

SEKUNDÄRE D-ISOTOPIEEFFEKTE BEI DER HYDROLYSE VON *p*-NITROACETANILID

G. KÜLLERTZ, G. FISCHER und A. BARTH*

Sektion Biowissenschaften, Wissenschaftsbereich Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle Halle/Saale,
Domplatz 1, DDR

(Received in Germany 9 June 1975; Received in the UK for publication 21 October 1975)

Zusammenfassung—Die Hydroxylionen katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitroacetanilid und *p*-Nitroacetanilid-1-d₃ wurde zwischen pH 11.5 und 13.5 bei 30°C untersucht. Die Grösse des sekundären Isotopieeffektes in der komplexen Geschwindigkeitskonstante k_{kor} ändert sich mit der Hydroxylionenkonzentration. Der inverse Isotopieeffekt bei grossen Hydroxylionenkonzentrationen (${}^Hk_{kor}/{}^Dk_{kor} = 0.87 \pm 0.05$) und der bei verminderten Hydroxylionenkonzentrationen (${}^Hk_{kor}/{}^Dk_{kor} = 1.08 \pm 0.04$) werden auf der Basis einer Änderung des geschwindigkeitsstimmenden Schrittes diskutiert.

Abstract—The OH⁻-catalysed hydrolysis of *p*-nitroacetanilide and *p*-nitroacetanilide-1-d₃ has been studied between pH 11.5 and 13.5 at 30°. The value of the secondary isotope effect is changed with respect to the OH⁻-concentration. The inverse isotope effects at high OH⁻-concentrations (${}^Hk_{kor}/{}^Dk_{kor} = 0.87 \pm 0.05$) and the opposite effects in the lower OH⁻-concentration ranges (${}^Hk_{kor}/{}^Dk_{kor} = 1.08 \pm 0.04$) are discussed on the basis of change in the rate limiting step.

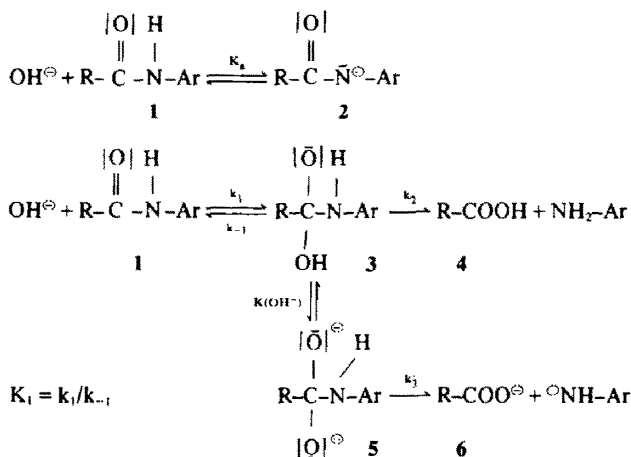
Die durch Hydroxylionen katalysierte Spaltung von Acetaniliden ist eine im Mechanismus weitgehend aufgeklärte Reaktion eines Amides.

Eingehende Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Ringsubstituenten¹⁻⁴ als auch die Veränderung des Acylrestes⁵⁻⁷ sowie die Variation des Lösungsmittels⁸⁻¹⁰ führten zur Formulierung des folgenden Hydrolysemechanismus.

niedriger und hoher OH⁻-Konzentrationen (relativ zu k) vereinfachen lässt.²¹

$$k_{kor} = \frac{k_1(k_2 + k_3 \times OH^\ominus)OH^\ominus}{k_1 + k_2 + k_3 \times OH^\ominus} \quad (I)$$

Die als Modells substrat für Proteasen vielfach verwendeten *p*-Nitroanilide^{1,9,22-25} verhalten sich bei der



Das Anilid 1 wird im basischen Milieu in einer reversiblen Nebenreaktion unter Bildung eines unreaktiven Ions^{2,12} deprotoniert; dieses Gleichgewicht wird durch die Konstante K_1 beschrieben.

Der Bildung des Monoanions 3 des durch die OH⁻-Addition an die Carbonylgruppe entstandenen tetraedrischen Zwischenproduktes 3 ist bei hohen OH⁻-Konzentrationen die Dissoziation in ein Dianion 5 überlagert. Der Zerfall der beiden anionischen Intermediate führt über voneinander verschiedene Übergangszustände letztlich zu identischen Reaktionsprodukten.

Unter der Voraussetzung $k_3 = k_2K$ gilt das kinetische Modell in Gleichung (I)⁹ das sich in den Grenzbereichen

Hydrolyse 1. Ordnung (in Bezug auf die OH⁻-Ionen) wie andere Anilide, während der spontane Zerfall des Dianions anomal verläuft. Um näheren Einblick in die Geometrie der Übergangszustände beider Hydrolysewege zu erhalten, haben wir die OH⁻-Katalyse von CH₃-CO-NH-Ar-NO₂ mit der der deuterierten Verbindung CD₃-CO-NH-Ar-NO₂ verglichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Tabelle 1 sind die Geschwindigkeitskonstanten und die Isotopieeffekte ${}^Hk/{}^Dk$ bei verschiedenen OH⁻-Konzentrationen aufgeführt.

Bei Auftragung von $\log k_{kor}$ gegen $\log (OH^-)$ wird in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Pollack und

Tabelle 1.

$(\text{OH}^-), \text{M}$	$k_{\text{neob}}, \text{sec}^{-1}$	R	$Dk_{\text{neob}}, \text{sec}^{-1}$	R	$k_{\text{kor}}, \text{sec}^{-1}$	$Dk_{\text{kor}}, \text{sec}^{-1}$	$k_{\text{kor}}^{\text{H}}/k_{\text{kor}}^{\text{D}}$
5.22×10^{-1}	$1.33 \pm 0.01 \times 10^{-3}$	7	$1.46 \pm 0.01 \times 10^{-3}$	7	$1.95 \pm 0.04 \times 10^{-3}$	$2.15 \pm 0.04 \times 10^{-3}$	0.91 ± 0.04
2.22×10^{-1}	$9.63 \pm 0.01 \times 10^{-4}$	9	$1.09 \pm 0.01 \times 10^{-3}$	9	$1.16 \pm 0.01 \times 10^{-3}$	$1.31 \pm 0.01 \times 10^{-3}$	0.89 ± 0.02
1.46×10^{-1}	$4.86 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	7	$4.88 \pm 0.03 \times 10^{-4}$	7	$5.50 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	$5.52 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	1.00 ± 0.03
1.01×10^{-1}	$3.12 \pm 0.01 \times 10^{-4}$	8	$3.30 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	8	$3.41 \pm 0.02 \times 10^{-4}$	$3.50 \pm 0.12 \times 10^{-4}$	0.97 ± 0.02
7.35×10^{-2}	$2.02 \pm 0.03 \times 10^{-4}$	8	$1.96 \pm 0.01 \times 10^{-4}$	7	$2.16 \pm 0.02 \times 10^{-4}$	$2.09 \pm 0.01 \times 10^{-4}$	1.03 ± 0.02
3.85×10^{-2}	$5.95 \pm 0.21 \times 10^{-5}$	8	$5.87 \pm 0.32 \times 10^{-5}$	7	$6.16 \pm 0.22 \times 10^{-5}$	$6.08 \pm 0.17 \times 10^{-5}$	1.01 ± 0.02
1.00×10^{-2}	$3.98 \pm 0.01 \times 10^{-6}$	10	$3.69 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	12	$4.02 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	$3.72 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	1.08 ± 0.02
5.22×10^{-3}	$1.31 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	10	$1.21 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	10	$1.32 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	$1.22 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	1.08 ± 0.03

R = Anzahl der Reproduktionen.

$k_{\text{kor}} = k_{\text{neob}}[1 + K_a(\text{OH}^-)]$.

$K_a = 0.906 \pm 0.05$.

$pK_a = 13.88$ bei 30°C .

Bender¹ bei $p_H > 13$ ein Anstieg von 1 und unterhalb dieser Hydroxylionenkonzentration ein Anstieg von 2 gefunden (Abb. 1).

Pollack und Dumsha¹² konnten zeigen, dass dieser Anstieg von 2 unterhalb $p_H 11.5$ wieder in einen Anstieg von 1 übergeht. Nach Gleichung (I) muss gelten: für einen Anstieg von 1 über $p_H 13$; $k_{\text{kor}} = k_1 \times (\text{OH}^-)$; für einen Anstieg von 1 unter $p_H 11.5$; $k_{\text{kor}} = K_1 \times k_2 \times (\text{OH}^-)$; und für einen Anstieg von 2 zwischen $p_H 11.5$ und 13 $k_{\text{kor}} = K_1 \times K \times k_3 \times (\text{OH}^-)^2 = K_1 \times k_3 (\text{OH}^-)^2$.

Die beobachteten, deutlich differenzierten Isotopieeffekte lassen sich näherungsweise den 3 geschwindigkeitsbestimmenden Schritten zuordnen (Abb. 2), wobei k_3 als geschwindigkeitsbestimmender Schritt nur im Übergangsbereich beobachtet wird.

Für die einzelnen Schritte ergeben sich:

$$k_1^{\text{H}}/k_1^{\text{D}} = 0.90 \pm 0.03$$

$$K_1^{\text{H}} \times K^{\text{H}} \times k_3^{\text{H}}/K_1^{\text{D}} \times K^{\text{D}} \times k_3^{\text{D}} = 1.00 \pm 0.03$$

$$K_1^{\text{H}} \times k_2^{\text{H}}/K_1^{\text{D}} \times k_2^{\text{D}} = 1.08 \pm 0.03.$$

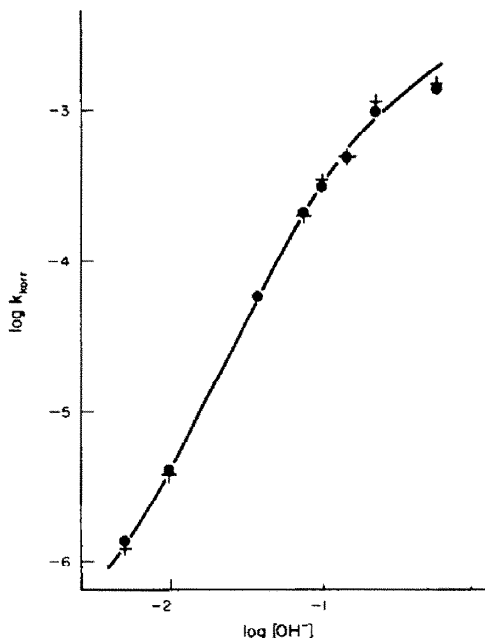


Abb. 1. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{kor} der Hydrolyse von *p*-Nitroacetanilid (●) und *p*-Nitroacetanilid-1-d, (+) von der OH^- -Konzentration.

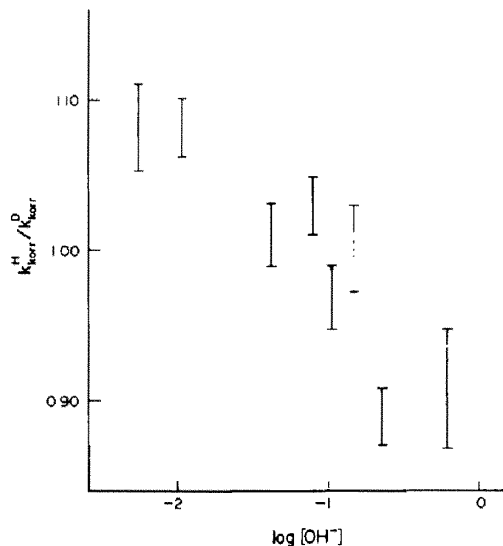


Abb. 2. Abhängigkeit des sekundären kinetischen D-Isotopieeffektes der Hydrolyse von *p*-Nitroacetanilid von der OH^- -Ionenkonzentration.

Der inverse kinetische Isotopieeffekt in k_1 steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass bei produktähnlichen Übergangszuständen die Addition von Nucleophilen an Carbonylgruppen in Nachbarschaft zu CD_3 -Gruppen erleichtert ist. So zeigt die wasserkatalysierte Addition von H_2O an die β -Carbonylgruppe von $\text{CD}_3\text{-CO-CONH}_2$ einen kinetischen Isotopieeffekt von $k_1^{\text{H}}/k_1^{\text{D}} = 0.89 \pm 0.03$, der fast dem thermodynamischen Isotopieeffekt der gleichen Addition entspricht ($K^{\text{H}}/K^{\text{D}} = 0.85 \pm 0.01$).²⁸

Die komplexe Zusammensetzung des kinetischen Isotopieeffektes erschwert die Zuordnung zu k_2 bzw. k_3 . Unter der Voraussetzung, dass das Dissoziationsgleichgewicht $K^{\text{H}}/K^{\text{D}}$ nur einen sehr kleinen Isotopieeffekt aufweist, folgt, $k_3^{\text{H}}/k_3^{\text{D}} < k_2^{\text{H}}/k_2^{\text{D}}$.

Die Abspaltung von Arylamin aus 3 verläuft säurekatalysiert mit einem aus einer Brönstedt-Auftragung geschlossenen weitgehend produktanalogen Übergangszustand.²⁶ Wir berechnen einen Isotopieeffekt $k_2^{\text{H}}/k_2^{\text{D}} = 1.20$ der aus der Überlegung resultiert, dass

$$K_1^{\text{H}}/K_1^{\text{D}} = (k_1^{\text{H}}/k_1^{\text{D}})(k_2^{\text{D}}/k_2^{\text{H}}) = 0.9 \times (k_2^{\text{D}}/k_2^{\text{H}})$$

ist, wobei berücksichtigt wird, dass $k_2^{\text{D}}/k_2^{\text{H}}$ stets ≤ 1 ist.

Der Wert von $k_2^{\text{H}}/k_2^{\text{D}} \cong 1.20$ liegt nahe der oberen

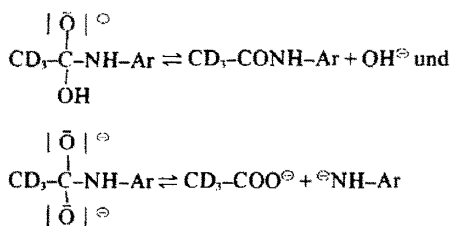
Grenze für solvolytische Dissoziationsreaktionen an gesättigten C-Atomen mit einer weitgehenden Carbo-niumstruktur im Übergangszustand.²⁷

Berücksichtigt man, dass die Carboxylamidstruktur den Carboniumionencharakter und damit den maximal möglichen kinetischen Isotopieeffekt weiter vermindert, lässt sich für K_1^H/K_1^D ein Bereich von 0.87–0.90 errechnen. Dieser Wert stimmt mit dem thermodynamischen Isotopieeffekt der H_2O -Addition an Brenztraubensäureamid annähernd überein.

Für k_1^H/k_1^D folgt dann ein Isotopieeffekt von 1.00 bis 1.03, was auf eine nur wenig ausgeprägte Carboniumionenstruktur bei der OH^- -Abspaltung im Übergangszustand hinweist.

Die Dissoziation des stark basischen Anions **5** in **6** sollte einen der OH^- -Abspaltung aus **2** ähnliche Aktivierungscharakteristik besitzen. Der Wert für $k_3^H/k_3^D = 1.00/(10.90-0.87) = 1.10$ bis 1.15 ist ohne Kenntnis des thermodynamischen Isotopieeffektes K_3^H/K_3^D schwierig interpretierbar.

Vergleicht man die kinetischen Isotopieeffekte in k_1 und k_3 , muss man berücksichtigen, dass der thermodynamische Isotopieeffekt für die Bruttoreaktionen verschieden und auf jeden Fall für die Addition des N-Nucleophilen grösser ist.²⁸



Nimmt man einen thermodynamischen Isotopieeffekt von 1.26 an, (für das Dissoziationsgleichgewicht des Adduktes aus Semicarbazid bzw. Hydroxylamin mit der β -Carboxylgruppe von Brenztraubensäureamid wurden thermodynamische Isotopieeffekte von 1.37 ± 0.13 bzw. 1.26 ± 0.05 gefunden²⁹) lässt sich die Lage des Übergangszustandes für die Dissoziation des Dianions **5** in die Reaktionsprodukte **6** als mehr produktähnlich abschätzen. Dies steht in Übereinstimmung mit dem beobachteten grossen Einfluss der Ringsubstituenten auf die Abspaltung des Arylamid-Anions.¹

EXPERIMENTELLER TEIL

p-Nitroacetanilid wurde durch Acylierung von *p*-Nitroanilin mit Essigsäureanhydrid, die deuterierte Verbindung mit 99.9% deuteriertem Essigsäureanhydrid dargestellt und mehrfach aus Alkohol umkristallisiert.

Fp. *p*-Nitroacetanilid 214°C (214°C²⁹); *p*-Nitroacetanilid-3-d, 213°C. PMR-Untersuchungen zeigten einen D-Gehalt = 98% in der Methylgruppe des deuterierten Anilids. Im IR-Spektrum (Beckman IR 12) war ein Isotopieeffekt auf die CO und NH-Schwingungen nachweisbar (25°C; Toluol): *p*-Nitroacetanilid $\nu_{\text{NH}} = 3412\text{--}13\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C=O}} = 1709\text{--}10\text{ cm}^{-1}$; *p*-Nitroacetanilid-3-d $\nu_{\text{NH}} = 3411\text{--}12\text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C=O}} = 1708\text{ cm}^{-1}$.

Auch Diäthylketon-2,2,4,4-d₄ zeigt eine um 6 cm^{-1} niedrigere Carbonylfrequenz als sein nichtdeuteriertes Analoges.²⁰ Alle kinetischen Messungen wurden bei 30°C durchgeführt, der p_H mit

KOH eingestellt und potentiometrisch gemessen (Glaselektrode G202B; Kalomelektrode K4112). Die Ionenstärke betrug bei den Messungen konstant 0.52 (KCl), die Geschwindigkeit der Hydrolyse wurde anhand der Extinktionszunahme bei 390 nm mit dem Spektralphotometer Unicam SP800 verfolgt. Die Anilidkonzentration in der Küvette (2×10^{-4} – 3×10^{-3}) wurde durch Verdünnung von Stammlösungen (1×10^{-1} M) eingestellt. Die Geschwindigkeitskonstanten, die alle nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt wurden, sind unter Einbeziehung der NH_4^+ -Dissoziation nach der Gleichung $k_{\text{corr}} = k_{\text{beob}} (1 + K_a \times OH^-)$ korrigiert. Die Dissoziationskonstante K_a der Anilide wurde spektrophotometrisch bei 310 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Anilidations ϵ_A ist bei dieser Wellenlänge grösser als der der undissoziierten Verbindung ϵ_{HA} ($\epsilon_A/\epsilon_{HA} = 1.19$). Eine Auftragung von $(E_0 - E_{OH})/(OH^-)$ gegen E_{OH} ergibt als Anstieg K_a .²⁹ Die Extinktion E_0 entspricht dem nichtionisierten Anilid und E_{OH} der Extinktion, die in Abhängigkeit von der Hydroxylionenkonzentration, auf $t=0$ extrapoliert, gemessen wurde. Die Extinktionskoeffizienten bei 390 und 310 nm waren für *p*-Nitroacetanilid und sein deuteriertes Analoges gleich. Für die Dissoziationskonstanten konnte kein Isotopieeffekt nachgewiesen werden (${}^H K_a/{}^D K_a = 0.998$; je 30 Reproduktionen).

LITERATUR

- ¹R. M. Pollack und M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 7190 (1970).
- ²R. H. De Wolfe und R. C. Newcomb, *J. Org. Chem.* **36**, 3870 (1971).
- ³V. Gani und P. Viout, *Tetrahedron Letters* 5241 (1972).
- ⁴C. E. Stauffer, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 7887 (1972).
- ⁵P. D. Bolton und G. L. Jackson, *Aust. J. Chem.* **24**, 969 (1971).
- ⁶T. Yamahara, A. Tsuji und Y. Mizukami, *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 721 (1973).
- ⁷R. M. Pollack und T. C. Dumsha, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 4463 (1973).
- ⁸T. J. Broxton und L. W. Deady, *Tetrahedron Letters* 3915 (1973).
- ⁹R. M. Pollack, *J. Org. Chem.* **39**, 2108 (1974).
- ¹⁰T. J. Broxton, L. W. Deady und P. R. A. Williamson, *Aust. J. Chem.* **27**, 1053 (1974).
- ¹¹F. M. Menger und J. A. Donohue, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 432 (1972).
- ¹²R. M. Pollack und T. C. Dumsha, *FEBS Letters* **38**, 292 (1974).
- ¹³E. A. Halevi, "Secondary isotope effects", *Progr. Phys. Org. Chem.* **1**, 109 (1963).
- ¹⁴Y. Pocker, *J. Phys. Chem.* **73**, 2879 (1969).
- ¹⁵E. M. Arnett und T. Cohen, *Chem. and Industrie* (London) 473 (1969).
- ¹⁶H. Bull und E. H. Cordes, *J. Org. Chem.* **36**, 1345 (1971).
- ¹⁷G. Lamaty, *Tetrahedron Letters* **57**, 5015 (1970).
- ¹⁸G. Lamaty, *Tetrahedron Letters* **57**, 5015 (1970).
- ¹⁹J. M. Jones und M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6322 (1960).
- ²⁰J. W. Baker, *Tetrahedron* **5**, 135 (1959).
- ²¹R. Borsdorf und M. Scholz, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Akademie-Verlag, Berlin (1968).
- ²²A. Bruylants, *Chimia* **27**, 428 (1973).
- ²³G. Feinstein, A. Kupfer und M. Sokolovsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**, 1020 (1973).
- ²⁴M. L. Bender und M. Philipp, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 1665 (1973).
- ²⁵J. Bieth und C. G. Wermuth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 383 (1973).
- ²⁶U. Femfert und G. Pfeleiderer, *FEBS Letters* **8**, 65 (1970); *Ibid.* **14**, 89, (1971).
- ²⁷D. Drake, R. L. Schowen und H. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 454 (1971).
- ²⁸E. H. Cordes und H. G. Bull, *Chemical Reviews* **74**, 581 (1973).
- ²⁹G. Fischer G. Küllertz und A. Schellenberger, in Vorbereitung.
- ³⁰R. W. Ramette, *J. Chem. Educ.* **44**, 647 (1967).