

# Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung von Carbonsäureestern mit Hydroxylamin

Von

**H. Hörmann\***

Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 29. September 1964)

Die Hydroxamsäurebildung aus Hippursäureäthylester und verschiedenen Aminosäure- und Peptidestern wurde in Abhängigkeit von pH und Hydroxylaminkonzentration kolorimetrisch untersucht. Günstige Reaktionsbedingungen sind pH 9,5 und 0,72*m*-NH<sub>2</sub>OH, 37°. Die Ausbeute wird durch die parallel gehende Verseifungsreaktion etwas gedrückt. Bei Aminosäure- und Di-peptidestern, die zu Ringschlußreaktionen neigen, sinkt die Hydroxamsäureausbeute erheblich ab.

The formation of hydroxamic acids from ethyl hippurate and other amino acid and peptide esters has been investigated colorimetrically in relation to pH and hydroxylamine concentration. Conditions favorable for the reaction are pH 9,5 and a 0,72*m* hydroxylamine solution at 37°. Generally, the yield is slightly diminished by the competing saponification reaction. However, with esters of amino acids and dipeptides tending to undergo cyclization reactions, the yield is considerably reduced.

Die Reaktion mit Hydroxylamin hat in der Naturstoffchemie bereits eine erhebliche Bedeutung zur Charakterisierung aktiver Carbonsäurederivate, wie z. B. Acylphosphate<sup>1</sup> oder Acyl-CoA-Verbindungen<sup>2</sup>, erlangt. Diese energiereichen Zwischenprodukte des Stoffwechsels bilden bereits bei neutralem pH Hydroxamsäuren, die auf Grund ihrer Farbbildung mit Eisen(III)-Salzen einfach quantitativ bestimmt oder auf Papierchromatogrammen lokalisiert werden können. In neuerer Zeit

\* Herrn Prof. Dr. Hermann Bretschneider zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

<sup>1</sup> F. Lipman und L. C. Tuttle, J. biol. Chem. **159**, 21 (1945).

<sup>2</sup> E. R. Stadtman, J. biol. Chem. **196**, 535 (1952).

ist die Überführung in Hydroxamsäuren immer mehr auch zur Charakterisierung und quantitativen Bestimmung normaler Carbonsäureester herangezogen worden. Bedeutung hat die Methode u. a. in der Proteinchemie erlangt, nachdem in Kollagen esterartige Bindungen aufgefunden wurden<sup>3</sup>, die als Verknüpfungsstellen von Untereinheiten dieses Faserproteins<sup>4</sup> und als Quervernetzungen<sup>5</sup> anzusehen sind. Ihre quantitative Bestimmung und ihre selektive Spaltung sind von erheblicher Bedeutung für die Strukturaufklärung dieses Eiweißkörpers.

Die Umsetzung von Carbonsäureestern mit Hydroxylamin wurde bisher im allgemeinen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln bei verhältnismäßig hohem pH durchgeführt<sup>6</sup>. Verschiedene quantitative Bestimmungsmethoden, die meist in alkoholischem Alkali arbeiten, sind bekannt<sup>7, 8</sup>. Bei sehr hohem pH ist die Reaktion jedoch für Untersuchungen an Proteinen zu wenig selektiv, denn es werden auch Amidgruppierungen<sup>9</sup> und empfindliche Peptidbindungen (z. B. im Tabakmosaikvirus<sup>10</sup>) erfaßt. Das gilt besonders bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen<sup>11</sup>. *Raake*<sup>12</sup> fand 1958, daß Ester von Aminosäuren bereits unter schwächer alkalischen Bedingungen oberhalb pH 7 mit Hydroxylamin reagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hydroxamsäurebildung aus Carbonsäureestern in Abhängigkeit von pH und Hydroxylaminkonzentration untersucht, um den Bereich ihrer analytischen Anwendbarkeit zu erforschen, und um die mit der Methode erzielten Ergebnisse besser beurteilen zu können. Vor allem sollten durch Vergleich mit synthetischen Hydroxamsäuren quantitative Aussagen über den Grad der Umsetzung erzielt werden, worüber bisher noch keine analytisch verwertbaren Angaben vorliegen. Für die meisten Untersuchungen wurde Hippursäureäthylester eingesetzt, da er den Proteinen nahe steht und, wie im späteren Teil der Arbeit ersichtlich, verhältnismäßig wenig zu Nebenreak-

<sup>3</sup> *P. M. Gallop, S. Seifter und E. Meilman, Nature [London] 183, 1659 (1959).*

<sup>4</sup> *P. M. Gallop, Biophys. J. 4, Suppl. 79 (1964); J. A. Petruska und A. J. Hodge, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 871 (1964).*

<sup>5</sup> *H. Hörmann, Leder 11, 173 (1960); 13, 79 (1962).*

<sup>6</sup> *C. R. Hauser und W. B. Renfrew jr., in: A. H. Blatt, „Org. Syntheses“, Collect. Vol. II, S. 67, Wiley & Sons, New York 1943.*

<sup>7</sup> *F. Feigl, V. Anger und O. Frehden, Mikrochemie 15, 12 (1934); R. E. Buckels und C. J. Thelen, Analyt. Chem. 22, 676 (1950); R. F. Goddu, N. F. Le Blanc und C. M. Wright, Analyt. Chem. 27, 1251 (1955); J. Ludowieg und A. Dorfman, Biochim. biophysica Acta 38, 212 (1960).*

<sup>8</sup> *S. Hestrin, J. biol. Chem. 180, 249 (1949).*

<sup>9</sup> *F. Bergmann, Analyt. Chem. 24, 1367 (1952); L. K. Ramachandran und K. Narita, Biochim. biophysica Acta 30, 616 (1958).*

<sup>10</sup> *G. Braunitzer, Biochim. biophysica Acta 19, 574 (1956).*

<sup>11</sup> *M. Liefländer und O. Wacker, Z. physiol. Chem. 327, 195 (1962).*

<sup>12</sup> *I. D. Raake, Biochim. biophysica Acta 27, 416 (1958).*

tionen neigt. Wegen der trägeren Umsetzung der Carbonsäureester wurde bei 37° gearbeitet.

Zur quantitativen Bestimmung der gebildeten Hydroxamsäuren diene die Farbreaktion mit Eisen(III)-Salzen in saurer Lösung<sup>7, 8, 13</sup>. Die Reaktion ist zwar nur mäßig empfindlich, kann jedoch auch in Gegenwart von überschüssigem Hydroxylamin durchgeführt werden. (Zur Beständigkeit der Fe(III)—Hydroxamsäurekomplexe vgl. *Schwarzenbach* und *Schwarzenbach*<sup>14</sup>.) Für die Bestimmung an hochmolekularen Proteinen eignen sich dagegen empfindlichere Methoden, die eine vorherige Entfernung von Hydroxylamin durch Dialyse voraussetzen. Die Hydroxamsäuren können dann entweder mit Jod zu salpetriger Säure oxydiert werden, die über eine Diazoniumverbindung in einen Azofarbstoff übergeführt und kolorimetriert wird<sup>15</sup>, oder sie werden sauer hydrolysiert und das abgespaltene Hydroxylamin mit Indol zu einem roten Farbstoff umgesetzt<sup>16</sup>.

Bei der näheren Untersuchung der Farbreaktion rein hergestellter Hippur-hydroxamsäure mit Fe(III)-Salzen hat sich ergeben, daß die Farbintensität durch gleichzeitig anwesendes Hydroxylamin deutlich erhöht wird (Abb. 1, gestrichelte Kurve). Die Abhängigkeit der Extinktion des Fe(III)-Komplexes von der  $\text{NH}_2\text{OH}$ -Konzentration zeigt einen S-förmigen Verlauf, was dafür spricht, daß Hydroxylamin durch Assoziation mit dem Komplex dessen Absorption verändert. Die Intensität der Färbung ist der eingesetzten Hydroxamsäurekonzentration über einen weiten Meßbereich proportional.

In Abb. 1 ist die kolorimetrisch bestimmte Hydroxamsäurebildung von Hippursäureäthylester nach 4 Stdn. Reaktionszeit in Abhängigkeit von der Hydroxylaminkonzentration aufgetragen. Durch Vergleich mit der Extinktion, welche man bei Einsatz reiner Hippur-hydroxamsäure mißt, kann man die Ausbeute der Reaktion ablesen. Man erkennt, daß zur Erzielung guter Ausbeuten an Hydroxamsäuren eine hohe Konzentration an Hydroxylamin notwendig ist. Bei pH 9,5 wird maximale Ausbeute erst mit *m*- $\text{NH}_2\text{OH}$  erzielt. Auch dann verläuft die Umsetzung nur zu 86,5% in die gewünschte Richtung. Bei pH 8,5 ist die Ausbeute noch schlechter und bei pH 7,5 werden nur mehr sehr geringe Mengen an Hydroxamsäuren gebildet.

Abb. 2 gibt den zeitlichen Verlauf der Hydroxamsäurebildung bei pH 9,5 bei verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen wieder. Man

<sup>13</sup> R. S. Schweet, *Biochim. biophysica Acta* **18**, 566 (1955).

<sup>14</sup> G. Schwarzenbach und K. Schwarzenbach, *Helv. chim. Acta* **46**, 1390 (1963).

<sup>15</sup> F. Bergmann und R. Segal, *Biochem. J.* **62**, 542 (1956).

<sup>16</sup> S. Seifter, P. M. Gallop, S. Michaels und E. Meilman, *J. biol. Chem.* **235**, 2613 (1960).

erkennt, daß bei allen Konzentrationen ein Endwert, zumindest in erster Näherung, nach etwa 4 Stdn. erreicht ist. Die in Abb. 1 für pH 9,5 angegebenen Werte stellen daher wirkliche Endwerte dar. Dagegen kann

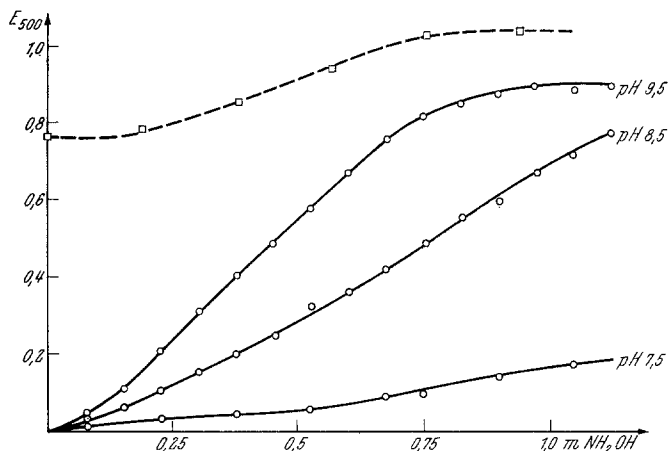


Abb. 1. Hydroxamsäure, gebildet nach 4 Stdn. Einwirkung von  $\text{NH}_2\text{OH}$  auf 10  $\mu\text{Mol}$  Hippursäure-äthylester bei  $37^\circ$ , bestimmt durch Farbreaktion mit  $\text{FeCl}_3$ . Reaktionsvolumen 3  $\text{cm}^3$ , Testvolumen 5  $\text{cm}^3$

(— — —) Extinktion des  $\text{Fe(III)}$ -Komplexes von 10  $\mu\text{Mol}$  Hippur-hydroxamsäure

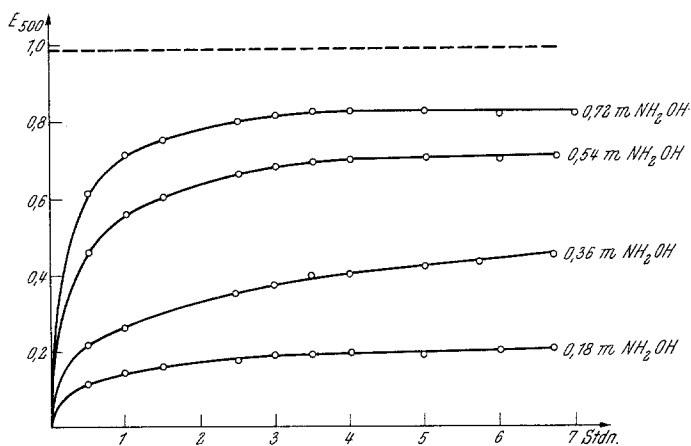


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Hydroxamsäurebildung aus Hippursäureäthylester bei pH 9,5 in Abhängigkeit von der  $\text{NH}_2\text{OH}$ -Konzentration. Bedingungen wie in Abb. 1

(— — —) Extinktion des  $\text{Fe(III)}$ -Komplexes von 10  $\mu\text{Mol}$  Hippur-hydroxamsäure

man aus Abb. 3 ersehen, daß die Reaktion bei pH 8,5 wesentlich langsamer verläuft und ein Endwert erst nach etwa 7 Stdn. erzielt wird. Dieser ist bei der angegebenen Hydroxylaminkonzentration niedriger als der bei pH 9,5 erreichte. Bei pH 7,5 findet die Umsetzung nur außerordentlich langsam statt.

Die unvollständige Ausbeute an Hydroxamsäuren und ihre starke Abhängigkeit von der Hydroxylaminkonzentration auch bei hohem  $\text{NH}_2\text{OH}$ -Überschuß macht deutlich, daß neben der Hydroxamsäurebildung aus Carbonsäureestern eine Konkurrenzreaktion einherläuft.

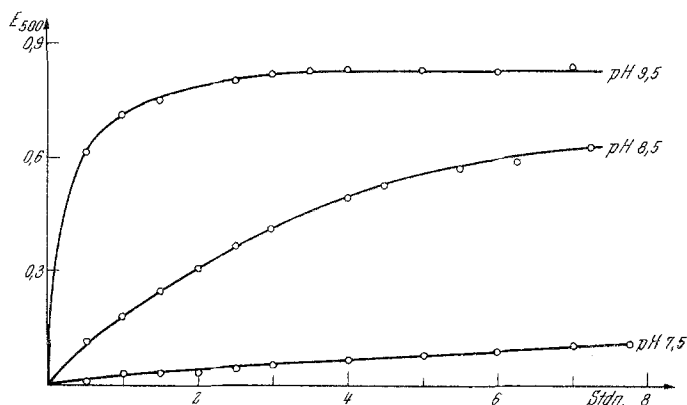


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Hydroxamsäurebildung aus Hippursäureäthylester bei verschiedenen pH-Werten.  $0,72m\text{-NH}_2\text{OH}$ ; Bedingungen wie in Abb. 1

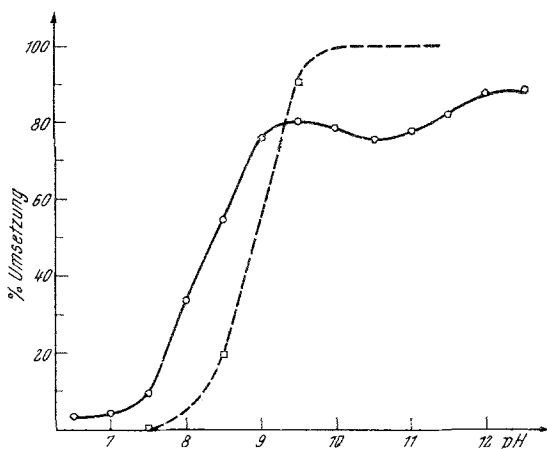


Abb. 4. Hydroxamsäurebildung (—) und Verseifung (---) von  $10\ \mu\text{Mol}$  Hippursäureäthylester bei verschiedenem pH, gemessen nach 4 Stdn.,  $37^\circ$ . Reaktionsvolumen  $3\ \text{cm}^3$ ; Hydroxamsäurebildung in  $0,72m\text{-NH}_2\text{OH}$

Diese kommt besonders dann zur Geltung, wenn die Hydroxylaminkonzentration klein ist, die Umsetzung zur Hydroxamsäure also langsam erfolgt. Als Konkurrenzreaktion kommt im angewendeten pH-Bereich eine Verseifung des Esters in Frage. In Abb. 4 sind die nach 4 Stdn. gemessenen Reaktionsumsätze der Verseifung und der Hydroxamsäurebildung in Gegenwart von  $0,72m\text{-Hydroxylamin}$  unter sonst gleichen

Bedingungen gegenübergestellt. Die Kurven zeigen, daß die Hydroxamsäurebildung zwar bei tieferem pH wirksam wird als die Verseifung, daß sich aber die Bereiche der beiden Reaktionen stark überlappen. Gute Ausbeuten an Hydroxamsäuren werden nach der angegebenen Reaktionszeit erst bei pH 9,5 erzielt. Bei noch höherem pH fällt die Ausbeute zunächst geringfügig ab, steigt aber dann noch einmal deutlich an. Die Verseifung beginnt im Bereich um pH 8 wirksam zu werden und nimmt dann an Reaktionsgeschwindigkeit zu, je mehr das pH ansteigt. Eine kinetische Verfolgung der Verseifung, welche bei der geringen angewendeten Konzentration an Hippursäureäthylester durch Überführung von unverbrauchtem Ester in Hydroxamsäuren bei pH 9,5 kolorimetrisch gemessen wurde, ergab für alle pH-Werte streng eine Reaktion erster Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_s$  betrugen bei 37° für pH 9,5  $1,42 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$  und für pH 8,5  $1,51 \cdot 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ .

Berücksichtigt man, daß neben der Hydroxamsäurebildung auch eine Verseifung des Esters nach einer Reaktion erster Ordnung abläuft, dann kann man die Kinetik der Umsetzung mit Hydroxylamin berechnen. (Siehe dazu die Angaben im experimentellen Teil.) Die bei pH 8,5 gemessenen Werte gehorchen über einen weiten Meßbereich einer Reaktion erster Ordnung ( $k_H/[\text{NH}_2\text{OH}] = 1,16 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ ). Für pH 9,5 lassen sich wegen des kleinen auswertbaren Meßbereiches nur ungefähre Angaben machen ( $k_H/[\text{NH}_2\text{OH}] = 7 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ ).

Diese Angaben zeigen, daß die Hydroxamsäurebildung und die Verseifung von Carbonsäureestern mit einer Größenordnungsmäßig vergleichbaren Geschwindigkeit ablaufen. Das Geschwindigkeitsverhältnis ist abhängig von der Hydroxylaminkonzentration und kann durch einen Überschuß an Hydroxylamin zugunsten der Hydroxamsäurebildung verschoben werden. In 0,72*m*-Hydroxylamin beträgt die Geschwindigkeitskonstante der Hydroxamsäurebildung bei pH 8,5 und 37°  $8,35 \cdot 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ , ist also etwa 5,5mal so groß wie die Verseifungskonstante. Ein ähnliches Verhältnis errechnet sich für die Reaktion bei pH 9,5\*.

\* Anmerkung während der Korrektur: Durch Behandlung mit 0,87*m*- $\text{NH}_2\text{OH}$  bei pH 12 und 37° gelang es *E. R. B. Graham, W. H. Murphy* und *A. Gottschalk* (Biochim. biophysica Acta **74**, 222 [1963]), die zahlreichen prosthetischen Kohlenhydratgruppierungen (N-Acetylneuraminyll[ $\alpha$ , 2  $\rightarrow$  6] N-acetylgalaktosamin) des Glykoproteids aus Submaxillarisdrüsen von Schafen weitgehend vom Proteinteil abzuspalten. Die Geschwindigkeitskonstante dieser nach 1. Ordnung verlaufenden Spaltungsreaktion war 3,8mal so groß wie die der Abspaltung der prosthetischen Gruppen mit Alkali allein. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Verseifungsreaktion und Hydroxylaminspaltung liegt also in der gleichen Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit. Nach Auffassung der Autoren sind die Kohlenhydratgruppierungen mit ihren glykosidischen Gruppen esterartig an seitenständige Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäureresten des Proteins gebunden.

Neben der Verseifung dürften in besonders gelagerten Fällen aber auch andere Nebenreaktionen ins Gewicht fallen, wie eine Untersuchung von Hydroxamsäureausbeuten verschiedener Ester zeigt. Die Reaktion kam in allen Fällen bei 37° und pH 9,5 innerhalb von 3—4 Stdn. zu einem Endpunkt. Bei der Farbreaktion mit  $\text{FeCl}_3$  erwies sich die erreichte Farbintensität allerdings als sehr unterschiedlich (Tab. 1), worauf

Tabelle 1. Relative Farbintensität von  $\text{Fe(III)}$ -Hydroxamsäurekomplexen, dargestellt aus Carbonsäureestern nach Umsetzung mit 0,72*m*- $\text{NH}_2\text{OH}$ , verglichen mit  $\text{Fe(III)}$ -Hippur-hydroxamsäure<sup>17</sup>

$\lambda = 500 \text{ m}\mu$ ; Hydroxylaminreaktion: pH 9,5, 37°, 4 Stdn.

|                                                     | % Farbintensität |
|-----------------------------------------------------|------------------|
| Hippur-hydroxamsäure                                | 100              |
| Hippursäureäthylester                               | 77               |
| $\text{N}_\alpha$ -Toluolsulfonylargininmethylester | 84               |
| Glycyl-glycyl-prolin-methylester                    | 77               |
| Prolyl-glycinmethylester                            | 57               |
| Glycinäthylester                                    | 26               |
| Histidinmethylester                                 | 23               |
| Hydroxyprolin-methylester                           | 7                |
| Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester                | 2                |

bereits *Hestrin*<sup>8</sup> hingewiesen hatte. Schlechte Ausbeuten wurden bei Aminosäureestern erzielt. Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester lieferte praktisch gar keine Hydroxamsäure. Verhältnismäßig geringe Ausbeuten wurden auch aus einem Dipeptidester Pro—Gly— $\text{OCH}_3$  erhalten.

Dagegen war die Hydroxamsäureausbeute bei Aminosäureestern, deren Aminogruppe blockiert war, erheblich besser. Hippursäureester ergab z. B. 77%. Auch ein Tripeptidester Gly—Gly—Pro— $\text{OCH}_3$  ließ sich mit einer Ausbeute umsetzen, die mit der N-substituierter Aminosäureester in verhältnismäßig engen Grenzen übereinstimmte. Nach diesen Ergebnissen ist anzunehmen, daß in den zuletzt genannten Beispielen die Möglichkeiten für Nebenreaktionen geringer sind als in den zuerst angeführten. Man erkennt, daß alle Verbindungen, welche schlechte Hydroxamsäureausbeuten ergeben, zu Ringschlußbildungen (Pyrrolidon-carbonsäure, Diketopiperazin) zwischen der an der Reaktion beteiligten Estergruppe und einer Aminogruppe befähigt sind. Sobald diese Möglichkeit entfällt, wie es nach Substituieren der freien Aminogruppe oder bei Tripeptidestern zutrifft, bilden sich Hydroxamsäuren in optimalen Mengen.

<sup>17</sup> M. Klenk, Dissertat., Univ. München 1960.

Schließlich wurden auch Asparagin und Triglycin bei pH 9,5 mit Hydroxylamin umgesetzt, um die Selektivität der Reaktion zu testen. Unter den angewendeten Bedingungen bildeten sich auch aus Asparagin in einer sehr langsamen Reaktion geringe Mengen an Hydroxamsäure. Die Reaktion verläuft jedoch im Gegensatz zu der von Carbonsäureestern, die nach 3—4 Stdn. abgeschlossen ist, über einen langen Zeitraum stetig weiter (Tab. 2), so daß es durch eine zeitliche Verfolgung der Hydroxamsäurebildung leicht möglich ist, Ester und Amidbindungen quantitativ auseinander zu halten. In stärker alkalischer Lösung verläuft die Hydroxamsäurebildung von Asparagin erheblich rascher (vgl. dazu *Bergmann*<sup>15</sup>). Triglycin gab bei pH 9,5 praktisch keine Reaktion.

Tabelle 2. Hydroxamsäurebildung aus Asparagin und Triglycin, verglichen mit Hippursäureäthylester ( $10 \mu\text{Mol}/3 \text{ cm}^3$ ) bei Umsetzung mit  $0,72m\text{-NH}_2\text{OH}$ , pH 9,5,  $37^\circ$

Extinktion der Lösung nach Farbreaktion mit  $\text{FeCl}_3$ .  $\lambda = 500 \text{ m}\mu$

| Stdn. $\text{NH}_2\text{OH}$ -Behandlung | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Asparagin                                | 0,014 | 0,020 | 0,023 | 0,025 | 0,028 | 0,032 |
| Triglycin                                | 0,004 | 0,008 | 0,007 | 0,008 | 0,008 | 0,010 |
| Hippursäureäthylester                    | 0,73  | 0,78  | 0,82  | 0,83  | 0,83  | 0,82  |

### Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß für die quantitative Bestimmung von Carbonsäureestern durch Überführung in Hydroxamsäuren, welche kolorimetrisch gemessen werden können, das Gebiet um pH 9,5 günstig ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hier genügend groß. Außerdem werden Peptid- und Amidbindungen nicht oder nur in sehr geringem Maße angegriffen. Bei der Reaktion soll eine möglichst hohe Hydroxylaminkonzentration ( $0,7 - 1m$ ) zur Anwendung kommen, um die Umsetzung möglichst weitgehend in die gewünschte Richtung zu lenken. Nach 4stdg. Einwirkung bei  $37^\circ$  erreicht die Reaktion ihren Endwert.

Die Hydroxamsäurebildung ist in keinem Falle vollständig, denn die Reaktion wird durch verschiedene Nebenreaktionen beeinträchtigt. Bei quantitativen Esterbestimmungen muß daher die Farbenintensität mit der eines Esters verglichen werden, der der gleichen Hydroxylaminbehandlung unterworfen worden war. Als wichtigste Nebenreaktion ist die Verseifung des Esters zu nennen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß dieselbe in dem für die Hydroxamsäurebildung günstigen pH-Bereich mit einer Geschwindigkeit abläuft, die die Hydroxamsäurebildung beeinträchtigen kann. In den Fällen, in denen die Konstitution der Verbindung für Ringschlußreaktionen der Estergruppe

mit einer Aminogruppe günstig ist, ist zusätzlich zur Wirkung der Verseifung ein erheblicher Abfall der Hydroxamsäureausbeute zu verzeichnen. Diese Erkenntnisse sind wichtig für quantitative kolorimetrische Bestimmungen von Estern nach der Hydroxamsäuremethode. Als Standardsubstanzen sind nur solche geeignet, welche maximale Ausbeuten an Hydroxamsäuren liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde Hippursäureester eingesetzt, während *Hestrin*<sup>8</sup> Acetylcholin verwendete.

Für die Beurteilung mancher Ergebnisse bei der Überführung von Carbonsäureestern in Hydroxamsäuren mag die Kenntnis des Reaktionsmechanismus aufschlußreich sein. Dazu liegt eine kurze Mitteilung von *Jencks*<sup>18</sup> vor. Bei der Umsetzung von p-Nitrophenylacetat mit Hydroxylamin bei pH 6,9 beobachtete er eine sehr rasche Freisetzung von p-Nitrophenol, während die Hydroxamsäure erst nach längerer Zeit erschien. Offenbar entstand zunächst ein Zwischenprodukt, das sich in einer langsameren Reaktion in Acethydroxamsäure umwandelte. Mit Hilfe von Benzoylchlorid gelang es, dieses Zwischenprodukt abzufangen und O-Acetyl-N-benzoylhydroxylamin zu isolieren. Im Falle der Verwendung von Benzoesäure-p-nitrophenylester gelang es sogar, die etwas stabilere Verbindung O-Benzoylhydroxylamin darzustellen. Bereits 1942 hatten *Scott* und *Wood*<sup>19</sup> O-Anthranoylhydroxylamin aus Isatosaureanhydrid und NH<sub>2</sub>OH erhalten. Alle diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß zunächst ein O-acyliertes Hydroxylamin entsteht, welches sich in die Hydroxamsäure umwandelt.

Die Umlagerung von O-Benzoylhydroxylamin in Benzhydroxamsäure verläuft nach den Angaben von *Jencks*<sup>18</sup> nur in Gegenwart größerer Mengen von Hydroxylamin glatt. Offenbar ist es ein intermolekularer Vorgang. In Abwesenheit von Hydroxylamin bildeten sich daneben erhebliche Mengen O,N-Dibenzhydroxamsäure.

Es ist durchaus möglich, daß die in der vorliegenden Arbeit als Störungen erkannten Verseifungs- und Ringschlußreaktionen besonders stark bei den als Zwischenstufe auftretenden O-Acylhydroxylaminverbindungen wirksam werden und nicht nur am freien Ester ansetzen. Diese Zwischenstufe besitzt sicherlich ein höheres Energieniveau und reagiert daher besonders leicht. Solange jedoch keine kinetischen Vergleiche vorliegen, kann diese Frage nicht eindeutig entschieden werden.

Wie weit schließlich die Untersuchungen von *Jencks*, welche mit aktivierten Estern angestellt worden waren, auch für die Umsetzung normaler Carbonsäureester gelten, ist noch unbekannt. Zweifel darüber werden aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion genährt. Im Falle aktivierter Ester — Untersuchungen liegen für S-Acetylthioglykolsäure

<sup>18</sup> W. P. *Jencks*, Biochim. biophysica Acta **27**, 417 (1958).

<sup>19</sup> A. W. *Scott* und B. L. *Wood*, J. org. Chem. **7**, 508 (1942).

vor<sup>20</sup> — scheint die Dissoziation von Hydroxylammoniumsalzen in die freie Base, welche im Bereich um pH 6 erfolgt ( $pK$  5,98<sup>21</sup>), der pH-abhängige Vorgang zu sein. Hippursäureester dagegen beginnt sich erst bei pH 8 mit Hydroxylamin umzusetzen. Der pH-abhängige Schritt dürfte hier eher in einer Zwischenstufe der Reaktion, etwa in der Umlagerung von O-Acylhydroxylamin in die Hydroxamsäure, zu suchen sein. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß im Falle der trägeren Carbonsäureester das Anion  $NH_2O^\ominus$  das angreifende Agens darstellt.

Frl. E. Boebinger sei für die saubere Durchführung der kinetischen Untersuchungen gedankt.

### Experimenteller Teil

*Hippur-hydroxamsäure*: 10 g Hippursäure und 10 g  $PCl_5$  wurden in 100 cm<sup>3</sup> Acetylchlorid 24 Stdn. geschüttelt<sup>22</sup>. Das gebildete Hippurylchlorid (8,1 g) wurde abgesaugt, mit Dioxan nachgewaschen und portionsweise unter gelegentlicher Kühlung in eine Lösung von 2,8 g Hydroxylaminhydrochlorid in 80 cm<sup>3</sup> Pyridin und 10 cm<sup>3</sup> Triäthylamin eingetragen. Nach Beendigung der Umsetzung wurden nochmals 10 cm<sup>3</sup> Triäthylamin zugesetzt. Nach 3 Stdn. wurde von Triäthylammoniumchlorid abgesaugt und die Lösung im Vak. zur Trockene genommen. Den öligen Rückstand nahm man in Wasser auf und schüttelte gefärbte Nebenprodukte mit Essigester aus. Ein flockiger Niederschlag wurde abgetrennt. Da die verbliebene wäßrige Lösung beim Eindampfen im Vak. zu starkem Schäumen neigte und sich Zersetzungserscheinungen bemerkbar machten, wurde sie eingefroren und bei 0,01 Torr verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Alkohol gelöst und die Lösung eingengt. Dabei schieden sich Kristalle aus (1,8 g); nach Umkristallisieren aus Alkohol—Äther: Schmp. 137—139°.

$C_9H_{10}N_2O_3$  (194,19). Ber. C 55,66, H 5,19, N 14,43.  
Gef. C 55,83, H 5,29, N 14,19.

Aus der Mutterlauge gelingt es, noch etwa eine gleiche Menge Hippurhydroxamsäure zu isolieren, indem man zur Trockene nimmt, den Rückstand in etwa 40 cm<sup>3</sup> Wasser löst und in Anteilen von 5 cm<sup>3</sup> an einer Säule, gefüllt mit Dowex 50-X2 ( $H^+$ -Form, 12 × 200 mm) chromatographiert. Lösungsmittel: Wasser. Eine geringe mit der Front wandernde  $FeCl_3$ -positive Fraktion wird verworfen. Die  $FeCl_3$ -positive Hauptfraktion tritt zwischen 25 und 50 cm<sup>3</sup> Elutionsvolumen aus der Säule. Nach ihrem Abklingen wird die Säule durch Spülen mit  $n/10$ -HCl, dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion regeneriert. Die Hippurylhydroxamsäure enthaltenden Eluate werden bei möglichst tiefer Temp. im Vak. zur Trockene genommen, die Rückstände in Alkohol gelöst und mit Äther gefällt.

*Kinetische Untersuchungen*: Hydroxylaminlösung wurde durch Mischen gleicher Volumteile einer 30proz. wäßrigen Lösung von Hydroxylammonium-

<sup>20</sup> L. H. Noda, S. A. Kuby und H. A. Lardy, J. Amer. chem. Soc. **75**, 913 (1953).

<sup>21</sup> H. Hagiwara, Bull. Inst. phys. chem. Res. [Tokyo] **20**, 251 (1941).

<sup>22</sup> E. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges. **38**, 612 (1905).

chlorid und 15proz. NaOH hergestellt. 1 cm<sup>3</sup> davon wurde auf das gewünschte pH gebracht, auf 2 cm<sup>3</sup> verdünnt und mit 1 cm<sup>3</sup> Wasser, enthaltend 10 μMol Hippursäureäthylester (2,08 mg), versetzt. Endkonzentration an Hydroxylamin 0,72*m*. Nach entsprechend langer Inkubation bei 37° versetzte man mit 1 cm<sup>3</sup> 3*n*-HCl und 1 cm<sup>3</sup> einer 4proz. wäßrigen FeCl<sub>3</sub>-Lösung und maß sofort mit einem Spektralphotometer Beckman DU die Extinktion bei 500mμ (Absorptionsmaximum) und 700 mμ (Basislinie) gegen eine Blindprobe, welche ohne Hippursäureäthylester angesetzt worden war. Die Differenz der Extinktionen wurde ausgewertet.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_H$  der Hydroxamsäurebildung wurde unter Zugrundelegung der für eine Reaktion 1. Ordnung mit Konkurrenzreaktion 1. Ordnung abgeleiteten Beziehung

$$\ln ([H_{\infty}] - [H/H_{\infty}]) = -(k_H + k_s) t,$$

berechnet. ( $H$  = Hydroxamsäure,  $k_s$  = Geschwindigkeitskonstante der Verseifung.)

*Verseifung*: 10 cm<sup>3</sup> einer wäßrigen Lösung von 20 μMol Hippursäureäthylester wurden mit 20 cm<sup>3</sup> 0,2*m*-Boratpuffer von pH 8,5 bzw. 9,5 versetzt und bei 37° inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 4,5 cm<sup>3</sup> entnommen, 3 cm<sup>3</sup> Hydroxylaminlösung (s. oben) zugesetzt, auf pH 9,5 gestellt und 4 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Der FeCl<sub>3</sub>-Test wurde mit 3 cm<sup>3</sup> der Lösung wie oben durchgeführt.