

**Oxydierbarkeit:** Oxydiert man Zone 8 mit  $MnO_2$ , so erhält man nach ca. 20 Min. zwei Reaktionsprodukte, wobei das Produkt 1 mit der Substanz aus Zone 7, und Produkt 2 mit Canthaxanthin identisch ist.

**UV.-Spektren der Oxydationsprodukte** (Fig. 15): Oxydationsprodukt 1 (= Zone 7), Maxima: ca. 431 (schwache Schulter), 457,5 (Hauptmaximum), 481 nm (schwache Schulter). Oxydationsprodukt 2 (Canthaxanthin), Maxima: 467 nm.

Zone 8 ist demnach unverändertes Isozeaxanthin.

Die UV.-Spektren wurden alle in Cyclohexan mit dem Spektrophotometer BECKMAN DK-2A aufgenommen. Die IR.-Spektren wurden in  $CS_2$  aufgenommen; dasjenige der Zone 1 mit dem Spektrophotometer PERKIN-ELMER 21 IR., die übrigen mit dem Spektrophotometer BECKMAN IR.-9.

Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE danken wir für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die säurekatalysierte Reaktion von Isozeaxanthin in Benzol-0,01M HCl untersucht. Für die einzelnen Reaktionsprodukte werden auf Grund chromatographischer, spektroskopischer und chemischer Eigenschaften Konstitutionsformeln vorgeschlagen.

Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie  
der Universität Bern

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. C. GROB & R. P. PFLUGSHAUPT, *Helv.* **45**, 1592 (1962).
- [2] R. P. PFLUGSHAUPT, Diss., Universität Bern 1965.
- [3] H. STRAIN *et al.*, *J. org. Chemistry* **26**, 5061 (1961).
- [4] C. BODEA *et al.*, *Liebigs Annalen Chem.* **627**, 237 (1959).
- [5] O. ISLER *et al.*, *Helv.* **39**, 451 (1956).

---

## 100. Über den Mechanismus der Trypsin-katalysierten Ester-Hydrolyse: Modellversuche an Substraten

von Margrit Gemperli, Werner Hofmann und Max Rottenberg<sup>1)</sup>

(26. III. 65)

Zur sicheren Beurteilung der im Titel erwähnten Enzymwirkung war es notwendig, die Umsatzgeschwindigkeiten der betreffenden Substrate ohne Enzym genau zu kennen<sup>2)</sup>. Die am häufigsten gebrauchten spezifischen Ester-Substrate für Trypsin sind N-Benzoyl- und N-p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methyl- oder äthylester. Potentiometrische Titration beim konstanten pH 10,0 und konstanter Temperatur zeigte sowohl bei den Methyl- als auch bei den Äthylestern, dass jeweils das Benzoylderivat 5 bis 6 mal schneller alkalisch hydrolysiert wird als das N-Tosylderivat (Tab. 1). Ähnliches

<sup>1)</sup> Auszugsweise vorgetragen am First Meeting of European Biochemical Societies, London 1964 (Abstract Nr. A 11).

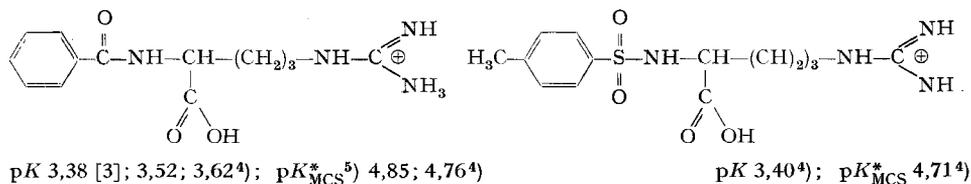
<sup>2)</sup> Ein ähnliches Problem haben LORAND *et al.* [1] beim Thrombin untersucht; wir danken Herrn Dr. LORAND für schriftliche Mitteilungen.

beobachtet man auch bei der «neutralen» Hydrolyse<sup>3)</sup>, die beim N-benzoylierten Aminosäureester immer noch 3mal schneller verläuft als beim N-tosylierten (Tab. 1). Diese Resultate sind in doppelter Hinsicht äusserst bemerkenswert.

Tabelle 1. *Hydrolyse substituierter Argininester: Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung  $k_1$  in  $\text{min}^{-1}$*

Ester	Tos Arg OMe	Bz Arg OMe	Tos Arg OEt	Bz Arg OEt
$k_1$ bei pH 10,00; 25°	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$10,0 \cdot 10^{-3}$	$0,68 \cdot 10^{-3}$	$3,41 \cdot 10^{-3}$
$k_1$ bei pH 3; 100°	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$0,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$

A. Das von uns gemessene und mehrmals nachgeprüfte Verhältnis der Geschwindigkeiten der *nichtenzymatischen Hydrolyse* widerspricht bei den Argininestern auf den ersten Blick den bewährten Regeln der organischen Chemie in bezug auf Substituenten-Effekte. Der N-Tosylrest wirkt stärker elektronenanziehend als der N-Benzoylrest (vgl. die bedeutend höhere Acidität der Sulfonamide gegenüber den Carbonsäureamiden; interessant sind auch die Befunde von RUDINGER [2]). Vergleicht man nun aber die den Estern zugrunde liegenden Säuren, so findet man praktisch keinen Unterschied in den Aciditäten:



Schema

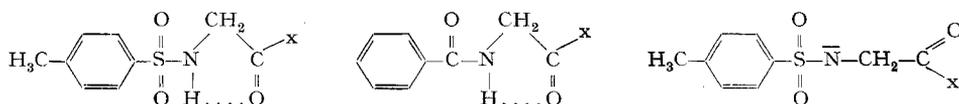


Tabelle 2. *Hydrolyse der Ester  $R_1\text{COOR}_2$*

$R_2$	$\text{CH}_3$		$\text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---NMe}_3^+$				$\text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---NMe}_3^+$	
$R_1$	Tos Gly	Bz Gly	Tos Gly	Bz Gly	O <sub>2</sub> N Bz Gly	Tos Sar	Bz Sar	
$k_1$ [OH <sup>-</sup> ]	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$9,9 \cdot 10^{-3}$	$4,9 \cdot 10^{-3}$	
$k_1$ [H <sub>2</sub> O]			$1,3 \cdot 10^{-3}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$				

$k_1$  [OH<sup>-</sup>]: Hydrolyse bei 25° / pH 9,00 in 0,5 M KCl ( $\text{min}^{-1}$ )

$k_1$  [H<sub>2</sub>O]: «Neutrale» Hydrolyse bei 100° / pH 2,8–3,1 ( $\text{min}^{-1}$ )

<sup>3)</sup> D.h. Hydrolyse des Esters in reinem Wasser bei ursprünglich neutralem pH; nach einigen % Reaktion bleibt dann das pH annähernd konstant zwischen 2 und 3.

<sup>4)</sup> Messungen von Prof. W. SIMON, ETH Zürich.

<sup>5)</sup> Zur Definition von  $\text{p}K_{\text{MCS}}^*$  vgl. [4].

Um zur Klärung dieser Situation weitere relevante Daten zu gewinnen, wählten wir die Derivate der einfachsten Aminosäure und verglichen N-Benzoylglycin und N-Tosylglycin in bezug auf ihre Aciditäten und auf die Hydrolysegeschwindigkeit ihrer Ester. Da Wasserstoffbrücken bzw. anionischer Sulfonamid-Stickstoff einen möglichen Einfluss haben könnten (s. Schema), wurden auch noch die entsprechenden *Sarcosin*-Derivate in die Messungen einbezogen (Tab. 2).

Beim Benzoylsarcosin-cholinester (N-Methylhippurylcholin) konnte die «neutrale» Hydrolyse nicht gemessen werden, weil unter diesen Bedingungen (verdünnte Lösung: pH 3; 100°) nicht nur die Esterbindung, sondern auch die Amidbindung mit vergleichbaren Geschwindigkeiten hydrolytisch gespalten werden [5]. In bezug auf Hydrolysegeschwindigkeit ihrer Ester verhalten sich alle diese Glycinderivate wenigstens qualitativ «normal», d. h. im Sinne der induktiven Effekte; der Tosylaminosäureester reagiert regelmässig doppelt so schnell wie das Benzoylderivat. Die Aciditäten jedoch sind auch hier praktisch gleich (Tab. 3). Schliesslich zogen wir auch noch *p-Nitrohippursäure* und den entsprechenden Cholinester zur Messung heran, wobei sich eindrücklich zeigte, dass induktive Effekte über die  $\alpha$ -ständige Amidocarbonylgruppe nur äusserst schwach übertragen werden.

Trotz all dieser zusätzlichen Befunde bleibt das «verkehrte» Reaktivitätsverhältnis der Argininester unerklärt.

Tabelle 3. *Aciditätskonstanten der Säuren*

Säure	Tos Gly	Bz Gly	O <sub>2</sub> N Bz Gly	Tos Sar	Bz Sar
pK <sup>0</sup> )	3,52 <sup>a)</sup>	3,64	3,53	3,37	3,50
pK <sub>MCS</sub> <sup>a)</sup>	5,37	5,74	5,60	5,56	5,50

a) Lit.: pK 3,46; vgl. [6].

B. Für die *Trypsin-katalysierte Hydrolyse* von N-Tosyl- und von N-Benzoyl-L-argininestern liegt schon ein sehr umfangreiches Zahlenmaterial vor. Wir zitieren hier wahllos aus den klassischen Arbeiten von NEURATH [7] und seiner Schule. Es betragen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_3$  (in Mol./l/min/mg Enzym-N/ml) der Trypsin-katalysierten Hydrolyse bei pH 7,8 und 25° für Bz-Arg-OMe bzw. Tos-Arg-OMe 0,25 bzw. 1,8.

Das Enzym wirkt also in solcher Weise, dass das Reaktivitätsverhältnis der beiden Ester gerade umgekehrt wird gegenüber den Verhältnissen bei der unkatalysierten Hydrolyse, wo der Tosylargininester fast um denselben Faktor *langsamer* reagierte. Zur Übersicht ist das Verhältnis  $r$  der Geschwindigkeitskonstanten des Tosyl- gegenüber dem Benzoyl-aminosäureester bei der alkalischen, neutralen und enzymkatalysierten Hydrolyse in Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. *Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten  $r = k_{Tos}/k_{Bz}$  für N-Acylglycyl- (Gly) bzw. N $\alpha$ -Acylarginyl-ester (Arg)*

Art der Hydrolyse	25° alkalisch	100° «neutral»	25° Trypsin
$r$	Gly: 2; Arg: 0,16	Gly: 2; Arg: 0,35	Gly: —; Arg: 7,2

<sup>6)</sup> Eigene Messungen (potentiometrische Titration in reinem Wasser).

Bei der Trypsin-katalysierten Hydrolyse spezifischer Ester-Substrate [8] wird über den MICHAELIS-Komplex in schneller Reaktion zunächst eine nucleophile Gruppe am Enzym covalent acyliert unter Ausstossung des Alkoholat-Restes. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt erfolgt dann die viel langsamere Deacylierung des Acyl-Enzyms. Als nucleophile Stelle des Enzyms, welche im Verlauf der Katalyse acyliert wird, betrachten heute die meisten Forschergruppen den *Serinrest* am aktiven Zentrum. Beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt es sich also um die Spaltung eines N-Benzoyl- oder N-Tosyl-L-argininesters, wobei hier das Tosylderivat 7mal *schneller* desacyliert wird, im Gegensatz zur alkalischen bzw. neutralen Hydrolyse, wo Tosylarginin-methylester 6mal bzw. 3mal langsamer reagiert als Benzoylarginin-methylester. Ersetzt man also beispielsweise im Acyl-L-arginin-äthylester die Alkoholkomponente durch die alkoholische Serin-Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum des Trypsins, so resultiert ein hochaktivierter Ester, dessen Hydrolyse bei pH 8 erstens sehr viel schneller, zweitens nach einem Mechanismus verläuft, der von der alkalischen und der neutralen Hydrolyse der Äthylester *ganz grundlegend verschieden* ist.

In bemerkenswertem Gegensatz dazu liegen die Verhältnisse bei der Esterase-Wirkung der Carboxypeptidase A. Dort konnte VALLEE [9] zeigen, dass die enzymkatalysierte Ester-Hydrolyse der OH<sup>-</sup>-katalysierten sehr ähnlich ist und sich davon bei gleichem Mechanismus nur quantitativ unterscheidet.

Die molekulare Struktur des Trypsins und ihre Beziehungen zu der des Chymotrypsins sind heute bekannt [10]. Für den Fall des Chymotrypsins konnte BENDER [11] wahrscheinlich machen, dass sich die spezifischen Ester-Substrate bei Gegenwart des Enzyms ähnlich verhalten wie bei der säurekatalysierten Hydrolyse. Es ist deshalb gut möglich, dass sich Trypsin analog verhält. Weitere Versuche werden hierüber Auskunft geben.

### Experimenteller Teil<sup>7)</sup>

**I. Substrate.** – *N-Benzoyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid* «FLUKA». Farblose, viskose Flüssigkeit. Quantitative Verseifung ergab einen Estergehalt von 83%, was bei allen Messungen berücksichtigt wurde.

*N-Benzoyl-L-arginin* «FLUKA», Smp. 264–267°, laut Analyse (C, H, N, Äq.-Gew.) rein.

*N-Benzoyl-L-arginin-äthylester-hydrochlorid* «FLUKA», Smp. 121–123°, laut Analyse (C, H, N, Cl) rein.

*Tosyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid* «FLUKA», Smp. 136–139° (Lit. [8], 147,5–148°). Verseifungs-Äquiv. ber. 379; gef. 377.

*Tosyl-L-arginin-äthylester-hydrochlorid*. Aus dem Methylester durch säurekatalysierte Umesterung. In eine Lösung von 10 g (26 mMol) *p*-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid in 200 ml Äthanol wurde wasserfreies HCl bis zur Sättigung bei schwachem Sieden unter Rückfluss eingeleitet (ca. 20 min). Dann liess man unter Ausschluss von Feuchtigkeit 24 Std. bei ca. 20° stehen. Die Lösung wurde im Vak. eingedampft bis eine feuchte Kristallmasse entstand, die wiederum mit 200 ml Äthanol versetzt und mit HCl gesättigt wurde. Nach 48 Std. bei ca. 20° wurde im Vak. abgedampft. Den Rückstand löste man in 25 ml Äthanol, setzte langsam 50 ml Äther zu und liess über Nacht im Eisschrank stehen. Man erhielt Kristalle, nach dem Trocknen 9,6 g (24 mMol) (Lit. vgl. [8]). Smp. 109–112°;  $[\alpha]_D^{23} = -10,3^\circ$  ( $c = 3,7$  in H<sub>2</sub>O).

C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>ClO<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S (393) Ber. C 45,85 H 6,41 N 14,26% Gef. C 45,78 H 6,87 N 14,04%

*Tosyl-L-arginin-hydrochlorid*. 10 mMol (3,8 g) Tosyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid wurden mit 50 ml 12N HCl 24 Std. bei ca. 20° stehengelassen. Dann wurde bei 0° (Eisbad) mit 50 ml

<sup>7)</sup> Die Smp. sind in einer Kapillare bestimmt und unkorrigiert. Fehlergrenze ca.  $\pm 3^\circ$ .

Wasser verdünnt und anschliessend im Vak. (Bad 40°) auf ca. 5 ml eingedampft. Zum Rückstand gab man nochmals 25 ml konz. HCl, liess 16 Std. bei 20° stehen, verdünnte dann mit Wasser und dampfte im Vak. ein. Nach dem Trocknen im Vak. über KOH erhielt man ein farbloses Glas, das man in 2 ml Wasser bei ca. 80° löste. Die Lösung wurde im Eisbad gekühlt und mit 50 ml Aceton und dann bis zur Trübung mit Äther versetzt (25 ml). Die beim Reiben erhaltenen Kristalle wurden über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 20°/12 Torr getrocknet: 2,7 g (7,4 mMol). Smp. 184–187°.  $[\alpha]_D^{20} = -6,12^\circ$  ( $c = 0,82$  in 0,01N HCl).

C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S (364,8) Ber. C 42,8 H 5,81 N 15,38% Gef. C 42,91 H 5,87 N 15,24%

*N*-Methylhippursäure. Hergestellt nach [5], Smp. 91–96°, laut Analyse (C, H, N) rein.

*N*-Methylhippursäure-cyanmethylester. Hergestellt nach dem allgemeinen Verfahren von SCHWYZER [12] aus 100 mMol Säure (19,3 g), 150 mMol Triäthylamin (21 ml) und 150 mMol Chloracetonitril (10 ml) durch dreistündiges Kochen in 100 ml Äthylacetat unter Rückfluss. Die 22,7 g Rohprodukt, Smp. 54–62°, ergaben aus 25 ml Äthylacetat + 75 ml Äther 11,0 g reine Substanz, Smp. 61–63°.

C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (232,2) Ber. C 62,06 H 5,21 N 12,06% Gef. C 62,24 H 5,35 N 11,92%

*N*-Methylhippursäure-cholinester-jodid. Aus dem Cyanmethylester durch cyanidkatalysierte Umesterung und anschliessende Methylierung: 1 g Kaliumcyanid, 50 ml Dimethylaminoäthanol und 75 ml Toluol wurden in einem Rundkolben auf ein kleines Volumen eingedampft. Zum Rückstand gab man 50 mMol (11,6 g) Cyanmethylester und 100 ml frisch dest. Dimethylaminoäthanol. Die Mischung wurde 15 min kräftig geschüttelt; dann liess man unter Ausschluss von Licht, Feuchtigkeit und CO<sub>2</sub> zwei Tage bei ca. 20° stehen. Die Aufarbeitung (Eindampfen, Aufnehmen in Äthylacetat, Waschen mit KHCO<sub>3</sub>-Lösung und mit Wasser, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Filtrieren und Eindampfen) ergab ein Öl, das in 250 ml Äthylacetat gelöst und mit 10 ml Methyljodid versetzt wurde. Nach 5 Tagen Stehen im Dunkeln bei ca. 20° waren 15 g (74%) analysenreiner Cholinester vom Smp. 125–127° auskristallisiert.

C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>J (406,3) Ber. C 44,35 H 5,71 N 6,89 J 31,24%  
Gef. „ 44,45 „ 5,75 „ 6,96 „ 31,02%

Hippursäurecholinester-halogenide sind schon früher beschrieben worden [13].

*p*-Toluolsulfonyl-glycin. Hergestellt nach dem Standard-Verfahren im Lehrbuch [14a]. Smp. 141–143° (Lit. [14b] 149–150°).

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S (229,25) Ber. C 47,15 H 4,84 N 6,11 S 13,98%  
Gef. „ 46,88 „ 4,88 „ 6,21 „ 14,06%

*p*-Toluolsulfonylglycin-methylester. 107 mMol (24,6 g) Tosylglycin, 5,3 mMol (1,0 g) *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat und 1,07 Mol Methanol (43,0 ml) wurden sechs Tage bei ca. 20° magnetisch gerührt. Eindampfen, Aufnehmen in Äthylacetat, Neutralwaschen und erneutes Eindampfen gab 25 g Rohprodukt, und nach Umlösen aus Chloroform (50 ml) + Pentan (47 ml) 20,5 g (78%) Kristalle vom Smp. 89–91°.

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S (243,27) Ber. C 49,37 H 5,38 N 5,76% Gef. C 49,42 H 5,61 N 5,88%

Wiederholung dieses Ansatzes unter Zugabe von 250 mMol (25 ml) 2,2-Dimethoxypropan [15] und unter Feuchtigkeitsausschluss, ergab ein Präparat vom gleichen Smp. und mit derselben Ausbeute.

*p*-Toluolsulfonylglycin-cholinester-jodid. 50 mMol (12 g) Tosylglycin-methylester + 50 ml Dimethylaminoäthanol wurden durch Katalyse mit 1 g KCN nach dem allgemeinen Verfahren von SCHÄTZLE [16] umgesetzt. Nach dem Waschen und Trocknen der Äthylacetat-Lösung (total 500 ml) musste hier 500 ml Dimethylformamid zugegeben werden, um Niederschlagsbildung zu vermeiden. Die filtrierte Lösung wurde im Vak. auf ca. 10 ml eingedampft. Zum Rückstand gab man 90 ml Dimethylformamid und 10 ml Methyljodid und liess drei Tage bei ca. 20° im Dunkeln stehen. Dann wurde im Eisbad gekühlt und bis zur Kristallbildung mit Äthylacetat versetzt. Nach zwei Tagen Stehen im Eisschrank wurden die Kristalle mit Dimethylformamid/Äthylacetat und zuletzt mit Äther gewaschen und bei ca. 15 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + KOH getrocknet: 16,4 g (74%); Smp. 156–159°.

C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>JS (442,3) Ber. C 38,02 H 5,24 N 6,33 J 28,69 S 7,25%  
Gef. „ 37,98 „ 5,46 „ 6,34 „ 28,24 „ 7,22%

Zur Umwandlung ins *Chlorid* wurden 32 mMol Jodid in 1 l Wasser mit 200 mMol AgCl 10 Minuten geschüttelt. Eindampfen der filtrierte Lösung gab 13 g feuchtes Rohprodukt. Es wurde in der Minimalmenge (350 ml) heissem Äthanol gelöst und die noch warme Lösung bis zur beginnenden Trübung mit Äther (350 ml) versetzt. Nach dem Trocknen 9,3 g, Smp. 191–192°.

$C_{14}H_{23}O_4N_2ClS$  Ber. C 47,92 H 6,61 N 7,98 Cl 10,11 S 9,14%  
(350,9) Gef. „ 47,90 „ 6,51 „ 8,05 „ 9,98 „ 9,10%

*N-p-Toluolsulfonyl-sarcosin*. Herstellung entsprechend dem Glycinderivat [14a] Smp. 143–145°.

$C_{10}H_{13}O_4NS$  Ber. C 49,37 H 5,38 N 5,76 S 13,18% Neutr.-äq. 243  
(243,3) Gef. „ 49,35 „ 5,45 „ 5,69 „ 12,91% „ 244

*Tosylsarcosin-cyanmethylester*. Aus der Säure nach SCHWYZER [12] wie oben beschrieben. 26 g Rohprodukt ergaben aus Äthylacetat (100 ml) + Pentan (80 ml) 17,3 g (59%) Reinpräparat vom Smp. 60–63°.

$C_{12}H_{14}O_4N_2S$  Ber. C 51,05 H 5,00 N 9,92 S 11,36%  
(282,3) Gef. „ 51,25 „ 5,04 „ 10,01 „ 11,19%

*Tosylsarcosin-cholinester-jodid*. Aus dem Cyanmethylester analog wie beim N-Methylhippursäure-Derivat. Das ölige Rohprodukt wurde mit 200 ml Aceton erwärmt (teilweise Lösung), die Mischung im Eisbad gekühlt und mit 250 ml Pentan versetzt, wodurch das Produkt kristallin erhalten wurde. Nach dem Trocknen 19,6 g (86%), Smp. 142–144°.

$C_{15}H_{25}O_4N_2JS$  Ber. C 39,48 H 5,52 N 6,14 J 27,81%  
(456,4) Gef. „ 39,51 „ 5,64 „ 5,89 „ 27,74%

*p-Nitrohippursäure* «SCHUCHARDT», aus heissem Wasser (100 ml für 10 g) umkristallisiert. Smp. 122–125°; Neutr.-äquiv. ber. 224; gef. 225.

*p-Nitrohippursäure-methylester*. Durch Kochen der Säure mit Methanol am Rückfluss bei Gegenwart von wasserfreiem Dowex 50 W×8–H<sup>+</sup>. Umkristallisiert aus Methanol-Wasser. Smp. 150–152°. Verseifungs-Äquiv. ber. 238; gef. 250.

*p-Nitrohippurylcholin-chlorid*. Aus dem Methylester durch Cyanid-katalysierte Umesterung mit Dimethylaminoäthanol und anschließende Methylierung mit Methyljodid. Das schmierige Esterjodid wurde durch Schütteln mit AgCl in Wasser ins Chlorid umgewandelt und aus heissem Acetonitril + Äthylacetat kristallisiert. Smp. 189–192°; Verseifungs-Äquiv. ber. 346; gef. 350.

$C_{14}H_{20}O_5N_3Cl$  Ber. C 48,63 H 5,83 N 12,15 Cl 10,25%  
(345,8) Gef. „ 48,26 „ 6,13 „ 12,14 „ 10,18%

**II. Kinetische Messungen.** – a) Den zeitlichen Verlauf der *alkalischen* Hydrolyse untersuchten wir durch potentiometrische Titration bei konstantem pH [17]. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung wurden nach dem Verfahren von GUGGENHEIM [18]<sup>8)</sup> ermittelt. Anfangskonzentration des Esters  $c_0 = 10^{-3}M$  in 0,5M wässriger KCl-Lösung. Das verwendete Wasser war durch Ionenaustausch gereinigt und kurz vor dem Versuch aus einer Quarzapparatur umdestilliert. Temperatur  $25^\circ \pm 0,1^\circ$ .

b) Die «neutrale» Hydrolyse wurde im Glycerin-Thermostat bei  $100^\circ \pm 0,2^\circ$  durchgeführt. Gemessen wurde mit Hilfe des früher ausführlich beschriebenen quantitativen Extraktionsverfahrens [13b].

#### SUMMARY

At both alkaline and neutral pH, tosyl-L-arginine ethyl ester hydrolyzes *slower* than benzoyl arginine ester, in disaccordance with the rules of inductive effects. Glycine and sarcosine esters however behave «normally», the tosyl derivatives reacting faster than the benzoyl. Tosyl-L-arginine esters are better substrates for trypsin than the corresponding benzoyl-L-arginine esters. It is concluded that the mechanism of trypsin-catalyzed ester hydrolysis (deacylation) is fundamentally different from both neutral and alkaline hydrolysis.

Medizinisch-chemisches Institut  
der Universität Bern

<sup>8)</sup> Für die Konstruktion und die Verfeinerung des selbstgebauten pH-States sind wir den Herren H. URHEIM und H. R. GUTJAHN zu grossem Dank verpflichtet.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. LORAND, W. T. BRANNEN & N. G. RULE, Arch. Biochemistry Biophysics 96, 147 (1962).  
 [2] J. RUDINGER, Pure Appl. Chemistry 7, 353 (1963).  
 [3] L. A. AE. SLUYTERMAN, Biochim. biophys. Acta 85, 308 (1964).  
 [4] W. SIMON, G. H. LISSY, A. MÖRIKOFER & E. HEILBRONNER, «Zusammenstellung von scheinbaren Dissoziationskonstanten im Lösungsmittelsystem Methylcellosolve/Wasser», Juris-Verlag, Zürich 1959.  
 [5] E. SCHÄTZLE & M. ROTTENBERG, in Vorbereitung.  
 [6] C. J. M. STIRLING, J. chem. Soc. 1962, 3684.  
 [7] N. M. GREEN & H. NEURATH, «The Proteins», Vol. II, Part B, S. 1125, Academic Press, New York 1954.  
 [8] N. J. BAINES, J. B. BAIRD & D. T. ELMORE, Biochem. J. 90, 470 (1964).  
 [9] B. L. VALLÉE, Fed. Proc. 23, 8–17 (1964).  
 [10] K. A. WALSH & H. NEURATH, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 884 (1964).  
 [11] M. L. BENDER & F. J. KÉZDY, J. Amer. chem. Soc. 86, 3704 (1964).  
 [12] R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, Helv. 38, 69 (1955).  
 [13] a) K. B. AUGUSTINSSON, Acta chem. scand. 9, 793 (1955); b) E. WENGER, H. URHEIM & M. ROTTENBERG, Helv. 45, 1013 (1962); c) R. M. EPAND & I. B. WILSON, J. biol. Chemistry 238, 1718 (1963).  
 [14] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «Chemistry of the Amino Acids», Vol. 2, a) S. 886; b) S. 888; Wiley & Sons, New York 1961.  
 [15] a) N. B. LORETTE & J. H. BROWN, Jr., J. org. Chemistry 24, 261 (1959); b) J. R. RACHELE, *ibid.* 28, 2898 (1963).  
 [16] E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, Helv. 42, 1708 (1959).  
 [17] C. F. JACOBSEN, J. LÉONIS, K. LINDERSTRÖM-LANG & M. OTTESEN, Methods of Biochemical Analysis, Vol. 4, S. 171, Interscience, New York 1957.  
 [18] E. A. GUGGENHEIM, Phil. Mag. [7] 2, 538 (1926).

**101. Reaktivität von Koordinationsverbindungen XIII [1].**  
**Zum Mechanismus der Eisen(II)-katalysierten Autoxydation eines**  
**Formazanfarbstoffes**

von **K. Trefzer** und **S. Fallab**

(4. III. 65)

Vor einiger Zeit berichteten wir über Kinetik und Mechanismus von Komplexbildungsreaktionen von 1-(2-Carboxy-5-sulfophenyl)-5-(2-hydroxy-3-nitro-5-sulfo-phenyl)-3-phenyl-formazan [2]. Der Farbstoff reagiert als vierzähliger Ligand und bildet mit vielen Metall-Ionen stabile, tetragonal-planare Chelate (Fig. 1a, b), wobei in jedem Fall die beiden Protonen der Carboxylgruppe und der Hydroxygruppe und bei höherem pH auch das Iminoproton der Formazangruppe abdissoziiert werden<sup>1)</sup>. Bei diesen Versuchen war uns aufgefallen, dass der Farbstoff in Gegenwart verschiedener Metall-Ionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $V^{3+}$ , vor allem aber  $Fe^{2+}$  rasch durch Luftsauerstoff zum entsprechenden Tetrazoliumsalz oxydiert wird [3]. Die vorliegende Arbeit hat die Ermittlung des Mechanismus dieser Autoxydationskatalyse zum Ziel.

<sup>1)</sup> Der dreibasische Ligand wird daher in der Folge zweckmässig mit  $FoH_3$  abgekürzt. Bei der Angabe der Ionenladung sind die Sulfonatgruppen nicht berücksichtigt.