

212. Mechanistische Untersuchung zur Acyl-Übertragung von Thioestern auf Amino- und Imidazolgruppen

von Helmut Wenck¹⁾ und Jürgen Polster

aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(6. VI. 1973)

Zusammenfassung. Die Reaktion von 4'-Mercapto-acetanilid-acetat mit *n*-Butylamin sowie mit Imidazol wurde bei pH 7,5 und 25,0° mit Hilfe von Reaktionsspektren, Extinktionsdifferenzen-Diagrammen und Extinktionsdifferenzen-Quotienten-Diagrammen untersucht. Die Aminolyse des Thioesters ist «spektroskopisch einheitlich», die Imidazolyse verläuft in zwei linear unabhängigen Reaktionen: Bildung und Hydrolyse von N-Acetyl-imidazol.

Durch formale Integration wurden die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ermittelt. Unter physiologischen Bedingungen verläuft die Imidazolyse schneller, bei Berücksichtigung der pK-Werte muss jedoch das Amin als reaktiver betrachtet werden.

Einleitung. – Die Acylübertragung von Thioestern auf Amino- und Imidazolgruppen ist biochemisch allgemein von Interesse, u. a. als Modellreaktion zum Wirkungsmechanismus der Acyltransferasen (E.C.2.3.), z.B. der Acetyl-CoA: Glycyl-N-acyltransferase (E.C.2.3.1.13) mit einer Aminogruppe als Acyl-Acceptor. Die Acylübertragung auf Imidazol wird insbesondere im Zusammenhang mit der kooperativen Wechselwirkung von SH- und Imidazolgruppen im aktiven Zentrum von Enzymen wie Papain diskutiert. Schneider [1] [2] postulierte einen Reaktionsmechanismus zur enzymatischen Esterspaltung (Schema 1), dessen erster Teilschritt, der nucleophile Angriff des Schwefels auf die Carbonylgruppe des Esters, bereits in mehreren Arbeiten näher untersucht wurde [3–6]. Kinetische und präparative Untersuchungen [7–22] zu dem nächsten Teilschritt, dem intramolekularen Acyltransfer von S auf N, liegen ebenfalls vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine kinetische Analyse der Spaltung von Thioestern in Gegenwart von Aminen oder Imidazol mit Hilfe von Reaktionsspektren, Extinktionsdifferenzen-Diagrammen (ED-Diagrammen) und weiterer neuerer Auswertungsverfahren [23–27] am Beispiel des 4'-Mercapto-acetanilid-acetat (MAA), das wegen seines gut strukturierten UV.-Spektrums für die genannten spektroskopischen Verfahren besonders geeignet ist. In Annäherung an den physiologischen pH wurde ein Phosphatpuffer pH 7,5 als Reaktionsmedium verwendet.

Material und Methoden. – *Substanzen.* 4'-Mercapto-acetanilid-acetat (MAA) (Schuchardt) wurde nach [28] aus thiophenfreiem Benzol und danach 2mal aus bidest. H₂O umkristallisiert und unter Lichtausschluss im Vakuum aufbewahrt; *n*-Butylamin puriss. Fluka; Imidazol (BASF) wurde 3mal aus thiophenfreiem Benzol umkristallisiert; Kaliumdihydrogenphosphat p.a. Riedel de Haën; Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H₂O, Orthophosphorsäure, Natriumcarbonat und alle weiteren Substanzen p.a. Merck.

¹⁾ Neue Postanschrift: Prof. Dr. H. Wenck, Lehrstuhl für Chemie und Didaktik der Chemie, Pädagogische Hochschule Westfalen-Lippe, Lampingstrasse 3, D-48 Bielefeld, Deutschland.

Ergebnisse und Diskussion. – 1. *Spontanhydrolyse.* Es war zunächst zu prüfen, wie weit der Thioester in wässrigem Medium einer Spontanhydrolyse unterliegt. Wie sich herausstellte, kann diese jedoch bei pH 7,5 vernachlässigt werden, da sie extrem langsam verläuft. Die Spontanhydrolyse des MAA bei pH 9,1 verläuft noch immer relativ langsam. In Fig. 1 sind zwei Isobesteten bei 267,8 nm ($\epsilon = 13250$) und 226,7 nm ($\epsilon = 7300$) erkennbar; dies deutet auf eine «spektroskopisch einheitliche» Reaktion [27] hin.

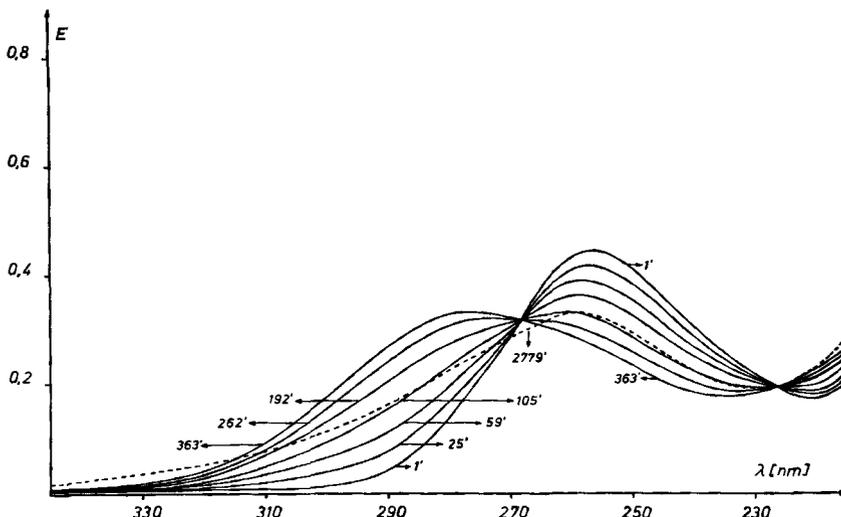


Fig. 1. Reaktionsspektren der Spontanhydrolyse von MAA bei pH 9,1 und 25°

2. *Nebenreaktionen.* Infolge der Wahl eines aromatischen Thioesters bleibt eine β -Elimination des gebildeten Mercaptans ausser Betracht.

In einer früheren Arbeit [29] konnte gezeigt werden, dass eine Substitution zum entsprechenden Alkohol unter den gewählten Bedingungen (pH 7,5; 25,0°) nicht stattfindet.

Die Oxydation zum Disulfid beeinträchtigt die Messungen erst bei langen Reaktionszeiten, wie die punktierte Linie in Figur 1 zeigt. Diese entspricht der Abnahme des Mercaptans durch die Bildung eines Disulfid-Niederschlages, wie früher [29] bereits ausführlich dargelegt.

3. *Reaktion von MAA mit n-Butylamin.* Die Reaktionsspektren der Spaltung des Thioesters mit *n*-Butylamin ergeben den gleichen Habitus wie die Spontanhydrolyse (s. Fig. 1), jedoch mit wesentlich kürzeren Reaktionszeiten. Nach ca. 2,5 Std. ist die Reaktion praktisch vollständig abgelaufen.

Auch hier weisen die isobestischen Punkte auf spektroskopische Einheitlichkeit der Reaktion hin.

Mit Hilfe von *ED-Diagrammen* kann exakt geprüft werden, ob eine Reaktion spektroskopisch einheitlich ist. Die Extinktionsdifferenzen $E_t - E_{t_0}$ bei zwei verschiedenen Wellenlängen werden zu verschiedenen Zeiten t (t_0 = Reaktionszeit des ersten Messpunktes) gegeneinander aufgetragen. Ergeben sich Nullpunkts-Geraden, so ist die Reaktion spektroskopisch einheitlich [23–24] [27].

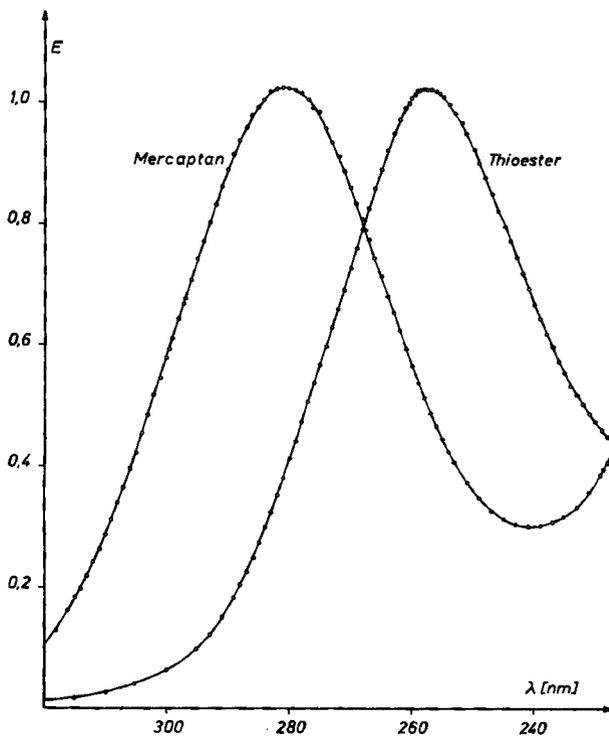


Fig. 2. UV.-Spektren des Thioesters MAA und des Mercaptans MA in Phosphatpuffer pH 7,5

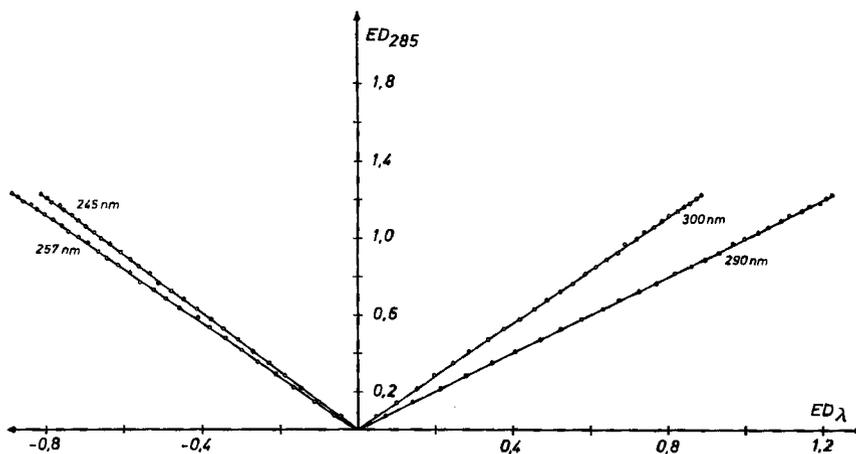


Fig. 3. ED-Diagramme von MAA + n-Butylamin bei pH 7,5 und 25,0°

Figur 3 zeigt ED-Diagramme verschiedener Wellenlängen-Kombinationen, die sämtlich linear verlaufen. Deshalb ist die Aminolyse von MAA im untersuchten Spektralbereich von 245 bis 300 nm spektroskopisch einheitlich.

In Analogie zu Schema 1 ist für die Aminolyse der in Schema 2 dargestellte Mechanismus zu erwarten. Das Zwischenprodukt ist als instabil zu betrachten; daher kann die *Bodenstein*-Hypothese des stationären Zustandes angewandt werden. Eine solche Reaktionsfolge ist ebenfalls als einheitlich [24] [27] anzusehen. Daher steht dieser Mechanismus nicht im Widerspruch zu den experimentellen Befunden.

Schema 2: Reaktionsmechanismus der Aminolyse von MAA

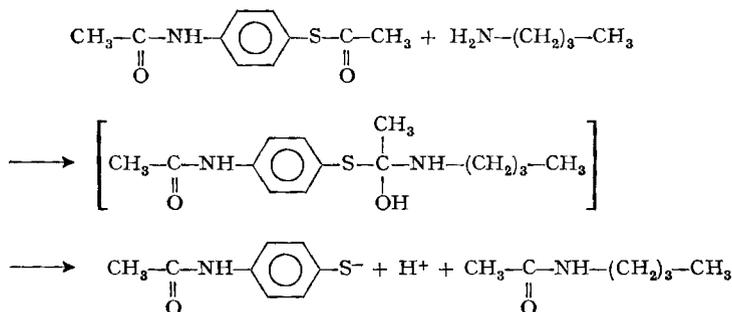


Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung der Aminolyse von MAA bei pH 7,5 und 25,0°

Wellenlänge [nm]	300	290	285	257	245
$k \cdot 10^4$ [s ⁻¹]	1,563	1,611	1,608	1,566	1,611

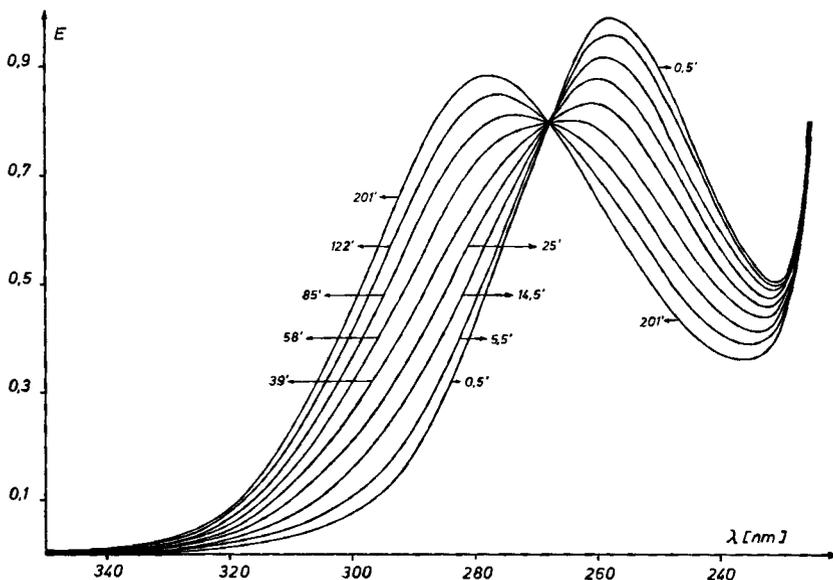


Fig. 4. Reaktionsspektren der Imidazolyse von MAA bei pH 7,5 und 25,0°

Da N-Acetyl-butylamin im untersuchten Spektralbereich nicht absorbiert, ist mit den hier angewandten Methoden nicht festzustellen, ob diese Verbindung weiter hydrolysiert wird. Andere Autoren [7–20] konnten z.T. präparativ nachweisen, dass N-Acetylamine bei der Aminolyse von Thioestern gebildet werden. Bei pH 7,5 sind Amide im allgemeinen stabil.

In Tab. 1 ist die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung in Abhängigkeit von der benutzten Wellenlänge dargestellt. Die Werte schwanken innerhalb von ca. 1,5% um den Durchschnitt.

4. *Reaktion von MAA mit Imidazol.* Figur 4 zeigt die Reaktionsspektren der Spaltung des Thioesters mit Imidazol. Bei 267,8 nm liegt ein isosbestischer Punkt ($\epsilon = 13250$), also an derselben Stelle wie bei Spontanhydrolyse und Aminolyse.

Die ED-Diagramme der Kombinationen 285/290 nm und 285/300 nm sind zwar linear, nicht jedoch diejenigen der Kombinationen 285/245 nm und 285/257 nm (s. Fig. 5).

In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Definition der «spektroskopischen Einheitlichkeit» hingewiesen; d.h., eine einheitliche Reaktion kann auch dadurch vorgetäuscht sein, dass Folgeprodukte (hier z.B. N-Acetyl-imidazol) im betrachteten Spektralbereich (hier z.B. 280–300 nm) nicht absorbieren (vgl. auch [27]).

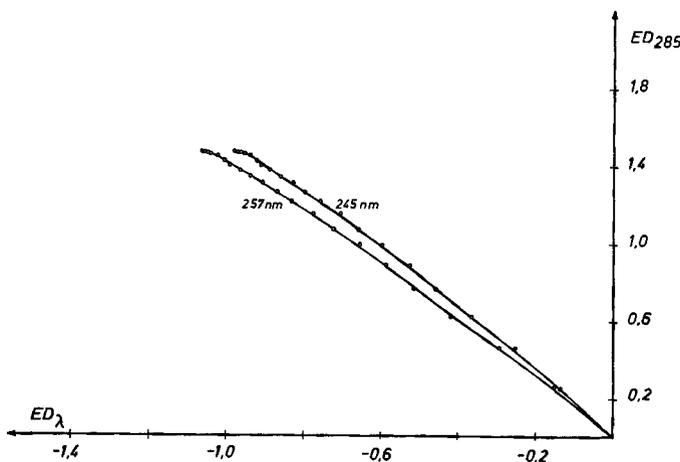


Fig. 5. ED-Diagramme von MAA + Imidazol bei pH 7,5 und 25,0°

Liegen in einem System zwei linear unabhängige Reaktionen [24] [27] vor, so gilt die Beziehung

$$\frac{\Delta E_\alpha}{\Delta E_\beta} = a + b \frac{\Delta E_\gamma}{\Delta E_\beta} \quad (3)$$

ΔE_λ = Extinktionsdifferenz bei der Wellenlänge α, β, γ .

a, b = Konstanten.

Trägt man die beiden Quotienten für verschiedene Messzeiten gegeneinander auf, so ergibt sich ein lineares *Extinktionsdifferenzen-Quotienten-Diagramm* (EDQ-Diagramm).

Das System MAA/Imidazol ergibt ein nahezu lineares EDQ-Diagramm. (Fig. 6). Die beiden ersten Punkte rechts unten weichen relativ stark von der Geraden ab, da die ersten Extinktionsdifferenzen sehr klein und daher mit sehr hohen Fehlern behaftet sind. Die anderen Abweichungen liegen statistisch. Diese Fehler entsprechen der geringen Krümmung der ED-Diagramme (Fig. 5).

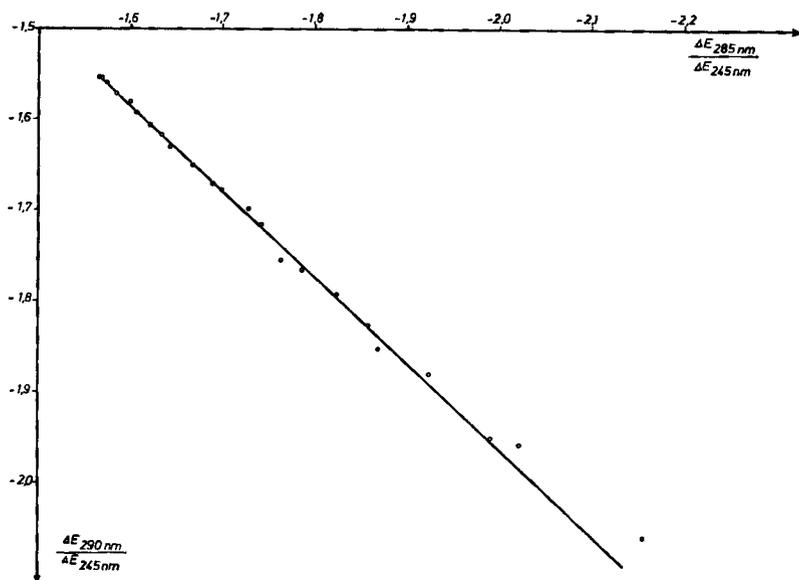


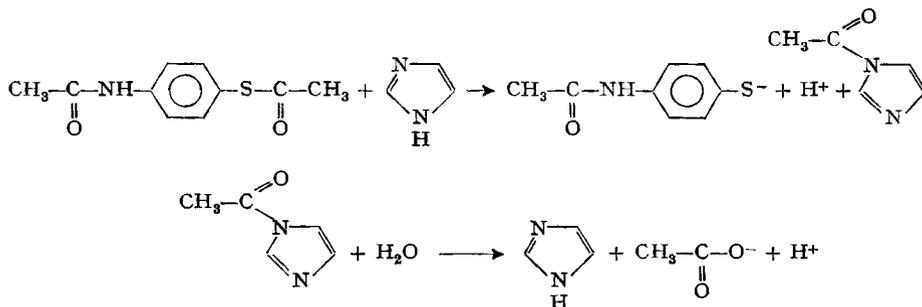
Fig. 6. EDQ-Diagramm des Systems MAA + Imidazol

Analog Schemata 1 und 2 ist für die Imidazolyse des MAA der in Schema 3 dargestellte Mechanismus zu erwarten.

Die durch das EDQ-Diagramm (Fig. 6) bewiesene zweite Teilreaktion ist die Zersetzung des in einer ersten Teilreaktion gebildeten N-Acetyl-imidazols (NACI) mit Wasser.

Da der Extinktionskoeffizient des NACI selbst in der Nähe des Maximums (ca. 245 nm) gering ($\epsilon \approx 2000$) und infolge der relativ schnellen Hydrolyse des NACI's

Schema 3. Reaktionsmechanismus der Imidazolyse von MAA



[27], dessen Konzentration während der Reaktion verhältnismässig niedrig ist, ist die geringe Krümmung der ED-Diagramme hierauf zurückzuführen.

Hierdurch wird der angegebene Mechanismus (Schema 3) experimentell untermauert. Damit findet auch der Mechanismus der enzymatischen Esterspaltung durch kooperative Wechselwirkung von Cys und His im aktiven Zentrum [1–2] eine weitere Bestätigung.

Tabelle 2. *Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung der Imidazololyse von MAA bei pH 7,5 und 25,0°*

Wellenlänge [nm]	300	290	285
$k \cdot 10^4$ [s ⁻¹]	5,56	5,70	5,79

In Tabelle 2 sind die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgeführt. Bei den Wellenlängen 245 nm und 257 nm absorbiert NACI, so dass dessen Zersetzung als Folgereaktion einer Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung im Wege steht.

Tabelle 3. *Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten [s⁻¹]*

k_1 = Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung

c = Konzentration mol/l des Amins bzw. Imidazols

α = Dissoziationsgrad des Amins bzw. Imidazols bei pH 7,5

	k_1	$k_2' = k_1/c$	$k_2 = k_1/\alpha \cdot c$	pK
Aminolyse	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$7,95 \cdot 10^{-3}$	9,81	10,59 Lit. [30]
Imidazololyse	$5,68 \cdot 10^{-4}$	$2,84 \cdot 10^{-1}$	0,374	7,0

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten (Tab. 3), normiert auf die Konzentration des Amins bzw. Imidazols, deutet zunächst darauf hin, dass die Imidazololyse wesentlich rascher verläuft als die Aminolyse. Bezieht man jedoch in Übereinstimmung mit *Schwyzler* [16] die Konzentration unter Berücksichtigung des Dissoziationsgrades auf das freie (deprotonisierte) Amin bzw. Imidazol, so ergibt sich im Hinblick auf den relativ hohen pK-Wert des ersteren, dass die Aminolyse auf einer wesentlich stärkeren Reaktivität beruht als die Imidazololyse.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Fr. Schneider*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1034 (1967).
- [2] *Fr. Schneider & H. Wenck*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 1653 (1969).
- [3] *Fr. Schneider & H. Wenck*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 1521 (1969).
- [4] *M. Kail, Fr. Schneider & H. Wenck*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **351**, 1280 (1970).
- [5] *E. Ziegler, H. Wenck & Fr. Schneider*, Z. Naturforsch. **25b**, 1417 (1970).
- [6] *H. G. Löffler, Fr. Schneider & H. Wenck*, Z. Naturforsch. **26b**, 43 (1971).
- [7] *P. J. Hawkins & D. S. Tarbell*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2982 (1953).
- [8] *D. S. Tarbell & D. P. Cameron*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2731 (1956).
- [9] *B. K. Morse & D. S. Tarbell*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 416 (1952).
- [10] *P. N. Rylander & D. S. Tarbell*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3021 (1950).
- [11] *R. E. Barnett & W. P. Jencks*, J. Amer. chem. Soc. **91**, 2358 (1969).
- [12] *W. P. Jencks & J. Carriuolo*, J. biol. Chem. **234**, 1280 (1959).
- [13] *T. Wieland & E. Bokelmann*, Angew. Chem. **64**, 59 (1952).

- [14] J. Th. G. Overbeek & V. V. Koningsberger, Koninkl. Nederl. Akad. B 57, 464 (1954).
 [15] R. Schwyzer & Ch. Hürlimann, Helv. 37, 155 (1954).
 [16] R. Schwyzer, Helv. 36, 414 (1953).
 [17] D. P. N. Satchell, Quart. Rev. 17, 160 (1963).
 [18] N. F. Albertson, Org. Reactions, 12, Chap. 4 (1962), dort weitere Lit.
 [19] D. R. Davis & A. L. Green, Adv. Enzymol. 20, 283 (1958).
 [20] T. E. King, Ch. J. Stewart & V. H. Cheldelin, Science 117, 439 (1953).
 [21] R. Voigt, H. Wenck & Fr. Schneider, Z. Naturforsch. 26b, 1010 (1971).
 [22] K. Wallenfels & L. Streffer, Biochem. Z. 346, 116 (1966).
 [23] H. Mauser, Z. Naturforsch. 19a, 767 (1964).
 [24] H. Mauser, Z. Naturforsch. 23b, 1021, 1025 (1968).
 [25] V. Bihl, Dissertation Tübingen 1968, S. 11/12.
 [26] H. Mauser, G. Gauglitz & F. Stier, Liebigs Ann. Chem. 739, 84 (1970).
 [27] H. Lachmann, H. Mauser, Fr. Schneider & H. Wenck, Z. Naturforsch. 26b, 629 (1971).
 [28] Th. Zincke & P. Jörg, Berl. Chem. Ber. 42, 3366 (1909).
 [29] H. Mauser, J. Polster & H. Wenck, Chimia 26, 361 (1972).
 [30] J. D. Edsall & J. Wyman, Biophysical Chemistry, Academic Press Inc., New York 1958.

213. Fragmentierung von α , β -Epoxyketoximen zu Alkinonen

Über Steroide, 228. Mitteilung¹⁾

von Peter Wieland und Heinz Kaufmann

Departement Forschung, Division Pharma, CIBA-GEIGY AG, Basel

(22. VI. 73)

Summary. The experimental details of the oxidoketone-alkynone fragmentation brought about by the treatment of steroidal α , β -oxido-oximes with hydroxylamine-O-sulfonic acid in alkaline solution at room temperature are presented together with a discussion of the mechanism of this reaction. Studies of a ring closure reaction transforming the fragmentation products back into the starting α , β -unsaturated ketones are discussed.

Zur Durchführung der α , β -Epoxyketon-Alkinon-Fragmentierung sind bereits mehrere Methoden beschrieben worden. Für präparative synthetische Arbeiten hat sich die α -Tosylhydrazon-Variante (**a** in Schema 1) [2, 3] als einfachstes und vielseitiges Verfahren erwiesen. Dabei wird ein α , β -Epoxyketon mit Tosylhydrazin umgesetzt. In vielen Fällen erfolgt die Fragmentierung des α , β -Epoxytosylhydrazons spontan oder sie lässt sich leicht unter milden Reaktionsbedingungen auslösen.

Eine Variante dieser Reaktion besteht in der thermischen Fragmentierung der Hydrazone aus α , β -Epoxyketonen und substituierten N-Aminoaziridinen (**b** in Schema 1) [4]. Der dieser Methode zugrundeliegende Leitgedanke, dass nämlich α , β -Epoxydiazalkane für den gewünschten Fragmentierungsprozess geeignete Zwischenstufen sein sollten, führte auch zu einer weiteren Spielart der α , β -Epoxyketon-Alkinon-Fragmentierung. Bei dieser Methode, die bereits in einer vorläufigen Mitteilung kurz beschrieben wurde [5], wird ein α , β -Epoxy-diazoalkan gebildet, indem man auf das Oxim eines α , β -Epoxyketons in alkalischer Lösung Natrium-hydroxylamin-O-sulfonat einwirken lässt (**c** in Schema 1).

¹⁾ 227. Mitt. vgl. [1].