

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN
GESELLSCHAFT

91. Jahrg. Nr. 3

S. 471—690

EUGEN BAMANN und WOLF-DIETRICH MÜTTERLEIN

Auftreten und Ursache zweier p_H -Wirkungsoptima bei der metallionenkatalytischen Spaltung von Phosphorsäureestern¹⁾

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München
(Eingegangen am 6. November 1957)

Herrn Professor Dr. Wolfgang Graßmann zum 60. Geburtstag

Bei der metallionenkatalytischen Spaltung ($Ce^{3\oplus}$, $Ce^{4\oplus}$, $La^{3\oplus}$) von Phosphorsäureestern treten zwei p_H -Wirkungsoptima auf, das erste im schwach alkalischen Gebiet, das zweite bei p_H um 10. Es besteht eine charakteristische Zeitabhängigkeit der beiden Maxima, indem nach kurzer Hydrolysedauer das zweite im stärker alkalischen Gebiet mehr hervortritt, während nach längerer Zeit stets das erste im mehr neutralen Bereich überwiegt. — Ursache für beide Erscheinungen ist das Vorliegen zweier getrennter, wenn auch sehr ähnlicher Reaktionsmechanismen, bei denen entweder das $Me(OH)^{2\oplus}$ oder — in stärker alkalischem Milieu — das $Me(OH)_2^{\oplus}$ als Reaktionspartner zur Bildung des Reaktions-Zwischenproduktes mitwirken. — Für die Erklärung ähnlicher, noch ungeklärter Beobachtungen auf dem Gebiete der enzymatischen Katalyse können die gewonnenen Einblicke von Nutzen sein.

Bei der Hydrolyse aliphatischer Mono-ester der Phosphorsäure mit Hilfe von Salzen seltener Erdmetalle findet sich außer dem bereits bekannten Wirkungsoptimum im schwach alkalischen Milieu²⁾ ein weiteres zweites Maximum bei p_H etwa 10.

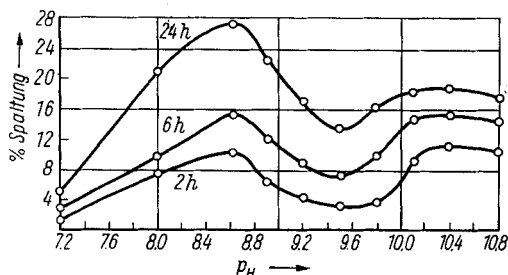
Eine typische Aktivitäts- p_H -Kurve dieser Art ergibt sich bei der Spaltung der Glycerin- β -phosphorsäure; die Kurven anderer untersuchter Ester zeigen einen ganz ähnlichen Verlauf.

Es ist auffallend, daß nach kurzer Hydrolysedauer das zweite Maximum im stärker alkalischen Gebiet etwas mehr hervortritt, während nach längerer Zeit stets das erste

¹⁾ XX. Mittel. der in Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 1711, 1980, 2086, 2233 [1938]; Chem. Ber. 81, 442, 451, 455, 463 [1948]; Biochem. Z. 325, 413 [1953/54], 326, 89, 161, 237 [1954/55]; Chem. Ber. 88, 199 [1955]; Biochem. Z. 326, 507 [1954/55]; Chem. Ber. 88, 1726, 1846 [1955]; Biochem. Z. 328, 12 [1956/57]; Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 289/61, 338, 428 [1956], veröffentlichten Untersuchungsreihe. Vgl. auch: Naturwissenschaften 43, 326 [1956], 44, 232, 328 [1957].

²⁾ E. BAMANN, Angew. Chem. 52, 186 [1939]; E. BAMANN, J. RIEHL und R. NICOLAI, Biochem. Z. 328, 12 [1956/57].

Optimum im mehr neutralen Bereich überwiegt. Für das Auftreten dieser beiden Maxima ist es ohne Belang, ob Cer(III)-, Cer(IV)- oder Lanthan-Salz als Katalysatoren fungieren. Eine Erhöhung oder Verminderung der Metallionen-Konzentration sowie



Abbild. 1
Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung der Glycerin- β -phosphorsäure nach 2, 6 und 24 Stdn.³⁾ Der Vers.-Ansatz von 10 ccm enthält 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Substrat und $2 \cdot 10^{-4}$ Mol $Ce(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$; $t = 37^\circ$; Zugabefolge B

auch der Wechsel in der Zugabefolge der Reaktionsteilnehmer verändern das charakteristische Kurvenbild nicht.

Bei aromatischen Estern scheint sich ein ähnliches Verhalten zu ergeben; vorerst haben wir dies beim Mono-*p*-kresyl-phosphat festgestellt (vgl. Abbild. 3).

Für das Zustandekommen der p_H -Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit ist sowohl die Eigenart des Katalysators als auch jene des Substrates mitbestimmend²⁾. Wie wir in einer folgenden Arbeit nachweisen, wirkt sich indessen die Esterstruktur vornehmlich auf die Lage des ersten p_H -Optimums aus, während die chemischen Eigenschaften der Katalysatoren beim Auftreten beider Maxima zur Geltung kommen.

Die Hydroxyde der seltenen Erdmetalle werden in Gegenwart von wenig Ammoniak in basische Salze übergeführt^{4, 5)}. Bei niedrigem p_H ist das $La(OH)^{2\oplus}$ vorhanden, in einem höheren p_H -Bereich dagegen das $La(OH)_2^\oplus$. Infolgedessen müssen zwei getrennte, wenn auch sehr ähnliche Spaltungsmechanismen vorliegen, bei denen entweder das $La(OH)^{2\oplus}$ oder — in stärker alkalischem Milieu — das $La(OH)_2^\oplus$ als Reaktionspartner zur Bildung des Reaktions-Zwischenproduktes mitwirken.

Die Annahme zweier verschiedener Reaktionsmechanismen erklärt die beobachtete charakteristische Zeitabhängigkeit der beiden Maxima (vgl. Abbild. 1). Anfänglich überwiegt die Spaltung im stärker alkalischen Bereich, bei längerer Reaktionszeit aber ist die Hydrolyse im mehr neutralen Medium beim ersten Optimum am größten: Der Versuchsansatz verarmt an katalytisch wirksamem Lanthan schneller bei höheren p_H -Werten, da zur Verseifung einer Molekel Ester zwei $La(OH)_2^\oplus$ benötigt werden (Gl. 2), die dann als $La(OH)_3 + LaPO_4$ ausfallen. Eine weitere Mitbeteiligung an der Reaktion ist nur in dem Maße möglich, wie — entsprechend dem Massenwirkungsgesetz — aus beiden Verbindungen Lanthanionen in Lösung gehen. Im

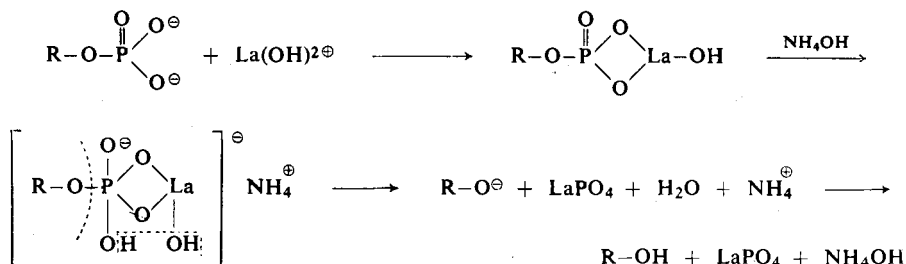
³⁾ Die Festlegung der p_H -Werte erfolgte mittels „Spezialindikator-Papier Merck“. Bestimmungen auf elektrometrischem Wege (p_H -Meter nach L. PUSL) ergeben jeweils niedrigere p_H -Werte, so daß bei Zugrundelegung dieser Meßwerte sich die Kurvenbilder etwas nach dem Neutralen hin verschieben.

⁴⁾ D. KRÜGER und E. TSCHIRCH, Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 2776 [1929].

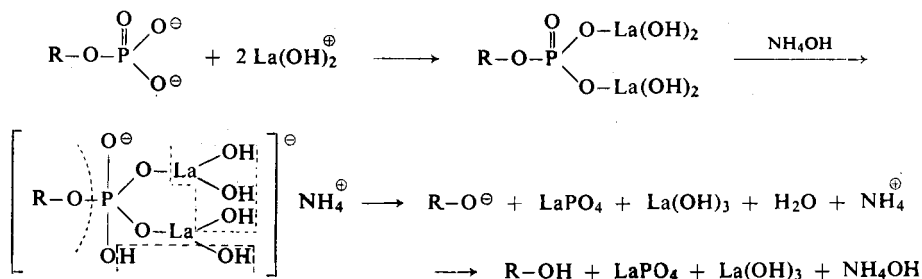
⁵⁾ R. C. VICKERY, Chemistry of the Lanthanons, S. 213, Butterworth Sci. Publ., London 1953.

mehr neutralen Gebiet dagegen wird zur Spaltung *einer* Estermolekel nur *ein* $\text{La}(\text{OH})_2^{2\oplus}$ gebraucht (Gl. 1), welches dann als katalytisch unwirksames LaPO_4 abgeschieden wird.

Spaltungsmechanismus im mehr neutralen Gebiet (1)



Spaltungsmechanismus im stärker alkalischen Gebiet (2)



Hierdurch ist auch eine Erklärung für das Auftreten der beiden Maxima gegeben, die bei der katalytischen Einwirkung von Lanthanionen auf die Guanidin-phosphorsäure beobachtet wurden⁶⁾. Auch bei der Einwirkung von Cer(III)- und Cer(IV)-Salz kommt es dabei zu zwei Hydrolyseoptima; sie sind nur nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der Aktivitäts- p_{H} -Kurve mit Lanthan und haben deshalb zunächst keine Beachtung gefunden. Es ist also bei den *Phosphoamiden* die gleiche Erscheinung vorhanden, und es ist bemerkenswert, daß beide Maxima etwa dieselbe Lage haben wie bei den Monoestern der Phosphorsäure.

Bei der Hydrolyse der Phosphorsäure-monoester *ohne* katalytische Mitwirkung von Metallionen treten ebenfalls zwei Hydrolyseoptima auf, die aber im *sauren* Gebiet liegen^{7,8,9)}; sie werden von W. W. BUTCHER und F. H. WESTHEIMER¹⁰⁾ erklärt: Die relativ starke Hydrolyse bei p_{H} 4 im Gegensatz zum langsameren Verlauf bei p_{H} 1 und p_{H} 8 würde zeigen, daß das Monoanion ROPO_3H^- rascher verseift wird als das Dianion ROPO_3^{2-} (bei etwa p_{H} 8) oder als die nichtionisierte Säure (unter p_{H} 4). In sehr starker Säure (p_{H} -Werte unter p_{H} 0)

6) E. BAMANN, L. FERNANDEZ SANCHEZ und H. TRAPMANN, Chem. Ber. **88**, 1846 [1955].

7) M. C. BAILLY, Bull. Soc. chim. France, Mém. **9**, 314 [1942].

8) A. DESJOBERT, Bull. Soc. chim. France, Mém. **14**, 809 [1947].

9) A. DESJOBERT, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **224**, 575 [1947].

10) J. Amer. chem. Soc. **77**, 2420 [1955].

werden die Ester ebenfalls schnell verseift; die Autoren nehmen an, daß in diesem Bereich zusätzliche Mechanismen in der Hydrolyse dominieren, die durch die Spaltung der (C—O)-Bindung bedingt sein würden. Die Ursache für das Auftreten dieser beiden Maxima liegt also hier — anders als im Falle der metallionenkatalytischen Spaltung — beim *Substrat*.

Die so gewonnenen Einblicke in die Verursachung mehrerer p_H -Wirkungsoptima bei katalytischen Umsetzungen dürften für die Erklärung ähnlicher Erscheinungen auf dem Gebiete der enzymatischen Katalyse, wo man heute noch auf die Wahl unter mehreren in Betracht zu ziehenden Möglichkeiten angewiesen ist, nicht ohne Bedeutung sein.

ERGEBNISSE SPEZIELLERER ART

1. Spaltung der Substrate mit Lanthan und 3-wertigem Cer

Bei allen 10 untersuchten aliphatischen Estern zeigt der Verlauf der Aktivitäts- p_H -Kurven die gleiche Tendenz. Darüber hinaus ergeben sich noch folgende Tatsachen¹¹⁾:

3-wertiges Cer spaltet alle untersuchten aliphatischen Ester besser als Lanthan; die schnellere Hydrolyse durch Cer tritt besonders bei nichtsubstituierten Estern hervor.

Stark ausgeprägte Maxima werden bei denjenigen Estern gefunden, die Hydroxylgruppen in der Alkoholkomponente tragen. Das erste Optimum im mehr neutralen Gebiet ist hinsichtlich seiner Lage besonders abhängig von der chemischen Struktur der Substanz und unterliegt deutlichen Verschiebungen. Auf die Lage des zweiten Maximums wirkt sich bei den bisher geprüften aliphatischen Estern die chemische Struktur weit weniger aus; das Optimum wird um p_H 10 gefunden.

2. Verseifung einiger Ester mittels 4-wertigen Cers

Die beiden Wirkungsmaxima treten auch im Falle der Cer(IV)-Katalyse auf, und zwar bei etwa den gleichen p_H -Werten, wie sie bei den Versuchen mit Cer(III)- und Lanthan-Salz gefunden werden (Abbild. 2 und 3).

Über *Wertigkeit* und *phosphatatische Wirksamkeit* eines Katalysators liegen bereits Beobachtungen vor^{6,12–16)}. Dazu kommen nunmehr Befunde bei einigen weiteren Estern der Phosphorsäure: 3-wertiges Cer hydrolysiert Mono-äthyl-phosphat bei jedem p_H und nach jeder Versuchszeit rascher als das 4-wertige (vgl. Abbild. 2). Mono-*p*-kresyl-phosphat wird dagegen bei allen p_H -Werten und unabhängig von der Hydrolysedauer durch 4-wertiges Cer schneller verseift als durch 3-wertiges Cer oder Lanthan (vgl. Abbild. 3). Die unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit ist besonders ausgeprägt im Bereich von p_H 7.5 bis p_H 8.5. Dieser Befund wird ergänzt durch die Beobachtung eines Mitarbeiters von Herrn Professor Dr. S. AKAMATSU¹⁷⁾ (Chiba, Japan), wonach bei der Spaltung des Mono-phenyl-phosphats das

¹¹⁾ Tabellarische Zusammenstellung der Versuchsergebnisse bei W.-D. MÜTTERLEIN, Dissertat. Univ. München 1957.

¹²⁾ Chem. Ber. **88**, 199 [1955].

¹³⁾ E. BAMANN und H. TRAPMANN, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **289/61**, 338 [1956].

¹⁴⁾ E. BAMANN, A. ROTHER und H. TRAPMANN, Naturwissenschaften **43**, 326 [1956].

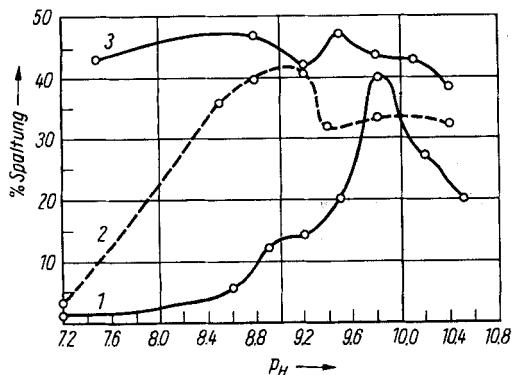
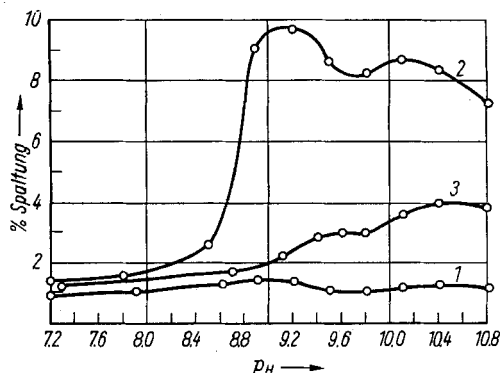
¹⁵⁾ E. BAMANN, H. TRAPMANN und A. ROTHER, Naturwissenschaften **44**, 232 [1957].

¹⁶⁾ E. BAMANN, M. STEBER, H. TRAPMANN und I. BRAUN-KRASNY, Naturwissenschaften **44**, 328 [1957].

¹⁷⁾ Persönl. Mitteil. von Herrn Prof. Dr. S. AKAMATSU.

4-wertige Cer ebenfalls wirksamer als das 3-wertige Cer ist. Nach diesen Erfahrungen läßt sich vermuten, daß *aliphatische* Phosphorsäure-ester durch 3-wertiges, *aromatische* Substrate dagegen durch 4-wertiges Cer schneller hydrolysiert werden.

Abbild. 2
Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung des Mono-äthyl-phosphats mit verschiedenen Katalysatoren³⁾
Der Vers.-Ansatz von 10 ccm enthält 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Substrat und $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Katalysator;
 $t = 37^\circ$; Reaktionszeit: 24 Stdn.;
Zugabefolge B.
1: $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
2: $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
3: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$



Abbild. 3
Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung des Mono-p-kresyl-phosphats mit verschiedenen Katalysatoren³⁾
Der Vers.-Ansatz von 10 ccm enthält 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Substrat und $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Katalysator;
 $t = 37^\circ$; Reaktionszeit: 96 Stdn.;
Zugabefolge B.
1: $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
2: $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
3: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

E. BAMANN und H. TRAPMANN¹²⁾ haben die geringe Hydrolysegeschwindigkeit bei den Versuchen mit 4-wertigem Cer ausschließlich dem während der Reaktion entstehenden 3-wertigen Cer zugeschrieben und dem 4-wertigen Cer die Funktion einer Phosphoesterase abgesprochen. Nach unseren jetzigen Befunden kann an der phosphatatischen Wirksamkeit auch des 4-wertigen Cers kein Zweifel mehr bestehen¹⁸⁾.

3. Einfluß von Katalysatorkonzentration und Zugabefolge

Eine Variierung der Katalysatorkonzentration sowie der Wechsel der Zugabefolge der Reaktionsteilnehmer¹⁹⁾ verändern den grundsätzlichen Kurvenverlauf der Aktivitäts- p_H -Kurven mit den charakteristischen zwei Maxima nicht.

Einen Überblick über die Spaltung der Glycerin- β -phosphorsäure (*mol/50*) bei verschiedener Cerionen-Konzentration vermitteln die in der Tabelle zusammengefaßten Versuchsergebnisse:

¹⁸⁾ Auch die (C-N)-Bindung in gewissen Peptiden¹⁴⁾ wird durch 4-wertiges Cer schneller als durch 3-wertiges Cer gelöst.

¹⁹⁾ E. BAMANN und E. NOWOTNY, Chem. Ber. **81**, 442 [1948].

Spaltung der Glycerin- β -phosphorsäure bei verschiedener Katalysatorkonzentration³⁾

Der Vers.-Ansatz von 10 ccm enthält 4 ccm 2.5 *n* Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Substrat und 10^{-3} bzw. $2 \cdot 10^{-4}$ bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ Mol $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; $t = 37^\circ$; Zugabefolge B. Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in % an.

a) Cer-Konzentration: mol/10; b) Cer-Konzentration: mol/50; c) Cer-Konzentration: mol/250

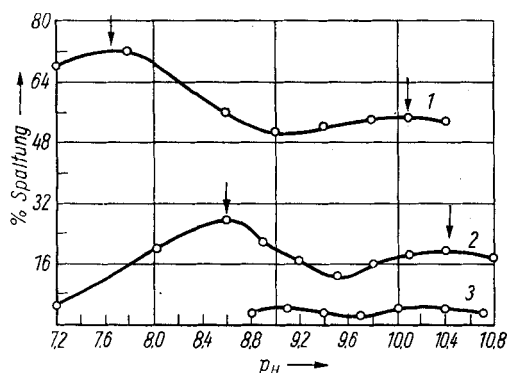
Reakt.-Dauer (Stdn.)		Glycerin- β -phosphorsäure									
	p_{H}	7.2	7.8	8.6	9.0	9.4	9.8	10.1	10.4		
a)	1	9.0	13.2	12.9	12.9	13.8	18.5	19.4	18.5		
	2	16.8	23.0	20.9	20.5	20.9	26.7	27.1	25.2		
	6	35.5	39.6	34.4	34.4	35.3	39.0	39.0	37.5		
	24	68.0	72.0	56.0	51.0	52.0	54.0	54.5	52.5		
	120	81.0	86.5	64.5	57.5	57.5	—	56.0	54.0		
	p_{H}	7.2	8.0	8.6	8.9	9.2	9.5	9.8	10.1	10.4	10.8
b)	2	1.4	7.4	10.0	6.0	4.0	2.8	3.6	8.6	11.2	10.4
	6	2.5	9.6	15.4	12.0	9.2	7.6	9.5	14.5	15.0	14.5
	24	5.0	20.5	27.2	22.5	17.0	13.0	16.0	18.0	18.5	17.3
	p_{H}	8.8	9.1	9.4	9.7	10.0	10.4	10.7			
c)	6	1.5	1.5	1.4	0.8	2.1	1.3	2.0			
	24	3.5	4.0	3.6	2.3	3.8	3.8	2.9			
	120	5.9	6.4	5.0	4.0	4.5	4.1	3.1			

Im einzelnen ist dieser Tabelle zu entnehmen:

Bei allen Meßzeiten (1–120 Stdn.) erhält man stets zwei Maxima.

Nach kürzerer Versuchsdauer ist das zweite, nach längerer das erste Optimum höher.

Mit der Veränderung der Katalysatorkonzentration tritt eine Verschiebung der beiden Maxima ein; sie ist im Falle des ersten Optimums stärker ausgeprägt als beim zweiten. Diese Verschiebung der Hydrolyseoptima zeigt Abbild. 4.



Abbild. 4

Aktivitäts- p_{H} -Kurven bei der Spaltung der Glycerin- β -phosphorsäure mittels 3-wertigen Cers in verschiedenen Mengen³⁾

Der Vers.-Ansatz von 10 ccm enthält 4 ccm 2.5 *n* Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Substrat und 10^{-3} bzw. $2 \cdot 10^{-4}$ bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ Mol $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; $t = 37^\circ$; Reaktionszeit: 24 Stdn.; Zugabefolge B.

- 1: mol/10 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
- 2: mol/50 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
- 3: mol/250 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Für diese Verlagerung der beiden Maxima geben wir folgende Erklärung: Bei einer höheren Konzentration des Cersalzes liegt schon in einem weniger alkalischen Gebiet diejenige Menge an $\text{Ce}(\text{OH})_2^{2\oplus}$ bzw. $\text{Ce}(\text{OH})_3^{\oplus}$ vor, die ausreicht, um mit dem vorhandenen Di-Anion $\text{ROPO}_3^{2\ominus}$ das zerfallende Zwischenprodukt zu bilden, während

bei geringerer Katalysatorkonzentration die erforderliche Anzahl $\text{Ce}(\text{OH})_2^{2\oplus}$ — bzw. $\text{Ce}(\text{OH})_2^{\oplus}$ -Ionen erst in stärker alkalischem Medium vorhanden ist.

Dem wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Herrn Dr. H. TRAPMANN, verdanken wir wertvolle Mithilfe bei der Durchführung und Niederschrift der Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

a) *Substrate*: *Mono-methyl-phosphat* als $\text{BaCH}_3\text{O}_4\text{P}$ (247.3) dargestellt nach J. CAVALIER²⁰, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Mono-äthyl-phosphat* als $\text{BaC}_2\text{H}_5\text{O}_4\text{P}$ (261.4) dargestellt nach CAVALIER²⁰, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Mono-n-propyl-phosphat* als $\text{BaC}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$ (275.4) dargestellt nach K. ASAKAWA²¹, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Mono-isopropyl-phosphat* als $\text{BaC}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$ (275.4) dargestellt nach ASAKAWA²¹, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Äthylenglykol-mono-phosphorsäure* als $\text{BaC}_2\text{H}_5\text{O}_5\text{P}$ (277.4) dargestellt nach F. R. ATHERTON, H. T. OPENSHAW und A. R. TODD²², nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Propylenglykol-mono-phosphorsäure* als $\text{BaC}_3\text{H}_7\text{O}_5\text{P}$ (291.4) dargestellt nach ATHERTON, OPENSHAW und TODD²², nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Glycerin- α -phosphorsäure* als $\text{CaC}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (246.2), E. Merck, Darmstadt, List. Nr. 4111. — *Glycerin- β -phosphorsäure* als $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (306.1), Farbenfabriken Bayer, Leverkusen. — *[2-Chlor-äthyl]-phosphat* als $\text{BaC}_2\text{H}_4\text{ClO}_4\text{P}$ (295.8) dargestellt nach C. MANAKA²³, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *[1.3-Dichlor-propyl-(2)]-phosphorsäure* (β, β' -Dichlor-isopropyl-phosphorsäure) als $\text{BaC}_3\text{H}_5\text{Cl}_2\text{O}_4\text{P}$ (344.3) dargestellt nach MANAKA²³, nach Überführung in das Kaliumsalz. — *Mono-p-kresyl-phosphat* als $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_4\text{P}$ (188.1) dargestellt nach M. RAPP²⁴.

b) *Metallsalze*: $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p. a. Merck (List. Nr. 2271). — $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p. a. Merck (List. Nr. 2274). — $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p. a. Merck (List. Nr. 5326).

c) *Der Versuchsansatz*: Der Versuchsansatz von 10 ccm enthielt 4 ccm 2,5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, Substratlösung und Cer- bzw. Lanthan-Salz in der jeweils angegebenen Konzentration. Die Reaktionsteilnehmer gaben wir in der vorstehenden Reihenfolge zusammen (Zugabefolge B)¹⁹. Der Ansatz wurde in einem Schüttelkolben mit eingeschlifftem Glasstopfen während der Reaktionsdauer in einem Schüttelthermostaten bei 37° gehalten. Die Null-Stoppungen erfolgten stets sofort nach dem Zusammengeben der Reaktionsteilnehmer. Bei Anwendung von frisch destilliertem Wasser konnte der Zusatz eines Konservierungsmittels unterbleiben. Die dem Reaktionsgemisch zu verschiedenen Meßzeiten entnommenen Proben betragen in der Regel 2 ccm, bei fortgeschrittener Spaltung der Substrate 1 bzw. 0.5 bzw. 0.25 ccm.

d) *Bestimmung des anorganischen Phosphats*: Das bei der Spaltung der Substrate entstehende anorganische Phosphat bestimmten wir nach der Methode von C. H. FISKE und Y. SUBBAROW²⁵, modifiziert nach K. LOHMANN und L. JENDRASSIK²⁶ in einem lichtelektrischen Kolorimeter (Modell VI) nach B. LANGE. Die Proben wurden 20 Min. bei 37° und anschließend 10 Min. bei 20° entwickelt. Entstehende Trübungen bei Zugabe der Molybdän-schwefelsäure trennten wir nach der Entwicklung — also vor der kolorimetrischen Bestimmung — durch Zentrifugieren ab.

²⁰) Bull. Soc. chim. France **19**, 883 [1898]. ²¹) J. Biochemistry [Tokyo] **11**, 143 [1929].

²²) J. chem. Soc. [London] **1945**, 382. ²³) J. Biochemistry [Tokyo] **14**, 191 [1931].

²⁴) Liebigs Ann. Chem. **224**, 156 [1884]. ²⁵) J. biol. Chemistry **66**, 375 [1925].

²⁶) Biochem. Z. **178**, 419 [1926].