

Zusammenfassung.

Das durch Bromierung von Cyclodecanon mit 1 Mol N-Bromsuccinimid erhaltene α -Brom-cyclodecanon gab bei der Behandlung mit Natriummethylat in guter Ausbeute die bisher unbekannte Cyclononan-carbonsäure (II).

Das Bromierungsprodukt, welches aus Cyclodecanon mit 2 Mol N-Bromsuccinimid entstand, lieferte durch Erhitzen mit Dimethylanilin ein Gemisch von trans-Dekalon-(1) (III) und $\Delta^{9,10}$ -Oktalon-(1) (VI).

Aus dem Bromierungsprodukt des Cyclononanons mit 2 Mol N-Bromsuccinimid erhielt man bei der analogen Behandlung mit Dimethylanilin das $\Delta^{8,9}$ -Hydrindenon-(4).

Der Mechanismus der ungewöhnlichen transanularen Cyclisierungsreaktion wird diskutiert.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

114. Eine spektrophotometrische Bestimmungsmethode für saure und alkalische Phosphatasen

von Hans Brandenberger¹⁾ und Roberta Hanson.

(27. III. 53.)

Da es sich bei den Phosphomonoesterasen I bis IV²⁾ um relativ unspezifische Fermente handelt, kann eine grosse Zahl von Phosphatestern als Substrate für den Enzymtest herangezogen werden. Die klassischen Bestimmungsverfahren beruhen auf Überführung eines der Hydrolysenprodukte, entweder des abgespaltenen Phosphates oder dann der freigesetzten Alkoholkomponente, in einen Farbstoff³⁾, dessen Konzentration kolorimetrisch gemessen wird. Dieses jedoch umständliche und zeitraubende Vorgehen birgt ausserdem noch infolge seiner Kompliziertheit viele Fehlerquellen. Das ist um so schwerwiegender, als die heute klinisch so wichtigen Phosphatase-Bestim-

¹⁾ Jetzige Adresse: Department of Physiological Chemistry, University of Pennsylvania, Medical School, Philadelphia, Pa., U.S.A.

²⁾ J. Roche, The Enzymes I, Part 1, p. 473 (1950).

³⁾ Siehe besonders: P. A. Levene & R. T. Dillon, J. Biol. Chem. **88**, 753 (1930); H. D. Kay, J. Biol. Chem. **89**, 233 (1930); A. Bodansky, J. Biol. Chem. **101**, 93 (1933); E. J. King & A. R. Armstrong, Canad. Med. Assn. J. **31**, 376 (1934); E. Gutmann & A. B. Gutmann, J. Biol. Chem. **136**, 201 (1940); A. M. Seligmann und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. **190**, 7 (1951).

mungen in Spitälern oft von chemisch nicht speziell geschultem Personal ausgeführt werden.

In neuerer Zeit sind daher Bestimmungsverfahren ausgearbeitet worden, die mit Verbindungen arbeiten, die als Phosphatester zwar farblos, in hydrolysiert Form hingegen farbig erscheinen oder fluoreszieren¹⁾, was die Bestimmung der Enzymwirkung sehr vereinfacht. Die Farbintensität der in Frage stehenden Verbindungen ist jedoch meist pH-abhängig und der Farbton oft unbeständig, so dass deren Standardisierung und Stabilisierung der colorimetrischen Bestimmung voranzugehen hat²⁾. Dies verunmöglicht aber eine kontinuierliche Messung der Enzymwirkung der Spaltungsreaktion. Auch handelt es sich bei den chromogenen Substraten meist um komplizierter gebaute Molekeln (mit Ausnahme von p-Nitrophenylphosphat), welche durch die Phosphatasen oft nicht mit der gewünschten Geschwindigkeit gespalten werden, zum Teil auch nicht in sehr reiner Form erhältlich sind³⁾, was lange Reaktionszeiten und die hohen Blindwerte der Enzymteste bedingt.

Unser spektrophotometrisches Verfahren vermeidet die erwähnten Unannehmlichkeiten; es ist sehr einfach, genau und empfindlich und erlaubt kontinuierliche Ablesungen.

Die Tatsache, dass Salicylsäure eine starke Absorptionsbande mit Maximum zwischen 295 und 300 m μ aufweist, die von ihren Fettsäureestern nicht gegeben wird, wurde von *L. J. Edwards* benutzt, um die nichtenzymatische Hydrolyse von Aspirin zu studieren⁴⁾, und *Hofstee* hat die enzymatische Hydrolyse der erwähnten Fettsäureester (spektrophotometrisch verfolgt) zur Bestimmung der Esterase-Aktivität⁵⁾ und für kinetische Studien⁶⁾ ausgewertet.

Wir haben nun festgestellt, dass die Lichtabsorption des Phosphorsäureesters der o-Oxy-benzoesäure zwischen 295 und 300 m μ ebenfalls sehr gering wird (Figuren I und II). Da der Ester sowohl von den sauren wie auch von den alkalischen Phosphomonoesterasen schnell hydrolysiert wird, eignet er sich als Substrat für eine spektrophotometrische Verfolgung der Enzymreaktion. Die Extinktionshöhe der entstehenden o-Oxy-benzoesäure ist in dem für Phosphatase-Bestimmungen wichtigen pH-Intervall von 4 bis 9,5 nahezu konstant⁴⁾, diejenige des Esters fast identisch gering (Figur II), so dass

¹⁾ Siehe besonders: *Y. Omori*, *Enzymologia* **4**, 217 (1937); *O. A. Bessey* und Mitarbeiter, *J. Biol. Chem.* **164**, 321 (1946); *C. Huggins & P. Talalay*, *J. Biol. Chem.* **159**, 399 (1945); *H. Neumann*, *Exper.* **4**, 74 (1951).

²⁾ Siehe neben den unter ⁴⁾ angegebenen Zitaten auch: *J. Monche*, *Rev. espan. fisiol.* **7**, 229 (1951); *K. Linhardt & K. Walter*, *Z. physiol. Ch.* **289**, 245 (1952).

³⁾ *O. A. Bessey & R. H. Love*, *J. Biol. Chem.* **196**, 175 (1952).

⁴⁾ *L. J. Edwards*, *Trans. Faraday Soc.* **46**, 723 (1950).

⁵⁾ *B. H. J. Hofstee*, *Science* **114**, 128 (1951).

⁶⁾ *B. H. J. Hofstee*, *J. Biol. Chem.* **199**, 357 und 365 (1952).

mit sauren und alkalischen Phosphatasen in gleicher Weise, lediglich unter Verwendung verschiedener Pufferlösungen, gearbeitet werden kann, und die Resultate sich direkt und ohne jede Korrektur miteinander vergleichen lassen. Zwei weitere Vorteile unseres Verfahrens beruhen auf der grossen Wasserlöslichkeit des Substrates sowie auf der Tatsache, dass dessen nichtenzymatische Hydrolyse in wässriger Lösung äusserst langsam erfolgt. Letzteres bedingt, zusammen mit der Reinheit der Substanz, verschwindende Vergleichswerte, die zudem bei geeigneter Arbeitsweise automatisch subtrahiert werden.

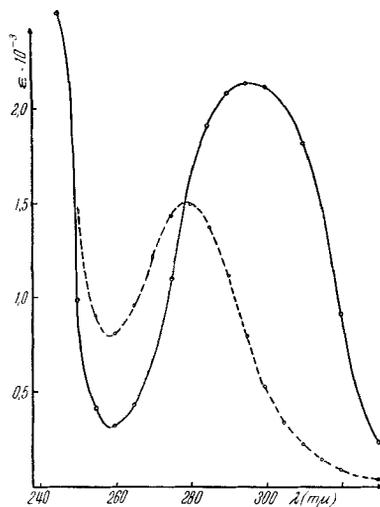


Fig. 1.

- Salicylsäure in Wasser,
 $5 \cdot 10^{-4}$ -m., pH = 3,50.
 ---○--- o-Carboxy-phenyl-phosphat in
 Wasser, $5 \cdot 10^{-4}$ -m., pH = 3,45.

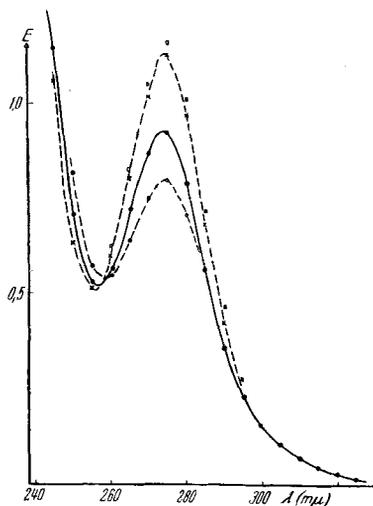


Fig. 2.

- o-Carboxyphenyl-phosphat
 $8,3 \cdot 10^{-4}$ -m. in Pufferlösungen:
 ○ Acetat pH = 4,25
 ● Phosphat pH = 6,40
 × Phosphat pH = 7,85
 □ Glycin pH = 9,25

Der o-Carboxy-phenylester der Phosphorsäure wurde zum erstenmal von Couper¹⁾, später wiederholt von Anschütz²⁾ erwähnt. Durch Vermengen von Salicylsäure mit Phosphorpentachlorid in geringem Überschuss erhielten die genannten Autoren ein destillierbares Trichlorid³⁾, welches bei sehr vorsichtiger Hydrolyse den Phosphorsäureester lieferte. Ihre Schmelzpunktangaben schwanken zwischen 140⁰ und 145⁰. Wir fanden, dass das Reaktionsprodukt durch Umkristallisation aus Dioxan oder aus Dioxan-Benzol-Gemisch leicht ganz rein

¹⁾ A. S. Couper, C. r. **46**, 1107 (1858); A. **109**, 369 (1859).

²⁾ R. Anschütz, A. **228**, 308 (1885); R. Anschütz & W. O. Emery, A. **239**, 301 (1887).

³⁾ Siehe auch R. Anschütz & W. O. Emery, A. **253**, 105 (1889).

mit dem Smp. 153–154° erhalten werden kann. Die Absorptionskurve des Rohproduktes zeigt um 300 m μ noch eine Inflexion, welche durch zweimaliges Umkristallisieren völlig eliminiert wird.

o-Carboxy-phenyl-phosphat wurde 1950 von *Walker & King*¹⁾ erneut erwähnt. Diese Autoren setzten Salicylsäureester in Pyridin mit Phosphoroxchlorid um und hydrolysierten das als Bariumsalz isolierte Zwischenprodukt, Di-o-carbomethoxyphenylpyrophosphat, mit Natronlauge zum Orthophosphat mit freier Carboxylgruppe, welches aber wiederum nur als Bariumsalz gefasst wurde. Die alten Arbeiten von *Couper* und *Anschütz* sind in dieser Publikation nicht erwähnt, und da *Walker & King* ihre Verbindung lediglich durch Barium- und Phosphor-Analysen und eine leider nicht charakteristische Dissoziationskurve beschreiben, wissen wir noch nicht mit Sicherheit, ob sie mit der über das Trichlorid erhaltenen Substanz identisch ist. *Walker & King* haben ihre Substanz als Phosphatase-Substrat getestet und als nicht sehr geeignet gefunden. Wir werden noch untersuchen, ob dieser Umstand dadurch bedingt ist, dass unser spektrophotometrisches Verfahren viel empfindlicher ist als die von den englischen Autoren verwendete colorimetrische Bestimmung des abgespaltenen Phosphates, ob er sich dadurch erklären lässt, dass wir nicht mit der gleichen Phosphatase wie *Walker & King* (einem Präparat aus Kot) gearbeitet haben, oder ob unsere Substrate verschieden sind.

Zur Durchführung des enzymatischen Testes werden Puffer-, Enzym- und Substrat-Lösung in eine *Beckman*-Absorptionszelle gegeben und die Extinktion bei 298 m μ in bestimmten Zeitintervallen gegen eine Vergleichszelle gemessen, welche das gleiche Gemisch, aber ohne Enzym oder mit inaktiviertem Enzym, enthält. Die Erhöhung der Extinktion pro Zeiteinheit gibt ein direktes relatives Mass für die Enzymaktivität. Dessen Umrechnung in Mengen an gespaltenem Substrat ergibt sich leicht aus den Extinktionskurven. Eine Extinktionserhöhung von 1,600 entspricht $1 \cdot 10^{-3}$ Mol an gespaltenem Substrat pro l, und, wenn man wie wir mit einem Gesamtvolumen von 3 ml arbeitet, $3 \cdot 10^{-6}$ Mol pro Ansatz.

Das Verfahren eignet sich nur für klare Lösungen. Enthält die Fermentquelle eine grössere Konzentration von Substanzen, welche in dem in Frage stehenden Spektralbereich absorbieren, so sind diese zuerst zu entfernen. Falls dies durch Dialyse möglich ist, so ist dies meist auf einfachem Wege durch Einlegen der Dialysierhülle über Nacht in fliessendes Wasser zu erreichen. In vielen Fällen, wie zum Beispiel bei Verwendung von Urin als Enzymquelle, ist eine solche Dialyse aus andern Gründen sowieso empfehlenswert²⁾, so dass dadurch keine zusätzliche Arbeit resultiert. Hohe Proteinkonzentration wirkt störend, da deren bei 300 m μ noch beträchtliche Absorption nur beschränkte Enzymdosen zu verwenden erlaubt, wodurch die Inkubationszeit sehr verlängert werden kann. So ist zum Beispiel unsere Methode für die direkte Bestimmung der sauren und alkalischen Phosphatasen im Blutplasma aus diesem Grunde nicht geeignet. Wir arbeiten gegenwärtig an einer Modifikation des Verfahrens, um es

¹⁾ P. G. Walker & E. J. King, *Biochem. J.* **47**, 93 (1950).

²⁾ G. E. Dolory & M. Hetherington, *Can. J. Med. Sci.* **30**, 1 (1952).

auch für diesen heute wohl am häufigsten ausgeführten Enzymtest verwendungsfähig zu machen.

Im experimentellen Teil beschreiben wir Messungen mit einem käuflich erhältlichen Phosphatase-Präparat sowie mit menschlichem Urin. Unsere Angaben sind lediglich als typische Anwendungsbeispiele gedacht; Vorversuche mit anderen Enzymquellen sind ebenfalls positiv ausgefallen.

Die saure Phosphatase des männlichen sowie auch die bedeutend schwächere des weiblichen Urins¹⁾ lässt sich durch den Zusatz von Fluoridionen vollständig inaktivieren. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Ohlmeyer*²⁾ vermochten wir die Fermentwirkung durch Magnesiumionen nicht zu beschleunigen. Das erfasste Enzym ist demnach eine Phosphomonoesterase II. Es besitzt ein pH-Optimum in der Gegend von 4,5, welches allerdings nicht scharf ausgeprägt ist (siehe exper. Teil).

Experimenteller Teil.

1. Darstellung der o-Carboxyphenyl-phosphorsäure. 7,0 g Salicylsäure (0,05 Mol) wurden mit 14,5 g Phosphorpentachlorid (0,07 Mol) vermengt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Beendigung der Umsetzung bei 12 mm Druck destilliert. Den zwischen 168 und 188° übergehenden Anteil lösten wir in der 5- bis 10-fachen Menge wassergesättigtem Benzol und liessen bei Zimmertemperatur stehen. Meist dauerte es mehrere Tage bis zum Beginn der Abscheidung einer weissen Substanz, welche zwischen 140 und 145° sintert und schmilzt. Wiederholtes Umkristallisieren aus Dioxan oder aus Dioxan-Benzol lieferte die o-Carboxyphenyl-phosphorsäure in farblosen, langen Prismen vom Smp. 153—154° (unkorrigiert, Kupferblock), Ausbeute: 37—42% der verwendeten Salicylsäure.

$C_7H_7O_6P$	Ber. C 38,53	H 3,21	P 14,23%
(218,07)	Gef. „ 38,49	„ 3,49	„ 14,03%

Absorptionsspektrum in Wasser: Min. bei 258 $m\mu$; $\epsilon = 0,780 \cdot 10^{-3}$; Max. bei 279 $m\mu$; $\epsilon = 1,500 \cdot 10^{-3}$.

2. Enzympräparate. a) Alkalische Phosphatase von „Bios“-Laboratories, New York, N.Y.: 10 mg des Präparates wurden in 100 ml 0,15-m. Natriumchlorid-Lösung aufgeschlämmt und 10 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Die filtrierte Lösung wurde direkt für den Enzymtest verwendet.

b) Saure Phosphatase des menschlichen Urins: Frischer Urin wurde über Nacht gegen fliessendes Leitungswasser von 4 bis 6° dialysiert; anschliessend wurde die Hülle für einige Std. im Eisschrank in destilliertes Wasser eingelegt. Der grösste Teil der um 300 $m\mu$ stark absorbierenden Harnsäure wird auf diesem Wege entfernt. Länger dialysierter Urin ergab die gleichen Resultate.

¹⁾ Siehe besonders die folgenden Abhandlungen, wo sich auch die weiteren Literaturzitate finden: *F. Demuth*, Bioch. Z. **159**, 420 (1925); *W. Kutscher*, Z. physiol. Ch. **235**, 62 (1935); *E. Waldschmidt-Leitz & W. Nonnebusch*, Naturw. **23**, 164 (1935); *A. Dmochowski & D. Assentrajm*, Naturw. **23**, 501 (1935); *W. Kutscher & H. Wolfberg*, Naturw. **23**, 558 (1935); *H. Wolfberg*, Z. physiol. Ch. **238**, 23 (1936); *M. D. Altschule* und Mitarbeiter, Am. J. Clin. Path. **21**, 480 (1951).

²⁾ *P. Ohlmeyer*, Z. physiol. Ch. **282**, 1 (1945).

3. Spektren. Die Messung der Lichtabsorption geschah mit einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, mit konstantem Temperatureinsatz. Die Spektren des *o*-Carboxyphenyl-phosphates wurden bei 5° aufgenommen. so dass auch in nicht neutralem pH-Gebiet keine Hydrolyse erfolgen konnte.

4. Spektrophotometrische Enzymbestimmungen. Die Enzymreaktionen wurden durch kontinuierliche Messung der Extinktionserhöhung bei 298 $m\mu$ im oben erwähnten Spektrophotometer bei 37° verfolgt. Puffer und Enzymlösung wurden, evtl. mit der zu testenden hemmenden oder aktivierenden Substanz, in die *Beckman*-Zellen gegeben und 15 Min. bei 37° austemperiert. Die Vergleichszelle enthält an Stelle der Enzymlösung Wasser (für Urin), 0,15-m. Kochsalzlösung (an Stelle der Bios-Phosphatase), oder durch Kochen denaturiertes oder durch grosse Inhibitor-Gaben inaktiviertes Ferment. Man leitet die Reaktion durch Zusatz der kurz vorher auf gleiche Temperatur gebrachten Substratlösung und kurzes Mischen ein. Da das Substrat auch der Vergleichszelle zugesetzt wird, ist die nichtenzymatische Hydrolyse automatisch aus den Messresultaten eliminiert. Die Extinktion bei 298 $m\mu$ wird in bestimmten Zeitintervallen abgelesen. Bei Verwendung von genügend starken Fermentpräparaten ergeben schon wenige Minuten ein genaues Mass der Enzymaktivität in Form der Extinktionserhöhung pro Min.

Wir arbeiteten mit einem Totalvolumen von 3,0 ml, die Konzentration des Substrates in der *Beckman*-Zelle war $5 \cdot 10^{-4}$ -m., die Ionenstärke der Lösung lag meist um 0,15.

Anschliessend beschreiben wir als Anwendungsbeispiele einige Enzymteste, wobei wir, um die Genauigkeit der Methode zu illustrieren, im ersten Falle die gesamte Messreihe wiedergeben.

5. Enzymansatz mit Bios-Phosphatase (Temperatur 37°).

Vergleichszelle	Zelle 1	Zelle 2
1. 1 ml 0,15-m. Kochsalzlösung	1 ml Bios-Phosphatase-Lösung	1 ml Steapsin (Lipase, z. Vgl.)
2. 1 ml Boratpuffer 0,30-m., pH = 8,5 nach Verdünnung		
3. 1 ml wässrige Substratlösung, $1,5 \cdot 10^{-3}$ -m.		

Extinktion bei 298 $m\mu$	0' (extrapol.)	1'	2'	3'	4'	5'	10'	$\Delta E/\text{Min.}$ (für 1,0 ml Fermentlösung)
Zelle 1	0,075	0,125	0,175	0,220	0,270	0,320	0,560	0,048
Zelle 2	0,055	0,055	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,000

6. Saure Phosphatase des Urins (Temperatur 37°). a) Ansatz mit männlichem Urin, ohne und mit Zusatz von Magnesium- und Fluorid-Ionen:

Vergleichszelle	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3
1. 0,5 ml Wasser	0,5 ml Urin	0,5 ml Urin	0,5 ml Urin
2. 1,0 ml Acetatpuffer 0,3-m., pH = 4,5 nach Verdünnung			
3. 1,0 ml wässrige Substratlösung, $1,5 \cdot 10^{-3}$ -m.			
4. 0,5 ml Wasser	0,5 ml Wasser	0,5 ml 0,30-m. MgCl_2	0,5 ml 0,30-m. NaF
$\Delta E/\text{Min.}$ (für 0,5 ml Urin)	0,089	0,087	0,000

b) Saure Phosphatase des männlichen Urins bei verschiedenem pH: Ansätze wie oben ergeben mit 0,5 ml Urin bei:

pH	4,2	4,4	4,6	5,0	5,4	5,8
$\Delta E/\text{Min.}$	0,080	0,085	0,085	0,082	0,070	0,068

c) Saure Phosphatase des weiblichen Urins: Ansatz wie oben ergibt mit 0,5 ml Urin bei pH 5 ein $\Delta E/\text{Min.}$ von 0,010 und 0,013 (zwei verschiedene Fraktionen von der gleichen Person; Reihenmessungen liegen keine vor). Fluoridzusatz inaktiviert vollständig!

SUMMARY.

A rapid and very sensitive spectrophotometric method for the determination of the acid and alkaline phosphatases is given, using o-carboxyphenyl-phosphate as a substrate. This compound has been purified and characterized by its melting point and absorption spectra in aqueous solutions of different pH. Hydrolysis of the ester can be followed continuously by measuring the increase of extinction at 298 m μ .

Some data are given for acid phosphatase in urine.

Einer der Verfasser (*H. B.*) dankt der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* für ein Stipendium, welches ihm die Durchführung dieser und zwei weiterer Arbeiten in USA. gestattet hat. Sein Dank gilt auch der Universität Wisconsin für die ihm erwiesene Gastfreundschaft sowie Herrn Prof. *P. P. Cohen* und den übrigen Mitgliedern des Departements für Physiologische Chemie für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse. Einige wenige Messungen wurden im University Laboratory of Physical Chemistry, Harvard University, und im Department of Physiological Chemistry, Pennsylvania University, ausgeführt.

Department of Physiological Chemistry, Medical School,
The University of Wisconsin, Madison, Wis., U.S.A.

115. Zur Synthese von radioaktivem Progesteron

von Marcel Gut.

(12. V. 53.)

Für biologische Versuche benötigten wir in grösserer Menge radioaktives Progesteron, dessen radioaktives Kohlenstoffatom Glied eines Ringes sein sollte. 3- und 4-¹⁴C-Progesteron sind bereits von *Heard* und Mitarbeiter¹⁾ beschrieben worden, wobei die Radioaktivität in die Ätiocholensäure eingeführt und dann die Seitenkette auf bekanntem Weg aufgebaut wurde. In dieser Methode wurden

¹⁾ *R. D. Heard & P. Ziegler*, Am. Soc. **72**, 4328 (1950).