

Die von uns *früher verwendete Trennmethode*<sup>1)2)</sup> über doppelte Fällung des {CoOx} und anschließende Extraktion von Spuren Co<sup>II</sup> mit Chloroformlösung von Oxychinolin ist mit etwas grösserem Nullaustausch verbunden. – Eine scheinbar äusserst praktische Methode der Trennung von Co<sup>III</sup> und Co<sup>II</sup> in Gegenwart der verwendeten Oxalatkonzentrationen mittels des DOWEX-Chelating Resin A1 musste infolge katalytischer Wirkung der Harzphase, die schlecht reproduzierbar war, wieder aufgegeben werden.

In den *Versuchen bei Gegenwart von Cer* konnte die Trennmethode unverändert beibehalten werden; es zeigte sich sogar, dass die kleinen Cermengen die Kristallisationsgeschwindigkeit des CoOx günstig beeinflussten.

Die PHILIPS-Szintillationszählanlage wurde aus Mitteln des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG angeschafft. – Herrn U. WITTORF danken wir für experimentelle Mithilfe. Im Rahmen kurzfristiger Diplomarbeiten haben die Herren A. WALSER, M. WOHLWEND, M. BUZZOLINI, R. SCARTAZZINI, G. DE MARCHI, B. GLUTZ und E. KLOFFENSTEIN experimentell an Teilproblemen mitgearbeitet. – Herrn Prof. Dr. G. SCHWARZENBACH danken wir für sein Interesse an dieser Arbeit.

#### SUMMARY

The thermal decomposition of  $\text{CoOx}_3^{3-}$  has been investigated in neutral and acid solutions and in presence of the metal ions  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ . Their catalytic influence increases in the series as listed, without being connected with appreciable changes in the activation energy which is also the same for decomposition in neutral and acid solution. In the electron exchange reaction between oxalate complexes of Co<sup>II</sup> and  $\text{CoOx}_3^{3-}$  the complex  $\text{CoOx}_2^{2-}$  is the only important species. The activation energy is slightly lower for the electron exchange than for the thermal decomposition. The exchange is catalysed by Cerium (III + IV). Mechanisms are postulated which connect all the reactions studied as well as the isomerization of  $\text{CoOx}_3^{3-}$  in aqueous solution, suggesting that the latter process has to be considered as a reversible oxidation of the ligand by Co<sup>III</sup>. Several independent facts suggest that the free radical ion  $\text{C}_2\text{O}_4^-$  does not appear as an unstable intermediate in solution. The transition state of the exchange reaction is likely to involve a bridged binuclear species. All reactions described are intimately connected with the entrance of water into the first coordination shell of  $\text{CoOx}_3^{3-}$ .

Zürich, Laboratorium für Anorganische Chemie  
der Eidg. Technischen Hochschule

### 213. Kinetische Studie zur Aminolyse von «aktiven Estern» bei der Peptidsynthese

3. Mitteilung über chemische Struktur und UV.-Spektroskopie<sup>1)</sup>

von K. Stich und H. G. Leemann

(7. VI. 63)

A. – Das grosse Interesse, das die Verwendung von aktiven Estern bei der Peptidsynthese in neuerer Zeit gefunden hat, veranlasste uns, die Kinetik der Aminolyse einer Reihe zum grössten Teil neuer Phenylester vergleichend zu untersuchen.

<sup>1)</sup> 2. Mitt.: K. STICH & H. G. LEEMANN, Helv. 46, 1151 (1963).

Während es uns allein um die Bestimmung physikalisch-chemischer Grössen ging, haben PLESS & BOISSONNAS<sup>2)</sup> auf Grund unserer Messungen die Verwendungsmöglichkeit gewisser Phenylester diskutiert, die bei den Synthesen von Polypeptiden durch SANDRIN, GUTTMANN & BOISSONNAS<sup>3)</sup> experimentell bestätigt werden konnte.

**B.** – Als *Methode* für die Beobachtung des Reaktionsablaufs wählten wir die spektrophotometrische Bestimmung einer der Komponenten im Reaktionsgemisch. Die Bestimmung der optischen Dichte ( $D$ ) in Funktion der Zeit bei konstanter Wellenlänge (Fig. 1) gestattete eine grosse Variationsmöglichkeit der Parameter Temperatur und Konzentration, sowie Selektivität der Versuchsbedingungen. In wenigen speziell gelagerten Fällen erwies sich eine weitere Registrierart – die in gegebenen zeitlichen Abständen wiederholte Aufnahme eines Teils des Spektrums – als ausserordentlich vorteilhaft, dies besonders bei der Abklärung der Stöchiometrie der Reaktion (Fig. 2).

Durch Einsetzen der optischen Dichte ( $D$ ) an Stelle der jeweiligen Konzentration<sup>4)</sup> in der Reaktionsgleichung liess sich die Rechnung zur Bestimmung der Reaktionsordnung bedeutend vereinfachen. Als Messgeräte standen uns Spektralphotometer BECKMAN DK 2A zur Verfügung, die es gestatteten, die optische

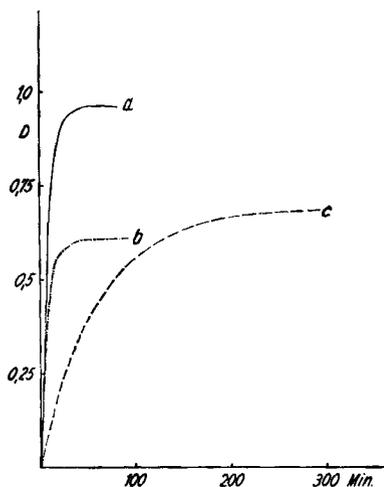


Fig. 1. Ableitung der optischen Dichte nach der Zeit

- a) CBO-Phe-pentachlorphenylester,  $\lambda_{max}$  303 m $\mu$   
(Phenol);  
b) CBO-Phe-pentachlorphenylester,  $\lambda_{max}$  326 m $\mu$   
(Phenolat);  
c) CBO-Phe-*p*-nitrophenylester,  $\lambda_{max}$  308 m $\mu$

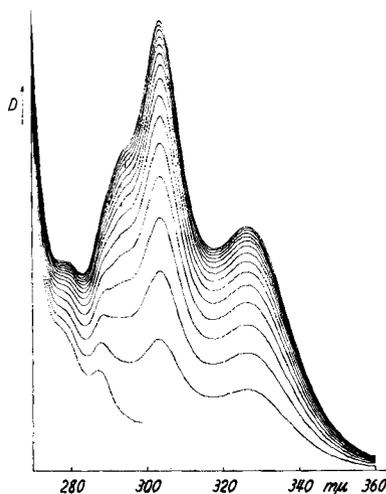


Fig. 2. CBO-Phe-pentachlorphenylester, Ableitung nach  $\lambda$

$\Delta t = 2,0$  Min.

$\lambda_{max}$  303 m $\mu$  = Phenol;

$\lambda_{max}$  326 m $\mu$  = Phenolat

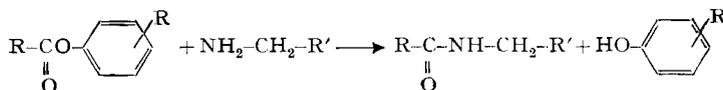
<sup>2)</sup> J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1609 (1963).

<sup>3)</sup> ED. SANDRIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1637 (1963); ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1626 (1963).

<sup>4)</sup> Siehe auch L. P. HAMMETT, *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill Book Comp., N.Y., Chapter IV, S. 96 ff.

Dichte sowohl in Funktion der Zeit bei konstanter Wellenlänge als auch in Funktion der Wellenlänge bei konstantem zeitlichen Abstand  $\Delta t$  der Aufnahmen aufzeichnen.

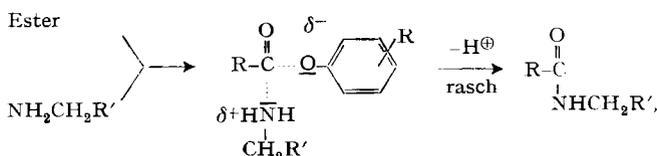
C. – Bei der Aminolyse eines «aktiven Esters»:



oder allgemein:

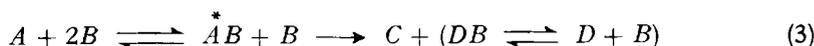
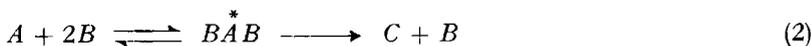


müssen mehrere Möglichkeiten des Reaktionsablaufes in Erwägung gezogen werden. Einmal können am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt je eine Molekel Ester und Amin beteiligt sein:



wobei das entstehende Phenolat-Ion das im zweiten, raschen Schritt ausgestossene Proton aufnehmen wird. In die allgemeine Formel der Reaktion (1) lässt sich in diesem Fall für  $a$  und  $b$  der Wert  $-1$  (eins) einsetzen. Die Reaktion wird zweiter Ordnung mit einem stöchiometrischen Verhältnis 1:1 sein.

Andererseits hat es sich im Verlaufe unserer Messungen gezeigt, dass in bestimmten Fällen  $b$  in Gleichung (1) grösser als  $-1$  (eins) sein muss. Es musste deshalb durch Analyse der Messresultate entschieden werden, ob das zusätzlich benötigte Amin am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt [Gleichung (2)] oder erst in sekundärer Reaktion zur Bildung eines Phenolat-Gleichgewichtes [Gleichung (3)] benötigt werde:



Es lässt sich nun zeigen, dass bei der Aminolyse in Dioxan der in Gleichung (3) dargestellte Fall zutrifft, wobei der Betrag von  $b$  aus der spektrophotometrischen Messung des Phenolatgehaltes zur Zeit  $t \rightarrow \infty$  erhalten wird.

In der Reihe der untersuchten substituierten Phenylester zeigen alle mit Ausnahme von XVIII, XXIV und XXVI<sup>5)</sup> ein normales Reaktionsverhalten beim Arbeiten in Dioxan. Sie liefern ein Gleichgewichtsgemisch, das vorzugsweise auf der Seite des Phenols liegt, wobei sich die geringe eventuell vorhandene Menge an Phenolat in der Rechnung nicht bemerkbar macht. Bei den drei erwähnten Phenylestern XVIII, XXIV und XXVI<sup>5)</sup> weist das Gleichgewicht je nach der Menge an zugesetztem Amin bis zu 50% Phenolat auf.

<sup>5)</sup> Die Nummernbezeichnung der aktiven Ester sowie auch die in der Peptidchemie übliche abgekürzte Schreibweise wurden aus <sup>2)</sup> übernommen.

Im Laufe der Untersuchung zeigte es sich, dass zur Bestimmung der Ordnung die optimalen Bedingungen in bezug auf zeitlichen Aufwand wie folgt gewählt werden mussten:

$$\begin{aligned} T &= 25^\circ\text{C}; \text{Lösungsmittel: Dioxan «MERCK»} \\ c_{\text{Ester}} &3,5 \cdot 10^{-4} \text{ Mol pro Liter (= } A_0) \\ c_{\text{Amin}} &3,5 \cdot 10^{-3} \text{ Mol pro Liter (= } B_0) \end{aligned}$$

Unter der Bedingung  $c_{\text{Ester}} \neq c_{\text{Amin}}$  gilt die Differentialgleichung einer Reaktion zweiter Ordnung:

$$dx/dt = k(A_0 + ax)(B_0 + bx)$$

und das dazugehörige bestimmte Integral:

$$kt = \frac{2,30259}{B_0 - A_0} \log \frac{A_0(B_0 + bx)}{B_0(A_0 + ax)}. \quad (4)$$

Setzen wir  $B_0 = 10 A_0$ ,  $a = -1$ ,  $b = -1$  und verwenden wir im logarithmischen Ausdruck an Stelle der Konzentrationsangaben die entsprechenden optischen Dichten oder deren Komplemente, so vereinfacht sich die Gleichung (4) zu:

$$kt = \frac{2,30259}{9 \cdot A_0} [\log (10D_\infty - D_t) - \log (D_\infty - D_t) - 1]. \quad (5)$$

Für den Fall, dass ein Gleichgewicht Phenol-Phenolat beobachtet werden kann, muss  $-1 < b < -2$  gesetzt werden.

**D.** – Während bei der Aminolyse des *p*-Nitrophenylesters in Dioxan (Fig. 1) nur das Entstehen des *p*-Nitrophenols beobachtet werden konnte, zeigte es sich, dass unter den gleichen Bedingungen beim Pentachlorphenylester sich ein Gleichgewicht Phenol-Phenolat ausbildete. Sowohl die Extinktion des Phenols bei  $303 \text{ m}\mu$  als auch diejenige des Phenolats bei  $326 \text{ m}\mu$  konnte zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante herangezogen werden (Fig. 1).

Mit Hilfe der in B erwähnten Ableitung nach der Wellenlänge bei konstantem  $\Delta t$  konnte das synchrone Erscheinen der beiden Gleichgewichtspartner verfolgt werden (Fig. 2).

Zur Bestimmung der Reaktionsordnung wandten wir in allen Fällen die Integrale Methode<sup>6)</sup> an, wie sie in Tabelle I für den Pentachlorphenylester dargestellt wurde.

Die Werte von  $k_2$  – der Index 2 soll ausdrücken, dass es sich um eine Konstante einer Reaktion zweiter Ordnung handelt – sind in  $l \text{ Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1}$  angegeben, wobei deren Konstanz die Reaktion als solche zweiter Ordnung als gesichert erscheinen lässt.

Setzt man in Gleichung (5)  $b = -1$ , so kommt man zu fallenden Werten von  $k_2$  im Laufe der Reaktion; wählt man  $b = -2$ , so findet man ein Ansteigen des Wertes von  $k_2$ . Sobald jedoch das Verhältnis Phenol-Phenolat in die Rechnung einbezogen wird, so wird, bei gemessenen 24% Phenolat,  $b = -1,24$  (Tab. I), und man erhält nach Gleichung (6):

$$kt = \frac{2,30259}{9 \cdot A_0} [\log (8,064 D_\infty - D_t) - \log (D_\infty - D_t) + \log 1,24 - 1] \quad (6)$$

konstante Werte von  $k_2$ .

<sup>6)</sup> K. J. LAIDLER, Chemical Kinetics, McGraw-Hill Book Company, N.Y. 1950, p. 13 ff.

Im Falle des *p*-Nitrophenylesters wurde die mittlere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_m = 2,84 \pm 0,02 \text{ l Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1}$ , beim Pentachlorphenylester  $k_m = 39,6 \pm 0,6 \text{ l Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1}$  gefunden.

Tabelle II. *Aminolyse aktiver Ester in Dioxan*  
 $T = 25^\circ\text{C}$ ; «pseudo-erste Ordnung»

Nr.	Verbindung	Halbwertszeit der Reaktion in Min.	$k'_1 \cdot 10^2$ Min. <sup>-1</sup>
XXVI	CBO-Phe-pentachlorphenylester	1,34	51,7
XXV	CBO-Phe-2, 4, 5-trichlorphenylester	4,9	14,0
XXVII	CBO-Phe-(2-chloro-6-carbamoyl-phenyl)-ester	7,2	9,6
XVIII	CBO-Phe-pentabromphenylester	9,9	6,97
XXI	CBO-Phe- <i>p</i> -nitrophenylester	23,2	2,99
XII	CBO-Phe-2, 4, 6-tribromphenylester	37,6	1,84
XVI	CBO-Phe-2, 4-dibromphenylester	78,0	0,89
XIII	CBO-Phe-3, 5-dichlorphenylester	172	0,40
XI	CBO-Phe-( <i>p</i> -methylcarbonyl-phenyl)-ester	654	0,11

E. – Um eine grössere Anzahl substituierter Phenylester bequem miteinander vergleichen zu können, haben wir nun durch Verwendung eines grossen Überschusses an Aminkomponente die Reaktion «pseudo-erster Ordnung» ablaufen lassen. Die Halbwertszeit wird damit unabhängig von der Konzentration  $A_0$  des Esters und kann als anschauliches Mass seiner Reaktionsfähigkeit herangezogen werden.

In jedem Fall wurde durch Auftragen von  $\log D_t$  gegen die Zeit  $t$  eine Gerade mit der Steigung  $k'_1$  erhalten. Eine Übersicht über die Aminolyse einer Anzahl CBO-Phe-ester mit verschiedenen Abgangsgruppen haben wir in Tabelle II (Dioxan) und III (Dioxan/Wasser 8:2) zusammengestellt.

Tabelle III. *Aminolyse aktiver Ester in Dioxan/Wasser 8:2*  
 $T = 25^\circ\text{C}$ ; «pseudo-erste Ordnung»

Nr.	Verbindung	Halbwertszeit der Reaktion in Min.	$k'_1 \cdot 10^2$ Min. <sup>-1</sup>
XXVII	CBO-Phe-(2-chloro-6-carbamoyl-phenyl)-ester	1,25	55,5
XXVI	CBO-Phe-pentachlorphenylester	2,4	29,1
XXV	CBO-Phe-2, 4, 5-trichlorphenylester	3,3	21,0
XXI	CBO-Phe- <i>p</i> -nitrophenylester	5,4	12,9
XX	CBO-Phe-2, 4, 6-trichlorphenylester	19,3	3,59
XVIII	CBO-Phe-pentabromphenylester	28,6	2,42
XVII	CBO-Phe-vanillinester	31,0	2,24
XVI	CBO-Phe-2,4-dibromphenylester	33,6	2,06
XV	CBO-Phe-2, 4-dichlorphenylester	35,5	1,93
XIV	CBO-Phe-4-carbäthoxyphenylester	42,0	1,65
XIII	CBO-Phe-3, 5-dichlorphenylester	44,5	1,56
XII	CBO-Phe-2, 4, 6-tribromphenylester	71,7	0,97
XI	CBO-Phe-( <i>p</i> -methylcarbonyl-phenyl)-ester	157	0,44
X	CBO-Phe-3-pyridylester	171	0,41
VIII	CBO-Phe-(2-carbamoyl-phenyl)-ester	305	0,23
VII	CBO-Phe-2, 4, 6-trijodphenylester	353	0,20
V	CBO-Phe-3-fluorphenylester	390	0,18

Tabelle I. *CBO-Phe-pentachlorphenylester*  
 Integrale Methode zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

t	$\frac{1}{t} \cdot 10^3$	$D_t$	$\frac{D_{\infty}-D_t}{M}$	log M	$\frac{8,06451}{M} \frac{D_{\infty}-D_t}{M}$	log M	$\log M - \log M - 1$ $+ \log 1,24$	$k_2$ Liter Mol <sup>-1</sup> Min <sup>-1</sup>
2	500,00	0,227	0,732	0,86451-1	7,507	0,87547	0,10438	39,27
3	333,33	0,317	0,642	0,80754-1	7,417	0,87023	0,15611	39,16
4	250,00	0,397	0,562	0,74974-1	7,337	0,86552	0,20920	39,33
5	200,00	0,467	0,492	0,69197-1	7,267	0,86136	0,26181	39,40
6	166,67	0,533	0,426	0,62941-1	7,201	0,85739	0,32140	39,16
7	142,86	0,584	0,376	0,57519-1	7,151	0,85437	0,37260	38,91
8	125,00	0,630	0,329	0,51720-1	7,104	0,85150	0,42772	39,08
9	111,11	0,669	0,290	0,46240-1	7,065	0,84911	0,48013	39,00
10	100,00	0,702	0,257	0,40993-1	7,032	0,84708	0,53057	39,92
11	90,91	0,735	0,224	0,35025-1	6,999	0,84504	0,58821	40,24
12	83,33	0,758	0,201	0,30320-1	6,976	0,84361	0,63383	39,75
13	76,92	0,781	0,178	0,25042-1	6,953	0,84217	0,68517	39,66
14	71,43	0,804	0,158	0,19866-1	6,933	0,84092	0,73568	39,54
15	66,67	0,820	0,139	0,14301-1	6,914	0,83973	0,79014	39,64
16	62,50	0,835	0,124	0,09342-1	6,899	0,83879	0,83879	39,45
17	58,82	0,850	0,109	0,03743-1	6,884	0,83784	0,89383	39,56
18	55,56	0,863	0,096	0,98227-2	6,871	0,83702	0,94817	39,64
19	52,63	0,875	0,084	0,92428-2	6,859	0,83626	1,00540	39,82
20	50,00	0,884	0,075	0,87506-2	6,850	0,83569	1,05405	39,66
21	47,62	0,893	0,066	0,81954-2	6,841	0,83512	1,10900	39,74
23	43,48	0,907	0,052	0,71600-2	6,827	0,83423	1,21165	39,64
25	40,00	0,917	0,042	0,62325-2	6,817	0,83359	1,30376	39,24
27	37,04	0,927	0,032	0,50515-2	6,807	0,83296	1,42123	39,61
29	34,38	0,934	0,025	0,39794-2	6,800	0,83251	1,52799	39,64
31	32,26	0,939	0,020	0,30103-2	6,795	0,83219	1,62458	39,44
32	31,25	0,942	0,017	0,23045-2	6,792	0,83200	1,69497	39,86
34	29,41	0,946	0,013	0,11394-2	6,788	0,83174	1,81122	40,08
36	27,78	0,949	0,010	0,00000-2	6,785	0,83155	1,92497	40,24
38	26,32	0,951	0,008	0,90309-3	6,783	0,83142	2,02175	40,04
40	25,00	0,953	0,006	0,77815-3	6,781	0,83129	2,14656	40,38
42	23,81	0,954	0,005	0,69897-3	6,780	0,83123	2,22568	39,88
44	22,73	0,955	0,004	0,60206-3	6,779	0,83117	2,32253	39,72
46	21,74	0,956	0,003	0,47712-3	6,778	0,83110	2,44740	40,04

$$k_m = 39,6 \pm 0,6 \text{ L Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1}$$

Dabei ist es auffallend, dass die Aminolyse im Gemisch allgemein rascher verläuft als in Dioxan. Der Grund für dieses Verhalten ist darin zu suchen, dass einerseits die Zunahme der Polarität des Lösungsmittels zur Stabilisierung des Übergangszustandes beiträgt, andererseits in der wasserhaltigen Lösung neben der Aminolyse die Hydrolyse parallel auftreten wird. Auf das Verhältnis der beiden Konkurrenzreaktionen möchten wir in einer späteren Arbeit näher eingehen und an dieser Stelle deshalb nur die dafür verantwortlichen Parameter rasch streifen.

F. – Lässt man unter vergleichbaren Bedingungen aktive Ester mit OH-Ionen in «pseudo-erster Ordnung» reagieren, so findet man, dass bei allen nicht oder nur wenig sterisch gehinderten Estern die Reaktionsgeschwindigkeit so gross wird, dass sie unter den in E gesetzten Normalbedingungen nicht mehr gemessen werden kann; die Hydrolyse kann nur bei Estern *o*-disubstituierter Phenole zeitlich verfolgt werden. Die Beispiele in Tabelle IV zeigen ausserdem, dass die Hydrolysegeschwindigkeit nicht vom *pK* der Phenolkomponente abhängt, sondern von der Raumerfüllung der beiden *o*-Substituenten bestimmt wird.

Tabelle IV. Hydrolyse aktiver Ester in Dioxan/Wasser 8:2  
T = 25°C; 0,01M Natriumhydroxid

Nr.	Verbindungen	<i>pK</i>	Halbwertszeit der Reaktion in Min.	$k'_1 \cdot 10^2$ Min. <sup>-1</sup>
VII	CBO-Phe-2,4,6-trijodphenylester	8,39	13,0	5,33
XII	CBO-Phe-2,4,6-tribromphenylester	8,43	1,3	53
XX	CBO-Phe-2,4,6-trichlorphenylester	8,56	0,6	115
XXV	CBO-Phe-2,4,5-trichlorphenylester	9,45	<0,1	>700
XV	CBO-Phe-2,4-dichlorphenylester	10,49	<0,1	>700
XXI	CBO-Phe- <i>p</i> -nitrophenylester	9,27	<0,1	>700
I	CBO-Phe-biphenylester	12,41	<0,1	>700

G. – Um eine quantitative Aussage über die Aktivierungsenergie der Aminolyse machen zu können, haben wir am Beispiel des CBO-Phe-pentachlorphenylesters die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei vier Temperaturen unter Bedingungen bestimmt, die eine Reaktion «pseudo-erster Ordnung» gewährleisten (Tab. V, Fig. 3).

Tabelle V. Temperaturabhängigkeit von  $k_1$

$T_{abs}$	297,9	308,4	318,1	328,0
$k_1$	245,7	346,6	509,7	729,6
$\ln k_1$	5,503	5,848	6,233	6,592

Aus der Steigung  $E_a/R$  der in Fig. 3 erhaltenen Geraden errechnet sich nach der modifizierten Gleichung<sup>7)</sup>:

$$E_a = \frac{R \cdot T(T - \tau)}{\tau} \ln \frac{k_T}{k(T - \tau)} \quad (8)$$

die Aktivierungsenergie zu 6,75 Kcal Mol<sup>-1</sup>, während  $\ln A$  sich in der Folge aus der ARRHENIUS-Gleichung ermitteln lässt. Die Anwendung der modifizierten Gleichung

<sup>7)</sup> HOUBEN-WEYL, Methoden der organischen Chemie, Bd. 3, Teil 1, Seite 133 ff.

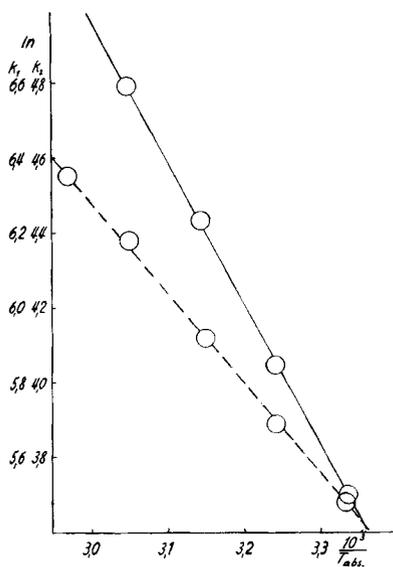


Fig. 3. Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  von CBO-Phe-pentachlorphenylester. —  $\ln k_1$ ; - -  $\ln k_2$

ist immer dann von Vorteil, wenn mit grösserer Genauigkeit eine Temperaturdifferenz  $\tau$  an Stelle der dazugehörigen absoluten Grössen gemessen werden kann.

Die gleiche Reaktion wurde ausserdem unter den in Abschnitt C erwähnten Bedingungen als Reaktion zweiter Ordnung ablaufen gelassen. Die Resultate (s. Tab. VI) liefern wiederum eine Gerade (Fig. 3), aus deren Steigung die Aktivierungsenergie zu  $E_a = 6,40 \text{ Kcal Mol}^{-1}$  errechnet wird.

Tabelle VI. Temperaturabhängigkeit von  $k_2$

$T_{abs}$	300,0	308,6	317,5	327,8	336,5
$k_2$	39,63	49,08	61,37	79,93	94,87
$\ln k_2$	3,6796	3,8934	4,1170	4,3810	4,5525

**Experimentelles.** — 1. *Lösungsmittel.* Die zur Verwendung gelangenden Lösungsmittel konnten nach Destillation direkt verwendet werden. Eine Ausnahme machte Triäthylamin, das zuerst durch Stehenlassen über CBO-Phe-2,4,5-Trichlorphenylester von eventuell vorhandenen primären und sekundären Aminen befreit werden musste. Benzylamin wurde im Vakuum destilliert und unter Stickstoff aufbewahrt.

2. *Aktive Ester.* Die aktiven Ester wurden durch Kristallisation gereinigt<sup>2)</sup>.

Zur *Messung* wurden eingewogene, konzentrierte Stammlösungen des aktiven Esters in Dioxan, bzw. der Aminokomponente in Dioxan oder Wasser, im Thermostat zur Temperaturkonstanz gebracht ( $\pm 0,05^\circ$ ). Zur Zeit 0 wurde durch Mischen aliquoter Mengen die Reaktion eingeleitet, die spektrophotometrisch in Quarzküvetten in einem thermokonstanten Küvettenhalter ( $\pm 0,05^\circ$ ) gegen eine Null-Lösung über die ganze Reaktionszeit verglichen wurde. Die Ableitung der optischen Dichte ( $D$ ) gegen die Zeit ( $t$ ) lieferte die Werte zur Errechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

#### SUMMARY

By means of spectrophotometric measurements the order of reaction in the aminolysis of «active esters» has been determined. In order to compare the reaction

velocities of various «active esters», test conditions have been chosen so that «pseudo-first order» reactions occur; this allows the characterization of the different «active esters» based on a half-value period which is independent of concentration.

On one of the «active esters» examined the activation energy was ascertained under both pseudo-first and second order reaction conditions.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien  
SANDOZ AG. Basel

## 214. L'inhibition de la décarboxylase de l'acide glutamique par le complexe cuivrique de l'isoniazide

par J. MAURON et E. BUJARD

Dédié au Prof. Dr. F. LEUTHARDT à l'occasion de son 60<sup>e</sup> anniversaire

(8 VI 63)

**Introduction.** – Il est fort bien connu que le coenzyme des décarboxylases bactériennes est généralement constitué par le pyridoxal-phosphate. Il a été ainsi possible de scinder certaines décarboxylases bactériennes (de la lysine, tyrosine, arginine, ornithine) en apoenzyme et coenzyme et de réactiver l'apoenzyme avec le pyridoxal-phosphate<sup>1</sup>). Cependant, cette preuve directe de la participation du dérivé de la vitamine B<sub>6</sub> à l'activité décarboxylante n'a pas été faite dans chaque cas.

Une preuve indirecte et moins rigoureuse peut alors suppléer à cette carence: l'inhibition de l'enzyme par les réactifs du groupe carbonyle. Or, la décarboxylase de l'acide glutamique du *Clostridium Welchii* S.R. 12 n'est que très peu inhibée par ces réactifs et on n'a pas pu séparer un coenzyme, si bien que GALE<sup>1</sup>) avait mis en doute la présence de pyridoxal-phosphate dans cette décarboxylase, ainsi que dans celle de l'histidine provenant du *Cl. Welchii* également.

A la suite des travaux de DAVISON<sup>2</sup>) sur le mécanisme de l'inhibition des décarboxylases par l'isoniazide, où l'auteur entrevoit dans l'inhibition progressive par l'isoniazide un nouveau test pour déceler la présence de pyridoxal-phosphate dans un enzyme, nous nous sommes proposé de revoir la question de la nature du coenzyme de cette décarboxylase, en étudiant le mécanisme de son inhibition par l'isoniazide.

### Partie expérimentale

**Décarboxylase.** – Le *Clostridium Welchii* S.R.12 employé comme source de l'enzyme est cultivé selon KREBS<sup>3</sup>). Après centrifugation et lavages, les bactéries sont suspendues dans l'eau et lyophilisées. Cette poudre de bactéries, préparée en grand et conservée sous vide a servi à tous les essais.

**Homogénat:** Pour chaque essai, les bactéries sont suspendues; la poudre lyophilisée est reprise dans une solution de NaCl 0,45% puis homogénéisée dans l'appareil de POTTER. L'homogénat contient en majeure partie des cellules intactes. Sauf indication contraire, les essais sont faits avec l'homogénat.

<sup>1</sup>) E. F. GALE, The bacterial amino acid decarboxylases. *Advances Enzymol.* VI, 1 (1946).

<sup>2</sup>) A. N. DAVISON, *Biochim. biophysica Acta* 79, 131 (1956).

<sup>3</sup>) H. A. KREBS, *Biochem. J.* 43, 51 (1948).