

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEgeben von der GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

78. JAHRGANG

NR. 22 · SEITE 993–1028

21. NOVEMBER 1966

Isotopeneffekte in der organischen Chemie und Biochemie

von PROF. DR. H. SIMON UND DR. D. PALM

CHEMISCHES INSTITUT DER FAKULTÄT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND GARTENBAU,
WEIHENSTEPHAN, UND
ORGANISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE MÜNCHEN

Es wird gezeigt, in welchem Maß bei Anwendung der Isotopentechnik mit Isotopeneffekten zu rechnen ist und welche Probleme mit primären und sekundären kinetischen Isotopeneffekten bearbeitet werden. Als Beispiel werden die Untersuchungsergebnisse bei E2-Reaktionen, speziell beim Hofmann-Abbau, diskutiert. Danach werden einige „analytische Isotopeneffekte“ besprochen. Schließlich werden die Probleme und Aussagemöglichkeiten von Isotopeneffekt-Studien bei Enzymreaktionen, u.a. die Vor- und Nachteile des kompetitiven und nicht kompetitiven Arbeitens, erörtert. Neben einer Zusammenstellung von Isotopeneffekten bei Dehydrogenase-Reaktionen werden neue Isotopeneffekte, die bei der Dehydrierung T-markierter Alkohole auftreten, mitgeteilt.

I. Einleitung

Bei der Anwendung stabiler und radioaktiver Isotope als Tracer in der organischen Chemie und Biochemie geht man meist von der Annahme aus, daß sich die verschiedenen schweren Nuklide eines Elements gleich verhalten, d.h. daß bei chemischen oder physikalischen Operationen keine Diskriminierung markierter und nicht markierter Moleküle stattfindet. Bei quantitativer Untersuchung beobachtet man derartige Diskriminierungen aber mehr oder weniger deutlich. Diese Iso-

- [1] J. Bigeleisen u. M. G. Mayer, *J. chem. Physics* 15, 261 (1947).
- [2] S. S. Roginski: Theoretische Grundlagen der Isotopenchemie. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1962, S. 1–107.
- [3] J. Bigeleisen u. M. Wolfsberg: *Advances in Chemical Physics*, Vol. I. Interscience Publishers, New York 1958.
- [4] L. Melander: *Isotope Effects on Reaction Rates*. Ronald Press, New York 1960.
- [5] C. J. Collins in V. Gold: *Advances in Physical Organic Chemistry*, Vol. II, Academic Press, New York 1964, S. 60.
- [6] H. Zollinger in V. Gold: *Advances in Physical Organic Chemistry*, Vol. II. Academic Press, New York 1964, S. 163; *Angew. Chem.* 70, 204 (1958).
- [7] P. Baertschi, *Z. naturwiss. med. Grundlagenforsch.* 2, 22 (1964).
- [8] E. A. Halevi in S. G. Cohen, A. Streitwieser jr. u. R. W. Taft: *Progress in Physical Organic Chemistry*, Vol. I. Interscience Publishers, New York 1964, S. 109–221.
- [9] J. Bigeleisen, *Pure appl. Chem.* 8, 217 (1964).
- [9a] K. B. Wiberg: *Physical Organic Chemistry*. Wiley, New York-London-Sydney 1964.

topeneffekte^[1–9a] beruhen überwiegend auf Massenunterschieden der Nuklide und dadurch bedingte Differenzen der Nullpunktenergien der Bindungen (vgl. Abb. 1). In sehr geringem Maß beruhen Isotopeneffekte z.T. auch auf anderen Kerneigenschaften, wie Quadrupolmoment und kernmagnetischem Moment. Die Isotopeneffekte sind um so kleiner, je kleiner der prozentuale Massenunterschied zweier Isotope ist. Die Isotopeneffekte fallen somit bereits bei den Isotopen des Kohlenstoffs meist nicht mehr sehr ins Gewicht. Dagegen muß man sich bei der Anwendung der Wasserstoffisotope stets über den Einfluß von Isotopen-

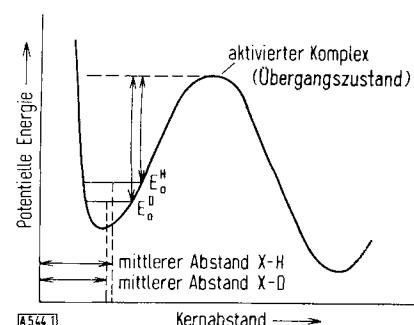


Abb. 1. Potentialkurve einer Molekel HX und des Übergangszustandes. Die Unsymmetrie der Potentialmulde (der Deutlichkeit halber stark überzeichnet) ist der Grund für den im Vergleich zur X—H-Bindung etwas geringeren X—D-Abstand. Die unterschiedlichen Nullpunktenergien E_0^H und E_0^D bedingen für eine Reaktion verschiedene Aktivierungsenergien (Pfeile) und sind die Hauptursache des kinetischen Isotopeneffekts.

effekten Rechenschaft ablegen, da Versuchsergebnisse häufig nur dann gedeutet werden können, besonders, wenn im Verlauf einer Reaktion Bindungen des Isotops selbst oder benachbarte Bindungen gebrochen werden. Die Hauptgründe, weshalb allein 1964 weit mehr als 100 Originalarbeiten sowie mehrere Übersichtsreferate^[5-8] zum Thema „Isotopeneffekte“ veröffentlicht wurden, sind folgende:

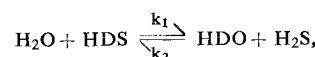
1) Der sogenannte „kinetische“ Isotopeneffekt gestattet die Untersuchung von Reaktionsmechanismen.

Nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit^[9a,b] ist der kinetische Isotopeneffekt gleich dem Quotienten der Gleichgewichtskonstanten der Besetzung des Grund- und Übergangszustandes für die nichtmarkierte und markierte Verbindung (vgl. Abschn. I. 2). Die Berechnung ist daher dann möglich, wenn die Schwingungsfrequenzen des Grundzustandes und des Übergangszustandes der Reaktanden bekannt sind^[3, 4, 9a, 10]. Während man die Frequenzen des Übergangszustandes jedoch nicht kennt, sind die Frequenzen im Grundzustand und der Isotopeneffekt messbar. Dadurch gelangt man zu Aussagen über den Übergangszustand. Wolfsberg und Stern^[10] sowie Willi^[11-13] haben auf Grund der von Bigeleisen und anderen^[1-4] entwickelten Vorstellungen Isotopeneffekte konkreter Übergangszustände theoretisch berechnet. Um den Einfluß der verschiedenen Parameter auf die Größe der rechnerischen Isotopeneffekte rationell ermitteln zu können, wurden Maschinenprogramme entwickelt^[10, 10a].

Die zur Zeit am häufigsten experimentell bearbeitete Fragestellung gilt dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in einer Reaktionsfolge und der Untersuchung, wie weit bei einer Reaktion im Übergangszustand eine Bindung bereits gelöst oder geknüpft ist.

2) Die bei Austauschgleichgewichten beobachteten Gleichgewichts-Isotopeneffekte sind von technologischer Bedeutung für die Isotopentrennung.

So ist^[14] für das Austauschgleichgewicht, das zur Gewinnung von schwerem Wasser verwendet wird,



die Gleichgewichtskonstante bei 25 °C: $k_1/k_2 = K = 2,2$ (dies ist ein extremer Wert, meist liegen die Werte näher bei 1).

Die Kenntnis bzw. Abschätzung von Gleichgewichts-Isotopeneffekten ist auch bei der präparativen Darstellung wasserstoff-markierter Verbindungen sowie bei biochemischen Studien von Interesse. Läßt man biochemische Reaktionsfolgen, z.B. die Glykolyse, in T-markiertem Wasser ablaufen und untersucht den Isotopengehalt von Zwischenprodukten, so unterscheidet sich bei reversiblen Reaktionsschritten, die bis zur Gleichgewichtseinstellung führen, der Isotopengehalt einer Wasserstoffposition an einer bestimmten Stelle im Molekül nur auf Grund eines Gleichgewichts-Isotopeneffekts vom Isotopengehalt des Wassers. Falls die Re-

[9b] A. A. Frost u. R. G. Pearson: Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1964.

[10] M. Wolfsberg u. M. J. Stern, Pure appl. Chem. 8, 225 (1964).

[10a] J. H. Schachtschneider u. R. G. Snyder, Spectrochim. Acta 19, 117 (1963).

[11] A. V. Willi, Helv. chim. Acta 47, 647 (1964).

[12] A. V. Willi, Helv. chim. Acta 47, 655, 837 (1964).

[13] A. V. Willi, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 68, 266 (1964).

[14] H. C. Urey, J. chem. Soc. (London) 1947, 562.

versibilität jedoch nicht so weitgehend ist, sind die Isotopengehalte geringer, da bei der Spaltung eines Wasserstoffmoleküls stets ein intramolekularer Isotopeneffekt auftritt, der bei HOD häufig ca. 3,5-4 und bei HOT ca. 7 beträgt (vgl. Abschn. V.4).

Die Verteilung eines Isotops zwischen zwei Molekülen A und B bei der Reaktion $A + B' \rightleftharpoons A' + B$ ist gleich dem Produkt der Quotienten der Verteilungsfunktionen Q im Grundzustand von markierten Molekülen A' bzw. B' und nichtmarkierten A bzw. B und der Nullpunktsenergien des Grundzustands.

$$K = \frac{Q_{A'} \cdot Q_B}{Q_A \cdot Q_{B'}} \cdot \prod^{3n-6} \frac{e^{-1/2u_{A'}}}{e^{-1/2u_A}} \cdot \prod^{3n-6} \frac{e^{-1/2u_B}}{e^{-1/2u_{B'}}}$$

Dabei bedeuten

$u = hv/kT$

h = Plancksches Wirkungsquantum

v = Frequenz der einzelnen Normalschwingungen

k = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

n = Zahl der Freiheitsgrade

Bei den Termen der Nullpunktsenergie erfolgt die Produktbildung über 3n-6 Schwingungsfrequenzen eines jeden Moleküls (3n-5 Frequenzen bei linearen Molekülen).

Falls man für die Verteilungsfunktionen, wie zur Berechnung von Isotopeneffekten üblich, nur Translations-, Rotations- und Schwingungsterme berücksichtigt, ergibt sich:

$$K = \left(\frac{M_{A'} M_B}{M_A M_{B'}} \right)^{3/2} \cdot \frac{(I_x I_y I_z)_{A'}^{1/2} (I_x I_y I_z)_{B'}^{1/2}}{(I_x I_y I_z)_A^{1/2} (I_x I_y I_z)_B^{1/2}} \cdot \prod^{3n-6} \frac{1 - e^{-u(A)}}{1 - e^{-u(A')}} \\ \cdot \prod^{3n-6} \frac{1 - e^{-u(B')}}{1 - e^{-u(B)}} \cdot \prod^{3n-6} \frac{e^{-1/2 u(A')}}{e^{-1/2 u(A)}} \cdot \prod^{3n-6} \frac{e^{-1/2 u(B)}}{e^{-1/2 u(B')}}$$

Dabei bedeuten:

M = Masse der Moleküle

I = Trägheitsmomente um die Achsen x, y und z

Durch Anwendung des Teller-Redlich-Theorems^[*] kann die Gleichung vereinfacht werden, wobei nur noch die Massen M und die Frequenzen v in die Berechnung eingehen.

Bei den in der organischen Chemie und Biochemie üblichen Temperaturen gilt näherungsweise der Ausdruck

$$K = \frac{e^{-\Sigma hv/2kT(A')} \cdot e^{-\Sigma hv/2kT(B')}}{e^{-\Sigma hv/2kT(A)} \cdot e^{-\Sigma hv/2kT(B')}}$$

Für die vollständige Berechnung siehe^[9a, 14a, b].

Es sei darauf hingewiesen, daß zwischen Gleichgewichts-Isotopeneffekten und Reaktionsmechanismen ein enger Zusammenhang besteht. So wird z.B. die Änderung der Geschwindigkeitskonstanten beim Übergang von H_2O zu D_2O als Lösungsmittel säure-base-katalysierter Reaktionen häufig zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Mechanismen herangezogen^[15-20a]. Sichere Schlußfolgerungen sind jedoch

[14a] J. C. Evans u. G. Y. S. Lo, J. Amer. chem. Soc. 88, 2118 (1966).

[14b] J. K. Wilnshurst u. H. J. Bernstein, Canad. J. Chem. 35, 226 (1957).

[*] Siehe z.B. K. S. Pitzer: Quantum Chemistry. Prentice-Hall, New York 1953, S. 275.

[15] R. P. Bell: Acid-Base Catalysis. Oxford University Press, London 1941.

[16] K. B. Wiberg, Chem. Reviews 55, 713 (1955).

[17] F. A. Long u. J. Bigeleisen, Trans. Faraday Soc. 55, 2077 (1959).

[18] A. V. Willi, Z. Naturforsch. 19b, 461 (1964).

[19] A. V. Willi: Säurekatalytische Reaktionen der organischen Chemie. F. Vieweg u. Sohn, Braunschweig 1965.

[20] A. J. Kresge, Pure appl. Chem. 8, 243 (1964).

[20a] H. H. Huang, R. R. Robinson u. F. A. Long, J. Amer. chem. Soc. 88, 1866 (1966).

nur dann möglich, wenn sich theoretisch begründen läßt, in welcher Größenordnung der Isotopeneffekt für einen bestimmten Mechanismus liegen muß. Schließlich kommt den Gleichgewichts-Isotopeneffekten in der Geologie große Bedeutung zu^[21, 22].

3) Wie in Abschnitt V gezeigt wird, haben Isotopeneffekte in der Biochemie bereits große Bedeutung und werden zur tieferen Einsicht in biochemische Mechanismen weiter beitragen.

4) „Analytische Isotopeneffekte“:

Die Anwendung markierter Verbindungen setzt im allgemeinen voraus, daß die Verbindungen durch Umrückraktion, Destillation oder eine Methode der multiplen Verteilung bis zu konstanter spezifischer Radioaktivität gereinigt werden können. Dies ist, bedingt durch Isotopeneffekte, aufgrund nur mehr oder weniger eingestellter Austauschgleichgewichte und kinetische Effekte, mitunter weitgehend unmöglich.

II. Primäre und sekundäre kinetische Isotopeneffekte

1. Primäre Isotopeneffekte

Nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit^[9a, 9b] erhält man bei gegebener Temperatur den maximalen kinetischen Isotopeneffekt bei einem Minimum an Bindungsenergie im Übergangszustand. Betrachten wir aber beispielsweise die Ablösung eines Protons von einem C-Atom durch eine Base, so erfolgt in dem Maße der Lösung des Protons vom C-Atom eine Bindung an die Base B. Der maximale Isotopeneffekt ergibt sich daher bei der sogenannten „Halblösung“: C···H···B.

Ist dagegen im Übergangszustand das Proton noch stärker an das C-Atom (C···H···B) oder bereits stärker an die Base gebunden (C···H···B), so ergeben sich kleinere Isotopeneffekte.

Die rechnerische Behandlung findet sich bei *Westheimer*^[23] und *Bigeleisen*^[9]. Auf Grund theoretischer Überlegungen und Berechnungen kommen jedoch *Willi* und *Wolfsberg*^[23a] zu dem Schluß, daß ein ausgeprägtes Maximum des Isotopeneffekts in Abhängigkeit von Bindungslösung und -bildung im Übergangszustand von der Gestalt des Potentialwalls, der Reaktanden und Produkte trennt, abhängt. Experimente, die dies bestätigen, scheinen noch nicht bekannt zu sein.

Bei Mehrstufen-Reaktionen läßt sich natürlich nur dann ein Isotopeneffekt feststellen, wenn die Bindung des Isotops im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gelöst wird (primärer Isotopeneffekt). Im allgemeinen betragen die maximalen Isotopeneffekte bei der Lösung von Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen bei 0 °C k_H/k_D ^[*]

[21] H. C. Urey, H. A. Lowenstam, S. Epstein u. C. R. McKinney, Bull. geol. Soc. America 62, 399 (1951).

[22] P. Baertschi, Schweiz. mineralog. petrogr. Mitt. 37, 73 (1957).

[23] F. H. Westheimer, Chem. Reviews 61, 265 (1961).

[23a] A. V. Willi u. M. Wolfsberg, Chem. and Ind. 1964, 2097.

[*] Die kinetischen Isotopeneffekte werden meist als Verhältnisse der Geschwindigkeitskonstanten angegeben, wobei der Index die Nuklidart bezeichnet.

= 8,3, bei 25 °C $k_H/k_D = 6,9$, etc.^[4]. Dies gilt jedoch nur, wenn der Protonenübergang ohne Tunneln erfolgt^[24a].

Bei der durch 2,6-Lutidin katalysierten Jodierung von [2-D]-2-Nitropropan wurde z. B. kürzlich bei 25 °C $k_H/k_D = 24$ gemessen, während die gleiche Reaktion, mit Pyridin katalysiert, $k_H/k_D = 9,8$ ergab^[24]. Die Autoren schließen daraus, daß allgemein sterisch gehinderte langsame Protonenübergänge extrem große Isotopeneffekte zeigen können.

Bei der elektrophilen aromatischen Substitution von D oder T beobachtet man meist keine oder nur kleine kinetische Isotopeneffekte^[6]. Liegen besondere sterische Verhältnisse vor, so können jedoch größere Werte auftreten. Bei der durch Silberionen katalysierten Bromierung von 1,3,5-Tri-tert.-butyl-[2-D]-benzol wurde $k_H/k_D \geq 3,6$ ^[26d] gemessen und bei der Bromierung von deuteriertem 2,4-Dibrom-1,3,5-trimethoxybenzol 4,75^[26e]. Bei Oxidationsreaktionen hingegen^[27–32] treten meist Wasserstoff-Isotopeneffekte nahe dem Maximalwert auf.

Für die Umrechnung von Isotopeneffekten mit Deuterium in solche mit Tritium wird häufig die Gleichung

$$\left(\frac{k_H}{k_D} \right)^{1,44} = \frac{k_H}{k_T}$$

verwendet^[25]. (Vgl. jedoch auch^[26].)

Neben den relativ großen Isotopeneffekten der Wasserstoff-Isotope wurden zahlreiche Effekte mit den Nukliden ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O und ^{34}S oder ^{35}S gemessen^[4]. Für $k_{12\text{C}}/k_{13\text{C}}$ sind bei $\text{S}_{\text{N}2}$ -Reaktionen Werte bis 1,086 bei 11 °C^[26a] bekannt geworden; dagegen treten bei $\text{S}_{\text{N}1}$ -Reaktionen nur wesentlich kleinere oder gar inverse Isotopeneffekte auf^[26b]; für $k_{12\text{C}}/k_{14\text{C}}$ können doppelt so große Werte angenommen werden. Bei der Decarboxylierung an der Carboxygruppe ^{14}C -markierter Benzoesäure und ihren Derivaten wurden bei 210 und 238 °C Isotopeneffekte zwischen 1,068 und 1,18

[24] L. Funderburk u. E. S. Lewis, J. Amer. chem. Soc. 86, 2531 (1964).

[24a] V. J. Shiner, jr. u. B. Martin, Pure appl. Chem. 8, 371 (1964).

[25] C. G. Swain, E. C. Stivers, J. F. Reuwer jr. u. L. J. Schaad, J. Amer. chem. Soc. 80, 5885 (1958).

[26] J. Bigeleisen in: Tritium in the Physical and Biological Sciences, Vol. I. Internat. Atomic Energy Agency, Wien 1962, S. 161.

[26a] K. R. Lynn u. P. E. Yankwich, J. Amer. chem. Soc. 83, 790, 3220 (1961).

[26b] A. J. Kresge, N. N. Lichtin u. K. N. Rao, J. Amer. chem. Soc. 85, 1210 (1963).

[26c] M. Roessler u. H. Koch, Radiochim. Acta 4, 12 (1965).

[26d] G. Illuminati u. F. Stegel, Ric. sci., Parte II, Sez. A 7, 460 (1964); Chem. Abstr. 63, 5466c (1965).

[26e] E. Helgstrand, Acta chem. scand. 19, 1583 (1965).

[27] W. P. Jencks in A. F. Scott: Survey of Progress in Chemistry, Vol. I. Academic Press, New York 1963.

[28] R. Stewart: Oxidation Mechanisms Application to Organic Chemistry. W. A. Benjamin, Inc., New York-Amsterdam 1964.

[29] K. B. Wiberg u. P. A. Lepse, J. Amer. chem. Soc. 86, 2612 (1964).

[30] O. H. Wheeler, Canad. J. Chem. 42, 706 (1964).

[31] D. G. Hoare u. W. A. Waters, J. chem. Soc. (London) 1964, 2560.

[32] A. J. Green, T. J. Kemp, J. S. Littler u. W. A. Waters, J. chem. Soc. (London) 1964, 2722.

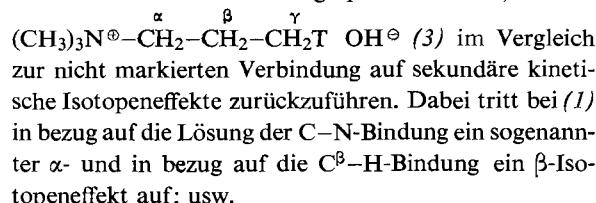
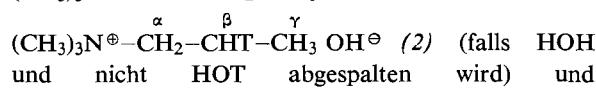
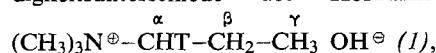
gemessen [26c]. Nach *Bigeleisen* und *Wolfsberg*^[3] wäre maximal 1,057 zu erwarten gewesen. Die meisten bis jetzt bekannten Werte für (k_{14N}/k_{15N}) sind <1,03.

Weitere Reaktionstypen, bei denen primäre Isotopeneffekte an den Nukliden D, T, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁴S gemessen wurden, sind Solvolyse-, Decarboxylierungs-, Eliminierungs-, Fragmentierungs- und Isomerisierungsreaktionen^[4]. Über Isotopeneffekte bei der monomolekularen Zersetzung einfacher Alkane und Alkyradikale gibt es ebenfalls eine Übersicht^[32a]. Als Beispiel für Isotopeneffekte bei metallkatalysierten Reaktionen sei die Zersetzung deuterierter Ameisensäuren erwähnt^[32b].

2. Sekundäre Isotopeneffekte

Eine ausführliche und kritische Behandlung des sekundären Isotopeneffekts wurde von *Halevi*^[8] und anderen^[33] publiziert. Beim sekundären Isotopeneffekt werden entweder überhaupt keine Bindungen der fraglichen Isotope gelöst, oder nicht im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Auch hier kann man zwischen Gleichgewichts- und kinetischen Isotopeneffekten unterscheiden.

So ist der Unterschied in den Dissoziationskonstanten von $C_6H_5-CH_2-COOH$ und $C_6H_5-CD_2-COOH$ ($K_H/K_D = 1,12$) ein sekundärer Gleichgewichts-Isotopeneffekt. Ganz entsprechend ist $C_6H_5-CD_2-NH_2$ eine stärkere Base als $C_6H_5-CH_2-NH_2$ ($K_a^H/K_a^D = 1,13$)^[34]. Die Größe der Werte scheint nicht völlig sicher zu sein, und für Essigsäure und [2,2,2-D₃]-Essigsäure wurden Isotopeneffekte zwischen 1,06^[34] und 1,03^[34a] angegeben. Dagegen sind z.B. die Geschwindigkeitsunterschiede des Hofmann-Abbaus von



Von *Halevi*^[8] wird, zurückgehend auf *Streitwieser*^[34b], zwischen sekundären Isotopeneffekten erster und zweiter Art unterschieden. Als Kriterium hierfür gilt, ob die Isotopenbindung durch die Reaktion eine andere

[32a] B. S. Rabinovitch u. D. W. Setser in W. A. Noyes jr., G. S. Hammond u. J. N. Pitts jr.: Advances in Photochemistry, Vol. 3. Interscience Publishers 1964, S. 1–82.

[32b] G. M. Schwab u. A. M. Watson, Trans. Faraday Soc. 60, 1833 (1964).

[33] R. E. Weston jr. in: Annual Reviews of Nuclear Science. Annual Reviews, Inc., Palo Alto 1961, S. 439.

[33a] H. C. Brown u. G. J. McDonald, J. Amer. chem. Soc. 88, 2514 (1966); H. C. Brown, M. E. Azzaro, J. G. Koelling u. G. J. McDonald, ibid. 88, 2520 (1960).

[34] E. A. Halevi u. M. Nussin, Bull. Res. Council Israel Sect. A 5, 263 (1956); J. chem. Soc. (London) 1963, 866.

[34a] M. Paabo, R. G. Bates u. R. A. Robinson, J. physic. Chem. 70, 540 (1966).

[34b] A. Streitwieser jr., R. H. Jagow, R. C. Fahey u. S. Suzuki, J. Amer. chem. Soc. 80, 2326 (1958).

räumliche Orientierung erhält oder nicht. Z.B. wäre der Übergang eines deuterium-substituierten C-Atoms von sp³- zu sp²-Hybridisierung ein Effekt erster Art, ebenso der Hoffmann-Abbau von (1) und (2); dagegen wäre der Abbau von (3) ein Effekt zweiter Art.

Da bei Deuteriummarkierung häufig z. B. eine Methylgruppe völlig deuteriert ist, werden die Isotopeneffekte meist auf 1 D bezogen (z. B. $\Delta \Delta F = \left[\frac{RT}{n} \ln \frac{k_H}{k_D} \right]$, wobei n die Zahl der D-Atome pro Molekül ist).

Von *Collins*^[35] wurde auch ein Beispiel für einen sekundären ¹⁴C-Isotopeneffekt bei der Umsetzung von $C_6H_5-^{14}CO-CH_3$ mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gefunden ($k_{12C}/k_{14C} = 1,0085 \pm 0,0004$). Es ist jedoch fraglich, ob aus solch extrem kleinen Effekten Aussagen gewonnen werden können.

Die Theorien über den sekundären Isotopeneffekt sind komplex und teilweise widerspruchsvoll^[8, 33], weshalb nur einige physikalische Fakten, die in engem Zusammenhang mit der chemischen Reaktivität stehen, und häufig bestätigte Regeln über Richtung und Größe der Effekte bei einzelnen Reaktionstypen angegeben werden sollen.

Es gibt im wesentlichen zwei Auffassungen:

1) Sekundäre Isotopeneffekte können als Substituenteneffekte verstanden werden, wonach einer C–D-Bindung ein stärkerer +I-Effekt zukommt als einer C–H-Bindung^[8, 10, 13, 33, 34, 36, 37] und einer CD₃-Gruppe eine schwächere Hyperkonjugation als einer CH₃-Gruppe^[53].

2) Sekundäre Wasserstoff-Isotopeneffekte können durch die geringere Raumerfüllung von Deuterium^[33a] bzw. durch geringere Schwingungsamplituden von D im Vergleich zu H verstanden werden^[41].

Wie man aus Experimenten weiß, werden Dipolmomente, Kernquadrupol-Kopplungskonstanten und optische Aktivität durch Wasserstoffisotopen-Substitution beeinflußt. Aus der geringen Anharmonizität der molekularen Energiefunktion (Morsefunktion)^[9b] kann (vgl. Abb. 1) eine etwas unterschiedliche Elektronenverteilung zwischen C–H- und C–D-Bindungen abgeleitet werden, wodurch es zu einer geringen Abstandsverkürzung und einer etwas größeren Elektronenabgabe einer C–D- gegenüber einer C–H-Bindung kommt^[8].

Die Dipolmomente von ND₃, CD₃ND₂, DCNO und (CH₃)₃CD sind um 0,01 bis 0,04 Debye größer als die der entsprechenden Wasserstoffverbindungen^[38–38b]. Man kann daher sagen, daß eine C–D-Bindung relativ zu einer C–H-Bindung einen höheren induktiven Effekt ausübt. So weisen $C_6H_5-CD_2-COOH$ und $C_6H_5-CD_2-NH_3$ im Vergleich zu den nicht deuterierten Verbindungen geringere Dissoziation auf. Besonders deutlich wird der Einfluß des Deuteriums beim Ver-

[35] V. F. Raaen, A. K. Tsionis u. C. J. Collins, J. Amer. chem. Soc. 82, 5502 (1960).

[36] A. Streitwieser jr., Ann. New York Acad. Sci. 84, 576 (1960).

[37] M. Wolfsberg, J. chem. Physics 33, 2 (1960).

[38] J. M. A. DeBruyne u. C. P. Smyth, J. Amer. chem. Soc. 57, 1203 (1935).

[38a] D. R. Lide, J. chem. Physics 27, 343 (1957); 33, 1519 (1960).

[38b] J. N. Shoolery, R. G. Shulman u. D. M. Jost, J. chem. Physics 21, 1416 (1953).

gleich der Kernquadrupol-Kopplungskonstanten von CH_3X und CD_3X (X : Halogen). Die C–X-Bindungen sind in den deuterierten Verbindungen stärker ionisch.

Zur gleichen Aussage kommt man durch Studium der Auswirkung einer Deuteriumsubstitution auf die chemische Verschiebung kernmagnetischer Resonanzsignale. So werden die H-Signale in $-\text{CH}_2\text{D}$ gegenüber $-\text{CH}_3$ um $0,015$ ppm verschoben^[39] und die F-Signale in $-\text{CF}_2\text{D}$ um $0,60 \pm 0,05$ ppm gegenüber der $-\text{CF}_2\text{H}$ -Gruppe^[40]. Allerdings wurden kürzlich nicht die erwarteten chemischen Verschiebungen der ^{19}F -Signale beim Vergleich von m-Fluortoluol und $[\alpha,\alpha,\alpha\text{-D}_3]\text{-Fluortoluol}$ gefunden^[40a].

Auch Elektronenspinresonanz-Messungen an deuteriertem Benzol, Naphthalin und Cyclooctatetraen zeigen keine stärkere Elektronendonatorwirkung des Deuteriums^[40d]. Die C–D-Bindung ist weniger polarisierbar als die C–H-Bindung; dies führt zur optischen Asymmetrie in Verbindungen des Typs $\text{R}^1\text{R}^2\text{CHD}$. Für die auf Isotopeneffekten beruhende optische Aktivität wurde eine Theorie entwickelt, die lediglich auf der Wechselwirkung des Lichts mit den verschiedenen Atomen bzw. Isotopen beruht^[40c]. Streitwieser^[48] weist z.B. auf die Ähnlichkeit der optischen Rotationsdispersionskurven von $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CHD(OH)}$, $\text{CH}_3\text{--CHD(OH)}$ und $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH(OH)}\text{--CH}_3$ hin^[40b].

Auf Grund dieser Fakten kommt man zum Schluß, daß diese sogenannten elektronischen Isotopeneffekte^[8] wie echte Substituenteneffekte behandelt werden können. Der Ersatz eines Wasserstoffatoms in einer C–H-Bindung durch D äußert sich qualitativ ähnlich wie ein Ersatz durch eine CH_3 -Gruppe. Der Ersatz einer CH_3 - durch eine CD_3 -Gruppe wirkt sich wie der Übergang von einer CH_3 - zu einer C_2H_5 - oder gar $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -Gruppe aus.

Über die „Weiterleitung“ von Isotopeneffekten über Mehrfachbindungen und Benzolkerne haben sich Shiner und Kriz geäußert^[53]. Die beim Ersatz von H durch D oder T beobachteten Effekte können noch auf andere Weise erklärt werden: Bartell^[41] nimmt an, daß sowohl die α - wie β -Deuterium-Isotopeneffekte durch die größeren Schwingungsamplituden von C–H- im Vergleich zu C–D- oder C–T-Bindungen zustandekommen. Dadurch sind die Abstoßungskräfte zwischen H-Atomen größer als die von H-Atomen zu Deuterium oder Tritium bzw. von diesen untereinander. Weiterhin treten an einem sp^3 -C-Atom stärkere Abstreuungen nichtbindender Atome auf als bei C-Atomen im sp^2 -Zustand. Folglich ist der Energiegewinn beim Übergang von sp^3 nach sp^2 durch Abnahme der Abstoßungskräfte bei

[39] G. van Dyke Tiers, J. chem. Physics 29, 963 (1958).

[40] G. van Dyke Tiers, J. Amer. chem. Soc. 79, 5585 (1957).

[40a] G. E. Maciel u. D. D. Traficante, J. Amer. chem. Soc. 87, 2508 (1965).

[40b] A. Streitwieser jr., L. Verbit u. S. Andreades, J. org. Chemistry 30, 2078 (1965).

[40c] N. V. Cohan u. H. F. Hameka, J. Amer. chem. Soc. 88, 2136 (1966).

[40d] M. Karplus, R. G. Lawler u. G. K. Fraenkel, J. Amer. chem. Soc. 87, 5260 (1965).

[41] L. S. Bartell, J. Amer. chem. Soc. 83, 3567 (1961).

Hydrogeniumverbindungen größer als bei Deuteriumverbindungen. Daraus läßt sich ableiten, daß beim Übergang vom sp^3 - zum sp^2 -Zustand H-Verbindungen rascher als D- oder T-Verbindungen reagieren; dies ist eine gut bestätigte Regel^[36, 42–46]. Entsprechendes gilt umgekehrt für den Übergang vom sp^2 - in den sp^3 -Zustand^[8, 46, 47]. Dies wurde auch für eine Radikalreaktion bestätigt: Bei der Styrolpolymerisation reagieren $[\alpha\text{-D}]$ -, $[\beta,\beta\text{-D}_2]$ -, $[\alpha\text{-T}]$ - und trans-T-Styrol rascher als nichtmarkiertes Styrol^[47a].

Die geringere Raumerfüllung von CD_3 -Gruppen gegenüber CH_3 -Gruppen hat H. C. Brown^[33a] kürzlich sehr deutlich nachgewiesen. Danach bedingt die Quaternierung von 2-Trideuteriomethyl-pyridin mit Methyljodid einen inversen sekundären Isotopeneffekt von 0,97, mit Äthyljodid von 0,96 und mit Isopropyljodid von 0,935. Für 2,6-Bis(trideuteriomethyl)-pyridin wurde 0,92 gemessen. Da 3-Trideuteriomethyl-pyridin und 4-Trideuteriomethyl-pyridin nur sehr kleine, nicht signifikante Isotopeneffekte zeigen, lehnt H. C. Brown jede Erklärung sekundärer Isotopeneffekte durch andere als sterische Einflüsse ab.

Zu demselben Schluß führt auch der Befund, daß nur das 2,6-Bis(trideuteriomethyl)-pyridin eine größere Reaktionswärme (0,23 kcal/mol) mit BF_3 zeigt, dagegen nicht die 3- und 4-Methylverbindungen.

Von Streitwieser^[48] wurde erstmalig der Einfluß von α -ständigem D auf $\text{S}_{\text{N}}1$ -Solvolysereaktionen (Übergangszustand mit sp^2 -Charakter) gezeigt und durch höheren Energiegewinn der H-Verbindung beim Übergang vom sp^3 - in den sp^2 -Zustand im aktivierte Komplex ge deutet. Streitwieser^[48] gibt ein Näherungsverfahren an, das erlaubt, $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ aus den meist bekannten Schwingungsfrequenzen des nicht markierten Ausgangsmaterials und des Endprodukts zu bestimmen. Bei nichtcyclischen Verbindungen wird häufig $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 1,12$ bis 1,15 gefunden, bei cyclischen Verbindungen etwas höher^[8, 33].

Bei $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionen beobachtet man sehr kleine oder sogar inverse Isotopeneffekte. So fanden wir^[49] z.B. für die Quaternierung von Pyridin mit [T]-Methyljodid $k_{\text{H}}/k_{\text{T}} = 0,96$ (siehe auch^[8]). Intensiv wurde von Shiner^[50] sowie Llewellyn und Robertson^[51] die Solvolyse von Halogeniden und Tosylaten bearbeitet; hier werden durchweg inverse Isotopeneffekte beobachtet (vgl. hierzu auch Berechnungsversuche von Willi^[13]).

[42] H. Simon u. G. Heubach, Z. Naturforsch. 18b, 160 (1963).

[43] H. Simon u. G. Mühlhofer, Chem. Ber. 96, 3167 (1963).

[44] H. Simon u. G. Mühlhofer, Pure appl. Chem. 8, 379 (1964); Vortrag beim Symposium on Isotope Mass Effects in Chemistry and Biology. Wien 9. bis 13. Dezember 1963.

[45] H. Simon u. G. Mühlhofer, Chem. Ber. 97, 2202 (1964).

[46] A. A. Zavitsas u. S. Seltzer, J. Amer. chem. Soc. 86, 3836 (1964).

[47] S. Seltzer, J. Amer. chem. Soc. 83, 1861 (1961).

[47a] W. A. Pryor, R. W. Henderson, R. A. Patsiga u. N. Carroll, J. Amer. chem. Soc. 88, 1199 (1966).

[48] A. Streitwieser jr., R. H. Jagow, R. C. Fahey u. S. Suzuki, J. Amer. chem. Soc. 80, 2326 (1958).

[49] H. Simon u. D. Palm, Chem. Ber. 92, 2701 (1959).

[50] V. J. Shiner jr., H. R. Mahler, R. H. Baker jr. u. R. R. Hiatt, Ann. New York Acad. Sci. 84, 583 (1960).

[51] K. T. Leffek, J. A. Llewellyn u. R. E. Robertson, Canad. J. Chem. 38, 1505 (1960).

Über die Möglichkeit, durch sekundäre α -Deuterium-Isotopeneffekte nähere Einblicke in den Verlauf von Solvolysereaktionen zu erhalten, haben Lee und Wong^[52] berichtet. Die Solvolyse von [1,1-D₂]-2-Cyclopentyläthyl-, [1,1-D₂]-2-(Δ^2 -Cyclopentenyl)äthyl- und [1,1-D₂]-2-(Δ^3 -Cyclopentenyl)äthyl-p-nitrobenzolsulfonaten zeigt nur für die dritte Verbindung mit $k_H/k_D = 1,07$ pro D einen wesentlichen Isotopeneffekt. Daraus wird auf teilweisen S_N2-Charakter im Übergangszustand geschlossen bzw. in Übereinstimmung mit Streitwieser^[34b] auf Nachbargruppeneffekte.

Bei der Bildung von Methylradikalen aus 1-Trideuteriomethyl-2-phenyläthyl-hypochlorit zeigt sich ein α -Deuterium-Isotopeneffekt von 1,15 pro D, was mit den Ergebnissen an S_N1-Reaktionen und unimolekularen thermischen Spaltungen gut übereinstimmt^[46].

III. Isotopeneffekte bei E2-Reaktionen nach Art des Hofmann-Abbaus

Die Untersuchung des Isotopeneffekts bei E2-Eliminierungen ist insofern reizvoll, als sich zwei Bindungen im Übergangszustand „gleichzeitig“ lösen. Man kann daher fragen, wie z.B. beim Hofmann-Abbau quartärer Kationen des Typs $(CH_3)_3N^\oplus-CH_2-\overset{\alpha}{CH}_2-R$ dieses „gleichzeitige“ Lösen von R abhängt, d.h. man kann versuchen, mit Hilfe von Isotopeneffekten festzustellen, ob je nach dem Charakter von R die Lösung der C-N-Bindung oder die der C $^\beta$ -H-Bindung rascher vorstatten geht. Wir bestimmten daher die ¹⁴C- und T-Isotopeneffekte beim Hofmann-Abbau der in Tabelle 1 aufgeführten quartären Ammoniumkationen^[42-44].

Tabelle 1. Übersicht über von uns [43-45] bestimmte primäre ¹⁴C- und T-Isotopeneffekte (IE_{exp}) sowie Vergleich mit einigen D-Isotopeneffekten nach verschiedenen Autoren (umgerechnet auf T) beim Hofmann-Abbau quartärer Ammoniumkationen $(CH_3)_3N^\oplus R$.

R	IE_{exp} , für 40 °C umgerechnet [a]	R	IE_{exp} , für 60 °C umgerechnet [a]	Lit.
¹⁴ CH ₂ -CH ₃	1,05 [b]	CH ₂ -CH ₂ T	3,0 [a,b]	[43-45]
¹⁴ CH ₂ -CH ₃	1,06 [b]	CH ₂ -CH ₂ T	2,8 [a,b]	[43-45]
¹⁴ CH ₂ -C ₂ H ₅	1,07 ₃	CH ₂ -CHT-CH ₃	2,8 ₆ [a]	[43-45]
¹⁴ CH ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₄ -NO ₂ -p	1,03 ₄	CH ₂ -CHT-C ₆ H ₅	4,2 [a]	[45]
¹⁴ C(CH ₃) ₃	1,06 ₄	CH ₂ -CHT-C ₆ H ₄ -NO ₂ -p	8 ± 1,6 [a]	[45]
CH ₂ - ¹⁴ CH ₂ -CH ₃	1,03 ₈	CH ₂ -CD ₃	12 ± 4	[66]
		CH ₂ -CD ₂ -C ₆ H ₅	14	[60]
			3,9	[59]

[a] Für experimentelle Einzelheiten, Umrechnung der bei verschiedenen Temperaturen bestimmten Werte auf 40 bzw. 60 °C, Fehlerdiskussion etc., siehe [43-45]. [b] Sehr unterschiedliche Bedingungen.

Der Befund eines kaum vom Lösungsmittel abhängigen sekundären Isotopeneffekts bei der Hydrolyse von [1,1,1-D₃]-4-Chlor-4-methyl-2-pentin von $k_H/k_D \approx 1,09$ ^[53] spricht stark für die verringerte Hyperkonjugation einer CD₃-Gruppe im Vergleich zu einer CH₃-Gruppe, da sterische Effekte hier nicht in Betracht kommen^[53].

Neben den vielfältig untersuchten S_N1- und S_N2-Reaktionen^[54] wurde mit Hilfe sekundärer Isotopeneffekte versucht, Einblicke in die Diels-Alder-Reaktion^[55] zu erhalten. Die Ergebnisse sprechen für eine Vierzentrenreaktion mit einem Übergangszustand, der weitgehend auf Seiten der Reaktanden liegt.

Sterische Isotopeneffekte durch D-Substitution wurden auch bei der Racemisierung von 9,10-Dihydro-4,5-dimethylphenanthren beobachtet^[56]. Die an den Methyl- bzw. Methylengruppen deuterierten Präparate racemisieren rascher. Der Effekt ist additiv. Ein deutlicher Isotopeneffekt wurde auch bei der Racemisierung von 2,2'-Dibrombiphenyl-4,4'-dicarbonsäure beobachtet^[57].

[52] C. C. Lee u. E. W. C. Wong, Tetrahedron 21, 539 (1965).
[53] V. J. Shiner jr. u. G. S. Kriz jr., J. Amer. chem. Soc. 86, 2643 (1964).

[54] Vgl. z.B. A. Streitwieser jr.: Solvolytic Displacement Reactions. McGraw-Hill Book Co., New York 1962.

[55] D. E. Van Sickle u. J. O. Rodin, J. Amer. chem. Soc. 86, 3091 (1964).

[56] K. Mislow, R. Graeve, A. J. Gordon u. G. H. Wahl jr., J. Amer. chem. Soc. 86, 1733 (1964).

[57] L. Melander u. R. E. Carter, J. Amer. chem. Soc. 86, 295 (1964).

Es waren zwar bereits Isotopeneffekte für die Lösung von C $^\beta$ -H-Bindungen bekannt^[58-60], für die Lösung der C-Y-Bindung (Y = N, S) jedoch lediglich $k_{32S}/k_{34S} = 1,0015$ zur Eliminierung von Dimethylsulfid aus β -Phenyläthyl-dimethylsulfonium-bromid^[61]; später 1,006^[61a]. Arey^[62] fand für $(CH_3)_3N^\oplus-CH_2-CH_3$ bei 60 °C einen ¹⁵N-Isotopeneffekt $k_{14N}/k_{15N} = 1,017$ und für $(CH_3)_3N^\oplus-CH_2-CH_2-C_6H_5$ 1,009. Dieses Ergebnis zeigt, daß der elektronenziehende Phenylrest den Isotopeneffekt der C-N-Bindungslösung verkleinert. Die etwa gleichzeitig von uns gefundenen ¹⁴C-Isotopeneffekte (Tab. 1) waren hiermit in guter Übereinstimmung und zeigten noch deutlicher, daß Elektronendonatoren wie Methylgruppen den Isotopeneffekt vergrößern (vgl. R = C₃H₇ mit R = C₂H₅), elektronenziehende Gruppen wie p-NO₂-C₆H₄ aber sehr verkleinern.

[58] Über Eliminierungsreaktionen siehe D. V. Banthorpe in E. D. Hughes: Reaction Mechanisms in Organic Chemistry, Bd. 2. Elimination Reactions. Elsevier Publishing Comp., Amsterdam-New York 1963.

[59] W. H. Saunders jr. u. D. H. Edison, J. Amer. chem. Soc. 82, 138 (1960).

[60] V. J. Shiner jr. u. M. L. Smith, J. Amer. chem. Soc. 80, 4095 (1958).

[61] W. H. Saunders jr. u. S. Asperger, J. Amer. chem. Soc. 79, 1612 (1957).

[61a] W. H. Saunders jr., A. F. Cockerill, S. Asperger, L. Klasinc u. D. Stefanović, J. Amer. chem. Soc. 88, 848 (1966).

[62] G. Ayrey, A. N. Bourne u. V. A. Vyas, Canad. J. Chem. 41, 1759 (1963).

Die Bestimmung des Isotopeneffekts von $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ war von Interesse, da die tert.-Butylgruppe bei $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktionen besonders kleine Isotopeneffekte zeigt, wie man annimmt wegen der Bindungsfestigung zwischen dem tertiären Kohlenstoff und den Methylgruppen im Carboniumion [63]. Wie man sieht, zeigt die tertiäre Butylgruppe beim Hofmann-Abbau keine Besonderheit.

Für $(\text{CH}_3)_2\text{S}^+-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ betrug $k_{32\text{S}}/k_{34\text{S}} = 1,007$ [64]. Der ^{15}N -Isotopeneffekt beim Abbau von $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{X}-\text{p}$, mit $\text{X} = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}$ und Cl , änderte sich nicht merklich mit X [65].

Während die für die Lösung der C–N-Bindung gefundenen Isotopeneffekte in Einklang zu bringen und sinnvoll waren, war dies für die Lösung der C^3H -Bindung, wenn man alle bekannten Werte in Betracht zog, nicht der Fall. In Tabelle 1 sind die von uns bestimmten Tritium-Isotopeneffekte und die aus der Literatur bekannten Isotopeneffekte zusammengestellt. Zum Vergleich sind alle Werte auf 60°C und die Deuterium-Werte auf Tritium-Werte umgerechnet worden [45]. Danach nimmt der Tritium-Isotopeneffekt mit den Substituenten in β -Stellung in der Reihe $\text{CH}_3 \leq \text{H} < \text{C}_6\text{H}_5 < \text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2\text{-p}$ zu [*][**].

Wie man sieht, steht beim Hofmann-Abbau einem großen Wasserstoff-Isotopeneffekt ein kleiner Kohlenstoff-Isotopeneffekt gegenüber, und umgekehrt. Welche Aussagen lassen sich daraus für den Übergangszustand machen? Für elektronenziehende Gruppen wie Phenyl und p-Nitrophenyl sind die Wasserstoff-Isotopeneffekte groß; hier sollte im Übergangszustand die Lösung des Protons etwa zur Hälfte fortgeschritten sein („Halblösung“, vgl. Abschn. II.1). Es erhebt sich dann die Frage, ob die Protonenablösung im Fall von Alkylgruppen weiter oder weniger als bis zur „Halblösung“ gediehen ist, da in diesem Fall kleinere Isotopeneffekte auftreten.

Hierzu kann man wie folgt argumentieren: Es ist anzunehmen, daß ein Rest R , der die Abspaltung eines Protons erleichtert (relative Verschiebung der $\text{E}2$ -Eliminierung zu einem Übergangszustand mit Carbanion-Charakter), das Ablösen einer unter Mitnahme des Elektronenpaares austretenden Gruppe erschwert, und umgekehrt. Weiterhin kann man annehmen, daß eine negative Ladung am C^3 -Atom durch eine Alkylgruppe nicht stabilisiert werden kann und unter dem Einfluß der positiven Ladung am Stickstoff die irreversible Elektronenverschiebung zu den Produkten dadurch schon

[63] M. L. Bender u. G. J. Buist, J. Amer. chem. Soc. 80, 4304 (1958).

[64] W. H. Saunders jr. u. S. E. Zimmerman, J. Amer. chem. Soc. 86, 3789 (1964).

[65] A. N. Bourns u. P. J. Smith, Proc. chem. Soc. (London) 1964, 366.

[*] E. M. Hodnett u. J. J. Sparapani, Pure appl. Chem. 8, 385 (1964), haben einen wesentlich kleineren Wert publiziert; dieser wurde jedoch nicht direkt bestimmt wie bei den früheren Messungen von Hodnett [66] und uns [45], sondern indirekt aus dem kinetischen und dem sekundären Isotopeneffekt. Dieses Vorgehen erscheint uns jedoch wegen der Polymerisation von p-Nitrostyrol besonders ungünstig.

[**] Stark fällt allerdings der Wert für $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CD}_3$ [60] heraus; da diese Untersuchungen primär nicht zur Bestimmung des Isotopeneffekts durchgeführt wurden, ist ein relativ großer Fehler möglich. — V. J. Shiner u. M. L. Smith, persönliche Mitteilung.

[66] E. M. Hodnett u. J. J. Flynn jr., J. Amer. chem. Soc. 79, 2300 (1957).

bei geringfügiger Lösung der C^3H -Bindung erfolgt (geringe Bindungslösung im Übergangszustand). Im Fall der Arylreste kann die entstehende negative Ladung besser stabilisiert werden, wodurch das Proton sich weiter entfernen kann, bevor es zum irreversiblen Elektronenübergang kommt.

Diese Annahmen werden durch die sekundären Isotopeneffekte gestützt. Wäre der Übergangszustand des Hofmann-Abbaus der Struktur der Endprodukte ähnlich, so sollten sich relativ große sekundäre Isotopeneffekte ergeben. Dies ist jedoch, wie wir bei den quartären Ammonium-Kationen mit $\text{R} = \text{CH}_2-\text{CHT}-\text{CH}_3$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{T}$ und $\text{CHT}-\text{C}_2\text{H}_5$ bestimmt haben, nicht der Fall; wir fanden 1,33, 1,10 bzw. 1,10 [43].

Diese aus den Isotopeneffekten gezogenen Schlüsse stehen im Gegensatz zu der von *Bunnell* [67] sowie *Ingold, Hughes* et al. [68] geäußerten Annahme, daß beim Hofmann-Abbau quartärer Ammoniumkationen die C^3H -Bindungslösung im Übergangszustand schon relativ weit fortgeschritten sei. Auch *Ayrey* et al. [62] kamen zu dieser Annahme. Sie verglichen den Isotopeneffekt der Phenylverbindung ($\text{R} = \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$) mit dem von *Shiner* und *Smith* [60] für die Äthylverbindung ($\text{R} = \text{CH}_2-\text{CD}_3$) bestimmten. Da dieser letzte Isotopeneffekt viel größer als der für die Phenylverbindung ist, nahmen sie an, daß im Falle der Äthylverbindung etwa „Halblösung“ der C^3H -Bindung vorliegt und bei der Phenylverbindung schon eine weitergehende Lösung. Da jedoch nach unseren zahlreichen, sehr sorgfältigen Messungen, die Äthyl- und Propylverbindung ($\text{R} = \text{CH}_2-\text{CH}_2\text{T}, \text{CH}_2-\text{CHT}-\text{CH}_3$) einen wesentlich kleineren Isotopeneffekt aufweisen als die Phenyl- und p-Nitrophenyl-Verbindung ($\text{R} = \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ bzw. $\text{CH}_2-\text{CHT}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2\text{-p}$), stimmen die Schlußfolgerungen dieser Autoren nur insoweit mit den unseren überein, daß die Lösung der C^3H -Bindung bei den Verbindungen mit elektronenziehenden Gruppen weiter fortgeschritten ist als bei Verbindungen mit Alkylgruppen.

Das Beispiel des Hofmann-Abbaus zeigt unseres Erachtens sehr deutlich, worauf es bei der Bestimmung von Isotopeneffekten ankommt und welche Schlüsse man ziehen kann. Insbesondere bei Wasserstoff-Isotopeneffekten führt nur ein großer Wert zu einer eindeutigen Aussage (vgl. jedoch [23a]). Am zweckmäßigsten ist es, an allen Stellen eines Moleküls, an denen Bindungen gelöst oder geknüpft werden, isotope Nuklide einzubauen und festzustellen, ob Isotopeneffekte auftreten oder nicht. Außerdem ist es meist nützlich, eine Reaktion mit verschiedenen Substituenten an den reagierenden Zentren zu studieren.

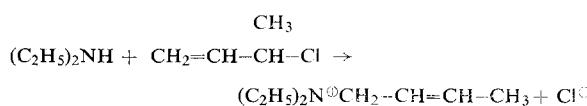
Solche systematischen Untersuchungen wurden von *Fry* [69] für die Dieckmann-Kondensation, die Wolf-Umlagerung, die Hydrolyse von Benzylchlorid und parasubstituierten Benzylchloriden sowie die Substitution von 3-Chlor-1-butene durch Diäthylamin durchgeführt. Im letzten Beispiel wurden die ^{14}C -Isotopeneffekte für das $[1-^{14}\text{C}]$ -, $[2-^{14}\text{C}]$ - und

[67] J. F. Bunnell, Angew. Chem. 74, 731 (1962), Angew. Chem. internat. Edit. 1, 225 (1962).

[68] D. V. Banthorpe, E. D. Hughes u. C. K. Ingold, J. chem. Soc. (London) 1960, 4054.

[69] A. Fry, Pure appl. Chem. 8, 409 (1964).

$[3-^{14}\text{Cl}]$ -3-Chlor-1-butene zu $1,057 \pm 0,007$, $1,074 \pm 0,003$ und $1,079 \pm 0,003$ bestimmt. Der Chlor-Isotopeneffekt $k_{^{35}\text{Cl}/k_{^{37}\text{Cl}}}$ wurde zu $1,0112 \pm 0,0006$ gemessen. Dies ist ein besonders hübsches Beispiel, da es zeigt, daß bei der Reaktion:



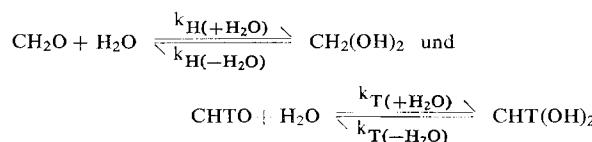
im Übergangszustand alle Bindungen des 3-Chlor-1-butene beeinflußt sind.

IV. „Analytische“ Isotopeneffekte

Werden wasserstoff-markierte Verbindungen einfachen Trennoperationen, z.B. der Umkristallisation oder Destillation, unterworfen, Methoden also, die im Vergleich zu multiplen Verteilungen wenig wirksam sind, so können trotzdem recht hohe Isotopeneffekte auftreten, nämlich dann, wenn mit solch einer Trennung eine chemische Reaktion verbunden ist. Wir haben hierfür zwei Beispiele gefunden.

Bei der Umkristallisation von [1-T]-Mannose-phenylhydrazon aus 60-proz. wäßrigem Methanol stellten wir fest, daß die markierten Moleküle langsamer auskristallisierten [70, 71]; $k_H/k_T = 1,12$. Wegen der Bedeutung der Umkristallisation bei der Reinigung markierter Verbindungen („Umkristallisation bis zu konstanter Radioaktivität“ ist ein Lehrsatz!) wurde diese Beobachtung vom National Bureau of Standards, Washington, geprüft, welches unsere Befunde bestätigte [71]. Der Grund für diesen hohen Isotopeneffekt ist sehr wahrscheinlich, daß für die Kristallisation die Mutarotation einer oder mehrerer Formen des Mannose-phenylhydrazons geschwindigkeitsbestimmend ist.

Das zweite Beispiel betrifft die Destillation wäßriger Lösungen von [T]-Formaldehyd [42]. Die hierbei ablaufende chemische Reaktion ist sehr wahrscheinlich die Hydratisierung und Dehydratisierung des Formaldehyds. Wie bei der Besprechung sekundärer Isotopieeffekte erwähnt wurde, reagieren D- und T-markierte Moleküle beim Übergang $\text{sp}^3 \rightarrow \text{sp}^2$ langsamer als die nicht markierten Molekülen und entsprechend rascher beim Übergang $\text{sp}^2 \rightarrow \text{sp}^3$. Im Fall des T-markierten Formaldehyds ist also für die Gleichgewichte



$$k_{H(+\text{H}_2\text{O})} < k_{T(+\text{H}_2\text{O})} \text{ und } k_{H(-\text{H}_2\text{O})} > k_{T(-\text{H}_2\text{O})}.$$

Dadurch ist beim T-markierten Formaldehyd das Gleichgewicht gegenüber nicht markiertem auf die Seite der hydratisierten Form verschoben, wodurch [T]-Formaldehyd weniger flüchtig ist. Daneben können noch Gleichgewichte mit dem Dimeren, dem Methylen-

[70] F. Weygand, H. Simon u. K. D. Keil, Chem. Ber. 92, 1635 (1959).

[71] F. Weygand, H. Simon, K. D. Keil, H. S. Isbell u. L. T. Snieski, Analytic. Chem. 34, 1753 (1962).

glykol, oder oligomeren Oxymethylenhydraten eine Rolle spielen.

Über erstaunliche Isotopeneffekte bei der Papier- und Säulenchromatographie T-markierter Aldosterone berichtet Klein [72]. Hierbei wurde die Änderung des Verhältnisses $T/^{14}\text{C}$ bei doppelt intermolekular markierten Präparaten verfolgt. So ändert sich z.B. bei der Papierchromatographie von Aldosteron-diacetat $T/^{14}\text{C}$ für 4 Segmente des Substanzflecks, die quer zur Laufrichtung ausgeschnitten wurden, von 11,2, 8,5, 6,3 bis zu 5,6. Entsprechende Fraktionierungen wurden für Chromatographiesäulen festgestellt. Dabei wurde gezeigt, daß die Fraktionierung nicht infolge der ^{14}C -Markierung, sondern allein infolge der Tritium-Markierung erfolgt [*].

So ist es nicht verwunderlich, daß kleine Moleküle mit verschiedenen Wasserstoffisotopen-Gehalten, z.B. Methane [74] und Äthane [75], ganz oder weitgehend mit üblichen chromatographischen Methoden getrennt werden können. Die Effekte hängen dabei nicht nur von der Zahl der Wasserstoffisotope, sondern auch von deren Stellung ab. So trennten Lee und Rowland [76]

Tabelle 2. Isotopeneffekte bei chromatographischen Trennungen [a].

Verfahren	Verbindung	Isotopeneffekt (in Retentionsvolumen-Prozent [b])	Lit.
Ionen austauscher	$[^{14}\text{C}]$ -Aminosäuren	-0,123 bis 0,338	[77a, 77b]
	[T]-2-Aminopurin	-2,4	[77c]
	$[^{14}\text{C}]$ -Ameisensäure	0,62 bei 6 °C 0,32 bei 35,4 °C	[77d]
Papierchromatographie	[6,7-T]-Oestradiol	0,75	[77e]
	1,2-T-Aldosteron-diacetat	0,2	[77f]
Säulenchromatographie	T-Ameisensäure	2,4	[77g]
	Methyl-T-methoxyessigsäure	1,01	[77g]
	T-Linoleinsäure	0,41	[73]
	T-Cholesterinacetat	bis 0,49	[72]
	1,2-T-Aldosteron-diacetat	bis 0,73	[77f]
Gaschromatographie	1,2-T-Aldosteron	bis 1,63	[77h]
	T-Steroide	bis -1,15	[77i]
	D-Trimethylsilylierte Kohlenhydrate	bis 2,62	[77j]

[a] Wir danken Herrn Dr. P. D. Klein sehr herzlich, daß er uns ein Manuskript vor der Publikation zugänglich machte.

[b] Unter Retentionsvolumenprozenten versteht man den prozentualen Unterschied zwischen den Retentionsvolumen, bei denen 50 % der nicht-markierten und 50 % der markierten Substanz eluiert sind.

Negative Werte bedeuten rascheren Lauf der markierten Verbindung.

[72] P. D. Klein, D. W. Simborg u. P. A. Szczepanik, Pure appl. Chem. 8, 357 (1964); J.H. Laragh, J. E. Sealey u. P. D. Klein, im Druck.

[*] P. D. Klein et al. [72] verwenden die Probit-Analyse [77k] um festzustellen, ob die Änderung der spezifischen Aktivitäten bei Reinigungsoperationen durch Isotopeneffekte bedingt ist, oder durch Abtrennung von Verunreinigungen.

[73] D. S. Sgoutsas u. F. A. Kummerow, J. Chromatography 16, 448 (1964).

[74] P. L. Gant u. K. Yang, J. Amer. chem. Soc. 86, 5063 (1964).

[75] W. A. van Hook u. M. E. Kelly, Analytic. Chem. 37, 508 (1965).

[76] E. K. C. Lee u. F. S. Rowland, Analytic. Chem. 36, 2181 (1964).

stellungsisomere T-markierte Olefine wie Propylen ($\text{CH}_2\text{T}-\text{CH}=\text{CH}_2$ von $\text{CH}_3-\text{CT}=\text{CH}_2$ und $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CHT}$), cis-Buten ($\text{CH}_2\text{T}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ von $\text{CH}_3-\text{CT}=\text{CH}-\text{CH}_3$) und 1-Buten ($\text{CH}_3-\text{CHT}-\text{CH}=\text{CH}_2$ von $\text{CH}_3-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHT}$ und/oder $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CT}=\text{CH}_2$). Äußerst geringe T-Konzentrationen in Wasserstoffgas lassen sich an einer Aluminiumoxid-Eisenoxidsäule bei -183°C anreichern [77]. Beispiele für bei säulen- oder gaschromatographischen Trennungen auftretende Isotopeneffekte sind in Tabelle 2 angegeben.

V. Isotopeneffekte in der Biochemie

In biologischen Systemen lassen sich neben den bereits definierten Gleichgewichts-, kinetischen und Lösungsmittel-Isotopeneffekten weitere Isotopeneinflüsse beobachten, z.B. veränderte Permeabilität, morphologische und genetische Änderungen, veränderte Wachstumsraten und selbst Lebensfähigkeit der Zelle [78]. Auch hier bedingen Wasserstoffisotope die stärksten Effekte. Die Gesamteinflüsse lassen sich aber bei Kenntnis der Teilprozesse auf primäre und sekundäre Isotopeneffekte markierter Substrate in Enzymreaktionen und den Einfluß von D_2O auf Substrate und Enzyme zurückführen [79–82].

Im allgemeinen Fall liegt die isotopenmarkierte Verbindung zusammen mit der nicht markierten vor und wird kompetitiv enzymkinetisch gemessen. Der Anteil der markierten Verbindung wird durch Atomgewichtsprozente oder die spezifische Radioaktivität gekennzeichnet. Bei 100-proz. Sub-

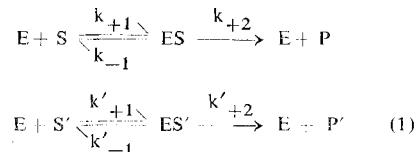
- [77] J. L. Borowitz u. J. R. Gat, Int. J. appl. Radiat. Isotopes 15, 401 (1964).
 [77a] K. A. Piez u. H. Eagle, Science (Washington) 122, 968 (1955).
 [77b] K. A. Piez u. H. Eagle, J. Amer. chem. Soc. 78, 5284 (1956).
 [77c] H. Gottschling u. E. Freese, Nature (London) 196, 829 (1962).
 [77d] C. N. Davidson, C. K. Mann u. R. K. Sheline, J. physic. Chem. 67, 1519 (1963).
 [77e] E. V. Jensen u. H. I. Jacobsen, Recent Progr. Hormone Res. 18, 387 (1962).
 [77f] J. H. Laragh, J. E. Sealy u. P. D. Klein, Proc. Symposium radiochem. Methods Analysis 2, 353 (1965).
 [77g] W. G. Brown, L. Kaplan, A. R. Van Dyken u. K. E. Wilzbach, Proc. internat. Conf. peaceful Uses Atomic Energy 15, 16 (1956).
 [77h] V. Cejka u. E. M. Venneman, Clin. chim. Acta 11, 188 (1965).
 [77i] V. Cejka, E. M. Venneman u. P. D. Klein, persönliche Mitteilung.
 [77j] R. Bentley, N. S. Saha u. C. C. Sweeley, Analytic. Chem. 37, 1118 (1965).
 [77k] J. D. Finney: Probit Analysis. Cambridge University Press, London 1952.
 [78] J. F. Thomson in: Modern Trends in Physiological Sciences, Vol. 19. Biological Effects of Deuterium. Pergamon Press, Oxford 1963.
 [79] H. Simon, H.-D. Dorrer u. A. Trebst, Z. Naturforsch. 19b, 734 (1964).
 [80] J. J. Katz, H. L. Crespi u. A. J. Finkel, Pure appl. Chem. 8, 471 (1964).
 [80a] J. Katz, R. Rognstad u. R. G. Kemp, J. biol. Chemistry 240, PC 1484 (1965).
 [81] V. Moses u. M. Calvin, Biochim. biophysica Acta 33, 297 (1959).
 [82] H. D. Hoberman, L. Proskey, P. G. Hempstead u. H. W. Arfin, Biochem. biophysic. Res. Commun. 17, 490 (1964).

stitution durch das Isotop, was bei Deuterium erreicht werden kann, kann jedes Substrat für sich kinetisch gemessen werden. Wir bezeichnen diesen Fall als nicht kompetitiv und behandeln ihn wegen der einfachen Ableitung von Isotopeneffekten zuerst.

1. Isotopeneffekt und Enzymmechanismus

a) Bei nicht kompetitiver Versuchsführung

Isotopeneffekte enzymatischer Reaktionen lassen sich für Einstabstrat-Reaktionen durch die Isotopeneffekte der Maximalgeschwindigkeit V und der Michaelis-Konstante K_m ausdrücken. Für die Reaktion eines Enzyms E mit einem Substrat S oder einem isotopen-substituierten Substrat S' gelten dabei im einfachsten Fall [83]:



Aus dem Ansatz (1) ergeben sich die Beziehungen für die Initialgeschwindigkeit v_i :

$$v_i = \frac{V}{1 + K_m/[S]} ; v'_i = \frac{V'}{1 + K'_m/[S']} \quad (2)$$

Bei Substratsättigung gilt:

$$V = k_{+2} [E_0] \quad (3)$$

wobei

$$[E_0] = [E] + [ES].$$

K_m ist definitionsgemäß gleich der Substratkonzentration bei der $v_i = V/2$ ist. Außerdem folgt aus Gl. (1):

$$K_m = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

Falls sich das Gleichgewicht zwischen Enzym, Substrat und Komplex (ES) eingestellt hat ($k_{+2} \ll k_{-1}$), ist K_m praktisch gleich der Dissoziationskonstante K_s des Komplexes ES:

$$K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s \quad (5)$$

Nach Gleichung (2) werden die Konstanten V , V' , K_m und K'_m ermittelt und daraus die Isotopeneffekte V/V' und K_m/K'_m berechnet.

In einer Einstabstrat-Reaktion gibt ein Isotopeneffekt von V an, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine isotopen-substituierte Bindung gelöst oder gebildet wird. Ein Isotopeneffekt von K_m kann bei Erfüllung der Bedingung (5) als Maß für die relative Affinität der zu vergleichenden Substrate dienen. Für $K_m/K'_m > 1$ ist das isotopen-substituierte Substrat fester gebunden als das nicht markierte.

Als Isotopeneffekt der Initialgeschwindigkeit v_i , der unmittelbar zugänglichen Meßgröße, ergibt sich aus Gl. (2):

$$\frac{v_i}{v'_i} = \frac{V[S](K'_m + [S'])}{V'[S'](K_m + [S])} \quad (6)$$

[83] L. Lumper in Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, VI A, Enzyme, Teil A. Springer-Verlag, Berlin 1964, S. 17.

Für gleiche Substratkonzentrationen ($[S] = [S']$) folgt daraus bei Substratsättigung Gleichung (7) und bei kleinen Substratkonzentrationen Gleichung (8)

$$\frac{v_i}{v'_i} = \frac{V}{V'} = \frac{k_{+2}}{k'_{+2}} \quad (7)$$

$$\frac{v_i}{v'_i} = \frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m} \quad (8)$$

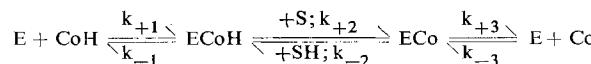
Nach Gl. (6) ergibt sich ferner, daß bei ein und derselben Enzymreaktion der Isotopeneffekt von v_i eine Funktion der Substratkonzentration ist und ≥ 1 sein kann.

Für Zweisubstrat-Reaktionen (dazu gehören die für D- und T-Isotopeneffekte besonders interessanten NAD-abhängigen Dehydrogenasen (siehe Tab. 3) führt die Mehrzahl der möglichen Mechanismen zum gleichen Geschwindigkeitsgesetz, das durch die Dalziel-Gleichung (9) wiedergegeben wird^[84]; diese ersetzt Gleichung (2).

$$\frac{\Phi_0}{v_i} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{[S_a]} + \frac{\Phi_2}{[S_b]} + \frac{\Phi_{1,2}}{[S_a][S_b]} \quad (9)$$

$[S_a]$ und $[S_b]$ sind die Konzentrationen der Substrate oder Coenzyme. Die Φ sind Produkte aus den Geschwindigkeitskonstanten der Einzelschritte, ihr Zusammenhang mit dem Mechanismus findet sich bei Dalziel^[84], ihre Ermittlung auch bei^[83]. Zwischen den Φ einer Gesamtreaktion (Hin- und Rückreaktion) lassen sich mit der Haldane-Beziehung^[85], den Dalziel-Beziehungen^[84] und Gleichungen für die Produkt-Inhibierung^[86, 87] den Mechanismus kennzeichnende Größen ableiten. Durch die für die Größe Φ ermittelten Isotopeneffekte kann in ähnlicher und ergänzender Weise auf den Enzymmechanismus geschlossen werden.

Als Beispiel für die Aussagemöglichkeiten aus Isotopeneffekten sei die Leberalkoholdehydrogenase-Reaktion besprochen (von der ursprünglich angenommen wurde, daß sie einem einfachen Theorell-Chance-Mechanismus entspräche^[88]):



(Co, S, CoH, SH entsprechen Coenzym und Substrat und ihren reduzierten Formen.)

Als Parameter der Hin- und Rückreaktion ergeben sich daraus

$$\Phi_0 = \frac{1}{k_{+3}}; \quad \Phi_1 = \frac{1}{k_{+1}}; \quad \Phi_2 = \frac{1}{k_{+2}};$$

$$\Phi_{1,2} = \frac{k_{-1}}{k_{+2} k_{+1}} \quad (\text{Hinreaktion})$$

$$\Phi_{or} = \frac{1}{k_{-1}}; \quad \Phi_{1r} = \frac{1}{k_{-3}}; \quad \Phi_{2r} = \frac{1}{k_{-2}};$$

$$\Phi_{1,2r} = \frac{k_{+3}}{k_{-2} k_{-3}} \quad (\text{Rückreaktion})$$

[84] K. Dalziel, Acta chem. scand. 11, 1706 (1957).

[85] R. A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 75, 1928 (1953).

[86] R. A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 80, 1777 (1958).

[87] W. W. Cleland, Biochem. biophysica Acta 67, 104, 173, 188 (1963).

[88] H. Theorell u. B. Chance, Acta chem. scand. 5, 1127 (1951).

Für die Isotopeneffekte $\Phi/\Phi' = \varphi$ ergeben sich folgende Bedingungen

$$\varphi_{1r} = 1; \quad \varphi_0 = 1; \quad \varphi_{2r} = \varphi_{1,2r}; \quad \frac{\varphi_1 \varphi_2}{\varphi_{1,2}} = \varphi_{or}$$

In Bakers Untersuchungen^[89] wurden die zweite und vierte Bedingung nicht erfüllt und somit wahrscheinlich gemacht, daß kein einfacher Theorell-Chance-Mechanismus vorliegt. Weitere Anwendungen der Dalziel-Gleichung finden sich bei^[50, 89–94].

b) Bei kompetitiver Versuchsführung

a) $[S]$ und $[S']$ sind vergleichbar groß

Die Gesamtgeschwindigkeit v_t für den Umsatz eines isotopen Substratgemisches^[94a] ist

$$v_t = v_s + v'_s = \frac{V \cdot [S]}{[S] + K_m (1 + [S]/K_m)} + \frac{V' \cdot [S']}{[S'] + K'_m (1 + [S]/K_m)} \quad (10)$$

wobei v_s und v'_s den Teilgeschwindigkeiten der isotopen Substrate entsprechen. Da K_m/K'_m größer oder kleiner als 1 sein kann, kann auch jede Teilgeschwindigkeit größer oder kleiner sein, als der entsprechenden Substratkonzentration ohne Isotopeneffekt zukäme. Das Geschwindigkeitsgesetz (10) entspricht formal dem einer kompetitiven Hemmung, aber es ist falsch, daraus zu schließen, ein markiertes Substrat vertrete einen kompetitiven Inhibitor.

Mit Gl. (10) ergibt sich, daß das Verhältnis der Teilgeschwindigkeiten im kompetitiven Versuch stets proportional dem Verhältnis der Substratkonzentrationen ist^[95].

$$\frac{v_s}{v'_s} = \frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m} \cdot \frac{[S]}{[S']} \quad (11)$$

Für die Bestimmung von V/V' und K_m/K'_m ergeben sich beim kompetitiven Arbeiten zwei Möglichkeiten: Man bestimmt v_t und das Verhältnis der Teilgeschwindigkeiten, oder man bestimmt die Abhängigkeit von v_t vom Mischungsverhältnis der Substrate^[96].

[89] R. H. Baker jr., Biochemistry 1, 41 (1962).

[90] R. H. Baker jr. u. H. R. Mahler, Biochemistry 1, 35 (1962).

[91] H. R. Mahler, R. H. Baker jr. u. V. J. Shiner jr., Biochemistry 1, 47 (1962).

[92] H. R. Mahler u. J. Douglas, J. Amer. chem. Soc. 79, 1159 (1957).

[93] J. F. Thomson, J. J. Darling u. L. F. Bordner, Biochem. biophysica Acta 85, 177 (1964).

[93a] J. F. Thomson u. S. L. Nance, Biochem. biophysica Acta 99, 369 (1965).

[94] J. F. Thomson, D. A. Bray u. J. J. Bummert, Biochem. Pharmacol. 11, 943 (1962).

[94a] M. B. Thorn, Nature (London) 164, 27 (1949).

[94b] J. A. Rose u. S. V. Rieder, J. biol. Chemistry 231, 315 (1958).

[95] R. H. Abeles, W. R. Frisell u. C. G. Mackenzie, J. biol. Chemistry 235, 853 (1960), Korrektur auf unnumerierter Blatt in Heft 6 (1960).

[96] M. B. Thorn, Biochem. J. 49, 602 (1951).

3) $[S]$ ist sehr viel größer als $[S']$ (radioaktiver Tracer)

Bei Verwendung radioaktiv markierter Substrate gilt fast immer $[S'] \ll [S]$ und $[S'] \ll K'_m$. Die Aussagemöglichkeit der Gleichung (10) wird wesentlich eingeschränkt. v_t entspricht praktisch der Teilgeschwindigkeit v_s , und damit entfällt die Möglichkeit zur unabhängigen Bestimmung der Teilgeschwindigkeit v'_s ^[*]. Daher kann nach Gl. (11) nur ein Isotopeneffekt für das Verhältnis $\frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m}$ bestimmt werden.

Ist die spezifische Aktivität des Substrats $[S']/[S] = N_0$ und die des Produkts N_p , so ergibt sich der Isotopeneffekt für gegen Null gehenden Umsatz ($\leq 10\%$) f^[13] aus den Quotienten

$$\left(\frac{N_0}{N_p} \right)_{f \rightarrow 0} = \frac{k}{k'} = \frac{v_i}{v'_i} \cdot \frac{[S']}{[S]}.$$

In Gleichung (11) eingesetzt ergibt sich (siehe auch^[97])

$$\left(\frac{N_0}{N_p} \right)_{f \rightarrow 0} = \frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m} \quad (12)$$

c) Vergleich nicht kompetitiver und kompetitiver Versuchsführung

Die Vorteile des Arbeitens mit Substraten, die hoch oder vollständig isotopen-substituiert sind, liegen in der Möglichkeit zur unmittelbaren Bestimmung von K_m , V , K'_m und V' und der kinetischen Größen Φ und ϕ (vgl. Abschn. V. 1a) in Mehrsubstrat-Reaktionen^[50, 89–94]. Aber selbst bei sehr genau eingehaltenen Versuchsbedingungen können die Fehler der Einzelmessungen zu großen Fehlern des Isotopeneffekts führen^[5]. Dies zeigt ein Vergleich der Meßergebnisse für Alkohol-Dehydrogenase^[50, 92] und die Abhängigkeit des Isotopeneffekts der Urease-Reaktion von verschiedenen Enzympräparationen^[97].

Die kompetitive Versuchsführung hat folgende Vorteile: Fehler aus dem Vergleich von zwei Meßserien, wie sie bei nicht kompetitiver Versuchsführung benötigt werden, treten nicht auf. Durch radioaktive oder massenspektroskopische Produktanalyse kann bei der kompetitiven Methode der Isotopeneffekt mit kleinem Fehler bestimmt werden. Die Markierung der benötigten Substrate in Tracermengen ist meist einfacher als die Darstellung isotopenreiner Substrate, z.B. kann die Darstellung stereospezifisch markierter Substrate entfallen (Erläuterungen zu Tab. 4). Die Versuchsführung paßt sich in-vivo-Untersuchungen besser an. Nachteilig ist, daß für Tracermarkierung im allgemeinen nur das Produkt $\frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m}$ erhalten wird (vgl. Abschn. V.1b).

[*] Dies ist am einfachsten daraus zu sehen, daß für $[S'] \ll K'_m$ Gl. (2) zu $v'_i = V'[S']/K'_m$ vereinfacht wird. Folglich ist nur das Verhältnis V'/K'_m bestimmbar und nicht die Einzelgrößen.

[97] K. R. Lynn u. P. E. Yankwich, Biochem. biophysica Acta 56, 512 (1962); K. R. Lynn u. P. E. Yankwich, ibid. 81, 533 (1964).

[98] M. Florkin u. E. H. Stotz in: Comprehensive Biochemistry, Vol. 13. 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam 1965.

2. Deutung des Isotopeneffekts für die Biochemie

Die weitaus größte Zahl an Veröffentlichungen über enzymatische Isotopeneffekte befaßt sich mit Deuterium-Isotopeneffekten, insbesondere mit der eingehenden Untersuchung der Wasserstoff-Übertragungen durch Oxidoreduktasen und Isomerasen. Spezielle Beispiele werden im Abschnitt V. 3 und in Tabelle 3 behandelt. Obwohl die Zahl der Untersuchungen von Enzymreaktionen mit Hilfe von Isotopeneffekten noch weit hinter der der organischen Chemie zurücksteht, können einige zusammenfassende Angaben über die Größe von Isotopeneffekten bei Enzymreaktionen und ihre Deutung gemacht werden.

Die Deuterium-Isotopeneffekte von v_i und V von Enzymreaktionen sind in ihrer Größe mit denen normaler chemischer Reaktionen vergleichbar. Wenn auch für einen normalen Deuterium-Isotopeneffekt zwischen 20 und 35 °C 6 bis 7 erwartet wird^[16], so lassen sich die gefundenen D-Isotopeneffekte von durchschnittlich 1,5 bis 3 doch zwanglos einordnen, wenn nämlich der Übergangszustand reaktanden- oder produktähnlich ist. Es gelten dann die Ausführungen in Abschnitt II.1 über die Größe des Isotopeneffekts in Abhängigkeit von der Bindungslösung in Richtung der Reaktionskoordinate. Außerdem kommt man oft zu einer gewissen Kompenstation und damit Verringerung des meßbaren Isotopeneffekts, weil das Verhältnis v_i/v'_i , wenn keine Substratsättigung vorliegt, vom Verhältnis $\frac{V}{V'} \cdot \frac{K'_m}{K_m}$ abhängt (Gl. (6), (8) u. (11)). Auch wenn Gleichgewichtseinstellungen dem Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vorausgehen, muß mit solchen Einflüssen auf den Gesamt-Isotopeneffekt gerechnet werden^[4]. Daher werden Deuterium-Isotopeneffekte von 6 und größer selten erreicht (siehe Tab. 3 und^[99, 100]).

Der Isotopeneffekt von K_m liegt vielfach über dem für Gleichgewichtskonstanten zu erwartenden, auch dort, wo feststeht, daß K_m wirklich die Bedeutung einer Dissoziationskonstanten (K_s) zukommt. Für diesen Fall fordern Mahler^[92] und Shiner^[50] bereits bei der Bindung des Substrats an das Enzym eine Wechselwirkung des Enzyms mit der isotopen-substituierten Bindung. Diese Wechselwirkung erklärt auch die großen Isotopeneffekte von K_m , die bei Isotopensubstitution einer nicht am Bruttoumsatz beteiligten Bindung eines Substrats gefunden werden, z.B. die 4-B-Stellung des NADH für A-spezifische Enzyme^{[50, 93, 94], [*]}.

Für eine Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym bei der Substratbindung spricht z.B. auch der be-

[99] J. F. Thomson u. F. J. Klipfel, Biochem. biophysica Acta 44, 72 (1960).

[100] P. Strittmatter, J. biol. Chemistry 237, 3250 (1962).

[*] NAD^+ ($NADP^+$) = Nicotinamid-adenindinucleotid(-phosphat).

NADH (NADPH) = reduzierte Formen von NAD^+ und $NADP^+$. [A-4-D]-NADH = Im Nicotinamidteil des NADH ist diejenige 4-Position markiert, die bei Anordnung der Atome 1 bis 6 im Gegenuhrzeigersinn nach vorn schaut, d.h. [4(R)-4-D]-NADH [100a]. [B-4-D]-NADH entspricht [4(S)-4-D]-NADH. Nach der Stereospezifität der Wasserstoff-Übertragung werden Enzyme, die Wasserstoff auf die A-Stellung des NADH übertragen, als A-Enzyme bezeichnet und Substrate des Typs CHHbd in A- und B-Substrate unterteilt.

[100a] J. W. Cornforth, G. Ryback, G. Popjak, C. Donninger u. G. Schroepfer jr., Biochem. biophysic. Res. Commun. 9, 371 (1962).

Tabelle 3. Deuterium-Isotopeneffekte bei biochemischen Redoxreaktionen.

Enzym und Reaktion	Substrat	$\frac{V}{V'}$	K_m [a] K'_m	$\frac{v_i}{V'i}$ und andere Größen	Bedingungen/Lit.
Alkohol-Dehydrogenase (Hefe) $CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$	CH_3CD_2OH [A-4-D]-NADH	1,75 1,75	2,3 [92] 1,39	1,31 [b]	pH = 7,45; 24 °C [91]
Alkohol-Dehydrogenase (Leber) $CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$	[A-4-D]-NADH [B-4-D]-NADH	1,59 0,50 [d]	1,31	1,6 [b]	pH = 8,8; 27 °C [91]
Lactat-Dehydrogenase Pyruvat + NADH + H ⁺ ⇌ Lactat + NAD ⁺	[A-4-D]-NADH [B-4-D]-NADH	1,41 0,81 [d]	0,43 1,59	0,35 [b]	pH = 7,4; 25 °C [93]
Lactat-Dehydrogenase (Rinderherz) Pyruvat + NADH + H ⁺ ⇌ Lactat + NAD ⁺	[A-4-D]-NADH [B-4-D]-NADH	1,35 1,10 [d]	0,69 2,02	0,92 [b]	pH = 7,4; 25 °C [93a]
Lactat-Dehydrogenase (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>) Lactat + NAD ⁺ ⇌ Pyruvat + NADH + H ⁺	[2-D]-D-Lactat		1,86		pH = 8,6 [111a]
Malat-Dehydrogenase Oxalacetat + NADH + H ⁺ ⇌ Malat + NAD ⁺	[A-4-D]-NADH [B-4-D]-NADH	1,85	1,70 0,82 1,51 [e]	1,09 [b]	pH = 7,4; 25 °C [94]
Glucose-6-P-Dehydrogenase Glucose-6-P + NADP ⁺ → Gluconsäure-6-P + NADPH + H ⁺		2,0–2,4	1,3–1,6	1,3–1,6	pH = 5,9–9,4 [107]
Ameisensäure-Dehydrogenase (Erbse) $HCOOH + NAD^+ \rightarrow CO_2 + NADH + H^+$			nicht signifi- kant	3,0(16 °C)–2,0(37 °C) $E_A(H) = 11700 \pm 150$ cal $E_A(D) = 14935 \pm 170$ cal [c]	pH = 6,8 [108]
Ameisensäure-Dehydrogenase (<i>E. coli</i>) $HCOOH \rightarrow CO_2 + 2 H^+ + 2 e^-$				1,0	pH = 6,8; 32 °C [108]
Katalase $H_2O_2 + HCOOH \rightarrow CO_2 + 2 H_2O$			1,0	1,5	pH = 5,9; 27 °C [108]
Glykolsäure-Oxidase $HOCH_2COOH + NAD^+ \rightleftharpoons OHCCOOH + NADH + H^+$				2,5	[114]
Succinat-Dehydrogenase $HOOCCH_2CH_2COOH \rightleftharpoons HOOCCH=CHCOOH$	77 % D		0,69	bis 5,9 [99] $E_A(H) = 11250 \pm 150$ cal $E_A(D) = 12700 \pm 300$ cal [c]	[96]
Monoamino-Oxidase $Amin + H_2O + O_2 \rightarrow Aldehyd + NH_3 + H_2O_2$				2,3	[110]
Sarcosin-Oxidase $Sarcosin \rightarrow H_2CO + Glycin \rightarrow Serin$		1,5	0,5		[95]
Cytochrom-b ₅ -Reduktase NADH + H ⁺ + 2 Cytochrom-b ₅ (oxidiert) → NAD ⁺ + 2 Cytochrom-b ₅ (reduziert)	[A-4-D]-NADH acetyl-analog pyridinaldehyd-analog		1,66 [117]	3,66 10,45 8,7	pH = 8,1; 25 °C [100]
NADH-Oxidase Acceptor: O ₂ NADH-Dehydrogenase Acceptor: 2,6-Dichlorindophenol und andere	[B-4-D]-NADH			4,5	[116]
	[B-4-D]-NADH			1,66–1,1	[116]

[a] Isotopeneffekt der Michaelis-Konstante oder von Gleichgewichtskonstanten der angeführten Substrate im Komplex ES. $K_m/K'_m > 1$ bedeutet festere Bindung des deuterierten Substrats (vgl. Gl. (5)).

[b] Isotopeneffekt für die Geschwindigkeitskonstante der Bindung des Coenzyms.

[c] Aktivierungsenergien (E_A) für Lösung der C–H- und C–D-Bindung.

[d] Sekundäre Isotopeneffekte.

[e] in D₂O.

reits ohne Acceptor an Dihydroxyacetophosphat durch Aldolase bewirkte Wasserstoffaustausch [94b].

Es sind mehrere Beispiele für eine erhöhte Affinität des deuterierten Substrats zum Enzym ($K_m/K'_m > 1$) vorhanden (siehe Tab. 3). Geringere Affinität des deuterierten Substrats wurde auch durch eine stärkere Hemmung des deuterierten Substrats mit einem kompetitiven Inhibitor nachgewiesen [95].

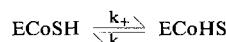
Während die Isotopeneffekte von K_m eine Aussage über die Bindung des Substrats und damit über das aktive Zentrum des Enzyms geben können, kann auch der Isotopeneffekt per se als Nachweis für Änderungen am aktiven Zentrum herangezogen werden. Ein eindrucksvolles Beispiel gibt Rose [101], der native und mit Carboxypeptidase behandelte Aldolase untersuchte. Während das native Enzym keinen Isotopeneffekt auf die Synthesereaktion mit markierten Triosephosphaten gab, fand sich für das behandelte Enzym ein Deutierungs-Isotopeneffekt von 6 und ein Tritium-Isotopeneffekt von 20.

3. Spezielle Beispiele

Als Ordnungsprinzip für die hier behandelten Beispiele wurde die Enzymliste [98] herangezogen. Die Bedeutung des Isotopeneffekts zur Klärung von Enzym-Mechanismen kann unter anderem an der Beteiligung eines Enzyms in einem gekoppelten System, Stereospezifität einer CaabD-Molekel, intramolekulare Protonenverschiebung und Spaltung eines Moleküls in gleiche Bruchstücke gezeigt werden.

a) Wasserstoff-Isotopeneffekte

Über die Alkohol-Dehydrogenase(Hefe)-Reaktion liegen Messungen des Isotopeneffekts mit [4-D]-NADH (chemisch und enzymatisch reduziert) und [1,1-D₂]-Äthan vor [50, 91, 92, 102]. Die Autoren nehmen an, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Umwandlung der ternären Komplexe



sei, dessen Isotopeneffekt $k_+/k'_+ = k_-/k'_- = 1,75$ beträgt (Tabelle 3).

Dies sei durch eine geringe Bindungslösung im Übergangszustand des Komplexes zu erklären. Damit steht der unerwartet hohe Isotopeneffekt der Substratdissoziationskonstanten in Übereinstimmung, der durch eine Wechselwirkung der an der Wasserstoffübertragung beteiligten C—H-Bindung mit dem Enzym erklärt wird. Nach Silverstein und Boyer [103] ist die Spaltung des NAD- oder NADH-Produkts der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. In diesem Fall würde die voranstehende Zuordnung des Isotopeneffekts zu den kinetischen Konstanten nicht gelten. Müller-Hill und Wallenfels [104] schließen aus der Temperaturabhängigkeit der Reaktion, daß unterhalb 20 °C der erste, oberhalb 20 °C der zweite Mechanismus zutreffen würde.

Wir führten Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit des Isotopeneffekts von [1-T]-Äthanol [*]

[101] J. A. Rose, E. L. O'Connell u. A. H. Mehler, J. biol. Chemistry 240, 1758 (1965).

[102] H. R. Levy, F. A. Loewus u. B. Vennesland, J. Amer. chem. Soc. 79, 2949 (1957).

[103] E. Silverstein u. P. D. Boyer, J. biol. Chemistry 239, 3908 (1964).

[104] B. Müller-Hill u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 339, 338 (1964).

[*] Es handelt sich um das Gemisch der stereoisomeren [1-T]-Alkohole.

und [A-4-T]-NADH als Substrate der Alkohol-Dehydrogenase (Hefe) aus [105, 105a]. Die Zunahme des Isotopeneffekts mit steigender Temperatur (Tab. 4) läßt sich mit einem Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes deuten.

Da Alkohol-Dehydrogenase der Hefe auch die Oxidation der Homologen des Äthanols mit vergleichbaren Geschwindigkeiten katalysiert, konnten wir an ihr den Einfluß verschiedener Substrate auf den Isotopeneffekt einer Enzymreaktion studieren [105] (siehe Tab. 4). Die

Tabelle 4. Vergleich der Isotopeneffekte (k_H/k_T) beim Umsatz einiger Alkohole [*] mit Alkohol-Dehydrogenase (Hefe) unter verschiedenen Bedingungen [105].

Bedingungen	[1-T]-Äthanol [a]	[1-T]-Propanol [a]	[1-T]-Butanol [a]
pH = 7,6 15 °C	3,3 ± 0,1	6,4 ± 0,05	6,8 ± 0,2
pH = 7,6 25 °C	4,1 ± 0,05	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,2

[a] Bei Tracermengen der tritierten Substanz gibt es keine ins Gewicht fallende Doppelmarkierung, es braucht daher nicht mit stereospezifisch markierten Substraten gearbeitet zu werden, wenn der Isotopeneffekt am gebildeten [A-4-T]-NADH gemessen wird.

Zunahme des Isotopeneffekts beim Übergang von Äthan zu Propanol übertrifft wesentlich die gleichzeitig nur 34-proz. Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit [106].

Für die Alkohol-Dehydrogenase der Leber [91] wurde versucht, aus den für Hin- und Rückreaktion erhältlichen 12 unabhängigen Gleichungen die 13 kinetischen Konstanten durch Iteration zu erhalten. Damit konnten Isotopeneffekte für jeden Einzelschritt eines komplexen Mechanismus berechnet werden. Neben den Werten in Tabelle 3 wird für die H-Übertragung von CH₃CH₂OH auf NAD⁺ $k_H/k_D = 2,28$, von [A-4-D]-NADH auf CH₃CHO $k_H/k_D = 3,11$ angegeben.

Bestimmt man den Isotopeneffekt von [A-4-T]-NADH bei der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion in Abhängigkeit von Acet-, Propion- und Butyraldehyd, so findet man bei dem Enzym aus Hefe eine Substratabhängigkeit [105a], bei dem Enzym aus Leber aber nicht [105b]. Damit kann für den Mechanismus des Leberenzymes bestätigt werden, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt von der Dissoziation des Coenzyms abhängt.

Thomson [92, 93a] untersuchte Isotopeneffekte des [A-4-D]-NADH und [B-4-D]-NADH in der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion. Gegenüber dem normalen Isotopeneffekt von V durch [A-4-D]-NADH gibt [B-4-D]-NADH einen inversen Isotopeneffekt (Tabelle 3), woraus zumindest auf die Wechselwirkung beider 4-ständigen Wasserstoffe des NADH mit dem Enzym im Laufe der Reaktion geschlossen werden kann.

Aus dem Isotopeneffekt der NADP-abhängigen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konnte für die CO₂-Bildung aus Glucose in intakten Zellen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ermittelt werden. Dieser ist eine C—H-Spaltung, entweder bei der H-Übertragung von Glucose auf NADP oder bei der Reoxidation des

[105] D. Palm, Z. Naturforsch. 21b, 540 (1966).

[105a] D. Palm, Z. Naturforsch. 21b, 547 (1966).

[105b] D. Palm u. T. Fiedler, unveröffentlicht.

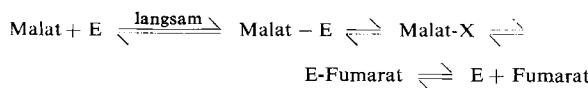
NADPH. Entsprechendes ergab sich mit Tumor-Zellen^[107].

Während bei der Alkohol-Dehydrogenase Beispiele für die Untersuchung verschiedener Substrate mit einem Enzym vorliegen, hat Aebi^[108] vergleichende Messungen eines Substrats (Formiat) mit verschiedenen Enzymen vorgenommen (Tab. 3).

Die Succinat-Dehydrogenase-Reaktion an deuterierter Bernsteinsäure gilt als klassisches Beispiel für enzymatische Isotopeneffekte^[109]. Bei neueren Arbeiten war es möglich, perdeuterierte Substrate zu verwenden und damit $V/V' = 5,9$ zu bestimmen^[99]. Für das [D₄]-Succinat sind allerdings auch sekundäre Isotopeneffekte zu berücksichtigen. Als Substrat der Atmungskette hat [D₄]-Succinat keinen verlangsamen Einfluß auf die oxidative Phosphorylierung.

Die Klärung einer stereospezifisch ablaufenden Reaktion gelang Belleau^[110] für die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren zu Aminen und deren Dehydrierung. Die beiden Enantiomeren [1-D]-Tyramine konnten hergestellt und ihre Isotopeneffekte bei der Monoaminoxidase-Reaktion mit dem in D₂O aus Tyrosin erhaltenen Decarboxylierungsprodukt verglichen werden.

Für die Dehydratisierung von Malat (Fumarase-Reaktion) wurde ein Isotopeneffekt erwartet, aber keiner gefunden^[111]. Da die Lösung der stereospezifisch markierten Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung nicht geschwindigkeitsbestimmend war, muß ein Mechanismus über einen bis jetzt unbekannten Komplex Malat-X postuliert werden:



Bei der Racemisierung von [2-D]-Lactat durch einen Extrakt aus *Clostridium butylicum* wird ein Isotopeneffekt von $k_H/k_D = 2,14$ beobachtet, der für beide Enantiomere von gleicher Größe ist. Der Beweis, daß durch die Racemisierung kein Deuterium verloren ging, wurde dadurch erbracht, daß die Geschwindigkeit der Dehydrierung durch die Lactatdehydrogenase sowohl für die D- wie die L-Form genau der der deuterierten Milchsäuren entsprach^[111a].

Durch Messung des Deuterium-Isotopeneffekts an [1-¹⁴C-2-D]-Glucose-6-phosphat bei der Hexoseisomerase-Reaktion wurde ein intramolekularer Protonenübergang bewiesen^[112]. Im Substrat-Enzym-Komplex

[106] J. van Eys u. N. O. Kaplan, J. Amer. chem. Soc. 79, 2782 (1957).

[107] I. A. Rose, J. biol. Chemistry 236, 603 (1961).

[108] H. Aebi, Pure appl. Chem. 8, 459 (1964).

[109] H. Erlenmeyer, W. Schoenauer u. H. Süttman, Helv. chim. Acta 19, 1376 (1936).

[110] B. Belleau u. J. Burba, J. Amer. chem. Soc. 82, 5751 (1960); B. Belleau, M. Fang, J. Burba u. J. Moran, ibid. 82, 5752 (1960); B. Belleau u. J. Moran, Ann. New York Acad. Sci. 107, 822 (1963).

[111] R. A. Alberti in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes, Vol. 5. Academic Press, New York 1961, S. 531.

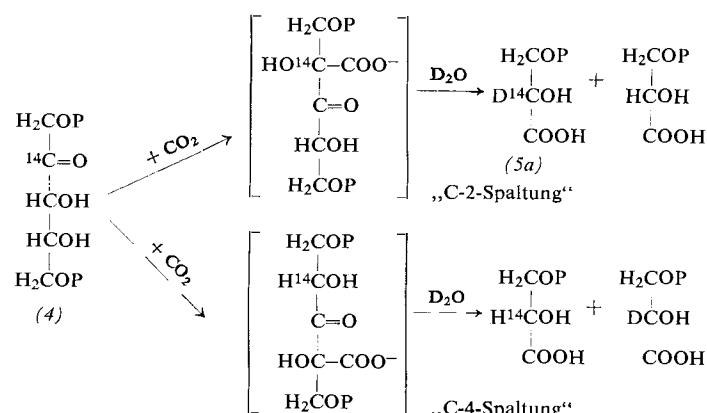
[111a] S. S. Shapiro u. D. Dennis, Biochemistry 4, 2283 (1965).

[112] I. A. Rose u. E. L. O'Connell, J. biol. Chemistry 236, 3086 (1961).

wird zu ca. 50 % der Wasserstoff als Proton von C² in die 1-Stellung des Substrats (vice versa) ohne Austausch mit dem Lösungsmittel übertragen.

Für Deuterium wird in beiden Richtungen der Isomerase-Reaktion ein Isotopeneffekt von 2 (für Tritium ca. 3,2) gefunden. Einen Isotopeneffekt ähnlicher Größe erhielten Rose und Rieder^[113] für die Triosephosphat-Isomerase. [3-D]-1,3-Dihydroxyaceton-1-phosphat reagiert 2,2 mal langsamer als das unsubstituierte Substrat. Bei der Epimerisierung von Uridin-diphosphat-galaktose und -glucose durch ein Enzym aus Hefe wurde für die [4-T]-markierten Hexosen ein inverser Isotopeneffekt von $k_H/k_T = 0,66$ bis 0,33 gefunden^[113a]. Mit der Richtung und Größe des Isotopeneffekts steht ein Mechanismus in Einklang, dessen erster Schritt eine reversible Wasserstoffübertragung von C⁴ auf das Enzym ist. Für ein solches Gleichgewicht wurden auch bei der Alkohol-Dehydrogenase inverse Isotopeneffekte gefunden (Tab. 3). Darauf folgt die Umlagerung des Enzymkomplexes, wobei der Wasserstoff die geeignete Position erhält, um auf die epimere Stellung der Hexose übertragen zu werden. Aus der Größe des Isotopeneffekts (Gleichgewichts-Isotopeneffekt) wird auf eine Beteiligung von C-, N- oder O-Atomen an der Wasserstoffübertragung geschlossen, die Beteiligung von S ist auszuschließen.

Eine interessante Anwendung von Deuterium und Tritium-Isotopeneffekten demonstrierte Rose^[114, 115] bei der Klärung verschiedener Teilschritte der Ribulose-diphosphat-Carboxylase-Reaktion (Carboxy-Dismutase). Es war dabei zu klären, ob das CO₂ am C² oder C⁴ des Ribulosediphosphats (4) fixiert wird, bevor die Spaltung in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerinsäure (5) eintritt. Nur wenn das CO₂ an C² fixiert wird, entsteht neben nicht markierter eine intramolekular doppelmarkierte [2-¹⁴C-2-D]-3-Phosphoglycerinsäure (5a). Da



die aus den Phosphoglycerinsäuren gewonnene [¹⁴C]-Glykolsäure bei der Oxidation mit Glykolsäure-Oxidase einen Isotopeneffekt von 2,5 zeigte, mußte diese Glykolsäure neben ¹⁴C auch D tragen, d.h. das CO₂ wird an

[113] S. V. Rieder u. I. A. Rose, J. biol. Chemistry 234, 1007 (1959).

[113a] R. D. Bevill III, E. A. Hill, F. Smith u. S. Kirkwood, Canad. J. Chem. 43, 1575 (1965).

[114] G. Müllhofer u. I. A. Rose, J. biol. Chemistry 240, 1341 (1965).

[115] I. A. Rose, G. Müllhofer u. F. Fiedler, unveröffentlicht.

C_2 von (4) fixiert. In 3-Stellung tritiertes (4) reagiert bei $pH = 8,1$ und $25^\circ C$ bei der Carboxylierung vier- bis sechsmal langsamer als die H-Verbindung. Die Protonenablösung scheint der limitierende Schritt der Gesamtreaktion zu sein [115].

Bei der irreversiblen Bildung einer C-H-Bindung durch Protonenaufnahme aus einem Lösungsmittel, das partiell wasserstoff-markiert ist, wird meist im Produkt ein wesentlich geringerer Gehalt des höheren Wasserstoffisotops gefunden als im Lösungsmittel. Dies ist eine Folge des Isotopeneffekts bei der Spaltung einer X-H-Bindung, wobei X z.B. O, S oder N sein kann. Ein typisches, experimentell und theoretisch untersuchtes Beispiel ist die Hydratisierung von Isobutylolen in saurem Medium [121]. Dabei wird in H_2O/D_2O -Mischungen im gebildeten tert.-Butanol eine 3,9 mal kleinere D-Konzentration gefunden als im Wasser; für T ist das Verhältnis 7,1 und für T in D_2O 1,9.

Entsprechende biochemische Beispiele sind:

Bei der enzymatischen Spaltung von Citrat in HOT wird T in Acetyl-CoA eingebaut. Wasserstoff wird im Verhältnis $k_H/k_T = 6,7$ bevorzugt [122]. Bei der Spaltung von *threo*-D-

[116] B. Mackler, Biochem. biophysic. Res. Commun. 4, 195 (1961).

[117] P. Strittmatter, J. biol. Chemistry 239, 3043 (1964).

[118] J. L. Rabinowitz, T. Sall, J. N. Bierly jr. u. O. Oleksyshyn, Arch. Biochem. Biophysics 63, 437 (1956).

[119] J. L. Rabinowitz, J. S. Lafair, H. D. Strauss u. H. C. Allen jr., Biochem. biophysica Acta 27, 544 (1958).

[120] S. Seltzer, G. A. Hamilton u. F. H. Westheimer, J. Amer. chem. Soc. 81, 4018 (1959).

[121] V. Gold u. M. A. Kessick, J. chem. Soc. (London) 1965, 6718 (1965).

[122] J. Bove, R. O. Martin, L. L. Ingraham u. P. K. Stumpf, J. biol. Chemistry 234, 999 (1959).

Isocitrat in Succinat und Glyoxylat wird in Abhängigkeit von der Isocitrat-Konzentration ($2 \cdot 10^{-3}$ bis $4 \cdot 10^{-3}$ M) ein Isotopeneffekt $k_H/k_T = 6,5$ –13,9 gefunden, wenn die Reaktion in tritiumhaltigem Puffer erfolgt [123]. Bei der Spaltung von Phosphoenolpyruvat durch Pyruvatkinase in HOT wird T mit einem Isotopeneffekt $k_H/k_T = 6,4$ eingebaut [124].

b) Isotopeneffekte des Kohlenstoffs

Von Lynn und Yankwich [97] wurde der Isotopeneffekt der Urease-Reaktion (mit Harnstoff von natürlichem $^{12}C/^{13}C$ -Verhältnis) in Abhängigkeit von Umsatz, Konzentration, Puffer, Temperatur, pH und Alterung des Enzyms untersucht und zu maximal 2,3 % gefunden. Die Unterschiede der für verschiedene Enzympräparationen gefundenen Isotopeneffekte waren zum Teil größer als die für die angegebenen Variablen zu messenden Unterschiede. Die von anderen Autoren [118] gefundenen Isotopeneffekte von 5 bis 10 % konnten nicht bestätigt werden.

Einen ^{14}C -Isotopeneffekt ungewöhnlicher Größenordnung fand Rabinowitz [119] für die enzymatische Oxidation von $[^{14}C]$ -Formiat durch Ameisensäure-Dehydrogenase: bei $37^\circ C$ 1,27, unabhängig von der zwischen 0,8 bis 100 $\mu\text{Ci}/\text{m mol}$ variierten Substrataktivität.

Die zu Pyruvat führende Decarboxylierung von Oxalacetat durch ein Enzym aus *Micrococcus lysodeikticus* ergibt keinen Isotopeneffekt am ^{13}C -markierten Substrat. Die Mn(II)-katalysierte, nicht-enzymatische Decarboxylierung dagegen ergibt einen Isotopeneffekt von 1,06; Lösungsmittel-Isotopeneffekte in D_2O deuten auf einen anderen limitierenden Schritt als die eigentliche Decarboxylierung [120].

Eingegangen am 5. August 1965,
ergänzt am 22. Juli 1966 [A 544]

[123] H. H. Daron, W. J. Rutter u. I. C. Gunsalus, Biochemistry 5, 895 (1966).

[124] H. Simon u. G. Müllhofer, unveröffentlicht.