

## ZUR THEORIE DER $\alpha$ -KETOSÄUREN†

### SEKUNDÄRE THERMODYNAMISCHE UND KINETISCHE DEUTERIUM ISOTOPIEEFFEKTE BEI NUCLEOPHILEN ADDITIONSREAKTIONEN AN DIE $\alpha$ -CARBONYLGRUPPE VON PYRUVAMID

G. FISCHER, G. KÜLLERTZ und A. SCHELENERGER

Sektion Biowissenschaften, Wissenschaftsbereich Biochemie der Universität Halle/Salle, DDR

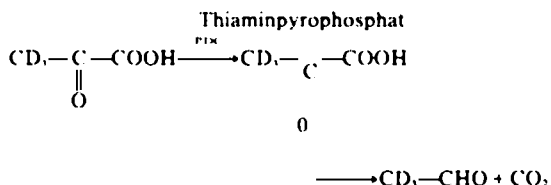
(Received in Germany 27 July 1975)

**Zusammenfassung**—Die Gleichgewichtskonstanten der Addition verschiedener O, N und S-Nucleophiler an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe von Pyruvamid wurden ermittelt. Der sekundäre Deuterium Isotopeneffekt in der Additionskonstanten bei Substrat-deuterierung ist für S- und O-Nucleophile nahezu identisch, für N-Nucleophile aber deutlich grösser. Aus den kinetischen sekundären Deuterium Isotopeneffekten der Wasseraddition an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe lassen sich für die unkatalysierte und OH<sup>-</sup>-katalysierte Reaktion Aussagen über die Natur des Übergangszustandes erhalten.

**Abstract**—Equilibrium constants for the addition of a series of O, N and S-nucleophilic reagents to the  $\alpha$ -carbonyl group of pyruvamide are reported. The secondary deuterium isotope effects of the addition constants are nearly independent of the nature of the O- and S-nucleophilic reagent; the corresponding isotope effects of N-nucleophilic reagents are significantly larger. The values of the kinetic secondary deuterium isotope effects for the attack of H<sub>2</sub>O to the  $\alpha$ -carbonyl group are useful as a guide to the transition state of the uncatalysed and the OH<sup>-</sup>-catalysed reaction.

Nucleophile Additionsreaktionen an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe der Brenztraubensäure (BTS)<sup>1</sup> und des Pyruvamids (PA)<sup>2</sup> sind wesentliche Reaktionsschritte bei verschiedenen enzymatischen Umsetzungen.

Beim Einsatz von  $\beta$ -deuterierter BTS als Substrat bzw. von  $\beta$ -deuteriertem PA als Effektor bei der durch die Pyruvatdecarboxylase (PDC) katalysierten Decarboxylierung der BTS beobachtet man einen deutlichen Einfluss der  $\beta$ -CD<sub>3</sub>-Gruppierung auf die sigmoide V/S-Charakteristik der Enzymreaktion.<sup>3</sup>



Um aus den gemessenen sekundären Isotopieeffekten Hinweise über den Enzymmechanismus ableiten zu können, wurde die Kinetik und Thermodynamik der Addition einiger O-, N- und S-Nucleophiler an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe des PA untersucht.

Einige Besonderheiten der Carbonylreaktivität von BTS und seinen carboxylsubstituierten Derivaten haben zur intensiven Bearbeitung vor allem der Kinetik und Thermodynamik der H<sub>2</sub>O-Addition<sup>4</sup> und der Enolisierung<sup>5</sup> geführt. In beiden Fällen werden aussergewöhnlich hohe Geschwindigkeiten der wasser-katalysierten Reaktion neben sehr niedrigen protonen-katalytischen Termen gefunden. Auch der kinetische Solvent-Deuterium Isotopeneffekt der wasser-katalysierten BTS-Hydratation<sup>6</sup> fällt im Vergleich zu einer Reihe

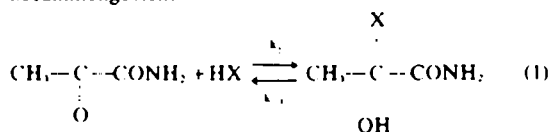
ähnlich strukturierter Carbonylverbindungen ungewöhnlich niedrig aus und liefert Hinweise auf eine spezifische Solventstruktur in der Umgebung der  $\alpha$ -Carbonylgruppe. Diese Deutung wird durch den kinetischen Solvent-Deuterium Isotopeneffekt auf die Geschwindigkeit der solventkatalysierten Enolisierung von Brenztraubensäure-diäthylamid gestützt.<sup>7</sup>

C-, N- und S-Nucleophile addieren erwartungsgemäss ebenfalls reversibel an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe der BTS-Derivate,<sup>8,9</sup> ihre Additionsreaktionen sind mechanistisch bisher aber kaum untersucht.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

##### (a) Additions-gleichgewichte

Die Gleichgewichtskonstanten K<sub>0</sub> der Addition einer Reihe von Nucleophilen an PA und PA- $\beta$ -d<sub>3</sub> sind UV-spektroskopisch vermessen worden und in Tabelle 1 zusammengestellt.



$$K_0 = \frac{[\text{Addukt}]}{[\text{PA}][\text{HX}]} \quad (2)$$

Da die Addition der S- und N-Nucleophilen in Wasser als Lösungsmittel untersucht wurde, muss die Solventaddition in die Berechnung von K<sub>0</sub> einbezogen werden (Gl.3).

$$K_0 = K_{0w}(1 + K_0^{\text{H}_2\text{O}}) \quad (3)$$

Die Additions-gleichgewichte zeigen, dass die  $\alpha$ -Carbonylgruppe des PA im Vergleich zu BTS in ihrer Reaktivität vermindert ist, (K<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 1.8/55.5)<sup>10</sup> andererseits

†XXII. Mitteilung; XXI. Mitteilung, *Tetrahedron* 29, 4313 (1973).

Tabelle 1. Gleichgewichtskonstanten der Addition einiger Nucleophiler an Pyruvamid und Pyruvamid- $\beta$ -d, bei  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 

Nucleophil	pH	$c_N$ (Mol/l)	$K_o^H$ (1/Mol)	$K_o^D$ (1/Mol)	$K_o^H/K_o^D$	Reprod.
Wasser	4.7	55.5	0.75/55.5	0.87/55.5	0.87 - 0.01	40
CH <sub>3</sub> OH	—	24.7	$4.40 \times 10^{-2}$	$5.19 \times 10^{-2}$	$0.85 \pm 0.04$	10
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	—	17.2	$2.01 \times 10^{-2}$	$2.28 \times 10^{-2}$	$0.88 \pm 0.04$	10
$\beta$ -Mercaptoäthanol	5.6	0.2-0.5	5.9	6.7	$0.88 \pm 0.06$	8
HS-CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub>	5.6	0.02-0.04	12.8	14.7	$0.87 \pm 0.05$	10
Semicarbazid	6.2	0.01-0.03	80.1	112	$0.73 \pm 0.08$	16
Hydroxylamin	6.2		135	172	$0.79 \pm 0.05$	10

aber erheblich über dem BTS-Anion liegt ( $K_{H_2O} = 0.053/55.5 \approx K_{NH_2OH} = 57^{10}$ ). Mit dem Parameter  $\gamma$ , einem Mass für die Affinität eines Nucleophilen zur Carbonylgruppe,<sup>12</sup> sind die  $\lg K_o$ -Werte der isotopen PA linear korrelierbar (Gl.4 und 5).

$$\lg K_o^H = 1.0\gamma + 0.1 \quad (4)$$

$$\lg K_o^D = 1.0\gamma + 0.2 \quad (5)$$

Diese Korrelationen werden auch von N-Nucleophilen erfüllt, was auf ein Additionsverhalten ähnlich dem der aromatischen Aldehyde und verschieden von dem des Formaldehyds hinweist.<sup>12</sup> Der Anstieg der Korrelationsgeraden ( $\Delta = 1.0$ ;  $r = 0.99$ ) zeigt, dass die Sensibilität der  $\alpha$ -Carbonylgruppe des PA gegenüber den Nucleophilen sich nicht von der des Formaldehyds bzw. *p*-Chlorbenzaldehyds unterscheidet.<sup>12</sup>

Der Isotopeneffekt auf die Additions-gleichgewichte ist erwartungsgemäss invers ( $K_H/K_D < 1$ ).<sup>11</sup> Weitgehende Änderungen der sterischen Eigenschaften und der Stärke des Nucleophilen lassen trotz beträchtlicher Unterschiede in den Additionskonstanten den Isotopeneffekt nahezu unbeeinflusst. Nichtbindende Wechselwirkungen des Substituenten mit der isotopen Bindung können damit nicht für die Grösse des Effektes verantwortlich gemacht werden.

Erwartungsgemäss findet man für N-Nucleophile ein kleineres  $K_H/K_D$  als für S- und O-Verbindungen.<sup>14,15</sup>

#### (b) Kinetische Untersuchungen

Für die allgemeine Säure- und allgemeine Basen-Katalyse der nucleophilen Addition von H<sub>2</sub>O an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe des PA gilt Gl. (6).

$$k_1 = k_0 + k_{H_2O} \cdot [H_2O] + k_{OH} [OH^-] + k_{HA} [HA] + k_A [A^-] \quad (6)$$

Bei Acetationenkonzentrationen  $< 0.02$  m und Essigsäurekonzentrationen  $< 0.1$  m sind nur katalytische Beiträge der H<sub>2</sub>O- und OH<sup>-</sup>-Katalyse zu beobachten. Protonenkatalytische Terme treten, wie bei allen bisher untersuchten Carbonylreaktionen an BTS-Derivaten

demgegenüber in den Hintergrund. In Tabelle 2 sind einige der in Acetatpuffer erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der PA-Hydratation aufgeführt.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Hydratation von Pyruvamid ( $k_1^H$ ) und Pyruvamid- $\beta$ -d, ( $k_1^D$ ) von der Acetatpufferkonzentration

HAc (Mol/l)	Ac (Mol/l)	pH	$K_1^H$ (min <sup>-1</sup> )	$k_1^D$ (min <sup>-1</sup> )	$k_1^H/k_1^D$
$9.78 \times 10^{-1}$	$9.78 \times 10^{-1}$	4.7	1.18	1.35	0.87
$1.97 \times 10^{-1}$	$1.97 \times 10^{-1}$	4.7	1.19	1.37	0.86
$1.96 \times 10^{-2}$	$1.96 \times 10^{-2}$	4.7	1.19	1.37	0.86

Bei höheren Basekonzentrationen in Phosphatpuffer lässt sich eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  von der Phosphationenkonzentration erhalten, die ausser  $k_A$ - auch  $k_{OH}$ -liefert. (Abb. 1)

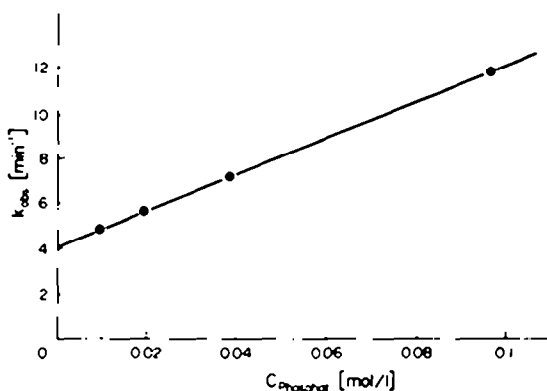


Abb. 1. Phosphationenkatalysierte Hydratation von Pyruvamid. (pH = 7.2;  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{amid}} = 7.0 \times 10^{-3}$  m;  $\mu = 0.2$  (NaCl)) Jedes  $k_{\text{obs}}$  entspricht dem Mittelwert aus 4 voneinander unabhängigen Messungen.

In Tabelle 3 sind alle erhaltenen Katalysekonstanten für die Hydratisierung ( $k_1$ ) und Dehydratisierung ( $k_{-1}$ ) von PA zusammen mit den dazugehörigen kinetischen Isotopeneffekten verzeichnet.

Aus den Geschwindigkeitskonstanten der wasserkata-

Tabelle 3. Katalysekonstanten der Hydratisierung ( $k_1$ ) und Dehydratisierung ( $k_{-1}$ ) von Pyruvamid und Pyruvamid- $\beta$ -d.

Base	$k_1^H$ (Mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_1^D$ (Mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_1^H/k_1^D$	$k_{-1}^H$ (Mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$k_{-1}^D$ (Mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$k_{-1}^H/k_{-1}^D$	Reprod.
H <sub>2</sub> O	$1.18 \pm 0.02/55.5$	$1.32 \pm 0.02/55.5$	$0.89 \pm 0.03$	$1.56 \pm 0.03/55.5$	$1.51 \pm 0.03/55.5$	$1.03 \pm 0.04$	15
OH	$3.72 \pm 0.13 \times 10^6$	$3.76 \pm 0.27 \times 10^6$	$0.99 \pm 0.06$	$4.94 \pm 0.18 \times 10^6$	$4.43 \pm 0.32 \times 10^6$	$1.12 \pm 0.06$	17
Phosphat <sup>b</sup>	$3.41 \pm 0.13 \times 10^1$	$3.91 \pm 0.28 \times 10^1$	$0.87 \pm 0.09$	$4.53 \pm 0.17 \times 10^1$	$4.52 \pm 0.17 \times 10^1$	$1.01 \pm 0.09$	17

<sup>a</sup>  $k_{-1} = K_{H_2O} \times k_1$ .

<sup>b</sup> Bei pH 7.2 erhalten und als Katalysekonstante eines Gemisches von HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (50%) und H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (50%) zu betrachten.

lysierten Addition ( $k_a$ ) kann man ersehen, dass der retardierende Einfluss der Amidgruppierung auf die Reaktivität der  $\alpha$ -Carbonylgruppe beträchtlich ist. (Tabelle 4).

Tabelle 4. Geschwindigkeitskonstanten  $k_a$  der  $H_2O$ -katalysierten Wasseraddition

	$k_a$ (min <sup>-1</sup> )	
CH <sub>3</sub> CO-COO	$9.5 \times 10^{-1}$	(0°C) <sup>17</sup>
CH <sub>3</sub> CO-COOH	$3.3 \times 10^1$	(25°C) <sup>18</sup> ; 2.00(0°C) <sup>17</sup>
CH <sub>3</sub> CO-COOCH <sub>3</sub>	6.9	(0°C) <sup>16</sup>
CH <sub>3</sub> CO-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	5.37	(0°C) <sup>16</sup>
CH <sub>3</sub> CO-CONH <sub>2</sub>	1.18	(25°C)

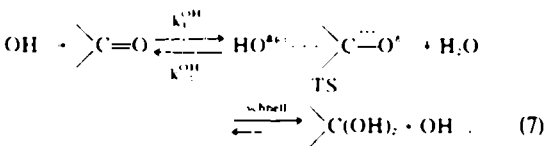
<sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen bestätigen den ausserordentlich grossen Einfluss des Zustandes der Carboxylgruppe auf die  $\alpha$ -Carbonylgruppierung und lassen, obwohl der C-C-Bindungsabstand zwischen dem  $\alpha$ -Carbonyl und der Carboxylat-<sup>20</sup> oder Carboxamidgruppe nicht verkürzt ist, auf intensive konjugative Wechselwirkungen schliessen.<sup>21</sup>

Eine intramolekulare Protonenkatalyse, die auf Grund der verschiedenen  $k_a$ -Werte bei Strehlow<sup>16</sup> und Pocker<sup>17</sup> auch bei der BTS-Hydratation noch fraglich erscheint, ist für PA auszuschliessen.

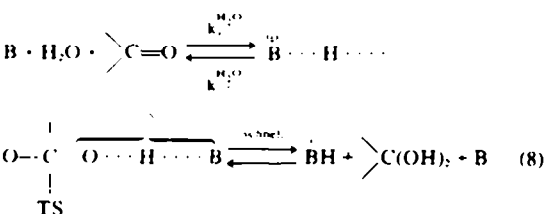
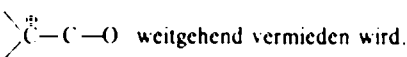
Unter der Voraussetzung, dass die unterschiedliche Ladungsverteilung im dipolaren Übergangszustand (TS, Gl.8) und im ungeladenen Reaktionsprodukt keinen Einfluss auf den Betrag der kinetischen Isotopeneffekte hat, lassen sich beim Vergleich der thermodynamischen und kinetischen Isotopeneffekte Aussagen über den Grad der Bindungsbildung zwischen dem Nucleophilen und der Carbonylgruppe im Übergangszustand machen. Dabei ergeben sich für die  $H_2O$ - und Phosphatkatalyse einerseits und für die OH<sup>-</sup>-Katalyse wesentliche Unterschiede.

Wir finden im TS der  $H_2O$ - und Phosphatkatalyse ein weitgehend sp<sup>3</sup>-hybridisiertes  $\alpha$ -C-Atom des PA, während die OH<sup>-</sup>-Katalyse einen reaktandenanalogen TS aufweist. Daraus kann man auf verschiedene Reaktionsmechanismen schliessen.

Wir nehmen für die OH<sup>-</sup>-Katalyse eine direkte Addition der Hydroxylionen an die  $\alpha$ -Carbonylgruppe an (Gl.7)



Für die durch schwache Basen katalysierte Wasseraddition kann Mechanismus (8) formuliert werden, bei dem die Bildung instabiler Intermediate<sup>19</sup> vom Typ



## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Pyruvamid und Pyruvamid- $\beta$ -d, wurden nach in einer früheren Arbeit beschriebenen Methode dargestellt und gereinigt.<sup>22</sup> Die Gleichgewichtskonstanten der Addition verschiedener Nucleophiler an PA wurden anhand der Abnahme der Extinktion der n- $\pi^*$ -Bande der  $\alpha$ -Carbonylgruppe bei 339 nm untersucht. Der Extinktionskoeffizient der reinen Carbonylform des PA in Wasser war durch Extrapolation der pseudo-1. Ordnung-Kinetik der  $H_2O$ -Addition auf t=0 zu erhalten ( $\epsilon_{339}^{H_2O} = 24.9 \pm 0.5$ ;  $\epsilon_{339}^{H_2O} = 1.00$ ).

Bei den Messungen in CH<sub>3</sub>OH und C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH und C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH wurde zur Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung eine Spur Pyrrolidin zugesetzt. Die Konzentration an PA betrug in allen Fällen ca.  $10^{-2}$  m. Die Gleichgewichtsmessungen und die Kinetik wurden an einem Bifrequenzspektralphotometer (Perkin-Elmer Modell 356) bei  $25 \pm 0.2^\circ C$  verfolgt. Da die Reaktion durch Injektion einer 2 m Stammlosung des PA in Dioxan (Fa. Merck, Uvasol) gestartet wurde, waren die kinetischen Ansätze in Wasser ca.  $10^{-2}$  m an Dioxan ( $\mu = 0.1$  (NaCl)). Bei den Gleichgewichtsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass der Dioxangehalt in diesem Konzentrationsbereich die Konstanten nicht beeinflusst. Die kinetischen Messungen wurden durch Zugabe der PA-Stammlosung in die temperierte Küvette gestartet. Erste Messwerte konnten ca. 4 sec. nach der Zugabe erhalten werden; lineare pseudo-1. Ordnung-Kurven wurden mindestens 3 Halbwertszeiten beobachtet. Da die Hydratation reversibel ist, muss die gemessene Geschwindigkeitskonstante  $k_{app}$  nach Gl. 9 in  $k_a$  umgewandelt werden.

$$k_a = k_{app} \cdot K_{H_2O} / (K_{H_2O} + 1) + K_{H_2O} \cdot [Hydrat] / [Ketoform] \quad (9)$$

## LITERATUR

- R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1792 (1957).
- L. O. Krampitz, *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 213 (1969).
- A. Schellenberger, *Notulae Acta Leopoldina* **36**, 9 (1971).
- P. A. Reese und E. E. Snell, *Biochemistry* **1970**, 9; \*D. S. Hodgkins und R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **242**, 5158 (1967); \*K. R. Hanson und E. A. Havir, *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 1 (1970).
- G. Fischer, in Vorbereitung.
- V. Gold, G. Socrates und M. R. Crampton, *J. Chem. Soc.* 5888 (1969); \*V. S. Griffith und G. Socrates, *Trans. Faraday Soc.* **63**, 673 (1967); \*M. Becker, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **68**, 669 (1964); \*M. Eigen, K. Kustin und H. Strehlow, *Z. Phys. Chem.* **31**, 140 (1962); \*N. Hellström und S.-O. Almquist, *J. Chem. Soc. B* 1396 (1970); \*Y. Pocker, J. E. Meany, B. J. Nist und C. Zadoranyi, *J. Phys. Chem.* **73**, 2879 (1969).
- W. J. Albery, R. P. Bell und A. L. Powell, *Trans. Faraday Soc.* **61**, 1194 (1965); \*G. Fischer und A. Schellenberger, *Tetrahedron* **29**, 4113 (1972); \*G. Fischer, G. Kullertz und A. Schellenberger, *Ibid.* **29**, 4313 (1973); \*J. E. Meany, *J. Phys. Chem.* **75**, 150 (1971).
- H. M. Menzel, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **78**, 89 (1974).
- V. Franzen, *Liebigs Ann. Chem.* **613**, 1 (1958).
- W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6154 (1969).
- L. Field und B. J. Sweetman, *J. Org. Chem.* **34**, 1799 (1969).
- E. G. Sander und W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6154 (1968).
- M. M. Mocek und R. Stewart, *Can. J. Chem.* **41**, 1641 (1963).
- V. J. Shiner, Jr., In *Isotope Effects in Chemical Reactions*, C. J. Collins und N. S. Bowman, Ed., van Nostrand, New York (1970).
- L. do Amaral, H. G. Bull und E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 7579 (1974).
- Y. Pocker, J. E. Meany und C. Zadoranyi, *J. Phys. Chem.* **75**, 792 (1971).
- Y. Pocker und J. E. Meany, *Ibid.* **74**, 1486 (1970).
- H. Patting und H. Strehlow, *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **73**, 534 (1969).
- W. P. Jencks, *Chem. Reviews* **72**, 705 (1972).
- K.-M. Marstokk H. Mollendal, *J. Molecular Struct.* **20**, 257 (1974).
- G. Fischer und D. R. Petzold, in Vorbereitung.