

Kinetik der Reaktion von Sulphydrylverbindungen mit α, β -ungesättigten Aldehyden in wäßrigem System

Von

H. Esterbauer

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Graz

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 4. Oktober 1969;
endgültige Fassung: 5. Dezember 1969)

2-Alkenale reagieren mit SH-Verbindungen zu $R-CH(SR)-CH_2-CHO$; 4-Hydroxy-2-alkenale reagieren zu den entsprechenden 4-Hydroxyalkanalen, die sich zu den cyclischen Halbacetalen umlagern. Die Gesamtreaktion ist reversibel. Die Geschwindigkeit der Produktbildung ist gegeben durch: $v = k$ (Alkenal) (Sulphydryl). Methoden zur Bestimmung der Konstanten k werden beschrieben. k ist eine scheinbare Konstante; sie ist eine Funktion der Konzentrationen und der Art aller Protonendonatoren (H_2O , H_3O^+ , CH_3COOH , $H_2PO_4^{-1}$, HPO_4^{-2} oder allgemein HX-Verbindungen). Es wird eine Gleichung abgeleitet, die den Zusammenhang zwischen der milieuabhängigen Konstante k einerseits und den individuellen, milieuunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten sowie der Zusammensetzung des Reaktionssystems beschreibt. Mit dieser Gleichung werden für einige Modellreaktionen aus den scheinbaren Konstanten k die wahren, milieuunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Die biologischen Effekte von Hydroxyalkanalen werden auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse diskutiert.

Kinetics of the Reaction of Sulphydryl Compounds with α, β -Unsaturated Aldehydes in an Aqueous System

2-alkenals react with SH-compounds to $R-CH(SR)-CH_2-CHO$; 4-hydroxy-2-alkenals react to the corresponding 4-hydroxy-alkanals which rearrange to the cyclic semiacetals $R-\underset{\text{O}}{\underset{|}{\text{C}}}-CH(SR)-CH_2-CHOH$. The

overall-reaction is reversible. The rate of product formation is given by: $v = k$ (alkenal) (sulphydryl). Methods for determination of the rate constant k are described. The apparent constant k is a function of concentration and kind of proton donors of the reaction system (H_2O , H_3O^+ , CH_3COOH , $H_2PO_4^{-1}$, HPO_4^{-2} or other HX-compounds). An equation is developed which

describes the interrelation between the overall-reaction rate constant k and the individual intrinsic rate constants and composition of the reaction system. By this formula from the k -values the individual intrinsic rate constants of some model reactions are calculated. The biological effects of hydroxyalkenals are discussed on the basis of the obtained data.

Einleitung

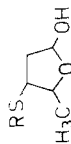
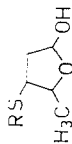
Wie die Untersuchungen von *Schauenstein* und Mitarb.¹ zeigen, sind die vielfältigen Wirkungen von Alkenalen und 4-Hydroxyalkenalen auf Zell- und Gewebesmaterial sowie auf isolierte Enzyme und Proteine vor allem der Reaktion dieser Aldehyde mit SH-Gruppen zuzuschreiben. Die Summe der dabei ablaufenden Teilreaktionen läßt sich formal durch die Reaktionsgleichung $Ald + RSH \rightarrow AldHSR$ ($R =$ Protein, Peptid oder niedermolekulare Verbindung) beschreiben. Voraussetzung für die Deutung und Interpretation der verschiedenen empirisch festgestellten Effekte dieser Aldehyde ist, daß sowohl die Struktur der Reaktionsprodukte als auch der Mechanismus und die Kinetik der Reaktionen α,β -ungesättigter Aldehyde mit Sulfhydrylverbindungen gesichert ist.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten einiger Reaktionen dieser Art gemessen. Es zeigte sich, daß die experimentell bestimmbar Konstanten in komplizierter Weise vom Reaktionsmilieu abhängen und zunächst weder einen Schluß auf die Reaktionskinetik noch auf die wahren milieunabhängigen Konstanten ermöglichen. Es war vorauszusehen, daß die Deutung der aus den kinetischen Messungen gewonnenen Daten um so schwieriger ist, je komplexer die eingesetzten Verbindungen sind. Daher sollte die Untersuchung der in Tab. I angeführten einfachen Modellreaktionen einen möglichst genauen Überblick über die bei den Reaktionen von Alkenalen bzw. Hydroxyalkenalen mit Sulfhydrylverbindungen in wäßriger Lösung ablaufenden Vorgänge ergeben. Thioglykolsäureäthylester wurde als Vertreter für SH-Verbindungen, die außer der SH-Gruppe keine weitere dissoziationsfähige Gruppe enthalten, ausgewählt, Thioglykolsäure als Modellsubstanz für SH-Verbindungen, die neben der SH-Gruppe noch eine weitere dissoziationsfähige Gruppe enthalten. Die

¹ *E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer, Mh. Chem. 95, 180 (1964); I. J. Bickis und E. Schauenstein, Abstr. 5th Internat. Congr. Chemother., Vienna 1967, Part. 2, Verl. Wiener Med. Akademie, Wien, 1967, p. 965; W. Burkl, I. Kramer und E. Schauenstein, Z. Naturforsch. 22 b, 763 (1967); E. Schauenstein, W. Wöhl und I. Kramer, Z. Naturforsch. 23 b, 530 (1967); E. Schauenstein, F. Dörner und J. Sonnenbichler, Z. Naturforsch. 23 b, 316 (1968); E. Schauenstein, B. Wünschmann und H. Esterbauer, Z. Krebsforsch. 71, 21 (1968); E. Schauenstein, B. Wünschmann und H. Esterbauer, Z. Krebsforsch. 72, 325 (1968); E. Schauenstein, I. J. Bickis und M. Taufer, Mh. Chem. 100, 1077 (1969).*

Tabelle 1. Modellreaktionen und Struktur der Reaktionsprodukte

<i>Ald</i>	RSH	<i>Ald</i> HSR
Rkt. 1 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$	$\text{HSCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{SR})-\text{CH}_2-\text{CHO}$
Rkt. 2 $\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$	$\text{HSCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}(\text{SR})-\text{CH}_2-\text{CHO}$
Rkt. 3 $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$	$\text{HSCH}_2\text{COOH}(\text{Na}^+)$	$\text{CH}_3-\underset{\text{SR}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CHO}$
Rkt. 4 $\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$	$\text{HSCH}_2\text{COOH}(\text{Na}^+)$	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}(\text{SR})-\text{CH}_2-\text{CHO}$



beiden Aldehyde wurden als Vertreter der Alkenale bzw. 4-Hydroxyalkenale gewählt.

Material und Methoden

Abkürzungen: *Ald* = α,β -ungesättigter Aldehyd; RSH = Sulfhydrylverbindung; *AldHSR* = Reaktionsprodukt von *Ald* und RSH; *HPE* = 4-Hydroxy-2-pentenal; *RGK* = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante; Gl. = Gleichung; *M* = Mole/Liter; *s* = Sekunden; *k* = experimentell bestimmbare *RGK* der Gesamtreaktion, definiert nach Gl. (1) in $M^{-1}s^{-1}$; (*Ald*) = *a* = Konzentration an *Ald* (in *M*); (RSH)_g = *b* = gesamte mit Methode 1 bestimmbare Konzentration an RSH (in *M*); (*AldHSR*) = *x* = Konzentration des Reaktionsproduktes *AldHSR* (in *M*), ohne cyclische Acetalform bei den Hydroxyalkenalreaktionsprodukten; *DTNB* = 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure).

Crotonaldehyd (Fa. Schuchardt, München): Einmal über die Kolonne destilliert. UV-Spektrum in Wasser: $\epsilon_{33\ 500\ \nu} = 43$, $\epsilon_{45\ 000\ \nu} = 15\ 500$.

*4-Hydroxypentenal*²: UV-Spektrum in Wasser: $\epsilon_{32\ 500\ \nu} = 36$, $\epsilon_{45\ 000\ \nu} = 13\ 800$.

Thioglykolsäure (etwa 80proz. wäbr. Lösung der Fa. Merck): Vor Gebrauch mit H₂O verdünnt und mit NaOH auf pH 6,0 gebracht. UV-Absorption in Wasser steigt mit dem Dissoziationsgrad der SH-Gruppe; aus der pH-Abhängigkeit des Spektrums wurde die Dissoziationskonstante der SH-Gruppe zu $K_{SH} = 5,0 \cdot 10^{-11}$ bestimmt ($t = 25^\circ$; 0,1 M KCl). $K_{COOH} = 3,0 \cdot 10^{-4}$ ($t = 25^\circ$; 0,1 M KCl).

Thioglykolsäureäthylester (Fa. Schuchardt, München): Aus der pH-Abhängigkeit der UV-Absorption wurde die Dissoziationskonstante der SH-Gruppe bestimmt zu $K_{SH} = 7,40 \cdot 10^{-9}$.

Reaktionsbedingungen: Alle kinetischen Messungen wurden in Wasser bei 25°C durchgeführt. Die pH-Werte der Reaktionslösungen lagen im Bereich von 0,3—12,0 und wurden während der Reaktion auf mindestens 0,05 pH-Einheiten konstant gehalten. Einstellung und Konstanthaltung der jeweiligen pH-Werte erfolgte nach dem pH-Stat-Prinzip mit NaOH bzw. HCl. Die Ionenstärke wurde mit KCl auf 0,1 μ eingestellt.

Bei den Experimenten zur Prüfung der Abhängigkeit der *RGK* von pH und Essigsäurekonzentration bzw. von pH und Phosphatkonzentration enthielt die Reaktionslösung zwischen $5 \cdot 10^{-3}$ und $5 \cdot 10^{-1} M$ Gesamtacetat bzw. -phosphat. Die Ionenstärke war bei diesen Experimenten $\geq 0,1 \mu$.

Die Anfangskonzentrationen von *Ald* (Crotonaldehyd, Hydroxypentenal) lagen im Bereich von $1 \cdot 10^{-1}$ bis $5 \cdot 10^{-5} M$, die Anfangskonzentrationen an RSH zwischen $2 \cdot 10^{-3}$ und $5 \cdot 10^{-5} M$.

Das Mischungsverhältnis *Ald*:RSH betrug 20—50:1; 3:1; 1:1 oder 1:3.

Mischungsverhältnis und Konzentration der Reaktanten waren stets so gewählt, daß die Hauptreaktion nicht durch störende Nebenreaktionen (Oxydation der SH-Verbindungen, H⁺- und OH⁻-katalysierte Polymerisation

² H. Esterbauer und W. Weger, Mh. Chem. 98, 1884, 1994 (1967).

der Aldehyde) beeinflußt wurde. Die Geschwindigkeit der Nebenreaktionen wurde in einer Reihe von Vorversuchen gemessen³.

Reaktionsansatz: Das Reaktionsgefäß ist ein auf $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ thermostatisiertes 150-ml-Titriergefäß mit 5-Schliff-Aufsatz. Der Mittelschliff nimmt die kombinierte Glaselektrode auf, die äußeren Schliffe enthalten das Thermometer, die Zuleitung von einer NaOH-Kolbenbürette (E 274, Fa. Metrohm) und die Zuleitung von einer HCl-Kolbenbürette. Durch die fünfte Schlifföffnung werden die Reaktionslösungen zugegeben und Proben entnommen. Gerührt wird mit Magnetrührer und teflonüberzogenem Rührstäbchen.

In das Reaktionsgefäß pipettiert man 10 ml *m*-KCl-Lösung, 70 ml H₂O (bei den Versuchen über den Einfluß von Acetat oder Phosphat: 20 ml H₂O und 50 ml Acetat- bzw. Phosphatlösung), 10 ml Na-Thioglykolat oder Thioglykolsäureäthylesterlösung bekannter Konzentration (Konzentration bestimmt mit DTNB nach *Ellman*⁴). Durch Zugabe von HCl oder NaOH aus den Kolbenbüretten wird der gewünschte pH-Wert eingestellt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml wäbr. Aldehydlösung bekannter Konzentration gestartet (Konzentrationsbestimmung spektrometrisch). Während der Aldehydzugabe, die in 5 s beendet sein soll, wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Je nach Reaktionsgeschwindigkeit werden in Intervallen von 30 s bis 1 h Proben entnommen und auf SH-Gehalt bzw. Aldehydgehalt analysiert. Während der Reaktion auftretende pH-Änderungen werden durch vorsichtige Zugaben von HCl oder NaOH ausgeglichen. Die zugegebenen Volumina waren kleiner als 2 ml, der Verdünnungsfaktor wurde nicht berücksichtigt.

Bestimmung von b und a in Abhängigkeit von der Reaktionszeit t

Die Anfangskonzentrationen a_0 und b_0 ergeben sich unmittelbar aus Volumen und Konzentration der eingesetzten Aldehyd- bzw. Sulfhydryllösung. Das Fortschreiten der Reaktion wird entweder auf Grund der Konzentrationsabnahme der Sulfhydrylverbindung (Methode 1) oder der Aldehydverbindung (Methode 2) verfolgt. Gemessen wird immer die Konzentrationsabnahme der Unterschlußkomponente.

Methode 1: Bestimmung von b : Aus der Reaktionslösung werden v ml Probe (0,5 bis 5 ml) entnommen und zu einer Mischung aus $(5 - v)$ ml H₂O und 5 ml DTNB-Reagens gegeben. DTNB-Reagens: $1 \cdot 10^{-4}$ Mole = 39,6 mg DTNB in 100 ml 0,1*m*-Phosphatpuffer pH 7,0. Die Gelbfärbung wird innerhalb einer Minute bei 412 nm ($d = 2$ cm, 1 cm) gemessen. Die Vergleichsküvette enthält eine Mischung aus 5 ml H₂O und 5 ml DTNB-Reagens. Aus der gemessenen Extinktion E berechnet sich die vorhandene Konzentration der Sulfhydrylverbindung in der Reaktionslösung nach:

$$b = E/f/13\,500\,d$$

(f = Verdünnungsfaktor)

Durch DTNB wird die Reaktion sofort gestoppt, da die noch vorhandene SH-Verbindung in einer schnellen Reaktion zum entsprechenden Disulfid umgesetzt wird.

Bei dem zur Durchführung der Reaktion benötigten pH-Wert von 7 bis 8 reagieren die SH-Verbindungen aber auch mit den Aldehyden mit

³ H. Esterbauer, unveröffentlichte Versuche.

⁴ G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 (1959).

erheblicher Geschwindigkeit. Ob die Vernachlässigung dieser Parallelreaktion gerechtfertigt ist, läßt sich in einem einfachen Experiment überprüfen. Man gibt zu einer Mischung aus 5 ml *DTNB*-Reagens und 4 ml Aldehydlösung ($c = 0; 1 \cdot 10^{-3}M; 5 \cdot 10^{-3}M$ usw.) 1 ml RSH-Lösung bekannter Konzentration und mißt $E_{412 \text{ nm}}$. Bei den untersuchten Reaktionen findet man 95 bis 100% des eingesetzten RSH nur dann, wenn die Aldehydkonzentration in der Meßlösung kleiner als etwa $1 \cdot 10^{-2}M$ ist. Dieser Grenzwert hängt sowohl von der Art des *Ald* als auch von der Art der zu bestimmenden Sulfhydrylverbindung ab. Die Extinktion der Probe nimmt bei längerem Stehen zu, da sich *Ald*HSR in der reversiblen Reaktion zu *Ald* und RSH zersetzt.

Methode 2: Bestimmung von a : Bei den Experimenten, bei denen die Reaktionslösung HCl, NaOH, Phosphatpuffer oder Acetatpuffer in Konzentrationen größer als $5 \cdot 10^{-2}M$ enthält, ist eine pH-Änderung während der Reaktion nicht zu befürchten und eine pH-Kontrolle während der Reaktion, wie sie bei Methode 1 durchgeführt wird, nicht notwendig. Eine Probe der Reaktionslösung wird unmittelbar nach dem Starten der Reaktion in Küvetten geeigneter Schichtdicke übergeführt und der Reaktionsablauf im Spektrometer bei $45\,000 \text{ cm}^{-1}$ verfolgt. Die Vergleichsküvette enthält alle Komponenten mit Ausnahme der Reaktanten. Das Küvettengehäuse ist auf 25°C thermostatiert. Ungesättigte Aldehyde zeigen ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei $45\,000 \text{ cm}^{-1}$, das bei der Reaktion mit Sulfhydrylverbindungen verschwindet. Aus der gemessenen Extinktion berechnet sich die Konzentration des *Ald* in der Reaktionslösung nach: $a = m - (b_0 \epsilon_{\text{RSH}} - a_0 \epsilon_{\text{RSH}} + a_0 \epsilon_{\text{AldHSR}}) / (\epsilon_{\text{Ald}} + \epsilon_{\text{RSH}} - \epsilon_{\text{AldHSR}})$. Dabei ist $m =$ Extinktion der Probe bei $45\,000 \text{ cm}^{-1}$, $d = 1 \text{ cm}$; ϵ_{Ald} , ϵ_{RSH} , ϵ_{AldHSR} = molare dek. Extinktionskoeffizienten von *Ald*, HSR und *Ald*HSR; der ϵ_{RSH} -Wert ist pH-abhängig.

Für Thioglykolat gilt bei pH 1 bis 9, für Thioglykolsäureäthylester von pH 1 bis 6: $\epsilon_{\text{AldHSR}} - \epsilon_{\text{RSH}} \ll \epsilon_{\text{Ald}}$. Enthält die Vergleichsküvette b *M*-RSH, so berechnet sich bei Messungen in den genannten pH-Bereichen die jeweils vorhandene Aldehydkonzentration nach: $a = E / \epsilon_{\text{Ald}} d$.

pH-Messungen: pH-Meter E 300 (Fa. Metrohm, kombinierte Glaselektrode, UX. Eichung mit Eichpuffer pH 2, 4, 7, 8, 10, 13.

UV-Spektren: Zeiss Spektralphotometer M 4 Q III d.

IR-Spektren: Perkin-Elmer, Modell 21, Lösungsmittel CHCl_3 .

*NMR-Spektren**: Varian A 60 A, Lösungsmittel CDCl_3 , *TMS* als innerer Standard.

Polarogramme: Polarograph PO 4 (Fa. Radiometer).

Versuchsergebnisse und deren Diskussion

Struktur der Reaktionsprodukte

Die Reaktionen 1 bis 4 führen zu einem Gleichgewicht. Unter geeigneten experimentellen Bedingungen gelingt es, das Gleichgewicht so weit auf die Seite der Reaktionsprodukte zu verschieben, und anderer-

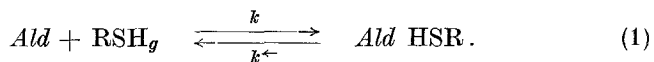
* Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Ziegler, Vorstand des Instituts für Organische Chemie der Universität Graz, und Herrn Dr. H. Sterk für die Aufnahme und die Interpretation der NMR-Spektren.

seits die Rückreaktion so zu verlangsamen, daß auch eine präparativ synthetische Darstellung der Reaktionsprodukte möglich ist. Die chemischen und physikochemischen (Elementaranalyse, UV, IR, NMR) Untersuchungen der Reaktionsprodukte der 4 Modellreaktionen und einiger weiterer ähnlicher Reaktionen ergaben, daß Alkenale und 4-Hydroxyalkenale mit Sulfhydrylverbindungen in wäßrigem System zu den entsprechenden β -substituierten gesättigten Aldehyden $R-CH(SR)-CH_2-CHO$ bzw. $R-CH(OH)-CH(SR)-CH_2-CHO$ reagieren (vgl. Tab. 1). Die Reaktionsprodukte der 4-Hydroxyalkenale lagern sich im Oxo—Cyclo-Tautomeriegleichgewicht zu den furanoiden Halbacetalen um; das Gleichgewicht ist weitgehend zugunsten der cyclischen Form verschoben. In organischen Lösungsmitteln konnte UV-, IR- und NMR-spektroskopisch keine Oxo-Form nachgewiesen werden. In Wasser hingegen läßt sie sich UV-spektroskopisch durch die $C=O$ -Absorptionsbande bei $33\,000\text{ cm}^{-1}$ eindeutig nachweisen. Die quantitative Bestimmung der Gleichgewichtslage war nicht möglich.

Kinetik der Gesamtreaktion und Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k der Gesamtreaktion

Der Reaktionsablauf wird, wie vorne aufgeführt, durch Messen der Zeit—Umsatzkurve bestimmt; Abb. 1 bringt eine kleine Auswahl typischer Kurven. Ist das pH der Reaktionslösung kleiner als 7, reagieren äquimolare Mischungen von etwa $1 \cdot 10^{-4}M$ *Ald* und RSH praktisch vollständig zum entsprechenden *AldHSR*. Mit zunehmendem pH der Reaktionslösung macht sich aber der reversible Charakter der Reaktionen mehr und mehr bemerkbar und die Konzentrationen von *Ald* und RSH nehmen nicht mehr auf 0 ab, sondern auf den durch die Gleichgewichtskonstante der Reaktion gegebenen Wert. Die Reversibilität der Reaktionen nimmt in der Reihe zu: Rkt. 4 < Rkt. 2 < Rkt. 3 < < Rkt. 1. Durch Erhöhung der Anfangskonzentrationen von *Ald* oder von *Ald* und RSH über $1 \cdot 10^{-4}M$ konnte bei den Reaktionen 4 und 2 auch im alkalischen pH-Bereich meist nahezu irreversibler Reaktionsablauf erreicht werden. Bei Reaktion 3 und insbesondere bei Reaktion 1 war dies nur zum Teil möglich.

Für die Reaktionsgleichung der experimentell meßbaren Gesamtreaktion gilt Gl. (1)



Aus den Meßwerten der Zeit—Umsatzkurven wurden die konzentrationsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung ($= k$) berechnet oder graphisch bestimmt. Zur Anwendung kamen die Zeit-

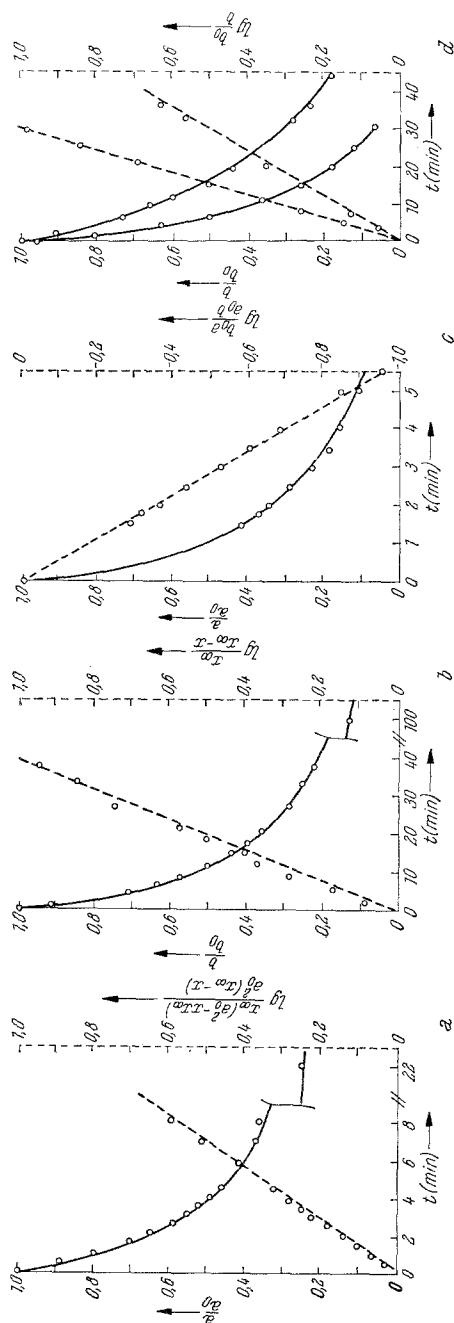


Abb. 1. Ausgewählte Beispiele für Zeit—Umsatzkurven und deren graphische Auswertung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung. Die linke Ordinate gilt für die Zeit—Umsatzkurven (ausgezogene Kurven), die rechte Ordinate gilt für die Geraden (-----). a) Rkt. 4, pH 11,0; $a_0 = b_0 = 8 \cdot 10^{-5}M$; $x_\infty = 6 \cdot 10^{-5}M$; b) Rkt. 1, pH 10,0; $a_0 = 2 \cdot 10^{-3}M$; $b_0 = 7,5 \cdot 10^{-5}M$; $x_\infty = 6,6 \cdot 10^{-5}M$; c) Rkt. 3, pH 7,0; $a_0 = 1 \cdot 10^{-2}M$; $b_0 = 3,0 \cdot 10^{-2}M$; d) Rkt. 2, pH 6,0; $a_0 = 2,1 \cdot 10^{-2}M$; $b_0 = 4,0 \cdot 10^{-4}M$; $a_0 = 4,2 \cdot 10^{-2}M$; $b_0 = 8,0 \cdot 10^{-4}M$

gesetze⁵ einer Reaktion des Typs $A + B \rightleftharpoons C$, wenn die Reaktion zu einem meßbaren Gleichgewicht führte (vgl. Abb. 1 a, 1 b).

Wenn die Reaktion zu keinem meßbaren Gleichgewicht führte, wurden die Konstanten nach den bekannten Zeitgesetzen einer irreversiblen Reaktion zweiter Ordnung bestimmt (vgl. Abb. 1 c, 1 d).

Einfluß der Ionenstärke auf die Geschwindigkeitskonstante k

Um den Einfluß der Ionenstärke und den Einfluß primärer und sekundärer Salzeffekte auf die Reaktionen 1—4 zu untersuchen, wurden in einigen Experimenten bei pH 7,0 die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k bei Ionenstärken im Bereich von 0,01 bis 0,3 μ bestimmt. Die Versuche ergaben, daß Ionenstärken von $\mu \leq 0,01$ —0,3 keinen meßbaren Einfluß auf die k -Werte der Reaktionen 1—4 haben.

Einfluß der H^+ -Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstante k

Als Reaktionspartner der α,β -ungesättigten Aldehyde kann zweifellos das Sulphydrylanion, das sich in einer vorgelagerten Dissoziationsreaktion bildet, angenommen werden; daher war zu erwarten, daß die *RGK* der Gesamtreaktion stark von der H^+ -Konzentration abhängt. Um diese Abhängigkeit zu studieren, wurden zunächst alle kinetischen Messungen in 0,1*m*-Phosphatpuffern durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, daß die so bestimmten k -Werte tatsächlich in keinen erkennbaren Zusammenhang mit der H^+ -Konzentration bzw. der Dissoziation der SH-Verbindung gebracht werden können. Wie die späteren Ausführungen über den Mechanismus zeigen werden, ist der Einfluß von Puffern auf k ein spezieller Fall des allgemeinen Prinzips, nach dem die *RGK* der Gesamtreaktion von der Konzentration aller im System anwesenden Protonendonatoren abhängen muß. Um den Einfluß von H^+ allein zu untersuchen, wurden daher die kinetischen Messungen in pufferfreier Reaktionslösung durchgeführt. Die verschiedenen pH-Werte wurden nach dem pH-Stat-Prinzip mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Für die Reaktionen 1—4 wurden zunächst die k -Werte im pH-Bereich 1—12 bei jeweils ganzzahligen pH-Werten bestimmt. Um schließlich aus den k -Werten die individuellen milieuunabhängigen *RGK* genau berechnen zu können, wurden bei den Reaktionen 1 und 2 innerhalb der pH-Bereiche 12—8, 4—2 und 1—0,3, bei den Reaktionen 3 und 4 in den pH-Bereichen 12—10, 8,5—6, 4—2 und 1—0,3 auch bei ZwischenpH-Werten (= nicht ganzzahlige pH) k -Werte bestimmt. Alle bestimmten k -Werte sind in die $\lg k$ —pH-Kurven der Abb. 2 eingetragen. Weitere k -Werte enthalten die Tab. 2 und 3.

⁵ A. A. Frost und R. G. Pearson, Kinetik und Mechanismen homogener chem. Reaktionen. 2. Aufl., Weinheim 1964.

Die Kurven zeigen zunächst vor allem deutlich, daß die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion nur eine scheinbare Konstante ist, die in komplizierter Weise von der H^+ -Konzentration abhängt. Die k -Werte nehmen im allgemeinen von pH 2 bis pH 12 mit steigendem pH um 3 bis 5 Zehnerpotenzen zu. Welche Funktion den Zusammenhang

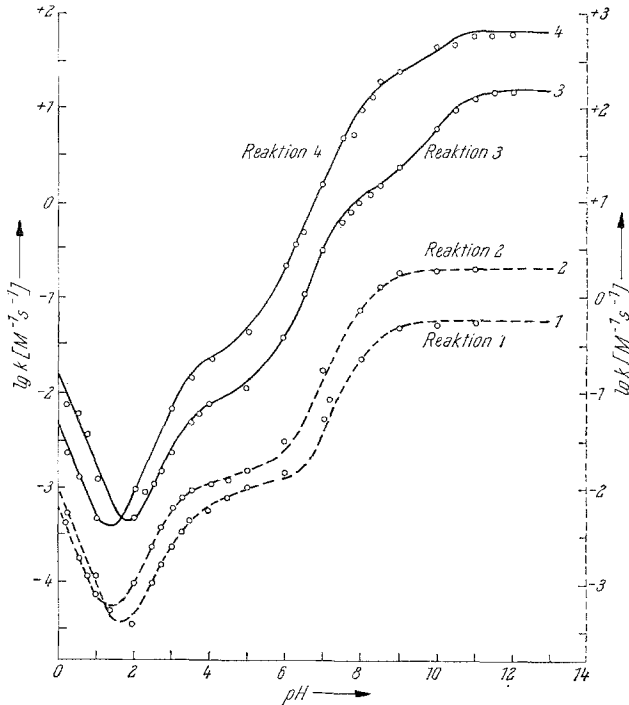


Abb. 2. Einfluß der H^+ -Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstante k . Die linke Ordinate gilt für die Kurven 3 und 4, die rechte Ordinate gilt für die Kurven 1 und 2. Die Kurven ——— und - - - - - wurden mit den in Tab. 5 angegebenen Konstanten berechnet; \circ experimentell in pufferfreiem System bestimmte k -Werte

zwischen k und der H^+ -Konzentration beschreibt, geht aus den Kurven nicht unmittelbar hervor, so daß nur allgemein festgestellt werden kann: $k = f(H^+)$.

Der Kurventyp wird im wesentlichen von der SH-Verbindung bestimmt und nicht vom Aldehyd. Ähnlichen Kurvenverlauf ergeben jeweils die Reaktionen 1 und 2 bzw. die Reaktionen 3 und 4. Bei allen 4 Reaktionen steigt k ab pH < 1,5 etwa proportional mit der H^+ -Konzentration an, d. h. in diesem pH-Bereich ist die Gesamtreaktion

Tabelle 2. Berechnung der Konstanten k_1 , k_{H_2O} , k_{H^+} , $k_1'K'_{SH}$ für die Reaktion 3

pH	k $M^{-1}s^{-1}$	k_1 $M^{-1}s^{-1}$	β_{H_2O}	k_{H_2O} $\cdot 10^{-7}$ $M^{-1}s^{-1}$	pH	k $M^{-1}s^{-1}$	k_{H_2O} $\cdot 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$	pH	k $\cdot 10^3$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_{R'S^-}$ $\cdot 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_1'K'_{SH}$ $\cdot 10^6$ s^{-1}
6,00	0,04	870	(1,13)	—	10,0	6,4	4,70	2,00	0,50	3,15	3,15
6,50	0,11	745	0,93	4,4	10,5	16,4	4,00	2,50	1,15	1,09	3,75
6,75	0,18	720	0,87	3,7	11,0	12,7	3,70	2,75	1,70	1,67	3,50
7,00	0,31	770	0,84	5,4	11,5	15,0	3,85	3,00	2,60	2,58	3,40
7,25	0,50	800	0,77	6,0	12,0	14,6	3,45	3,50	4,70	4,65	2,85
7,50	0,63	625	0,53	3,6				3,80	6,70	6,57	3,00
7,75	0,80	(410)	0,39	3,6				4,00	7,60	7,40	2,95
8,00	1,15	—	0,27	(7,1)				5,00	11,6	8,10	2,50
8,25	1,25	—	0,19	4,1				6,00	42,0	6,00	—
8,50	1,60	—	0,13	5,0							
Mittelwerte:		750		4,5			3,75				3,15

k_1 berechnet nach Gl. (11 a); k_{H_2O} ber. nach Gl. (10 a); β_{H_2O} ber. nach Gl. (11 b); k_{H^+} ber. nach Gl. (11 c); $k_{R'S^-}$ ber. nach Gl. (12); $k_{R'S^-} = k - k_1 \alpha_{SH} \beta - k_0 (H^+)$; $k_1'K'_{SH}$ ber. nach Gl. (13).

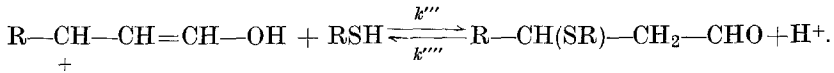
Tabelle 3. Einfluß von Phosphat und Acetat auf die Reaktionen 1 und 2 bei konstantem pH. Berechnung der k_{Acetat} und k_{Phosphat} -Werte nach Gl. (15) bzw. Gl. (18)

Reaktion 2; (Phosphat)		pH = 5,0		Reaktion 2; (Acetat)		pH = 5,0		Reaktion 1; (Acetat)		pH = 4,0	
M	$k \cdot 10^2$ $M^{-1} s^{-1}$	k_{Phosphat} $M^{-1} s^{-1}$	$k \cdot 10^2$ $M^{-1} s^{-1}$	M	k_{Acetat} $M^{-1} s^{-1}$	$k \cdot 10^2$ $M^{-1} s^{-1}$	k_{Acetat} $M^{-1} s^{-1}$	M	$k \cdot 10^2$ $M^{-1} s^{-1}$	k_{Acetat} $M^{-1} s^{-1}$	k_{Acetat} $M^{-1} s^{-1}$
0,000	1,64	—	1,64	0,000	—	1,64	—	0,000	0,62	—	—
0,005	3,06	3,40	3,22	0,005	3,30	3,22	3,30	0,005	0,83	13,0	13,0
0,009	4,45	3,30	4,55	0,010	3,15	4,55	3,15	0,010	0,96	13,2	13,2
0,017	7,50	3,30	13,0	0,050	2,60	13,0	2,60	0,030	1,28	11,2	11,2
0,020	8,40	3,70	16,6	0,075	2,30	16,6	2,30	0,10	2,18	14,5	14,5
0,030	10,5	3,2	22,0	0,10	2,50	22,0	2,50				
0,050	14,5	2,90	38,0	0,25	2,75	38,0	2,75				
0,080	21,5	3,05									
0,10	27,0	3,30									
0,15	32,8	3,10									
Mittelwerte:		3,25			2,88						13,0

H⁺-katalysiert. Der α,β -ungesättigte Aldehyd wird in der Primärreaktion durch H⁺ aktiviert:



Der aktivierte Aldehyd reagiert mit der undissoziierten Sulfhydrylverbindung RSH zum Endprodukt:



Die Aktivierung des Aldehyds kann als vorgelagertes, sich schnell einstellendes Gleichgewicht betrachtet werden, so daß für die H⁺-Konzentration-unabhängige Geschwindigkeitskonstante dieser Additionsreaktion gilt: $k_0 = k'''k'/k''$.

k_0 ist die Geschwindigkeitskonstante der H⁺-katalysierten Additionsreaktion bei pH = 0. Ihr Wert läßt sich aus den experimentell bestimm- baren k -Werten nach Gl. (2) berechnen:

$$k_0 = k/(\text{H}^+); \text{Bedingung: } d(\lg k)/d(\text{pH}) = -1 \quad (2)$$

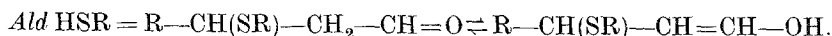
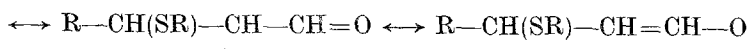
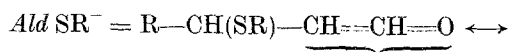
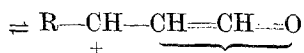
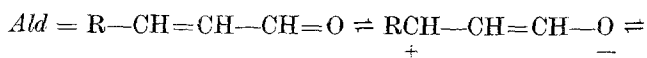
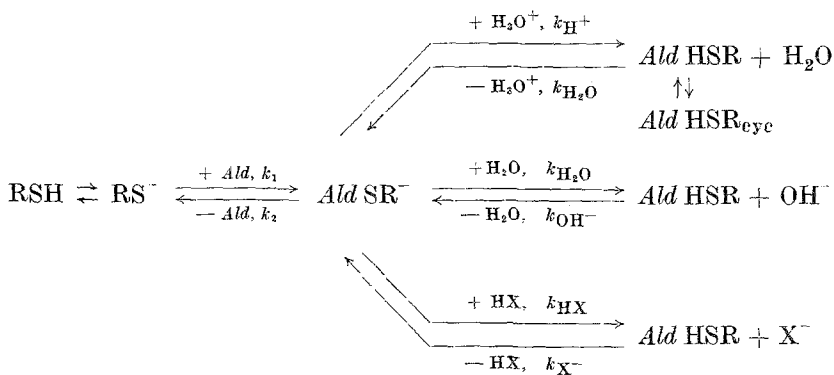
Die Rechnung ergab die folgenden Mittelwerte:

Reaktion 1: $k_0 = 1,18 \cdot 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$; Reaktion 2: $k_0 = 8,05 \cdot 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$;

Reaktion 3: $k_0 = 1,85 \cdot 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$; Reaktion 4: $k_0 = 4,95 \cdot 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$.

Im pH-Bereich des Minimus der $\lg k$ -pH-Kurven (pH etwa 1,5 bis 2,5) reagieren die Sulfhydrylverbindungen sowohl in der RSH- als auch in der RS⁻-Form, ab pH > 2,5 reagieren nur die RS⁻-Formen in der OH⁻-katalysierten Additionsreaktion nach Schema 1 mit dem α,β -ungesättigten Aldehyd. Es wird im Gegensatz zur H⁺-katalysierten Reaktion der nukleophile Reaktionspartner RSH durch OH⁻ in einem vorgelagerten Dissoziationsgleichgewicht aktiviert. Das Sulfhydrylanion RS⁻ reagiert mit einer mesomeren Grenzform des Aldehyds zu einer reaktiven Zwischenverbindung AldSR⁻. Für die instabile Zwischenverbindung AldSR⁻ gilt der quasi-stationäre Zustand: $+d(\text{AldSR}^-)/dt = -d(\text{AldSR}^-)/dt$. Die Konzentration des AldSR⁻ ist klein im Vergleich zu den Konzentrationen aller übrigen Reaktanten. Die reaktive Zwischenverbindung kann nun wieder in die Ausgangssubstanzen Ald und RS⁻ zerfallen, sie kann sich aber auch in einer Reihe von Parallelreaktionen mit den im System vorhandenen Protonendonatoren zum Endprodukt AldHSR umsetzen.

Reaktionsschema 1



Da alle Reaktionen nur in wässrigem Medium durchgeführt werden, reagiert AldSR^- auf alle Fälle mit H_2O und — entsprechendes pH vorausgesetzt — auch mit H_3O^+ . Darüber hinaus können durch Zusatz verschiedener HX -Verbindungen beliebig viele Parallelreaktionen eingeschaltet werden, die in grundsätzlich gleicher Weise AldSR^- zu AldHSR umsetzen. Experimentell untersucht wurde allerdings nur, wie noch gezeigt wird, der Zusatz der folgenden HX -Verbindungen: CH_3COOH , H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} .

Die bei den Reaktionen von 4-Hydroxyalkenalen primär gebildeten Reaktionsprodukte lagern sich auf Grund der Oxo-Cyclo-Tautomerie zu den cyclischen Halbacetalen ($\text{AldHSR}_{\text{cyc}}$) um. Diese nachgelagerte Reaktion wird bei den folgenden Ableitungen nicht berücksichtigt.

Die effektive, experimentell meßbare Reaktionsgeschwindigkeit der nach Schema 1 ablaufenden OH^- -katalysierten Additionsreaktion ist gegeben durch Gl. (3). Für die Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung ($= v^+$) gilt Gl. (4), für die Geschwindigkeit der Rückreaktion gilt Gl. (5).

$$v = v^{\rightarrow} - v^{\leftarrow} \quad (3)$$

$$v^{\rightarrow} = k(\text{Ald})(\text{RSH})_g = k_1 \alpha_{\text{SH}} \frac{\sum k_{\text{HX}}(\text{HX})}{k_2 + \sum k_{\text{HX}}(\text{HX})} a \cdot b \quad (4)$$

$$v^{\leftarrow} = k^{\leftarrow}(\text{Ald HSR}) = k_2 \frac{\sum k_{\text{X}^-}(\text{X}^-)}{k_2 + \sum k_{\text{HX}}(\text{HX})} (\text{Ald HSR}) \quad (5)$$

Aus Gl. (4) ergibt sich unmittelbar die Gl. (6) für die milieunabhängige Geschwindigkeitskonstante k :

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \frac{\sum k_{\text{HX}}(\text{HX})}{k_2 + \sum k_{\text{HX}}(\text{HX})}; \quad \alpha_{\text{SH}} = \frac{(\text{RS}^-)}{b} = \frac{K_{\text{SH}}}{K_{\text{SH}} + \text{H}^+} \cdot \sum k_{\text{HX}}(\text{HX}) = k_{\text{H}_2\text{O}}(\text{H}_2\text{O}) + k_{\text{H}^+}(\text{H}^+) + \dots + k_{\text{HX}_i}(\text{HX}_i) \quad (6)$$

Gl. (6) ist die gesuchte Funktion, die den Zusammenhang zwischen der experimentell bestimmbar Konstante einerseits und den individuellen milieunabhängigen Konstanten und den Konzentrationen aller vorhandenen HX-Verbindungen beschreibt. Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Gleichung ist, daß in der Reaktionslösung nur *ein* reaktives Sulfhydrilanion vorliegt, und daß die OH⁻-katalysierte Reaktion die Hauptreaktion ist. Der Quotient $\sum k_{\text{HX}}(\text{HX}) / k_2 + \sum k_{\text{HX}}(\text{HX})$ in Gl. (6) gibt jenen Bruchteil des insgesamt reagierenden *AldSR*⁻ an, der mit HX-Verbindungen entsprechend Schema 1 zum Endprodukt umgesetzt wird. Im folgenden wird dieser Quotient als Umsatzgrad β bezeichnet ($\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ = Umsatzgrad, wenn als HX-Verbindungen nur H₃O⁺ und H₂O vorhanden sind). Der Umsatzgrad β ist nach Gl. (7) abhängig von den Konzentrationen und Katalysekonstanten aller im System anwesenden Säuren (H₂O, H₃O⁺, CH₃COOH, etc.). Der Umsatzgrad $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ ist nur mehr eine Funktion der H⁺-Konzentration und muß allgemein mit steigender H⁺-Konzentration von einem konstanten unteren Grenzwert β_{Min} zum oberen Grenzwert $\beta = 1$ ansteigen [Gl. (7 a) und (7 b)]. Eine Erhöhung des Umsatzgrades über den Grenzwert 1 hinaus ist natürlich weder durch Erhöhung der H⁺-Konzentration noch durch Zusatz anderer Säuren möglich. Die $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ -Kurven der Reaktionen 1 bis 4 bringt die Abb. 3. Die Kurven haben formal den gleichen Verlauf wie die ρ -Kurven von Säuren, weil $k_2 \gg k_{\text{H}_2\text{O}}(\text{H}_2\text{O})$. Der pH-Wert des Wendepunkts der Kurve entspricht dem negativen Logarithmus von k_2/k_{H^+} . Aus den $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ -Kurven kann für jeden pH der Umsatzgrad direkt abgelesen werden. Im Falle der Reaktionen 1 und 2 werden durch eine H⁺-Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ bzw. $8 \cdot 10^{-4} M$ 50% der reaktiven Zwischenverbindung durch Protonen zum Endprodukt *AldHSR* umgesetzt, während die restlichen 50% wieder in *Ald* und *RS*⁻ zerfallen. Bei

den Reaktionen 3 und 4 wird ein 50proz. Umsatz dagegen schon bei einer H^+ -Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}$ bzw. $6 \cdot 10^{-9}M$ erreicht. Der durch H_2O bewirkte Mindestumsatz $\beta_{Min.}$ [vgl. Gl. (7 b)] beträgt bei Reaktion 1 0,12%, bei Reaktion 2 0,13%, bei Reaktion 3 2,1% und bei Reaktion 4 1,8%. Bei den Reaktionen mit $-SCH_2COOH$ (Reaktion 3 und 4 bei $pH < 6$) ist der Umsatzgrad unabhängig vom pH gleich 100%.

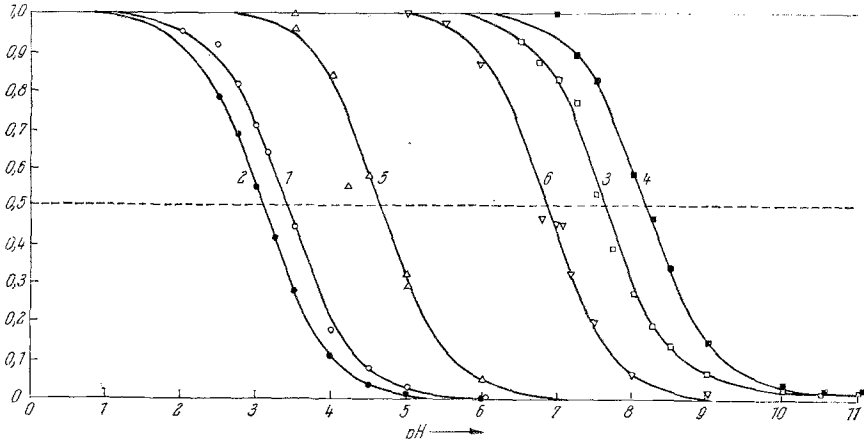


Abb. 3. Darstellung der pH-Abhängigkeit des Umsatzgrads β_{H_2O} und der $k_{Acetat}/k_{CH_3COOH^-}$ bzw. $k_{Phosphat}/k_{H_2PO_4^-}$ -Werte. Die β_{H_2O} -Werte wurden nach Gl. (11 b) berechnet. Kurven 1, 2, 3 und 4: β_{H_2O} -Kurven der Reaktionen 1, 2, 3, 4. Kurve 5: Theoret. Verlauf der $(1-\alpha)$ -Kurve von CH_3COOH ; Δ nach Gl. (16) ber. Werte der Acetat-katalysierten Reaktion 1. Kurve 6: Theoretischer Verlauf der $(1-\alpha)$ -Kurve von $H_2PO_4^-$; ∇ nach Gl. (19) ber. Werte der phosphatkatalysierten Reaktion 2

$$\text{Umsatzgrad } \beta = \frac{\sum k_{HX} (HX)}{k_2 + \sum k_{HX} (HX)} \tag{7}$$

$$\beta_{H_2O} = \frac{k_{H_2O} (H_2O) + k_{H^+} (H^+)}{k_2 + k_{H_2O} (H_2O) + k_{H^+} (H^+)} \tag{7a}$$

$$\beta_{Min.} = \frac{k_{H_2O} (H_2O)}{k_2 + k_{H_2O} (H_2O)} \tag{7b}$$

Im allgemeinen Fall, daß das Reaktionssystem mehrere Sulfhydrylverbindungen ($RSH, R'SH, R''SH$) enthält, von denen jede sowohl in der H^+ -katalysierten als auch in der OH^- -katalysierten Additionsreaktion gemäß Schema 1 mit dem Aldehyd reagieren kann, wird die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion durch die Gl. (8) beschrieben.

$$k = k_1 \beta \frac{(\text{RS}^-)}{b} + k_1' \beta' \frac{(\text{R}'\text{S}^-)}{b} + k_1'' \beta'' \frac{(\text{R}''\text{S}^-)}{b} + \dots k_0 \frac{(\text{H}^+) (\text{RSH})}{b} + \dots \quad (8)$$

$b = (\text{RSH}) + (\text{RS}^-) + (\text{R}'\text{SH}) + (\text{R}'\text{S}^-) + \dots$; $\beta, \beta', \beta'' =$ Umsatzgrade von *Ald* SR^- , *Ald* SR'^- usw.

Bei den Reaktionen von Thioglykolsäureester kann Crotonaldehyd bzw. *HPE* nur mit $-\text{SCH}_2\text{COOR}$ reagieren; enthält das System als HX -Verbindungen nur H_2O und H_3O^+ , so ist die Geschwindigkeitskonstante gegeben durch Gl. (9). Diese Gl. gilt natürlich nur für die OH^- -katalysierte Additionsreaktion. Für bestimmte pH-Bereiche läßt sie sich durch die einfacheren und für die Berechnung der Konstanten besser geeigneten Gl. (10) und (11) ersetzen. Das \gg bzw. \ll bedeutet in diesen Gleichungen 20mal größer bzw. kleiner, da dann der Fehler, der sich bei Vernachlässigung der kleineren Größe ergibt, bereits innerhalb der Standardabweichung von etwa $\pm 5\%$ der k -Werte liegt.

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \frac{k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) + k_{\text{H}^+} (\text{H}^+)}{k_2 + k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) + k_{\text{H}^+} (\text{H}^+)}; \text{ wenn } k \gg k_0 (\text{H}^+) \quad (9)$$

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}}; \text{ wenn } k_2 \ll k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) + k_{\text{H}^+} (\text{H}^+) \quad (9a)$$

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \beta_{\text{Min}}; \text{ wenn } k_{\text{H}^+} (\text{H}^+) \ll k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) \quad (10)$$

$$\frac{k_{\text{H}_2\text{O}}}{k_2} = \frac{\beta_{\text{Min.}}}{(1 - \beta_{\text{Min.}}) 55,5}; \quad (10a)$$

$$k = \frac{k_1 K_{\text{SH}} k_{\text{H}^+}}{k_2 + k_{\text{H}^+} (\text{H}^+)}; \text{ wenn } k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) \ll k_{\text{H}^+} (\text{H}^+) \text{ und } K_{\text{SH}} \ll (\text{H}^+) \quad (11)$$

$$\frac{1}{k} = \frac{(\text{H}^+)}{k_1 K_{\text{SH}}} + \frac{k_2}{k_1 k_{\text{H}^+} k_{\text{SH}}}; \quad (11a)$$

$$\beta_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{(\text{H}^+)}{(\text{H}^+) + k_2/k_{\text{H}^+}} = \frac{k}{k_1 \alpha_{\text{SH}}} \quad (11b)$$

$$\frac{k_{\text{H}^+}}{k_2} = \frac{\beta}{(\text{H}^+) - \beta (\text{H}^+)} \quad (11c)$$

Zur Berechnung der Konstanten $k_1, k_2, k_{\text{H}_2\text{O}}, k_{\text{H}^+}$ der Reaktionen 1 und 2 wurde wie folgt vorgegangen: Aus den im pH-Bereich 2 bis 12 bestimmten k -Werten wurden mit $K_{\text{SH}} = 7,4 \cdot 10^{-9}$ die $\lg k/\alpha_{\text{SH}}$ -Werte ($= k_1 \beta_{\text{H}_2\text{O}}$) berechnet. Auftragen von $\lg k/\alpha_{\text{SH}}$ ($= \lg k_1 + \lg \beta_{\text{H}_2\text{O}}$) gegen pH ergibt die Kurven 1 und 2 der Abb. 4. Der Kurvenverlauf gibt, da k_1 eine pH-unabhängige Größe ist, unmittelbar die pH-Abhängigkeit des Umsatzgrades $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ an. Mit fallendem pH steigen die Kurven von einem

unteren Grenzwert zu einem oberen Grenzwert an. Aus der H^+ -Funktion des Umsatzgrades [vgl. Gl. (8 a)] folgt, daß im pH-Bereich des unteren Grenzwertes ($pH > 8$) gelten muß: $k/\alpha_{SH} = k_1\beta_{Min.}$, während im pH-Bereich des oberen Grenzwertes ($pH < 2$) gelten muß: $k/\alpha_{SH} = k_1$, $\beta = 1$. Die Konstante k_1 läßt sich aus diesen Kurven allerdings nicht genau entnehmen, da im pH-Bereich des oberen Grenzwertes neben der OH^- -kata-

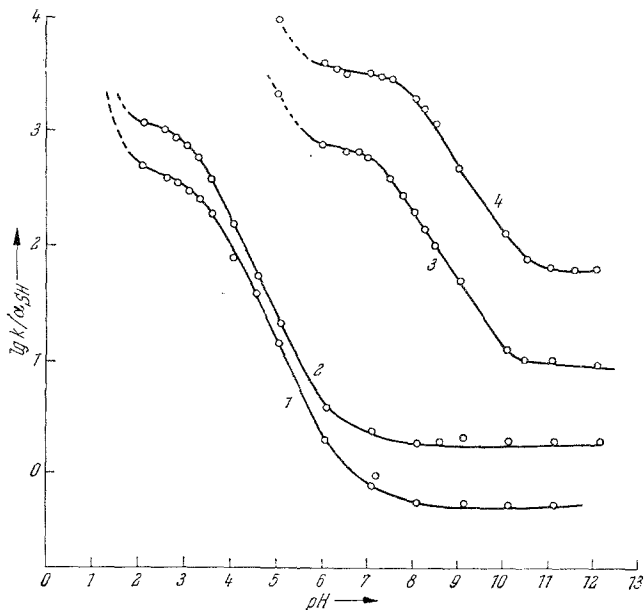


Abb. 4. Darstellung der pH-Abhängigkeit der $\lg k/\alpha_{SH}$ -Werte der Modellreaktionen. Kurve 1: Rkt. 1; Kurve 2: Rkt. 2; Kurve 3: Rkt. 3; Kurve 4: Rkt. 4

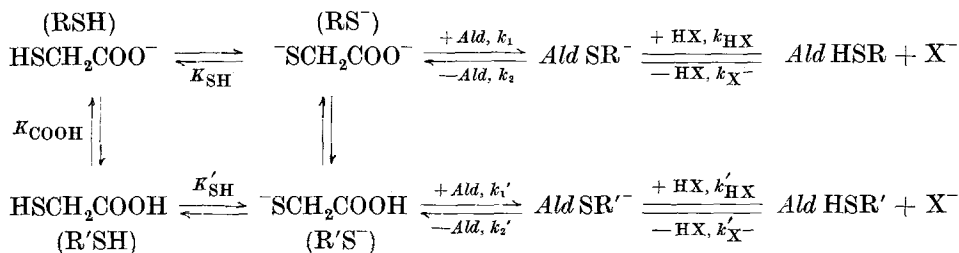
lysierten auch die H^+ -katalysierte Reaktion abläuft. Aus dem ungefähren Wert für k_1 , dem Wert für $k_1\beta_{Min.}$ und einem k/α -Wert bei $pH\ 3$ ($\beta_{H_2O} = 0,5$) kann nach Gl. (10 a) und (11 c) k_{H^+} und k_{H_2O} ungefähr berechnet werden. Mit diesen Konstanten und dem Wert für k_0 und K_{SH} lassen sich in einfacher Weise die pH-Bereiche berechnen, in denen die Bedingungen der Gl. (9 a) bis (11 c) erfüllt sind. Die Rechnung ergibt z. B. für Reaktion 2, daß Gl. (10) ab $pH > 7,4$ und Gl. (11), (11 a), (11 b) und (11 c) bei $pH\ 2$ bis $4,8$ gültig sind, während die Bedingung für die Gültigkeit der Gl. (9 a) in keinem pH-Bereich exakt erfüllt ist, so daß k_1 nicht nach dieser einfachen Gleichung berechnet werden kann. Vielmehr muß die Gl. (11 a) zur Berechnung angewendet werden. Für die Reaktion 1 ergeben sich etwa gleiche Gültigkeitsbereiche für die einzelnen Gleichungen. Die berechneten individuellen Geschwindigkeits-

konstanten k_1 , $k_{\text{H}_2\text{O}}$, k_{H^+} der Reaktionen 1 und 2 sind in die Tab. 5 eingetragen. Die Konstanten $k_{\text{H}_2\text{O}}$ und k_{H^+} können nicht als Absolutwerte bestimmt werden, sondern nur als Quotienten: $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_2$, k_{H^+}/k_2 . Als Bezugsgröße für alle k_{HX} -Konstanten dient immer die Konstante k_2 , die willkürlich gleich 1 s^{-1} gesetzt wird.

Berechnet man mit diesen Konstanten nach $k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \beta_{\text{H}_2\text{O}} + k_0 (\text{H}^+)$ den theoretischen Verlauf der $\lg k$ -pH-Kurven der Reaktionen 1 und 2, so ergeben sich die Kurven 1 und 2 der Abb. 2. Tatsächlich liegen alle experimentell bestimmten Konstanten auf den berechneten Kurven. Die Abweichungen sind im allgemeinen kleiner als $\pm 5\%$. Im pH-Bereich 3 bis 6 ist $d(\lg k)/d(\text{pH}) \sim 0$, weil in diesem pH-Gebiet der Umsatzgrad mit steigendem pH nahezu ebenso schnell abnimmt, als der Dissoziationsgrad α_{SH} zunimmt. Ab $\text{pH} > 9$ ist k pH-unabhängig, weil in diesem pH-Bereich $\alpha_{\text{SH}} = 1$ und $\beta_{\text{H}_2\text{O}} = \beta_{\text{Min}}$ ist.

Die Berechnung der Konstanten der Reaktionen von Crotonaldehyd bzw. HPE mit Thioglykolsäure bzw. Thioglykolat (Rkt. 3 und 4) ist etwas schwieriger, da in diesem Fall je nach pH zwei verschiedene Sulfhydrylanionen vorliegen, die in grundsätzlich gleicher Weise über je eine reaktive Zwischenverbindung zum Endprodukt reagieren. Für die H^+ -katalysierte Reaktion kommt als Reaktionspartner des Aldehyds nur HSCH_2COOH in Frage. Die OH^- -katalysierte Gesamtreaktion läuft nach Schema 2 ab. RS^- und $\text{R}'\text{S}^-$ bilden sich in einem vorgelagerten Dissoziationsgleichgewicht. Einsetzen der Ausdrücke für $(\text{RS}^-)/b$ und $(\text{R}'\text{S}^-)/b$ in Gl. (8) ergibt für die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion die Gl. (12).

Reaktionsschema 2



$$b = (\text{RSH}) + (\text{RS}^-) + (\text{R'SH}) + (\text{R'S}^-); \quad (\text{RS}^-)/b \equiv \alpha_{\text{SH}} \alpha_{\text{COOH}} \cong \alpha_{\text{SH}}$$

$$(\text{R'S}^-)/b = \frac{(1 - \alpha_{\text{COOH}}) K'_{\text{SH}}}{K'_{\text{SH}} + (\text{H}^+)} \cong \frac{(1 - \alpha_{\text{COOH}}) K'_{\text{SH}}}{(\text{H}^+)}$$

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \beta + k_1' \beta' \frac{(1 - \alpha_{\text{COOH}}) \cdot K'_{\text{SH}}}{(\text{H}^+)} + k_0 (\text{H}^+) \quad (12)$$

Für bestimmte pH-Bereiche läßt sich natürlich auch die Gl. (12) wieder vereinfachen. In dem pH-Bereich, in dem nur RS^- reagiert, gelten die Gl. (9) bis (11 c).

Aus den $\lg k/\alpha_{\text{SH}}$ -Kurven der Reaktionen 3 und 4 (vgl. Abb. 4) ergibt sich unmittelbar der pH-Bereich, in dem nur RS^- mit *Ald* reagieren kann. Die Kurven steigen, wie im Fall der Reaktionen 1 und 2, mit fallendem pH von einem unteren zu einem oberen Grenzwert an. Für den unteren Grenzwert ($\text{pH} > 11$) muß gelten: $k/\alpha_{\text{SH}} = k_1 \beta_{\text{Min.}}$.

Der obere Grenzwert ist gegeben durch: $k/\alpha_{\text{SH}} = k_1$. Der Wiederanstieg der Kurven bei $\text{pH} < 5,5$ erklärt sich damit, daß ab diesem pH auch oder nur $-\text{SCH}_2\text{COOH}$ ($\text{R}'\text{S}^-$) mit *Ald* reagiert. Aus den im pH-Bereich 6 bis 12 bestimmten k -Werten werden die individuellen Konstanten der Reaktion von Crotonaldehyd bzw. *HPE* mit $-\text{SCH}_2\text{COO}^-$ in grundsätzlich gleicher Weise berechnet, wie die entsprechenden Konstanten der Reaktionen 1 und 2. Tab. 2 bringt als Beispiel die Berechnung der Konstanten der Reaktion 4.

Mit k_0 und den Konstanten k_1 , $k_{\text{H}_2\text{O}}$, k_{H^+} werden aus den im pH-Bereich 2 bis 6 gemessenen k -Werten die milieubehängigen Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit $-\text{SCH}_2\text{COOH}$ berechnet. Aus diesen Werten lassen sich nach Gl. (13) die Werte für $k_1' K'_{\text{SH}}$ berechnen.

$$k_1' K'_{\text{SH}} \beta' = \frac{[k - k_1 \alpha_{\text{SH}} \cdot \beta - k_0 (\text{H}^+)] [(\text{H}^+)]}{1 - \alpha_{\text{COOH}}} = k_1' \cdot K'_{\text{SH}} \quad (13)$$

Die so berechneten Werte sind pH-unabhängige Größen (vgl. letzte Spalte der Tab. 2). Der Umsatzgrad für die Zwischenverbindung AldSR'^- muß daher bei $\text{pH} < 6$ konstant sein. Auf Grund des niedrigen pH-Wertes ist anzunehmen, daß gilt: $\beta' = 1$. Da die mikroskopische Dissoziationskonstante K'_{SH} nicht bekannt ist, können die k_1' -Konstanten nicht berechnet werden. Die Tab. 5 enthält alle für die Reaktionen 3 und 4 berechneten Geschwindigkeitskonstanten. Berechnet man mit diesen Konstanten nach Gl. (12) den theoretischen Verlauf der $\lg k$ -pH-Kurven von Reaktion 3 und 4, so erhält man die Kurven 3 bzw. 4 der Abb. 2. Obwohl bei diesen Reaktionen die $\lg k$ -pH-Kurve die Summenkurve aus 3 Teilreaktionen ist, von denen jede in anderer Weise von pH abhängt, liegen alle experimentell gemessenen Konstanten auf den berechneten Kurven. Die Abweichungen sind im allgemeinen kleiner als $\pm 5\%$. Die Inflexion der Kurven im pH-Bereich 3 bis 4,5 erklärt sich damit, daß hier nur $-\text{SCH}_2\text{COOH}$ reagiert, dessen Konzentrationsanteil am (RSH)_g sich in diesem pH-Bereich nur wenig ändert. Die zweite Inflexion im pH-Bereich 7 bis 10 wird wieder dadurch verursacht, daß in diesem pH-Bereich der Umsatzgrad schneller abnimmt, als der Dissoziationsgrad zunimmt.

Einfluß von Acetatpuffer und Phosphatpuffer auf die Geschwindigkeitskonstante k

Als Bezugs- und Vergleichsgröße für alle in Gegenwart von Acetat bzw. Phosphat gemessenen k -Werte dienen immer die Konstanten, die in pufferfreiem System bei gleichen pH bestimmt wurden. Dividiert man die mit Acetat bzw. Phosphat bestimmten Konstanten durch die in pufferfreier Lösung bestimmten k -Werte, so erhält man eine relative Geschwindigkeitskonstante, die ein direktes Maß für den Einfluß bzw. für die katalytische Wirkung des jeweiligen Puffers ist:

$$\text{katalyt. Wirkung} = \text{rel. RGK} = \frac{k(\text{best. m. Acetat bzw. Phosphat bei pH} = x)}{k(\text{best. ohne Acetat bzw. Phosphat bei pH} = x)}$$

In dem pH-Bereich, in dem H_2O und H_3O^+ allein keinen 100proz. Umsatz der reaktiven Zwischenverbindung bewirken (vgl. $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ -Kurven in Abb. 3) kann durch Zusatz weiterer Säuren der Umsatzgrad vergrößert werden. Eine Vergrößerung des Umsatzgrades ist aber gleichbedeutend mit einer Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k . Damit erklärt sich aber auch in einfacher Weise die katalytische Wirkung von Essigsäure, H_3PO_4 , H_2PO_4^- und HPO_4^{2-} . Werden Pufferlösungen dieser Säuren bei konstantem pH dem Reaktionssystem zugesetzt, so bewirken sie mit zunehmender Konzentration eine Vergrößerung des Umsatzgrades. Für einen bestimmten pH gilt: Katalysewirkung = $\beta/\beta_{\text{H}_2\text{O}}$.

Bei Reaktion 3 und 4 ist bis zu pH $\sim 6,5$ kein Einfluß von Acetat oder Phosphat auf k feststellbar (vgl. Abb. 5), da in diesem pH-Bereich der Umsatzgrad $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ 100% ist (vgl. Kurven 3 und 4 der Abb. 3). Bei pH $> 6,5$ ist nach den β -Kurven der Reaktionen 3 und 4 eine Beschleunigung der Reaktionen durch Zusatz von HX möglich. Tatsächlich konnte bei pH $> 6,5$ auch eine geringe Katalysewirkung des Phosphats festgestellt werden (Kurve 3, 4 in Abb. 5), während Essigsäure auch bei pH $> 6,5$ keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktionen 3 und 4 hat, da sie praktisch nur in der unwirksamen CH_3COO^- -Form vorliegt.

Bei den Reaktionen 2 und 3 ist ab pH $< 1,5$ der Umsatzgrad $\beta_{\text{H}_2\text{O}}$ gleich 1 (Kurve 1 und 2 der Abb. 3). Daher läßt sich im pH-Bereich von 0,3 bis 1,5 keine Katalysewirkung des Phosphats oder Acetats nachweisen. Bei pH $> 1,5$ ist $\beta_{\text{H}_2\text{O}} < 1$, so daß der Umsatzgrad durch Zusatz von Acetat bzw. Phosphat gesteigert werden kann (vgl. Kurven 1 und 2 der Abb. 5). Der Verlauf der Kurven in Abb. 5 erklärt sich durch die Überlagerung der Dissoziationskurven der Essigsäure bzw. der Dissoziationskurven des primären Phosphats einerseits, mit den β -Kurven der Reaktionen andererseits.

In den pH-Bereichen, in denen HX die Reaktionen 1 bis 4 katalysieren kann, gilt für die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion die Gl. (9). Bei Reaktionen, die in Gegenwart von Acetat ablaufen, gilt daher für k die Gl. (14), die durch Umformen (15) bzw. (16) ergibt. Nach (15) können aus experimentellen Daten (k , pH und Gesamtacetatkonzentration) und den Konstanten der unkatalysierten Reaktion

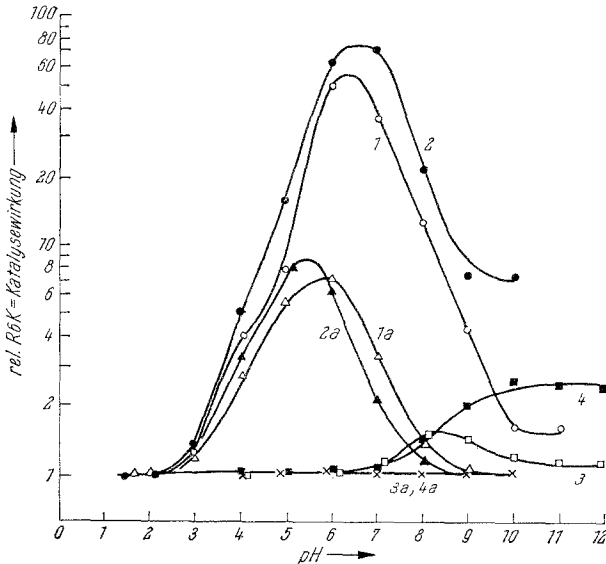


Abb. 5. Einfluß von 0,05M-Acetat und 0,1M-Phosphat bei verschiedenen pH auf die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen 1, 2, 3, 4.

$$\text{rel. RGK} = \text{kat. Wirkung} = \frac{k \text{ (best. mit Acetat bzw. Phosphat)}}{k \text{ (best. ohne Acetat bzw. Phosphat)}}$$

Einfluß von Phosphat (Kurve 1) und Acetat (Kurve 1a) auf Rkt. 1; Einfluß von Phosphat (Kurve 2) und Acetat (Kurve 2a) auf Rkt. 2; Einfluß von Phosphat auf Rkt. 3 (Kurve 3) und auf Rkt. 4 (Kurve 4); Einfluß von Acetat auf Rkt. 3, 4 (Kurve 3a bzw. 4a)

(Tab. 5) die k_{Acetat} -Werte berechnet werden. Die k_{Acetat} -Werte sind aus der Gesamtacetatkonzentration berechnet; da aber nur CH_3COOH wirksam ist, sind diese Werte zwar konzentrationsunabhängige, jedoch nicht pH-unabhängige Größen. Die konzentrations- und pH-unabhängige Konstante läßt sich nach Gl. (16) berechnen. Bei den Reaktionen, die in Gegenwart von Phosphat ablaufen, ist k gegeben durch Gl. (17). Die auf die Gesamtposphatkonzentration bezogenen k_{Phosphat} -Werte lassen sich nach Gl. (18) berechnen; diese konzentrationsunabhängigen Konstanten lassen sich nach Gl. (19) auf die pH-unabhängigen Konstanten zurückführen.

In Tab. 3 sind einige bei konstantem pH, aber variablen Phosphat- bzw. Acetatkonzentrationen bestimmte k -Werte für die Reaktionen 1 und 2 angegeben. Aus den k -Werten wurden nach Gl. (15) bzw. (18) die k_{Acetat} - bzw. k_{Phosphat} -Werte gemäß dem folgenden Beispiel berechnet: Reaktion 1: pH = 4,0; Gesamtacetat = $5 \cdot 10^{-2} M$; $k = 1,48 \cdot 10^{-2}$; k_1 , k_2 , $k_{\text{H}_2\text{O}}$, k_{H^+} wurden aus Tab. 5 entnommen; $K_{\text{SH}} = 7,4 \cdot 10^{-9}$.

$$k_{\text{Acetat}} = \frac{465 \cdot 7,4 \cdot 10^{-5} (0,0012 + 0,25) - 1,48 \cdot 10^{-2} (1 + 0,0012 + 0,25)}{5 \cdot 10^{-2} (1,48 \cdot 10^{-2} - 465 \cdot 7,4 \cdot 10^{-5})} = 10,0.$$

Alle übrigen Konstanten in Tab. 3 und 4 wurden in gleicher Weise berechnet.

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \frac{\mathbf{a} + \mathbf{c}}{\mathbf{b} + \mathbf{c}} \quad (14)$$

$$k_{\text{Acetat}} = \frac{k_1 \alpha_{\text{SH}} \mathbf{a} - k \mathbf{b}}{(k - k_1 \alpha_{\text{SH}}) (\text{Gesamtacetat})} \quad (15)$$

$$k_{\text{Acetat}} = k_{\text{CH}_3\text{COOH}} (1 - \alpha);$$

$$K = 2,5 \cdot 10^{-5} (25^\circ \text{C}, 0,1 M\text{-KCl}) \quad (16)$$

$$k = k_1 \alpha_{\text{SH}} \frac{\mathbf{a} + \mathbf{d}}{\mathbf{b} + \mathbf{d}} \quad (17)$$

$$k_{\text{Phosphat}} = \frac{k_1 \alpha_{\text{SH}} \mathbf{a} - k \mathbf{b}}{(k - k_1 \alpha_{\text{SH}}) (\text{Gesamtphosphat})} \quad (18)$$

$$k_{\text{Phosphat}} \cong k_{\text{H}_3\text{PO}_4} (1 - \alpha_1) + k_{\text{H}_2\text{PO}_4} (1 - \alpha_2) \alpha_1 + k_{\text{HPO}_4} \alpha_2 \quad (19)$$

$$K_1 = 7,1 \cdot 10^{-3}; K_2 = 1,4 \cdot 10^{-7} (25^\circ \text{C}, 0,1 M \text{KCl}); K_3 = 4,4 \cdot 10^{-13}$$

$$\mathbf{a} = k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{H}_2\text{O}) + k_{\text{H}^+} (\text{H}^+); \mathbf{b} = k_2 + \mathbf{a}$$

$$\mathbf{c} = k_{\text{CH}_3\text{COOH}} (\text{CH}_3\text{COOH}) = k_{\text{Acetat}} (\text{Gesamtacetat})$$

$$\mathbf{d} = k_{\text{H}_3\text{PO}_4} (\text{H}_3\text{PO}_4) + k_{\text{H}_2\text{PO}_4} (\text{H}_2\text{PO}_4^-) + k_{\text{HPO}_4} (\text{HPO}_4^{2-}) = k_{\text{Phosphat}} (\text{Gesamtphosphat})$$

In einer Reihe von Experimenten wurden für die Reaktionen 1 bis 4 die k -Werte in Gegenwart von Phosphat bzw. Acetat bei verschiedenen pH-Werten gemessen (Kurven der Abb. 5). Zusätzlich zu den in Abb. 5 eingetragenen Meßwerten wurden für die Reaktionen 1 und 2 noch weitere k -Werte gemessen, um zu überprüfen, ob die k_{HX}^* -Werte tatsächlich die nach Gl. (16) und (19) gegebene pH-Abhängigkeit zeigen, und somit die Berechnung der pH-unabhängigen Konstanten nach

Tabelle 4. Einfluß von Phosphat auf Reaktion 2 und von Acetat auf Reaktion 1 bei variablem pH.
 Berechnung der Konstanten $k_{H_2PO_4}$ bzw. k_{CH_3COOH} nach Gl. (19) bzw. Gl. (16)

pH	Reaktion 2 (Phosphat-katalysiert)				Reaktion 1 (Acetat-katalysiert)			
	(Phosphat) M	k $M^{-1} s^{-1}$	$k_{Phosphat}$ $M^{-1} s^{-1}$	$k_{H_2PO_4}$ $M^{-1} s^{-1}$	(Acetat) M	k $M^{-1} s^{-1}$	k_{Acetat} $M^{-1} s^{-1}$	k_{CH_3COOH} $M^{-1} s^{-1}$
4,0	0,100	0,05	5,70	—	0,05	0,0062	11,3	12,0
5,5	0,100	0,78	3,20	3,00	0,05	0,0148	10,0	12,2
5,0	Mittelwerte v. Tab 3	3,25	3,25	3,25	0,04	0,0165	10,0	12,2
6,0	0,020	0,58	2,85	3,15	0,05	0,0182	6,65	9,0
6,5	0,020	1,78	2,80	3,85	0,04	0,0285	7,00	12,0
6,8	0,026	2,50	1,50	2,65	0,04	0,0535	3,85	12,5
7,0	0,020	2,90	1,45	3,25	0,05	0,0625	3,80	12,2
7,0	0,026	3,63	1,42	3,20	0,05	0,0590	3,50	11,0
7,2	0,026	4,3	1,06	3,10	0,05	0,110	0,57	13,0
7,5	0,020	4,70	0,63	2,95	0,05			12,2
8,0	0,10	17,0	0,28	2,90				
9,0	0,10	14,3	0,10					
10,0	0,10	14,5	0,09					
11,0	0,10	15,5	0,10					
	Mittelwert:					Mittelwert:		
				3,30				

Tabelle 5. Individuelle, milieuunab-

	$k_1 K_{SH}$ $\cdot 10^8$ s ⁻¹	k_1 $\cdot 10^{-2}$ M ⁻¹ s ⁻¹	k_2 s ⁻¹
Crotonaldehyd + ROOCCH ₂ SH (Rkt. 1)	3345	4,65	1
HPE ¹ + ROOCCH ₂ SH (Rkt. 2)	1040	14,0	1
Crotonaldehyd + - OOCCH ₂ SH (Rkt. 3)	3,75	7,50	1
HPE + - OOCCH ₂ SH (Rkt. 4)	17,8	35,4	1
Pental + - OOCCH ₂ SH ²	3,60	7,15	1
HOE ¹ + - OOCCH ₂ SH ²	16,0	33,5	1
Crotonaldehyd + HOOCCH ₂ SH (Rkt. 3)	315	*	1
HPE + HOOCCH ₂ SH (Rkt. 4)	920	*	1
Pental + HOOCCH ₂ SH ²	270	*	1
HOE + HOOCCH ₂ SH ²	850	*	1

¹ HPE = 4-Hydroxy-2-pental; HOE = 4-Hydroxy-2-octenal.

² Die Konstanten dieser Reaktionen wurden aus bisher unveröffentlichten kinetischen Messungen berechnet.

* Konstante aus verschiedenen Gründen [Gl. (7), (7a)] nicht bestimmbar.

** Bestimmung dieser Konstante grundsätzlich möglich.

diesen Gleichungen gerechtfertigt ist. Diese zusätzlich bestimmten k -Werte sind in Tab. 4 eingetragen. Aus den Konstanten k wurden nach dem obigen Beispiel die k_{HX}^* -Werte berechnet. Aus den k_{Acetat} -Werten wurden die konzentrations- und pH-unabhängigen Konstanten k_{CH_3COOH} berechnet. Die Werte in Tab. 4 zeigen nur geringe Schwankung, obwohl sich sowohl die Essigsäurekonzentration um fast zwei Zehnerpotenzen ändert als auch die Gesamtacetatkonzentration bei den Versuchen variiert wurde. Auftragen von k_{Acetat}/k_{CH_3COOH} gegen pH ergibt die (1- α)-Kurve der Essigsäure. Es liegen alle experimentell bestimmten Dissoziationswerte auf der theoretischen Kurve (Kurve 5 in Abb. 3).

Die $k_{Phosphat}$ -Werte (Tab. 4) der mit Phosphat katalysierten Reaktion 2 geben das Dissoziationsverhalten der Phosphorsäure bzw. des primären und sekundären Phosphats wieder. Zur Berechnung der pH-unabhängigen Konstanten wurde wie folgt vorgegangen: $k_{HPO_4} =$ Mittelwert der bei pH ≥ 9 bestimmten $k_{Phosphat}$ -Werte. $k_{H_3PO_4}$: Einsetzen der bei pH 3 und 4 bestimmten $k_{Phosphat}$ -Werte in Gl. (19) ergibt zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten, die in üblicher Weise aufgelöst werden [das dritte Glied in Gl. (19) kann vernachlässigt werden].

$k_{H_2PO_4}$: Im pH-Bereich 5—9 kann, wie eine einfache Rechnung zeigt, die Katalysewirkung des H₃PO₄ und HPO₄²⁻ gegenüber der Katalysewirkung des H₂PO₄⁻ vernachlässigt werden, so daß in diesem pH-Bereich gilt: $k_{Phosphat} = k_{H_2PO_4} (1 - \alpha_2)$. Mit dieser Gleichung wurde nun wieder überprüft, ob die Katalysewirkung des H₂PO₄ bzw. die $k_{Phosphat}$ -Werte

hängige Geschwindigkeitskonstanten

$k_{\text{H}_2\text{O}}$ $\cdot 10^5$	k_{H^+} $\cdot 10^{-3}$	$k_{\text{CH}_3\text{COOH}}$	$k_{\text{H}_3\text{PO}_4}$	$k_{\text{H}_2\text{PO}_4}$	k_{HPO_4} $\cdot 10^3$
$M^{-1}\text{s}^{-1}$	$M^{-1}\text{s}^{-1}$	$M^{-1}\text{s}^{-1}$	$M^{-1}\text{s}^{-1}$	$M^{-1}\text{s}^{-1}$	$M^{-1}\text{s}^{-1}$
2,16	2,50	12,0	1000	3,4	5
2,45	1,22	9,3	500	3,3	90
37,5	45500	*	*	42	30
33,0	155000	*	*	335	300
37,0	**	*	*	**	**
29,0	**	*	*	**	**
$\gg 1$	*	*	*	*	*
$\gg 1$	*	*	*	*	*
$\gg 1$	*	*	*	*	*
$\gg 1$	*	*	*	*	*

exakt dem Dissoziationsgesetz dieser Säure gehorchen. Tatsächlich sind die mit dieser Gleichung berechneten $k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$ -Werte, wie Tab. 4 zeigt, exakt pH-unabhängig. Auftragen von $k_{\text{Phosphat}}/k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$ ergibt die $(1-\alpha)$ -Kurve von H_2PO_4^- . Die aus den experimentellen kinetischen Daten berechneten Dissoziationswerte liegen alle auf der theoretischen Kurve (Abb. 3, Kurve 6). Alle weiteren Konstanten, die in Tab. 5 angegeben sind, wurden in grundsätzlich gleicher Weise berechnet.

Die individuellen, milieunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten

Die Affinität (= k_1 -Werte) der α,β -ungesättigten Aldehyde gegenüber einem Sulphydrylanion nimmt in der folgenden Reihe geringfügig zu: Pentenal < Crotonaldehyd < 4-Hydroxyoctenal < 4-Hydroxypentenal. Die etwas erhöhte Affinität der Hydroxyalkenale ist auf Grund des *F*-Effekts der Hydroxylgruppe verständlich. Wie ein Vergleich der k_1 -Werte von Rkt. 1 und 3 bzw. von Rkt. 2 und 4 zeigt, ist die nukleophile Kraft des $-\text{SCH}_2\text{COOR}$ etwa halb so groß wie die des $-\text{SCH}_2\text{COO}^-$. Dies steht im Gegensatz zu den von Friedman⁶ gefundenen Ergebnissen, wonach die Nukleophilie verschiedener SH-Verbindungen gegenüber Acrylnitril mit dem $\text{p}K_{\text{SH}}$ -Wert zunimmt. Für die Reaktion von Crotonaldehyd bzw. HPE mit dem Sulphydrylanion $-\text{SCH}_2\text{COOH}$ konnten nur die $k_1'K'_{\text{SH}}$ -Werte berechnet werden. Nimmt man an, daß die $-\text{SCH}_2\text{COOH}$ -Form etwa gleich nukleophil ist wie $-\text{SCH}_2\text{COOR}$, so ergibt sich aus den k_1 - und $k_1'K'_{\text{SH}}$ -Konstanten von Rkt. 1 und 3 bzw. 2 und 4 für den Dissoziationsvorgang $\text{HSCH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{SCH}_2\text{COOH} +$

⁶ M. Friedman, J. F. Carvins und J. S. Wall, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 3672 (1965); J. F. Carvins und M. Friedman, J. Biolog. Chem. **243**, 3357 (1968).

+ H⁺ ein pK_{SH} -Wert von 8,18. Dieser Wert stimmt genau mit dem pK_{SH} -Wert (= 8,13) von HSCH₂COOC₂H₅ überein.

Die Affinität (= k_{HX} -Werte) verschiedener Säuren HX zu einer reaktiven Zwischenverbindung nimmt in der folgenden Reihe schnell ab: H₃O⁺ > H₃PO₄ > CH₃COOH > H₂PO₄⁻ > HPO₄²⁻ > H₂O. Die Säure mit der kleineren Dissoziationskonstante hat, wie auf Grund des Brönstedtschen Katalysegesetzes⁵ zu erwarten ist, immer die kleinere Katalysekonstante.

Biochemische Aspekte

Wie schon in der Einleitung dargelegt wurde, ist für alle bisher festgestellten Wirkungen von 4-Hydroxyalkenalen und Alkenalen auf biologisches Material die Reaktion dieser Aldehyde mit SH-Trägern (Proteine, Enzyme, niedermolekulare SH-Verbindungen) verantwortlich. Hydroxyalkenale sind wesentlich wirksamere Zell- und Enzymgifte als Alkenale.

Die kinetischen Untersuchungen zeigen, daß Alkenale und 4-Hydroxyalkenale nach dem grundsätzlich gleichen Mechanismus mit SH-Verbindungen reagieren. Die Hydroxyalkenale haben nur eine 2- bis 4mal größere Affinität gegenüber Sulfhydrylanionen als die Alkenale. Auch in den Konstanten, die den Umsatzgrad β bestimmen und somit auf die Reaktionsgeschwindigkeit Einfluß haben, unterscheiden sich die beiden Aldehydtypen kaum. Die spezifische Wirkung von Hydroxyalkenalen auf die verschiedensten SH-Systeme kann somit keineswegs etwa auf Grund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen oder auf Grund von Reaktivitätsunterschieden erklärt werden. Ein ganz wesentlicher Unterschied liegt aber in der Struktur der Reaktionsprodukte und in der Lage der Reaktionsgleichgewichte. Die Reaktionsprodukte von Alkenalen können nur in der Oxo-Form vorliegen, die primären Reaktionsprodukte und 4-Hydroxyalkenalen dagegen lagern sich in die cyclischen Halb-acetalformen um, so daß — unter sonst gleichen Bedingungen — bei Reaktionen mit 4-Hydroxyalkenalen, wie die Werte der Tab. 6 zeigen, wesentlich weniger SH-Gruppen im Gleichgewicht frei sind als bei den entsprechenden Reaktionen mit Alkenalen. Dies bedeutet, daß funktionelle SH-Enzymssysteme durch 4-Hydroxyalkenale wesentlich leichter, d. h. bei kleineren Konzentrationen an Hemmstoff, inaktiviert werden als durch Alkenale. Bei in-vitro-Experimenten ist auch von entscheidender Bedeutung, daß die mit 4-Hydroxyalkenalen zu erzielenden Effekte — sobald sich die primären Reaktionsprodukte cyclisiert haben — nahezu oder ganz irreversibel sind, weil eine Rückreaktion zu Ald und RSH nur in dem Maße möglich ist, als sich die cyclische Form in die Oxo-Form umlagert.

Tabelle 6. Gleichgewichtskonstanten K von Reaktionen verschiedener SH-Verbindungen mit Crotonaldehyd bzw. *HPE*: $Ald_0 = 1 \cdot 10^{-3}M$, $RSH_0 = 5 \cdot 10^{-4}M$, $pH = 7,4$ (0,02*m* an Phosphat), $t = 25^\circ C$

	Crotonaldehyd	<i>HPE</i>	(RSH) : (RSH)*
Thioglykolat	$K = 2 \cdot 10^{-5}$	$K = 5 \cdot 10^{-8}$	400 : 1
Thioglykolsäureester	$K = 2 \cdot 10^{-5}$	$K = 8 \cdot 10^{-7}$	25 : 1
Glutathion	$K = 3 \cdot 10^{-5}$	$K = 1 \cdot 10^{-6}$	30 : 1

* Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration bei Reaktion mit Crotonaldehyd zur Gleichgewichtskonzentration bei Reaktion mit *HPE*.

Die Ursachen der unterschiedlichen Reaktivität ($= k$) verschiedener SH-Gruppen zu *einem* Aldehyd (z. B. Hydroxypentalen) sind vor allem in den unterschiedlichen Werten der drei Parameter der Gleichung $k = k_1 \alpha_{SH} \beta$ zu suchen. Auf Grund der k_1 -Werte ist nur eine kleine Variationsbreite für die Reaktivitäten zu erwarten, da sich die verschiedenen Sulfhydrylanionen in ihrer Nukleophilie nur wenig voneinander unterscheiden. Eine Variationsbreite um mindestens zwei Zehnerpotenzen ergibt sich auf Grund des unterschiedlichen Dissoziationszustands der verschiedenen SH-Gruppen.

Wird einem Kollektiv verschiedener SH-Gruppen (mehrere niedermolekulare SH-Verbindungen oder Protein mit mehreren SH-Gruppen) 4-Hydroxypentalen angeboten, so reagieren die SH-Gruppen mit der größten Dissoziationskonstante am schnellsten, die mit der kleinsten am langsamsten. Ein weiteres Auswahlprinzip liegt im Verlauf der β_{H_2O} -Kurven vor. SH-Verbindungen, deren β -Kurven im sauren pH-Bereich liegen (vgl. Kurve 1 und 2 der Abb. 3), reagieren bei pH 7 wesentlich langsamer, als auf Grund ihrer k_1 - und α_{SH} -Werte zu erwarten wäre, da die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion in diesem Fall nicht die Addition des RS^- an den Aldehyd ist, sondern die wesentlich langsamer ablaufende Reaktion der Zwischenverbindung $AldSR^-$ mit H_2O . Reaktionen dieser Art sind katalysierbar. Der Einfluß von Protonendonatoren auf die Reaktivität verschiedener SH-Gruppen gegenüber ungesättigten Aldehyden darf keinesfalls außer acht gelassen werden, vor allem dann nicht, wenn etwa durch intramolekularen Protonenübergang, wie er bei Proteinen leicht möglich ist, das Zwischenprodukt $AldSR^-$ abgesättigt werden kann.

In dieser Arbeit wurden einerseits die für die Untersuchung der Reaktionen α,β -ungesättigter Aldehyde mit SH-Verbindungen geeigneten Methoden erarbeitet; andererseits wurde ein Ansatz gefunden, der die Kinetik dieser Reaktionen qualitativ und quantitativ richtig

beschreibt. In der Folge wird es daher möglich sein, auch die Kinetik komplexerer Systeme, wie etwa die Reaktion von Protein-SH-Gruppen, mit α,β -ungesättigten Aldehyden zu untersuchen.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. *E. Schauenstein*, Vorstand des Instituts für Biochemie der Universität Graz, für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit sowie für seine zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Die Arbeit wurde durchgeführt mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien.