

## Über die Verwendung von o-Carboxyphenylphosphat zum Nachweis saurer Phosphatase im Sperma\*

GOTTFRIED WALTHER

Institut für gerichtliche Medizin (Direktor: Prof. Dr. med. H. LEITHOFF)  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Eingegangen am 20. Januar 1969

Im menschlichen Sperma ist saure Monophosphatesterase in hoher Aktivität vorhanden und qualitativ sowie quantitativ leicht nachzuweisen (GUTMAN u. GUTMAN, HUGGINS, KUTSCHER). Zunächst glaubte man, mit der Bestimmung dieses Fermentes eine spezifische Nachweismethode für Spermaspuren gefunden zu haben. Von WEYRICH, LEITHOFF und KUZIAS, HAUCK u. LEITHOFF, PROKOP u. a. wurde jedoch auch in anderen biologischen Medien saure Phosphatase z. T. in hoher Aktivität nachgewiesen. Somit ist der Fermentnachweis allein nicht geeignet, einen Spermafleck mit einer für das Gericht erforderlichen Sicherheit zu identifizieren. Neben anderen morphologischen, immunologischen und chemischen Methoden vermittelt die quantitative Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase jedoch für den gerichtsmedizinischen Nachweis von Spermaspuren eine diagnostische Information.

Für die quantitative Bestimmung dieses Fermentes ist eine größere Anzahl von Methoden bekannt. In einigen wird Phenylphosphat (Phph) als Substrat verwandt, wobei das freigesetzte Phenol ein Maß der Hydrolyse darstellt. Nach ERDMANN-MÜLLER z. B. wird das Phenol mit Folinischem Reagens quantitativ bestimmt. Diese Bestimmung ist äußerst störanfällig, da Zeit und Temperatur der Farbentwicklung streng eingehalten werden müssen. Ein weiterer Nachteil ist, daß Verdünnungsreihen des Spermas — oft bis zu 1:100000 — herzustellen sind, da durch die hohe Fermentaktivität das Substrat nach kurzer Zeit hydrolysiert ist. Eine Erhöhung der Substratkonzentration ist hier wegen der Überschußhemmung nicht möglich.

o-Carboxyphenylphosphat (o-C) wurde von ANSCHÜTZ synthetisiert und von BRANDENBERGER et al. und HOFSTEE zur quantitativen Aktivitätsbestimmung von Phosphatasen eingesetzt. Auch ALBERS et al. und MEISENZAHN benutzten für kinetische Studien an der gereinigten sauren Phosphatase aus der Prostata dieses Substrat.

\* Herrn Professor Dr. Dr. E. WEINIG zum 65. Geburtstag gewidmet.

Im folgenden soll über die Verwendung von o-C zur quantitativen Bestimmung der sauren Spermaphosphatase berichtet werden.

Bei der hydrolytischen Spaltung dieses Substrates entsteht Salicylsäure (Abb. 1).

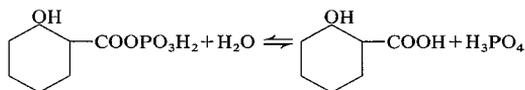


Abb. 1. Hydrolytische Spaltung des o-Carboxyphenylphosphats zur Bestimmung der sauren Phosphatase. Die entstehende Salizylsäure dient als Meßgröße

### Material und Methode

Für die Untersuchung wurde, der Praxis angepaßt, ungereinigte saure Phosphatase in Form des Samenplasmas in einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:100 benutzt. Die Enzymbestimmungen mit o-C erfolgten in 0,1 M Essigsäure/Natriumacetatpuffer und mit Phph in 0,1 M Citronensäure/Natronlaugepuffer nach SÖRENSEN. Alle Messungen wurden mit 0,1 ml Probelösung in Gang gesetzt. Die Bestimmungen erfolgten in Quarzcuvetten von 1 cm Schichtdicke bei 25°C mit dem Spektralphotometer PM Q II der Firma Zeiss, Oberkochen. Zur Aufzeichnung diente der Schreiber „Servogor“ der Firma Metrawatt, Nürnberg.

Im einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Prüfung der Stabilität der Substrate,
2. Bestimmung der Absorptionsmaxima der Substrate und Spaltprodukte,
3. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten,
4. Bestimmung der Substratoptima beider Substrate und Bestimmung des pH-Optimums für o-C,
5. Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms nach Verdünnung des Samenplasmas.

### Ergebnisse

#### 1. Untersuchungen zur Stabilität von o-C und Phph

Das o-C zeigte in 0,1 M Acetatpuffer bei pH 4,8 und in wäßriger Lösung bei 25°C sowie einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M eine spontane Hydrolyserate von 0,2—1,0  $\mu\text{M}/\text{min}$ . Phph läßt in 0,1 M Citronensäure/Natronlaugepuffer bei pH 4,9 keine Extinktionsänderung erkennen.

#### 2. Bestimmung der Absorptionsmaxima

Die Messungen erfolgten für Phenol und Phph in dem zugehörigen Puffer bei pH 4,9 und für Salicylsäure und o-C in dem entsprechenden Puffer bei pH 4,8. Es ergaben sich folgende Maxima (Abb. 2):

Phenol:	272 nm,	Salicylsäure:	298 nm,
Phph:	263 nm,	o-C:	276 nm.

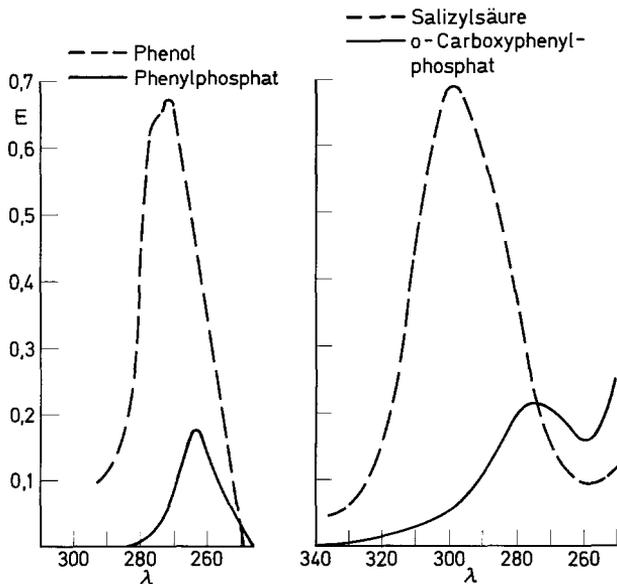


Abb. 2. Absorptionsverhalten von Phenol, Phenylphosphat, Salizylsäure und o-Carboxyphenylphosphat in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Messungen erfolgten hinsichtlich Pufferart und pH unter den Bedingungen der jeweiligen Hydrolyse. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: Phenol und Phenylphosphat:  $5 \cdot 10^{-4}$  M; Salizylsäure und o-Carboxyphenylphosphat:  $2 \cdot 10^{-4}$  M

### 3. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten

Von den Substraten und zugehörigen Spaltprodukten wurden je 5 Lösungen angesetzt und je 5mal gemessen. Die Messungen erfolgten in den jeweiligen Puffern. Für o-C und Salizylsäure betrug die Wasserstoffionenkonzentration pH 4,8 und für Phph und Phenol pH 4,9. Aufgrund der Instabilität des o-C muß diese Lösung sofort nach der Herstellung gemessen werden. Es ergaben sich folgende Werte:

$$\begin{aligned} \epsilon_{298}(\text{o-C}): & \quad 0,239 \cdot 10^3, & \epsilon_{272}(\text{Phph}): & \quad 0,111 \cdot 10^3, \\ \epsilon_{298}(\text{Salizylsäure}): & \quad 3,496 \cdot 10^3, & \epsilon_{272}(\text{Phenol}): & \quad 1,352 \cdot 10^3. \end{aligned}$$

### 4. Bestimmung der Substratoptima von o-C und Phph

Es wurden für beide Substrate jeweils 2 Untersuchungsreihen mit je 2 Messungen in den eingangs erwähnten Puffern und bei pH 4,8 (für o-C) bzw. pH 4,9 (für Phph) durchgeführt. Die Konzentration von o-C wurde zwischen pS 2,12 und 3,60 und die des Phph zwischen pS 2,00 und 3,30 variiert. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse je einer Meßreihe für Phph und o-C.

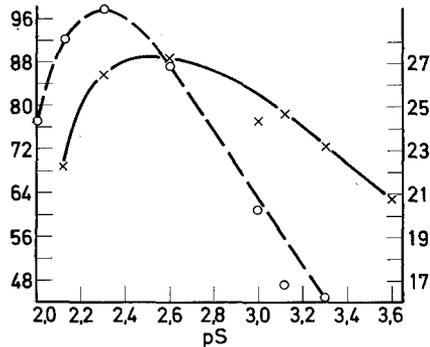


Abb. 3. Phosphataseaktivität des Samenplasmas in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. ○---○---○ Mit Phenylphosphat; ×---×---× mit o-Carboxyphenylphosphat. Die Bestimmungen erfolgten in den jeweiligen Puffern bei pH 4,8 für o-C und 4,9 für Phph. Wegen der höheren Hydrolyserate des o-C mußte das Samenplasma 1:100 verdünnt werden. Die Höchstwerte für Phph ergaben sich bei  $4-6 \cdot 10^{-3}$  M und für o-C bei  $2-5 \cdot 10^{-3}$  M. Umgerechnet auf 1:10 verdünntes Samenplasma ergeben sich für Phph  $98 \mu\text{M}/\text{min}$  und für o-C  $270 \mu\text{M}/\text{min}$

Die höchsten Hydrolyserate ergaben sich bei folgenden Werten:

o-Carboxyphenylphosphat pS 2,3—2,7 =  $2-5 \cdot 10^{-3}$  M,  
 Phenylphosphat pS 2,2—2,4 =  $4-6 \cdot 10^{-3}$  M.

##### 5. Bestimmung des pH-Optimum für o-C

Es wurden 6 Bestimmungsreihen zu je 2 Messungen mit frischen, verschieden alten und Mischproben bei  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M Substratkonzentration in 0,1 M Acetatpuffer durchgeführt. Bei Verwendung von Mischsperma und älteren Proben fiel eine Unregelmäßigkeit im Bereich zwischen pH 4,2—5,2 auf. Es waren oft sog. „Ausreißer“ zu beobachten, die jedoch nicht immer bei gleichem pH auftraten. Ein relativ gerader Kurvenverlauf einer frischen Spermaprobe ist in Abb. 4 dargestellt. Es ergibt sich hieraus ein pH-Optimum bei pH 4,8—5,6. Aber auch hier sind zwischen pH 4,8—5,2 geringe Abweichungen zu beobachten.

##### 6. Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms

Um zu prüfen, ob bei höheren Verdünnungen das Enzym an Aktivität verliert, wurden 5 Spermaproben mit physiologischer Kochsalzlösung bis 1:10000 verdünnt und für jeden Verdünnungsgrad 2 Messungen durchgeführt. Ein Aktivitätsverlust wurde nicht beobachtet. Abb. 5 zeigt die Meßergebnisse einer solchen Verdünnungsreihe.

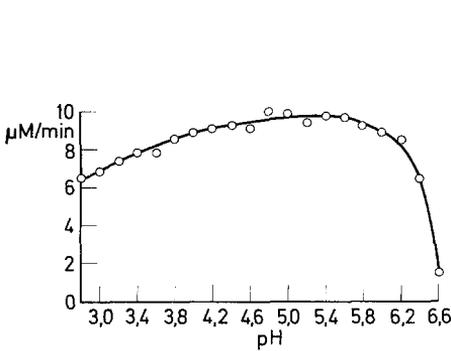


Abb. 4

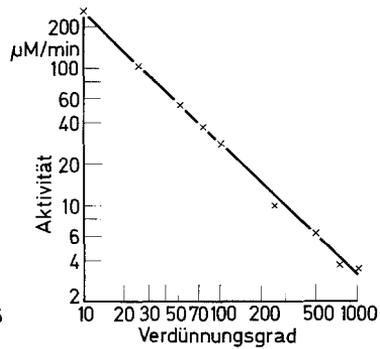


Abb. 5

Abb. 4. Phosphataseaktivität des Samenplasmas in Abhängigkeit vom pH. Die Messungen erfolgten in 0,1 M Acetatpuffer bei  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M o-Carboxyphenylphosphat. Ein Maximum der Aktivität liegt zwischen pH 4,8 und 5,6

Abb. 5. Saure Phosphataseaktivität des Samenplasmas in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad (am Beispiel einer Probe). Der geradlinige Verlauf zeigt, daß ein Aktivitätsverlust durch Verdünnung des Samenplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung nicht eintritt

### Diskussion

Die Absorptionsmaxima von Phph und Phenol liegen sehr dicht beieinander (Abb. 2), so daß eine spektrophotometrische Messung fraglich erscheint. Die durchgeführte Berechnung ergibt jedoch für die Spaltung von  $1 \mu\text{M}$  Phph eine Extinktionszunahme von  $1,240 \cdot 10^{-3}$ . Aktivitätsmessungen unter den Hydrolysebedingungen nach ERDMANN-MÜLLER lassen erkennen, daß eine meßbare Extinktionszunahme besteht (Abb. 3). Die bereits erwähnten Nachteile dieser Methode können somit bei der spektrophotometrischen Messung des freigesetzten Phenols umgangen werden. Um optimale Reaktionsbedingungen zu erhalten, sollte allerdings die Substratkonzentration, wie aus der Kurve V/pS (Abb. 3) zu ersehen ist, auf  $5 \cdot 10^{-3}$  M erhöht werden. Die Extinktionszunahme bei der Spaltung von  $1 \mu\text{M}$  Phph ist mit  $1,240 \cdot 10^{-3}$  aber auch dann noch relativ gering

Für das Substrat o-C wurden die optimalen Reaktionsbedingungen bei pH 4,8—5,6 (Abb. 4) und  $2,0$ — $5,0 \cdot 10^{-3}$  M Substratkonzentration (Abb. 3) in 0,1 M Acetatpuffern festgestellt. Die Absorptionsmaxima von Substrat und Spaltprodukt liegen mit 22 nm weit auseinander (Abb. 2). Der molare Extinktionskoeffizient von Salicylsäure ist wesentlich höher als von Phenol. So ergeben sich unter Verwendung von o-C größere Extinktionszunahmen bei der Hydrolyse äquimolarer Substratmengen. Bei der Spaltung von  $1 \mu\text{M}$  o-C resultiert eine Extinktions-

zunahme von  $3,258 \cdot 10^{-3}$ , während diese bei der Spaltung von  $1 \mu\text{M Phph}$  nur  $1,240 \cdot 10^{-3}$  — etwa ein Drittel — beträgt. Das bedeutet eine größere Empfindlichkeit bei der Verwendung von o-C. Hinzu kommt, daß im Bereich des Substrat- und pH-Optimum die Hydrolyseraten des o-C etwa doppelt so hoch sind wie die des Phph (Abb. 3). Diese beiden Faktoren einer schnelleren Hydrolyse und höheren äquimolaren Extinktionsänderung ergeben zusammengenommen in der Zeiteinheit eine etwa 6fache Extinktionszunahme. Damit ist die Möglichkeit gegeben, auch geringere Fermentaktivitäten zu erfassen.

Die Messung der unverdünnten Spermaphosphatase ist bei Verwendung von o-C selbst mit höchster Papiergeschwindigkeit des Schreibers nicht möglich. Eine Verdünnung von 1:10 oder 1:100 reicht jedoch im allgemeinen aus, meßbare Fermentaktivitäten zu erhalten. Mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Samenplasma zeigt keine Aktivitätsminderung der sauren Phosphatase (Abb. 5).

Bei den Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums fiel bei Verwendung von verschiedenen alten Spermaproben und Mischsperma eine geringe Abweichung zwischen pH 4,2 und 5,6 auf. Auch bei Verwendung einer frischen Spermprobe ließen sich in dem Bereich 3 Meßpunkte nicht zwanglos in den begradierten Kurvenverlauf eingliedern (Abb. 4). Diese sog. „Ausreißer“ waren nicht immer bei gleichem pH und auch nicht in allen Proben zu beobachten. Auch HAUCK u. LETTHOFF beschreiben ähnliche unregelmäßige und atypische Kurven. Derartige Unregelmäßigkeiten lassen daran denken, daß es sich hier um Isoenzyme mit verschiedenen pH-Optima und unterschiedlicher Stabilität handelt. SMITH u. WHITBY, SUR et al. sowie VERNON et al. konnten im Sperma und im Prostatagewebe 2 und mehr Isoenzyme der sauren Phosphatase nachweisen.

### Zusammenfassung

Für die Bestimmung der sauren Spermaphosphatase wird an Hand eines Vergleiches mit Phenylphosphat (Methode nach ERDMANN-MÜLLER) als Substrat o-Carboxyphenylphosphat empfohlen. Die optimalen Reaktionsbedingungen werden festgestellt. Das Inkubationsmedium ist wie folgt zusammengesetzt:

o-Carboxyphenylphosphat	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M,
Essigsäure/Natriumacetatpuffer pH 4,8	0,1 M,
Probelösung (bei 2,5 ml-Ansatz)	0,1 ml.

Die Reaktionsgeschwindigkeit und spektrale Empfindlichkeit ist bei Verwendung dieses Substrates wesentlich höher als bei Phenylphosphat. Bei hoher Papiergeschwindigkeit des Schreibers genügen im allgemeinen Spermaverdünnungen von 1:10 bzw. 1:100, um meßbare Aktivitäten zu erhalten.

### Summary

Estimation of seminal acid phosphatase is carried out with sodium phenylphosphate and o-carboxyphenylphosphate. Comparism indicates more increase of extinction and higher rate of splitting with the aid of o-carboxyphenylphosphate. Dilution of seminal fluid 1:10 ore 1:100 is sufficient for estimation. The incubating medium is mixed as following:

o-carboxyphenylphosphate	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M,
acetic acid/sodium acetate buffer pH 4.8	0,1 M,
seminal fluid (at 2.5 ml test sloution)	0,1 ml.

### Literatur

- ALBERS, H., I. BÜSING u. G. SCHUDT: Über die aktive Gruppe der sauren Hefephosphatase (3,5-Phosphatase). *Enzymologia* **30**, 149 (1966).
- ANSCHÜTZ, R.: Über die Einwirkung von Phosphorpentachlorid auf Salizylsäure. Erste Abhandlung. *Ann. Chem.* **228**, 308 (1885).
- , and W. O. EMERY: Über die Einwirkung von Phosphortrichlorid auf Salizylsäure und auf Phenol. *Ann. Chem.* **239**, 301 (1887).
- BRANDENBERGER, H., u. R. HANSON: Eine spektrophotometrische Bestimmungsmethode für saure und alkalische Phosphatasen. *Helv. chim. Acta* **36**, 900 (1953).
- ERDMANN-MÜLLER, G.: Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase. Klinisch-chemische Untersuchungsmethoden für das Photometer „Eppendorf“. Hamburg: Natahler & Hinz.
- GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: Acid phosphatase as functional activity of the prostatic (man) and preputial glands (rat). *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **39**, 529 (1938).
- — Quantitative relations of a prostatic component (acid phosphatase) of human seminal fluid. *Endocrinology* **28**, 115 (1941).
- HAUCK, G., L. KARLE u. H. LEITHOFF: Beitrag zur Kenntnis der Phosphatasen im Ejakulat von Haustieren. *Zuchthyg.* **3**, 144 (1959).
- , u. H. LEITHOFF: Die Phosphatasebestimmung als gerichtsmmedizinischer Spermanachweis. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 5 (1959).
- — Beobachtungen über das Vorkommen von Phosphatasen in Gartenpflanzen. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **99**, 351 (1959).
- HOFSTEE, B. H. J.: Direct and continuous spectrophotometric assay of phosphomonoesterases. *Arch. Biochem.* **51**, 139 (1954).
- HUGGINS, C.: The physiology of the prostata gland. *Physiol. Rev.* **25**, 281 (1945).
- KUTSCHER, W., u. J. PANY: Prostataphosphatase. III. *Mitt. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **255**, 169 (1938).
- , u. A. WÖRNER: Prostataphosphatase. II. *Mitt. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **239**, 109 (1936).
- , u. H. WOLBERGS: Prostataphosphatase. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **236**, 237 (1935).
- LEITHOFF, H., u. G. A. KUZIAS: Über den Beweiswert des Nachweises saurer Phosphatase bei der forensischen Spermauntersuchung. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 260 (1957).

MEISENZAHN, H.: Reinigungsversuche und Bestimmung des Kd-Wertes der sauren Phosphatase der Prostata mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Diplomarbeit Mainz 1965.

PROKOP, O.: Diskussionsbeitrag zur Tagg der Dtsch. Ges. für gerichtl. Medizin, Freiburg 1966.

SMITH, J. K., and G. WHITBY: The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **151**, 607 (1968).

SUR, B. K., D. W. MOSS, and E. J. KING: Apparent heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochem. J.* **84**, 55 p. (1962).

VERNON, C. A., J. GAULDIE, J. M. HANSON, J. M. HUMPHREYS, P. E. SMITH, A. J. LAWRENCE, and B. E. C. BANKS: Acid phosphatase. *Nature (Lond.)* **208**, 382 (1963).

WEYRICH, G.: Spermanachweis. *Arch. Kriminol.* **11**, 154 (1956).

Dr. med. G. WALTHER  
Institut für gerichtliche Medizin  
65 Mainz, Langenbeckstr. 1