

Biologische und chemische Wege zur Anreicherung von Spurenelementen

Von E. BAYER¹

Metallhaltige organische Verbindungen sind in Organismen als Katalysatoren lebensnotwendiger Reaktionen weit verbreitet. So wirkt am Beginn des Kreislaufes des Kohlenstoffs in der belebten Natur der magnesiumhaltige grüne Blattfarbstoff, das Chlorophyll, mit, und der zum oxydativen Abbau der organischen Verbindungen benötigte Sauerstoff wird im Säugetierkörper durch den eisenhaltigen roten Blattfarbstoff Hämoglobin übertragen. In das Stoffwechselgeschehen greifen Proteine und Fermente ein, die so relativ seltene Elemente wie zum Beispiel Kobalt, Kupfer, Molybdän oder Vanadium enthalten. Zumeist ist das Metall in komplexer Bindung an eine «prosthetische Gruppe» geknüpft, die, oftmals wiederum über das Metall selbst, an einen höhermolekularen Proteinbestandteil gebunden ist, wie dies vom Hämoglobin her allgemein bekannt ist. In anderen Fällen, zum Beispiel bei dem kupferhaltigen *Hämocyanin*, dem Blattfarbstoff der Weinbergschnecke, konnten bislang noch keine prosthetischen Gruppen nachgewiesen werden, und es liegt nahe, hier eine direkte komplexe Bindung des Metalls an das Protein anzunehmen, wie sie für das Eisen im *Eisenspeicherprotein Ferritin* nachgewiesen wurde². Bei vielen Fermenten konnte demonstriert werden, dass deren Wirkungsmechanismus eng an die Anwesenheit des Metalls gekoppelt ist. In der organischen Chemie findet diese Wirkung von Metallen in der Natur ihre Analogie in der Katalyse von Reaktionen durch Metallverbindungen, die zum Beispiel W. REPPE den Aufbau der Azetylenchemie ermöglichte.

Neben der spezifischen Reaktionsweise metallhaltiger Fermente gewinnt die Frage nach dem Mechanismus der spezifischen Anreicherung solcher Spurenelemente grösseres Interesse. Wir haben so nachgewiesen³, dass die Aszidie *Phallusia mamillata* Cuv. Vanadium in ihrem Blut gegenüber dem Meerwasser auf das $0,5 \times 10^6$ -fache angereichert enthält. Von GOLDBERG, McBLAIR und TAYLOR⁴ liegen Resorptionsversuche mit radioaktivem Vanadium bei der Aszidie

Ciona intestinalis vor, die zeigen, dass sich das im Wasser ursprünglich gelöste Vanadium in den Blutzellen wiederfindet. Bei einem mittleren Blutgehalt von 20 ml je Tier und einem Vanadiumgehalt von etwa 160 mg Vanadium in einem Liter Blut⁵ reichern demgemäss etwa 300 *Phallusien* 1 g Vanadium an, das ist der Gesamtvanadiumgehalt von etwa 1 Million Liter Meerwasser. Da andere Schwermetalle im Blut von *Phallusia mamillata* nicht in nennenswerten Mengen gefunden werden, ist diese selektive Auswahl und Anreicherung des Vanadiums aus den vielen im Meerwasser vorkommenden Spurenelementen um so erstaunlicher. Ein starkes Speicherungsvermögen für Vanadium wurde von BERTRAND⁵ auch bei dem Pilz *Amanita muscaria* festgestellt.

Das Zustandekommen solcher Anreicherungen von Schwermetallen ist durch physikalische Phänomene wie Diffusion, Adsorption und Osmose allein nicht mehr zu deuten. Auch die Ablagerung des Vanadiums in Form einer schwerlöslichen Verbindung scheidet aus. Denn der vanadiumhaltige Blattfarbstoff, das *Hämovanadin*, kommt in gelöster Form vor, sowohl in den Blutzellen als auch in den mit destilliertem Wasser hergestellten Hämolysaten. Nach magnetischen Messungen⁶, chemischen Reaktionen, analytischen Daten³ und Vergleich mit Modellschubstanzen⁷ liegt das Vanadium in den Hämolysaten komplex gebunden als braunrote Disulfatovanadin-(III)-säure vor. Das Molekulargewicht des Chromoproteids beträgt 24400⁸. Auf Grund dieser Beobachtungen lässt sich die Anreicherung des Vanadiums durch die feste Verankerung des Metalls an die komplexbildende Gruppierung des Hämovanadins deuten. An Hand von Modellreaktionen wurde ein Schema der Vanadinanreicherung aufgestellt³, das auf folgenden Reaktionsschritten basiert: primäre Resorption von Tetravanadat aus dem Meerwasser in das neutrale bis schwach alkalische Blutplasma, welches keinen Komplexbildner für Vanadium enthält; Bindung an den Komplexbildner in den annähernd neutralen, oberflächlichen Zellschichten der

¹ Forschungsinstitut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, Siebelingen, Pfalz, Abteilung Biochemie und Physiologie.

² H. J. BIELIG und E. BAYER, *Naturwissenschaften* **42**, 125 (1955). – E. BAYER und K. H. HAUSSE, *Exper.* **11**, 254 (1955).

³ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **25**, 26 (1954).

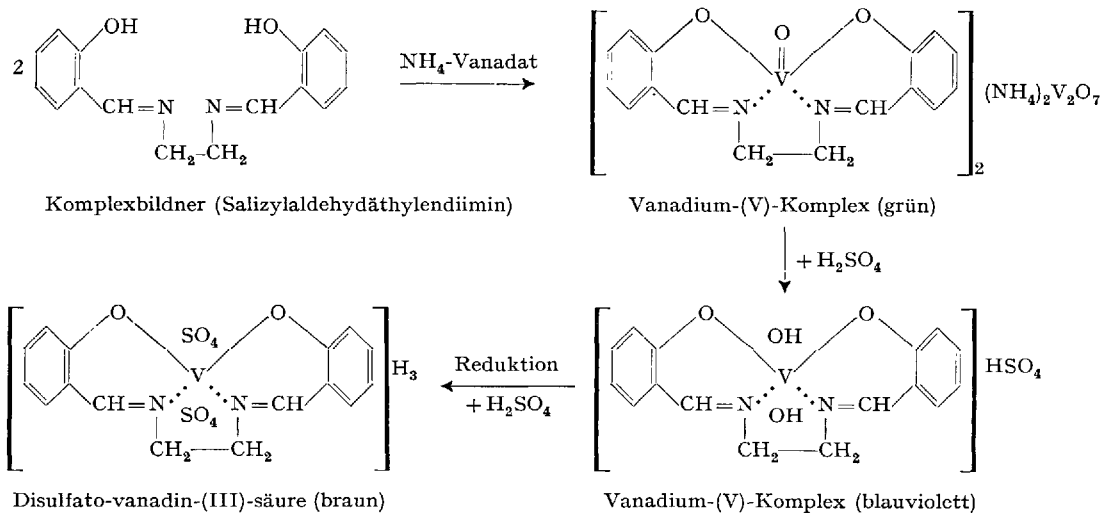
⁴ E. D. GOLDBERG, W. McBLAIR und K. M. TAYLOR, *Biol. Bull.* **101**, 84 (1951).

⁵ D. BERTRAND, *Bull. Soc. Chim. biol.* **25**, 194 (1943).

⁶ H.-J. BIELIG und E. BAYER, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* (1956), in Druck.

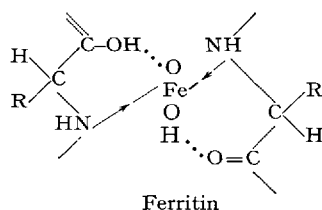
⁷ H.-J. BIELIG und E. BAYER, *Liebigs Ann. Chem.* **580**, 135 (1953).

⁸ H.-J. BIELIG und E. BAYER, *Exper.* **10**, 300 (1954).

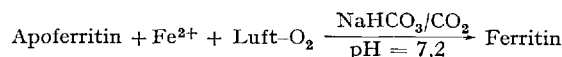


Vanadozyten und Reduktion zu 3wertigem Vanadium im sauren Zellinnern, eventuell über die Stufe eines Vanadium-(IV)-Komplexes. Die mit Hilfe von Salizylaldehyd-äthylendiimin als Modellkomplexbildner synthetisch gangbaren einzelnen Reaktionsstufen verlaufen nach obigem Schema.

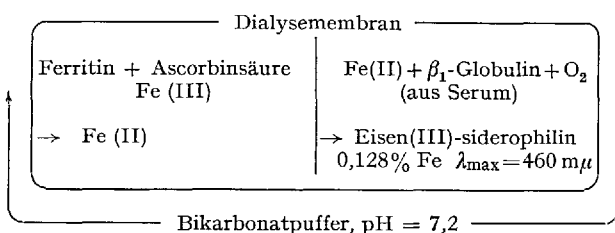
Während die Struktur der komplexbildenden Gruppierung im Hämovanadin noch nicht aufgeklärt ist, sind wir bei dem für die primäre Eisenresorption in der Darmwand⁹ und für die Eisenanreicherung in Milz und Leber von Säugetieren verantwortlichen Ferritin in der Lage, nähere Aussagen über die Struktur machen zu können²:



Wiederum ist ein hochmolekularer Komplexbildner für die Metallanreicherung verantwortlich. An dem eisenfreien Protein, dem Apoferritin, ist das 3wertige Metall in Form von $\text{O}=\text{Fe}-\text{OH}$ -Gruppen an je zwei Stickstoffe von Säureamidgruppierungen komplex gebunden. Nach den magnetischen Messungen liegen die 4 Liganden in einer Ebene und sind durch dsp^2 -Bastardbindungen an das Metall geknüpft¹⁰. Die Synthese des Ferritins aus Apoferritin und Eisen-(II)-salzen unter zellmöglichen Bedingungen ist das Modell für die primäre Resorption des Eisens aus der Nahrung. Man erhält synthetisches Ferritin, wenn bei Gegenwart von Luftsauerstoff Apoferritin mit Eisen-(II)-bikarbonat behandelt wird²:



Apoferritin scheint selektiv nur Eisen binden zu können. Denn bisher ist es noch nicht gelungen, andere Metalle als Eisen an Apoferritin anzulagern. Aus den Mucosazellen der Darmschleimhaut, wo das Fe zunächst an Apoferritin verankert wird, muss das Metall nun den Stellen des Körpers zugeführt werden, wo es zur Synthese des Hämoglobins, zur Anlegung von Eisenspeicherdepots oder zur Bildung eisenhaltiger Fermentsysteme benötigt wird. Für diesen Transport im Blut wird das β_1 -Globulin des Blutserums (Siderophilin¹¹) verantwortlich gemacht. BIELIG und BAYER¹² haben einen Austausch des Eisens vom Ferritin auf das Siderophilin experimentell unter zellfreien Bedingungen verwirklicht, wie er auch *in vivo* verlaufen könnte. Das Metall lässt sich durch reduktive Spaltung des Ferritins nach dem unten abgebildeten Schema auf Siderophilin übertragen. Nach kinetischen Messungen kommen als biologische Reduktionsmittel insbesondere L-Ascorbinsäure und eventuell Glutathion in Frage.



Schema des Eisenaustausches zwischen Ferritin und Siderophilin

Nach unseren Beispielen scheint die Anreicherung von Spurenelementen, besonders bei Schwermetallen, durch hochmolekulare Komplexbildner bewerkstelligt zu werden. Bei Alkali- und Erdalkalimetallen, die

⁹ P. F. HAHN, W. F. BALE, J. F. ROSS, W. M. BALFOUR und G. H. WHIPPLE, J. exper. Med. 78, 169 (1943).

¹⁰ H.-J. BIELIG und E. BAYER, Naturwissenschaften 42, 125 (1955). – E. BAYER und K. H. HAUSSER, Exper. 11, 254 (1955). – E. BAYER, Angew. Chemie 67, 521 (1955).

¹¹ A. L. SCHADE, R. W. REINHART und H. LEVY, Arch. Biochem. 20, 170 (1949).

¹² H.-J. BIELIG und E. BAYER, Naturwissenschaften 42, 466 (1955).

weniger zur Ausbildung von Komplexen befähigt sind, müssen andere Mechanismen in Betracht gezogen werden. Umfangreiches experimentelles Material über die Ionenaufnahme liegt bei Pflanzen vor. LUNDEGARDH¹³ hat der enge Zusammenhang zwischen Salzspeicherung und Atmung bei Pflanzen zur Anionenatmungstheorie geführt. REICHENBERG und SCUTCLIFFE¹⁴ vergleichen die Ionenanreicherung in Pflanzen mit Reaktionen an Ionenaustauschern, und EPSTEIN und HAGEN¹⁵ deuten die Selektivität der Ionenaufnahme durch primäre Bindung der Ionen an spezifische Träger. Für die spezifische Anreicherung von Schwermetallen können wir nach unseren Befunden beim Ferritin und Hämovanadin EPSTEIN und LEGGET¹⁶ zustimmen, dass «active transport in plant roots entails ion-binding characterized by a degree of selectivity far higher than is the exchange adsorption of ions by roots exchange forces». Bei Untersuchungen des Ionen-transportes und der Ionenanreicherung in Pflanzen werden, in Analogie zu Tieren, als aktive Transportsysteme Komplexbildner in Betracht gezogen werden können. Die Reaktionsweisen, in denen Organismen die Anreicherung von Spurenelementen verwirklichen, gewinnen für die analytische und angewandte Chemie besondere Bedeutung. Denn wenn es gelänge, Verbindungen zu synthetisieren, die, ähnlich wie die komplexbildende Gruppierung des Hämovanadins, Vanadium oder wie das Apoferritin Eisen, Schwermetalle oder Schwermetallgruppen selektiv anzureichern vermögen, würden zum Beispiel der technischen Gewinnung von Metallen aus verdünnten Lösungen neue Impulse gegeben. Es wäre so durchaus denkbar, dass es auf diese Weise einmal gelingen könnte, den grossen, unerschlossenen Kupfervorrat im Meerwasser zu mobilisieren. Bei einem Kupfergehalt von 5 mg je 1 m³ Meerwasser¹⁷ und einem Gesamtwassergehalt der Weltmeere von 1380 km³ stünden 6,5 Milliarden Tonnen Kupfer zur Verfügung, die den Kupferverbrauch auf Jahrhunderte hinaus decken würden. Die marin lebenden Tintenfische (*Octopus spec.*) enthalten Kupfer in ihrem Blut gegenüber dem sie umgebenden Meerwasser auf das Fünffzigtausendfache angereichert¹⁸.

Es hat in der Vergangenheit nicht an ernsthaften Versuchen gefehlt, den Metallgehalt der Meere nutzbar zu machen. So wollte HABER¹⁹ nach dem ersten Weltkrieg das im Meerwasser vorhandene Gold gewinnen. Hierzu hatte er in breit angelegten Versuchen ein Verfahren ausgearbeitet, das auf der Fällung des Goldes als Sulfid beruhte. Um einen filtrierbaren Niederschlag

zu erhalten, wurde Kupfersalz zugesetzt, das nach Zusatz von Alkalipolysulfiden als Kupfersulfid fällt und Goldsulfid schon in geringsten Spuren mitreisst. Von diesen als Fajanssche Fällungsregel, Panethsche Adsorptionsregel und Hahnscher Fällungssatz in die Literatur eingegangenen Erscheinungen macht man insbesondere Gebrauch zur Anreicherung von in Spuren bei radioaktiven Prozessen entstandenen Elementen. Die Haberschen Versuche zur Goldgewinnung scheiterten nicht an den methodischen Voraussetzungen, sondern an den von früheren Autoren berichteten, zu optimistisch geschätzten Goldkonzentrationen im Meerwasser. Mit maximal 0,03 mg Gold je m³ Meerwasser lag der gefundene Metallgehalt um rund zwei Zehnerpotenzen niedriger, als er den Rentabilitätsberechnungen zugrunde gelegt worden war. Die Enttäuschung über das Misslingen spricht HABER¹⁹ selbst aus: «Wir haben es aufgegeben, nach dieser zweifelhaften Stecknadel in einem Heuhaufen zu suchen.» Trotz alledem bleibt die Bewunderung für die erstaunenswert verfeinerten mikroanalytischen Bestimmungsmethoden bestehen.

Neben Fällungsmethoden erscheinen Ionenaustauscher zur Anreicherung von Metallen besonders geeignet, die in der analytischen Chemie bereits zur Trennung von Metallen allgemeine Verwendung gefunden haben. Die handelsüblichen Kationenaustauscher weisen jedoch einen geringen Spezifitätsgrad auf, und trotz immer wieder von neuem in der Literatur auftauchenden Berichten ist meines Wissens noch kein technisch verwertbares Austauscherharz entwickelt worden, das ohne besondere Vorbehandlung zum Beispiel Alkali- oder Erdalkalitionen von Schwermetallionen streng zu trennen vermag. Die Selektivität solcher Ionenaustauscher ist durch Einbau von funktionellen Gruppen, die zur Schwermetallbindung geeignet sind, zu steigern. So hat GREGOR²⁰ am Polytechnic Institute Brooklyn ein SH-Gruppen enthaltendes Polystyrolharz entwickelt, das zur spezifischen Rückgewinnung von Quecksilber, Kupfer, Silber und Gold geeignet sein soll und für eine Gewinnung des Urans aus dem Meerwasser empfohlen wird. GREGOR und Mitarbeiter²¹ haben durch Kondensation von m-Phenylendiglycin mit Formaldehyd ein «Chelat-Ionenaustauscherharz» erhalten, das im batch-Verfahren bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Adsorption von Metallen aufweist. Weitere Eigenschaften dieses interessanten Produktes werden nicht näher beschrieben. Durch Kondensation von Phenolsulfosäure mit Formaldehyd bei Gegenwart von dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, Diacetyldioxim- oder Chromotropsäure werden nach KLJATSCHKO²² Aus-

¹³ Siehe zum Beispiel: H. LUNDEGARDH in: Ann. Rev. Plant Physiol. 6, 1 (1955).

¹⁴ D. REICHENBERG und J. F. SCUTCLIFFE, Nature 174, 1047 (1954).

¹⁵ E. EPSTEIN und C. E. HAGEN, Plant Physiol. 27, 457 (1953).

¹⁶ E. EPSTEIN und J. E. LEGGET, Amer. J. Bot. 41, 785 (1954) (zit. S. 791).

¹⁷ H. WATTENBERG, Z. anorg. Chem. 236, 339 (1938).

¹⁸ E. BAYER, unveröffentlicht.

¹⁹ F. HABER, Angew. Chem. 39, 662 (1926); 40, 303, 1401 (1927).

²⁰ Zit. nach Angew. Chem. 67, Beilage: Nachr. aus Chemie und Technik p. 203 (1955).

²¹ H. P. GREGOR und Mitarb., Ind. Eng. Chem. 44, 2834 (1952).

²² W. A. KLJATSCHKO, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 81, 235 (1951); ref. Chem. Zbl. 1952, 5377.

tauscherharze mit erhöhter Selektivität für Kalzium, Nickel oder Titan gebildet. Zur spezifischen Bindung des Metalls wirken Komplexbildner und aktivierte Sulfogruppen zusammen. Eine spezifische Eisenbindung von Austauschharzen mit Hydroxamsäuregruppierungen wird von CORNAZ und DEUEL²³ berichtet. Diese Autoren haben Karboxylgruppen enthaltende Austauschharze auf Pektinsäure- oder Acrylsäurebasis (Amberlite IRC-50) über die Säurechloride oder Ester zu den entsprechenden Hydroxamsäuren umgesetzt. Nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse lässt sich noch nicht völlig übersehen, ob auf der Grundlage von Ionenaustauscherharzen brauchbare Produkte zur selektiven Anreicherung von Metallen oder Metallgruppen erhalten werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Metallen bzw. Spurenelementen wird in einer *Synthese hochmolekularer Komplexbildner*²⁴ zu suchen sein, die in Analogie zum Ferritin und Hämovanadin nicht auf Ionenaustauscherharzbasis beruhen. Dies wäre die naturgetreueste Nachahmung der hier aufgezeigten, in der Natur vorkommenden Schwermetallanreicherungen. Als Voraussetzung einer allgemeinen Verwertung müssten diese hochmolekularen Komplexbildner schwerlöslich sein, und es sollte die Möglichkeit bestehen, durch einfache Operationen das Metall wieder abzuspalten, ohne die komplexbildenden Gruppierungen zu zerstören. Die Reaktionsweise solcher Substanzen beruht auf einer einfachen komplexen Bindung des Metalls, und der Selektivitätsgrad wird von vornherein durch die Stabilitätskonstanten der monomolekularen Komplexe gegeben sein, da diese ja die gleichen Liganden wie die hochmolekularen Verbindungen aufweisen.

Durch Kondensation von Polyaminophenolen mit Dikarbonylverbindungen konnten nun *hochmolekulare Komplexbildner* erhalten werden²⁵, die eine ungewöhnliche *Spezifität für Schwermetalle*, insbesondere Kupfer, Uran, Kobalt und Nickel aufweisen. Die genannten Metalle werden selbst aus konzentrierten Alkali- und Erdalkalisalzlösungen selektiv gebunden. Auch bei einer gegenüber den anwesenden Schwermetallen zehntausendfach höheren Konzentration von Alkali-, Magnesium-, Barium- oder Zinkionen ist zum Beispiel die Kupferbindung nicht beeinträchtigt. Die Gegenwart der Erdalkalitionen bewirkt sogar, entgegen allen ursprünglichen Erwartungen, eine *Erhöhung der Aufnahmekapazität* für Kupfer um 50–100%. Die Anwesenheit dieser Ionen führt demnach bei diesen hochmolekularen Komplexbildnern nicht zu einer Konkurrenzreaktion um die bindenden Gruppen, wie bei Ionenaustauschern, sondern zu einer zusätzlichen Aktivie-

rung. Weitaus am stärksten wird Kupfer an die Kondensationsprodukte gebunden, und dann folgen, nach der absinkenden Stabilität der komplexen Bindung geordnet: Uran – Nickel – Kobalt – Vanadium. Wegen der grossen Stabilität der Kupferbindung wird, ganz unabhängig davon, welche Schwermetall- oder Leichtmetallionen sonst noch anwesend sind, zunächst immer das Kupfer an den Komplexbildner verankert, ehe die anderen Metalle gebunden werden. Erst wenn alles Kupfer angelagert ist, wird Uran aufgenommen. Selbst aus so stabilen Kupferkomplexen, wie zum Beispiel dem Kupfer-tetramminkomplex, wird das Metall von den hier beschriebenen Kondensationsprodukten gebunden. Die Abspaltung und Wiedergewinnung der Metalle lässt sich durch verdünnte Säuren bewerkstelligen, und je nach der Stabilität der komplexen Bindung werden Säurelösungen von tieferem oder höherem pH benötigt. So wird Uran von einer Mineralsäurelösung vom pH = 2,2 abgespalten, während Kupfer bei dieser Wasserstoffionenkonzentration noch fest gebunden bleibt. Maximal können die von mir als Poly-APG bezeichneten hochmolekularen Komplexbildner bis zu 10% ihres Trockengewichts Kupfer oder Uran anlagern. Diese Aufnahmekapazität wird durch oftmalige Anlagerung und Wiederabspaltung des Metalls nicht beeinträchtigt. All diese genannten Eigenschaften berechtigen zu der Hoffnung, dass Poly-APG für besondere Fragen der Uran- und Kupferchemie Bedeutung gewinnen kann.

Durch eine weitere Ausdehnung des hier angewandten Prinzips zur Synthese hochmolekularer Komplexbildner wird auch Selektivität für andere Metallgruppen zu erreichen sein. Da mono- und hochmolekulare Komplexbildner durch gleiche Bindung das Metall festhalten und somit einen parallelen Gang der Selektivität aufweisen, wie wir bei Poly-APG und den entsprechenden monomolekularen Komplexbildnern nachgewiesen haben²⁵, wird sich aus den Stabilitätskonstanten der monomolekularen Metallkomplexe immer eine Voraussage über die Spezifität der hochmolekularen Kondensationsprodukte treffen lassen, was die Auswahl geeigneter Ausgangsprodukte sehr erleichtert.

Summary

Using as examples hemovanadin, the vanadium-containing blood pigment of the ascidian *Phallusia mamillata*, and ferritin, the protein for iron storage in mammals, pathways for the concentration of vanadium and of iron are described: These have been realized *in vitro* and may occur *in vivo*. The uptake and concentration of heavy metals in nature seems to occur by means of complexing agents.

High molecular weight, insoluble chelating substances which are able to bind metal ions, especially uranium and copper selectively, have been synthesized. Recovery of the metals is possible without destruction of the chelating groups, and, as in the case of ion-exchange resins, repeated cycles can be carried out without diminishing the metal-binding capacity.

²³ J. P. CORNAZ und H. DEUEL, Exper. 10, 137 (1954).

²⁴ Herrn Prof. Dr. R. KUHN, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, möchte ich meinen besonderen Dank für anregende Diskussionen zur Frage der «hochmolekularen Komplexbildner» aussprechen.

²⁵ E. BAYER, erscheint demnächst.