

GÜNTER LOSSE, ALFRED BARTH und WOLFGANG LANGENBECK

Über organische Katalysatoren, LXVI¹⁾

Die katalytische Oxydation von Dihydroxy-phenylaminosäuren und ihrer Derivate durch Kupfer- und Eisen(III)-Chelate²⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle (Saale)

(Eingegangen am 25. September 1961)

Die katalytische Oxydation des 2.3-, 2.4- und des 2.5-Dihydroxy-phenylalanins sowie des 3.4-DOPA-Methylesters und Amids, ferner des DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanins und der 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure durch L-Histidinanhydrid-Cu^{*}), Kupferprotoporphyrin und Hämin wurde studiert. Die Oxydation der Dihydroxy-phenylaminosäuren und ihrer Derivate erfolgt durch diese Fermentmodelle in ähnlicher Weise, wie durch Extrakte der Tyrosinase. Dabei ist die Oxydationsgeschwindigkeit durchweg bei denjenigen *o*-Diphenolen am höchsten, bei denen ein Ringschluß zu Indolderivaten stattfinden kann. Die Indolbildung muß danach auch bei der enzymatischen Oxydation ein entscheidender reaktionsbeschleunigender Schritt sein. 2.5-Dihydroxy-phenylalanin wird durch L-Histidinanhydrid-Cu nur bis zur Chinonstufe oxydiert. Hieraus werden Rückschlüsse auf den möglichen Mechanismus der physiologischen Wirksamkeit dieser Aminosäure gezogen.

In einer vorangegangenen Mitteilung²⁾ wurde über die katalytische Oxydation des 3.4-Dihydroxy-phenylalanins durch Kupfer- und Eisen-Chelate berichtet, wobei insbesondere die stereochemischen Effekte genauer untersucht wurden. Im folgenden wird die Substratspezifität der von uns verwendeten Oxydationskatalysatoren²⁾ ausführlicher behandelt.

J. P. LAMBOOY³⁾ untersuchte bereits vor einigen Jahren die Wirkung der Tyrosinase auf DOPA-Analoga. Er konnte feststellen, daß neben dem DOPA auch 2.3- und 2.5-Dihydroxy-phenylalanin durch Tyrosinaseextrakte schnell oxydiert werden. 2.6- und 3.5-DOPA werden durch die Tyrosinase nicht angegriffen, während das 2.4-Dihydroxy-phenylalanin als Ferment-Inhibitor wirkt.

In diesem Zusammenhang erschien es uns interessant, festzustellen, ob L-Histidinanhydrid-Cu, Protoporphyrin-Cu und Hämin, Verbindungen, die als Oxydasemodelle wirksam sind, die Oxydationsgeschwindigkeit der DOPA-Analoga beeinflussen. Unter Anwendung dieser Katalysatoren wurde der Oxydationsverlauf von 2.3-, 2.4- und 2.5-Dihydroxy-phenylalanin sowie von DOPA-Derivaten mit veränderter Seitenkette, wie beispielsweise dem DOPA-Methylester, Amid, dem DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin und der 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure, untersucht.

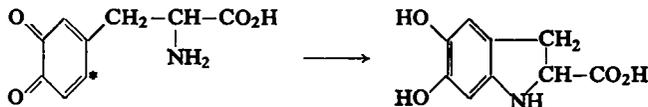
¹⁾ LXV. Mitteil. H. W. KRAUSE, Chem. Ber. 95, 777 [1962].

²⁾ II. Mitteil. über die Polyphenoloxidasewirkung von Kupfer- und Eisenchelaten. I. Mitteil., G. LOSSE, A. BARTH und W. LANGENBECK, Chem. Ber. 94, 2271 [1961].

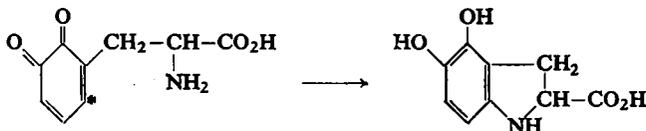
³⁾ J. Amer. chem. Soc. 76, 133 [1954].

^{*} 3.6-Dioxo-2.5-bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-piperazin-Kupfer.

Es ist bekannt, daß das bei katalytischer Oxydation entstehende Chinon des 3.4-Dihydroxy-phenylalanins sofort den Ring zu einem Indolderivat schließt. Dabei lagert sich die freie Aminogruppe des DOPA, entsprechend einer 1.4-Addition, an dasjenige C-Atom an, welches sich in *p*- und *m*-Stellung zu den chinoiden Carbonylgruppen (*) befindet⁴⁾.



Ein derartiger Ringschluß ist ebenfalls bei 2.3-DOPA grundsätzlich möglich.



Jedoch sind die 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure und die C-terminalen DOPA-Peptide zu einem Indolringschluß nicht befähigt. Im ersten Falle reicht die Anzahl der Atome der Seitenkette zur 5-Ringbildung nicht aus, bei den C-terminalen DOPA-Peptiden aber ist der Wasserstoff der DOPA-Aminogruppe durch Acylierung blockiert. Das 2.4-Dihydroxy-phenylalanin ist als *m*-Diphenol einer Oxydation mit nachfolgendem Indolringschluß nicht zugänglich. Die Prüfung dieser DOPA-Derivate, welche entweder keinen Indolringschluß oder keine Chinonbildung zulassen, war daher in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse.

Für die Oxydasemessungen wurden nach TH. WIELAND und B. HEINKE⁵⁾ folgende DOPA-Peptide dargestellt: Glycyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin, DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin und DL-Phenylalanyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin.

I. OXYDATION VON DOPA-ANALOGEN DURCH L-HISTIDINANHYDRID-KUPFER-CHELAT

Bei der Oxydation der von uns untersuchten Dihydroxy-phenylaminosäuren und ihrer Derivate erwies sich das L-Histidinanhidrid-Kupfer-Chelat als besonders aktiver Katalysator. So werden, wie aus Abbild. 1 hervorgeht, alle diejenigen DOPA-Derivate, bei denen ein Indolringschluß möglich ist, wie z. B. das 2.3- (7) und 3.4-DOPA (6) sowie der Ester (5) und das Amid (4) des letzteren relativ rasch oxydiert.

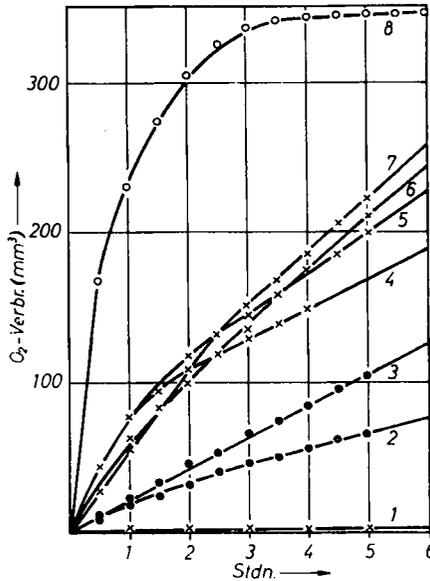
Langsamer erfolgt die Reaktion bei der 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure (2) und bei den C-terminalen DOPA-Peptiden, wie das Beispiel des DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanins (3) in Abbild. 1 zeigt.

2.4-DOPA (1) wird als *m*-Diphenol durch L-Histidinanhidrid-Kupfer nicht oxydiert und verhält sich somit als Substrat ähnlich wie bei Anwendung von Tyrosinase-Extrakten³⁾.

⁴⁾ H. S. RAPER, Biochem. J. 20, 740 [1926]; Biochem. J. 21, 89 [1927]; H. S. MASON, J. biol. Chemistry 172, 83 [1948].

⁵⁾ Liebigs Ann. Chem. 599, 70 [1956].

Interessant ist der Oxydationsverlauf des 2,5-Dihydroxy-phenylalanins (8). Hier wird der Sauerstoff anfänglich sehr rasch aufgenommen. Nach ca. 3 Stdn. kommt aber die Reaktion zum Stillstand, wobei insgesamt etwa 340 mm³ O₂ verbraucht



Abbild. 1. Oxydaseaktivität von L-Histidinase-Kupfer:

1 = 2,4-DOPA, 2 = 3,4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure, 3 = Leucyl-3,4-DOPA, 4 = 3,4-DOPA-Amid, 5 = 3,4-DOPA-Methylester, 6 = 3,4-DOPA und 7 = 2,3-DOPA, 8 = 2,5-DOPA (Katalysatorkonz.: $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/ccm, Substratkonz.: $2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm, pH 7,3, $n/5$ Phosphatpuffer)

werden. Dies entspricht der theoretisch berechneten Sauerstoffmenge, die nötig ist, um die Dihydroxy-aminosäure in die *p*-chinoide Form zu überführen. Im Gegensatz zu den *o*-Chinonen ist das Chinon des 2,5-DOPA also stabil und nicht in der Lage, einen Ringschluß zum Indolderivat (Dihydroxy-dihydro-indol-carbonsäure) einzugehen. Dieser Befund steht damit im Einklang, daß *p*-Chinone gegenüber *o*-Chinonen allgemein beständiger sind.

Im Jahre 1951 berichtete B. E. VOLCANI⁶⁾ über die toxischen Eigenschaften des 2,5-Dihydroxy-phenylalanins gegen *Escherichia coli* (ATCC 9637). Er stellte fest, daß dieser Mikroorganismus durch die genannte Aminosäure irreversibel in seinem Wachstum gehemmt wird, wogegen das *o*-Hydroxy-phenylalanin keine derartige Toxizität zeigt. Die antibiotische Wirkung des 2,5-DOPA kann deshalb nicht nur auf die phenolische Struktur der Aminosäure zurückgeführt werden.

Wie oben gezeigt wurde, geht das 2,5-Dihydroxy-phenylalanin aber schon bei milder Oxydation in sein stabiles *p*-Chinon über. Da derartige Chinonstrukturen u. a. in natürlichen Antibiotica vorkommen⁷⁾, so liegt in Übereinstimmung mit B. E. VOLCANI die Annahme nahe, daß die toxischen Eigenschaften des 2,5-DOPA auf einer Oxydation der Aminosäure

⁶⁾ J. biol. Chemistry 192, 543 [1951].

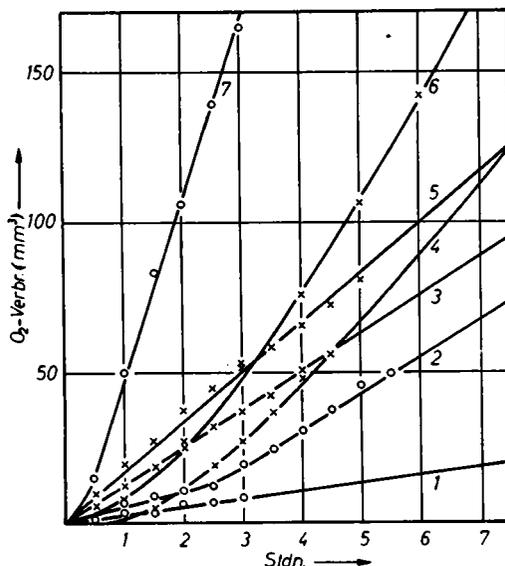
⁷⁾ Vgl. ULLMANN, Bd. 3, S. 733, Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1953.

im Organismus beruhen, wobei sich die oben erwähnte relativ stabile *p*-chinoide Form ausbildet. Diese ist wahrscheinlich der Träger der biologischen Aktivität.

Die größere Oxydationsgeschwindigkeit des 2.5-DOPA im Gegensatz zu den untersuchten *o*-Diphenolen erklärt sich zwanglos aus der allgemein bekannten Tatsache, daß die *p*-Chinone ein niedrigeres Redox-Potential besitzen als die isomeren *o*-Chinone⁸⁾.

II. OXYDATION VON DOPA-ANALOGEN DURCH HÄMIN UND PROTOPORPHYRIN-KUPFER

Bei der katalytischen Oxydation der Dihydroxy-phenylaminosäuren und ihrer Abkömmlinge mit Hilfe von Hämin beobachtet man ähnliche Wirkungen, wie in Abschnitt I. beschrieben. Auch hier wird das 2.5- (7) und 3.4-DOPA (6) am schnellsten oxydiert, während das 2.3-Dihydroxy-phenylalanin (4) sowie der Ester (5) und das Amid des 3.4-DOPA (3) langsamer reagieren. Die Oxydationsgeschwindigkeit der 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure (1) und des DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanins (2) ist hier wiederum am geringsten.



Abbild. 2. Oxydaseaktivität von Hämin:

1 = 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure, 2 = Leucyl-3.4-DOPA, 3 = 3.4-DOPA-Amid, 4 = 2.3-DOPA, 5 = 3.4-DOPA-Methylester, 6 = 3.4-DOPA, 7 = 2.5-DOPA (Katalysatorkonz. $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/ccm, Substratkonz. $2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm, pH 7.3, *n*/5 Phosphatpuffer)

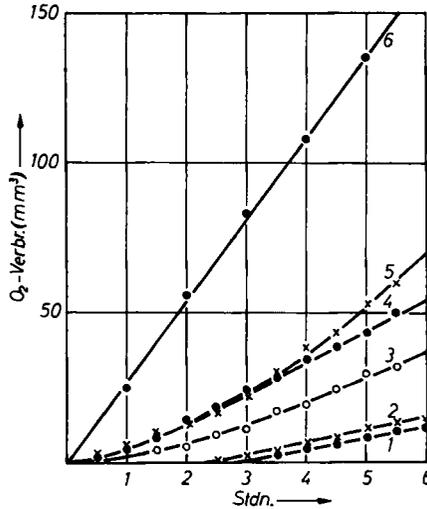
Generell zeigt sich, daß die Oxydationsgeschwindigkeiten bei der Häminkatalyse weitaus niedriger sind als in Gegenwart von L-Histidinanhydrid-Kupfer. So wird z. B. die Endstufe der Oxydation von 2.5-DOPA durch Hämin selbst nach 5 Std. noch nicht erreicht.

⁸⁾ Vgl. D. JERCHEL, Redoxpotentiale, Naturforsch. Med. Deutschl. 1939–46, Bd. 42, 1.

Wie aus Abbild. 3 hervorgeht, ist das Protoporphyrin-Kupfer der inaktivste der untersuchten Katalysatoren. Hier macht sich bemerkbar, daß das Zentralatom Kupfer sehr stabil an den Liganden gebunden ist⁹⁾, wobei die beständige Koordinationszahl 4 erreicht wird. Dadurch ist einerseits die komplexe Anlagerung des Luftsauerstoffs an das Chelat behindert, was eine Erniedrigung der Aktivierung des O₂-Moleküls zur Folge hat. Andererseits wird der für die Oxydasewirkung wichtige Übergang:



erschwert¹⁰⁾.



Abbild. 3. Oxydasaktivität von Protoporphyrin-Kupfer:

1 = 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure, 2 = Leucyl-DOPA, 3 = 2.3-DOPA, 4 = 3.4-DOPA-Methylester, 5 = 3.4-DOPA, 6 = 2.5-DOPA (Katalysatorkonz. $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/ccm, Substratkonz. $2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm, pH 7, *n*/5 Phosphatpuffer, 30°)

Aus den Meßergebnissen geht zusammenfassend hervor, daß die Oxydation der Dihydroxy-phenylaminosäuren durch die Fermentmodelle L-Histidinanhydrid-Kupfer, Protoporphyrin-Kupfer und Hämin in ähnlicher Weise erfolgt, wie durch Extrakte des natürlichen Fermentes, der Tyrosinase³⁾.

Histidinanhydrid-Kupfer ist der aktivste der untersuchten Katalysatoren. Die Oxydasewirkung ist beim Hämin geringer. Protoporphyrin-Kupfer aber ist nur sehr schwach wirksam. Weiterhin zeigt sich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit durchweg bei denjenigen *o*-Diphenolen am höchsten ist, bei denen ein Ringschluß zu Indolderivaten stattfinden kann. Diese Erscheinung wird unabhängig vom verwendeten Katalysator beobachtet. Zur Erläuterung sind in nachstehender Tabelle einige Versuchsergebnisse zusammenfassend dargestellt.

⁹⁾ H. FISCHER und B. Pützer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **154**, 58 [1926].

¹⁰⁾ Vgl. A. GOUDOT und L. DE BROGLIE, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **252**, 1521 [1961].

Oxydasewirkung des L-Histidinanhydrid-Kupfers und des Hämins nach 3 Stdn. (Katalysatorkonz.: $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/ccm, Substratkonz.: $2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm, pH 7.3, *n*/5 Phosphatpuffer, 30°)

Substrat	Histidinanhydrid-Cu		Hämin	
	O ₂ -Verbr. in mm ³	Aktiv. in % gegen Autox.	O ₂ -Verbr. in mm ³	Aktiv. in % gegen Autox.
3.4-Dihydroxy-phenyl- aminoessigsäure	45.9	—	9.3	—
Leucyl-DOPA	68.5	212.7	20.8	0
DOPA-Amid	131.3	644.8	36.5	179.8
DOPA-Methylester	145.6	633.0	52.2	226.9
2.3-DOPA	153.5	2896.2	27.5	518.8
2.5-DOPA	336.0	579.3	165.2	284.8
3.4-DOPA	133.6	1785.1	53.2	718.9

Die optimalen Oxydaseeffekte findet man in diesen Versuchen bei *o*-diphenolischer Struktur des Substrates mit einer zum Kern β -ständigen freien Aminogruppe, strukturellen Voraussetzungen also, wie sie auch bei der Wirkung der natürlichen *o*-Polyphenoloxydase erforderlich sind.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

A. Synthese von C-terminalen DOPA-Peptiden

I. Ausgangsstoffe

1. *Cbo-Glycin**): Aus Glycin und Carbobenzoxychlorid in alkalischem Medium¹¹⁾. Schmp. 120°.

2. *Cbo-DL-Leucin* und *Cbo-DL-Phenylalanin*: Analog der Darstellung des *Cbo-Glycins* aus *DL-Leucin* und Carbobenzoxychlorid¹²⁾ bzw. *DL-Phenylalanin* und Carbobenzoxychlorid¹³⁾. *Cbo-DL-Leucin*: Schmp. 52—54°, *Cbo-DL-Phenylalanin*: Schmp. 103°.

3. *3.4-Dihydroxy-phenylalanin-methylester-hydrochlorid*¹³⁾: Mit Methanol/Chlorwasserstoff nach E. FISCHER¹⁴⁾. Ausb. quantitativ. Schmp. 183—185°.

II. Die *Cbo-Peptid-methylester* wurden nach TH. WIELAND und B. HEINKE⁵⁾ dargestellt.

1. *Cbo-Glycyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin-methylester*: Aus 2 cMol *3.4-DOPA-Methylester-hydrochlorid* und 2 cMol *Cbo-Glycin* unter Zusatz von Phosphoroxychlorid und Triäthylamin in absol. Tetrahydrofuran bei -15°. Ausb. 4.0 g (49.8% d. Th.); farbloses glasiges Pulver.

$C_{20}H_{22}N_2O_7$ (402.4) Ber. C 59.69 H 5.51 N 6.96 Gef. C 59.66 H 5.92 N 6.98

2. *Cbo-DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin-methylester*: Aus 2 cMol *3.4-DOPA-Methylester-hydrochlorid* und 2 cMol *Cbo-DL-Leucin* analog 1., Ausb. 5.4 g (61.0% d. Th.); farbloses glasiges Pulver.

$C_{24}H_{30}N_2O_7$ (458.5) Ber. C 62.87 H 6.59 N 6.11 Gef. C 62.17 H 6.97 N 6.09

*) *Cbo* = Carbobenzoxy-Rest

11) M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 [1932].

12) W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 [1958].

13) J. O'NEILL, F. P. VEITCH und T. WAGNER-JAUREGG, J. org. Chemistry 21, 363 [1956].

14) Ber. dtsch. chem. Ges. 34, 433 [1901].

3. *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalantin-methylester*: Aus 2 cMol 3.4-DOPA-Methylester-hydrochlorid und 2 cMol *Cbo-DL-Phenylalanin* analog 1., Ausb. 6.0 g (60% d. Th.); farbloses glasiges Pulver.

$C_{27}H_{28}N_2O_7$ (492.5) Ber. C 65.84 H 5.73 N 5.69 Gef. C 67.06 H 5.86 N 5.63

III. *Cbo-Peptide*

1. *Cbo-Glycyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin*: Aus 3.0 g des Methylesters II. 1. in 20 ccm Methanol, gelöst durch 2-stdg. Verseifen mit 20 ccm 2*n* NaOH in einer Stickstoffatmosphäre. Ausb. 2.1 g (72.4% d. Th.); farblose Kristalle, Schmp. 128–129°.

$C_{19}H_{20}N_2O_7$ (388.8) Ber. C 58.68 H 5.18 N 7.20 Gef. C 57.97 H 5.29 N 6.97

2. *Cbo-DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin*: Aus 2 cMol des Methylesters II. 2., analog 1. Farblose Kristalle vom Schmp. 147–148°.

$C_{23}H_{28}N_2O_7$ (444.7) Ber. C 62.10 H 6.34 N 6.29 Gef. C 61.89 H 6.25 N 6.58

3. *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin* wird aus 3.0 g des Methylesters II. 3. analog 1. durch 2-stdg. Verseifen bei Raumtemperatur gewonnen. Farblose Kristalle, Schmp. 170–172°.

$C_{26}H_{26}N_2O_7$ (479.1) Ber. C 65.17 H 5.47 N 5.85 Gef. C 64.77 H 5.54 N 6.06

IV. *DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin* entsteht aus 2.5 g des *Cbo-Derivats* III. 2. in 60 ccm 50-proz. wäBr. Methanol durch 4-stdg. Hydrogenolyse im Beisein von Pd/Tierkohle. Ausb. 1.2 g (68.6% d. Th.). Nach Umfällen aus heißem Äthanol mit dem 20-fachen Überschuß Äther schmilzt es bei 166–168°.

$C_{15}H_{22}N_2O_5$ (310.2) Ber. N 9.03 Gef. N 9.06

B. *3.4-Dihydroxy-phenylalanin-amid-hydrochlorid*: wird analog der üblichen Methode zur Gewinnung der Aminosäureamid-hydrochloride¹⁵⁾ aus 4.94 g *3.4-Dihydroxy-phenylalanin-methylester-hydrochlorid* und 50 ccm bei 0° mit Ammoniak gesätt. absol. Methanol im Bombenrohr erhalten. Nach dreitägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird aufgearbeitet. Ausb. quantitativ. Das Rohprodukt wird in heißem Butanol gelöst und mit absol. Äther ausgefällt. Farblose hygroskopische Kristalle, Schmp. 139–141°.

$C_9H_{12}N_2O_3 \cdot HCl$ (232.7) Ber. C 46.45 H 5.63 N 12.04 Gef. C 46.01 H 5.85 N 11.88

C. *3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure*

1. *3-Hydroxy-4-methoxy-phenylaminoessigsäure-hydantoin*¹⁶⁾ 152 g *Vanillin* werden in die Hydrogensulfitverbindung übergeführt. Diese wird dann mit 130 g KCN und 348 g Ammoniumcarbonat in 1.5 l 50-proz. Äthanol eingetragen. Man erhitzt 5 Stdn. auf 55° und 1 Stde. auf 90°, säuert mit 700 ccm konz. Salzsäure an und saugt tags darauf das Produkt ab. Derbe Kristallblöcke aus heißem Wasser, Schmp. 121–122°. Ausb. 130 g.

$C_{10}H_{10}N_2O_4$ (222.2) Ber. C 54.05 H 4.54 N 12.61 Gef. C 53.60 H 4.97 N 13.08

2. *3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure*¹⁷⁾: Man kocht 48 g des Hydantoin 9 Stdn. mit Jodwasserstoffsäure (*d* 1.7), destilliert HJ i. Vak. ab, löst das Hydrojodid in wenig Äthanol und neutralisiert vorsichtig mit Ammoniak. Nach längerem Stehenlassen im Eisschrank erhält man rohe 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure (50% d. Th.). Nach 5-maligem Umkristallisieren aus heißem Wasser bleiben 20% d. Th. analysenreines Produkt. Schmp. 204–206°.

$C_8H_9NO_4 \cdot H_2O$ (201.1) Ber. C 47.52 H 5.49 N 6.93 Gef. C 47.62 H 5.55 N 6.74

¹⁵⁾ E. L. SMITH und N. B. SLONIN, J. biol. Chemistry 176, 835 [1948].

¹⁶⁾ Vgl. H. T. BUCHERER und V. A. LIEB, J. prakt. Chem. (2) 141, 5 [1934].

¹⁷⁾ Vgl. B. BLOCH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 98, 241 [1916/17].

D. Katalytische Messungen

Die Oxydaseaktivitäten wurden nach der Warburg-Methode in wäßr. Lösung bei 30° ermittelt. Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines $n/5$ Phosphatpuffers. Die Substratlösungen wurden wie folgt dargestellt:

1. *Methode A*: $2.5 \cdot 10^{-3}$ Mol reines Substrat werden in 100 ccm bidest. Wasser gelöst. Von dieser Lösung wird zu jeder Messung 1 ccm angewandt, dies entspricht einer Menge von $2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm Substrat.

2. *Methode B*: $2.5 \cdot 10^{-3}$ Mol Substrat-hydrochlorid werden in ca. 20 ccm bidest. Wasser gelöst und unter Schütteln mit der genau berechneten Menge einer $0.2n$ NaOH versetzt, die zur Bindung der Salzsäure des Hydrochlorids nötig ist (12.5 ccm Faktor: 1.00). Die so behandelte Lösung wird dann mit bidest. Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Zur Messung wird 1 ccm dieser Lösung verwendet, dies entspricht einer Menge von $2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/ccm freies Substrat.

Nach Methode A wurden folgende Substratlösungen hergestellt: 2.3-, 2.4-, 2.5-DOPA, 3.4-Dihydroxy-phenylaminoessigsäure und DL-Leucyl-DL-3.4-dihydroxy-phenylalanin. Die Methode B wurde bei der Darstellung der Lösungen von 3.4-DOPA-Methylester-hydrochlorid und 3.4-DOPA-Amid-hydrochlorid angewandt.

Die verwendeten Phosphatpuffer pH 7, 7.3 und 8 wurden nach H. S. T. BRITTON und O. WELFORD¹⁸⁾ hergestellt. Um eine Beeinflussung der Oxydasereaktion durch Schwermetallphosphatbildung auszuschalten, wurde die Pufferkonzentration möglichst klein gehalten. Die Kontrolle der pH-Werte der Reaktionsgemische zu Beginn und am Ende eines jeden Versuchs ergab, daß die Anwendung eines $n/5$ Phosphatpuffers zur Konstanthaltung des pH-Wertes ausreicht. Die in vorliegender Arbeit angegebenen pH-Werte entsprechen daher der beständigen Wasserstoffionenkonzentration der Versuchslösungen.

¹⁸⁾ J. chem. Soc. [London] 1937, 1848.