender Austausch mit den Protonen des Mediums für das  $\alpha$ -ständige Proton zu erwarten ist.

Sowohl die Reduktion von BBMD als auch die Reduktion von Benzylidenmalononitril zu Benzyl-

malononitril durch NADH wird durch ein Enzym beschleunigt, das sich aus menschlichen Erythrozyten andreichern lässt. Von den verschiedenen möglichen Wasserstoffacceptoren für die Reaktion mit NADH oder NADPH ist bisher das 2-Chlor-benzyliden-malononitril der beste. Wir bezeichnen das Enzym daher als „CS-Reduktase“<sup>9, 25</sup>. Der Beschleunigungsfaktor ist in beiden Fällen gering, er beträgt für die BBMD-Reduktion 1,63 und für die Benzyliden-

malononitril-Reduktion 3,5 bei den zu Abb. 13 angegebenen Bedingungen.

Wir danken dem Bundesministerium des Innern für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Unser Dank gilt weiterhin Herrn Dr. W. Draber, Bayer AG, Forschungszentrum, Wuppertal, für die Überlassung einer BBMD-Probe sowie der Hoffmann-La Roche AG, Basel, für die kostenlose Lieferung von Ubichinon, Plastochinon, Liponsäure und FAD.

- <sup>1</sup> J. C. Hessler, Amer. Chem. J. **22**, 181 [1899].
- <sup>2</sup> J. C. Westfahl u. T. L. Gresham, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2910 [1955].
- <sup>3</sup> W. P. Neumann, R. Sommer u. E. Müller, Angew. Chem. **78**, 545 [1966].
- <sup>4</sup> R. Sommer, E. Müller u. W. P. Neumann, Liebigs Ann. Chem. **718**, 11 [1968].
- <sup>5</sup> T. Zsolnai, Biochem. Pharmacol. **14**, 1325 [1965].
- <sup>6</sup> T. Zsolnai, Biochem. Pharmacol. **14**, 1425 [1965].
- <sup>7</sup> P. C. Brandon u. O. Elgersma, Biochim. Biophys. Acta **292**, 753 [1973].
- <sup>8</sup> C. Wolff, K. H. Büchel u. G. Renger, Z. Naturforsch. **30c**, 172 [1975].
- <sup>9</sup> K. Wallenfels, W. Ertel, A. Höckendorf, J. Rieser u. K. H. Ueberschär, Naturwissenschaften **62**, 459 [1975].
- <sup>10</sup> S. Muraoka u. H. Terada, Biochim. Biophys. Acta **275**, 271 [1972].
- <sup>11</sup> P. Cerletti u. N. Siliaprundi, Arch. Biochem. Biophys. **76**, 214 [1958]. P. Hemmerich, S. Ghisla, U. Hartmann u. F. Müller, Flavins and Flavoproteins, p. 83 (H. Kamin, ed.), University Park Press, Baltimore 1971. P. Hemmerich u. W. Haas, Reactivity of Flavins, p. 1 (K. Yagi, ed.), University of Tokyo Press 1975.
- <sup>12</sup> J. C. Gunsalus, L. S. Barton u. W. Gruber, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 1763 [1956].
- <sup>13</sup> Y. Hatefi, Biochim. Biophys. Acta **34**, 183 [1959].
- <sup>14</sup> J. Tomeš, Coll. Czech. Chem. Commun. **9**, 12 [1937].
- <sup>15</sup> W. Ertel, Diplomarbeit, Universität Freiburg 1969. K. Friedrich u. W. Ertel, Synthesis **1970**, 23.
- <sup>16</sup> K. Wallenfels, K. Friedrich, J. Rieser, W. Ertel u. H. K. Thieme, Angew. Chem. **88**, 311 [1976].
- <sup>17</sup> T. Nagai u. T. Matsuda, Rev. Polarogr. (Japan) **17**, 133 [1971].
- <sup>18</sup> R. Filler, Chem. Rev. **63**, 21 [1963].
- <sup>19</sup> Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, **Bd. 5**, pp. 24 und 248, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1960.
- <sup>20</sup> H. A. Sober, R. A. Harte u. E. K. Sober, Handbook of Biochemistry, p. J-33, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 2. Aufl. 1970.
- <sup>21</sup> E. C. Slater in G. E. W. Wolstenholme u. C. M. O'Conor, Ciba-Foundation Symposium, "Quinones in Electron Transport", J. u. A. Churchill, London 1961, a) p. 170 und 415, b) p. 416.
- <sup>22</sup> P. C. Jocelyn, Biochemistry of the SH Group, p. 56, Academic Press, London, New York 1972.
- <sup>23</sup> K. Wallenfels, W. Ertel u. K. Friedrich, Liebigs Ann. Chem. **1973**, 1663.
- <sup>24</sup> A. J. Kresge, Acc. Chem. Res. **8**, 354 [1975].
- <sup>25</sup> Veröffentlichung in Vorbereitung.