

Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 923–926 (1981)

Acetylcholinesterase- und Base-katalysierte Hydrolyse von Cholin-Carbonaten

Günter Lambrecht*

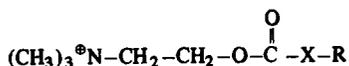
Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/M,
Theodor-Stern-Kai 7, Gebäude 75A, D-6000 Frankfurt/M
Eingegangen am 21. Januar 1981

Die Acetylcholinesterase- und Base-katalysierte Hydrolyse der beiden Carbonate **4a** und **4b** des Cholins wurde untersucht. Beide Ester sind sehr schlechte Substrate für Acetylcholinesterase, sie hemmen die Hydrolyse von Acetylcholin.

Hydrolysis of Choline Carbonates Catalyzed by Acetylcholine Esterase or Bases

The hydrolysis, catalyzed by acetylcholine esterase or bases, of the choline carbonates **4a** and **4b** was studied. Both esters are poor substrates for the enzyme and act as acetylcholine esterase inhibitors.

Im Rahmen von Untersuchungen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen von offenkettigen Acetylcholinanalogen¹⁾ wurden auch Verbindungen von Typ 1–3 auf ihre cholinergen Eigenschaften geprüft^{1,2,6)}. Dabei zeigte es sich, daß die Muskarin- bzw. Nikotinwirkung und das Verhalten gegenüber Acetylcholinesterase sehr stark von der Gruppierung X und dem Substituenten R abhängt.



	X	R		X	R
1a	CH ₂	CH ₃	3a	NH	CH ₃
1b	CH ₂	C ₂ H ₅	3b	NH	C ₂ H ₅
2a	CH=	=CH ₂	4a	O	CH ₃
2b	CH=	=CH-CH ₃	4b	O	C ₂ H ₅

Zur weiteren Aufklärung des Einflusses von X auf die cholinergen Eigenschaften von Verbindungen des Typs 1–3 wurden von uns die Carbonate des Cholins **4a** und **4b** synthetisiert³⁾ und ihre elektronischen⁴⁾, konformativen^{3,4,5)} und pharmakologischen⁵⁾

* Herrn Prof. Dr. H. Oelschläger mit herzlichen Glückwünschen zum 60. Geburtstag gewidmet.

Eigenschaften untersucht. Im Rahmen dieser Mitteilung soll über das Verhalten von **4a** und **4b** gegenüber Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.) berichtet werden. Da zu erwarten war, daß **4a** und **4b** auch bei reiner OH^\ominus -Katalyse, d.h. bei Abwesenheit des Enzyms, unterschiedliche Verseifungsgeschwindigkeiten besitzen, wurde auch die Base-katalysierte Hydrolyse untersucht.

Tab. 1: Kinetische Daten der Base-katalysierten Hydrolyse von Acetylcholin (Ach) und **4a** bzw. **4b**

Substrat	$k_{\text{OH}'}$ ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	Rel. k_{OH}
Ach	1.74 ± 0.07	100
4a	1.83 ± 0.07	105
4b	0.74 ± 0.04	42.5

Der Methylester **4a** ist ein gleich gutes Substrat für die OH^\ominus -katalysierte Hydrolyse wie Acetylcholin (Tab. 1). Verlängerung der Seitenkette zum Ethylester **4b** verringert die Hydrolysegeschwindigkeitskonstante etwa um den Faktor 2.5.

Die beiden Cholin-Carbonate **4a** und **4b** sind wesentlich schlechtere Substrate für Acetylcholinesterase als Acetylcholin (Tab. 2). Der fördernde Einfluß des Enzyms auf die Hydrolyse von **4a** ist etwa um den Faktor 18 geringer als bei Acetylcholin, bei **4b** etwa um den Faktor 233 (Tab. 2, Spalte 7). Diese Unterschiede kommen im wesentlichen nicht

Tab. 2: Kinetische Daten der Acetylcholinesterase-katalysierten Hydrolyse von Acetylcholin (Ach) und **4a** bzw. **4b**

Substrat	$V_{\text{max_exp}}/E_0^a$ ($\mu\text{mol U}^{-1} \text{sec}^{-1}$) ^b	Rel. $V_{\text{max_exp}}/E_0$	K_m' , mM	$V_{\text{max_exp}}/E_0 K_m$ ($\text{U}^{-1} \text{ml sec}^{-1}$) ^{b,c}	Rel. $V_{\text{max_exp}}/E_0 K_m$	Rel. ^d $V_{\text{max_exp}}/E_0 K_m /$ Rel. $k_{\text{OH}} \times 10^2$
1	2	3	4	5	6	7
Ach	8.85 ± 0.15	100	0.12 ± 0.008	73.8	100	100
4a	0.51 ± 0.013	5.76	0.12 ± 0.004	4.25	5.76	5.48
4b	0.06 ± 0.003	0.66	0.43 ± 0.006	0.14	0.18	0.43

^a) Um die experimentellen V_{max} -Werte vergleichen zu können, wurden diese durch die Enzymkonzentration (E_0 in mikromolaren Einheiten/ml) dividiert. Diese normalisierten V_{max} -Werte (Spalte 2), die man als katalytische Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung ansehen kann, sind in Spalte 3 relativ zu Acetylcholin enthalten. Sie sind ein Maß für die Acylierungsgeschwindigkeit des Enzyms.

^b) Alle Werte dieser Spalte $\times 10^{-3}$.

^c) Nach Division der Werte in Spalte 2 durch den entsprechenden Michaelis-Menten Parameter K_m (Spalte 4) erhält man Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Enzym-katalysierte Hydrolyse (Spalte 5). Diese Werte sind in Spalte 6 relativ zu Acetylcholin zusammengestellt.

^d) Um wirklich vergleichbare Werte für den fördernden Einfluß von Acetylcholinesterase auf die Hydrolyse der einzelnen Ester zu erhalten, wurden die Werte der Spalte 6 durch die relativen Geschwindigkeitskonstanten der OH^\ominus -katalysierten Hydrolyse dividiert (Tab. 1). Diese Zahlen befinden sich in Spalte 7.

durch Unterschiede in den K_m -Werten (Tab. 2, Spalte 4), sondern durch Unterschiede in den Geschwindigkeiten der Acylierung von Acetylcholinesterase zustande (Tab. 2, Spalte 3).

Unter den experimentellen Bedingungen, unter denen die enzymkatalysierte Hydrolyse von Acetylcholin untersucht wurde (Enzymkonzentration $E_0 = 0.10 \mu\text{mol U/ml}$), konnte bei **4a** und **4b** keine Hydrolyse beobachtet werden. Beide Ester verhalten sich hier als reversible kompetitive Inhibitoren mit einer geringen nicht-kompetitiven Komponente ($K_i\text{-4a} = 2.56 \times 10^{-4}\text{M}$; $K_i\text{-4b} = 2.13 \times 10^{-4}\text{M}$). Die Reversibilität dieser Enzymhemmung zeigte sich darin, daß keine Abhängigkeit der Hemmkonstanten K_i von der Inkubationszeit (0,1,5,10,20 min) gefunden wurde.

Insgesamt gesehen verhalten sich die beiden Cholin-Carbonate **4a** und **4b** gegenüber Acetylcholinesterase qualitativ gleich wie die Cholinester **1** und **2**⁶⁾. Unterschiede bestehen aber im Vergleich zu den beiden Carbamaten **3a** und **3b**, die infolge einer vergleichsweise langsamen Entacylierung des carbamoylierten esteratischen Zentrums des Enzyms als irreversible Inhibitoren wirken²⁾.

Wir danken Frau Ch. Rötger für die sorgfältige Durchführung der kinetischen Untersuchungen.

Experimenteller Teil

Die Bestimmung der Kinetik der alkalischen Hydrolyse erfolgte nach bekannten Literaturvorschriften⁷⁻⁹⁾ mit einer pH-stat-Methode, einer Substratausgangskonzentration von $6 \times 10^{-4}\text{M}$ und $t = 25^\circ$. Als Titrationslösung diente CO_2 -freie 0.01 N-NaOH. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden nach Kunz⁷⁾ ermittelt. Die initialen Verseifungsgeschwindigkeiten (= Laugenverbrauch/Zeit) wurden mit Hilfe der 2. Dissoziationskonstanten der Kohlensäure ($K_2 = 4.68 \times 10^{-11}\text{M}$) für jeden pH-Wert (9.00–10.70) korrigiert, da bei pH-Werten zwischen 9.00 und 10.70 für die Titration von 1 mol **4a** bzw. **4b** weniger als 2 mol NaOH verbraucht werden (Korrektionsfaktor $y = 1/(1 + (\text{H}^+)/K_2)$).

Die Bestimmung der Kinetik der enzymatischen Hydrolyse wurde weitgehend nach Schowen et al.¹⁰⁾ durchgeführt und die entsprechenden Parameter mit Hilfe eines doppeltreziproken Plots errechnet. Die Hemmkonstanten K_i wurden der Dixon-Darstellung entnommen. Als Titrationslösung bei den pH-stat-Titrationsen diente CO_2 -freie 0.01 N-NaOH, $t = 25^\circ$. Das verwendete Enzym stammte von *Electrophorus electricus* (Serva-Heidelberg) und hatte eine Aktivität von 880 U/mg. Enzymkonzentrationen: Hydrolyse von Ach = $0.10 \mu\text{mol U/ml}$, **4a** = $1.00 \mu\text{mol U/ml}$, **4b** = $8.00 \mu\text{mol U/ml}$; Hemmversuche = $0.10 \mu\text{mol U/ml}$. Die initialen Verseifungsgeschwindigkeiten (Laugenverbrauch/Zeit) wurden mit Hilfe der Wasserstoffionenkonzentration bei pH = 7.20 (pH-Wert der Enzymversuche) und der 1. Dissoziationskonstanten der Kohlensäure ($K_1 = 4.47 \times 10^{-7}\text{M}$) korrigiert. Korrektionsfaktor $y = 1/(1 + (\text{H}^+)/K_1)$: Errechneter Wert = 0.88; experimenteller Wert = 0.84.

Literatur

- 1 G. Lambrecht, Pharm. Ztg. *117*, 1500 (1972); *118*, 77 (1973).
- 2 K.-B. Augustinsson, T. Fredriksson, A. Sundwall und G. Jonsson, Biochem. Pharmacol. *3*, 68 (1959).
- 3 B. Jensen, Acta Chem. Scand. B *33*, 227 (1979).

- 4 H. Johansen, S. Rettrup und B. Jensen, *Theor. Chim. Acta* 55, 267 (1980).
- 5 B. Jensen und G. Lambrecht, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 307, Suppl. R54 (1979).
- 6 A.A. Sekul, W.C. Holland und A.E. Breland, *Biochem. Pharmacol.* 11, 487 (1962).
- 7 H. Kunz, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1973, 2001.
- 8 J. Katzhendler, L.A. Poles und S. Sarel, *J. Chem. Soc. B* 1971, 1847.
- 9 L.W. Dittert und T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* 52, 852 (1963).
- 10 K.B. Schowen, E.E. Smisman und W.F. Stephen, *J. Med. Chem.* 18, 292 (1975).

[Ph 369]

 Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 926-932 (1981)

Die Beeinflussung der Resorption von Benzocain und Lidocain durch Pluronic F 68 bei Fischen

Karl-Heinz Frömming^{*)***)} und Ghaly M. Ghaly^{**)}

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 2 + 4, 1000 Berlin 33
Eingegangen am 21. Januar 1981

Black-Molly-Fische (*Poecilia Shenops*) werden als Modelle für Untersuchungen der Beeinflußbarkeit der Resorption von nicht dissoziiertem Benzocain ($0,60 \cdot 10^{-3}$ mol/l) und Lidocain ($1,07 \cdot 10^{-3}$ mol/l) durch Pluronic F 68 herangezogen. Mit steigenden Hilfsstoffkonzentrationen tritt eine Verlängerung der „Overturn“-Zeit auf. Gegenüber dem Lidocain ist der Effekt schwächer ausgeprägt. Zwischen den mit verschiedenen In vitro-Diffusionsmodellen erhaltenen Diffusions-Geschwindigkeitskonstanten des Benzocains und den reziproken „Overturn“-Zeiten werden geradlinige Abhängigkeiten bewiesen.

Influence of Pluronic F 68 on the Absorption of Benzocaine and Lidocaine by Fish

Black molly fishes (*Poecilia Shenops*) are used to determine the influence of Pluronic F 68 on the absorption of undissociated Benzocaine ($0,60 \cdot 10^{-3}$ mol/l) and Lidocaine ($1,07 \cdot 10^{-3}$ mol/l). With increasing concentrations of the additive an increase of the turnover times is observed. The effect of pluronic is weaker for lidocaine. It exists a straight line relation between the diffusion rate constants of benzocaine in in vitro diffusion models and the inverse of the turnover time ($1/t$).

Mit der Gleichgewichtsdialyse und mit Löslichkeitsuntersuchungen konnten Wechselwirkungen des Benzocains ($pK_a 2,5$) mit äquimolaren und höhermolaren Pluronic F 68-Konzentrationen bewiesen werden¹⁾. Diese Wechselwirkungen bewirkten bei Dialy-

***) Herrn Prof. Dr. H. Oelschläger zum 60. Geburtstag gewidmet.