

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen. Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen)

1-N-Morpholino-3,4-dihydro-naphthalin und 2-N-Morpholino-3,4-dihydro-naphthalin (Literaturberichtigung)*

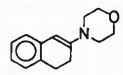
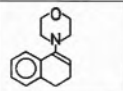
1961¹ wurde in einer Arbeit über die Reaktion von Arylaziden mit verschiedenen Enaminen 1-Morpholino-3,4-dihydro-naphthalin (II) beschrieben; die Arbeit inkl. II wurde in *Chem. Abstr.* 56 (1962) 14019g referiert. Es hat sich bei der Nachbearbeitung ergeben, daß durch ein Versehen die früher¹ angegebenen Daten sich nicht auf II, sondern auf das entsprechende Derivat I des β -Tetralons beziehen². Dies soll hiemit richtiggestellt sein; II wurde aus α -Tetralon hergestellt; die physikalisch-chemischen Daten sind in der Tabelle zusammengestellt. Für die Herstellung von I und II aus den entsprechenden Tetralonen und Morpholin wurde die Methode mit TiCl_4 ³ eingesetzt.

* Eingegangen am 20. September 1972.

¹ R. FUSCO, G. BIANCHETTI und D. POCAR, *Gazz. Chim. Ital.* 91 (1961) 849.

² I wurde seither auch beschrieben von U. K. PANDIT, S. A. G. DE GRAAF, C. T. BRAAMS und J. S. T. RAAPHORST, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 91 (1972) 799.

³ W. A. WHITE und H. WEINGARTEN, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 213.

		Smp.	Kp.	UV-Abs.-Spektrum in Alkohol (E)	$\nu_{C=C}$ (CH_2Cl_2 -Lösung)
I		56-58°	214°/15 Torr	213 nm (13 500) 226 nm (12 200) 296 nm (18 900)	1619 cm^{-1}
II		53-55°	186°/15 Torr	231 nm (10 600) 277 nm (4 095)	1625 cm^{-1}

2-N-Morpholino-3,4-dihydro-naphthalin (I): Zu einer Lösung von 14,8 g β -Tetralon und 44,4 g Morpholin in 135 ml Benzol wurden unter Rühren innerhalb von 15 min 10,95 g TiCl_4 gelöst in 15 ml Benzol getropft. Die Reaktionstemperatur stieg dabei auf 70°. Die braunrot gefärbte Suspension wurde 18 Std. unter Rühren gekocht. Nach dem Abkühlen auf 20° wurden 50 ml Wasser zugesetzt und die ungelösten Anteile durch ein Hyflofilter abgenutscht. Nach dem Eindampfen der benzolischen Phase des Filtrats destillierte man im Claisen-Kolben;

Kp. 211 bis 214°/15 Torr (Badtemperatur 240 bis 260°); Ausbeute 13,42 g (56% der Theorie, bezogen auf β -Tetralon). Aus Äther-Hexan 10,98 g gelbliche Prismen, Smp. 56 bis 58°.

$C_{14}H_{17}NO$ Ber. C 78,1 H 8,0 N 6,5 O 7,4%
(215,3) Gef. C 78,3 H 8,0 N 6,5 O 7,6%

1-N-Morpholino-3,4-dihydro-naphthalin (II): Aus 10 g α -Tetralon, 30 g Morpholin in 90 ml Benzol wurden mit 7,4 g $TiCl_4$ in 10 ml Benzol unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen 12,5 g Enamin II (86% der Theorie, bezogen auf α -Tetralon) erhalten; Kp. 186°/15 Torr (Badtemperatur 210°); aus Hexan gelbliche Prismen, Smp. 52 bis 55°.

$C_{14}H_{17}NO$ Ber. C 78,1 H 8,0 N 6,5%
(215,3) Gef. C 77,9 H 8,1 N 6,3%

Die Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind nicht korrigiert. Die UV-Spektren wurden auf einem Zeiß-Gerät PMQ-2 (Absorptionsmaxima) und einem Perkin-Elmer-Gerät 137-UV (Gesamtspektren) ausgemessen. Die IR-Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer-Gerät PE 21 (NaCl-Prisma) aufgenommen.

R. FUSCO, H. P. HÄRTER, U. STAUSS und O. SCHINDLER

Istituto di Chimica industriale organica dell'Università, Milano,
und Forschungsinstitut Wander AG, 3001 Bern

Transient Nutations in $^1H\{^{14}N\}$ Nuclear Magnetic Double Resonance*

Summary

Transient nutations in $^1H\{^{14}N\}$ nuclear magnetic double resonance are described. The high symmetry of the ammonium, tetramethylammonium and tetraethylammonium cations allowed the detection of two different types of transient nutations. One is produced by the INDORE technique with fast passage of the $\{^{14}N\}$ frequency, the other by a sudden increase of the decoupling field H_2 . The influence of the quadrupole relaxation prevents the observation of $^1H\{^{14}N\}$ transient nutations in larger and less symmetrical ammonium cations.

Introduction

As a phenomena of transient nature in nuclear magnetic resonance TORREY¹ described transient nutations by applying radio frequency power in the form of pulses in the neighbourhood of resonance. The nature of the nutations is explained by the transient solution of the BLOCH equations.

Such transient nutations may be observed whenever the monitoring field H_1 is rapidly changed. The nutation frequency ν_T is given by

$$\nu_T = [(\gamma_1 H_1 / 2\pi)^2 + (\nu_0 - \nu_1)^2]^{1/2} = \gamma_1 H_{\text{eff}} / 2, \quad [1]$$

where ν_0 is the resonance frequency and γ_1 the gyromagnetic factor of the observed nucleus.

Under the condition of exact resonance these nutations furnish a simple method for the measurement of the effective intensity of the radio frequency field H_1 ².

In a frame of reference rotating with the frequency ν_1 the magnetization vector precesses about the effective field H_{eff} and is subject to both spin-spin and spin-lattice relaxation, being damped with a time constant given by

$$T^{-1} = 1/2 [T_1^{-1} + T_2^{-1}]. \quad [2]$$

This characteristic damped oscillation is readily distinguished from the "wiggles" in many conventional spectra by virtue of constant frequency.

FERRETTI and FREEMAN³ observed similar transient nutations in $^1H\{^1H\}$ double resonance experiments. A characteristic decaying oscillation is detected whenever

the double resonance frequency ν_2 passes through a line that shares an energy level with the monitored transition. The sign of the transient oscillation provides a clear distinction between progressively and regressively connected transitions.

Further examples of transient nutations were demonstrated in $^1H\{^{13}C\}$ heteronuclear double resonance experiments and have supplied accurate ^{13}C shift determinations^{4, 5}.

This paper describes transient nutations in $^1H\{^{14}N\}$ double resonance experiments.

Results and Discussion

Transient nutations in nuclear magnetic resonance are only feasible if the condition of adiabatic passage through resonance is approached but not adequately fulfilled³. The extensive broadening of the ^{14}N resonance under the influence of the quadrupole relaxation⁶ virtually precludes the satisfaction of the fast adiabatic passage conditions. The NH_4^+ cation with its symmetrical environment about the nitrogen and its large $^{14}N-^1H$ coupling ($J_{^{14}N-^1H} = 52.8$ Hz) only is suitable for $^1H\{^{14}N\}$ transient double resonance experiments. BAKER⁷ has investigated the NH_4^+ system by means of the $^1H\{^{14}N\}$ INDORE technique. Since he made use of the tickling effect, he observed dips in the monitored line.

The $^1H\{^{14}N\}$ INDORE spectrum shown in Fig. 1 was recorded with the monitoring radio frequency maintained at exact resonance for the central line of the proton triplet of NH_4^+ with the level H_1 set well above

* Received October 10, 1972.

¹ H. C. TORREY, *Physic. Rev.* 76 (1949) 1059.

² J. S. LEIGH, *Rev. Sci. Instr.* 39 (1968) 1594.

³ J. A. FERRETTI and R. FREEMAN, *J. Chem. Physics* 44 (1966) 2054.

⁴ F. W. WEHRLI and W. SIMON, *Helv. Chim. Acta* 53 (1970) 1612.

⁵ D. ZIESSOW and E. LIPPERT, *J. Mol. Struct.* 2 (1968) 248.

⁶ E. W. RANDALL and D. C. GILLIES, *Progr. NMR Spectrosc.* 6 (1971) 119.

⁷ E. B. BAKER, *J. Chem. Physics* 37 (1962) 911.

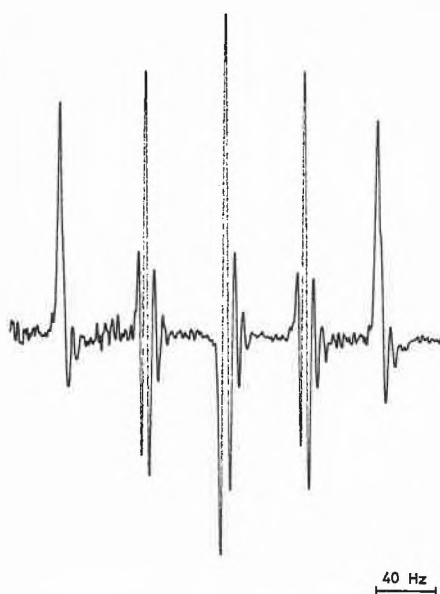


Fig. 1. $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ INDOR spectrum of NH_4NO_3 ;
 $\gamma_{^1\text{H}} \cdot H_1 / 2\pi = 0.69 \text{ Hz}$, $\gamma_{^{14}\text{N}} \cdot H_2 / 2\pi = 2 \text{ Hz}$, $d\nu_2/dt = 6 \text{ Hz/sec}$

saturation ($\gamma_{^1\text{H}} \cdot H_1 / 2\pi = 0.69 \text{ Hz}$), and the second radio frequency swept through the ^{14}N spectrum.

This spectrum is explained by the superposition of the effect of tickling and transient nutation. No pure transient nutations could be obtained. The intensities of the five lines largely depend on the amplitudes of the radio frequency fields H_1 and H_2 and the sweep rate $d\nu_2/dt$. Only if pure tickling conditions are observed (low saturation level of H_1 , H_2 at medium power, slow passage of ν_2) a real replica of the ^{14}N spectrum with intensities 1 : 4 : 6 : 4 : 1 is produced^{6,7}.

The $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ INDOR technique was widely employed for the indirect detection of ^{14}N resonances^{6,8,9,10}. In all these cases (except NH_4^+) the irradiation amplitude H_2 was kept as high as required for spin decoupling. The $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ decoupling INDOR experiment of $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ showed that only a slight increase of the sweep rate of ν_2 caused some oscillation in the tail of the INDOR signal. A properly resolved transient nutation could be recorded by further increasing the strength of H_1 and the sweep rate of the decoupling frequency. In Fig. 2 the two forms of $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ INDOR spectra of $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ are shown. In Fig. 2a the experiment was performed in a quasi-stationary way with moderate intensity of H_1 and slow passage of the decoupling frequency ν_2 ; whereas in Fig. 2b conditions of fast passage were approached.

The $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ cation was the only example which enabled the detection of the described $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ transient nutation. The influence of the quadrupole relaxation prevented fast passage in a series of tetraalkylammonium iodides⁸ as well as in substituted N-alkylpyridinium cations^{9,10}.

Further $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ transient nutations were produced in a manner which is more similar to the type of oscillations

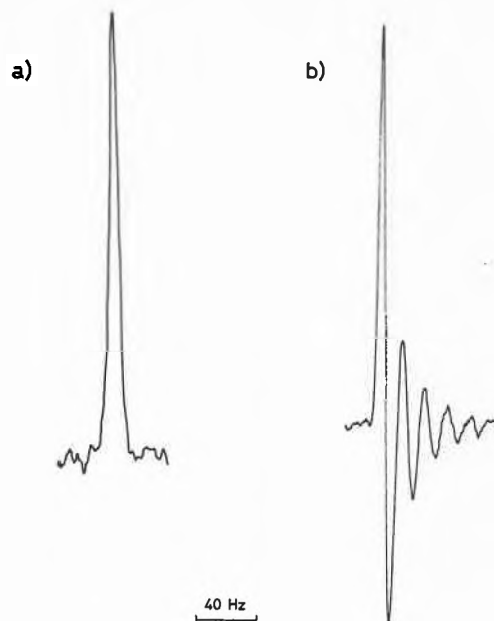


Fig. 2. $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ INDOR spectra of $^+\text{N}(\text{CH}_3)_4$
 a) $\gamma_{^1\text{H}} \cdot H_1 / 2\pi = 0.36 \text{ Hz}$, $\gamma_{^{14}\text{N}} \cdot H_2 / 2\pi = 8 \text{ Hz}$, $d\nu_2/dt = 1.2 \text{ Hz/sec}$
 b) $\gamma_{^1\text{H}} \cdot H_1 / 2\pi = 1.06 \text{ Hz}$, $\gamma_{^{14}\text{N}} \cdot H_2 / 2\pi = 2 \text{ Hz}$, $d\nu_2/dt = 6 \text{ Hz/sec}$

described by TORREY¹. The monitoring frequency ν_1 was kept at a saturating value of radio frequency power and was maintained at resonance of the centre of the proton signal split or broadened by ^{14}N - ^1H coupling. The irradiating frequency ν_2 , adjusted exactly to the ^{14}N resonance in question, was rapidly increased to decoupling power. The transient signal was drawn by the recorder of the spectrometer driven with a speed of 5 mm/sec. Fig. 3 shows the recorder traces of four typical oscillations. Following the transient signal the base line is raised because the intensity of the monitored proton signal is enhanced by spin decoupling.

These transient phenomena may be explained by the precession of the magnetization vector about the effective field H_{eff} modified by the decoupling field H_2 . The relaxation times of the monitored protons are responsible for the time constants of the damped oscillations. The influence of the spin-lattice relaxation time of the ^{14}N nucleus on the relaxation of the neighboring protons is evidenced as postulated for a nucleus with an electric quadrupole moment¹¹.

Fig. 3a and 3b indicate the temperature effect on the quadrupole relaxation given by the formula

$$T_1^{-1} = \frac{3}{8} e^4 \hbar^{-2} q^2 Q^2 \tau_c \quad [3]$$

for a nucleus of spin 1¹².

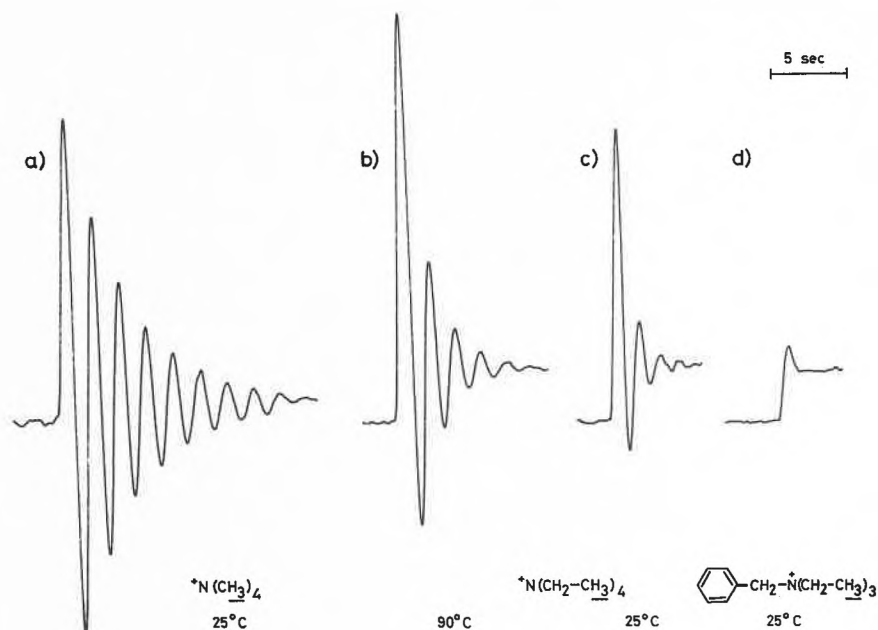
⁸ W. GIGER, Diss. ETH Zürich, 1971.

⁹ F. W. WEHRLI, W. GIGER, and W. SIMON, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 229.

¹⁰ W. GIGER, P. SCHAUECKER, and W. SIMON, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 2488.

¹¹ A. ABRAGAM, *The Principles of Nuclear Magnetism*, p. 331, Clarendon Press, Oxford (England) 1961.

¹² J. A. POPLE, *Molec. Physics* 1 (1958) 168.

Fig. 3. $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ transient nutations

The correlation time τ_c , which is a measure for the time required for molecular reorientation, may be expressed as,

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT}, \quad [4]$$

where η is the viscosity of the solution and a the radius of the considered particle.

An increase of temperature, as deduced from Equations [3] and [4], results in an increase of the relaxation time T_1 , because of the lower viscosity η and the inverse temperature $1/T$ in Eq. [4].

Considering the fact that the expression for the correlation time τ_c contains the cube of the ionic radius (Eq. [4]), a vastly different appearance of the decay functions of $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ and $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4^+$ is to be expected. This is clearly demonstrated in Fig. 3a and 3c.

The slower relaxation of the ^{14}N nucleus in $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ is also expressed in the proton spectrum. Whereas the proton signal of $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ is split due to the small ^{14}N - ^1H coupling ($J_{^{14}\text{N}-^1\text{H}} = 0.5$ Hz), the corresponding coupling between ^{14}N and the methylene protons in $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4^+$ is not resolved.

In the benzyl-triethyl-ammonium cation, finally, the quadrupole relaxation is so efficient that no oscillation is observed (Fig. 3d).

The larger size of the cation as well as the increased electric field gradient at the nitrogen contribute to the faster relaxation. Simultaneously the larger coupling between the ^{14}N and the methyl protons ($J_{^{14}\text{N}-^1\text{H}} \approx 2$ Hz) only broadens the signal of the methyl protons in $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2)(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$.

The method of $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ transient nutations supplies a simple opportunity to detect indirectly the relaxation time τ_1 of the ^{14}N nucleus by using a continuous wave

spectrometer equipped with heteronuclear INDOOR facilities.

Experimental

The $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ heteronuclear double resonance experiments were performed with a Bruker-Spectrospin HFX-10 spectrometer operating at 90 MHz for ^1H and at 6.49 MHz for ^{14}N . $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ INDOOR spectra were obtained by sweeping the double resonance frequency⁹. A sudden increase of radio frequency power (H_1 or H_2) was achieved by switching the radio frequency attenuation to the desired value.

The field strength of H_1 was determined by using TORREY oscillations of the resonance line of chloroform². The amplitude of the irradiating field H_2 , on the other hand, was measured by $^1\text{H}\{^{14}\text{N}\}$ tickling experiments of NH_4^+ ¹³.

Commercially available NH_4NO_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ and $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{J}$ (Fluka AG, Buchs, Switzerland) were used without further purification. $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2)(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{J}$ was prepared by reacting $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ and ethyl iodide in nitromethane. Recrystallization from acetone and ethyl acetate yielded a product of m.p. 163 to 164°C.

A saturated solution of NH_4NO_3 in H_2O acidified with HNO_3 (to minimize proton exchange) was examined. Field/frequency stabilization was effected via the water signal. 1 M solutions of the tetraalkylammonium iodides in D_2O were investigated with DSS as internal lock signal.

Acknowledgment

This work was carried out with the financial support of the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

The authors would like to thank Professor R. R. ERNST for valuable discussions.

WALTER GIGER and WILHELM SIMON

Laboratory for Organic Chemistry,
Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (Switzerland)

¹³ W. MCFARLANE and D. H. WHIFFEN, *Molec. Physics* 17 (1969) 603.

Modellreaktionen zum Mechanismus der Asparaginase aus *E. coli*

Summary

A molecular mechanism for the reactions catalyzed by asparaginase (EC3.5.1.1) was proposed, the essential features of which are the participation of the α -carboxyl-group of the substrates in the catalytic process and the intermediate formation of aspartic acid anhydride. As a nonenzymatic model reaction following essentially the same mechanisms we found the hydrolysis of monoamides of 1,8-naphthalenedicarboxylic acid which is considerably facilitated by the neighbouring COOH-group. The kinetics of the formation of 1,8-naphthalenedicarboxylic acid anhydride from different monoamides and of the hydrolysis of the anhydrides as well as its formation from the acid was investigated. This reaction is an outstanding example of the efficiency of approximation and orientation in a COOH-catalyzed intramolecular amide hydrolysis. The rate of hydrolysis of 1,8-naphthalenedicarboxylic acid propylamide is more than two orders of magnitude greater than for phthalic acid monoamide.

Für den molekularen Ablauf der durch Asparaginase (EC3.5.1.1) katalysierten Reaktionen haben wir einen Mechanismus vorgeschlagen¹, der im Gegensatz zu den Vorstellungen von SCHWARTZ und Mitarbeitern² nicht die intermediäre Bildung eines Acylenzyms annimmt, sondern durch die Beteiligung der α -Carboxylgruppe der Substrate an der Katalyse und das Auftreten von enzymgebundenem Asparaginsäureanhydrid als Zwischenprodukt gekennzeichnet ist (Abb. 1).

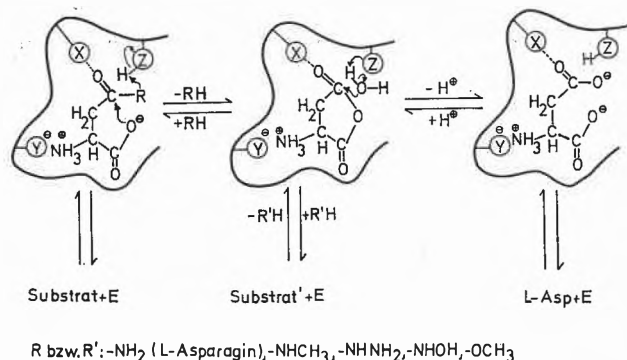


Abb. 1. Möglicher Mechanismus der *E. coli*-Asparaginase. Die Gruppen X, Y und Z des Enzyms sind noch nicht eindeutig identifiziert

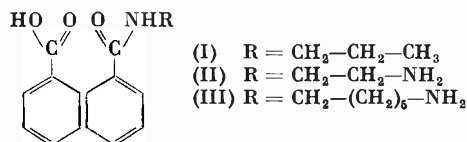
Dieser Vorschlag basiert:

1. auf den Ergebnissen kinetischer Studien mit einer Reihe von Substraten und Substratanalogen¹
2. auf Untersuchungen über die chemische Modifizierung von Aminosäuren des Enzyms und ihren Einfluß auf die katalytische Aktivität³
3. auf Modellreaktionen zur Carboxylgruppen-katalysierten Hydrolyse von Säureamidbindungen

Wir berichten in der vorliegenden Arbeit über unsere Modellstudien zur Asparaginase-Katalyse.

Bereits 1925 war BISTRZYCKI und RISI⁴ die Labilität von Halbamiden der Naphthalin-1,8-dicarbonsäure aufgefallen, die schon beim Stehen in kalter wäßriger Lösung in Naphthalsäureanhydrid übergehen. Wir haben

die Kinetik und pH-Abhängigkeit dieser Reaktion an drei Derivaten, dem N-Propyl-naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamid (I), dem N-(2-Aminoäthyl)amid (II) und dem N-(6-Aminohexyl)-amid (III) untersucht. Das präparativ schwer zugängliche Naphthalsäuremonoamid ($R = H$) wurde nicht berücksichtigt.



Material und Methoden

Naphthalsäureanhydrid (Schuchardt, München) wurde unter Zusatz von Aktivkohle zweimal aus Eisessig umkristallisiert.

Naphthalsäure und Naphthalimid wurden nach l.c.⁵ aus dem Anhydrid hergestellt.

N-Propyl-naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamid (I), N-(2-Aminoäthyl)-naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamid (II) und N-(6-Aminohexyl)-naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamid (III) wurden aus Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid und den entsprechenden Aminen in Aceton dargestellt⁴. Amid I wurde als Propylammoniumsalz erhalten.

Wegen ihrer Labilität und schlechten Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln außer 2,2,2-Trifluoräthanol lassen sich die Verbindungen nicht umkristallisieren. Bis auf Spuren des Anhydrids waren sie jedoch dünn-schichtchromatographisch (Laufmittel: *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/Wasser = 4:1:1:1:2:1) einheitlich. Sie zersetzen sich oberhalb 150°C. Ihre IR-Spektren und Elementaranalyse bestätigen die Struktur.

UV-Spektren in wäßriger Lösung; Naphthalsäure: $\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$, $\epsilon = 6,8 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$. Dianion $\epsilon = 7,6 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$. Naphthalsäurehalbamide: $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$, $\epsilon = 8,2 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$. Naphthalsäureanhydrid: $\lambda_{\text{max}} = 339 \text{ nm}$, $\epsilon = 12,9 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$. N-(2-Aminoäthyl)-naphthalimid: $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$, $\epsilon = 14 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$.

Auf Grund der verschiedenen Lage der Absorptionsmaxima ist es möglich, sowohl die Hydrolyse der Halbamide als auch des Anhydrids spektrophotometrisch zu verfolgen.

Kinetische Messungen

Alle Messungen wurden mit dem Spektralphotometer Beckman Acta III mit temperierbarem Küvettenhalter bei $40^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ durchgeführt. Bei pH-Werten unter 3,2 wurden 0,05 m Citrat/HCl-Puffer, sonst 0,01 m Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer (0,1 m an NaCl) verwendet. Die Anhydridbildung aus den Halbamiden kann unter pH 4 mit guter Näherung als Reaktion 1. Ordnung behandelt werden, da in diesem Bereich die Hydrolyse des Anhydrids zur Säure sowie die bei höheren pH-Werten auftretende Bildung zyklischer Imide nur wenig ins Gewicht fallen. Die Geschwindigkeitskonstanten k_b dieser Reaktion wurden aus der Extinktionszunahme bei 339 nm nach der Methode von GUGGENHEIM⁶ ermittelt. Die Auswertung nach diesem Verfahren bietet den Vorteil, daß man die durch die Folgereaktionen nicht eindeutig festzulegenden E_∞ -Werte nicht benötigt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_2

und k_{-2} der Reaktion $\text{Anhydrid} \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} \text{Säure}$ wurden aus der Gleichgewichtseinstellung zwischen vorgelegtem Anhydrid und der Dicarbonsäure bei 339 nm bestimmt⁷.

Ergebnisse und Diskussion

Die Spektralkinetik der Spaltung des Amids II unter Bildung des Anhydrids ist in Abb. 2 dargestellt. Bei fortschreitender Abnahme der Amidextinktion bei 296 nm steigt die Anhydridextinktion bei 339 nm unter Ausbildung eines isosbestischen Punktes bei 306 nm. Endprodukt der Reaktion ist bei pH 2,2 fast ausschließlich das Anhydrid, da das Gleichgewicht zwischen Säure und Anhydrid bei pH-Werten unter 4 weit auf Seiten des letzteren liegt.

Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 , der Hydrolyse des Anhydrids, sowie von k_{-2} , der Bildung des Anhydrids aus der Säure, ist in Abb. 3 dargestellt. Die pH-Abhängigkeit der Konstanten k_2 gibt die Katalyse der Anhydridhydrolyse durch Hydronium- bzw. Hydroxylionen wieder; die Geschwindigkeit der spontanen Anhydridbildung aus der freien Säure und damit die pH-Abhängigkeit von k_{-2} wird dagegen vom Dissoziationszustand der Carboxylgruppen bestimmt. Die pK -Werte dieser Gruppen haben wir durch potentiometrische Titration bei 25 °C in 20% Methanol zu $3,7 \pm 0,2$ für die erste und $6,2 \pm 0,1$ für die zweite Dissoziationsstufe bestimmt. Legt man die bei der Phthalsäure gefundene Temperaturabhängigkeit der pK -Werte zugrunde⁸, ergeben sich für 40 °C Werte von etwa 3,8 bis 3,9 bzw. 6,5 bis 6,6 und damit gute Übereinstimmung mit den kinetisch ermittelten Größen. Bemerkenswert ist, daß bereits die einfach protonierte Säure zu Anhydridbildung in der Lage ist.

Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der Anhydridbildung aus den von uns untersuchten Halbhamiden I, II und III geht aus Abb. 4 hervor. Der Verlauf der Kurven weist eindeutig auf Be-

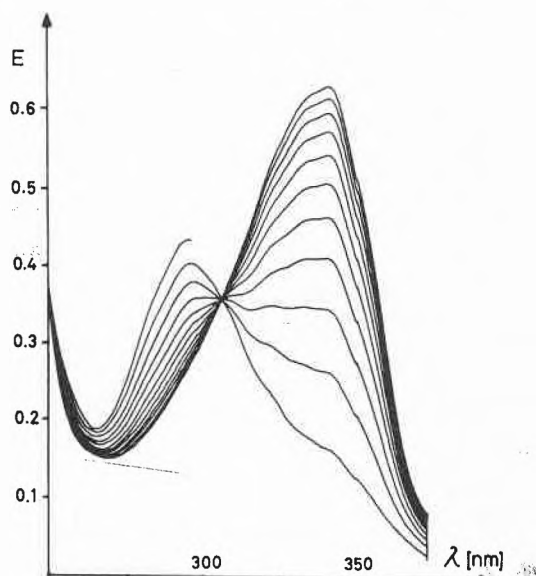


Abb. 2. Spektralkinetik der Hydrolyse des N-(2-Aminoäthyl)-naphthalin-1,8-dicarbonsäuremonoamids unter Bildung des Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrids, pH 2,2, $T = 40^\circ\text{C}$, Ausgangskonzentration des Amids $5,2 \cdot 10^{-5}\text{m}$ in 0,05m Citrat/HCl-Puffer. Die Messung der Kurven erfolgte im Abstand von 5 min

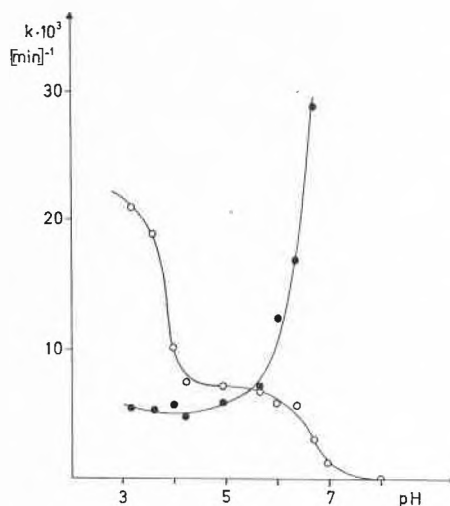


Abb. 3. pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_2 der Anhydridhydrolyse $\bullet$ — $\bullet$ und der Anhydridbildung k_{-2} aus der Säure $\circ$ — $\circ$. Weitere Einzelheiten s. Methoden

teilung der Carboxylgruppen an der Amidspaltung hin. Wegen der Schwerlöslichkeit der Halbamide in wäßriger Lösung und ihrer Labilität im sauren Bereich war eine potentiometrische Bestimmung des pK -Wertes der freien Carboxylgruppe nicht möglich. Die kinetischen pK -Werte der Amide I und III stimmen aber gut mit dem pK_1 der Naphthalsäure überein. Überraschend ist der Effekt der Aminogruppe in Amid II. Hier beobachtet man eine Erniedrigung des kinetischen pK -Wertes der Carboxylgruppe, die wahrscheinlich auf eine Wech-

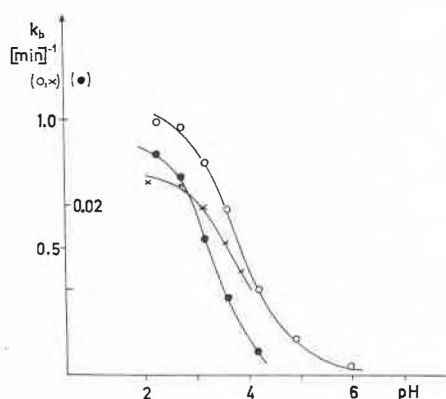
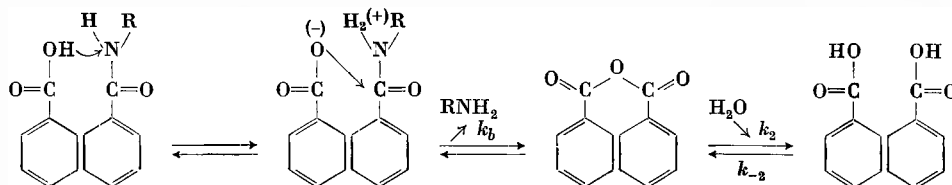


Abb. 4. Geschwindigkeitskonstanten k_1 der Bildung von Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid aus den Amiden I ($\circ$), II ($\bullet$) und III ($\times$) in Abhängigkeit vom pH-Wert

- ¹ K. H. RÖHM und F. SCHNEIDER, *Z. physiol. Chem.* 352 (1971) 1739.
- ² M. EHRLMAN, H. CEDAR und J. H. SCHWARTZ, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 88.
- ³ K. H. RÖHM, Dissertation, Marburg 1972.
- ⁴ A. BISTRZYCKI und J. RISI, *Helv. Chim. Acta* 8 (1925) 810.
- ⁵ A. BEHR und W. A. VAN DORP, *Liebigs Ann. Chem.* 172 (1874) 263.
- ⁶ E. A. GUGGENHEIM, *Phil. Mag.* 2 (1926) 538.
- ⁷ A. A. FROST und R. G. PEARSON, *Kinetics and Mechanism*, Wiley, New York 1961.
- ⁸ R. A. ROBINSON und R. H. STOKES, *Elektrolyte Solutions*, 2. Auflage, London 1959.

selwirkung zwischen dem Carboxylat-Ion und der protonierten Aminogruppe zurückzuführen ist. Die Folge ist eine Art Hemmung der Katalyse, was sich dadurch bemerkbar macht, daß das Amid II etwa 30 mal langsamer zum Anhydrid reagiert als I; dieser Effekt ist wegen des Abstandes der Aminogruppe in Amid III erwartungsgemäß viel weniger deutlich.

Unsere Messungen führen zu einem Mechanismus der Amidhydrolyse, der dem von uns vorgeschlagenen Mechanismus der *E. coli*-Asparaginase (Abb. 1) in wesentlichen Punkten völlig analog ist:



Wie bei allen bisher untersuchten COOH-katalysierten Amidhydrolysen ist auch bei den Naphthalsäurehalbamiden die undissoziierte Carboxylgruppe die katalytisch aktive Spezies. Wie THANASSI und BRUCE⁹ an einer Reihe von Halbestern der Phthalsäure gezeigt haben, wird intramolekulare Katalyse durch das Carboxylat-Anion nur dann beobachtet, wenn die Basizität der austretenden Gruppe gering ist, wie z. B. bei Phenylestern. Bei weniger reaktiven Estern und bei Amiden wird die Acylgruppe zunächst in einem vorgelagerten Gleichgewicht durch die Carboxylgruppe protoniert, worauf der nukleophile Angriff durch das Carboxylat-Ion unter Bildung eines Anhydrids erfolgt. Bei der enzymkatalysierten Reaktion nehmen wir an, daß die Übertragung eines Protons von einer Gruppe Z-H (vgl. Abb. 1) des Enzyms erfolgt, die nach vorliegenden Indizien ein Tyrosinrest sein könnte³. Dieselbe Gruppe würde im nächsten Reaktionsschritt wieder ein Proton vom Wasser übernehmen und im Sinne einer Basenkatalyse die Hydrolyse des Anhydrids beschleunigen.

Die spontane Zyklisierung der Naphthalsäure zum Anhydrid in wäßriger Lösung demonstriert besonders deutlich die außerordentlich günstige Orientierung und Fixierung der Carboxylgruppen in 1,8-Stellung des Naphthalins. Die Anhydridbildung ist bei dieser Ver-

bindung so begünstigt, daß ihre Geschwindigkeit im Säuren die der Anhydridhydrolyse weit übersteigt. Dieser Teil unserer Modellreaktion macht den durch Asparaginase katalysierten schnellen ¹⁸O-Austausch zwischen Asparaginsäure und H₂¹⁸O sowie die enzymatische Synthese des Hydroxamats aus Asparaginsäure und Hydroxylamin² verständlich.

Intramolekulare Katalyse der Hydrolyse von Estern und Amiden durch Carboxylgruppen ist in der Literatur an mehreren Beispielen beschrieben, die von JENCKS¹⁰ sowie BRUCE und BENCovic¹¹ kritisch verglichen wur-

den. Das vorliegende Beispiel stellt einen besonders günstigen Fall für eine solche Katalyse dar. So weist das Amid I bei pH-Werten unter drei und 40°C Halbwertszeiten von weniger als einer Minute auf und zerfällt damit um mehr als zwei Zehnerpotenzen schneller als das Halbamid der Phthalsäure¹². Die Bedeutung des Orientierungs- und Fixierungsfaktors für die hohe Effektivität der Enzymkatalyse, auf die BRUCE¹³ neuerdings wieder besonders hingewiesen hat, wird durch diese Modellreaktion erneut bewiesen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

K. H. RÖHM und FR. SCHNEIDER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Marburg
D-355 Marburg/Lahn (BRD)

⁹ J. W. THANASSI und T. C. BRUCE, *J. Amer. Chem. Soc.* 88 (1966) 747.

¹⁰ W. P. JENCKS, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York 1969.

¹¹ T. C. BRUCE und S. J. BENCovic, *Bioorganic Mechanisms*, Benjamin, New York 1966.

¹² M. L. BENDER, Y. L. CHOW und F. CLOUPEK, *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (1958) 5380.

¹³ T. C. BRUCE, in *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 36 (1971) 21.

Über
2000 Artikel
aus Kunststoff
sind im neuen
Semadeni-
Katalog!



GRATIS

Senden Sie uns/mir
Ihren neuen Katalog

Firma

Strasse

PLZ/Ort

Einsenden an:
A. Semadeni+Co., Postfach
3027 Ostermündigen