

Modellreaktionen zur kooperativen Amid/SH-Katalyse der Esterhydrolyse

Model Reactions of the Concerted Amide-SH Catalysis of Ester Hydrolysis

Dorothee Petz, Friedhelm Schneider
und Hans-Georg Löffler

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Marburg,
Marburg

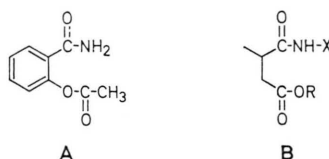
Z. Naturforsch. **33 c**, 151–155 (1978);
eingegangen am 3. Januar 1978

Model Reactions, Ester Hydrolysis, Amid/SH-Catalysis

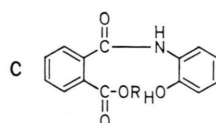
An enhancement of the rate of hydrolysis of certain methyl esters by cooperative effects of neighbouring amide and SH groups is demonstrated. The rate of hydroxyl ion catalyzed hydrolysis of the most reactive ester exceeds the rate of saponification of simple aliphatic esters by a factor of about 10^3 . A mechanism of the saponification reactions involving intermediate cyclic imide formation is proposed.

Die am häufigsten in den Enzymproteinen vorkommende funktionelle Gruppe ist die Peptid- oder Säureamidbindung. Gehen wir davon aus, daß ein wesentliches Merkmal der Enzymkatalyse die Reaktionsbeschleunigung durch concertierte Aktion ideal benachbarter funktioneller Gruppen ist [1, 2], so ergibt sich die Frage, ob auch Peptidbindungen am katalytischen Prozeß beteiligt sein könnten und nicht nur funktionelle Gruppen der trifunktionellen Aminosäuren wie Histidin, Serin, Cystein u. a.

Modellreaktionen zur Enzymkatalyse haben gezeigt, daß Säureamidgruppen in einer nucleophilen Katalyse aktiv werden können [3, 4]; hier ist vor allem die durch eine benachbarte Amidgruppe intramolekular katalysierte Esterhydrolyse im Acetylsalicylamid zu erwähnen [5]. Das Studium dieser Reaktion zeigte, daß im Vergleich zu der durch Acetamid intermolekular katalysierten Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat unter gleichen Bedingungen die Hydrolyse des Acetylsalicylamids (A) durch intramolekulare Katalyse um den Faktor 60 000 beschleunigt wird [5]. Die am Salicylsäureamid durchgeführten Untersuchungen wurden bald auf Derivate der Phthalsäure und Asparaginsäure ausgedehnt, die sich durch folgende allgemeine Formel darstellen lassen (B) [6, 7]:



Dabei zeigte sich, daß die Einführung einer OH-Gruppe mit dem Substituenten X unter bestimmten Bedingungen zu einer weiteren erheblichen Beschleunigung der Esterhydrolyse führte, deren Geschwindigkeit bei optimaler Orientierung und Fixierung der in Wechselwirkung tretenden Gruppen die höchsten Werte erreichte, die man bei Esterhydrolysen überhaupt gemessen hat; so wurde für die Verbindung C



eine Geschwindigkeitskonstante der OH-katalysierten Esterhydrolyse bei 25° in der Nähe des Neutralpunktes von 3×10^5 [mol⁻¹ × min⁻¹] gefunden [7], während derselbe Wert für Propionsäureäthylester im Bereich von 1–2 [mol⁻¹ × min⁻¹] liegt [8].

Wir berichten in der vorliegenden Arbeit über Experimente, die den Einfluß ideal benachbarter Säureamid- und SH-Gruppen auf die Geschwindigkeit der Esterhydrolyse in Verbindungen vom Typ C (SH statt OH) zum Gegenstand haben, wobei die Abstände und der Grad der Fixierung der interagierenden Gruppen variiert wurden.

Material und Methoden

Die Synthese der Verbindungen I–IV [N-(*o*-Carbomethoxy-benzoyl)-*o*-aminothiophenol, N-(*o*-Carbomethoxy-benzoyl)-cysteinyl-amid, Z-asparagyl- α -cysteinylamid- β -methylester, Z-glutamyl- γ -cysteinylamid- α -methylester] ist in loc. cit. [9] beschrieben. Die Reduktion der entsprechenden Disulfide, deren analytische Daten in Tab. I aufgeführt sind, erfolgte mit Merkaptoäthanol. Nach Umkristallisation wurde der SH-Gehalt mit Ellmans Reagenz [10] bestimmt. Alle Produkte wurden dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft. Anfärbung der Chromatogramme erfolgte mit Chlor-Tolidin [11] und Ellmans Reagenz.

Die CHN-Analysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg ausgeführt.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Marburg, Lahnberge, D-3550 Marburg.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Bestimmung der pK-Werte der SH-Gruppen erfolgte durch photometrische Titration bei 220 – 240 nm nach Benesch und Benesch [12].

Kinetische Messungen

Die Hydrolysegeschwindigkeit der Ester wurde mit der pH stat Methode verfolgt. Die Messungen erfolgten in 5 ml 0,1 N NaCl, Esterkonzentration 4×10^{-4} M unter Argonschutz mit 0,1 N NaOH als Titrant. Die Hydrolyse wurde bis zu 2/3 der vollständigen Umsetzung verfolgt, da wegen der Schwierigkeiten der Endwertbestimmung die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten des Alkaliverbrauchs nach dem Verfahren von Guggenheim [13] erfolgte. Stammlösungen der Ester wurden in Methanol angesetzt; der Methanolgehalt im Ansatz lag in allen Fällen <10%. Die Messungen wurden mit dem pH stat von Radiometer, bestehend aus Titrator TTT 11, Motorburette AB 11, Schreiber SBR 2 c, Einstabmeßkette Metrohm EA 147 U oder Mikro-zweistabmeßkette Radiometer mit Glaselektrode G 2222 C und Kalomelektrode K 4112, durchge-

führt. Als Thermostat wurde ein Kryomat MWG Lauda K 2 RD oder MWG Lauda WB 2058 verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Struktur und analytische Daten der Disulfide der untersuchten Ester sind in Tab. I zusammengefaßt. Da die entsprechenden, durch Reduktion mit Merkaptoäthanol aus ihnen erhaltenen SH-Verbindungen, deren pK_{SH}-Werte ebenfalls in die Tabelle aufgenommen wurden, oxidationsempfindlich sind, wurden diese nach Bestimmung des SH-Gehaltes und dünnstichtchromatographischer Prüfung sofort zur Messung der Geschwindigkeit der Esterhydrolyse eingesetzt. Die pH- und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der Hydrolyse der untersuchten Ester sind in Abb. 1 dargestellt. Bei pH 10 und 25° finden wir die folgenden Hydrolysekonstanten für **I** $4,5 \times 10^{-2}$ [min⁻¹]; **II** $2,0 \times 10^{-2}$ [min⁻¹]; **III** $6,1 \times 10^{-2}$ [min⁻¹] und **IV** $0,4 \times 10^{-2}$ [min⁻¹]. Aus diesen Konstanten geht hervor, daß sich die Hydrolysegeschwindigkeit

Tab. I. Formeln und analytische Daten der Disulfite.

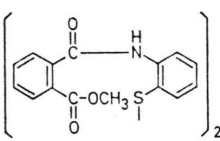
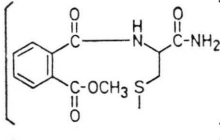
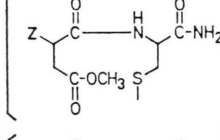
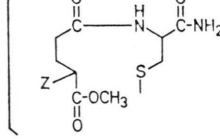
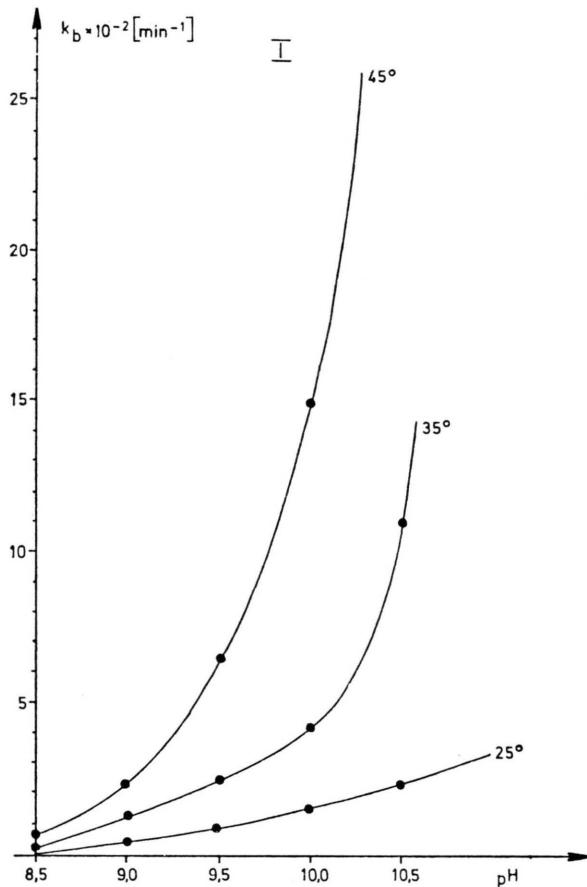
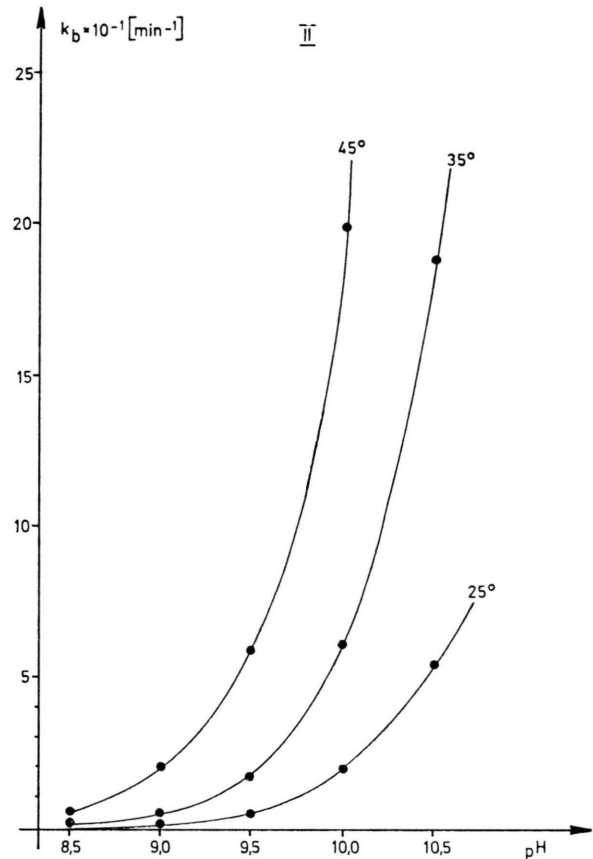
Disulfid	Analysen	Schmelzpunkt [°C]	pK _{SH} -Werte und relative Hydrolysegeschwindigkeiten der entsprechenden SH-Verbindungen bei pH 10 und 25 °C	
			pK _{SH} 25 °C	relative Hydrolysegeschwindigkeit Essigsäuremethylester = 1
 I	C ₃₀ H ₂₄ N ₂ O ₆ S ₂ (572,7) Ber. C 62,92 H 4,22 N 4,89 Gef. C 62,90 H 4,19 N 4,85	125	8,5	68
 II	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₈ S ₂ (562,6) Ber. C 51,23 H 4,66 N 9,96 Gef. C 51,24 H 4,41 N 9,67	176	~9,0	890
 III	C ₃₂ H ₄₀ N ₆ O ₁₂ S ₂ (764,9) Ber. C 50,26 H 5,23 N 10,99 Gef. C 50,17 H 5,13 N 10,91	152	9,05	270
 IV	C ₃₄ H ₄₄ N ₆ O ₁₂ S ₂ (792,9) Ber. C 51,50 H 5,59 N 10,60 Gef. C 51,06 H 5,55 N 10,50	210	8,95	17

Abb. 1. pH- und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der Esterhydrolyse von



I N-(o-Carbomethoxy-benzoyl)-o-aminothiophenyl;



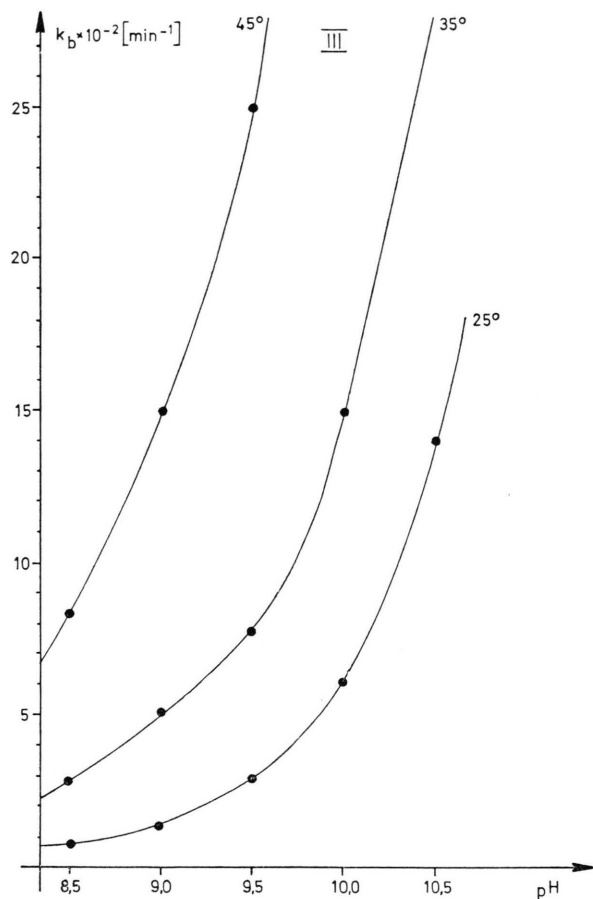
II N-(o-Carbomethoxy-benzoyl)-cysteinylamid;

ten bei pH 10 maximal um den Faktor 50 unterscheiden (Verbindung II und IV), wobei der Glutaminsäure- α -ester IV die geringste Zerfallsgeschwindigkeit zeigt.

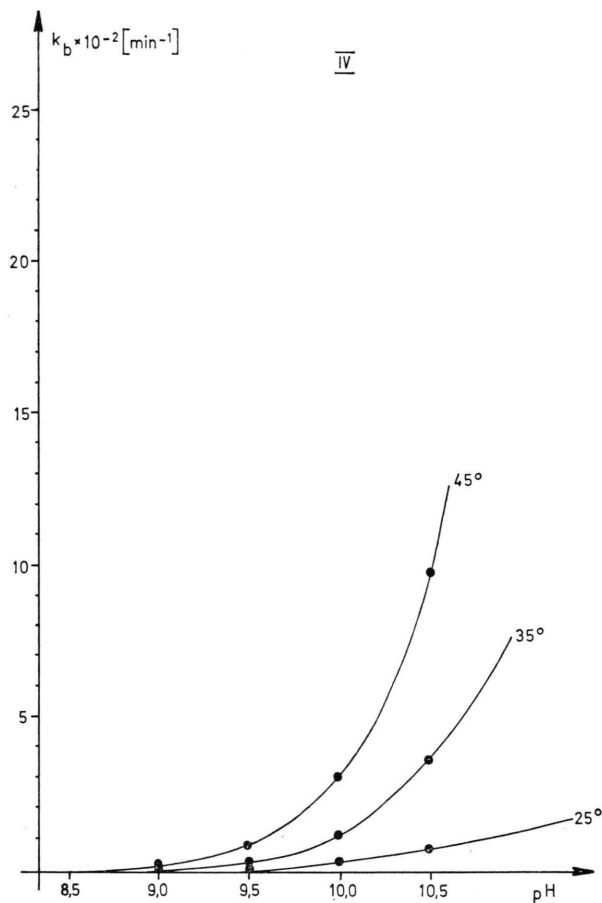
Da ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen Geschwindigkeitskonstanten mit den in der Literatur veröffentlichten Hydrolysekonstanten einfacher Ester wegen der unterschiedlichen Bedingungen (z. B. Gehalt an organischen Lösungsmitteln im Reaktionsansatz) nur bedingt möglich ist, wurde unter unseren Bedingungen die Hydrolysegeschwindigkeit des Chloressigsäureäthylesters gemessen, von dem bekannt ist, daß er 761mal schneller alkalisch gespalten wird als Essigsäuremethylester [14]. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse des Chloressigsäureäthylesters betragen bei pH 10,0 und 25 °C $1,7 \times 10^{-1}$ [min⁻¹], bei pH 9,0 $2,3 \times 10^{-2}$ [min⁻¹]. Mit Hilfe dieser Werte ist ein

direkter Vergleich der Verseifungsgeschwindigkeiten der hier untersuchten Ester I–IV und einfacher aliphatischer Ester möglich. Die relativen Geschwindigkeitskonstanten bezogen auf die alkalische Hydrolyse des Essigsäuremethylesters sind in Tab. I aufgeführt. Aus diesen Zahlen geht hervor, daß z. B. der Ester II etwa 900mal schneller verseift wird als Essigsäuremethylester (und fast 1500mal schneller als Essigsäureäthylester).

Aus einem Vergleich der Hydrolysekonstanten OH und SH analoger Verbindungen geht hervor, daß die OH Gruppe die Spaltung der Ester effektiver katalysiert als die SH Gruppe. So finden wir beispielsweise bei pH 9,0 und 25 °C für Verbindung III eine Hydrolysenkonstante von $1,3 \times 10^{-2}$ [min⁻¹], für die OH analoge Verbindung (Serin statt Cystein) wird eine Konstante von $6,2 \times 10^{-2}$ [min⁻¹] angegeben [6] (Dioxan/0,4 M NaCl =



III Z-asparaginylnl-α-cysteinylamid-β-methylester;

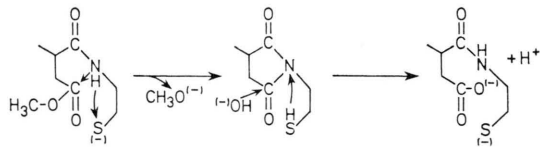


IV Z-glutamyl-γ-cysteinylamid-α-methylester.

1 : 1). Die Unterschiede zwischen den Hydrolysekonstanten von Verbindung I und C sind noch bedeutend größer und lassen sich aufgrund vorliegender Literaturdaten [6, 7] auf zwei Zehnerpotenzen abschätzen.

Die Frage nach der Ursache des Abfalls der Hydrolyserate beim Austausch der OH- gegen eine SH-Gruppe impliziert die Frage nach dem Mechanismus der Esterspaltung in diesen Verbindungen. Dazu liegen für die OH-Analogen von I und III eingehende Untersuchungen vor [6, 7], die zeigen, daß als Intermediat der Esterspaltung ein cyclisches Imid auftritt, dessen Bildung und Hydrolyse einer allgemeinen Säure oder Basenkatalyse durch die OH-Gruppe unterliegt. Da die Bildung des cyclischen Imids unter alkalischen Bedingungen auch unabhängig vom Vorhandensein der OH-Gruppe (wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit) erfolgt [6], gehen

wir davon aus, daß auch in den Verbindungen I–IV ein Imid als Zwischenprodukt auftritt, dessen Bildung und Zerfall bei unseren Estern durch die SH-Gruppe katalysiert wird:



Bei Verbindung IV tritt ein Glutarimidderrivat auf, dessen Bildung langsamer erfolgt [15], als die des Succinimids; daher die niedrige Hydrolyserate bei diesem Ester. Da das Thiolation eine geringere Basizität und Neigung zur Bildung von H-Brücken zeigt als das Phenolat bzw. Alkoholation, ist verständlich, daß es die Esterspaltung weniger effektiv katalysiert; außerdem behindert seine größere Raumerfüllung im Vergleich zum Sauerstoff die op-

timale Orientierung der Reaktanden, z.B. in Verbindung **I**, was für die große Differenz der Hydrolysekonstanten der Sauerstoff- und Schwefelanalogen **C** und **I** mitverantwortlich sein dürfte. Die Beteili-

gung der SH-Gruppe an der Esterspaltung läßt sich leicht durch ihre Methylierung demonstrieren, wodurch die Hydrolysekonstanten bis zu zwei Größenordnungen abfallen.

- [1] D. E. Koshland, Jr., K. W. Carraway, G. A. Dafforn, J. D. Gass u. D. R. Storm, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology **36**, 13 (1971).
- [2] Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes; Biochemical Society Symposium No. 31, R. M. Smellie, ed.), Academic Press, London 1970.
- [3] T. C. Bruice u. St. Benkovic, Biorganic Mechanisms, S. 187–200, W. A. Benjamin, Inc., New York 1966.
- [4] W. P. Jencks, Catalysis in Chemistry and Enzymology, S. 24, McGraw-Hill Book Company, New York 1969.
- [5] M. T. Behme u. E. H. Cordes, J. Org. Chem. **28**, 1255 (1964).
- [6] S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela u. Y. Shalitin, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 2421 (1962).
- [7] Y. Shalitin u. S. A. Bernhard, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 2291 (1964).
- [8] Tables of Chemical Kinetics, U.S. Natl. Bureau of Standards Circular No. 510, Washington, D.C. 1951, pp. 104, 102.
- [9] D. Petz, Dissertation Marburg 1975.
- [10] G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 (1959).
- [11] F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 (1954).
- [12] R. E. Benesch u. R. Benesch, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 5877 (1955).
- [13] E. A. Guggenheim, Phil. Mag. **2**, 538 (1926).
- [14] L. P. Hammett, Physical Organic Chemistry, S. 211, McGraw-Hill Book Company, New York 1940.
- [15] E. Sondheimer u. R. W. Holley, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 3767 (1957).