

(compare yields of **21** and **22**), or even allylic (δ - or ε -) C–H bonds which, therefore, do not appear to be particularly activated (by the adjacent ethylenic linkage) for internal H-abstraction, as illustrated by the LTA oxidations of **12** (compare yields of **13** and (**14** + **15**)) and **16** (compare yields of **17** and **19**)⁸).

The authors are grateful to the *Serbian Republic Research Fund* and to the *Serbian Academy of Sciences and Arts* for financial support.

REFERENCES

- [1] *M. Lj. Mihailović, J. Bošnjak & Ž. Čeković*, *Helv.*, in the press.
 [2] a) *K. Heusler & J. Kalvoda*, *Angew. Chem.* **76**, 518 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* **3**, 525 (1964); b) *M. Lj. Mihailović & Ž. Čeković*, *Synthesis* **1970**, 209, and references cited therein; c) *M. Lj. Mihailović & R. E. Pavtch*, in 'Selective Organic Transformations', Vol. **2**, pp. 97–182; ed. by B. S. Thyagarajan, Wiley-Interscience, New York–London 1972, and references cited therein.
 [3] *R. M. Moriarty*, in 'Selective Organic Transformations', Vol. **2**, pp. 183–237; ed. by B. S. Thyagarajan, Wiley-Interscience, New York–London 1972, and references cited therein.
 [4] *J.-M. Surzur & M.-P. Bertrand*, *Bull. Soc. chim. France* **1973**, 1861, and references cited therein.
 [5] *S. Moon & J. M. Lodge*, *J. org. Chemistry* **29**, 3453 (1964).
 [6] *J.-M. Surzur, P. Cozzone & M.-P. Bertrand*, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci. (C)* **1968**, 908.
 [7] a) *J.-M. Surzur, M.-P. Bertrand & R. Nouguier*, *Tetrahedron Letters* **1969**, 4197; b) *M.-P. Bertrand & J.-M. Surzur*, *Bull. Soc. chim. France* **1973**, 2393; c) *R. D. Rieke & N. A. Moore*, *Tetrahedron Letters* **1969**, 2035; d) *R. D. Rieke & N. A. Moore*, *J. org. Chemistry* **37**, 413 (1972).
 [8] a) *D. L. H. Williams*, *Tetrahedron Letters* **1967**, 2001; b) *D. L. H. Williams, E. Bienvenue-Goetz & J. E. Dubois*, *J. chem. Soc. (B)* **1969**, 517; c) *A. Bresson, G. Dauphin, J.-M. Geneste, A. Kergomard & A. Lacourt*, *Bull. Soc. chim. France* **1971**, 1080.
 [9] *H. C. Brown, P. J. Geoghegan, Jr., J. T. Kurek & G. J. Lynch*, *Organometal. Chem. Syn.* **1**, 7 (1970/1971).
 [10] *S. Moon & L. Haynes*, *J. org. Chemistry* **31**, 3067 (1966).

- ⁸) However, with increasing distance between the double bond and the hydroxyl group (in the olefinic alcohol) the case of internal addition relative to intramolecular substitution slowly decreases, as evident from the ratios of 'addition' cyclic ethers to 'substitution' cyclic ethers, *i.e.* for **8**, (**9** + **10**):**11** = 96.5:3.5; for **12**, **13**:(**14** + **15**) = 78:22–74.5:25.5; for **16**, **17**:(**18** + **19**) = 72.5:27.5; for **20**, **21**:(**22** + **23**) = 58:42.

318. Kinetische Untersuchung der durch Imidazol katalysierten Acylübertragung von Thioestern auf Cyanessigeste, einer Modellreaktion zur enzymatischen Knüpfung von C, C-Bindungen von Helmut Wenck¹⁾ und Michael Schallies

aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

(4. IX. 73)

Zusammenfassung. – Die durch Imidazol katalysierte Acylübertragung von Thioestern auf Cyanessigsäureäthylester in wässrigem Medium als Modellreaktion zur enzymatischen Knüpfung von C, C-Bindungen besteht aus zwei Teilreaktionen: Bildung von N-Acetylimidazol und

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

Übertragung des Acylrestes auf den Acceptor. Letztere Teilreaktion ist spektroskopisch einheitlich. Mit dieser konkurriert die durch das entstehende RSH katalysierte Hydrolyse des N-Acetylimidazols als Nebenreaktion. Hierdurch erklärt sich die gegenüber den beiden Teilschritten beträchtlich verminderte Geschwindigkeit der Gesamtreaktion.

Bei konstantem pH nimmt die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion linear mit steigendem pK_{SH} ab.

Einleitung. – Während Modellreaktionen zum Mechanismus enzymatischer Hydrolysen kinetisch bereits eingehend untersucht wurden [1–7], liegen bisher nur wenige Arbeiten über Modellreaktionen zur enzymatischen Knüpfung von C, C-Bindungen vor (Enzyme E.C.4.1 und E.C.6.4). C, C-Additionen wurden von *Baker & Reid* [8] sowie von *Cronyn* [9] untersucht, Carboxylierungen – als Modell biotin-abhängiger Reaktionen – von *Schaeffer & Bhargava* [10]. Die Acylübertragung von N, S-Diacetylcysteamin auf Malonsäurederivate in wässrigem Milieu nach *Lienhard & Jencks* [11] ist von besonderem Interesse, weil sie wie viele der oben genannten hydrolytischen Prozesse [1–7] durch Imidazol katalysiert wird.

Ziel dieser Arbeit sind weitere Ergebnisse zum Mechanismus der Acylübertragung auf Carbanionen. Hierzu sollte zunächst die Reaktion von Thioestern mit Cyanessigester [11] durch Reaktionsspektren [5] und weitere moderne Verfahren [12–15] näher überprüft und in einigen Parametern variiert werden.

Weiterhin sollte das Reaktionsverhalten des bei der katalysierten Acylübertragung angenommenen Zwischenproduktes N-Acetylimidazol gegenüber Cyanessigester gesondert untersucht werden.

Auf das Studium der bei beiden Systemen auftretenden Nebenreaktionen wurde spezieller Wert gelegt.

Material und Methoden. – *Substanzen:* S-Acetyl-glutathion *Schuchardt*; S-Acetyl-thiocholinjodid puriss. *Fluka*; N, S-Diacetyl-cysteinamid [16]; S-Acetyl-4-[β -mercaptoäthyl]-imidazol [2]; N-Acetylimidazol [17]; Cyanessigsäure-äthylester purum *Fluka*; Imidazol *BASF*, aus Benzol mehrfach umkristallisiert; 4-Hydroxymethylimidazol [18]; 4-[β -Hydroxyäthyl]-imidazol [19]; 2-Methylimidazol *BASF*²⁾; 2,4-Dimethylimidazol *BASF*²⁾; N-Acetyl-cysteinamid [20]; 4-Mercaptomethylimidazol [2]; 4-[β -mercaptoäthyl]-imidazol [2]; Glutathion *Böhringer Mannheim*; Acetyl-Coenzym A *Böhringer Mannheim*; Pyrogallol DAB 6 *Merck*; Argon *Messer Griesheim*, mit Pyrogallol-Lösung [21] gereinigt; Fixanal-Ampullen *Riedel de Haën*; Kaliumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumpyrophosphat, Oxalsäure, Puffersubstanzen nach *Sørensen* sowie alle anderen Chemikalien *p. a. Merck*.

Geräte und Methoden: *Einwellenlängenkinetik* bei 270 nm (Extinktionszunahme durch den gebildeten 2-Cyano-acetessigester): Spektralphotometer *Zeiss PMQ II* mit Doppelmonochromator MM 12, thermostatisierbarem Küvettenhalter, Transmissions-Extinktions-Wandler und Kompensations-Linienschreiber *Servogor*. *Reaktionsspektren:* Registrierendes Spektralphotometer *Zeiss DMR 21* mit thermostatisierbarem Küvettenhalter. *Thermostatisierung:* *Colora*-Ultra-Thermostat, Temperaturkonstanz $\pm 0,01^\circ\text{C}$. *Küvetten:* Quarz 1 cm, *Hellma* 110 QS und 100 QS. *pH-Messung:* *Radiometer PHM 26* mit Radiometer-Elektroden G 202 C und K 401 (Eichpuffer 6,5 Radiometer). *pH-Stat-Kinetik:* Combi-Titrator *Metrohm 3D* mit Mikrobürette 0,2 ml, Typ E 425-1 und thermostatisierbarem Reaktionsgefäß EA 880 T-5 sowie Einstabelektrode EA 147 X.

Ansätze: *Puffer pH 7,0–8,75:* 0,2M Pyrophosphat, nach Zugabe von Imidazol (0,1M) mit 0,2M HCl zurücktitriert. *Puffer pH 9,0–10,0:* 0,5M Carbonat. – Die Pufferlösungen waren 1M an KCl, um die Ionenstärke konstant zu halten. Sie wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angesetzt und jeweils vor den Messungen 5 Min. mit Argon durchströmt.

²⁾ Der Firma *BASF* danken wir für die freundliche Überlassung der Chemikalien.

I. *Messküvette*: a) *Thioester als Donator*: 2,0 ml Puffer mit Katalysator für 0,1 M Endkonz. (bei pH \geq 9: 2,5 ml), 1,0 ml Cyanessigester für 10^{-2} M Endkonz. (bei pH \geq 9: 0,1 ml, entsprechend höher konz.), 0,1 ml Donator für $5 \cdot 10^{-4}$ M Endkonz. b) *N-Acetylimidazol als Donator*: Gleicher Ansatz wie a für pH \geq 9; N-Acetylimidazol wurde – entsprechend höher konz. – in abs. Äthanol vorgelöst.

II. *Vergleichsküvette*: Gleicher Ansatz wie I, jedoch anstelle der Donatorlösung bidest. H₂O bzw. Äthanol.

Gestartet wurde durch Einspritzen der Donatorlösung, bei pH \geq 9 durch gleichzeitiges Einspritzen der Donator- und der Cyanessigester-Lösung. Da die Substanzen in alkalischem Medium nicht haltbar waren, wurden sie im letzteren Fall – entsprechend höher konz. – in bidest. H₂O vorgelöst.

Auswertungsverfahren der Einwellenlängenkinetik: Die Reaktionen wurden nach pseudo-erster Ordnung ausgewertet, da der Cyanessigester gegenüber dem Acyl-donator in starkem Überschuss vorlag, der Katalysator gegenüber beiden (vgl. Ansätze).

Nach dem *Verfahren der Einzelkonstanten* wurden die Geschwindigkeitskonstanten k zu verschiedenen Zeiten t jeweils nach Gl. (1) errechnet. Von k wurde das arithmetische Mittel gebildet.

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{E_{\infty} - E_0}{E_{\infty} - E_t} \quad (1)$$

E_{∞} = Extinktion zur Zeit $t = \infty$ (vollständiger Umsatz)

E_0 = Extinktion zur Zeit $t = 0$

E_t = Extinktion zur Zeit t

Da zwischen $\ln(E_{\infty} - E_t)$ und t ein linearer Zusammenhang besteht, wurden diese Größen nach dem *graphischen Verfahren* gegeneinander aufgetragen; k wurde aus der Steigung der Geraden berechnet:

$$\ln(E_{\infty} - E_t) = \ln(E_{\infty} - E_0) - kt \quad (2)$$

Obwohl die Steigung durch eine Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt wurde, erwies sich dieses Verfahren in den meisten Fällen als zu störanfällig.

Daher wurden die endwertlosen Verfahren nach *Swinbourne* [14] [22] und nach *Guggenheim* [23] herangezogen.

Wenn die Extinktionsänderungen zwischen zwei Messpunkten zu gering wurden, versagten die beiden letzteren Verfahren und lieferten falsche Konstanten. Die den Verfahren jeweils zugrundeliegende Linearität wurde deshalb nach der Methode der kleinsten Quadrate überprüft. Die Konstanten wurden nur dann als «richtig» betrachtet, wenn die Abweichungen um die errechnete Gerade *statistisch verteilt* waren. Die endwertlosen Verfahren versagten bei der Reaktion der Thioester unterhalb pH 8,75.

Die Anwendung der *Methode der formalen Integration* nach *Mauser* [5] [24] erbrachte in diesen Fällen der zu geringen Extinktionsänderungen ebenfalls keine Verbesserung der Ergebnisse.

Daher wurde die Reaktion der Thioester bei pH $<$ 8,75 trotz der Fehlermöglichkeit durch den Endwert E_{∞} nach dem Verfahren der Einzelkonstanten ausgewertet. Bei pH \geq 8,75 wurde diese Reaktion nach dem Verfahren von *Swinbourne* ausgewertet, das sich auch für die Reaktion des N-Acetylimidazols im gesamten untersuchten pH-Bereich als geeignet erwies.

Alle Berechnungen wurden in ALGOL programmiert und mit einer Datenverarbeitungsanlage Control Data 3300 ausgeführt³⁾.

Ergebnisse und Diskussion. – *Spektroskopische Untersuchung der Gesamtreaktion.* Zur näheren Untersuchung der Acylübertragung von Thioestern auf Malonsäurederivate [11] wurden N,S-Diacetyl-cysteinamid als Donator und 2-Cyanoessigsäure-äthylester als Acceptor gewählt; letzterer zeigte bis pH 10 am wenigsten Nebenreaktionen im Vergleich zu allen anderen in Frage kommenden Verbindungen. Imidazolpuffer wurden nicht verwandt, da mit diesen eine Variation der Imidazolkonzentration über grössere Bereiche kaum möglich ist; es wurden vielmehr die üblichen Phosphat-, Pyrophosphat- und Carbonatpuffer benutzt. 0,1M Imidazol diente im Standardfall als Katalysator.

Die Reaktionsspektren der Fig. 1 zeigen eine kontinuierliche Zunahme der Extinktion zwischen 255 und 295 nm, so dass die Aufnahme der Einwellenlängenkinetik bei 264 nm [11] berechtigt erscheint. In einem isosbestischen Punkt ($\lambda = 248$ nm) bei pH 8,0 schneiden sich die Spektren erst ab 5,5 Min. Reaktionsdauer, das Spektrum bei 30 Sek. verläuft jedoch anders. Hieraus kann man auf die langsame Einstellung eines stationären Gleichgewichtes schliessen. Bei pH 9 und 10 liegt kein isosbestischer Punkt vor. Nach Lage der Spektren sind bei pH 10 keine E-Diagramme [5] [12–13] möglich. Bei pH 9,0 ergeben sich keine linearen E-Diagramme, die Reaktion ist also nicht spektroskopisch einheitlich [5] [12–13]. Da die Spektren bei diesem pH stark zusammengedrängt sind (Fig. 2), konnten keine Extinktionsdifferenzen-Quotienten-

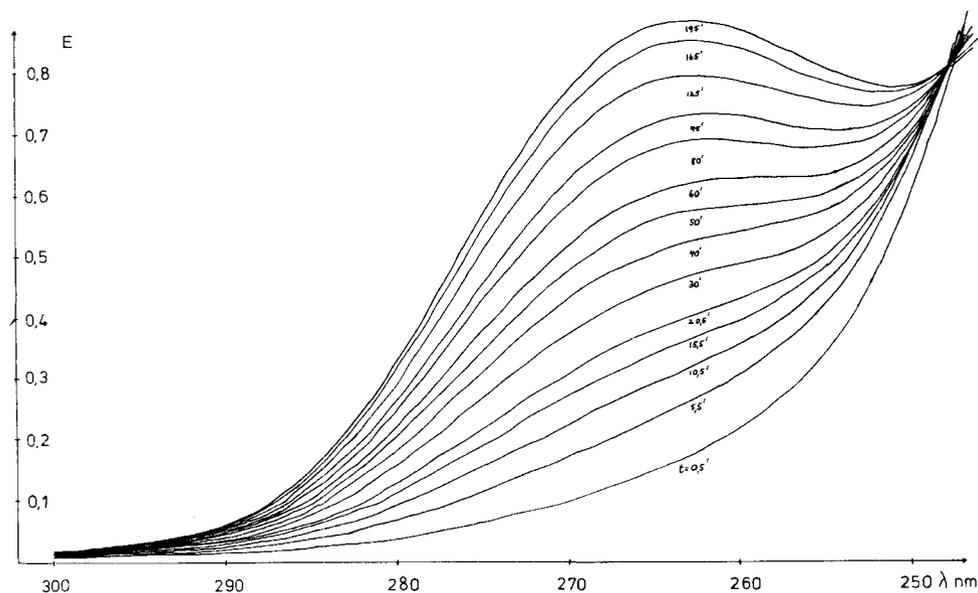


Fig. 1. Reaktionsspektren der Gesamtreaktion bei pH 8,0 und 25°C

³⁾ Der Leitung des Zentrums für Datenverarbeitung der Universität Tübingen danken wir für freundliches Entgegenkommen.

Diagramme [15] [25] (EDQ-Diagramme) aufgestellt werden. Auch bei pH 8,0 sind E-Diagramme nur in einem sehr schmalen Wellenlängenbereich zu gewinnen. Diese E-Diagramme sind teils nahezu linear, teils sehr flach gekrümmt, ebenso ist das aus sehr engem Bereich konstruierte EDQ-Diagramm 260/270//260/280 nm flach gekrümmt, so dass über die spektroskopische Einheitlichkeit bzw. die Anzahl von Teilreaktionen bei diesem pH noch keine klare Aussage zu erhalten ist.

Weitere Schlüsse können nur aus der Untersuchung der Acylübertragung von N-Acetylimidazol auf Cyanessigester als angenommener Teilreaktion [11] gezogen werden (s.u.).

pH-Abhängigkeit: In Tab. 1 sind die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung in Abhängigkeit vom pH dargestellt. Wertet man nach dem Verfahren von Lindley [26] aus, das nur *eine* dissoziabile Gruppe berücksichtigt, so ergibt sich ein pK-Wert von 10,7 (Fig. 3). Dieser liegt in dem Bereich, innerhalb dessen die Angaben über den pK der CH-aciden Gruppe im Cyanessigester variieren (10,5 [27] - 11,7 [11]). Es liegt nahe, dass die Reaktion mit steigender Konzentration des Carbanions rascher verläuft.

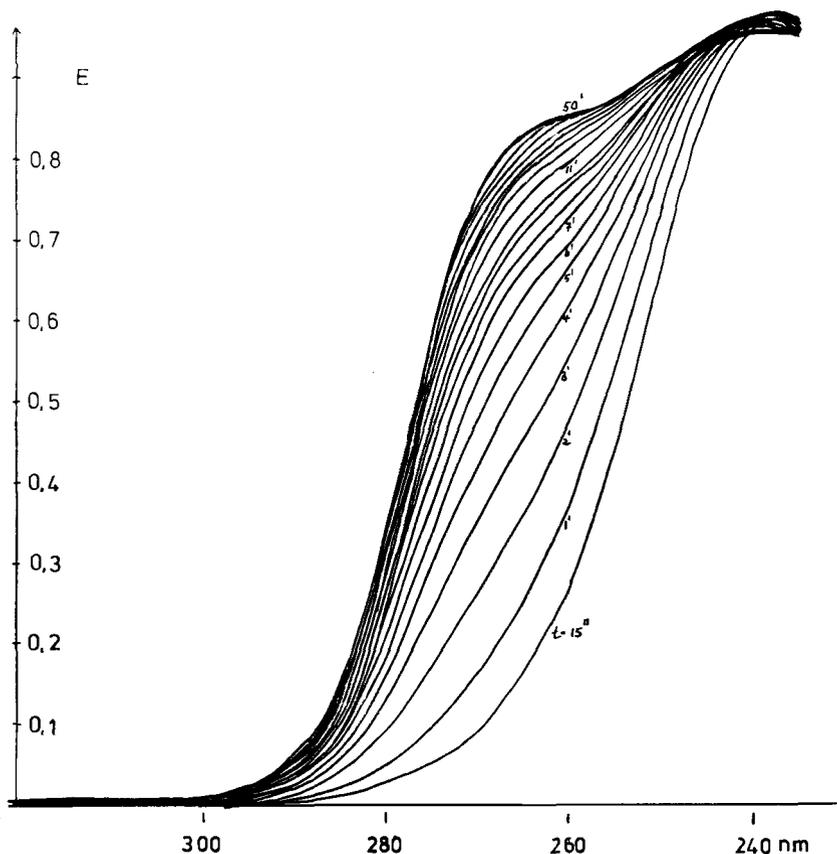
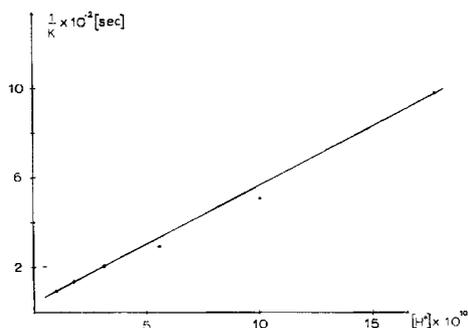


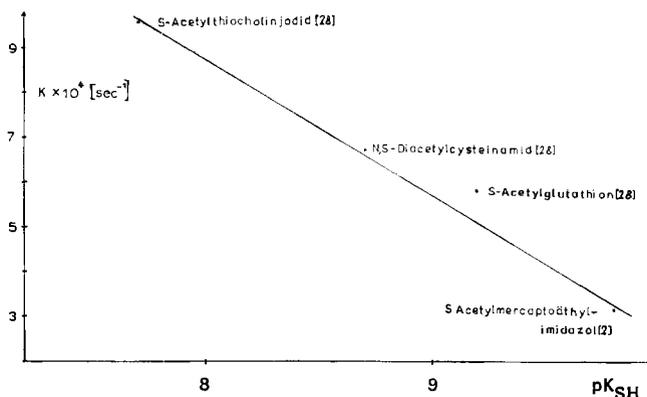
Fig. 2. Reaktionsspektren der Gesamtreaktion bei pH 9,0 und 25°C

Tabelle 1. *pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion (Standardfall) bei 25°C*

pH	7,75	8,00	8,25	8,50	8,75	9,00	9,25	9,50	9,75	10,0
$k \cdot 10^8$ [s ⁻¹]	0,394	0,401	0,496	0,690	1,02	1,99	3,38	4,97	7,45	10,1

Fig. 3. Lindley-Diagramm zur *pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion zwischen pH 8,75 und 10,0 bei 25°C*

Variation des Acyldonators. Bei konstantem pH und damit konstanter Konzentration des Acceptor-Carbanions und gegebener Temperatur hängt die Reaktionsgeschwindigkeit der Acylübertragung vom pK_{SH} des aus dem Thioester entstehenden Thiols ab. In Fig. 4 sind die Geschwindigkeitskonstanten mit verschiedenen Acyldonatoren gegen diesen aufgetragen, wobei sich eine lineare Abnahme mit steigendem pK_{SH} zeigt.

Fig. 4. *Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion vom pK_{SH} des Donators bei pH 8,5 und 25°C. Die pK_{SH} -Werte sind der Literatur [2] [28] entnommen*

Wegen seiner biologischen Bedeutung wurde auch Acetyl-Coenzym A als Donator eingesetzt. Infolge der Unübersichtlichkeit der Reaktionsspektren (zunächst Zunahme, nach 30 Min. Abnahme der Extinktion im Bereich 230–250 nm, kein Isosbest) konnte zwar eine Reaktion nachgewiesen werden; mit den hier verwandten Methoden war jedoch keine quantitative Aussage zu erzielen.

Variation des Katalysators. Tab. 2 zeigt einen Vergleich der katalytischen Wirkung von Imidazol mit einigen seiner Derivate. Bei 2-Methyl- und 2,4-Dimethylimidazol ergaben sich geringere Reaktionsgeschwindigkeiten. Dies war zu erwarten, da wegen der höheren pK_{Im} -Werte [29] bei gegebenem pH geringere Mengen an katalytisch wirksamer freier Base vorhanden sind und die Methylgruppe in 2-Stellung sterische Hinderung bewirkt [29].

Tabelle 2. *Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion mit verschiedenen Imidazolderivaten bei 25°C*

pH	Katalysator	$k \cdot 10^4$ [s ⁻¹]
8,0	4-Hydroxymethylimidazol	3,61
	4-Hydroxyäthylimidazol	3,37
	Imidazol	3,94
9,0	2,4-Dimethylimidazol	11,3
	2-Methylimidazol	8,01
	Imidazol	19,9

Bei den Hydroxy-Imidazolverbindungen liegt offenbar aufgrund des hohen pK_{OH} im untersuchten pH-Bereich eine zu geringe Konzentration an reaktivem Alkoxid-Anion vor, so dass die im Vergleich zum Imidazol stärkere nucleophile Wirkung nicht zum Tragen kommt.

4-Mercaptomethyl- und 4-Mercaptoäthylimidazol zeigten bei pH 7 und 8 keine katalytische Wirkung. Bei höheren pH-Werten machte eine beginnende Nebenreaktion, wahrscheinlich β -Elimination von H₂S, die Messung bei 264 nm unmöglich; die entsprechenden Eliminierungsprodukte absorbieren in diesem Bereich ebenfalls.

Mit freiem Histidin ergab sich bei pH 8,75 eine Geschwindigkeitskonstante von $8,67 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, also eine geringere katalytische Wirkung als mit Imidazol (vgl. Tab. 1), wahrscheinlich infolge der Abstossung des Carbanions durch die negative Ladung des Carboxylat-Ions.

Eine unkatalysierte Reaktion zwischen Thioester und Cyanessigester konnte in keinem Fall beobachtet werden. (Bei pH $\geq 9,25$ wurde eine Extinktionsabnahme beobachtet, die der Verseifung des Cyanessigesters und deren Folgereaktionen entspricht.)

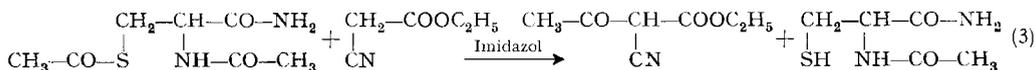
Einheitlichkeit der Acylübertragungs-Reaktion von N-Acetylimidazol auf Cyanessigester. Das bei der imidazolkatalysierten Esterhydrolyse [3] [5] [30] nachgewiesene Zwischenprodukt N-Acetylimidazol (NAcI) wird auch für die Acylübertragung von Thioestern auf Malonsäurederivate als Intermediärverbindung angenommen [11] [31].

Danach würde die Gesamtreaktion (s. Schema 1) aus den beiden Teilschritten von Schema 2 bestehen.

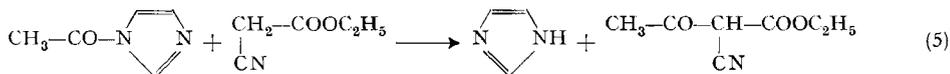
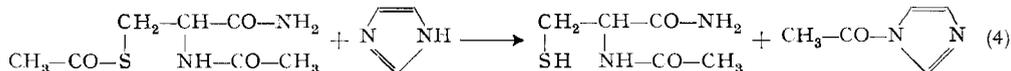
Um die vorliegenden Befunde besser deuten zu können, wurde die Reaktion (5) gesondert untersucht. Die Reaktionsspektren des Systems NAcI + Cyanessigester zwischen pH 7,8 (Fig. 5) und 8,5 zeigen einen Isobesten, der von 260 auf 254 nm wandert. Für pH 8,0 liegt er bei 258 nm.

Dieser Hinweis auf spektroskopische Einheitlichkeit der Reaktion (5) wird durch die Linearität der Extinktionsdifferenzen-Diagramme (ED-Diagramme) bestätigt (vgl. Fig. 6) [5] [12–13].

Schema 1



Schema 2



Da NaCl bei der hier untersuchten Acylübertragung (s. Tab. 3) ebenso wie bei durch Imidazol katalysierten hydrolytischen Prozessen [3] [5] [30] kein sehr kurzlebige Zwischenprodukt ist, kann bei Betrachtung der Gesamtreaktion (3) die *Bodenstein*-Hypothese des stationären Zustandes nicht angewandt werden. Daher trifft der Begriff der spektroskopischen Einheitlichkeit auf die Reaktionsfolge (4) \rightarrow (5) nicht zu [5]. In Übereinstimmung hiermit stellt auch die Auswertung der Temperaturabhängigkeit der Gesamtreaktion (3) bei pH 8,0 (Tab. 4), die auf ein nicht-lineares *Arrhenius*-Diagramm aufgrund verschiedener Temperaturabhängigkeiten der einzelnen Teilreaktionen schliessen lässt, während die Temperaturabhängigkeit der untersuchten Teilreaktion (5) im gemessenen Bereich (Tab. 5) ein lineares *Arrhenius*-Diagramm ergibt (Fig. 7). Aus diesem wurde eine Aktivierungsenergie von 16,8 kcal/mol errechnet.

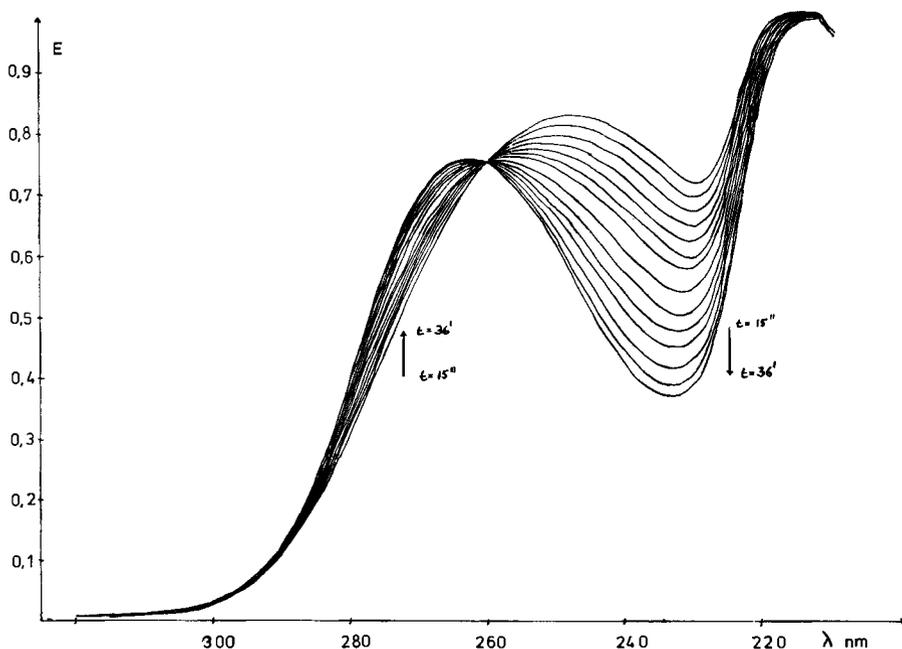


Fig. 5. Reaktionsspektren des Systems *N*-Acetyl-imidazol + Cyanessigester bei pH 7,8 und 25°C

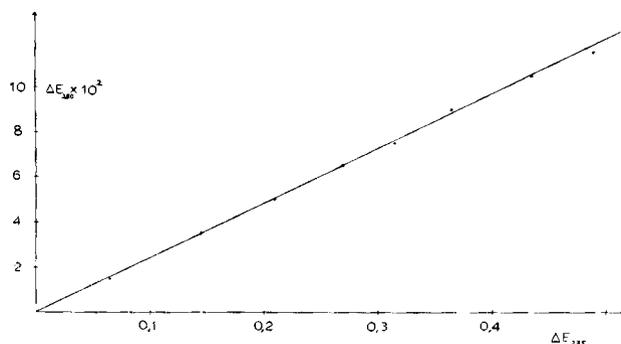
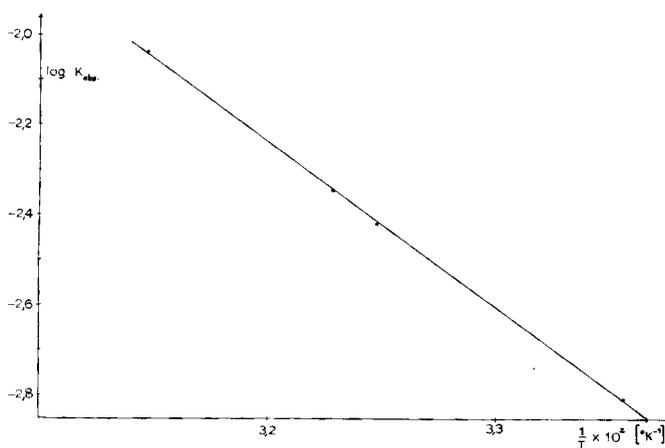

 Fig. 6. ED-Diagramm des Systems *N*-Acetylimidazol + Cyanessigester bei pH 8,0 und 25 °C

 Fig. 7. Arrhenius-Diagramm des Systems *N*-Acetylimidazol + Cyanessigester bei pH 8,0

 Tabelle 3. Geschwindigkeitskonstanten der Acylübertragung von *N*-Acetylimidazol auf Cyanessigester bei 25 °C in Abhängigkeit vom pH

pH	$k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	$k \cdot 10^3$ [s ⁻¹] bei Gegenwart von 0,1 M Imidazol
7,80	1,09	1,13
8,00	1,56	1,54
8,25	2,14	2,13
8,50	3,39	3,40

Tabelle 4. Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion (3) bei pH 8,0 in Abhängigkeit von der Temperatur

T °C	25,0	30,0	34,6
$k \cdot 10^4$ [s ⁻¹]	3,94	6,03	8,09

Tabelle 5. *Geschwindigkeitskonstanten der Acylübertragung von N-Acetylimidazol auf Cyanessigester bei pH 8,0 in Abhängigkeit von der Temperatur*

T °C	25,0	34,8	44,3
$k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	1,56	3,81	9,09

Aus Tab. 3 geht ausserdem hervor, dass die Teilreaktion (5) selbst nicht durch Imidazol beschleunigt wird.

Bildung des N-Acetylimidazols aus Thioester und Imidazol. Eine gesonderte Untersuchung der Teilreaktion (4) mit Hilfe von Reaktionsspektren und E-Diagrammen war wegen der mangelnden Strukturierung der UV.-Spektren des N,S-Diacetylcysteinamids und des N-Acetylimidazols, deren Maxima sich zudem noch überschneiden, nicht möglich. Ausserdem überlagert sich die Hydrolyse des gebildeten NAcI. Aus der Zunahme der Extinktion bei 250 nm konnten die Konstanten jedoch bei pH 9,0 zu $7,2 \cdot 10^{-3}$ und bei pH 10,0 zu $1,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ geschätzt werden.

Bei 264 nm wird die Extinktion im pH-Bereich 9–10 nach anfänglicher Zunahme ab ca. 5 Min. konstant. Wahrscheinlich stellt sich nach einer ersten Phase der NAcI-Bildung ein Gleichgewicht zwischen NAcI-Bildung und -Zerfall ein. Diese Bildungszeit des NAcI ist auch in den Reaktionsspektren der Gesamtreaktion (Fig. 1) zu beobachten (s.o.). Ähnliche Effekte treten bei der durch Imidazol katalysierten Esterhydrolyse [3] [5] [30] auf.

Wegen der puffernden Wirkung des Imidazols war eine genauere Untersuchung auch mit Hilfe der pH-Stat-Technik nicht möglich.

In einer früheren Arbeit [25] wurde die Acylübertragung von einem aromatischen Thioester auf Imidazol untersucht, wobei sich anhand von EDQ-Diagrammen zeigte, dass die Bildung von NAcI und dessen anschliessender Zerfall zwei spektroskopisch einheitliche Reaktionen sind.

Hieraus folgt, dass die durch Imidazol katalysierte Acylübertragung vom Thioester auf das Carbanion (3) aus zwei einheitlichen Teilschritten, den Reaktionen (4) und (5), bestehen muss.

Nebenreaktionen. Einige experimentelle Befunde, u.a. das gekrümmte EDQ-Diagramm (s.o.) sowie die Tatsache, dass die Gesamtreaktion (3) langsamer verläuft als jeder der beiden Teilschritte (4) und (5) [s. Tab. 6], so dass also keiner dieser beiden Teilschritte geschwindigkeitsbestimmend sein kann, lassen jedoch auf ein komplexeres Reaktionssystem schliessen. Daher wurde das Reaktionsgemisch auf Nebenreaktionen untersucht. In Schema 3 sind alle in Frage kommenden Reaktionsmöglichkeiten dargestellt.

Zunächst war die Spontanhydrolyse des Thioesters zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass der Thioester bis pH 9 stabil ist; bei pH 10,0 wurde am pH-Stat eine Zerfallskonstante von $1,81 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Untersuchung des aromatischen Thioesters [25], dessen Hydrolyse bei pH 7,5 völlig vernachlässigbar und bei pH 9,1 sehr langsam ist.

Weiter musste geprüft werden, ob das aus dem Thioester gebildete Thiol RSH (N-Acetylcysteinamid) oder dessen Zersetzungsprodukte einen echten *chemischen* Einfluss – z. B. katalytisch – auf die Gesamtreaktion (Hauptreaktion) ausüben oder

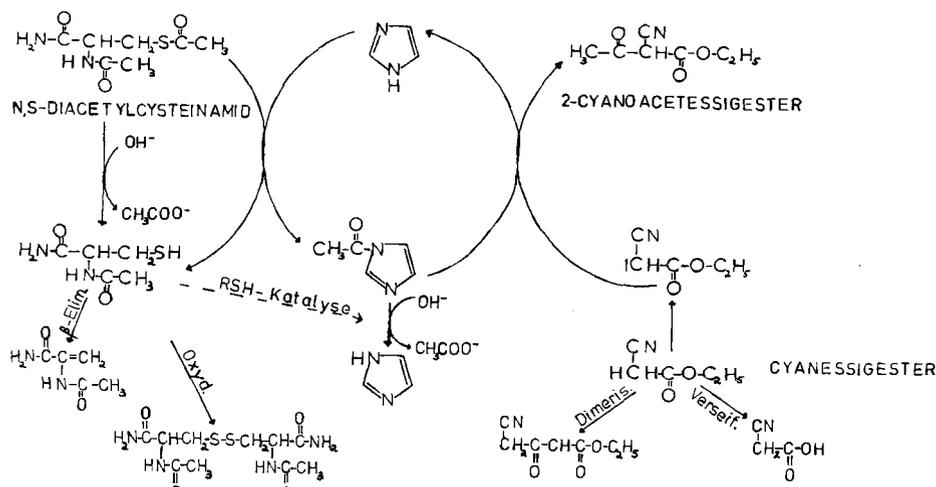
Schema 3. Acylübertragung von *N,S*-Diacetylcysteinamid auf Cyanessigsäureäthylester mit möglichen Nebenreaktionen


Tabelle 6. Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten bei 25°C

pH	Gesamtreaktion (3) $k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	Teilreaktion (4) $k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	Teilreaktion (5) $k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]
8,5	0,69	—	3,4
9,0	1,99	7,2	5,0

durch Extinktionsänderungen im verwendeten Wellenlängenbereich optisch eine Beeinflussung vortäuschen.

N-Acetylcysteinamid und zum Vergleich auch Glutathion GSH zeigten in den benutzten Puffersystemen bei 264 nm keine Änderung und im Bereich des Maximums der RS-Absorption bei 236 nm eine geringfügige Abnahme der Extinktion. Diese Befunde änderten sich auch in Gegenwart von 0,1 M Imidazol nicht, so dass eine optische Störung durch das entstehende RSH bzw. RS⁻ nicht vorliegt. Hinweise auf β -Eliminierung von H₂S wurden nicht gefunden. Die frühere Untersuchung eines aromatischen Thiols [32] hatte bei pH 7,5 gezeigt, dass Substitution zum entsprechenden Alkohol ausgeschlossen werden kann und die Oxydation sehr langsam verläuft.

Weiterhin war die Hydrolyse des NAcI zu untersuchen. Tab. 7 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der Spontanhydrolyse sowie der durch Imidazol und der durch RSH katalysierten Verseifung des NAcI. Man ersieht daraus, dass die Spontanhydrolyse des NAcI nur wenig langsamer verläuft als die Acylübertragung von NAcI auf Cyanessigester (vgl. Tab. 3). Imidazol beschleunigt bei pH 7,8 und 8,0 die NAcI-Hydrolyse um rund 20%, bei steigendem pH in noch geringerem Masse. Hieraus ist zu folgern, dass es sich nicht um eine Katalyse durch das unprotonierte Imidazol handeln kann, wie von Jencks [11] [33] vermutet. Es sollte daher eher ein Lösungsmittelleffekt (Imidazol-Lösung als Lösungsmittel) in der Art stärkerer Polarisierung durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante vorliegen, der die Dissoziation der ge-

lösten Stoffe beeinflusst und bei höheren pH-Werten relativ an Bedeutung verliert. Durch RSH wird die NAcI-Hydrolyse dagegen erheblich beschleunigt.

Tabelle 7. *Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse von N-Acetylimidazol bei 25°C in Abhängigkeit vom pH*

pH	$k \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	$k_{\text{Im}} \cdot 10^3$ [s ⁻¹]	$k_{\text{RSH}} \cdot 10^3$ [s ⁻¹]
7,80	0,99	1,19	7,14
8,00	1,29	1,56	6,96
8,25	1,77	1,96	6,71
8,50	2,70	2,77	8,21

k_{Im} = Geschwindigkeitskonstante in Gegenwart von 0,1 M Imidazol

k_{RSH} = Geschwindigkeitskonstante in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-4}$ M N-Acetylcysteinamid

Es ist also davon auszugehen, dass neben der Acylübertragung von NAcI auf Cyanessigester – Teilreaktion (5) – im Gesamtsystem auch der durch RSH katalysierte Zerfall des NAcI stattfindet. Wenn Parallelreaktionen bezüglich der Ausgangsstoffe dieselbe Reaktionsordnung haben, so ergibt sich das Erscheinungsbild einer einheitlichen Reaktion [5] [13]. Daher ist es nicht widersprüchlich, dass die benutzten spektroskopischen Methoden [5] [12–14] auf diese Parallelreaktion keinen Hinweis erbringen, obwohl deren Existenz durch Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten der NAcI-Hydrolyse in Gegenwart von RSH in separaten Versuchen belegt ist (Tab. 7).

Die Möglichkeit, dass der Acylrest ausser vom Schwefel auch vom Aminstickstoff des N,S-Diacetyl-cysteinamids aus übertragen wird, kann ausgeschlossen werden, da keine Reaktion zu beobachten ist, wenn anstelle des Thioesters die entsprechende freie SH-Verbindung, N-Acetylcysteinamid, eingesetzt wird.

Wesentlich sind jedoch die Nebenreaktionen des Acceptors. Unterhalb pH 9,25 ergab eine Messung bei 264 nm keine Extinktionsänderung einer Lösung von Cyanessigester in Puffer. Bei höherem pH wurde eine Abnahme der Extinktion gemessen, die z. B. bei pH 10,0 eine Verseifungskonstante von $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ergab, immerhin ca. 40% der Geschwindigkeit der Reaktion (3) (s. Tab. 1). Ähnliche Beobachtungen bei 250 nm liegen von Jencks [11] für Lösungen des Cyanessigesters in Carbonatpuffer pH 10,2 und in Natronlauge verschiedener Konzentration vor.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ändert die Gegenwart von Imidazol oder RSH diesen Sachverhalt nicht. Da der pK des Cyanessigesters bei ca. 11 liegt [11] [27] (s.o.), ist auch bei höheren pH-Werten eine Dimerisierung in Betracht zu ziehen.

Von den möglichen Nebenreaktionen sind also nur von Bedeutung: a) Spontanhydrolyse des NAcI, b) Spaltung des NAcI, durch gebildetes RSH katalysiert, c) Verseifung des Acceptors Cyanessigester.

Ausserdem beeinflusst Imidazol pH-abhängig die Hydrolyse des NAcI durch einen Lösungsmittelleffekt.

Wie Fig. 8 zeigt, nimmt die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion (3) linear mit der Imidazolkonzentration zu, jedoch nicht in dem einer Katalyse entsprechenden Verhältnis. Daher muss sich der erwähnte Lösungsmittelleffekt ebenfalls – verstärkt – auf die Gesamtreaktion auswirken.

Folgerung für die Gesamtreaktion. Der Befund, dass die Gesamtreaktion (3) langsamer als jede der beiden Teilreaktionen (4) und (5) verläuft, ist dadurch zu erklären, dass die durch das gebildete N-Acetylcysteinamid katalytisch beschleunigte Hydrolyse des N-Acetylimidazols mit der Teilreaktion (5) konkurriert.

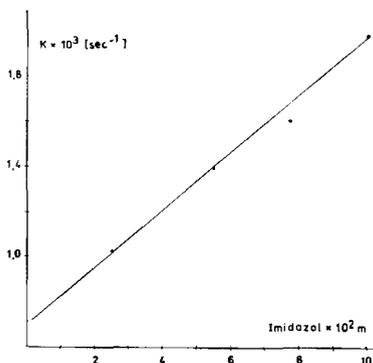


Fig. 8. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion (3) von der Imidazolkonzentration bei pH 9,0 und 25°C

LITERATURVERZEICHNIS

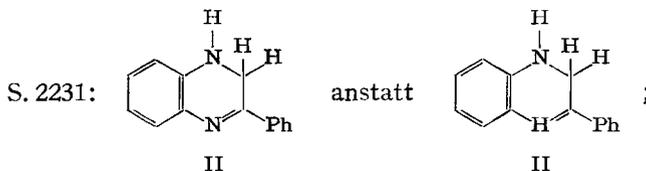
- [1] J. C. Sheehan, G. B. Benett & J. A. Schneider, J. Amer. chem. Soc. 88, 3455 (1966); E. Katchalski, G. D. Fasman, E. Simons & E. R. Blout, Arch. Biochem. Biophys. 88, 361 (1960); J. R. Whitaker, J. Amer. chem. Soc. 84, 1900 (1962); J. W. Ogilvie, J. T. Tildon & B. S. Strauch, Biochemistry 3, 754 (1964); T. C. Bruice & R. Lapinski, J. Amer. chem. Soc. 80, 2265 (1958).
- [2] Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1034 (1967).
- [3] Fr. Schneider & H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1221 (1967).
- [4] Fr. Schneider, E. Schaich & H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1525 (1968);
- [5] H. Lachmann, H. Mauser, Fr. Schneider & H. Wenck, Z. Naturforsch. 26b, 629 (1971).
- [6] Fr. Schneider & H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1653 (1969).
- [7] T. C. Bruice & S. J. Benkovic, Bio-organic Mechanisms, W. A. Benjamin Inc., New York 1966, dort weitere Literatur.
- [8] R. B. Baker & E. E. Reid, J. Amer. chem. Soc. 51, 1567 (1929).
- [9] M. W. Cronyn, M. P. Chang & R. A. Wall, J. Amer. chem. Soc. 77, 3031 (1955).
- [10] H. J. Schaeffer & P. S. Bhargava, J. Pharmaz. Sci. 51, 1116 (1962); *idem*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 468 (1964).
- [11] G. E. Lienhard & W. P. Jencks, J. Amer. chem. Soc. 87, 3863 (1965).
- [12] H. Mauser, Z. Naturforsch. 19a, 767 (1964).
- [13] H. Mauser, Z. Naturforsch. 23b, 1021, 1025 (1968).
- [14] V. Bihl, Dissertation Tübingen 1968, S. 11/12.
- [15] H. Mauser, G. Gauglitz & F. Stier, Liebigs Ann. Chem. 739, 84 (1970).
- [16] Fr. Schneider, persönliche Mitteilung.
- [17] H. A. Staab, Chem. Ber. 89, 1927 (1956).
- [18] Org. Syntheses, XXIV 64, submitted by J. R. Trotter & W. J. Darby, checked by H. R. Snyder & R. L. Rowland, Verlag J. Wiley & Sons, New York 1944.
- [19] W. Repppe, Liebigs Ann. Chem. 596, 63 (1955).
- [20] Fr. Schneider & H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1521 (1969).
- [21] F. Hoppe-Seyler & H. Thierfelder, Handbuch der pathologisch- und physiologisch-chemischen Analyse, Herausgeber K. Lang u. E. Lehnartz, 10. Aufl., Springer-Verlag Berlin.
- [22] E. S. Swinbourne, J. chem. Soc. 473, 2371 (1960).
- [23] E. A. Guggenheim, Phil. Mag. 2, 538 (1926).

- [24] *H. Mauser & H. Bokranz*, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 72, 272 (1968).
 [25] *H. Wenck & J. Polster*, Helv. 56, 2036 (1973).
 [26] *E. Lindley*, Biochem. J. 74, 577 (1960).
 [27] Organikum, 5. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1965, S. 428.
 [28] *E. Heilbronn*, Acta chem. Scand. 12, 1492 (1958); *H. Wenck*, Z. Naturforsch., eingereicht;
R. E. Benesch & R. Benesch, J. Amer. chem. Soc. 77, 5877 (1955).
 [29] *Fr. Schneider*, Habilitationsschrift Tübingen 1962.
 [30] *M. L. Bender & B. W. Turnquest*, J. Amer. chem. Soc. 79, 1652, 1656 (1957).
 [31] *T. C. Bruice* in Methods in Enzymology, VI, 606 (1963), ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan.
 [32] *H. Mauser, J. Polster & H. Wenck*, Chimia 26, 361 (1972).
 [33] *W. P. Jencks*, Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York 1969, p. 168;
W. P. Jencks, S. Cordes & J. Carriuolo, J. biol. Chemistry 235, 3608 (1960).

Erratum

Helv. 56, 2227 (1973), Abhandlung Nr. 235 von *Niklaus Baumann*:

S. 2227, Zeile 9: [4b] anstatt [4a];



S. 2233, Fig. 4: Ordinate $\frac{1}{\Phi_{II}}$ wie bei Fig. 3;

S. 2236, Zeile 3 und 17: (Gl. 7) anstatt (Gl. 6).

International Atomic Energy Agency – International Centre for Theoretical Physics

Miramare-Trieste, Italy, 16 January–10 April 1974

Further informations: The Deputy Director, International Centre for Theoretical Physics,
P.O. Box 586, I-34100 Trieste, Italy.

International Conference on Electron Spectroscopy

devoted to 'Progress in research and application'
Namur, Belgium, 16–19 April 1974

Further informations: The Conference Secretary, Laboratoire de Spectroscopie Electronique,
Faculté Universitaires, Rue de Bruxelles 61, B-5000, Namur, Belgium.