

# REAKTIVIERUNG VON *O,O*-DIÄTHYLPHOSPHORYL-ACETYLCHOLINESTERASE REAKTIVIERUNGS-REPHOSPHORYLIERUNGS-GLEICHGEWICHT

K. SCHOENE

Aus dem Institut für Aerobiologie der Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., Grafschaft/Hochsauerland, Deutschland

(Received 22 May 1971; accepted 7 July 1971)

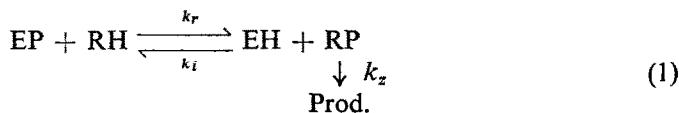
**Abstract**—Acetylcholinesterase, inhibited by *O,O*-diethyl-*O-p*-nitrophenylphosphate (paraoxon), was reactivated with pyridinium oximes. The reaction reached an equilibrium, indicating that simultaneously with the reactivation process, the free enzyme becomes rephosphorylated by the produced phosphoryl oxime. From the concentrations of the reactants in the equilibrium the equilibrium constants were calculated. Kinetical treatment of the reaction course yielded the rate constants of reactivation and rephosphorylation.

After equilibrium has been reached, a further slow increase of enzymatic activity indicates the decomposition of the phosphorylated oxime. From the time course of this consecutive reaction the rate constant for decomposition of the phosphoryloximes could be calculated.

The phosphoryloximes of potent activators such as toxogenin® and TMB-4 proved to be up to ten times stronger anticholinesterases than paraoxon. The decomposition rate constants of these compounds are in the range of  $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ .

ACETYLCHOLINESTERASE (AChE, EC 3.1.1.7) wird durch Phosphorsäureester mit acylierenden Eigenschaften irreversibel gehemmt. Das inhibierte Enzym lässt sich mit Pyridiniumoximen unter Ablösung des Phosphorylrestes regenerieren.<sup>1,2</sup> Diese als Reaktivierung bezeichnete Reaktion äußert sich in einer Wiederkehr der Enzymaktivität.

Nach Hobbiger<sup>1</sup> und Reiner<sup>3</sup> ist die Reaktivierung bei Abwesenheit von Substrat als Teil einer Gleichgewichtsreaktion aufzufassen (Substrat in ausreichender Konzentration hemmt die Rephosphylierung<sup>3</sup>):



(EP, RP = Phosphoryl-Enzym bzw. —Oxim, RH = Oxim-Reaktivator,  
EH = regeneriertes Enzym)

Eine Verschiebung des Reaktivierungs-Rephosphylierungs-Gleichgewichts im Sinne einer durchgreifenden Reaktivierung kann nur durch raschen Zerfall des Phosphoryloxims bewirkt werden.

Das Zwischenprodukt RP nimmt damit eine Schlüsselposition im Reaktivierungs-geschehen ein. Um die Eigenschaften der Phosphoryloxime *in vivo* und *in vitro* eingehender studieren zu können, sind viele Versuche zur Synthese dieser Substanzen unternommen worden. So gelang die Darstellung verschiedener Phosphorylderivate

von Pyridin- und *N*-Alkylpyridinium-ketoximen sowie Pyridinaldoximen,<sup>4-7</sup> aus Verbindungen also, die nur geringe Reaktivierungsqualitäten aufweisen. Phosphorylierte Oxime aus Reaktivatoren hoher Wirksamkeit, die in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse wären, konnten jedoch ihrer geringen Stabilität wegen bisher nicht erhalten werden.

Angesichts dieser präparativen Schwierigkeiten suchten wir nach anderen Möglichkeiten zur Charakterisierung der aus hochwirksamen Reaktivatoren resultierenden Zwischenprodukte RP. Unter diesem Aspekt schien ein eingehendes Studium des Reaktivierungs-Rephosphorylierungs-Gleichgewichtes (1) erfolgversprechend.

### METHODIK

Bei Anwendung eines hohen Reaktivatorüberschusses kann man die Reaktivierungs-Teilreaktion in (1) nach dem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung behandeln; die Rückreaktion (Rephosphorylierung durch RP) verläuft nach der zweiten Ordnung mit gleichen Konzentrationen (EH) und (RP). Für diesen Reaktionstyp läßt sich aus dem Ansatz

$$-\frac{d(\text{EP})}{dt} = k_r' (\text{EP}) - k_t (\text{EH})(\text{RP}) \quad (2)$$

die integrale Form der Geschwindigkeitsbeziehung für die Reaktivierungsreaktion entwickeln:<sup>8</sup>

$$k_r' \frac{(\text{EP})_0 + (\text{EP})_G}{(\text{EP})_0 - (\text{EP})_G} = \ln \frac{(\text{EP})_0^2 - (\text{EP})_t (\text{EP})_G}{(\text{EP})_0 [(\text{EP})_t - (\text{EP})_G]} \quad (3)$$

Aus der Geschwindigkeits ("RG")-Konstanten pseudo-erster Ordnung  $k_r'$  ergibt sich die RG-Konstante zweiter Ordnung  $k_r$  durch Multiplikation mit der angewandten Reaktivatorkonzentration (RH):

$$k_r (\text{RH}) \frac{(\text{EP})_0 + (\text{EP})_G}{(\text{EP})_0 - (\text{EP})_G} = \ln \frac{(\text{EP})_0^2 - (\text{EP})_t (\text{EP})_G}{(\text{EP})_0 [(\text{EP})_t - (\text{EP})_G]} \quad (4)$$

In den Gleichungen (3) und (4) bezeichnen die Indices O die Anfangs- und G die Gleichgewichtskonzentrationen an EP. ( $\text{EP}_t$ ) ist die Konzentration an EP zur Zeit  $t$ .

Aus dem Experiment ergibt sich als Maßzahl für den Reaktivierungsgrad die jeweils erreichte Enzymaktivität, bezogen auf die Aktivität eines ungehemmten Kontrollansatzes. Zwischen Enzymaktivität und -konzentration besteht Proportionalität. Daher lassen sich die Konzentrationsangaben in Gleichung (4) durch die korrespondierenden Aktivitätswerte ersetzen: dem Ausdruck  $(\text{EP})_0 (= (\text{EH})_0)$  entspricht die Aktivität des ungehemmten (bzw. zu 100% reaktivierten) Enzym ("NA");  $(\text{EP})_G$  läßt sich durch die Differenz aus NA und der Enzymaktivität im Gleichgewichtszustand, ( $\text{EP}_t$ ), durch die Differenz aus NA und der Enzymaktivität zur Zeit  $t$  ersetzen.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Gleichung (4) ist unter anderem, daß der Reaktivierungsansatz keinen Rest an nicht umgesetztem Inhibitor enthält. In der vorliegenden Arbeit wird zur Herstellung von EP Paraoxon (*O,O*-Diäthyl-*O-p*-nitrophenyl-phosphat) mit einer äquimolaren Menge (bezüglich der aktiven Zentren) an Enzym zur Reaktion gebracht. Infolge der hohen Hemmgeschwindigkeit läßt sich der Inhibitor innerhalb von 4 Stunden zu über 99 % umsetzen.

Bei Kenntnis der Enzymkonzentration im Reaktivierungsansatz<sup>9</sup> lassen sich die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner und damit die Gleichgewichtskonstante berechnen:

$$K = \frac{(EH)_G \cdot (RP)_G}{(RH) (EP)_G} \quad (5)$$

Aus der Beziehung  $K = k_r/k_i$  ergibt sich ferner die RG-Konstante der Rephosphylierung  $k_i$ .

Durch den Zerfall des Zwischenproduktes RP wird das Gleichgewicht (1) zur Reaktivierungsseite hin verschoben (die Zerfallsprodukte besitzen keine nennenswerte Hemmwirkung auf AChE). Die Gleichgewichtsverschiebung äußert sich in einem allmählichen Anstieg der Enzymaktivität über das anfangs schnell erreichte Niveau hinaus (vgl. Abb.). Daraus läßt sich unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Gleichgewichtsbedingungen die Zerfallskonstante  $k_z$  (pseudo-erster Ordnung) berechnen. Da der Reaktivator im Reaktionsansatz im Überschuß vorliegt, spielt es für die Ermittlung von  $k_z$  keine Rolle, welcher der möglichen Zerfallswege—Hydrolyse unter Rückbildung von Oxim oder Eliminierung zu Nitril<sup>5-7,10,11</sup>—beschritten wird.

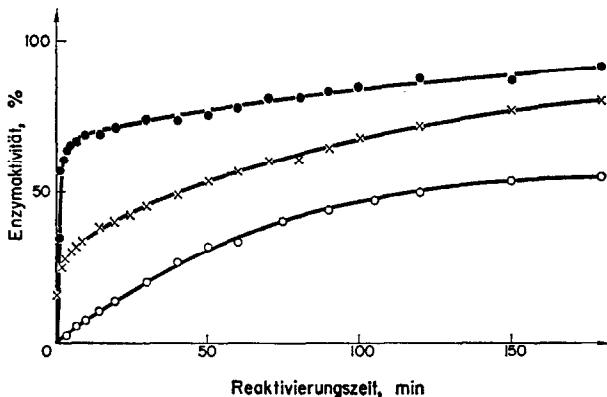


ABB. 1. Reaktivierung von *O,O*-Diäthylphosphoryl-AChE mit  $1 \times 10^{-3}$  M HS 6 ( $\circ$ ),  $1 \cdot 10^{-4}$  M ( $\times$ ) und  $5 \cdot 10^{-4}$  M ( $\bullet$ ) Toxogonin.

Für die Zerfallsgeschwindigkeit des im Gleichgewicht vorhandenen Phosphoryloxims  $RP_G$  gilt

$$-\frac{d(RP_G)}{dt} = k_z (RP_G); k_z t = \ln \frac{(RP_G)_0}{(RP_G)_t} \quad (6)$$

mit  $(RP_G)_0$  und  $(RP_G)_t$  als den Gleichgewichtskonzentrationen an RP zur Zeit  $t = 0$  und  $t$ .

Zu jedem Zeitpunkt muß die Gleichgewichtsbedingung (5) erfüllt sein, die damit zur Bestimmungsgleichung für  $(RP_G)_t$  wird

$$(RP_G)_t = K(RH) \frac{(EP_G)_t}{(EH_G)_t} \quad (7)$$

Durch Einsetzen in (6) ergibt sich

$$k_z t = \ln \frac{(RP_G)_0 (EH_G)_t}{K(RH) (EP_G)_t} \quad (8)$$

Bei Kenntnis der in den Reaktionsansatz eingebrachten Konzentrationen ( $EP$ ) und ( $RH$ ) lassen sich  $(RP_G)_0$ ,  $(EH_G)_t$  und  $(EP_G)_t$  aus den gemessenen Enzymaktivitäten berechnen. Gleichung (8) kann zur Ermittlung von  $k_z$  nur herangezogen werden, wenn  $k_z \ll k_r$ . Die Relation zwischen  $k_r$  und  $k_z$  ist bereits anhand der graphischen Darstellung des Reaktivierungsverlaufs abzuschätzen.

### DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

(1) *Bestimmung der Enzymaktivität.* Die Enzymaktivität der aus den Reaktionsansätzen entnommenen Proben wird nach entsprechender Verdünnung mit Hilfe der—etwas modifizierten—elektrometrischen Methode nach Michl<sup>12</sup> bestimmt. Als Substrat dient Acetylcholinchlorid, als Lösungsmittel für alle Vorrats- und Versuchslösungen wird dest. Wasser mit einem Gehalt an NaCl (0,1 M) und MgCl<sub>2</sub> (0,02 M) verwendet.

(2) *Bestimmung der Enzymkonzentration.* Der Gehalt des AChE-Präparates (AChE aus Rindererythrozyten, Fa. Serva, Heidelberg) an aktiven Zentren wird durch "Titration" mit Soman (*O*-[1.2.2.-Trimethylpropyl]-methyl-phosphonyl-fluorid) ermittelt, wie kürzlich beschrieben.<sup>9</sup> 1 mg des verwendeten AChE-Präparates enthält  $5,2 + 0,5 \cdot 10^{-12}$  Mol aktive Zentren.

(3) *O,O-Diäthylphosphoryl-AChE.* Das Gemisch aus 10,0 mg ( $5,2 \cdot 10^{-11}$  Mol) AChE und  $5,2 \cdot 10^{-11}$  Mol Paraoxon (10 µl einer alkoholischen Lösung) in 1 ml Tris-Puffer ( $5 \cdot 10^{-3}$  M, pH 7,60) wird 4 Std. bei 37° inkubiert und über Nacht bei 4° aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wird die Lösung mit 1 ml desselben Puffers verdünnt und im Thermostaten auf 25° erwärmt.

(4) *Reaktivierung.* 1 ml des nach (3) erhaltenen Reaktionsgemisches wird mit 1 ml einer Lösung des Reaktivators in Tris-Puffer ( $5 \cdot 10^{-3}$  M, pH 7,60, 25°) versetzt. Aus der bei 25° im Thermostaten aufbewahrten Mischung werden Proben (20 µl) zur Aktivitätsbestimmung entnommen, anfangs in 10-Sekunden-Intervallen, später in größeren Zeitabständen. Die angewandten Reaktivatorkonzentrationen ( $1 \cdot 10^{-4}$  bis  $1 \cdot 10^{-3}$  M) sind in der Tabelle angegeben.

(5) *Spontanreaktivierung.* Die auch ohne Einwirkung eines Reaktivators allmählich stattfindende Regenerierung des Enzyms auf hydrolytischem Wege wird in gleicher Weise bestimmt wie unter (4) beschrieben; der hinzugefügte Puffer enthält in diesem Falle keinen Reaktivator.

(6) *Hemmgeschwindigkeit des Paraoxons.* Die Lösung von 10,0 mg ( $5,2 \cdot 10^{-11}$  Mol) AChE in 4 ml Tris-Puffer ( $5 \cdot 10^{-3}$  M, pH 7,60, 25°) wird mit  $5,2 \cdot 10^{-11}$  Mol Paraoxon (10 µl einer alkoholischen Lösung) versetzt. In geeigneten Intervallen werden Proben zur Aktivitätsbestimmung entnommen.

### REAKTIVATOREN

Die Synthese der Substanzen 2- und 4-PAM,<sup>13</sup> TMB-4,<sup>14</sup> IV,<sup>14</sup> HS 6<sup>15</sup> und HS 7<sup>15</sup> erfolgte wie in der zitierten Literatur beschrieben. Die Verbindungen LüH-40, HI 1 und HI 4 wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Hagedorn, Freiburg, zur

Verfügung gestellt. R 21 und R 23 wurden von Herrn Dr. G. Zimmer, Frankfurt, nach einer Vorschrift von Dr. N. Engelhard<sup>16</sup> synthetisiert.

### AUSWERTUNG

Die aus den Versuchen nach (4), (5) und (6) erhaltenen Aktivitätsdaten werden bezogen auf die Enzymaktivität der entsprechenden ungehemmten Kontrollansätze. Auftragung gegen die Zeit liefert die graphische Darstellung des Reaktionsverlaufs (siehe Abb.). (EP)<sub>G</sub> ergibt sich aus der halblogarithmischen Auftragung von (EP), gegen die Zeit als Schnittpunkt der an die beiden Kurvenäste angelegten Tangenten. Nach Berechnung der übrigen Gleichgewichtskonzentrationen wird gemäß Gleichung(5) die Gleichgewichtskonstante K ermittelt.

Die Auftragung des logarithmischen Ausdrucks in Gleichung (4) gegen die Zeit liefert eine Gerade, aus deren Steigung sich  $k_r$  ergibt. Nach  $k_i = k_r/K$  wird  $k_i$  berechnet.

Der mit den Verbindungen 2-PAM, LüH 40 und HS 6 (vgl. Abb.) erhaltene Reaktivierungsverlauf zeigt, daß in diesen Fällen die Bedingung  $k_z \ll k_r$  nicht erfüllt ist, eine Gleichgewichtseinstellung läßt sich nicht nachweisen. Die halblogarithmische Auftragung der zeitlichen Abnahme an gehemmter Enzymaktivität liefert bis zu hohen Umsatzquoten hin eine Gerade, entsprechend einem Reaktionsverlauf pseudo-erster Ordnung. Die Berechnung der RG-Konstanten erfolgt daher über das Zeitsgesetz erster Ordnung. In gleicher Weise wird die RG-Konstante der Spontanreaktivierung ermittelt.

Zur Bestimmung der Zerfallskonstanten  $k_z$  wird der logarithmische Ausdruck der Gleichung (8) gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem Anstieg der erhaltenen Geraden ergibt sich nach Abzug der RG-Konstanten der Spontanreaktivierung die Zerfallskonstante  $k_z$ .

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle sind die verwendeten Reaktivatoren, ihre Konzentrationen sowie die erhaltenen Resultate zusammengestellt. Die angegebenen Daten sind die Mittelwerte aus jeweils drei Ansätzen. Die relativen Abweichungen von den Mittelwerten betragen maximal 12% für K, für  $k_r$  20% und im Falle der  $k_z$ -Werte 17%.

Aus den Ansätzen (5) und (6) ergaben sich die RG-Konstanten für die Spontanreaktivierung zu  $0,016 \cdot 10^{-2} \text{ Min}^{-1}$  und die Hemmgeschwindigkeit des Paraoxons zu  $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ Min}^{-1}$ .

Die RG-Konstanten  $k_r$  zeigen im Vergleich untereinander die bekannten<sup>17</sup> Relationen: Bisquartäre Bis-aldoxime reaktivieren schneller als bisquartäre Mono-aldoxime, diese wiederum besitzen im allgemeinen höhere  $k_r$ -Werte als Mono-quartäre Oxime; das Ketoxim R 23 erweist sich erwartungsgemäß als schwacher Reaktivator.

Die bei den Verbindungen 2-PAM, Toxogonin, TMB-4 und IV zu beobachtende Konzentrationsabhängigkeit der  $k_r$ -Werte deutet auf eine dem Reaktivierungsschritt vorgelagerte Komplexbildung hin:<sup>17,18</sup>



Die Reaktionsgeschwindigkeit—and damit  $k_r$ —wird demnach nicht allein von der Reaktivität bestimmt, sondern limitiert durch die verfügbare Konzentration an

TABELLE 1. REAKTIVIERUNG VON  $O,O$ -DIÄTHYLPHOSPHORYL-AChE MIT PYRIDINIUMOXIMEN

Reaktivator	a	Y	R	b	X	(R)	$K \cdot 10^3$	$k_p \cdot 10^6$	$M^{-1} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot 10^{-2}$	$k_t \cdot M^{-1} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot 10^{-6}$	$k_x \cdot \text{Min}^{-1}$
2-PAM	2	—CH <sub>3</sub>	*	*	I	I	0,1	1,0	1,0	0,7	≥ 10
4-PAM	4	—CH <sub>3</sub>	*	*	Cl	0,5	1,0	0,5	0,5	0,04	< 1
LiiH 40	4	—O—CH <sub>3</sub>	—CONH <sub>2</sub>	3	Cl	1,0	6,1	0,1	0,01	0,06	≥ 6
HS 6	2	—O—	—CHNOH	4	Cl	0,1	41,6	11,8	28,4	≥ 1	≥ 1
Toxogonin	4	—O—	“	4	Br	0,5	31,7	10,1	31,8	9,6	7,0
TMB 4	4	—CH <sub>2</sub> —	“	4	Br	0,5	69,9	12,2	17,4	8,4	13,2
IV	4	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> —	“	4	Br	0,5	63,6	8,4	8,0	3,1	8,0
R 21	4	—CH—CH—	“	4	Br	1,0	35,0	2,6	7,4	2,6	12,2
			OH OH			1,0	21,3				
HS 7	4	—CH <sub>2</sub> —	—CONH <sub>2</sub>	3	Br	1,0	22,4	1,1	4,9	2,7	
HI 1	4	—O—	“	3	Cl	1,0	13,0	2,6	20,0	8,2	
HI 4	4	—O—	—H	“	Cl	1,0	13,2	2,3	17,4	7,4	
R 23			Bis-(4-acetoxypyridinium-1)-methyl-äther-dioximidchlorid			1,0	30,0	0,6	1,9	1,7	

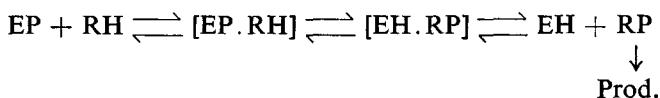
\* Monopyridiniumsalze.

Komplex [EP.RH], die wiederum von der Affinität Reaktivators zum Phosphoryl-enzym abhängt.

Die RG-Konstanten  $k_t$  der Phosphoryloxime lassen einen Zusammenhang mit den  $pK_s$ -Werten ihrer Abgangsgruppen erkennen: Die  $k_t$ -Werte der Phosphorylderivate aus bisquartären Oximen mit Acetalbrücke steigen in der Reihenfolge ihrer Aciditäten an (in Klammern die  $pK_s$ -Werte der freien Oxime<sup>17</sup>): R 23 (8,58), HI 4 (7,90), HI 1 (7,87), Toxogonin (7,63). Analoges Verhalten zeigen die bisquartären Verbindungen mit Polymethylenbrücke HS 7 (8,17), IV (7,91), TMB-4 (7,83); auch das Phosphoryl-4-PAM (8,44) läßt sich in dieses Schema einreihen.

Der Phosphorylester des Toxogonins hemmt entsprechend seiner RG-Konstante  $k_t$  etwa zehnmal schneller als Paraoxon. Die Abgangsgruppe des Paraoxons, *p*-Nitrophenol, ist aber mit  $pK_s = 7,15^{19}$  wesentlich acider als Toxogonin (7,63). Diese Diskrepanz wie auch die Unterschiede der  $k_t$ -Werte zwischen den Toxogonin- und TMB 4-Varianten sowie der Verbindung R 21 deuten darauf hin, daß neben der Reaktivität ( $pK_r$ -Wert) des Acylierungsmittels auch dessen Affinität zum Enzym die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

Kürzlich gelang O. Rogne<sup>20</sup> der Nachweis, daß die Reaktion von Phosphon-säureestern aus Pyridin- und Pyridinium-ketoximen mit AChE durch Bildung eines reversiblen Komplexes (Enzym-Phosphorsäureester) eingeleitet wird. Es liegt daher nahe, auch für die hier behandelte Phosphorylierung durch Phosphorylaldoxime als einleitenden Schritt eine Komplexbildung mit dem Enzym anzunehmen. Das Reaktivierungs-Rephosphorylierungs-Gleichgewicht wäre dann folgendermaßen zu formulieren:



Die Zerfallskonstante  $k_z$  der Phosphoryloxime aus 2-PAM, LüH 40 und HS 6 läßt sich nach Gleichung (8) nicht ermitteln. Die in Klammern angegebenen  $k_z$ -Werte sind die beobachteten Reaktivierungs-RG-Konstanten pseudo-erster Ordnung. Sie stellen entsprechend dem geschilderten Reaktionsverlauf den unteren Grenzwert für  $k_z$  dar.

Die  $k_z$ -Werte der Phosphorylester aus Toxogonin, HI 1 und HI 4 mit einer Acetal-verknüpfung der beiden Pyridiniumringe liegen höher als jene der entsprechenden Methylenanalogen TMB-4 und HS 7. Eine ähnliche Relation fand M. Nenner<sup>21</sup> beim Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten der bis-Benzoylester aus Toxogonin und TMB-4.

Die Zerfallstendenz der Phosphoryl-aldoxime wächst mit steigender Acidität des Methin-Protons am Aldehyd-C-Atom,<sup>11</sup> denn wie ein Vergleich der  $pK$ -Werte der entsprechenden freien Pyridinium-aldoxime zeigt,<sup>17</sup> ist diese Acidität im Falle der Verbindungen mit Acetal-Brücke höher als bei jenen mit Tri- oder Tetramethylen-brücke.

Das Phosphoryl-ketoxim R 23 zeigt eine deutlich geringere Zerfallstendenz als der entsprechende Aldoximester aus Toxogonin. Diese Befunde stehen im Einklang mit unseren kürzlich dargelegten Vorstellungen über den Zerfallsmechanismus der Phosphoryloxime.<sup>11</sup>

Aus den  $k_t$ - und  $k_z$ -Werten ergibt sich, daß aus *in vivo* hoch wirksamen Reaktivatoren wie Toxogonin und TMB-4 Phosphoryloxime entstehen, die—entsprechend  $k_t$ —hochtoxisch sein dürften und darüberhinaus eine unerwartet geringe Zerfalls-tendenz besitzen. Wenn viele dieser Oxime im Tierversuch gegenüber einer Paraoxonvergiftung dennoch therapeutisch hoch wirksam sind,<sup>22</sup> so ist daraus zu schließen, daß Toxizität und Stabilität der Zwischenprodukte RP für den Reaktivierungsablauf *in vivo* keine ausschlaggebende Rolle spielen können. Vielleicht ist hier dem infolge verzögerten Abbaus akkumulierten Acetylcholin größere Bedeutung beizumessen, denn dieses könnte die Rephosphorylierung hemmen und damit eine durchgreifende Reaktivierung des Enzyms ermöglichen.

**Zusammenfassung**—Paraoxon-gehemmte Acetylcholinesterase wird mit Pyridiniumoximen reaktiviert. Die Reaktion führt zu einem Gleichgewicht zwischen Reaktivierung des Enzyms und Rephosphorylierung durch das gebildete Phosphoryloxim. Aus der Lage des Gleichgewichts lässt sich die Gleichgewichtskonstante ermitteln. Die kinetische Auswertung des Reaktionsverlaufs ergibt die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung sowie der Rephosphorylierung. Der Zerfall des Phosphoryloxims äußert sich in einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Reaktivierung. Aus dem zeitlichen Verlauf dieser Folgereaktion wird die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Phosphoryloxims errechnet.

Die Phosphoryloxime aus hoch wirksamen Reaktivatoren wie Toxogonin® und TMB-4 sind bis zu zehnmal stärkere Cholinesterase-Hemmstoffe als Paraoxon. Die Zerfallskonstanten dieser Verbindungen liegen in der Größenordnung  $10^{-2}$  Min<sup>-1</sup>. Herrn R. Wulf bin ich für seine sorgfältige Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

#### LITERATUR

1. F. HOBBIGER, *Hbd. d. exp. Pharmakologie*, (Ed. G. B. KOELLE) Bd. XV, Springer, Berlin (1963).
2. J. B. WILSON, *Drugs Affecting the Peripheral Nervous System*. Vol. I, March Dekker, New York (1967).
3. E. REINER, *Biochem. J.* **97**, 710 (1965).
4. B. E. HACKLEY, G. M. STEINBERG und J. C. LAMB, *Archs Biochem. Biophys.* **80**, 211 (1959).
5. J. C. LAMB, G. M. STEINBERG, S. SOLOMON und B. E. HACKLEY, *Biochemistry* **4**, 2475 (1965); G. M. STEINBERG und S. SOLOMON, *Biochemistry* **5**, 3142 (1966).
6. C. VAN HOODONK und L. GINJAAR, *Chem. Ind.* 702 (1966), und C. VAN HOODONK, G. W. KRAAIJ und L. GINJAAR, *Rec.* **87**, 673 (1968).
7. J. H. BLANCH und J. ANDERSEN, *J. chem. Soc.* (B) 169 (1968) und J. H. BLANCH, *J. chem. Soc.* (B) 1172 (1969).
8. A. A. FROST und R. G. PEARSON, *Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen*. S. 154. Verlag Chemie, Weinheim (1964).
9. K. SCHOENE, *Biochem. Pharmac.*, **20**, 2527 (1971).
10. J. H. BLANCH, *J. chem. Soc.* (B) 167 (1968) und J. H. BLANCH und O. T. ONSAGER, *J. chem. Soc.* 3729 (1965).
11. I. HAGEDORN, W. H. GÜNDEL und K. SCHOENE, *Arzneimittelforsch.* **19**, 603 (1969).
12. H. O. MICHEL, *J. lab. clin. Med.* **34**, 1564 (1949).
13. S. GINSBURG und J. B. WILSON, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 481 (1957).
14. F. HOBBIGER und P. W. SADLER, *Br. J. Pharmac.* **14**, 192 (1959).
15. K. SCHOENE, Dissertation Freiburg (1967).
16. N. ENGELHARD und W. D. ERDMANN, *Arzneimittelforsch.* **14**, 870 (1964).
17. K. SCHOENE und E. M. STRAKE, *Biochem. Pharmac.*, **20**, 1041 (1971).
18. A. L. GREEN und H. J. SMITH, *Biochem. J.* **68**, 28 u. 32 (1958).
19. H. M. RAUEN, *Biochem. Taschenbuch*, Bd. II, S. 72. Springer, Berlin (1964).
20. O. ROGNE, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1853 (1967).
21. M. NENNER, Dissertation Göttingen (1970).
22. H. OLDIGES und K. SCHOENE, *Arch. Toxikol.* **26**, 293 (1970).