

224. C. N. Ionescu und I. Cotani: Über die Langenbeckschen Esterasemodelle.

Aus d. Biolog.-chem. Laborat. d. Pharmazeut. Fakultät Bukarest.]
(Eingegangen am 9. Mai 1938.)

In einer unserer früheren Arbeiten¹⁾ haben wir uns mit der Kinetik der Esterasen beschäftigt, um einige Regelmäßigkeiten festzustellen. Wir fanden, daß die Geschwindigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse mehr von dem Verteilungszustand des kolloidalen Katalysators als von der chemischen Struktur des Esters abhängt. Fast alle Eigenheiten dieser enzymatischen Hydrolyse können im Vergleich zu der nichtenzymatischen leicht durch Sorptionserscheinungen und Veränderung des Dispersitätsgrades des Enzympräparates erklärt werden. Um in dieser Frage klar zu sehen, stellten wir uns die Aufgabe, einerseits die durch natürliche und andererseits die durch die künstliche Esterase (Langenbecks Esterasemodell) katalysierte Esterhydrolyse genau zu prüfen. Dieses vergleichende Studium versprach sehr aufschlußreich zu werden, da nach den Behauptungen Langenbecks²⁾ seine Esterasemodelle fast alle Eigenschaften der natürlichen Esterase besitzen, mit Ausnahme des kolloidalen Charakters. Dieser Arbeitsplan konnte leider nicht durchgeführt werden, da aus unseren Versuchen einwandfrei hervorgeht, daß die Esterhydrolyse durch die Langenbeckschen Esterasemodelle, wenigstens durch das Benzoylcarbinol, mit dem wir arbeiteten, nicht katalysiert wird.

Langenbeck zeigte in mehreren Arbeiten³⁾, daß einige organische Substanzen wie Benzoylcarbinol, Benzylalkohol, α -Naphthylcarbinol, Glykolsäure-anilid, ω -Oxy-acetophenon-carbonsäure-(4) u. a. die Eigenschaft haben, die Esterhydrolyse zu beschleunigen.

Die Hydrolyse des Methylbutyrats soll in Gegenwart von Benzoylcarbinol sechs- bis siebenmal so rasch verlaufen wie ohne Katalysator. Der Aktivierungsprozeß ist folgender: zwischen Methylbutyrat und Benzoylcarbinol findet eine Umesterung statt, indem Methanol frei wird und sich der Buttersäure-benzoylcarbinolester bildet. Die Hydrolysegeschwindigkeit des Methylbutyrats wird von dem langsameren Prozeß der Umesterung bestimmt, der sich in der oberen Schicht abspielt. Der Verfasser arbeitet in heterogenem, zweiphasigen Medium: mit Methylbutyrat gesättigtes Wasser, mit Wasser gesättigtes Methylbutyrat.

Da bei den Langenbeckschen Enzymmodellen mehr von der angewandten Technik als von dem Prinzip selbst die Rede ist, müssen wir einige Einzelheiten der Arbeitsweise anführen. Die Hydrolysegeschwindigkeit wird nach Knaffl-Lenz⁴⁾ gemessen, indem die frei werdende Säure sofort in dem Hydrolysegemisch selbst mit $n/_{10}$ -Barytlauge und Phenolphthalein als Indicator bestimmt wird. Man arbeitet demnach bei einem höheren p_H als 8.3 und unter fortwährender Volumvergrößerung. Während der Reaktion läßt man einen Wasserstoffstrom durch die Flüssigkeit streichen. Unter denselben Bedingungen werden gleichzeitig Blindproben mit Ester und Benzoylcarbinol ausgeführt. Nach dieser Technik erhielt der Verf. die Ergebnisse der Tafel 1.

¹⁾ Bul. Soc. Stiinte farmac. România II, 3—4 [1937].

²⁾ Bull. Soc. chim. biol. **112**, 627—636 [1935].

³⁾ B. **67**, 387—391, 1204—1209 [1934]; **69**, 514 [1936].

⁴⁾ Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **97**, 242 [1923].

Tafel 1. Verseifung von Methylbutyrat unter Einwirkung der Esterasemodelle (nach Langenbeck).

Katalysator	Konzentration d. Katalysators in Molen	ccm n_{10} -Ba(OH) ₂ nach t =					
		5	10	15	20	25	30
Ohne Katalysator	—	0.08	0.17	0.30	0.41	0.50	0.60
Glykolsäure-anilid	5×10^{-4}	0.33	0.80	1.20	1.70	2.20	2.70
Benzoylcarbinol	5×10^{-4}	1.00	1.38	1.60	2.70	3.35	3.80
Benzoylcarbinol	2×10^{-4}	0.30	0.55	0.79	1.30	1.80	2.18
[p-Acetamino-benzoyl]- carbinol	5×10^{-4}	0.25	0.51	0.79	1.11	1.40	1.70

Aus diesen von Langenbeck erhaltenen Zahlen geht hervor, daß von allen untersuchten Substanzen das Benzoylcarbinol der aktivste Katalysator ist.

Wegen der außerordentlichen Bedeutung dieser Frage überprüfte S. C. Olivier⁵⁾ die Arbeiten Langenbecks nach einer etwas abgeänderten Technik. Er bestimmte zunächst die Hydrolysenkonstante des Methylbutyrats in Gegenwart der Hydroxylionen, beide in n_{50} -Konzentrationen. Bei 30° fand er einen Mittelwert von 6.7. Dann arbeitete er in Gegenwart des Benzoylcarbinols, von dem er für jedes Millimol Substrat 0.488 Millimol zugab. Nach Ablauf gleicher Zeiten fand er bei Anwesenheit des Katalysators ungefähr 82% verseiften Ester und ungefähr 79%, wenn dieser fehlt. Olivier erklärte diese geringe Beschleunigung der Hydrolyse dadurch, daß das Benzoylcarbinol im alkalischen Medium auch Lauge verbraucht, denn dessen Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse ist bei 30° gleich 0.4. Olivier führte dann noch Verseifungen von Essigsäure-äthylester mit und ohne Benzoylcarbinol in Gegenwart von Natriumacetat aus und kam zum Schluß, daß das Benzoylcarbinol, das aktivste unter den Esterasemodellen von Langenbeck und Baltés, die Esterhydrolyse weder in stark alkalischen, noch in Lösungen mit einem p_H von ungefähr 9 oder niedriger merklich katalysiert.

Langenbeck⁶⁾ erklärte die negativ verlaufenen Versuche Oliviers folgendermaßen: es wurden nicht die vorgeschriebenen Arbeitsbedingungen eingehalten; die Konzentrationen des Katalysators waren zu gering; die Hydrolysen-geschwindigkeit wurde in einem schon zu stark vorgeschrittenen Stadium (ungefähr 80%) gemessen, und da dieses Stadium dem Endpunkte schon zu nahe war, mußten selbstverständlich für die Hydrolyse in An- oder Abwesenheit des Katalysators nahe liegende Werte gefunden werden. Olivier verteidigte jedoch die Richtigkeit seiner Anschauungen und behauptete aufs neue, daß das Benzoylcarbinol die Esterhydrolyse nicht katalysiere⁷⁾. Hiermit schloß die Polemik. Langenbeck änderte jedoch in einer späteren Arbeit⁸⁾, in der er die Bemerkungen Oliviers nicht mehr erwähnte, unbedeutende Einzelheiten der Arbeitsweise und hielt die Wirksamkeit der Esterasemodelle aufrecht.

Nach diesem Stand der Dinge, und weil die Esterasemodelle für unseren Zweck von großer Wichtigkeit waren, haben wir die Langenbeckschen Versuche wiederholt und gehofft, durch Benzoylcarbinol eine Beschleunigung

⁵⁾ Rec. Trav. chim. Pays-Bas **54**, 322 [1935].

⁶⁾ B. **68**, 776 [1935].

⁷⁾ Rec. Trav. chim. Pays-Bas **54**, 599 [1935].

⁸⁾ B. **69**, 514 [1936].

der Esterhydrolyse zu erreichen. Es sei von vornherein gesagt, daß wir bei diesen Versuchen die Langenbecksche Arbeitsweise auch in den kleinsten Einzelheiten eingehalten haben (s. Tafel 2).

Tafel 2. Verseifung von Methylbutyrat in Gegenwart von Benzoylcarbinol (nach Langenbeck).

a) Hydrolysegemisch mit Katalysator	Blindproben:		
	b) Substrat (Methylbutyrat)	c) Benzoyl-carbinol	
(Methylbutyrat + Benzoyl-carbinol)			
Methylbutyrat	0.50 ccm	0.50 ccm	0
Wasser	2.00 ccm	2.00 ccm	2.00 ccm
Benzoylcarbinol	0.25-mol.	0	0.25-mol.
Temp. 80°. Zeit 30 Min.			

Nr.	Verbrauchte ccm n_{10} -Ba(OH) ₂		
	a) Methylbutyrat + Benzoylcarbinol	b) Methylbutyrat	c) Benzoylcarbinol
1	1.25	1.35	0.10
2	1.15	—	—
3	1.85	1.65	0.09
4	1.10	1.33	—
5	1.45	1.40	0.11
6	1.88	1.20	—
7	1.57	1.16	0.12
8	1.58	1.80	—
9	1.69	1.13	—
10	1.14	1.06	0.06
Mittelwert:	1.47	1.34	0.10

Aus Tafel 2 ersieht man vor allem, daß die Methode sehr ungenau ist. Denn, obwohl alle Maßnahmen getroffen wurden, um möglichst gleiche Arbeitsbedingungen zu haben, schwanken die erhaltenen Werte zwischen den einzelnen Versuchen dennoch in Grenzen, die bei derartigen Bestimmungen nicht erlaubt sind. Diese großen Schwankungen sind, unserer Meinung nach, folgenden Umständen zuzuschreiben:

- 1) Das Flüssigkeitsvolumen ist zu klein (ungefähr 2.5 ccm).
- 2) Durch fortwährende Zugabe von Lauge ist es unmöglich, das p_H der Lösung konstant zu halten. Auch wenn die Bürettenspitze fein ausgezogen ist, so wie es Langenbeck in seiner letzten Arbeit⁸⁾ empfiehlt, ist es unmöglich, lokale Konzentrationen der Lauge an deren Eintrittspunkt in die Lösung ganz zu vermeiden.
- 3) Das Durchstreichenlassen eines Wasserstoffstromes durch ein auf 80° erhitztes Gemisch aus Wasser und Methylbutyrat verursacht eine fortwährende Änderung der Wasser- und Ester-Konzentration.
- 4) Nach Langenbeck muß der verdampfte Ester von Zeit zu Zeit ersetzt werden. Dadurch ändert sich jedoch die Verteilung des Benzoylcarbinols zwischen den zwei Phasen fortwährend. Es ist demnach unmöglich, alle Faktoren auszuschalten, welche die Hydrolysegeschwindigkeit beeinflussen können.

Hätten wir uns auf eine kleine Anzahl von Versuchen beschränkt, so könnten wir entweder die Ergebnisse Langenbecks bestätigen, oder aber wir hätten das Gegenteil gefunden, und zwar, daß das Benzoylcarbinol die Esterhydrolyse hemmt, je nachdem, ob die Versuchsfehler zufällig im Sinne der Versuche Nr. 3, 6, 7, 9 oder nach dem der Versuche Nr. 2, 4, 8 ausgefallen wären.

Zieht man das Mittel aus diesen 10 Versuchen, so ergibt sich ein Verbrauch von 1.47 ccm n_{10} -Ba(OH)₂ für die Verseifung des Esters in Gegenwart des Katalysators. In derselben Zeit verbraucht die Verseifung des Esters ohne Katalysator 1.34 ccm und die Zersetzung des Benzoylcarbinols 0.10 ccm Ba(OH)₂, im ganzen also 1.44 ccm. Zwischen der Hydrolyse mit Katalysator (1.47 ccm) und der ohne Katalysator (1.44 ccm) ist demnach praktisch kein Unterschied.

Wir sagen dies mit voller Zurückhaltung, da die Übereinstimmung zwischen den beiden Mittelwerten sogar in den Hundertstel ccm bestimmt ein Zufall ist. Die sich aus der angewandten Arbeitstechnik ergebenden Versuchsfehler sind zu groß, um einen sicheren Schluß zuzulassen; die erhaltenen Zahlen weisen trotzdem darauf hin.

Um möglichst einwandfreie Ergebnisse zu erhalten, haben wir die Arbeitsweise Langenbecks etwas abgeändert, das Prinzip jedoch beibehalten. Und zwar haben wir die von ihm vorgeschriebenen Substanzmengen proportional erhöht, indem wir sie mit 25 multiplizierten, und Konzentrationsänderungen, die von anderen Faktoren als vom Verseifungsprozeß selbst hervorgerufen werden können, ausgeschaltet. Die Reaktion verläuft in einem Dreihalskolben, der mit mechanischem Rührwerk und Rückflußkühler versehen ist. Während der Reaktion streicht durch die Flüssigkeit ein Wasserstoffstrom von konstantem Debit (Rotameter). Damit sich das Benzoylcarbinol in der Blindprobe unter Bedingungen befindet, die denen der Hydrolysenflüssigkeit möglichst nahe liegen, ersetzen wir in dieser Probe das Methylbutyrat durch die gleiche Menge Amylalkohol, dessen Löslichkeit in Wasser ungefähr von derselben Größenordnung ist wie die dieses Esters. Die Ergebnisse zeigt Tafel 3.

Tafel 3. Verseifung von Methylbutyrat in An- und Abwesenheit von Benzoylcarbinol (nach der abgeänderten Technik).

a) Hydrolysegemisch mit Katalysator (Methylbutyrat + Benzoylcarbinol)		Blindproben:	
		b) Substrat (Methylbutyrat)	c) Benzoylcarbinol
Methylbutyrat	12.50 ccm	12.50 ccm	Amylalkohol 12.50 ccm
CO ₂ -freies Wasser	50.00 ccm	50.00 ccm	50.00 ccm
Benzoylcarbinol	0.25-mol.	0.00 ccm	0.25-mol.

Indicator Phenolphthalein. Temp. 80° Zeit 15 Min.

Nr.	Verbrauchte ccm n_{10} -Ba(OH) ₂		
	a) Methylbutyrat + Benzoylcarbinol	b) Methylbutyrat	c) Benzoylcarbinol
1	9.05	7.05	1.60
2	9.20	7.40	1.70
3	9.00	7.45	—
4	—	7.20	—
5	—	7.50	—
Mittelwert:	9.08	7.32	1.65

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, verbraucht der Ester bei der Verseifung in Anwesenheit des Benzoylcarbinols 9.08 ccm d. s. 1.76 ccm mehr Lauge als in Abwesenheit dieses Katalysators. Diese Beschleunigung ist jedoch nur eine scheinbare, denn das Benzoylcarbinol zersetzt sich im alkalischen Medium und verbraucht unter denselben Bedingungen 1.65 ccm Barytlauge. Dies erklärt den bemerkten Unterschied. Das Benzoylcarbinol beeinflusst demnach die Esterhydrolyse in keiner Weise. Diese erfolgt unter den von Langenbeck festgelegten Bedingungen (alkalisches Medium und konstantes p_H von ungefähr 8.4) mit derselben Intensität auch ohne Benzoylcarbinol.

In anderem Zusammenhang versuchten wir festzustellen, ob das Benzoylcarbinol die Reaktion nicht vielleicht in entgegengesetztem Sinne katalysiert, d. h. die Synthese der Ester beschleunigt. Zu diesem Zwecke mischten wir Essigsäure mit Methylalkohol und gaben 3% Benzoylcarbinol dazu. Außerdem wurden zwei Blindproben ausgeführt, die eine enthielt Essigsäure, Benzoylcarbinol und Aceton statt des Alkohols, die andere nur Essigsäure und Methylalkohol, ohne Katalysator. Die Ergebnisse zeigt Tafel 4.

Tafel 4. Synthese von Methylacetat in An- und Abwesenheit von Benzoylcarbinol.

a) Synthesengemisch (Essigsäure + Methanol + Benzoylcarbinol)		Blindproben:	
		b) Essigsäure + Methanol	c) Benzoylcarbinol
Essigsäure	6.00 ccm	6.00 ccm	6.00 ccm
Methanol	4.00 ccm	4.00 ccm	Aceton 4.00 ccm
Benzoylcarbinol	0.30 g	0	0.30 g

Temp. 30°. Proben von je 2.00 ccm.

Zeit in Stdn.	Verbrauchte ccm n_{11} -NaOH		
	Essigsäure + Methanol + Benzoylcarbinol	Essigsäure + Methanol	Benzoylcarbinol
0	19.20	19.25	19.00
24	17.40	17.25	19.05
48	15.90	16.00	18.95
72	15.20	15.00	18.95
168	12.70	12.60	19.00

Wie ersichtlich ist, nimmt die Esterifizierung in An- und Abwesenheit von Benzoylcarbinol genau denselben Verlauf. Das Benzoylcarbinol katalysiert demnach weder die Hydrolyse noch die Synthese des Esters.

Zusammenfassung.

Die Arbeit von Langenbeck über die Beschleunigung der Esterhydrolyse durch Esterasemodelle wurde in alkalischer Lösung und bei konstantem p_H nach der Technik dieses Verfassers wiederholt. Dabei haben wir festgestellt, daß die Methode zu ungenau ist, um Schlüsse über eine katalysatorische Fähigkeit des Benzoylcarbinols zuzulassen.

Durch Erhöhung der Genauigkeit der Methode konnten wir feststellen, daß das von Langenbeck und Baltés vorgeschlagene Esterasemodell, das Benzoylcarbinol, nicht fähig ist, die Hydrolyse oder die Synthese der Ester zu katalysieren, und demnach mit den natürlichen Esterasen nichts gemein hat.