

# Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft

71. Jahrg. Nr. 11. — Abteilung B (Abhandlungen), S. 2233–2434 — 2. November

---

## 367. Eugen Bamann und Marianne Meisenheimer: Katalytische Aufspaltung von Pyro- und Polyphosphaten (IV. Mittel. über „phosphatatische“ Wirkungen von Hydrogelen).

[Aus d. Pharmazent. Abteil. d. Chem. Instituts d. Universität Tübingen.]  
(Eingegangen am 26. September 1938.)

Vor etwas mehr als 10 Jahren wurde auf die enzymatische Spaltung von Pyrophosphatverbindungen zu Orthophosphatverbindungen aufmerksam gemacht<sup>1)</sup>. Diese Wirkung kommt, wie sich in letzter Zeit zeigen ließ<sup>2)</sup>, einem Enzym zu, das unabhängig und verschieden von dem orthophosphorsäureester-spaltenden Enzym ist: Pyrophosphatase und Phosphoesterase können heute in enzymatisch einheitlichem Zustand dargestellt werden. Vor kurzem ist nun eine „Polyphosphatase“, also ein Enzym, das die Aufspaltung von Polyphosphorsäuren in Orthophosphorsäure katalysiert, bekannt geworden. Auch ihm schreiben seine Entdecker<sup>3)</sup> Sondernatur zu. Und ähnlich verhält es sich mit der „Metaphosphatase“. Dieses Enzym — anorganisches Metaphosphat in Orthophosphat umwandelnd — wird ebenfalls verschieden von der Phosphoesterase angenommen.

Während so den Katalysatoren der tierischen und pflanzlichen Zelle jeweils ein beschränkter Wirkungsbereich zugewiesen ist, vermissen wir diese Spezifität bei den phosphatatisch wirksamen anorganischen Katalysatoren: Gewisse Metallhydroxydgele, die wir zunächst bei der Spaltung von Estern<sup>4)</sup> der Phosphorsäure, später bei der Überführung von anorganischem Metaphosphat<sup>5)</sup> in Orthophosphat wirksam fanden, besitzen — wie wir in dieser Abhandlung darlegen — auch noch die Fähigkeit, Pyrophosphorsäure sowie Polyphosphorsäure in Orthophosphorsäure umzuwandeln; somit erstreckt sich die phosphatatische Wirksamkeit dieser Hydrogele gleichzeitig auf die wichtigsten Derivate der Phosphor-

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. J. Wagner, *Biochem. Ztschr.* **171**, 485 [1926]; K. Lohmann, *ebenda* **203**, 172 [1928]; H. D. Kay, *Biochem. Journ.* **22**, 1446 [1928].

<sup>2)</sup> E. Bauer, *Naturwiss.* **23**, 866 [1935]; *Ztschr. physiol. Chem.* **239**, 195 [1936]; E. Bamann u. H. Gall, *Biochem. Ztschr.* **293**, 1 [1937].

<sup>3)</sup> C. Neuberg u. H. A. Fischer, *Enzymologia* II, 191 [1937]; II, 241 u. 360 [1938].

<sup>4)</sup> I. u. II. Mittel. dieser Untersuchungsreihe B. **71**, 1711, 1980 [1938].

<sup>5)</sup> III. Mittel.: B. **71**, 2086 [1938].

säure<sup>6)</sup>. Sie erfüllen also die Funktionen der Phosphoesterase, der Metaphosphatase, der Pyrophosphatase und der Polyphosphatase.

1) Spaltung von Pyrophosphorsäure und Triphosphorsäure.

Eine Übersicht über die Wirksamkeit der bisher geprüften Hydroxyde vermitteln die nachstehenden Tafeln. Danach sind gegenüber Pyrophosphat sehr wirksam die Hydroxyde des Lanthans, des Cers, des Zirkoniums und des Thoriums. Von mittlerer Wirksamkeit sind das Yttriumhydroxyd, das Bleihydroxyd und das Manganoxydhydrat. Zu den weniger wirksamen zählen die Hydroxyde des Magnesiums, des Zinks, des Aluminiums und des Eisens. Für die Aufspaltung der Triphosphorsäure sind sehr geeignet das Lanthanhydroxyd und das Yttriumhydroxyd, noch gute Wirksamkeit zeigen Manganoxydhydrat und Eisenhydroxyd, schwächere die Hydroxyde des Aluminiums und des Zinks.

Tafel 1. Spaltung von Pyrophosphorsäure.

| Katalysator<br>(sowie Ausgangsverbindung)  | pH<br>im<br>Vers.-Ans. | Umwandlung (in Prozenten)<br>nach (Stunden) |     |    |     |    |    |    |    |     |     |     |
|--|------------------------|---|-----|----|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
|  |                        | 1   | 2   | 5  | 19  | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 216 | 240 |
| Lanthanhydroxyd<br>(0.1 g LaCl <sub>3</sub> + 7H <sub>2</sub> O)   | 8.7                    | 8   | 11  | 17 | —   | 48 | 62 | —  | 63 | —   | —   | —   |
| Cerhydroxyd<br>(0.15 g Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 2NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + 4H <sub>2</sub> O) | 8.5                    | 8   | 11  | 17 | —   | 50 | 62 | —  | 65 | —   | —   | —   |
| Yttriumhydroxyd<br>(0.082 g YCl <sub>3</sub> + 6H <sub>2</sub> O)  | 8.7                    | 3.5   | 5.5 | 10 | —   | 47 | 57 | —  | 63 | —   | —   | —   |
| Aluminiumhydroxyd<br>(0.1 g AlCl <sub>3</sub> + 6H <sub>2</sub> O)   | 8.9                    | 0   | 0   | —  | 0.5 | —  | —  | 1  | —  | 1.7 | —   | 2   |
| Magnesiumhydroxyd<br>(0.5 g MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O)   | 8.9                    | 0   | 0   | 1  | —   | 4  | 5  | —  | —  | —   | —   | —   |
| Zinkhydroxyd<br>(0.1 g ZnCl <sub>2</sub> )   | 8.7                    | 0   | 0   | 0  | —   | 1  | 1  | —  | —  | —   | —   | —   |
| Zirkoniumhydroxyd<br>(0.092 g ZrOCl <sub>2</sub> + 9H <sub>2</sub> O)  | 8.9                    | —   | 16  | 22 | —   | 40 | 54 | —  | 69 | —   | —   | 69  |
| Thoriumhydroxyd<br>(0.13 g Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> + 4H <sub>2</sub> O)                                | 8.9                    | 8   | 12  | 19 | —   | 37 | 53 | —  | 55 | —   | —   | —   |
| Bleihydroxyd<br>(0.1 g Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> + 3H <sub>2</sub> O)                                 | 8.9                    | 2   | —   | 6  | —   | 27 | —  | 36 | —  | —   | 36  | —   |
| Manganhydroxyd<br>(0.1 g MnCl <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O)  | 8.7                    | 1   | 1.5 | 3  | —   | 6  | 8  | —  | 9  | —   | —   | 9.5 |
| Eisenhydroxyd<br>(0.1 g FeCl <sub>3</sub> + 6H <sub>2</sub> O)   | 8.2                    | 0.5   | —   | 1  | 2   | —  | —  | 6  | —  | —   | 9   | —   |
| Cobalthydroxyd<br>(0.1 g CoCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O)  | 8.7                    | 0   | —   | 0  | —   | 1  | —  | —  | —  | —   | —   | —   |
| Nickelhydroxyd<br>(0.1 g NiCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O)  | 8.4                    | 0   | —   | 0  | —   | 0  | —  | —  | —  | —   | —   | —   |

Vergleicht man die Geschwindigkeiten, mit denen die verschiedenen Abkömmlinge der Phosphorsäure durch ein und dasselbe Gel gespalten

<sup>6)</sup> Es ist beabsichtigt, noch weitere Substrate, z. B. die der Phosphaminasen und der Sulfatasen, auf ihr Verhalten gegenüber Metallhydroxydgelen zu prüfen.

Tafel 2. Spaltung von Triphosphorsäure.

| Katalysator<br>(sowie<br>Ausgangsverbindung)                        | pH<br>in<br>Vers.-Ans. | Umwandlung (in Prozenten)<br>nach (Stunden) |    |     |    |    |    |     |
|---|------------------------|---|----|-----|----|----|----|-----|
|   |                        | 1   | 3  | 5   | 24 | 48 | 72 | 120 |
| Lanthanhydroxyd<br>(0.1 g $\text{LaCl}_3 + 7\text{H}_2\text{O}$ )   | 8.7                    | 14  | 22 | 27  | 54 | —  | 57 | —   |
| Yttriumhydroxyd<br>(0.082g $\text{YCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ )   | 8.5                    | 15  | 29 | 42  | 62 | —  | 71 | —   |
| Aluminiumhydroxyd<br>(0.1 g $\text{AlCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ ) | 8.9                    | 1   | 2  | 3.5 | 8  | —  | 14 | —   |
| Zinkhydroxyd<br>(0.1 g $\text{ZnCl}_2$ )                            | 8.6                    | 1   | 2  | 3.5 | 8  | —  | 15 | —   |
| Manganhydroxyd<br>(0.1 g $\text{MnCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ )    | 8.7                    | 3.5   | 7  | 10  | 20 | —  | 30 | —   |
| Eisenhydroxyd<br>(0.1 g $\text{FeCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ )     | 8.3                    | —   | —  | 9   | —  | 24 | —  | 31  |

bzw. umgewandelt werden, so ergibt sich im Falle des sehr wirksamen Lanthanhydroxyds folgendes Bild:

Bei einer Wasserstoffionenkonzentration entsprechend  $\text{pH}$  etwa 8.5 bewirkt das Gel aus 0.1 g  $\text{LaCl}_3 + 7\text{H}_2\text{O}$  in 1 Stde. die Umwandlung von:

|              |             |              |                  |
|--------------|-------------|--------------|------------------|
| 14%          | 14%         | 8%           | 4%               |
| Metaphosphat | Triphosphat | Pyrophosphat | Glycerophosphat, |

wenn die einzelnen Substrate in einer Konzentration vorliegen, daß auf den Ansatz von 10 ccm jeweils 26.4 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$  entfallen; das sind: 0.051 g  $(\text{NaPO}_3)_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.059 g  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} + 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.083 g  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + 10\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g glycerin- $\beta$ -phosphorsaures Natrium +  $3\text{H}_2\text{O}$ .

## 2) Vorgetäuschte und wirkliche „Aktivierung“ der Pyrophosphatase.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung erfordern eine kritische Stellungnahme zu den bisherigen Beobachtungen über „Aktivierung“ der tierischen und pflanzlichen Pyrophosphatase durch Metallsalze.

Das Substrat der Pyrophosphatase wird nach unseren Befunden durch eine verhältnismäßig große Anzahl von Hydroxydgelen und verhältnismäßig leicht in Orthophosphat übergeführt. In enzymatischen Versuchen, die in alkalischem Medium durchgeführt und denen Metallsalze zugeführt werden, ist demnach auf eine neben der enzymatischen Katalyse einherlaufende Umwandlung des Pyrophosphats Rücksicht zu nehmen. Es dürfte bisher gelegentlich auch in solchen Fällen von einer „aktivierenden Wirkung“ gesprochen worden sein, in denen die erhöhte Substrat-Umsetzung durch Addition zweier, voneinander unabhängiger Vorgänge, nämlich der enzymatischen Katalyse und der katalytischen Aufspaltung durch Metallhydroxyde, zustande kam. Feststellungen<sup>7)</sup> wie: „Zink aktiviert Bakterienphosphatase, aber nur die Pyrophosphatase“ bestärken uns in unserer Annahme.

Die Warnung macht ein Eingehen auf die Frage notwendig, ob nicht etwa auch der am besten bekannte und interessanteste Fall der Pyrophos-

<sup>7)</sup> C. Oppenheimer, Supplement zu „Die Fermente und ihre Wirkungen“, Verlag Dr. W. Junk, Den Haag 1936, I, S. 150.

phatase-Aktivierung, die Mg-Aktivierung, eine nur vorgetäuschte ist. Das trifft nun nicht zu. Denn wir haben erst vor kurzem gezeigt, daß schon geringe Mengen von Magnesiumsalzen die Wirksamkeit der tierischen Pyrophosphatase um viele Tausende Prozent erhöhen können<sup>8)</sup>. Dem parallel verlaufenden Prozeß der katalytischen Umwandlung des Substrats durch Magnesiumhydroxyd kommt dabei mengenmäßig keinerlei Bedeutung zu. Überdies ist es fraglich, ob in Anwesenheit von  $\text{NH}_4$ -Ionen (Verwendung von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer in den Versuchen mit Pyrophosphatase) überhaupt Magnesiumhydroxyd im Reaktionsmedium vorhanden ist.

### 3) Spaltung von Pyrophosphorsäure-Estern.

Auch die Aufspaltung von Estern der Pyrophosphorsäure in Orthophosphorsäure und Alkohol läßt sich mit Hilfe geeigneter Hydrogele durchführen; in einem orientierenden Versuch haben wir die Spaltung von Diphenylpyrophosphorsäure durch Lanthanhydroxyd verfolgt:

Vers.-Ans. 0.061 g Diphenylpyrophosphorsäure (entspr. 26.4 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), 1 ccm 2.5-n. Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer  $\text{pH} = 8.9$ , 0.1 g  $\text{LaCl}_3 + 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH}$  des Ans. = 8.3.

|                    |    |    |    |     |     |     |
|--------------------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Umsetzung (Stdn.): | 2  | 5  | 8  | 24  | 48  | 120 |
|                    | 1% | 2% | 4% | 10% | 15% | 26% |

Die Umsetzungsgeschwindigkeit ist in Anfangszeiten etwa die gleiche wie bei der Phenylphosphorsäure (I. Mitteil. dieser Untersuchungsreihe).

Ob im Falle der Diphenylpyrophosphorsäure die Esterbindung und die Pyrophosphatbindung gleichzeitig gelöst werden, oder ob bevorzugt eine stufenweise Spaltung erfolgt, können wir nicht entscheiden. Im Gegensatz zu der differenzierteren enzymatischen Spaltung, bei der zwei Katalysatoren, die Phosphoesterase und die Pyrophosphatase, beteiligt sein können, kommt dieser Frage auch keine prinzipielle Bedeutung zu.

### 4) Zur Durchführung der Versuche.

Die Versuchsanordnung wählten wir wie in den vorausgehenden Untersuchungen. Die Ansätze von 10 ccm enthielten 0.083 g  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + 10\text{H}_2\text{O}$  bzw. 0.059 g  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} + 6\text{H}_2\text{O}$ <sup>9)</sup> bzw. 0.061 g Diphenylpyrophosphorsäure (entspr. 26.4 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), 1 ccm 2.5-n. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer,  $\text{pH}$  9.2 bzw. 8.9. Das  $\text{pH}$  der Ansätze betrug 8.9 bis 8.2. Die Versuchstemperatur war 37°. Unter diesen Bedingungen erfolgt keine meßbare Selbst-Umwandlung des Pyro- und Polyphosphats. Sie ist jedoch erheblich im sauren Medium. Daher wird jeweils wie im Falle der Versuche mit Metaphosphat (III. Mitteil.) die während der Farbentwicklung (bei Aufarbeitung der Analysenproben) vor sich gehende Umwandlung in einem Parallelversuch gemessen.

Die William-G. Kerckhoff-Stiftung zu Bad Nauheim hat unsere Untersuchungen durch Gewährung eines Forschungsstipendiums an Frä. Dr. M. Meisenheimer gefördert. Wir sprechen dafür unseren aufrichtigen Dank aus. Ferner danken wir Hrn. A. Carl für die freundliche Mithilfe bei Durchführung der Versuche.

<sup>8)</sup> E. Bamann u. H. Gall, Biochem. Ztschr. **293**, 1 [1937].

<sup>9)</sup> H. Huber, Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **230**, 123 [1936]; Angew. Chem. **50**, 323 [1937].

<sup>10)</sup> Das Präparat von Natriumtripolyphosphat haben uns in liebenswürdiger Weise die Chem. Werke vorm. H. u. E. Albert A.-G., Amöneburg bei Wiesbaden-Biebrich, zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank ausdrücken.