

## SUMMARY

The synthesis of beef  $\beta$ -MSH (I) carrying protecting groups on N $^{\alpha}$  (carbobenzoxy-), N $^{\epsilon}$  (tosyl-),  $\beta$ -COOH (Asp $^1$  with  $\beta$ -CONH $_2$ , Asp $^{18}$  with  $\beta$ -COOCH $_3$ ),  $\gamma$ -COOH (Glu $^8$  with  $\gamma$ -CONH $_2$ ), and  $\alpha$ -COOH (Asp $^{18}$  with  $\beta$ -COOCH $_3$ ) is described. The compound elicits an activity (*in vitro*, frog skin) of  $1.4 \times 10^7$  U/g as compared to  $1.2 \times 10^9$  U/g for  $\beta_b$ -MSH and  $3.7 \times 10^7$  U/g for  $\alpha_3$ -ACTH.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel  
Pharmazeutische Abteilung

### 185. Cholinesterase-Modelle<sup>1)</sup>

von **Elsbeth Schätzle, Max Rottenberg und Max Thürkauf**

(8. VI. 59)

Seit den grundlegenden Untersuchungen von LOEWI und später besonders von NACHMANSOHN<sup>2)</sup> wissen wir, dass die chemischen Vorgänge bei der Nervenleitung durch den Wirkstoff Acetylcholin beherrscht werden. Zahlreiche Forscher<sup>3)</sup> haben sich deshalb mit der enzymkatalysierten Hydrolyse von Acetylcholin beschäftigt. Durch fast lückenlose Messung der Cholinesterase-Aktivität in Abhängigkeit von Substratkonzentration<sup>4)</sup>, pH des Mediums<sup>5)</sup> 6), sowie der chemischen Natur ausgewählter Substrate und Inhibitoren<sup>7)</sup> haben sich wichtige Anhaltspunkte gewinnen lassen zur Struktur-Erforschung des aktiven Zentrums und auch schon zur Entwicklung der ersten wirksamen Gegenmittel bei Vergiftung dieser Enzyme mit «Nervengasen».

Bei allen modernen Ideen über die Substrat-Spezifität der Cholinesterasen steht das «anionische Zentrum» im Vordergrund der Betrachtungen<sup>3,3) 8)</sup>. Als Beitrag zur weiteren Charakterisierung dieses immer noch hypothetischen Enzym-Bezirks untersuchen wir das hydrolytische Verhalten oxa-analoger Cholinester, das sind Substrate,

1) Über den gegenwärtigen Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der Enzym-Modelle unterrichten zwei kürzlich erschienene Aufsätze: a) W. LANGENBECK, *Tetrahedron* **3**, 185 (1958); b) F. H. WESTHEIMER, in *The Enzymes* (BOYER-LARDY-MYRBÄCK), 2. Aufl., Academic Press, New York 1959, S. 259–304.

2) Vgl. D. NACHMANSOHN, *Ergebnisse der Physiol.* **48**, 375–683 (1955).

3) Vgl. die Übersichtsreferate: a) D. R. DAVIES & A. L. GREEN, *Adv. Enzymol.* **20**, 283–318 (1958); b) F. BERGMANN, *Adv. Catal.* **10**, 131–164 (1958).

4) K. B. AUGUSTINSSON, *Arch. Biochemistry* **23**, 111 (1949).

5) I. B. WILSON, in *The Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 642–657.

6) a) F. BERGMANN, *Faraday Soc. Discuss.* **20**, 126–134 (1955); b) F. BERGMANN, R. SEGAL, A. SHIMONI & M. WURZEL, *Biochem. J.* **63**, 684 (1956); c) F. BERGMANN, S. RIMON & R. SEGAL, *ibid.* **68**, 493 (1958).

7) S. L. FRIESS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 3269 (1957), und frühere Arbeiten.

8) I. B. WILSON, *Faraday Soc. Discuss.* **20**, 119 (1955).

bei denen die isolierte positive Ladung am Cholin-Stickstoff durch einen Aminoxyd-Dipol ersetzt ist. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über Hydrolyse-Versuche am oxa-Analogen des Benzoylcholins, dem Benzoyloxyäthyl-dimethylaminoxyd, im enzymfreien Medium; eine genaue Kenntnis aller chemischen Reaktionswege, die dem Substrat überhaupt zur Verfügung stehen, erachten wir als unerlässliche Voraussetzung für die geplanten enzymatischen Untersuchungen.

Parallel zum Aminoxyd-ester wurde jeweils auch der entsprechende Cholinester zur Messung herangezogen, ausserdem Äthylbenzoat als Standard eines Esters eines aliphatischen Alkohols und Dimethylaminoäthylbenzoat als tertiärbasische Vergleichsubstanz. Die beiden letzteren Substrate erfordern das Arbeiten im gemischt wässrig-organischen Medium; für diese Untersuchungen hat sich tert.-Butanol als Zusatz zum Wasser am besten bewährt; es zeigt unter verschiedenen Bedingungen die kleinsten Lösungsmittel- und Salz-Effekte, und die Blindwerte sind gering und längere Zeit konstant. In der vorliegenden Arbeit sollen vorerst nur die «grossen» Effekte aufgezeigt und diskutiert werden; es werden beispielsweise nur solche Substrate verglichen, die sich in der Reaktivität um einen Faktor von mindestens 3 unterscheiden. Infolgedessen genügt hier ein halbquantitatives Messverfahren mit Fehlergrenze  $\pm 20\%$  <sup>9)</sup>.

In Tab. I sind die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung bei der alkalischen Hydrolyse der Ester zusammengestellt.

Tabelle I. *Alkalische Hydrolysen*

Bei jedem Ansatz war  $c_0$  (Substrat) =  $c_0(\text{OH}^\ominus)$  =  $c$  (Zusatz) =  $0,025 \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1}$

$$k_2 = \frac{1}{t} \left( \frac{1}{c_t} - \frac{1}{c_0} \right) \text{l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Temperatur °C	Substrat	Medium	$k_2$ $\text{l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
1	Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O	$7,3 \pm 1,5$
1	Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O + Cholin-Cl	$5,7 \pm 0,9$
1	Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O + NaCl	$7,4 \pm 1,6$
1	Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O + KF	$7,5 \pm 1,5$
1	Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O-t-BuOH(1:1)	$9,0 \pm 2$
1	Dimethylaminoäthylbenzoat- N-oxyd . . . . .	H <sub>2</sub> O	$2,5 \pm 0,3$
1	Dimethylaminoäthylbenzoat- N-oxyd . . . . .	H <sub>2</sub> O-t-BuOH(1:1)	$2,0 \pm 0,8$
19,6	Äthylbenzoat . . . . .	H <sub>2</sub> O-BuOH(1:1)	$4,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$
19,6	Dimethylaminoäthylbenzoat . .	H <sub>2</sub> O-BuOH(1:1)	$0,23 \pm 0,03$
1	Dimethylaminoäthylbenzoat . .	H <sub>2</sub> O-BuOH(1:1)	$4,2 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-2}$

Beim Vergleich <sup>10)</sup> zwischen Cholin- und Äthylester bestätigt zunächst schon die grobe Schätzung, dass Benzoylcholin, in Übereinstimmung mit der summarischen

<sup>9)</sup> Zur Erfassung der feineren Effekte wenden wir eine genauere Methode an, die gegenwärtig im Laboratorium Wimmis ausgearbeitet wird: H. URHEIM & E. SCHÄTZLE, in Vorbereitung.

<sup>10)</sup> Auf die Untersuchung bei derselben Temperatur musste aus praktischen Gründen verzichtet werden.

Literaturangabe<sup>11)</sup>, zu den stark «aktivierten» Estern gehört<sup>12)</sup>. Dass positiv geladene Ester bei der alkalischen Hydrolyse schneller reagieren als die entsprechenden ungeladenen, wird allgemein einem elektrostatischen Effekt zugeschrieben<sup>13)</sup>.

Der entsprechende Aminoxydester reagiert nur ca. dreimal langsamer als Benzoylcholin, ist also auch noch zu den «aktivierten Estern» zu zählen. Hingegen ist der tertiär-basische Dimethylaminoester nur noch um einen Faktor von ca. 5 reaktiver als die aliphatische Grundsubstanz. Dass bei diesem Ester überhaupt eine Beschleunigung der alkalischen Hydrolyse eintritt, ist zweifellos einem intramolekularen sterischen Effekt zuzuschreiben; der basische Stickstoff ist ideal benachbart für einen nucleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Esters (vgl. Fig. 1).

Ganz ähnliche Verhältnisse haben WIELAND und Mitarb.<sup>14)</sup> schon früher bei basischen Thioestern festgestellt.

Aus Tab. I geht ferner hervor, dass bei Umwandlung der Dimethylamino- in die entsprechende N-Oxyd-Gruppe ein Ester entsteht, der ca. 50mal schneller alkalisch hydrolysiert wird als die tertiär-basische Stammsubstanz. Diese Aktivierung könnte teilweise einem polaren Effekt des Aminoxyd-Dipols zugeschrieben werden<sup>15)</sup>.

Daneben muss auch noch mit einer intramolekularen nucleophilen Katalyse<sup>19)</sup> gerechnet werden, die sich ähnlich wie vorher beim Amino-Ester auswirken müsste (vgl. Fig. 2).

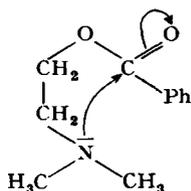


Fig. 1

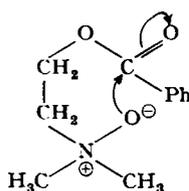


Fig. 2

<sup>11)</sup> W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **13**, S. 453 (1956).

<sup>12)</sup> Zum Begriff der «aktivierten Ester» vgl. R. SCHWYZER und Mitarb., Helv. **38**, 69 (1955), und eine Folge weiterer Arbeiten.

<sup>13)</sup> Vgl. R. P. BELL & F. J. LINDARS, J. chem. Soc. **1954**, 4601, wo auch frühere Literatur zitiert ist.

<sup>14)</sup> TH. WIELAND & E. BOKELMANN, Liebigs Ann. Chem. **576**, 20 (1952); TH. WIELAND & H. HORNIG, *ibid.* **600**, 12 (1956).

<sup>15)</sup> Substituenteneffekte der Aminoxydgruppe können heute noch nicht genügend sicher abgeschätzt werden; in den Übersichtstabellen von JAFFÉ<sup>16)</sup> und von TAFT<sup>17)</sup> sind sie nicht aufgeführt, ein vereinzelt Beispiel aus der Literatur<sup>18)</sup> zeigt jedoch, dass sie keineswegs zu vernachlässigen sind.

<sup>16)</sup> H. H. JAFFÉ, Chem. Reviews **53**, 191 (1953).

<sup>17)</sup> R. W. TAFT, JR., in Steric Effects in Organic Chemistry, edited by M. S. NEWMAN (John Wiley, New York 1956); S. 556–675.

<sup>18)</sup> R. W. ROODA, P. E. VERKADE & B. M. WEPSTER, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **73**, 849 (1954).

<sup>19)</sup> Wir folgen hier einem Vorschlag von BENDER<sup>20)</sup>, wonach für Effekte der vorliegenden Art der bisher gebräuchliche Ausdruck «allgemeine Basenkatalyse» zu ersetzen ist durch die treffende Bezeichnung «nucleophile Katalyse».

<sup>20)</sup> M. L. BENDER, Y. L. CHOW & F. CHLOUPEK, J. Amer. chem. **80**, 5380 (1958).

Noch bemerkenswerter waren die Ergebnisse der Neutral-Hydrolyse<sup>21)</sup> bei 100° (Tab. II). Hier ist Benzoylcholin in t-Butanol-Wasser nur noch um einen Faktor von ca. 20 reaktiver als Äthylbenzoat. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass der vorher überwiegende elektrostatische Effekt in bezug auf OH<sup>⊖</sup>-Ionen im neutralen Medium ausgeschlossen ist und dass die noch verbleibenden polaren Effekte sehr viel weniger wirksam sind<sup>22)</sup>.

Tabelle II. Neutralhydrolysen bei 100° ± 0,2°  
c<sub>0</sub> = 0,025 Mol · l<sup>-1</sup>; k<sub>1</sub> = 1/t (ln c<sub>0</sub> - ln c<sub>t</sub>) min<sup>-1</sup>

Substrat	Medium	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )
Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O	2 · 10 <sup>-5</sup> ± 0,3 · 10 <sup>-5</sup>
Benzoylcholinchlorid . . . . .	H <sub>2</sub> O-t-BuOH(1:1)	1,55 · 10 <sup>-5</sup> ± 0,2 · 10 <sup>-5</sup>
Dimethylaminoäthylbenzoat-N-oxyd	H <sub>2</sub> O	2,2 · 10 <sup>-3</sup> ± 0,2 · 10 <sup>-3</sup>
Äthylbenzoat . . . . .	H <sub>2</sub> O-t-BuOH(1:1)	8,4 · 10 <sup>-7</sup> ± 2 · 10 <sup>-7</sup>

Völlig unerwartet war jedoch die Beobachtung, dass bei 100° der Aminoxyd-Ester mit reinem Wasser 10<sup>8</sup>mal so schnell reagiert wie der Cholinester. Es erhebt sich somit sofort die Frage, welche strukturellen Faktoren für diese Aktivierung verantwortlich sind, wobei wir folgende Faktoren in Betracht gezogen haben:

a) Mit einem elektrostatischen Effekt kann bei neutralem pH nicht gerechnet werden.

b) Polare Effekte der Aminoxydgruppe sind durchaus annehmbar; dass sie jedoch stärker wären als diejenigen einer isolierten positiven Ladung, ist äusserst unwahrscheinlich; vgl. die Diskussion dieses Themas bei COPE<sup>23)</sup>.

c) Intramolekulare Katalyse.

1. Eine starke Beschleunigung der Neutralhydrolyse könnte dadurch zustandekommen, dass auch hier zunächst ein intramolekularer nucleophiler Angriff erfolgt (Fig. 3), und dass die so gebildete labile Zwischenverbindung alle Voraussetzungen hätte für eine bifunktionelle Hydrolyse.

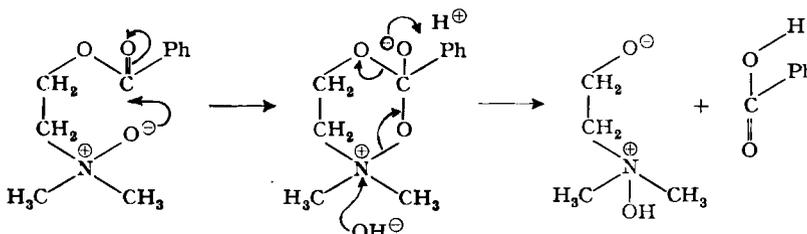


Fig. 3

<sup>21)</sup> Unter «Neutral-Hydrolyse» verstehen wir die unkatalysierte Reaktion des Substrates mit Wasser; dabei kann infolge der entstandenen Benzoesäure das pH bis auf den Wert 3 fallen. Diese Acidität ist jedoch säure-katalytisch noch nicht wirksam (vgl. Tab. VI).

<sup>22)</sup> Über induktive Effekte geladener Substituenten kann heute noch nichts Sicheres ausgesagt werden; vgl. R. W. TAFT, Jr. & I. C. LEWIS, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2436 (1958).

<sup>23)</sup> A. C. COPE, N. A. LE BEL, H. H. LEE & W. R. MOORE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4722 (1957).

2. Eine weitere Möglichkeit der intramolekularen Katalyse bestände darin, dass der Aminoxydester I (Fig. 4) nach Aufnahme einer Wassermolekel auch noch als Hydroxyd der konjugaten Säure, des Benzoyloxyäthyl-dimethyl-hydroxylammoniumhydroxyds (II), reagieren kann. Dieses hypothetische Zwischenprodukt würde einen Teil seiner vorübergehenden Existenzmöglichkeit der Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke verdanken. Durch diese Chelatbrücke würde ausserdem die Polarisierung der C=O-Bindung verstärkt und dadurch der nucleophile Angriff am Kohlenstoff erleichtert (vgl. Fig. 4).

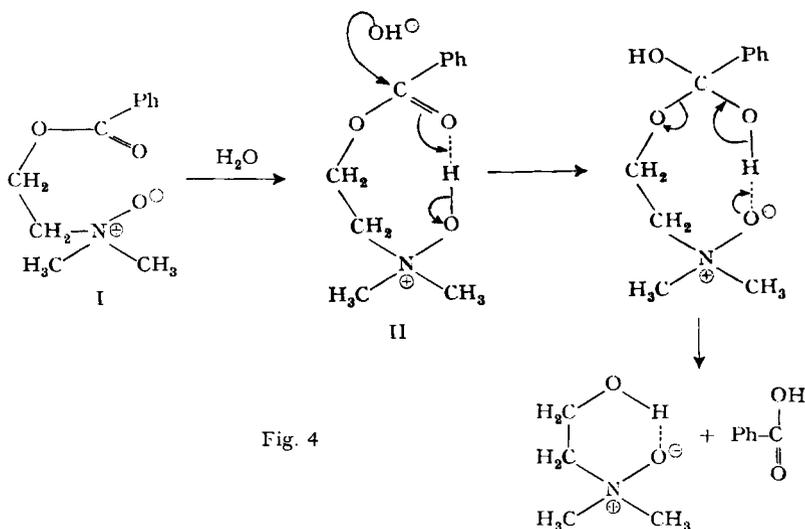


Fig. 4

Von den beiden diskutierten intramolekularen Mechanismen ist der erstere, c) 1. (Fig. 3), einer direkten experimentellen Prüfung zugänglich; hier verlangt nämlich die Theorie eine abnormale  $^{18}\text{O}$ -Isotopenverteilung für die Neutralhydrolyse in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -haltigem Wasser in solcher Weise, dass die gebildete Benzoesäure keinen schweren Sauerstoff aus dem Medium enthalten sollte. Tab. VIII (vgl. Exp. Teil) zeigt jedoch, dass die Neutralhydrolyse in bezug auf  $^{18}\text{O}$ -Isotopenverteilung durchaus normal verläuft; die Benzoesäure enthält, wie beim parallel durchgeführten *alkalischen* Hydrolyseversuch, ca. 50% des im Medium enthaltenen schweren Sauerstoffs. Damit war Mechanismus c) 1. ausgeschlossen, c) 2. (Fig. 4) jedoch noch keineswegs bewiesen. Immerhin liessen sich zwei experimentelle Hinweise, A und B, für die Wahrscheinlichkeit des intramolekularen Mechanismus mit H-Brücke gewinnen.

A. Im pH-Bereich der «Neutral-Hydrolyse» ist der basische Ester, das Dimethylaminoäthylbenzoat, wasserlöslich und liegt nach eigenen Messungen (siehe auch <sup>5)</sup>) überwiegend in der protonierten Form vor (vgl. Fig. 6), wodurch auch hier die strukturellen Voraussetzungen für eine intramolekulare H-Brücken-Katalyse gegeben wären. Tatsächlich zeigen die Messungen (Tab. III), dass die Hydrolyse des Dimethylaminoäthylesters im neutralen Medium bedeutend schneller verläuft als die der nicht protonierbaren quartären Ammoniumverbindung, des Benzoylcholins, und zwar beträgt das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten auch hier ca. 100:1,

wenn man die Halbwertszeiten als Vergleichsmass nimmt. Die Kinetik verläuft nämlich beim Dimethylaminoäthylbenzoat auch in grober Näherung nicht mehr nach der ersten Ordnung und wird zurzeit näher untersucht.

Tabelle III. *Dimethylaminoäthylbenzoat* (Base + ihr Hydrochlorid)  
Neutral-Hydrolyse in  $H_2O$  bei  $100^\circ \pm 0,2^\circ$ ;  $c_0 = 0,025 \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $pH_0 = 6,30$

Zeit (min) . .	30	60	120	180
% Reaktion .	19,8	27,12	31,64	33,06
$k_1 \text{ min}^{-1}$ . .	$73,3 \cdot 10^{-4}$	$43,6 \cdot 10^{-4}$	$31,6 \cdot 10^{-4}$	$23,5 \cdot 10^{-4}$
$pH_t$ . . . .		3,80		
Zeit (min) . .	240	360	480	900
% Reaktion .	38,8	44,2	56,9	60,5
$k_1 \text{ min}^{-1}$ . .	$20,4 \cdot 10^{-4}$	$16,2 \cdot 10^{-4}$	$17,5 \cdot 10^{-4}$	$10,3 \cdot 10^{-4}$
$pH_t$ . . . .		3,70		

Es ist äusserst interessant, diese Situation zu vergleichen mit einer kürzlich erschienenen Mitteilung von HANSEN<sup>24)</sup> über kinetische Hydrolyse-Versuche an Propionsäure-thiolethern. Danach verläuft die Hydrolyse der protonierten Thiolesterbase III (Fig. 5) 240mal schneller als diejenige des quaternären Propionylmercaptans IV beim gleichen pH<sup>25)</sup>. Dieses bemerkenswerte Resultat wird als vorläufige Messung und ohne Kommentar mitgeteilt; es fügt sich aber, falls es bestätigt wird, zwanglos in das hier entworfene Schema einer wirkungsvollen intramolekularen Katalyse mit H-Brücke ein (vgl. Fig. 6).

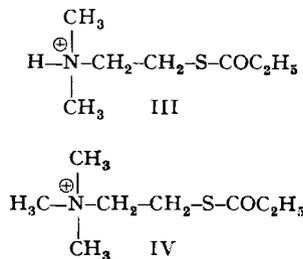


Fig. 5

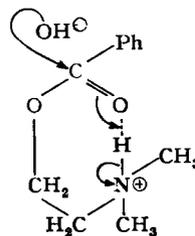


Fig. 6

B. Ein zweites wertvolles Argument für unsere Anschauungen fanden wir in einem Beispiel, das nicht als intramolekulare, sondern als *zwischenmolekulare* Aminoxyd-Katalyse mit Wasserstoffbindung nach demselben bifunktionellen Mechanismus gedeutet werden kann. Unsere Versuche haben nämlich gezeigt (Tab. IV), dass die Neutralhydrolyse von Benzoylcholin durch Zusatz einer äquimolaren Menge Hydroxyäthyl-dimethyl-aminoxid um einen Faktor von ca. 50 (gemessen durch die Halbwertszeit) beschleunigt wird, und zwar folgt jetzt die Reaktion, wenigstens im An-

<sup>24)</sup> B. HANSEN, Acta chem. scand. **12**, 324 (1958).

<sup>25)</sup> Eine Beziehung im gleichen Sinne hatte WIELAND<sup>14)</sup> überraschenderweise beim Vergleich der *alkalischen* Hydrolysegeschwindigkeiten aufgefunden; bei pH 10,5 reagierte Acetylcholin bedeutend langsamer als S-Acetyl-dimethylaminoäthanthiol.

fang, annähernd einer Kinetik zweiter Ordnung. Das Dimethylamino-äthanol-N-oxyd verhält sich also wie ein primitives Cholinesterase-Modell, dessen Wirkungsweise im Sinne der hier entwickelten Arbeitshypothese verstanden werden könnte und sich in groben Zügen gemäss Fig. 7 schematisch skizzieren liesse.

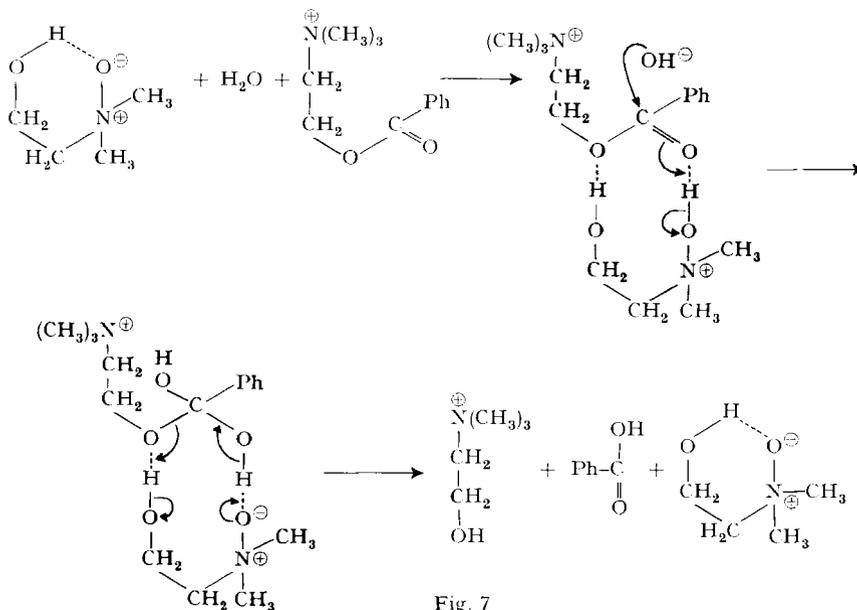


Tabelle IV. *Benzoylcholinchlorid* + *Dimethylaminoäthanol-N-oxyd*: beide Substrate in der Anfangs-Konz.  $c_0 = 0,025 \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Neutral-Hydrolyse in  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $100^\circ \pm 0,2^\circ$ . Anfangs-pH:  $(\text{pH})_0 = 6,76$   
Alle pH bei  $20^\circ$  gemessen

Zeit (min)	% R	pH <sub>t</sub>	«k <sub>1</sub> » (min <sup>-1</sup> )	«k <sub>2</sub> » (l · Mol <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	Halbwertszeit
90	14,4	6,40	$17 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-2}$	$\tau_1 = 602 \text{ min}$ (ber. aus $k_1 = 11,5 \cdot 10^{-4}$ )
120	22,6		$21 \cdot 10^{-4}$	$9,7 \cdot 10^{-2}$	
190	27,1		$17 \cdot 110^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-2}$	
300	34,3		$14 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$	
330	36,1	5,02	$13,5 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-2}$	$\tau_2 = 652 \text{ min}$ (ber. aus $k_2 = 6,4 \cdot 10^{-2}$ )
420	45,6	4,98	$14,5 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-2}$	
540	46,5		$11,5 \cdot 10^{-4}$	$6,4 \cdot 10^{-2}$	
1320	62,8	4,80	$7,4 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-2}$	
2700	63,2		$3,7 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	
5580	81,3		$3,2 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	

Die Literatur der allerletzten Jahre zeigt deutlich, dass immer mehr und immer bessere Enzym-Modelle gefunden werden. Eine allgemeine Diskussion unserer Resultate unter Berücksichtigung der Literatur scheint deshalb dringend angezeigt.

1. Bei der *alkalischen Hydrolyse* wurden zwei Beispiele einer *intramolekularen nucleophilen Katalyse* erwähnt, wobei im einen Fall eine tertiäre Aminogruppe und im andern Fall der anionische Sauerstoff eines Aminoxyd-Dipols die Rolle des intramolekularnucleophilen Zentrums übernehmen.

Bei den vereinzelt Beispielen aus der Literatur, die mechanistisch in dieselbe Kategorie eingeordnet werden können, sind die nucleophilen Zentren vertreten durch a) das basische Stickstoffatom einer Dimethylaminogruppe genau wie bei unserem Nor-cholinester<sup>14)</sup>, b) den basischen Imidazol-Stickstoff<sup>26)</sup> und c) die Carboxylatgruppe<sup>27)</sup>. Zu dieser Liste gesellt sich jetzt offenbar auch noch die Aminoxydgruppe als aktives Nucleophil bei der intramolekularen basischen Esterhydrolyse.

2. Der ungewöhnlich schnell verlaufenden *Neutralhydrolyse* von Dimethylaminoäthylbenzoat und insbesondere seinem N-Oxyd haben wir, als bisher beste Deutung, den Mechanismus einer *intramolekularen bifunktionellen Katalyse* zu Grunde gelegt. Auch hier lassen sich in der Literatur Beispiele finden, die mehr oder weniger passend in dasselbe Schema eingeordnet werden können. Wohl der klarste Fall ist die von MORAWETZ<sup>28)</sup> entdeckte Neutralhydrolyse geeigneter bifunktionell acylierter Salicylsäurederivate; aber auch die schon länger bekannte Instabilität des Aspirins gegenüber Wasser<sup>29)</sup> könnte man hier hinzuzählen. Eine allzu enge Kategorisierung erscheint jedoch weder notwendig noch erwünscht.

3. Die *Beschleunigung der Neutralhydrolyse von Cholinester* durch Zusatz von Hydroxyäthyl-dimethylaminoxid wurde durch das mechanistische Schema versuchsweise als *bifunktionelle zwischenmolekulare Katalyse* charakterisiert. Sie kommt dadurch zustande, dass die Katalysator-Molekel gleichzeitig ein nucleophiles und ein elektrophiles Zentrum enthält, die beide in bezug auf das Substrat räumlich günstig orientiert sind. Dieses Prinzip wurde insbesondere von SWAIN<sup>30)</sup> sehr klar erkannt und experimentell gesichert und später namentlich von KOSHLAND<sup>31)</sup> verfeinert und zur anschaulichen Deutung vieler Enzym-Reaktionen herangezogen. Durch Verwendung des gleichen Prinzips ist es GERO & WITHROW<sup>32)</sup> kürzlich gelungen, ein besonders schönes Lipasemodell zu bauen. SWAIN hat auch schon auf die Bedeutung der Wasserstoffbrücken bei seinem Mechanismus hingewiesen, und gerade bei den Cholinesterasen scheinen Wasserstoffbrücken derselben Art eine wichtige Rolle zu spielen für das Zustandekommen der primären Wechselwirkung sowohl des Substrates (Acetylcholin)<sup>33)</sup> als auch des Inhibitors vom Typus DFP (Phosphorsäure-diisopropylester-fluorid)<sup>33)</sup> mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, so dass das Dimethylaminoäthanol-N-oxyd auch im Wirkungsmechanismus als Cholinesterase-

<sup>26)</sup> G. L. SCHMIR & T. C. BRUCE, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1173 (1958); T. C. BRUCE & J. M. STURTEVANT, Biochem. biophys. Acta **30**, 208 (1958).

<sup>27)</sup> M. L. BENDER, F. CHLOUPEK & M. C. NEVEU, J. Amer. chem. Soc. **80**, 5384 (1958).

<sup>28)</sup> H. MORAWETZ & I. ORESKES, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2591 (1958).

<sup>29)</sup> Vgl. E. R. GARRETT, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3401 (1957), und dort zitierte frühere Literatur.

<sup>30)</sup> C. G. SWAIN & J. F. BROWN, Jr., J. Amer. chem. Soc. **74**, 2538 (1952).

<sup>31)</sup> D. E. KOSHLAND, Jr., J. cell. & comp. Physiol., S 1, **47**, 217–234 (1956).

<sup>32)</sup> A. GERO & C. L. WITHROW, Nature **180**, 1354 (1957).

<sup>33)</sup> R. F. ASHBOLT & H. N. RYDON, Biochem. J. **66**, 237 (1957); B. C. SAUNDERS, Some Aspects of the Chemistry and Toxic Action of Organic Compounds Containing Phosphorus and Fluorine, Cambridge University Press 1957, S. 188–191.

Modell betrachtet werden kann. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass es sich um ein «natürliches» Modell handelt; der Grundkörper, das Dimethylaminoäthanol, nimmt ja in der Biochemie der Ein-Kohlenstoffverbindungen<sup>34)</sup> einen gesicherten Platz ein<sup>35)</sup> und als Substrat im Cholinacetylase-Testsystem<sup>36)</sup> kann es Cholin mit voller Wirksamkeit ersetzen. Das Aminoxyd ist bisher nicht gefasst worden, es könnte aber bei der oxydativen Demethylierung intermediär auftreten. Dies wird nahe gelegt durch die interessanten Modellversuche von HORNING und Mitarb.<sup>37)</sup> und durch die attraktiven Hypothesen von WENKERT<sup>38)</sup> über die Bedeutung der N-Oxyde als Zwischenstufen bei der Biogenese von Alkaloiden. Es sei ferner darauf hingewiesen, dass wir im Dimethylaminoäthanol-N-oxyd ein oxa-analoges Cholin in Händen haben. Ersetzt man in der chemischen Struktur eines natürlichen Substrates eine CH<sub>2</sub>-Gruppe durch ein Sauerstoffatom, so gelangt man in vielen Fällen zu kräftigen Inhibitoren, die als kompetitive Antagonisten gegen das Substrat wirksam sind<sup>39)</sup>; wir erwarten deshalb gerade auch im Hinblick auf diese zusätzlichen Möglichkeiten ein interessantes enzym-chemisches und pharmakologisches Verhalten dieser Stoffgruppe.

Unter den hydrolytischen Enzym-Modellreaktionen wird die *Imidazol*-Katalyse<sup>40)</sup> zurzeit ganz besonders intensiv bearbeitet und in der Literatur am meisten zitiert. Wir haben sie bei der vorangehenden Diskussion nicht berücksichtigt, weil sie 1. als monofunktionelle nucleophile Katalyse in eine andere Kategorie fällt und 2. bisher nur bei den hochaktivierten Estern des p-Nitrophenols und seiner nächsten Verwandten, aber noch nie bei Estern aliphatischer Alkohole beobachtet wurde.

Abschliessend sei als wesentlichste Tatsache nochmals festgehalten, dass durch Zusatz von Dimethylaminoäthanol-N-oxyd die Neutralhydrolyse eines Cholinesters um das 50fache beschleunigt wird. Die Wirkungsweise wurde als bifunktionelle Katalyse gedeutet. Man könnte dagegen einwenden, dass bei einer echten bifunktionellen Katalyse eigentlich höhere Beschleunigungsfaktoren zu erwarten wären. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei diesem ersten primitiven Cholinesterase-Modell um einen Zufallstreffer handelt, bei dem insbesondere die optimale sterische Orientierung in bezug auf das Substrat mit grosser Wahrscheinlichkeit noch

<sup>34)</sup> S. J. BACH, *Ergebn. Physiol.* **48**, 529–574 (1955).

<sup>35)</sup> J. M. JOHNSTON & C. G. MACKENZIE, *J. biol. Chemistry* **221**, 301 (1956); C. G. MACKENZIE, in *Amino Acid Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 684–726.

<sup>36)</sup> S. R. KOREY, B. DE BRAGANZA & D. NACHMANSOHN, *J. biol. Chemistry* **189**, 705 (1951).

<sup>37)</sup> M. S. FISH, N. M. JOHNSON & E. C. HORNING, *Biochim. biophys. Acta* **18**, 564 (1955); M. S. FISH, C. C. SWEELEY & E. C. HORNING, *Chemistry & Ind.* **1956**, R 24; M. S. FISH, C. C. SWEELEY, N. M. JOHNSON, E. P. LAWRENCE & E. C. HORNING, *Biochim. biophys. Acta* **21**, 196 (1956); C. C. SWEELEY & E. C. HORNING, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2620 (1957).

<sup>38)</sup> E. WENKERT, *Experientia* **10**, 346 (1954).

<sup>39)</sup> T. J. McCORD, J. M. RAVEL, C. G. SKINNER & W. SHIVE, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5693 (1957); Zusammenfassung früherer Arbeiten: W. SHIVE & C. G. SKINNER, *Ann. Review Biochemistry* **27**, 643–678 (1958).

<sup>40)</sup> T. C. BRUCE & G. L. SCHMIR, *Arch. biochem. Biophys.* **63**, 484 (1956); *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1663 (1957); **80**, 148 (1958); M. L. BENDER & B. W. TURNQUEST, *ibid.* **79**, 1652, 1656 (1957); D. M. BROUWER, M. J. v. D. VLUGT & E. HAVINGA, *Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch., Proc. B* **60**, No. 4, 275 (1957); A. S. BRECHER & A. K. BALLS, *J. biol. Chemistry* **227**, 845 (1957); W. LANGENBECK & R. MAHRWALD, *Chem. Ber.* **90**, 2423 (1957); W. L. KOLTUN, R. N. DEXTER, R. E. CLARK & F. R. N. GURD, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 4188 (1958).

nicht erreicht ist. Umsomehr sollte es deshalb möglich sein, nach dem Prinzip der hier entwickelten Vorstellungen dem Idealfall immer näher zu kommen und so zu immer besseren und leistungsfähigeren Cholinesterase-Modellen zu gelangen; dies ist das Ziel unserer weiteren Arbeiten.

## Experimenteller Teil<sup>41)</sup>

### I. Substrate

*Benzoyl-cholin-chlorid*. Bezogen von HOFFMANN-LA ROCHE. Die alkal. Hydrolyse (quant. Verseifung) entspr. Gehalt von 99–100%.

*Dimethylaminoäthylbenzoat* ist kürzlich von MAMALIS & RYDON<sup>42)</sup> aus Dimethylaminoäthylchlorid und Kaliumbenzoat bereitet und knapp beschrieben worden. Präparativ günstiger erwies sich bei uns: a) Acylierung von Dimethylaminoäthanol mit Benzoylchlorid und Pyridin, oder b) besonders rationell für grössere Mengen, die cyanid-katalysierte Umesterung<sup>43)</sup> von Äthylbenzoat mit dem Aminoalkohol<sup>44)</sup>.

a) Eine Lösung von 9 g Dimethylaminoäthanol (EASTMAN) in 20 ml Pyridin wurde im Eisbad gekühlt. Im Laufe von 12 Min. wurden 15 ml Benzoylchlorid unter Umschwenken eingetropfelt. Es entstand eine klumpige Masse. Sie wurde mit dem Spatel zerdrückt und zuerst im Eisbad (15 Min.), dann bei Zimmertemperatur (3 Tage) stehengelassen. Man gab 25 ml Wasser dazu und liess noch weitere 10 Tage stehen. Die dunkelrote Lösung wurde im Wasserbad (50°) im Vakuum eingedampft. Unter Zusatz von Aceton (25 ml) liess sich der Kristallkuchen in Wasser (25 ml) lösen. Das Aceton wurde im Vakuum wieder abgedampft. Die zurückbleibende braune Lösung wurde mit 2-n. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alkalisch gemacht und mit Äther extrahiert (3 × 50 ml). Die Ätherlösung wurde mit Wasser gewaschen (3 × 25 ml), über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 100° hinterblieben 17,5 g dunkles Öl (90,6% Rohausbeute). Destillation lieferte 14,9 g nahezu farblose Flüssigkeit, Sdp. 133–135°/12 Torr. Eine Probe wurde über das krist. Hydrochlorid (s. u.) gereinigt: Sdp. 133°/12 Torr, 100–100,5°/0,1 Torr; d<sub>4</sub><sup>20</sup> = 1,0328; n<sub>D</sub><sup>20</sup> = 1,5079.

*Dimethylaminoäthylbenzoat-hydrochlorid*. Durch Fällen der Base in Äther mit 4-n. HCl in Äther. 3 g, aus kaltem Äthanol (10 ml) mit Aceton (30 ml) zum Kristallisieren gebracht, geben 2,2 g, Smp. 144°. Das Analysenpräparat (Analyse ausgeführt im techn.-chem. Laboratorium der ETH. Zürich) wurde 16 Std. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 0,2 Torr und ca. 20° getrocknet (sublimiert beim Erwärmen).

C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N.HCl	Ber. C 57,51	H 7,02	N 6,10	Cl 15,44%
(229,7)	Gef. „ 57,56	„ 7,10	„ 6,18	„ 15,44%

b) In einen 1-l-Rundkolben gab man 2,0 g KCN und 100 ml Toluol, dieses wurde grösstenteils unter vermindertem Druck abgedampft. Zum Rückstand gab man 90 ml Äthylbenzoat und 100 ml Dimethylaminoäthanol (beide frisch destilliert) und liess im verschlossenen Kolben 22 Std. stehen. Hierauf wurde im Wasserbad von nicht über 50° bei 15 Torr eingedampft; dabei wurden 83 ml Destillat gesammelt. Man gab 85 ml frisches Dimethylaminoäthanol dazu und liess weitere 3 Tage bei Raumtemperatur stehen. Wiederum destillierte man teilweise ab (60 ml), liess mit weiteren 25 ml Dimethylaminoäthanol noch 2 Tage stehen, filtrierte und destillierte

<sup>41)</sup> Die Smp. sind unkorrigiert; Fehlergrenze ca. ± 3°.

<sup>42)</sup> P. MAMALIS & H. N. RYDON, J. chem. Soc. 1955, 1058.

<sup>43)</sup> Q. R. PETERSEN, J. Amer. chem. Soc. 77, 1743 (1955).

<sup>44)</sup> In der Literatur sind Beispiele ähnlicher Umesterungen beschrieben, die auch ohne Zusatz von KCN erfolgreich waren<sup>45)</sup>; entsprechende Versuche im vorliegenden Fall zeigten, dass hier die «unkatalysierte» (d. h. durch den im Überschuss zugesetzten basischen Alkohol katalysierte) Reaktion viel schlechtere Resultate lieferte.

<sup>45)</sup> Vgl. a) Umesterung von Benzilsäure-methylester mit Diäthylaminoäthanol: Schweiz. Pat. Nr. 187 825; b) tertiäre Amine als Umesterungs-Katalysatoren: H. E. ZAUGG, M. FREIFELDER, H. J. GLENN, B. W. HORROM, G. R. STONE & M. R. VERNSTEN, J. Amer. chem. Soc. 78, 2626 (1956).

endgültig in drei Stufen, zuletzt an der Ölpumpe. Man erhielt 60 g farbloses Öl, Sdp. 97–98°/0,1 Torr. Titration mit 0,1-n. HCl in Alkohol (KJELDAHL-Indikator) ergab einen Gehalt von 100% Esterbase.

*Benzoyloxyäthyl-dimethylaminoxid-hydrochlorid*<sup>46)</sup>. Nach bekanntem Verfahren<sup>48)</sup> wurde eine wasserfreie Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Äther hergestellt (1,8-m.; Titration mit Permanganat). 90 ml dieser Lösung, auf 4° vorgekühlt, wurden unter Eiskühlung mit 18,9 g Dimethylaminoäthylbenzoat vermischt. Die klare Lösung wurde 16 Std. bei ca. 20° aufbewahrt; es hatte sich eine im Äther unlösliche, viskose Flüssigkeitsschicht gebildet. Beim Eindampfen (unter Feuchtigkeitsausschluss; teilw. Vakuum; Wasserbad < 50°) auf ca. 50 ml wurde die Mischung homogen und erwärmte sich spontan auf ca. 50°. Nach weiteren 23 h hatten sich nochmals 2 Schichten gebildet; völliges Eindampfen bei 20° gab ein farbloses Öl, das nach 24stündigem Stehen mit Äther behandelt (Umschwenken und Abdekantieren) wurde; dabei verwandelte sich der Sirup schliesslich in Kristallklumpen. Diese wurden noch mehrmals mit Äther gewaschen und schliesslich mit 50 ml einer 3-n. Lösung von trockenem HCl in Äther übergossen (Erwärmung; Gasentwicklung; grünlichgelbe Dämpfe; Geruch nach Chlor). Die Lösung wurde abdekantiert, die Klumpen wurden mit Äther gewaschen und dann noch zweimal (25; 10 ml) mit ätherischer Salzsäure behandelt, bis keine Reaktion mehr eintrat. Die Kristallmasse wurde jetzt in heissem Acetonitril gelöst (100 ml) und dann bis zur starken Trübung mit Äther versetzt (150 ml). Die Kristalle wurden mit Aceton gewaschen und getrocknet: 10,9 g, Smp. 130–137°. Zur Reinigung wurde eine gesättigte Lösung in Acetonitril heiss filtriert und erkalten gelassen: 6,8 g Kristalle, Smp. 142–144°. Das Analysenpräparat (Mikroanalysen von Herrn E. THOMMEN, Universität Basel) schmolz bei 142–145°.

C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> NCl	Ber. C 53,77	H 6,56	O 19,54	N 5,70	Cl 14,43%
(245,7)	Gef. „ 53,93	„ 6,69	„ 19,61	„ 5,63	„ 14,67%
Ber. H <sub>2</sub> Aufnahme kat.			1 H <sub>2</sub>		Vers.-Äq. 123
Gef. (kat. Hydr., Pd-C in C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)			1,084 H <sub>2</sub>		Vers.-Äq. 120

*Dimethylaminoäthanol-N-oxyd*. 18 g Dimethylaminoäthanol wurden unter Kühlung im Eisbad portionenweise mit 36 ml 30-proz. Perhydrol versetzt. Nach 18 Std. wurde mit Pt-Katalysator gerührt, bis die Probe mit PbS-Papier negativ war (7 Std.). Man filtrierte durch eine Schicht Tierkohle + «Hyflo Supercel» und dampfte im Vakuum ein. Trocknet man zuletzt über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> an der Ölpumpe (< 1 Torr), so wird der Sirup schliesslich fest: 20,4 g zerfliessliche Kristalle. Versuche zum Umkristallisieren oder zur Herstellung gut charakterisierbarer Salze sind bisher ohne Erfolg geblieben.

## II. Semiquantitativer Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten

a) *Alkalische Hydrolysen*. Die Reaktionen wurden gestartet durch möglichst rasches Vermischen von 2,5 ml Ester (0,1-m. Stammlösung) und 2,5 ml 0,1-n. NaOH in so viel Wasser (bidest.) bzw. t-Butanol, dass das Endvolumen stets 10,0 ml betrug und dass im Fall der wasserunlöslichen Substrate 5 ml H<sub>2</sub>O und 5 ml t-Butanol im Gemisch vorhanden waren. Durch raschen Zusatz von 4,0 ml 0,1-n. HCl wurden die Reaktionen abgestoppt. Rücktitration mit 0,1-n. NaOH (Phenolphthalein) und Vergleich mit einem identischen, aber ohne Substrat durchgeführten Kontrollversuch ergab dann den Stand der Hydrolyse zur betreffenden Zeit. Zur Illustration bringen wir je 1 Beispiel (Tab. V). Schon weiter oben (Tab. I) wurde darauf hingewiesen, dass Salzeffekte bei diesen semiquantitativen Untersuchungen vernachlässigt werden können.

b) *Neutral-Hydrolysen*. Diese wurden bei 100° (Glycerinbad) im zugeschmolzenen Jenaer-Röhrchen durchgeführt. Durch Einstellen ins Eisbad wurde die Reaktion gestoppt, dann wurde das Röhrchen geöffnet und sein Inhalt nach Zusatz von Phenolphthalein direkt im Röhrchen mit

<sup>46)</sup> Die allgemeinen Arbeitsregeln zur Herstellung von Aminoxyden entnehmen wir dem Übersichtsreferat von C. C. J. CULVENOR, Rev. pure appl. Chemistry **3**, 83–114 (1953); das neuere Ozon-Verfahren nach HORNER<sup>47)</sup> ergab bei diesen Esteraminen weniger reine Präparate, und auch die Ausbeuten waren viel schlechter.

<sup>47)</sup> L. HORNER, H. SCHAEFER & W. LUDWIG, Chem. Ber. **91**, 75 (1958).

<sup>48)</sup> Vgl. R. CRIEGEE, in HOUBEN-WEYL-MÜLLER, Methoden der organ. Chem. 4. Aufl., Bd. VIII, S. 33.

NaOH titriert (Rührspirale aus Glas). Für jede Einzelmessung wurden gleichzeitig 3 Röhrchen eingesetzt: «Analyse», «Kontrolle» und «pH-Bestimmung». – Ansätze (je 10,0 ml Lösung): «Analyse»: 0,25 mMol Substrat (+ evtl. Zusatz), gegebenenfalls noch auf gewünschtes pH gebracht; «Kontrolle»: genau gleicher Ansatz, aber ohne Substrat; «pH-Bestimmung»: identisch mit «Analyse», zur pH-Messung nach der Reaktion.

Tabelle V. *Alkalische Hydrolyse von Benzoylcholinchlorid und Äthylbenzoat*

$$k_2 = 1/t(1/c_t - 1/c_0) \text{ Liter} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

- I. *Benzoylcholinchlorid in H<sub>2</sub>O*. Stammlösung: 0,1-m. Ansätze: «Analyse»: 2,5 ml Stammlösung + 2,5 ml 0,1-n. NaOH + 5 ml H<sub>2</sub>O; abgestoppt durch Zusatz von 4,0 ml 0,1-n. HCl. «Kontrolle»: 2,5 ml 0,1-n. NaOH + 7,5 ml H<sub>2</sub>O, dann 4 ml 0,1-n. HCl. – Rücktitr. jeweils mit 0,1-n. NaOH (f = 1,00).
- II. *Äthylbenzoat in t-Butanol*. Stammlösung: 0,1-m. 2,5 ml pro Ansatz. «Analyse»: Dazu 2,5 ml t-Butanol + 2,5 ml 0,1-n. NaOH + 2,5 ml H<sub>2</sub>O. Stoppen mit 4 ml 0,1-n. HCl; Rücktitr. mit 0,1-n. NaOH (f = 0,96). «Kontrolle»: 5,0 ml t-Butanol + 2,5 ml 0,1-n. NaOH + 2,5 ml H<sub>2</sub>O. Dann 4 ml 0,1-n. HCl. Rücktitr. mit 0,1-n. NaOH (f = 0,96).

Substrat	Zeit	Titration		Differenz A minus K	% Reaktion	k <sub>2</sub>
		NaOH 0,1-n.				
		Analyse	Kontrolle			
I	1'00"	2,14 ml	1,77 ml	0,37 ml	14,8	6,98
	1'55"	2,41	1,77	0,64	25,6	7,17
	2'30"	2,59	1,77	0,82	32,8	7,80
	3'00"	2,63	1,77	0,86	34,4	6,99
	3'25"	2,72	1,77	0,98	38,0	7,17
	3'30"	2,79	1,77	1,02	40,8	7,87
	4'10"	2,84	1,77	1,07	42,8	7,18
	5'35"	3,02	1,77	1,25	50,0	7,16
	6'25"	3,10	1,77	1,33	53,2	7,08
	8'00"	3,18	1,77	1,41	56,4	6,57
	9'00"	3,30	1,77	1,53	61,2	7,01
II	120'	1,45 ml	1,12 ml	0,33 ml	12,6	4,805 · 10 <sup>-2</sup>
	180'	1,52	1,12	0,40	15,4	4,404 · 10 <sup>-2</sup>
	270'	1,77	1,12	0,65	24,9	4,885 · 10 <sup>-2</sup>
	330'	1,85	1,12	0,73	28,0	4,713 · 10 <sup>-2</sup>
	390'	1,88	1,12	0,76	29,2	4,230 · 10 <sup>-2</sup>
	540'	2,10	1,12	0,98	37,6	4,463 · 10 <sup>-2</sup>
	1200'	2,58	1,12	1,46	56,1	4,141 · 10 <sup>-2</sup>
	1380'	2,70	1,12	1,58	60,6	4,465 · 10 <sup>-2</sup>

In einzelnen Fällen musste auch noch der Laugeverbrauch des Ansatzes zur Zeit  $t = 0$  ( $x_0$  ml) bei der Auswertung berücksichtigt werden. Zwei Ausführungsbeispiele sind in den Tab. VI und VII dargestellt.

Bei der Neutralhydrolyse von Dimethylaminoäthylbenzoat (Tab. III) war ausserdem ein besonderer Kunstgriff notwendig, um den sonst sehr schleppenden Umschlag von Phenolphthalein besser zu erkennen: Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Proben in Stehkolben übergeführt, mit total ca. 10 ml H<sub>2</sub>O quantitativ nachgespült und mit Indikator versetzt; durch Zusatz von 30 ml t-Butanol erhält man jetzt einen brauchbaren Farbumschlag.

Tabelle VI. *Benzoylcholinchlorid in H<sub>2</sub>O (100° ± 0,2°)*  
 pH<sub>0</sub> (vor der Reaktion) = 4,10; c<sub>0</sub> = 0,025 Mol l<sup>-1</sup>; alle pH bei 20° gemessen  
 (Glaselektrode)

Zeit (min)	% R.	pH <sub>t</sub>	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	Halbwertszeit τ(min)	
2460	5,7	3,40	2,39 · 10 <sup>-5</sup>	τ = 33000	$\bar{k}_1 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ $\bar{\tau} = 34650 \text{ min}$
6780	14,6	3,22	2,31 · 10 <sup>-5</sup>		
9660	21,5	3,16	2,29 · 10 <sup>-5</sup>		
12540	24,2	3,14	2,20 · 10 <sup>-5</sup>		
15420	27,6	3,16	2,02 · 10 <sup>-5</sup>		
22650	38,8	3,20	2,10 · 10 <sup>-5</sup>		
32730	46,1	3,32	1,88 · 10 <sup>-5</sup>	τ = 40526	$k_1 = \frac{\ln c_0 - \ln c_t}{t} \text{ min}^{-1}$
39900	49,5	3,16	1,71 · 10 <sup>-5</sup>		
44400	62,8	3,18	2,22 · 10 <sup>-5</sup>		
47100	63,7	3,0	2,14 · 10 <sup>-5</sup>		

Tabelle VII. *Dimethylaminoäthylbenzoat-N-oxyl-HCl / Neutral-Hydrolyse bei 100°*

Zeit (min)	Titriert mit 0,096-n. NaOH (Phenolphthalein)		(x <sub>t</sub> - x <sub>0</sub> ) ml	% Reaktion	10 <sup>3</sup> · k <sub>1</sub> min <sup>-1</sup>	pH <sub>0</sub>	pH <sub>t</sub>
	Kontrolle ml	Analyse x <sub>t</sub> ml					
0	0,06	0,27	0,00	0	-	5,68	5,68
10	0,06	0,31	0,04	1,5	1,6	5,68	5,52
20	0,06	0,38	0,11	4,2	2,1	5,68	5,46
40	0,06	0,50	0,23	8,8	2,3	5,68	5,20
60	0,06	0,56	0,29	11,1	2,1	5,68	
80	0,06	0,78	0,51	19,5	2,7	5,68	
120	0,06	0,93	0,66	25,3	2,4	5,68	
180	0,06	1,01	0,79	30,3	2,01	5,68	4,92
225	0,06	1,21	0,84	36,0	1,9	5,68	
270	0,06	1,36	1,09	41,8	2,00	5,68	
285	0,06	1,42	1,15	44,1	2,03	5,68	4,80
300	0,06	1,50	1,23	46,0	2,05	5,68	
315	0,06	1,53	1,26	48,2	2,08	5,68	
345	0,06	1,68	1,41	54,0	2,2	5,68	4,68

*Ansätze.* Jedes Röhrchen enthielt für Analyse: 2,5 ml 0,1-m. Stammlösung (mit NaOH neutralisiert) + 7,5 ml H<sub>2</sub>O; für Kontrolle: 10,0 ml H<sub>2</sub>O

### III. Isotopen-Versuche:

#### Neutral-Hydrolyse von Dimethylaminoäthylbenzoat-N-oxyl in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O

Zwei Rundkolben (50 ml) aus dickem Pyrex-Glas wurden für den Hauptversuch und die Kontrolle A wie folgt beschickt, dann zugeschmolzen und gleichzeitig 4 Tage lang im Trockenschrank auf 97–98° erhitzt.

*Hauptversuch:* 245,8 mg Dimethylaminoäthylbenzoat-HCl (1 mMol) und 84,0 mg NaHCO<sub>3</sub> (1 mMol) in 40 ml H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (mit ca. 1,2% <sup>18</sup>O; zweimal über KMnO<sub>4</sub> destilliert). pH vor der Reaktion: 6,0; pH nach der Reaktion: 4,30 (gemessen bei 19,6°).

*Kontrolle A* (Prüfung, ob Benzoesäure unter diesen Bedingungen <sup>18</sup>O aus dem Medium aufnimmt): 122,2 mg Benzoesäure «ANALAR» (1 mMol) und 41,6 mg NaHCO<sub>3</sub> (0,5 mMol) in 40 ml H<sub>2</sub><sup>18</sup>O. pH vor der Reaktion: 4,08; pH nach der Reaktion: 4,30 (gemessen bei 19,6°).

Für die *Kontrolle B* (Nachweis, dass *alkalische* Hydrolyse des Esters normale  $^{18}\text{O}$ -Isotopenverteilung gibt) gab man in einen Pyrex-Rundkolben (50 ml) 245,8 mg Dimethylaminoäthylbenzoat-HCl (1 mMol) und 88,2 mg NaOH (2,2 mMol), gelöst in 40 ml  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Man verschloss mit Gummistopfen und liess 11 Tage bei  $+4^\circ$  stehen.

Zur *massenspektrometrischen Analyse* wurde die Benzoesäure jeweils aus der Reaktionsmischung isoliert (Ansäuern, Extrahieren mit Äther, Waschen mit Wasser, Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gereinigt (Aufnehmen in  $\text{KHCO}_3$ -Lösung, Waschen mit Methylenchlorid, Ansäuern mit HCl, Extraktion mit Äther usw.); im Hauptversuch erhielt man schliesslich 112 mg Benzoesäure (Neutralisations-Äquivalent = 125 mg/mVal), die ins *Silbersalz* übergeführt wurden (Na-Salz in 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , Fälln mit 1 ml 1-m.  $\text{AgNO}_3$ , Filtrieren, Waschen und Trocknen gab 156 mg Ag-Benzoat).

Die beiden andern Ansätze wurden genau gleich verarbeitet.

*Bestimmung des  $^{18}\text{O}$ -Gehaltes von Benzoesäure durch Messung des Isotopenverhältnisses am  $\text{CO}_2$ , das durch pyrolytische Decarboxylierung des Silberbenzoates gewonnen wurde<sup>49)</sup>.* In ein Pyrexglasrohr von 6 mm Innendurchmesser, 70 mm Länge und 1 mm Wandstärke, das an einem Ende mit einer dünnwandig ausgezogenen Spitze verschlossen und am andern Ende mit einer Vakuumabschmelzstelle versehen ist (siehe Fig. 8), werden 23 mg (0,1 mMol) Silberbenzoat eingewogen, welche bei quantitativer Decarboxylierung ca. 2 ml  $\text{CO}_2$  von Atmosphärendruck (0,1 mMol) liefern. Nach der Einwaage wird das Rohr auf  $10^{-2}$  Torr evakuiert und abgeschmolzen. Dann wird das unter Vakuum eingeschmolzene Silberbenzoat im Muffelofen 8 Std. auf  $275^\circ$  erhitzt,

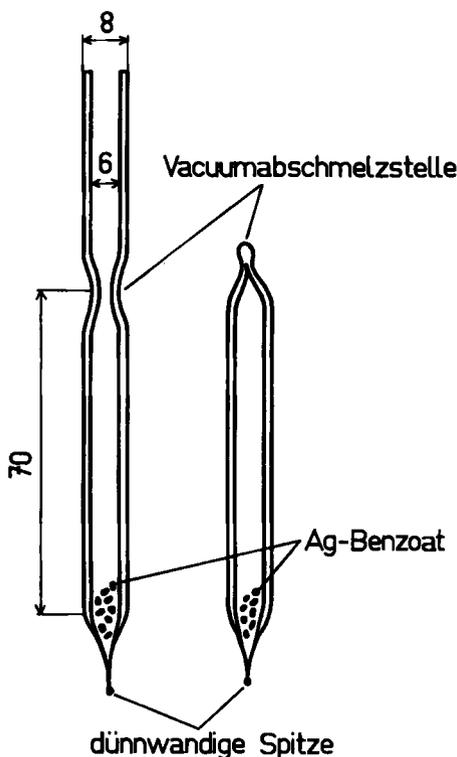


Fig. 8

<sup>49)</sup> Prinzip der Methode: D. B. SPRINSON & D. RITTENBERG, J. biol. Chemistry **180**, 707 (1949); vgl. auch L. PONTICORVO & D. RITTENBERG, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1705 (1954).

wobei sich neben einer grauen, zähen Masse ölige Tröpfchen bilden. Hernach wird das Pyrexrohr mit der dünnwandigen Spitze nach unten in das Zertrümmerungsgefäß A (Fig. 9) gebracht, das einen dickwandigen, nach innen gewölbten Boden B besitzt. Nach dem Evakuieren der ganzen Apparatur (Fig. 9) auf  $10^{-2}$  Torr wird der Hahn E geschlossen und das mit dem Latexschlauch F verbundene Zertrümmerungsgefäß so geschüttelt, dass die dünnwandige Spitze des Pyrexrohres G auf den dickwandigen Boden B aufschlägt und bricht. Dann wird das Gefäß A mit einem Aceton-Trockeneisgemisch und das Rohr H mit flüssiger Luft gekühlt. Beim Öffnen des Hahnes E kondensiert sich das bei der Decarboxylierung entwickelte  $\text{CO}_2$  via Dreiweghahn D in das Rohr H.

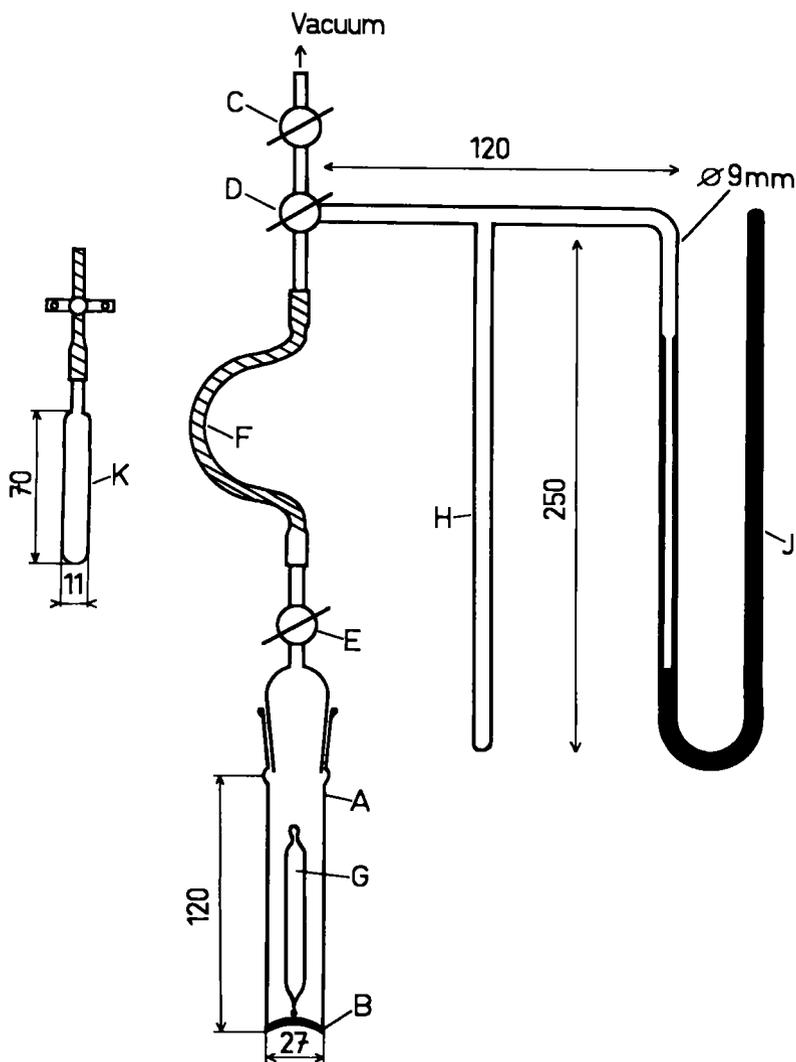


Fig. 9

Allfällig vorhandene, schwerer flüchtige Substanzen werden in dem mit Trockeneis gekühlten Gefäß A zurückgehalten. Nach dem Schliessen des Dreiweghahns D wird das Rohr H auf Raumtemperatur aufgewärmt, wobei der Druck des aus der Decarboxylierung gewonnenen  $\text{CO}_2$  am

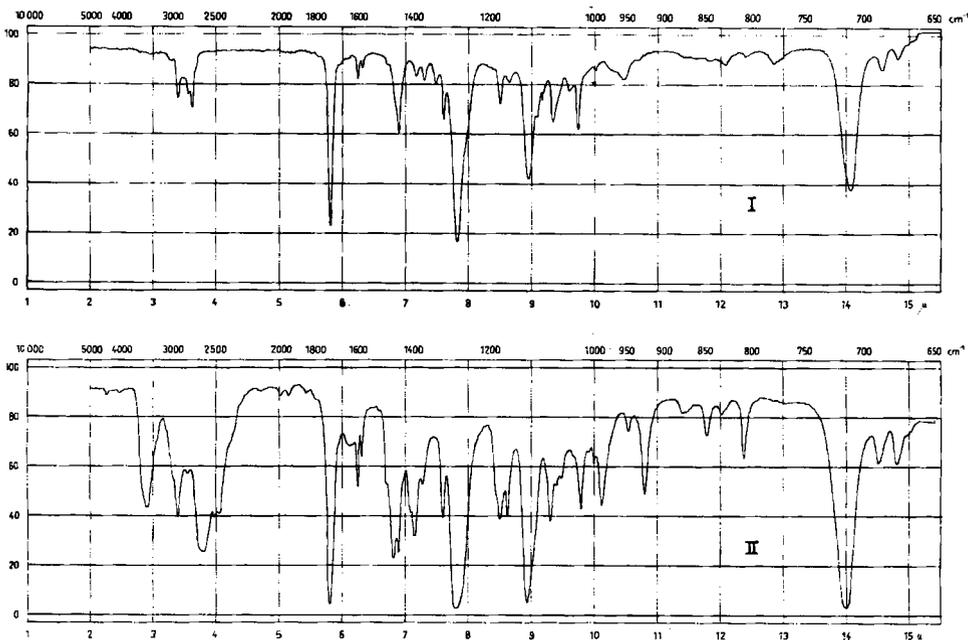
Quecksilberbarometer J abgelesen werden kann. Das Volumen der Apparatur ist so gewählt, dass 0,1 mMol CO<sub>2</sub> (ca. 2 ml bei Atmosphärendruck) einen Druck von ca. 100 Torr erzeugen. An Stelle des Gefäßes A wird jetzt das mit einem Latexschlauch und Quetschhahn versehene Gefäß K angeschlossen und *via* Dreiweghahn D und Hahn C evakuiert. Dann werden das Gefäß K mit flüssiger Luft und das Rohr H mit Trockeneis gekühlt und hernach *via* Dreiweghahn D miteinander verbunden, wobei sich das CO<sub>2</sub> im Gefäß K, welches am Einlaßsystem des Massenspektrometers angeschlossen werden kann, kondensiert und die beim ersten Kondensationsprozess mitgerissenen schwerflüchtigen Substanzen im gekühlten Rohr H zurückgehalten werden. Falls noch merkliche Mengen schwererflüchtige Substanzen im Rohr H festgestellt werden können, wird das Umkondensieren des CO<sub>2</sub> zwischen einer mit flüssiger Luft und einer mit Trockeneis gekühlten Vorlage noch ein- oder mehrmals wiederholt. Die mit CO<sub>2</sub> gekühlte Vorlage wird dabei jeweils nach dem Aufwärmen auf Raumtemperatur *via* Dreiweghahn D und Hahn C auf ca. 10<sup>-2</sup> Torr evakuiert. Die Schliche und Hähnen der Apparatur sind mit Apiezon N (METROPOLITAN VICKERS ELECTRICAL COMP. LTD., England) gefettet.

Die Messungen der <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O-Verhältnisse in den so gewonnenen CO<sub>2</sub>-Proben wurden mit Hilfe eines CONSOLIDATED-NIER Isotope-Ratio Mass Spectrometer, Modell 21-201, durchgeführt und ergaben die folgenden Resultate:

Tabelle VIII. <sup>18</sup>O-Bestimmungen

CO <sub>2</sub> aus Bombe . . . . .	0,208% <sup>18</sup> O	<i>Ag-Benzoesäure</i> aus Hauptversuch .	0,593% <sup>18</sup> O
H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O (verwendetes Hydrolyse-Medium) . . . . .	1,164	aus Kontrolle A . . . . .	0,216
<i>Ag-Benzoesäure</i> aus natürl. Benzoesäure . . . . .	0,202	aus Kontrolle B . . . . .	0,613

Fig. 10 gibt die IR.-Spektren der wichtigsten Substanzen (aufgenommen im Spektrollaboratorium der KTA. in Wimmis) wieder.



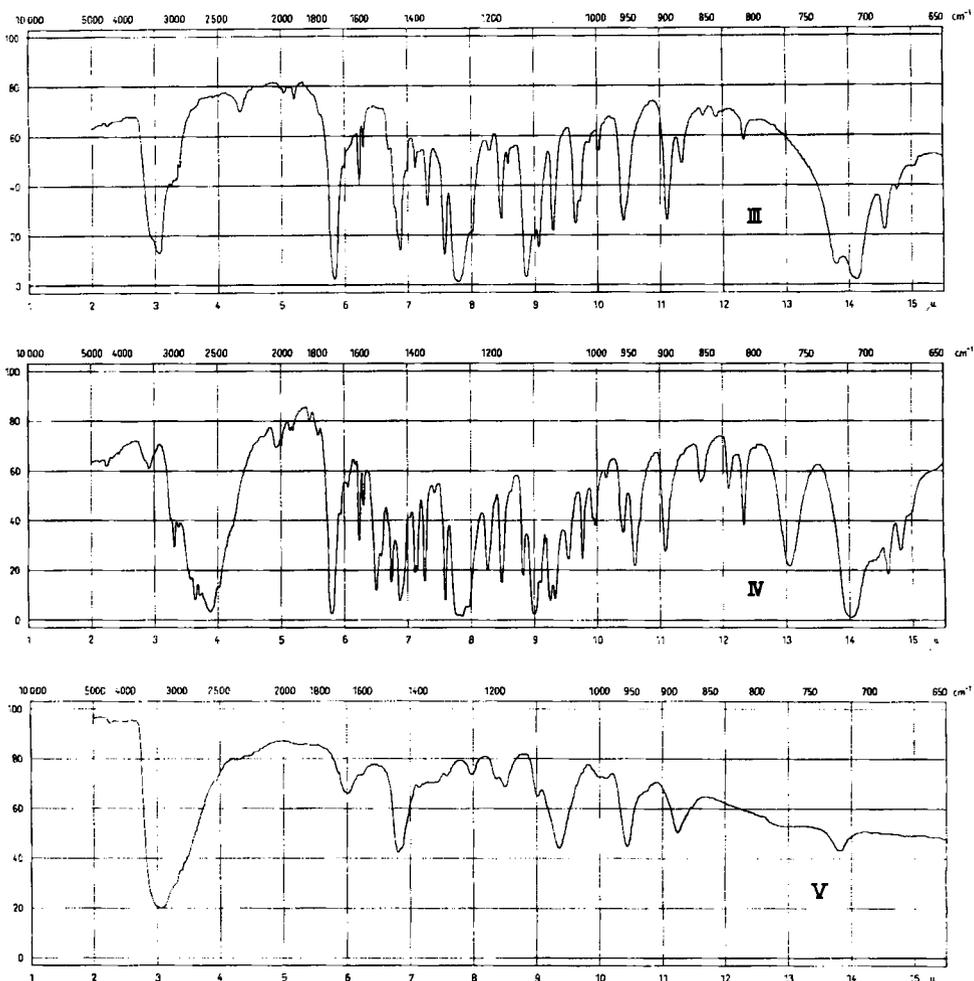


Fig. 10. IR.-Spektren

- I Dimethylaminoäthylbenzoat flüssig (Film); NaCl-Prisma.  
 II Dimethylaminoäthylbenzoat-hydrochlorid fest, in KBr.  
 III Dimethylaminoäthylbenzoat-N-oxyd (neutral), feuchte Kristalle, in KBr.  
 IV Benzoyloxyäthyl-dimethyl-hydroxylammoniumchlorid (Dimethylaminoäthylbenzoat-N-oxyd-HCl) fest, in KBr.  
 V Dimethylaminoäthanol-N-oxyd, konz. Lösung in H<sub>2</sub>O (Film).

Der eine von uns (M. TH.) ist der *Schweiz. Kommission für Atomwissenschaft (KAW.)* zu Dank verpflichtet. Das verwendete H<sub>2</sub><sup>18</sup>O wurde mit Hilfe von Präzisions-Destillierkolonnen gewonnen, welche im Rahmen eines Forschungsprogrammes der SKA. (Schweiz. Kommission für Atomenergie) entwickelt und in früheren Arbeiten beschrieben wurde<sup>50)</sup>.

<sup>50)</sup> W. KUHN, Chem. Ing. Techn. 1957, 6; P. BÄRTSCHI & W. KUHN, Techn. Rundschau 1954, Nr. 52.

## SUMMARY

The behaviour of dimethylaminoethylbenzoate N-oxide and similar esters during alkaline and neutral hydrolysis is investigated, using comparative rate studies and  $^{18}\text{O}$  tracer techniques. Whereas in an alkaline medium the amine oxide ester is somewhat less reactive than benzoylcholine, neutral hydrolysis is faster by a factor of about  $10^2$ . It was found, furthermore, that neutral hydrolysis of benzoylcholine is appreciably accelerated (ca. 50-fold) if dimethylaminoethanol N-oxide is added in equimolar amount, the amine oxide alcohol thus representing a cholinesterase model. On the basis of  $^{18}\text{O}$  tracer experiments presented here, and of indications taken from the literature, an attempt is made to interpret the results in terms of mechanisms involving, respectively, intramolecular and intermolecular bifunctional catalysis.

KTA Laboratorium Wimmis (Bern)  
und Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel

## 186. Détermination pH-métrique des constantes acide-base par la fonction de formation

II<sup>e</sup> partie

par I. Kapétanidis et D. Monnier

(26 VI 59)

Dans une publication précédente<sup>1)</sup>, nous avons exposé une méthode nouvelle permettant de déterminer les constantes de dissociation d'un acide polyvalent.

Poursuivant nos recherches, nous avons eu l'occasion de mieux étudier les inconvénients que la méthode peut présenter dans certains cas, et nous sommes parvenus à y remédier par des moyens très simples, tout en augmentant la précision de la méthode et en élargissant ses domaines d'application.

Tout d'abord, nous avons constaté que, dans les conditions auxquelles nous effectuons nos titrages (solutions  $10^{-3}$ -m.) et pour les acides bivalents ayant des constantes<sup>2)</sup> situées au voisinage de  $10^{-3}$  ou supérieures, un titrage de l'acide par la soude caustique n'est plus, à lui seul, suffisant pour permettre un calcul satisfaisant des constantes en question. En effet, un acide bivalent,  $\text{RH}_2$ , appartenant à cette catégorie est fortement dissocié en solution aqueuse  $10^{-3}$ -m. de sorte qu'il reste, en moyenne, moins d'un proton fixé par radical  $\text{R}^{--}$  ( $\bar{n} \leq 1$ ). Il en résulte que le système composé de deux équations du type:

$$\bar{n} = (2 - \bar{n})K_2(\text{H}^+)^2F_2 + (1 - \bar{n})K_1(\text{H}^+)F_1 \quad 3)$$

<sup>1)</sup> D. MONNIER & I. KAPÉTANIDIS, Helv. **41**, 1652 (1958).

<sup>2)</sup> Constantes acide-base selon BRÖNSTED.

<sup>3)</sup>  $K_1$  et  $K_2$  sont des constantes de stabilité, voir <sup>1)</sup>.