

MECHANISMUS DER BASISCHEN HYDROLYSE VON OLIGOPEPTID-4-NITRO-ANILIDEN

G. FISCHER, G. KÜLLERTZ und A. BARTH

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

(Received in Germany 9 February 1977; Received in the UK for publication 9 December 1977)

Abstract—Oligopeptide-4-nitroanilide alkaline hydrolysis mechanism has been studied in a wide pH-range. In the log k_b vs pH-profile we have identified three different ranges. In the k_2/k_{-1} controlled range a stereoelectronic control of the cleavage of the tetrahedral intermediate has been observed in the case, a α -substituent is available for interaction with groups on the tetrahedral carbon atom. In the k_3/k_{-1} - and in the k_1 -range of the hydrolysis no mechanistically differences exist between oligopeptide-4-nitroanilides and acet-4-nitroanilides. Kinetic-D-isotope effects are consistent with the postulated mechanism of hydrolysis.

Zusammenfassung—Die basische Hydrolyse von Oligopeptid-4-nitroaniliden wurde in einem weiten pH-Bereich untersucht. Im log k_b vs pH-Profil wurden drei verschiedene Bereiche identifiziert. Im k_2/k_{-1} kontrollierten Bereich wurde eine stereoelektronische Kontrolle der Spaltung des tetrahedralen Intermediats beobachtet, sobald in α -Stellung wechselwirkungsaktive Substituenten vorhanden sind. Im k_3/k_{-1} - und im k_1 -Bereich der Hydrolyse wurden bei Oligopeptid-4-nitroaniliden im Vergleich zu Acet-4-nitroaniliden keine Unterschiede im Mechanismus gefunden. Kinetische-D-Isotopieeffekte sind in Übereinstimmung mit dem postulierten Hydrolysemechanismus.

Der Mechanismus der basischen Hydrolyse verschiedener Anilide, die sowohl im Acylteil, als auch im Anilidteil des Moleküls unterschiedlich substituiert sind, wurde eingehend untersucht.¹⁻¹³ Wir haben die Geschwindigkeit der Hydrolyse einiger α -Aminosäure-4-nitroanilide und Oligopeptid-4-nitroanilide über einen weiten pH-Bereich gemessen. Dabei zeigten erste Untersuchungen eine im Vergleich mit α -Aminosäureaniliden, bei denen die 4-Nitrogruppe durch weniger elektronegative Substituenten ersetzt ist, sehr hohe Reaktivität.¹⁴ Diese und im Arylteil modifizierte Anilide finden als Substratanaloga zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen mit proteolytischen (aminopeptidatischen) Eigenschaften umfassende Verwendung. Ein Vergleich der Konstanten der enzymatischen Hydrolyse sollte zur genaueren Interpretation nach unserer Meinung stets auf der möglicherweise unterschiedlichen Acylreaktivität der Oligopeptid-anilide beruhen, um Fehlinterpretationen der hohen enzymatischen Spaltungsrate mancher Peptidbindungen zu vermeiden.

Die hydroxylionen-katalysierte Hydrolyse von 4-Nitroacet-anilid und 4-Nitro-trifluoracetanilid wird über einen weiten pH-Bereich durch das kinetische Modell (Gleichung 1) beschrieben.



In Gegenwart eines weiteren Katalysators B, der sowohl die Bildung als auch den Zerfall des tetrahedralen Intermediats (I) katalysiert, ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante pseudo-1. Ordnung (k_b) der

Hydrolysereaktion:

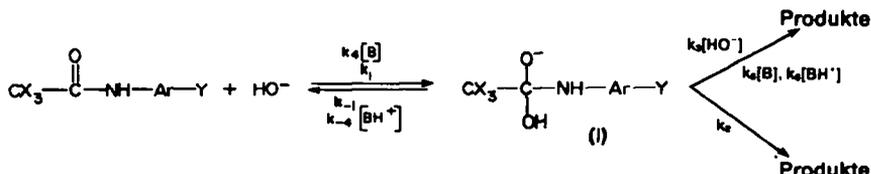
$$k_b = \frac{(k_1[HO^-] + k_4[B])(k_2 + k_3[HO^-] + k_5[B] + k_6[BH^+])}{k_{-1} + k_2 + k_3[HO^-] + k_{-4}[BH^+] + k_5[B] + k_6[BH^+]} \quad (2)$$

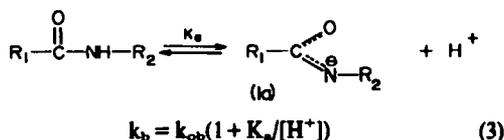
α -Aminosäure-4-nitroanilide und Oligopeptid-4-nitroanilide sollten in ihrem Hydrolyseverhalten zwischen diesen beiden Acylrestvariationen liegen, wobei die Protonierung der α -Aminogruppe bei pH-Werten < 10 einen weiteren pH-empfindlichen Term in die Gleichungen (1) und (2) einführt. Protonierte α -Aminosäureester hydrolysieren im alkalischen Bereich ca. 10^2 mal schneller als die neutrale Form der Verbindungen.^{15,16}

Um die einzelnen kinetischen Parameter in den Gleichungen (1) und (2) bestimmten Katalysatorkonzentrationen besser zuordnen zu können, haben wir neben dem katalytischen Verhalten zugesetzter Puffersubstanzen auch kinetische Deuterium-Solvent-Isotopieeffekte und sekundäre D-Isotopieeffekte auf die Hydrolysegeschwindigkeit bei der Substitution von H durch D in α -Stellung eines Substrates experimentell ermittelt.

ERGEBNISSE

Die Hydrolyse der 4-Nitroanilide wurde spektralphotometrisch anhand des entstehenden *p*-Nitroanilins bei 30° und $\mu = 1.0$ (KCl) verfolgt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten pseudo-1. Ordnung k_{ob} müssen infolge der Bildung des unreaktiven Anions (Ia)





nach Gleichung (3) korrigiert werden.^{24,11,17}

Die Profile der so erhaltenen pH/lg k_b -Abhängigkeiten für L-Pro-4-nitroanilid (Pro-pNA), L-Ala-4-nitroanilid (Ala-pNA), L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid (Ala₂-pNA), L-Ala-L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid (Ala₃-pNA), L-Phe-L-Ala-4-nitroanilid (Phe-Ala-pNA) und Acetyl-L-Ala-4-nitroanilid (Ac-Ala₂-pNA) sind z.T. in Abb. 1 bzw. die daraus erhaltenen kinetischen Einzelkonstanten in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Gleichgewichtskonstante K_a der NH-Dissoziation (1a) lässt sich aus der Extinktionsänderung einer Substratlösung bei verschiedenen Hydroxylionen-Konzentrationen zur Zeit $t=0$ ermitteln. Reaktionen bei hohen Hydroxylionen-Konzentrationen wurden bis zu einem stabilen Endpunkt verfolgt und nach einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet. Der erste Messpunkt war nach ca. 10 sec. zugänglich; eine Anlaufphase der Hydrolysegeschwindigkeit war nicht zu beobachten. Bei geringeren Hydrolysegeschwindigkeiten wurde nach Guggenheim³⁰ oder durch die Messung der Anfangsgeschwindigkeit k_{ob} ermittelt. Im Überlappungsbereich der Methoden wurden übereinstimmende Resultate erhalten.

Eine chromatographische Produktanalyse ergab nur Aminosäuren bzw. Oligopeptide und *p*-Nitroanilin als Endprodukte. Eine Hydrolyse von Amidbindungen neben der 4-Nitroanilidgruppe in den Oligopeptiden wurde nicht beobachtet. Zwischenprodukte sind chromatographisch und UV-VIS-spektrometrisch nicht nachweisbar. Man beobachtet sowohl bei hohen pH-Werten, als auch im pH-Bereich von 8-11 bei Anwesenheit von Puffersubstanzen isobestische Punkte bis zur Beendigung der Hydrolyse (z.B. für Ala₂-pNA bei 344 nm).

Eine Diketopiperazinbildung durch intermolekulare Aminolyse der α -Aminosäure-4-nitroanilide konnte nicht beobachtet werden. Im Bereich von Substratkonzentrationen $c = 3 \times 10^{-3}$ bis 5×10^{-5} M ist k_b in den Fehlergrenzen von der Konzentration unabhängig. Glycinkonzentrationen bis 0.5 M erhöhen k_b nicht signifikant über $k_1 \times [\text{OH}^-]$. Hydrolyse von Ala₂-pNA führt zum Dipeptid, wobei auch im pH-Bereich um 10.0 keine Diketopiperazinbildung (Dünnschichtchromatographie, Anfärbung mit Chlor/Tolidin-Reagens) festgestellt werden konnte. NH₂-Titration des Reaktionsproduktes ergab $98 \pm 2\%$ Dipeptid. Bei hohen pH-

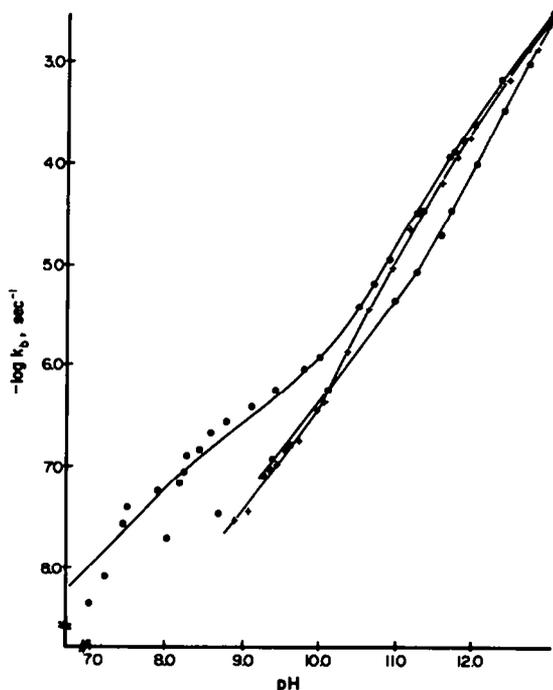


Abb. 1. Geschwindigkeitskonstanten lg k_b der Hydrolyse von Ala-pNA (O), Ala₂-pNA (●) und Ala₃-pNA (+) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die durchgezogenen Kurven sind nach Gleichung (1) mit den Konstanten von Tabelle 1 berechnet. Für Ala₂-pNA wurde diese Kurve als Summe der pH-Wert abhängigen Konzentrationen von H₂N-Ala₂-pNA und H₃N-Ala₂-pNA in Verbindung mit Gleichung (1) erhalten.

zentrationen $c = 3 \times 10^{-3}$ bis 5×10^{-5} M ist k_b in den Fehlergrenzen von der Konzentration unabhängig. Glycinkonzentrationen bis 0.5 M erhöhen k_b nicht signifikant über $k_1 \times [\text{OH}^-]$. Hydrolyse von Ala₂-pNA führt zum Dipeptid, wobei auch im pH-Bereich um 10.0 keine Diketopiperazinbildung (Dünnschichtchromatographie, Anfärbung mit Chlor/Tolidin-Reagens) festgestellt werden konnte. NH₂-Titration des Reaktionsproduktes ergab $98 \pm 2\%$ Dipeptid. Bei hohen pH-

Tabelle 1. Thermodynamische und kinetische Parameter der Hydrolyse von acylsubstituierten 4-Nitroaniliden

Substanz	pK _a ^{NH₃⁺} †	pK _a ^{NH⁺} †	k ₁ (M ⁻¹ sec ⁻¹)†	k ₂ /k ₋₁ †	k ₃ /k ₋₁ †
L-Ala-4-nitroanilid	7.98	13.05	0.019	0.14	24
L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid ⁴	8.08	12.60	0.023	0.13	100
L-Ala-L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid	7.99	12.61	0.021	0.12	130
Acetyl-L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid	—	12.59	0.028	0.15	90
L-Phe-L-Ala-4-nitroanilid	7.29	12.09	0.028	0.12	70
L-Ala-methylester ^{15,16}	7.61‡	—	1.1‡	—	—
L-Pro-4-nitroanilid	8.62	13.01	0.015	0.54	††
4-Nitroacetanilid ^{6,18}	—	13.6	0.0047	0.05	8
4-Nitrotrifluoracetanilid ⁷	—	8.2§	360§	—	5 × 10 ³ §
4-Nitrodichloracetanilid ⁴	—	—	39¶	0.05¶	6130¶

†Bei 30.0°C und $\mu = 1.0$ (KCl).

‡Bei 25.0°C und $\mu = 0.1$ (KCl) für die H₂N-Form; in der H₃N⁺-Form gilt $k_1 = 80.3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.¹⁵

§Bei 25.0°C und $\mu = 0.2$ (KCl).

¶Bei 40.0°C; k_2/k_{-1} ist kaum temperaturabhängig.

††Für die H₂N-Form; für die H₃N⁺-Form gelten näherungsweise folgende Werte: $k_1 = 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $k_2/k_{-1} = 0.2$ und $k_3/k_{-1} = 3000 \text{ M}^{-1}$.

‡‡Nicht bestimmbar, da $k_2 k_1 / (k_{-1} + k_2)$ nur wenig kleiner als k_1 .

Werten zeigen die erhaltenen pH/lg k_b -Profile eine grosse Ähnlichkeit mit dem Hydrolyseprofil von *p*-Nitroacetanilid, obwohl der maximale Anstieg der Kurven (im pH-Bereich von ca. 11 bis 12) mit $m \leq 1.5$ den ausgeprägten Term 2. Ordnung bezüglich der Hydroxylionen-Konzentration bei *p*-Nitroacetanilid ($m = 1.8$)² nicht erreicht. Aus k_b lassen sich nach Gleichung (1) bei einigen Verbindungen die Einzelkomponenten k_1 , k_2/k_{-1} , und k_3/k_{-1} errechnen (Tabelle 1).

Bei allen untersuchten *p*-Nitroaniliden kann bei hohen Hydroxylionen-Konzentrationen ein Grenzwert von $k_b/[HO^-]$ beobachtet werden, der nach Gleichung (1) einer geschwindigkeitsbestimmenden HO^- -Ionen-Addition (k_1) zuzuordnen ist. Die erwartete drastische Geschwindigkeitszunahme der Hydrolyse bei Ala-pNA und Pro-pNA durch Protonisierung der α -Aminogruppe bei $pH < 10$ ist nicht zu finden. Dagegen weicht für Ala₂-pNA k_b bei pH-Werten < 10.5 signifikant von Gleichung (1) ab. Diese Verbindung wird ca. dreimal schneller hydrolysiert als seine Homologen Ala-pNA und Ala₃-pNA. Berücksichtigt man den steigenden Anteil an H_3N^+ -Ala₂-pNA bei sinkenden pH-Werten, lässt sich diese Abweichung von den Homologen quantitativ klären (Abb. 1). Blockierung der freien α -Aminogruppe des Dipeptids führt zur Aufhebung der hohen Reaktivität (Ac-Ala₂-pNA).

Ala₂-pNA unterliegt neben der hydroxylionen-induzierten Hydrolyse der allgemeinen Katalyse durch zugesetzte Puffersubstanzen. Es zeigt sich, dass diese Katalyse bei hohen Katalysatorkonzentrationen zu einem Grenzwert von k_b führt. Ein solches Verhalten ist zu erwarten, wenn $k_4[B] \ll k_1[HO^-]$ und $k_4[BH^+] + k_3[B]/k_{-1} \gg 1 + k_2/k_{-1} + k_3/k_{-1}[HO^-]$ wird. In diesem Falle wird $k_b = k_1[HO^-]$ und damit unabhängig von der Katalysatorkonzentration. Die auf diese Weise für einen weiten pH-Bereich zugängliche Geschwindigkeit der Hydroxylionen-Addition, die zur Ausbildung von (I) führt, ist für Ala₂-pNA in Abbildung 2 zu finden.

Bei niedrigen Pufferkonzentrationen findet man eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen k_b und dieser Konzentration, wodurch die Katalysekonstanten k_B und k_{BH^+} zugänglich werden. Vorläufige Untersuchungen zeigen, dass eine allgemeine Basenkatalyse beobachtet

wird, während säurekatalytische Terme nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden können. Setzt man Glycin als Katalysator ein, kann man k_b , allerdings nicht mit sehr hoher Genauigkeit, zu $\sim 4 \times 10^{-5} M^{-1} sec^{-1}$ bestimmen (Abb. 3).

Die Hydrolyse von Ala₂-pNA in H₂O und D₂O ergibt kinetische Deuterium-Solvent-Isotopieeffekte, die sich, bedingt durch den komplexen Hydrolysemechanismus dieser Verbindung, nur bei Lyoxid-Konzentrationen $> 10^{-3} M$ Einzelkonstanten nach Gleichung (1) zuordnen lassen. Wir haben aus diesem Grunde bei niedrigen Lyoxid-Konzentrationen $k_b^{H_2O}/k_b^{D_2O}$ so berechnet, dass identische XO^- -Konzentrationen vorliegen und zusätzlich den Solvent-Isotopieeffekt auf das $[R-NH_2]/[R-NH_3^+]$ -Verhältnis des Substrates angeben (Tabelle 2).

In Tabelle 2 sind ausserdem die sekundären kinetischen Deuteriumisotopieeffekte der Hydrolyse von L-Ala-L-Ala-2-4-nitroanilid im Bereich der

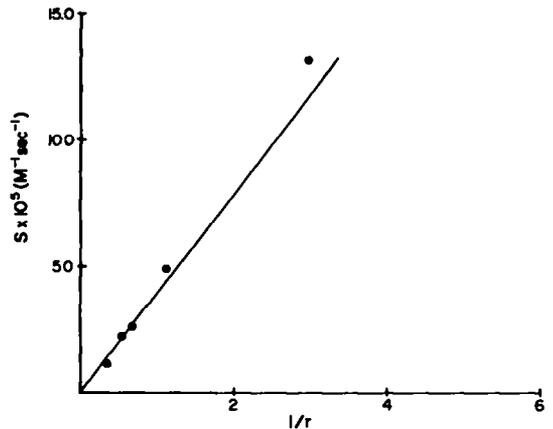


Abb. 3. Bestimmung der Katalysekonstanten für H₂N-Glycin und H₃N⁺-Glycin bei der Hydrolyse von Ala₂-pNA (30°C; $\mu = 1.0$ (KCl)). $r = [H_3N^+Gly]/[H_2N-Gly]$; $S =$ Anstieg des linearen k_b vs $[H_3N^+Gly]$ -Plots bei konstantem Pufferverhältnis r (pK_a (30°C, Glycin) = 9.65).¹⁹ $k_{H_2N-Gly} \sim 4 \times 10^{-5} (M^{-1} sec^{-1})$; $k_{H_3N-Gly} \leq 1 \times 10^{-6} (M^{-1} sec^{-1})$.

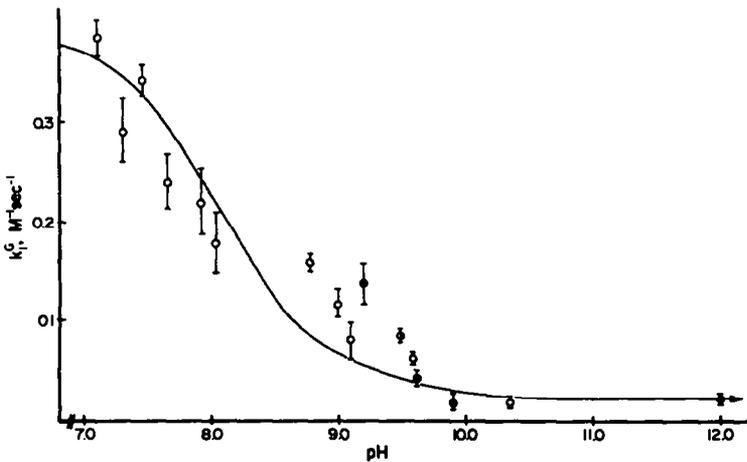


Abb. 2. Abhängigkeit der Hydroxylionen-Additionsgeschwindigkeit k_1^O von Ala₂-pNA vom pH-Wert. Die ausgezogene Kurve wurde nach der Gleichung: $k_1^O = k_1^{NH_3^+}[-NH_3^+] + k_1^{NH_2}[-NH_2]$ ($k_1^{NH_3^+} = 0.4 M^{-1} sec^{-1}$; $k_1^{NH_2} = 0.023 M^{-1} sec^{-1}$; $pK_a = 8.08$) berechnet. Katalysator: ●, HO⁻; ○, Imidazol; ○, Prolin; ○, Morpholin.

Tabelle 2. Kinetischer Deuterium-Solvent-Isotopieeffekt der Hydrolyse von Ala₂-pNA und sekundärer kinetischer Isotopieeffekt bei der Hydrolyse von Ala-Ala-2-d₁-pNA (30°C; μ = 1.0 (KCl))

pH bzw pD†	k _b ^H /k _b ^{D‡}	k _b ^D /[DO] [§]	k _b ^H /[HO ⁻]	k _H ^{HO} /k _D ^{DO}	[-NH ₂] ^{H²O} /[-ND ₂] ^{D²O} ¶
13.38	4.7	3.49 × 10 ⁻²	2.23 × 10 ⁻²	0.64	—
13.22	4.9	3.41 × 10 ⁻²	2.30 × 10 ⁻²	0.67	—
12.88	4.6	3.62 × 10 ⁻²	2.25 × 10 ⁻²	0.62	—
12.51	7.0	2.48 × 10 ⁻²	2.34 × 10 ⁻²	0.94	—
11.71	7.8	1.65 × 10 ⁻²	1.75 × 10 ⁻²	1.06	—
11.22	7.3	1.33 × 10 ⁻²	1.32 × 10 ⁻²	1.00	1.00
9.70	4.3	1.9 × 10 ⁻²	1.12 × 10 ⁻²	0.58	1.05
8.74	4.0	6.33 × 10 ⁻²	3.88 × 10 ⁻²	0.53	1.40
7.98	3.2	1.17 × 10 ⁻¹	5.01 × 10 ⁻²	0.43	2.25
11.10	1.05 ± 0.04 [¶]				
11.80	1.06 ± 0.04				

†pD = pH + 0.37 bei 30.0°C (μ = 1.0).²⁰

‡pK_a^{-ND⁻} = 13.09 (in D₂O).

§lg a^{DO} = pK_{D₂O} - pD; pK_{D₂O}^{30.0°C} = 14.70.²¹

¶pK_a(Ala₂-pNA) in D₂O = 8.59.

[¶]k_b(Ala₂-pNA)/k_b(Ala-Ala-2-d₁-pNA); jeweils 12 Reproduktionen; K_a^{-NH}(Ala₂-pNA)/K_a^{-NH}(Ala-Ala-2-d₁-pNA) = 1.00.

Hydroxylionenkatalyse des Zerfalls des Intermediates (I) niedergelegt.

DISKUSSION

Die pH-Profile der Hydrolyse von Ala-pNA und Pro-pNA weisen aus, dass die protonierte Form dieser Substrate nur eine geringfügige Steigerung der Hydrolyserate zeigt (Abb. 1 und 2). Dieses Verhalten ist unerwartet, da die Steigerung der alkalischen Hydrolysegeschwindigkeit von positiv geladenen Carbonsäureestern gegenüber den neutralen Formen beträchtlich ist und eingehend untersucht wurde.²³⁻²⁵

Mit zunehmender Entfernung der positiven Ladung vom Reaktionszentrum nimmt der beschleunigende Effekt ab, ist aber auch bei β-Alanin-methylester

(k_{EH}⁺/k_E = 51) und ε-H₃N⁺-Lysinmethylester (k_{EH}⁺/k_E = 2.7) noch deutlich.¹⁵ Holmquist und Bruice²⁶ korrelieren k_{HO}⁻ für die basekatalysierte Hydrolyse von X-CH₂-COOC₂H₅ linear mit Chartons σ_r-Werten (ρ = 3.89), wobei geladene CH₂-X-Reste nicht von der Korrelation abweichen.

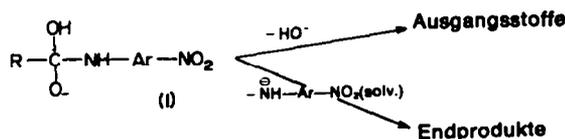
Im Falle der α-Aminosäureanilide muss das inerte Verhalten der Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber der NH₂-Protonierung im Mechanismus begründet sein. Während der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Esterhydrolyse die Hydroxylionen-Anlagerung ist (k_{HO}⁻ ~ k₁),²⁷ finden wir bei pH-Werten < 10 im Falle von Ala-pNA und Pro-pNA k_{HO}⁻ = k₁k₂/(k₋₁ + k₂). Glycinäthylester (NH₂-Form) hydrolysiert ca. 6 mal schneller als Äthylacetat bei 25°C;²⁸ ein ähnliches Verhältnis beobachtet man, wenn k₁ in p-Nitroacetanilid mit dem in H₂N-Ala-pNA verglichen wird (k₁ > CH-NH₂/k₁^{-CH₃} = 4.3).

Zumindest für k₁ muss damit auch bei den Aniliden mit einer den Estern entsprechenden Beschleunigung gerechnet werden, wenn der Acylsubstituent protoniert. Das von Hay und Morris¹⁵ gefundene Verhältnis k_{EH}⁺/k_E = 73 könnte einen oberen Grenzwert für Ala-pNA darstellen. Für Ala₂-pNA lässt sich k₁^{AH⁺}/k₁^A = 17.4 direkt messen (Abb. 4). Obwohl die Weiterleitung elektronischer Effekte über eine zwischengeschaltete Amidgruppe hinweg nicht widerspruchsfrei²⁹ geklärt ist, nehmen wir für die Beschleunigung der Hydroxylionen-Addition an diese Verbindung induktive, über die Bindungen hinweg wirksame Einflüsse der H₂N-Gruppe

an. Diese Auffassung wird durch ¹³C-NMR-Untersuchungen an Glycyl-sarkosin gestützt. Protonierung der Glycyl-NH₂-Gruppe führt zu beachtlichen Änderungen des Sarkosin-Carboxylat ¹³C-Shifts.³⁰

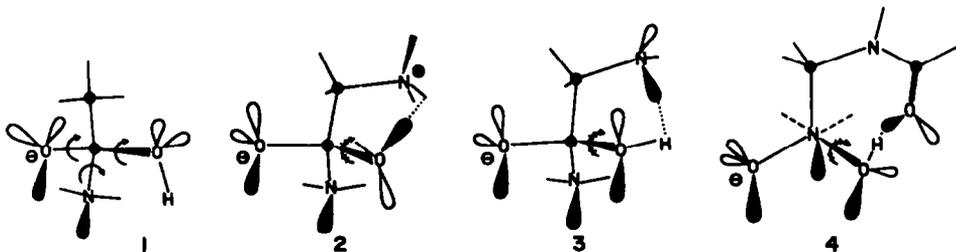
Nehmen wir für Ala-pNA an, dass k₁^{AH⁺}/k₁^A ~ k_{EH}⁺/k_E = 73 beträgt, so muss in H₂N-Ala-pNA k₂/k₋₁ drastisch reduziert sein, damit die beobachtete Hydrolyserate erklärlich wird (k₂/k₋₁ ca. 10⁻²). Für eine solche Veränderung in k₂/k₋₁ in der Nachbarschaft positiv geladener Zentren gibt es Hinweise. Trialkylammoniumacetamid-Kationen liegen in ihrem k₂/k₋₁-Verhältnis um ca. 10 mal niedriger als eine Reihe ähnlich acylsubstituierter Amide.³¹

Normalerweise ist k₂/k₋₁ sehr intensiv gegenüber Einflüssen des Acylrestes,^{6,31} da dieser sowohl die Abspaltung des Hydroxylions unter Rückbildung des Anilids als auch die Bildung des H-gebrückten Produktes ⁻NH-Ar-NO₂³² gleichermassen verändert. So unterscheiden sich zwar die induktiven Eigenschaften des Acylsubstituenten in 4-Nitro-dichloracetanilid und 4-Nitroacetanilid sehr stark, ohne aber k₂/k₋₁ zu verändern (Tabelle 1). Die Ursache für die Sonderstellung der Ammoniumstruktur in der Reihe der Acylsubstituenten könnte in den stereoelektronischen Eigenschaften des Intermediates (I) liegen.



Die Spaltung von (I) in beide Richtungen kann nur erfolgen, wenn beide am zentralen C-Atom verbleibende Heteroatome das Orbital eines ihrer einsamen Elektronenpaare jeweils antiperiplanar zur spaltenden Bindung ausrichten³³ (Schema 1).

In (I) sind alle Reste am zentralen C-Atom ohne erhebliche Rotationsbarriere frei drehbar, solange R wechselwirkungsinaktiv ist und keine ortho-Substituenten am Phenylrest des Anilidteils auftreten (I). k₂/k₋₁ wird dann ausschliesslich durch die elektronischen Eigenschaften der austretenden Gruppen bestimmt.^{6,11,34} Sobald -NHR bzw. -OH im Hemiorthoamid (I) mit günstig angeordneten Substituenten im Acylrest Wech-



Scheme 1.

selwirkungen eingehen können, entstehen mehr oder weniger ausgeprägte Rotationsbarrieren. Wird durch diese Rotationsbarriere die antiperiplanare Anordnung der Elektronenpaare der OH-Gruppe relativ zur zu lösenden Anilidbindung bevorzugt (Blockierung der antiperiplanaren Stellung des Protons durch intramolekulare H-Brückenbildung) (3) kommt es zu einem höheren k_2/k_{-1} -Verhältnis. Umgekehrt sinkt dieses Verhältnis, wenn ein freies Elektronenpaar durch den Acylsubstituenten fixiert wird (2). Gleiche Überlegungen lassen sich für die Wechselwirkung des Anilidrestes mit einem günstig angeordneten Acylsubstituenten anstellen, wobei die Wirkung auf die austretende HO⁻-Gruppe (k_{-1}) betrachtet wird. k_2/k_{-1} hängt damit unter Umständen von der relativen Stärke der -OH bzw. -NH-Wechselwirkung mit dem Acylsubstituenten ab. Bezogen auf die Hydrolyse der α -Aminosäure-4-nitroanilide lassen sich daraus die Schlussfolgerungen ziehen:

Das hohe Verteilungsverhältnis k_2/k_{-1} bei H₂N-AS-pNA im Vergleich zu strukturverwandten Acyl-4-nitroaniliden kommt durch eine (wenngleich in Wasser sicher schwache) intramolekulare OH...N-Brücke zustande (3). Intramolekulare H-Brücken in β -Aminoalkoholen sind in unpolaren Medien gut untersucht.³⁹

Das niedere k_2/k_{-1} -Verhältnis bei H₂N-AS-pNA kann durch eine konformative Ausrichtung der freien Elektronenpaare der OH-Gruppe durch die positive Ladung an der NR₃-Gruppe erklärt werden (3). Acyliert man die α -Aminogruppe der α -Aminosäureanilide, kommt man zu einer *trans*-Peptidbindung, die ebenfalls als starker H-Brückenakceptor bekannt ist.³⁵ Diese N-Aminoacylaminosäurederivate sind Verbindungen, für die besondere Hydrolysemechanismen über Oxazolion-Intermediate bekannt sind, wenn die austretende OR-Gruppe einen $pK_a < 11$ aufweist. *p*-Nitroanilin ist in dieser Hinsicht ein schlecht austretender Rest ($pK_a = 18.37$); ein Oxazolionmechanismus der Hydrolyse ist nicht zu beobachten. k_2/k_{-1} in acylierten α -Aminosäureamiden bleibt infolge der wechselwirkungsaktiven Peptidgruppe über dem Wert, den man bei *p*-Nitroacetanilid oder 4-Nitro-dichloracetanilid findet. Die Geometrie dieser *trans*-Peptidbindung ist allerdings zur Ausbildung der C=O...HO-Brücke nicht optimal, da eine energieergünstige kollinare Anordnung³⁶ zwischen der Hydroxylgruppe und den sp²-hybridisierten freien Elektronenpaaren der Carbonylgruppe nicht möglich ist (4). Fixierung der antiperiplanaren Anordnung der Orbitale durch Ringbildung führt zu einem starken Abspaltungsdruck für den Nitroanilidrest.

Wir haben die Nitroanilidabspaltung an L-Ala-L-Pro-4-

nitroanilid untersucht, das als Prolin-Peptid Anteile an *cis*-Peptidbindungen,^{30,37} enthalten sollte. Die dadurch begünstigte intramolekulare Aminolyse ergibt eine ausserordentlich hohe Spaltungsgeschwindigkeit, welche ein k_2/k_{-1} -Verhältnis um 1 fordert.⁴⁴

In H₃N⁺-Ala₂-pNA ist die H₃N⁺-Gruppe aufgrund ihrer geometrischen Lage nicht mehr fähig, in Wechselwirkung mit den OH-Orbitalen in (I) zu treten, so dass wir ein k_2/k_{-1} -Verhältnis, ähnlich dem von Ac-Ala₂-pNA zu erwarten haben (Tabelle 1). Im Bereich der quadratischen Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der HO⁻-Konzentration gilt der Mechanismus (Schema 2):

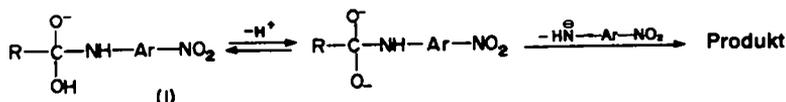
Eine antiperiplanare Anordnung der O⁻-Orbitale zur zu lösenden C-N-Bindung ist leicht möglich; die Reaktion läuft nicht mehr unter stereoelektronischer Kontrolle ab. Offensichtlich wird k_3/k_{-1} hauptsächlich durch die Acidität der Hydroxylgruppe in (I) bestimmt und hängt damit näherungsweise von induktiven Substituenteneinflüssen ab. Eine signifikante Abweichung für Verbindungen mit wechselwirkungsaktiven Substituenten im Acylrest wird nicht beobachtet³¹ (Tabelle 1). Die im Vergleich zu α -Aminosäure-4-nitroaniliden hohe Suszeptibilität von Ala₂-pNA gegenüber basenkatalysierten Einflüssen (Abb. 1 und 2) im Bereich des Monoanionen-Mechanismus (1), könnte ebenfalls auf der erhöhten OH-Acidität des Intermediates (I) beruhen.

Deuterium-Isotopieeffekte

Der kinetische-Deuterium-Solvent-Isotopieeffekt (KSIE) der Hydrolyse von Ala₂-pNA kann vor allem bei niedrigen pH-Werten nur summarisch ausgewertet werden, da bei der geringen Anzahl an Hydrolysedaten eine Aufspaltung in die kinetischen Konstanten für H₂N-

Ala₂-pNA und für H₃N-Ala₂-pNA besonders in D₂O nicht möglich ist (Tabelle 2). Bei hohen pH-Werten kann der auf identische Lyoxidkonzentrationen bezogene Isotopieeffekt als Mass für k_1^H/k_1^D angesehen werden. Oligopeptid-4-nitroanilide verhalten sich hier analog vielen anderen Hydroxylionen-Additionen an Carbonylgruppen und zeigen einen inversen Effekt⁴¹ ($k_1^H/k_1^D = 0.67$).

Im Bereich der Gültigkeit des Hydrolysemechanismus (Schema 2) ist eine genaue Ermittlung des KSIE für k_3/k_{-1} aus den oben angegebenen Gründen nicht möglich. Bei pH-Werten um 11 wird aber dieser KSIE näherungsweise mit ca. 1.0 erreicht. Kershner und Schowen³² fanden bei *m*-Nitro-N-methyltrifluor-acetanilid einen KSIE von 0.92 und bestätigen damit für ihre Substrate die Gültigkeit von Mechanismus (Schema 2) mit der Abspaltung des solva-



Scheme 2.

tisierten \ominus HH-Ar, bevor im Übergangszustand N-Protonierung einsetzt.

Die Daten für den sekundären kinetischen Isotopieeffekt der Hydrolyse bei Substratdeuterierung am α -C-Atom des an der Anilidbindung beteiligten Acylrestes von Ala₂-pNA wurden im Bereich der Gültigkeit des gleichen Mechanismus gemessen (Tabelle 2). Auch hier sind, verglichen mit identischen Untersuchungen an 4-Nitroacetanilid-d₃,¹³ Hinweise für die Gültigkeit des Dianionenmechanismus abzuleiten. Damit scheint sich zu bestätigen, dass α -Aminosäure-4-nitroanilide und Oligopeptid-4-nitroanilide im Dianionbereich und im Bereich des geschwindigkeitsbestimmenden k_1 analog einfachen acylsubstituierten 4-Nitroaniliden reagieren. Das Verhalten im Zerfallsbereich des Monoanions, also unter physiologischen pH-Bedingungen, scheint dagegen sehr different.

EXPERIMENTELLER TEIL

(a) Substanzen

Peptide wurden nach der Methode der gemischten Anhydride⁴² (Chlorkohlensäureester, N-Äthylmorpholin) unter Verwendung der *tert.* Butyl-oxycarbonyl-Schutzgruppe⁴³ aufgebaut. Die Entfernung der Schutzgruppe in HCl/Eisessig ergab die Hydrochloride der Peptide, die für die Messungen in 1 M KCl gelöst und erst zu diesem Zeitpunkt auf den gewünschten pH-Wert gebracht wurden.

Analytische Daten und ¹H-NMR-Spektren (Varian-HA 100) waren in Übereinstimmung mit der Struktur. Die Reinheit wurde dünnschichtchromatographisch (n-Butanol/Eisessig/Wasser; 4:1:1 v/v) kontrolliert. Totalhydrolyse durch Dipeptidylaminopeptidase IV und unter stark basischen Bedingungen ergab 100 ± 1.1% 4-Nitroanilin als Reaktionsprodukt ($\epsilon_{290}^{290} = 11,900$). L-Ala-2-d₁ wurde aus DL-Acetyl-Ala-2-d₁ durch stereoselektive Abspaltung der Acetylgruppe mittels Schweineieren-Acylase mit einem Deuterierungsgrad am C-2 > 98% erhalten. Imidazol (Merck, z.S. wurde mehrmals aus CHCl₃ umkristallisiert (Fp. 89–90°). Die Ionenstärke wurde mit KCl (VEB Laborchemie Apolda; p.a.) eingestellt, das aus 0.1 M HCl umkristallisiert wurde. H₂O und D₂O (99.7%, Isocommerz, Berlin) waren CO₂-frei und mit Argon gesättigt.

(b) Kinetische Messungen

Hydrolysegeschwindigkeiten wurden anhand der Zunahme an *p*-Nitroanilin spektralphotometrisch bei 390–410 nm gemessen (Perkin-Elmer, M 356). Alle Lösungen wurden bei 30.0 ± 0.2° vortemperiert und bei dieser Temperatur auch im Spektralphotometer vermessen. Zu 3 ml einer 5 × 10⁻⁵ bis 1 × 10⁻² M Anilidlösung wurden unterschiedliche Mengen an KOH gegeben und die Hydrolyse durch die Extinktionszunahme verfolgt. Linearität der log E gegen E₀/t-Auftragung wurde vom ersten

Messpunkt an mindestens drei Halbwertszeiten beobachtet. Bei niedrigen Hydrolysegeschwindigkeiten wurde k_{ob} nach Gleichung (5) ermittelt. $\Delta \epsilon$ ist für die einzelnen Substrate etwas unterschiedlich und zudem leicht pH-Wertabhängig (Tabelle 3).

$$k_{ob} = \Delta E / \Delta t \times C_{\text{Substrat}} \times \Delta \epsilon \quad (5)$$

Der sekundäre Isotopieeffekt bei der Hydrolyse von Ala₂-pNA wurde direkt bei den identischen Konzentrationen an deuteriertem und undeuteriertem Substrat gemessen. Während der Hydrolyse was es bei bestimmten Hydroxyionenkonzentrationen notwendig, den pH-Wert während der Reaktion durch KOH-Zugabe konstant zu halten. Dies wurde durch Kopplung der Küvette mit einer pH-Stat-Apparatur (T 11; ABU 13; Radiometer Kopenhagen) erreicht. Bei der Berechnung der Konstanten der Hydroxyionen-Katalyse wurde stets die Aktivität a^{H^+} benutzt, die über $a^{H^+} = K_w / a^{OH^-}$ zugänglich ist ($pK_w^{30} = 13.83$).²¹

Alle pH-Messungen wurden an einem pH-Meter PHM 26 mit der Glaselektrode G 2222 B und der Kalomelektrode K 4112 (Radiometer) unter Schutzgas (Argon) vorgenommen.

(c) Gleichgewichtskonstanten

Der Dissoziationsgrad des Anilidprotons konnte spektralphotometrisch bei 390 nm anhand der Extinktionszunahme zur Zeit $t = 0$ bei verschiedenen Hydroxyionen-Aktivitäten berechnet werden.

$$K = \frac{[-N^-]}{[-NH^-] \times a^{H^+}} = pK_a^{-NH^-} = pK_w - \lg K \quad (6)$$

$\Delta \epsilon$ des reinen Anilids wurde aus Werten, die bis ca. 70% Umsatz reichten, extrapoliert (Tabelle 3) und zur Berechnung des $[-N^-]/[-NH^-]$ -Verhältnisses im Gleichgewicht herangezogen. Die thermodynamischen Ionisationskonstanten der endständigen H₂N-Gruppe der Oligopeptid-4-nitroanilide wurden aus den Titrationskurven (pH-Stat-Radiometer) errechnet.

LITERATUR

- ¹M. L. Bender und R. J. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4183 (1961).
- ²R. M. Pollack und M. L. Bender, *Ibid.* **92**, 7190 (1970).
- ³S. O. Eriksson, *Acta Pharm. Svecica* **6**, 121 (1969).
- ⁴R. F. Pratt und J. M. Lawlor, *J. Chem. Soc. B*, 230 (1969).
- ⁵F. M. Mader, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3191 (1965).
- ⁶R. M. De Wolfe und R. C. Newcomb, *J. Org. Chem.* **36**, 3870 (1971).
- ⁷R. M. Pollack und T. C. Dumsha, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 377 (1975).
- ⁸U. Meresaar und S. O. Eriksson, *Acta Chem. Scand.* **26**, 4186 (1972).
- ⁹S. S. Biechler und R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4927 (1957).

Tabelle 3.

Substrat	Fp(°C)†	[α] _D ‡	$\Delta \epsilon_S \times 10^{-4}$ §	$\Delta \epsilon_{NH} \times 10^{-3}$ ¶
L-Ala-4-nitroanilid·HCl	204–217	+8.76	1.13	6.94
L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid·HCl	254–258	-54.48	1.14	7.56
L-Ala-L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid·HCl	203–206	-48.35	1.14	8.48
Acetyl-L-Ala-L-Ala-4-nitroanilid	282–284	-30.71	1.15	7.58
L-Phe-L-Ala-4-nitroanilid·HCl	223–225	-57.20	1.15	8.15
L-Pro-4-nitroanilid·HCl	234–248	-37.12	1.12	7.37
L-Ala-L-Ala-2-d ₁ -4-nitroanilid·HCl	243–250	-61.02	1.14	—

†Unkorrigiert.

‡c^{1%} in Äthanol.

§Differenz der Extinktionskoeffizienten von Substrat und Produkt (390 nm).

¶Extrapolierte Differenz der Extinktionskoeffizienten zwischen der -CO-NH-Ar-NO₂-Form und der -CO-N⁻-Ar-NO₂-Form des Substrates (390 nm).

||c^{1%} in DMSO.

- ¹⁰R. Kluger und C. H. Lam, *Ibid.* **97**, 5536 (1975).
¹¹C. E. Stauffer, *Ibid.* **94**, 7887 (1972).
¹²S. Drake, R. L. Schowen und H. Jayaraman, *Ibid.* **95**, 454 (1973).
¹³G. Küllertz, G. Fischer und A. Barth, *Tetrahedron* **32**, 759 (1976).
¹⁴G. Fischer, G. Küllertz, A. Barth und R. Rashid, *Z. Chem.* im Druck.
¹⁵R. W. Hay und P. J. Morris, *J. Chem. Soc. B*, 1577 (1970).
¹⁶R. W. Hay und L. J. Porter, *Ibid.* 1261 (1967).
¹⁷S. O. Eriksson und C. Holst, *Acta Chem. Scand.* **20**, 1892 (1966).
¹⁸R. M. Pollack, *J. Org. Chem.* **39**, 2109 (1974).
¹⁹E. J. King, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 155 (1951).
²⁰A. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 947 (1975).
²¹R. Bates, R. A. Robinson und A. K. Covington, *J. Chem. Educ.* **44**, 635 (1967).
²²C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.* 1375 (1930).
²³R. P. Bell und G. A. Wright, *Trans. Faraday Soc.* **57**, 1377 (1961); R. P. Bell und M. Robson, *Ibid.* **60**, 893 (1964); R. P. Bell und B. A. Collier, *Ibid.* **61**, 1445 (1965).
²⁴G. Aksnes und P. Froyen, *Acta Chem. Scand.* **21**, 1507 (1967); G. Aksnes und P. Froyen, *Ibid.* **20**, 1451 (1966).
²⁵B. Hansén, *Acta Chem. Scand.* **17**, 1481 (1963).
²⁶B. Homquist und T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2982 (1969).
²⁷S. L. Johnson, *Adv. Phys. Org. Chem.* **5**, 275 (1967); W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw-Hill, New York (1969).
²⁸R. W. Hay, L. J. Porter und P. J. Morris, *Austral. J. Chem.* **19**, 1197 (1966).
²⁹F. B. Peters und H. W. Johnson, Jr., *J. Org. Chem.* **40**, 1517 (1975); J. P. Idoux und R. Zarrillo, *Ibid.* **40**, 1519 (1975).
³⁰C. A. Evans und D. L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7312 (1974).
³¹U. Meresaar und L. Bratt, *Acta Chem. Scand. A*, **28**, 715 (1974).
³²L. D. Kershner und R. L. J. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4183 (1971).
³³P. Deslongchamps, *Tetrahedron* **31**, 2463 (1975).
³⁴F. M. Menger und J. A. Donohue, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 432 (1973).
³⁵S. N. Vinogradov und R. H. Linell, *Hydrogen bonding*, van Nostrand, Reinhold (1971).
³⁶P. Schuster, *Z. Chem.* **13**, 41 (1973); W. A. P. Luck, *Naturwissenschaften* **54**, 601 (1967).
³⁷C. M. Deber, F. A. Bovey, J. P. Carver und E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 6191 (1970).
³⁸E. A. Guggenheim, *Phil. Mag.* **2**, 538 (1926).
³⁹M. Tichy, *Adv. Org. Chem.* **5**, 115 (1965).
⁴⁰J. de Jersey, P. Willadsen und B. Zerner, *Biochemistry* **8**, 1959 (1969); A. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 947 (1975).
⁴¹V. Gold und S. Grist, *Ibid.* **89** (1972).
⁴²E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **732**, 188 (1967).
⁴³G. W. Anderson und A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6180 (1975).
⁴⁴G. Fischer, unveröffentlicht.