

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., Graftschaft/Hochsauerland, Deutschland

(Received 22 May 1971; accepted 7 July 1971)

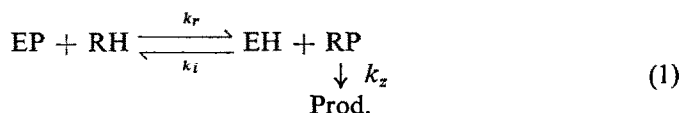
Abstract—Acetylcholinesterase, inhibited by *O,O*-diethyl-*O-p*-nitrophenylphosphate (paraoxon), was reactivated with pyridinium oximes. The reaction reached an equilibrium, indicating that simultaneously with the reactivation process, the free enzyme becomes rephosphorylated by the produced phosphoryl oxime. From the concentrations of the reactands 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 reactivators such as toxogonin® 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} 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.^{1,2} Diese als Reaktivierung bezeichnete Reaktion äußert sich in einer Wiederkehr der Enzymaktivität.

Nach Hobbiger¹ und Reiner³ ist die Reaktivierung bei Abwesenheit von Substrat als Teil einer Gleichgewichtsreaktion aufzufassen (Substrat in ausreichender Konzentration hemmt die Rephosphorylierung³):



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

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

Das Zwischenprodukt RP nimmt damit eine Schlüsselposition im Reaktivierungsgeschehen 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,⁴⁻⁷ 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:⁸

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

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. (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 (EP)₀ (= (EH)₀) entspricht die Aktivität des ungehemmten (bzw. zu 100% reaktivierten) Enzym ("NA"); (EP)_G läßt sich durch die Differenz aus NA und der Enzymaktivität im Gleichgewichtszustand, (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 Hemmggeschwindigkeit läßt sich der Inhibitor innerhalb von 4 Stunden zu über 99% umsetzen.

Bei Kenntnis der Enzymkonzentration im Reaktivierungsansatz⁹ 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 Rephosphorylierung 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^{5-7,10,11}—beschritten wird.

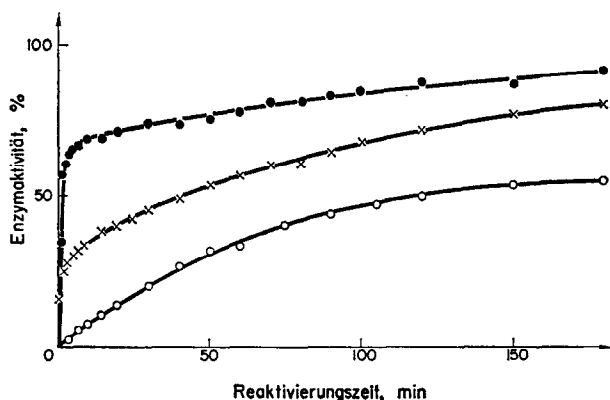


ABB. 1. Reaktivierung von *O,O*-Diäthylphosphoryl-AChE mit 1×10^{-3} M HS 6 (○), $1 \cdot 10^{-4}$ M (×) und $5 \cdot 10^{-4}$ M (●) Toxogonin.

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

$$k_z t = \ln \frac{(\text{RP}_G)_0 (\text{EH}_G)_t}{K(\text{RH}) (\text{EP}_G)_t} \quad (8)$$

Bei Kenntnis der in den Reaktionsansatz eingebrachten Konzentrationen (EP) und (RH) lassen sich $(\text{RP}_G)_0$, $(\text{EH}_G)_t$ und $(\text{EP}_G)_t$ 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 Michl¹² bestimmt. Als Substrat dient Acetylcholinchlorid, als Lösungsmittel für alle Vorrats- und Versuchslösungen wird dest. Wasser mit einem Gehalt an NaCl (0,1 M) und MgCl₂ (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.⁹ 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 μ l 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 μ l) 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 μ l einer alkoholischen Lösung) versetzt. In geeigneten Intervallen werden Proben zur Aktivitätsbestimmung entnommen.

REAKTIVATOREN

Die Synthese der Substanzen 2- und 4-PAM,¹³ TMB-4,¹⁴ IV,¹⁴ HS 6¹⁵ und HS 7¹⁵ 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. Engelhard¹⁶ 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.). $(EP)_G$ ergibt sich aus der halblogarithmischen Auftragung von $(EP)_t$ 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 pseudoerster Ordnung. Die Berechnung der RG-Konstanten erfolgt daher über das Zeitgesetz 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 $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ Min}^{-1}$.

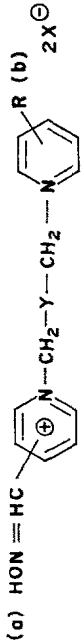
Die RG-Konstanten k_r zeigen im Vergleich untereinander die bekannten¹⁷ Relationen: Bisquartäre Bis-aldoxime reaktivieren schneller als bisquartäre Mono-aldoxime, diese wiederum besitzen im allgemeinen höhere k_r -Werte als Mono-quartäre Oxime; das Ketoxim R 23 erweist sich erwartungsgemäß als schwacher 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:^{17,18}



Die Reaktionsgeschwindigkeit—und 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-ÄTHER MIT PYRIDINIUMOXIMEN



Reaktivator	a	Y	R	b	X	(R)	K ·10 ⁶	k _r M ⁻¹ ·Min ⁻¹ ·10 ⁻²	k _i M ⁻¹ ·Min ⁻¹ ·10 ⁻⁶	k _x Min ⁻¹ ·10 ³
2-PAM	2	-CH ₃	*		I	0,1		1,0		≥10
4-PAM	4	-CH ₃	*		I	0,5		0,7		
LüH 40	4	-O-CH ₃	*		Cl	1,0	6,1	0,5	0,7	<1
HS 6	2	-O-	-CONH ₂	3	Cl	1,0		0,04		≥6
Toxogonin	4	-O-	-CHNOH	4	Cl	0,1		0,06		≥1
TMB-4	4	-CH ₂ -	„	4	Br	0,5	41,6	11,8	28,4	9,6
IV	4	-(CH ₂) ₂ -	„	4	Br	0,5	31,7	10,1	31,8	7,0
R 21	4	-CH-CH-	„	4	Br	0,5	69,9	12,2	17,4	
		OH				1,0	63,6	8,4	13,2	
		OH				0,5	38,9	3,1	8,0	
		OH				1,0	35,0	2,6	7,4	
		OH				1,0	21,3	2,6	12,2	
HS 7	4	-CH ₂ -	-CONH ₂	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-dioxim)chlorid			1,0	30,0	0,6	1,9	1,7

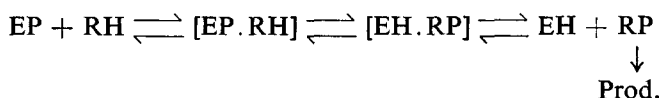
* Monopyridiniumsalze.

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 Oxime¹⁷): 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_s -Wert) des Acylierungsmittels auch dessen Affinität zum Enzym die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

Kürzlich gelang O. Rogne²⁰ der Nachweis, daß die Reaktion von Phosphonsäureestern 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 Acetalverknüpfung der beiden Pyridiniumringe liegen höher als jene der entsprechenden Methylenanalogen TMB-4 und HS 7. Eine ähnliche Relation fand M. Nenner²¹ beim Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten der bis-Benzoyl-ester aus Toxogonin und TMB-4.

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

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.¹¹

Aus den k_1 - und k_2 -Werten ergibt sich, daß aus *in vivo* hoch wirksamen Reaktivatoren wie Toxogonin und TMB-4 Phosphoryloxime entstehen, die—entsprechend k_1 —hochtoxisch sein dürften und darüberhinaus eine unerwartet geringe Zerfallstendenz besitzen. Wenn viele dieser Oxime im Tierversuch gegenüber einer Paraoxonvergiftung dennoch therapeutisch hoch wirksam sind,²² 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^{-1} . Herrn R. Wulf bin ich für seine sorgfältige Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. F. HOBIGER, *Hbd. d. exp. Pharmakologie*, (Ed. G. B. KOELLE) Bd. XV, Springer, Berlin (1963).
2. J. B. WILSON, *Drugs Affecting the Peripheral Nervous System*. Vol. 1, 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 HOOIDONK und L. GINJAAR, *Chem. Ind.* 702 (1966), und C. VAN HOOIDONK, 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. HOBIGER 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).