

286. Eugen Bamann und Marianne Meisenheimer: Spaltung von Estern der Phosphorsäure in Gegenwart von Lanthanhydroxyd (I. Mitteil. über „phosphatatische“ Wirkungen von Hydrogelen).

[Aus d. Pharmazeut. Abteil. d. Chem. Institutes d. Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 18. Juli 1938.)

Bei der vielseitigen wissenschaftlichen Durchforschung der Metalloxyde und Hydroxyde scheint eine nicht uninteressante Eigenschaft bisher unbekannt geblieben zu sein, nämlich das Vermögen, die Spaltung von Estern der Phosphorsäure katalytisch zu beeinflussen. Wir fanden diese Fähigkeit bei Gelen des Lanthanhydroxyds und wir beabsichtigen, auch andere Hydrogele daraufhin zu prüfen.

I) Reaktionsbedingungen und Versuchsansatz.

Die Versuchsansätze von 10 ccm enthielten 0.1 g glycerin- β -phosphorsaures Natrium + $3\text{H}_2\text{O}$ (entspr. 26.4 mg P_2O_5) und 1 ccm 2.5-n. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer¹⁾. Üblicherweise wurde die Mischung von Puffer und Substrat mit Wasser auf 9 ccm ergänzt und im Thermostaten auf 37° vorgewärmt. In dieses Gemisch ließen wir dann 1 ccm Lanthanchloridlösung (0.1 g $\text{LaCl}_3 + 7\text{H}_2\text{O}$ „Merck“) langsam und unter leichtem Bewegen des Reaktionskölbchens zufließen, wobei sich das Gel des Lanthanhydroxyds bildet. Die Versuchstemperatur betrug 37°.

Es sei darauf hingewiesen, daß die Reaktionsflüssigkeit nach Zugabe der Lanthanchloridlösung und Bildung des Gels nicht mehr das pH des zugegebenen Puffers aufweist: Dabei treten unter den angeführten Bedingungen z. B. folgende Verschiebungen ein: auf Zusatz des Puffers von pH 9.5 bzw. 9.2 bzw. 8.9 bzw. 8.6 bzw. 8.3 bzw. 8.0 weist das Reaktionsmedium ein pH auf von: 9.1 bzw. 8.8 bzw. 8.3 bzw. 7.8 bzw. 7.5 bzw. 7.0. Unter den angewandten Bedingungen sinkt das pH des Ansatzes im Verlaufe des Versuchs ein wenig ab, insbesondere bei sehr schwach alkalischer Reaktion. Während des Versuchs wurde soweit möglich in Zeitabschnitten von 20–30 Min. umgeschüttelt; obgleich sich so das Gel gleichmäßig in Suspension halten ließ, verdiente wohl ständiges leichtes Bewegen des Reaktionsgefäßes im Schüttelthermostaten den Vorzug.

Zur Bestimmung der abgespaltenen Phosphorsäure bedienten wir uns der von K. Lohmann und L. Jendrassik²⁾ modifizierten colorimetrischen Methode von C. H. Fiske und Y. Subbarow. Die erhaltenen Farbtöne wurden im Zeiss'schen Stufenphotometer mit Filter S 57 gemessen und die Konzentration an P_2O_5 aus einer (durch Vorlegen bekannter P_2O_5 -Mengen aufgestellten) Eichkurve abgelesen. Die Analysenproben betrugen je nach dem Spaltungsgrad 1–0.1 ccm der Suspension; sie wurden wie üblich mit Trichloressigsäure versetzt, wobei sich die Suspension, bestehend aus Lanthanhydroxyd und wechselnden Mengen Lanthanphosphat bzw. Phosphorsäure-Adsorbat, klar auflöst. Die Phosphorsäure-Bestimmung wird durch Anwesenheit von Lanthansalzen in der Untersuchungslösung nicht gestört.

Nach den üblichen Versuchszeiten, auch nach einer Versuchsdauer von 7 und noch mehr Tagen ist die Selbstspaltung der Glycerinphosphorsäure nicht meßbar, nicht einmal nachweisbar; sie kann unberücksichtigt bleiben. Selbst 14-tägige Einwirkung von 1-n. NaOH bei 37° führt zu keiner meßbaren Aufspaltung des Esters.

Wo die Umsetzung in den Tafeln nicht in Prozenten angegeben ist, drücken die Zahlen mg P_2O_5 , bezogen auf 10 ccm, aus.

¹⁾ C. Oppenheimer u. L. Pincussen, „Die Methodik der Fermente“, G. Thieme, Leipzig 1929, S. 615.

²⁾ Biochem. Ztschr. 178, 419 [1926].

II) Verlauf der Esterspaltung.

1) Abhängigkeit der Wirkung von der Wasserstoffionen-konzentration.

Vergleicht man die Anfangsgeschwindigkeiten, mit denen die Spaltung der Glycerinphosphorsäure in Gegenwart des Lanthanhydroxydgel's vor sich

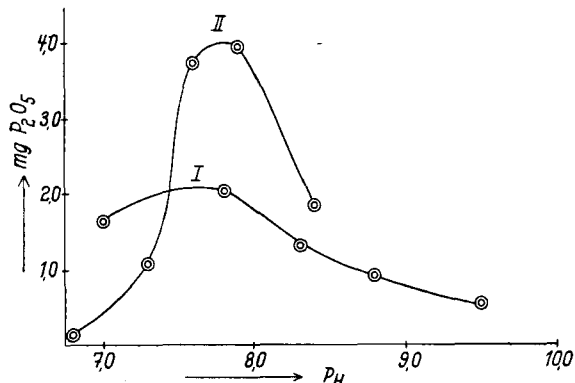


Abbildung 1. Umsetzungsgeschwindigkeit bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. (Versuchsdauer: 1 Stde.)

Kurve I: Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer;

Kurve II: Veronal-Natriumacetat-Puffer (s. dazu Unterabschn. 3).

geht, bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, so erkennt man ein ausgeprägtes Optimum. Es liegt im schwach alkalischen Gebiet, im Bereich p_H 7.5–8.0. Neutrale Reaktion ist etwas ungünstiger, bei stärker alkalischer Reaktion ist die Umsetzungsgeschwindigkeit bedeutend geringer, sie beträgt beispielsweise bei p_H 9.5 nur etwa $\frac{1}{4}$ der maximalen. Diese Abhängigkeit der Wirkung von der Wasserstoffzahl ist in Abbild. 1 dargestellt.

2) Der zeitliche Verlauf der Spaltung.

Der in den Anfangszeiten beobachteten Kinetik folgt die Esterspaltung im allgemeinen nicht lange. Noch am regelmäßigsten ist der Spaltungsverlauf im stärker alkalischen Gebiet; bei p_H 9.5 beispielsweise ist der Verlauf bis zu knapp 30% Umsatz ein fast linearer.

Im schwächer alkalischen Gebiet, in dem die Spaltung anfänglich bedeutend rascher vor sich geht, vermindert sich die Umsetzungsgeschwindigkeit sehr bald; dadurch kommen Kurven zustande, die rasch ansteigend zuerst über jenen fast linearen Verläufen liegen, dann aber stark abflachend diese schneiden (s. Abbild. 2). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die erreichbaren Endwerte der Spaltung um so höher liegen, je alkalischer das Medium ist. Nach Tafel 1 erreicht man bei

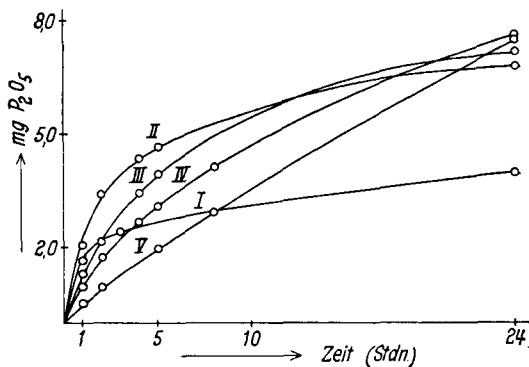


Abbildung 2. Kinetik der Esterspaltung bei verschiedenem p_H .

Kurve I: Vers. bei p_H 7.0;

Kurve II: Vers. bei p_H 7.8;

Kurve III: Vers. bei p_H 8.3;

Kurve IV: Vers. bei p_H 8.8;

Kurve V: Vers. bei p_H 9.5.

p_H 9.5 in 7 Tagen 53% Umsatz, während er bei p_H 7.8 in der gleichen Zeit 42% und bei p_H 7.0 nur 18% beträgt. Daß es sich praktisch um Endspal-

tungen handelt, geht aus dem Umstand hervor, daß die Spaltungszunahme vom 5. bis zum 7. Tag äußerst gering ist.

Die Gesamtwirksamkeit des Gels läßt sich vielleicht dadurch veranschaulichen, daß man die Umsätze in Beziehung zur vorhandenen Lanthanmenge bringt: würde sich eine einfache Umsetzung des Lanthan-Ions mit dem Phosphat-Ion zu LaPO_4 vollziehen, so würde das vorhandene Lanthan die Phosphorsäure aus 0.0725 g glycerinphosphorsaurem Natrium, d. i. 72.5 % des vorhandenen Substrats, binden können. In diesem Fall (der jedoch nicht verwirklicht wird) hätte man also als Endwert 72.5 % Spaltung zu erwarten.

Tafel 1. Zeitlicher Verlauf der Esterspaltung bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Versuchsdauer (Stdn.)	7.0	7.8	PH 8.3	8.8	9.5
			in %		
1	6.2	7.7	5.0	3.7	2.0
5	—	17.6	15.0	11.8	7.3
24	15.0	25.8	27.0	29.0	28.5
120	18.1	38.5	38.5	45.0	53.0
168	18.3	42.0	42.0	49.0	53.0

3) Einfluß der Pufferzusammensetzung.

Vergleichsweise haben wir die Reaktionsverhältnisse auch in Anwesenheit eines anderen Puffers, nämlich des Veronal-Natriumacetat-Gemisches nach L. Michaelis³⁾, geprüft. Erwähnenswert ist dabei, daß auch im Falle dieses Puffers ein Optimum der Spaltung besteht, und zwar im gleichen Bereich: pH 7.5—8.0. Das auffallend starke Absinken der Umsetzungsgeschwindigkeit im annähernd neutralen Medium hängt wohl damit zusammen, daß sich in diesem Gebiet bereits mehr oder weniger Veronal aus der Reaktionsflüssigkeit auszuscheiden begann. Wendet man den Puffer in geringerer Konzentration an, so daß eine Auskrystallisation unterbleibt, dann liegen die Umsätze einige Prozent höher. Dem Sinne nach besteht also bei Anwendung beider Puffergemische Übereinstimmung der Ergebnisse, nicht aber in der absol. Höhe der Umsätze; diese sind in Gegenwart des Veronal-Puffers größer als beim Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer. (Siehe Aktivitäts- pH -Kurve, Unterabschnitt 1.)

Der Versuchsansatz von 10 ccm enthielt 6 ccm der $\frac{1}{10}$ molaren Stammlösung (pH 9.6); nach Zusatz von 0.0 ccm bzw. 0.3 ccm bzw. 0.5 ccm bzw. 0.7 ccm bzw. 0.75 ccm $n_{1/1}\text{-HCl}$ beträgt das pH im Reaktionsmedium [nach Bildung des $(\text{La}(\text{OH})_3)_2$] 8.4 bzw. 7.9 bzw. 7.6 bzw. 7.3 bzw. 6.8.

pH	6.8	7.3	7.6	7.9	8.4
Umsatz nach 1 Stde.	0.6%	4.2%	14.3%	15.0%	7.0%

Die Werte der Endspaltung stimmen mit den beim Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer erhaltenen annähernd überein; die Spaltungsgrade betragen:

bei pH	7.3	7.6	7.9	8.4
nach 6 Tagen	—	30.4%	35.0%	39.0%
nach 8 Tagen	12.9%	31.5%	35.0%	42.0 %

Auch hier beobachtet man die Erscheinung, daß die Werte der Endspaltung um so höher liegen, je alkalischer das Reaktionsmedium ist.

³⁾ Biochem. Ztschr. **234**, 139 [1931].

4) Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Im Gegensatz zu vielen enzymatischen Katalysen, deren Aktivitäts- p_s -Kurven im Gebiet hoher Substratkonzentrationen wieder abfallen, erfolgt die Glycerinphosphorsäure-Spaltung in Gegenwart von Lanthanhydroxyd um so rascher, je konzentrierter die Esterlösungen sind. Auch in den konzentriertesten, von uns geprüften Lösungen (5-proz. und 10-proz. Lösungen) ist die Umsetzungsgeschwindigkeit immer noch im Steigen begriffen. Legt man die Anfangsgeschwindigkeiten zugrunde, so steht der Umsatz nach den Versuchen der Tafel 2 bei einer Esterkonzentration 0.1/10 bzw. 0.3/10 bzw. 0.5/10 bzw. 1.0/10 im Verhältnis von 1:3:5:10, er steigt demnach proportional der Esterkonzentration.

Tafel 2. Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten bei verschiedener Esterkonzentration.

(Die Zahlen geben die bei p_H 9.5 in 10 ccm gebildeten mg P_2O_5 an.)

Versuchsdauer (Min.)	Esterkonzentration:			
	0.1 g/10 ccm	0.3 g/10 ccm	0.5 g/10 ccm	1.0 g/10 ccm
20	0.21	0.60	1.11	1.98
60	0.58	1.67	2.70	4.10
90	0.82	—	—	4.65
120	1.08	—	—	5.05

III) Gel-Zustand und katalytische Wirksamkeit.

Schwankungen der katalytischen Aktivität haben wir häufig beobachten können. Schon bei Wiederholungen eines Versuchs unter möglichst genauem Einhalten äußerer Bedingungen treten gelegentlich Abweichungen auf, obgleich schon im allgemeinen die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse eine sehr befriedigende ist. Änderungen der äußeren Bedingungen führen aber zu Systemen oft beträchtlich veränderter katalytischer Aktivität.

Welches die Ursachen sind, die die unterschiedlichen Aktivitäten bedingen, können wir nicht entscheiden. Jedenfalls ist die Zustandsform des Katalysators bei verschiedenen Bildungsbedingungen jeweils ein andere. Dabei kann mitbestimmend werden der Verteilungsgrad, die Ausbildung einer besonders wirksamen Oberfläche oder die Bildung verschiedener, auch nach ihrem rein chemischen Verhalten unterscheidbarer Gel-„Typen“. So kommen wohl auch hier jene eigenartigen, in ihrem Wesen noch nicht erkannten Oberflächenkräfte zur Wirkung, die auf Grund ihrer überraschenden Selektivität heute in Form der Tswettschen chromatographischen Analyse und der Willstätterschen Adsorptionsmethode im Dienste der biochemischen Forschung stehen.

1) Einfluß der Bildungsbedingungen des Gels auf die katalytische Wirksamkeit.

Die im folgenden angeführten Versuche sollten durch weitere systematische Versuche ergänzt werden. Für den Fall, daß eine Reihe weiterer Metallhydroxyde das Esterspaltungsvermögen zeigt, könnte nämlich die Frage, wie weit man aus den Abstufungen der katalytischen Wirksamkeit auf das Vor-

liegen bestimmter Arten von Hydroxyden schließen darf, ein Problem von allgemeiner Bedeutung werden.

Die Unterschiede in den Bildungsbedingungen des Lanthanhydroxyd-Gels liegen bei unseren Versuchen darin, daß wir entweder — das ist der Normalfall — die Lanthansalzlösung zum fertigen Reaktionsgemisch zufügen, oder die Lanthansalzlösung — dieses Verfahren stellt den Ausnahmefall dar — nur in die Pufferlösung eintragen:

Reihenfolge I.

Zugabe der Lanthansalzlösung zum fertigen Reaktionsgemisch:
Das Gel entsteht im Puffer-Substrat-Gemisch.

Reihenfolge II.

Eintragen der Lanthansalzlösung in die Pufferlösung, nachträgliche Zugabe der Substratlösung:
a) Das Gel entsteht in der Pufferlösung;
b) Das ausgefallene Gel kann sich unter dem Einfluß des Substrats nachträglich umwandeln.

Bei diesen Arbeitsverfahren beobachtet man auffallende Unterschiede hinsichtlich der katalytischen Aktivität der Gele. Nachstehende Zusammenstellung verzeichnet die Unterschiede bezüglich der Anfangsgeschwindigkeiten:

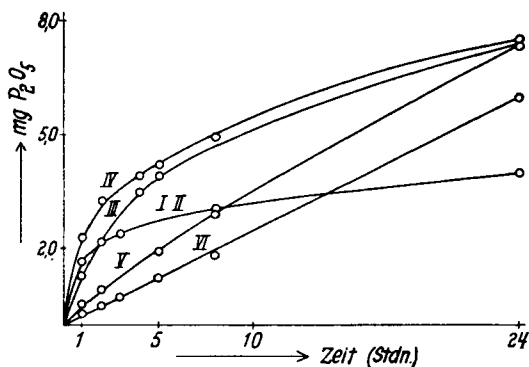
Reaktionsmedium	Zugabenfolge I	Zugabenfolge II
Neutrale bis sehr schwach alkalische Reaktion	Gleiche Anfangsgeschwindigkeiten	Größere Anfangsgeschwindigkeit
Schwach alkal. Reaktion (p_H 7.8—8.8)		
Stärker alkal. Reaktion (p_H 9.5)	Größere Anfangsgeschwindigkeit	

Der Abbild. 3 entnehmen wir folgende Werte: es betragen die Umsätze nach 1 Stde. Versuchsdauer im Falle der

	Folge I	Folge II
bei p_H 7.0	6.2%	6.2%
p_H 8.3	5.0%	8.7%
p_H 9.5	2.0%	1.1%

Bei längerer Versuchsdauer gleichen sich die Unterschiede im Umsatz allmählich aus: die Endspaltungswerte sind beinahe gleich.

Während man nach den vorstehend angeführten Beispielen auf Grund der verschiedenen Anfangsgeschwindigkeiten der Ester-spaltung auf die Bildung verschiedener Gelarten je nach den äußeren Bedingungen schließen darf, führen die Ergebnisse eines weiteren Beispiels zu der Annahme, daß sich die ursprünglich gebildete Gelart unter äußeren Einflüssen in eine andere umwandeln läßt.



Abbild. 3. Einfluß der Zugabenfolge im Versuchsansatz auf die Reaktionsfähigkeit des Gels.

- Kurve I: p_H 7.0, Zugabenfolge I;
Kurve II: p_H 7.0, Zugabenfolge II;
Kurve III: p_H 8.3, Zugabenfolge I;
Kurve IV: p_H 8.3, Zugabenfolge II;
Kurve V: p_H 9.5, Zugabenfolge I;
Kurve VI: p_H 9.5, Zugabenfolge II.

Tafel 3. Einfluß der Zugabenfolge im Versuchsansatz auf die Reaktionsfähigkeit des Gels.

Vers.- Dauer (Min.)	Zugabenfolge I Substratkonzentration				Zugabenfolge II Substratkonzentration				
	0.1/10	0.3/10	0.5/10	1.0/10	0.1/10	0.3/10	0.5/10	1.0/10	2.0/10
20	0.21	0.60	1.11	1.98	0.07	0.23	0.34	0.56	0.82
60	0.58	1.67	2.70	4.10	0.26	1.04	1.75	2.73	3.48
90	—	—	—	4.65	—	—	—	4.15	—
120	—	—	—	5.05	—	—	—	4.40	—
180	—	—	—	—	0.96	—	—	5.55	—

Die Versuche der Tafel 3, ausgeführt bei pH 9.5, zeigen: Im Falle der Folge I: Spaltungskurven von normalem Verlauf, nämlich angenähert linear oder (bei höherer Substratkonzentration) allmählich absinkend. Im Falle der Folge II dagegen: Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Spaltung; die Kurven weisen einen autokatalytischen Anstieg auf. Diese Erscheinung hat darin ihren Grund, daß sich das unter dem Einfluß des Puffers gebildete Gel bei Anwesenheit des Substrats in ein anderes umwandelt, das durch größere katalytische Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Ester ausgezeichnet ist.

2) Verminderung der Wirksamkeit durch Waschen der Gele.

a) Gele, gefällt im fertigen Reaktionsgemisch.

Gele, die im fertigen Reaktionsgemisch, also auch in Anwesenheit des Substrats erzeugt werden, werden in ihrer Wirksamkeit weder durch starkes Zusammenballen infolge scharfen Zentrifugierens, noch durch anschließendes Auswaschen mit Pufferlösung wesentlich beeinträchtigt. Das Substrat schützt anscheinend die wirksamen Stellen der Oberfläche weitgehend vor Veränderungen, wohl durch Anlagerung an das Hydroxyd, also infolge Bildung einer Lanthanhydroxyd-Phosphorsäureester-Verbindung. Größere Beständigkeit der Katalysator-Substrat-Verbindung im Vergleich zum Katalysator allein ist nicht ungewöhnlich. Man trifft diese Verhältnisse häufig im Falle von Enzymen an.

Beispiel: Versuch bei pH 9.0

Umsatz in 1 Stde.:

- | | |
|---|---|
| 1) Normal-Versuch | 0.90 mg P_2O_5 entspr. 3.4 % Spaltung |
| 2) Reaktionsflüssigkeit zentrifugiert | |
| a) Rückstand + Puffer-Substrat-Gemisch zu neuem Ansatz | 0.73 mg P_2O_5 entspr. 2.8 % Spaltung |
| b) Zentrifugat + Substrat-Lösung zu neuem Ansatz | 0.00 mg P_2O_5 entspr. 0.0 % Spaltung |
| 3) Reaktionsflüssigkeit zentrifugiert, Rückstand 1-mal mit Puffer-Lösung gewaschen, dann mit Puffer-Substrat-Gemisch zu neuem Ansatz .. | 0.70 mg P_2O_5 entspr. 2.6 % Spaltung |

b) Gele, gefällt im Puffergemisch in Abwesenheit des Substrats.

Starke Aktivitätseinbußen beobachtet man dagegen, wenn man das Gel nur im Puffergemisch erzeugt und nach dem Abtrennen mit geeigneten Flüssigkeiten auswäscht. Solche Gele erfahren demnach durch das Waschen Veränderungen. In neue Versuchsansätze gebracht, sind sie anfänglich äußerst schwach wirksam, später tritt allerdings eine teilweise Regenerierung ein.

Beispiel: Im Normalversuch beträgt der Umsatz in 2 Stdn. 1.45 mg P_2O_5 . In einem anderen Versuch wird das klare Zentrifugat nach Abzentrifugieren des Gels geprüft, in einem weiteren das mit Wasser gewaschene Gel und im letzten die abzentrifugierte Waschflüssigkeit. Die Umsatzwerte im Falle dieser 3 Versuche (durch eine Klammer kenntlich gemacht) betragen zusammen 0.69 mg P_2O_5 gegenüber 1.45 mg im Normalversuch. Öfteres Auswaschen schädigt noch mehr. Ersatz des Wassers durch Pufferlösung, Ammoniakflüssigkeit oder Kochsalzlösung ändert am Gesamtbild nichts.

Versuch bei pH 9.0 mg P_2O_5 /10 ccm in Stdn.	2	5	24
1) Normal-Versuch	1.45	3.15	8.30
2) Zentrifugat nach Abtrennen des Gels	0.21	0.29	0.46
3 a) Gel nach 1-mal. Waschen mit Wasser	0.17	0.45	3.55
b) Abzentrifugierte Waschflüssigkeit	0.31	0.60	3.35
4 a) Gel nach 1-mal. Waschen mit Pufferlösung	0.19	0.56	4.95
b) Abzentrifugierte Waschflüssigkeit	0	0	0
5 a) Gel nach 1-mal. Waschen mit 0.25-n. NH_3	0.19	0.34	3.45
b) Abzentrifugierte Waschflüssigkeit	nicht gemessen		
6 a) Gel nach 1-mal. Waschen mit 0.25-n. NaCl-Lösung.	0.24	0.63	4.90
b) Abzentrifugierte Waschflüssigkeit	0	0	0

3) Wechsel zwischen Gel- und Sol-Zustand während der Spaltung.

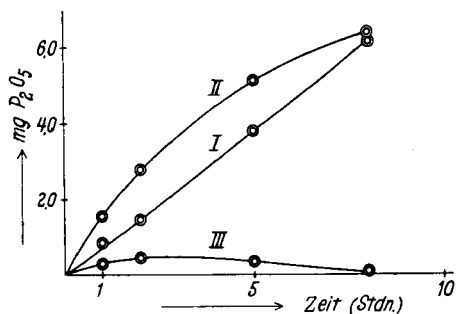
Während der Spaltung kann man gelegentlich eine eigentümliche Erscheinung beobachten: Die Trübung der Reaktionsflüssigkeit — verursacht durch das Gel des Hydroxyds — hellt sich langsam auf; in manchen Fällen bildet völlige Klarheit der Reaktionsflüssigkeit den vorläufigen Endzustand des Vorgangs. Nach einiger Zeit nimmt dann die Trübung wieder zu, bzw. beginnt sich die klare Flüssigkeit wieder zu trüben unter Rückbildung neuen Gels. Das während des Vorgangs entstehende Sol ist demnach nur wenig beständig. Im Sol-Zustand schreitet die Spaltung des Esters ohne Unterbrechung weiter, die Reaktionsflüssigkeit zeigt in diesem Zustand gerade noch wahrnehmbaren Tyndalleffekt⁴⁾.

Für das Zustandekommen dieses Wechsels zum kolloiden Zustand haben wir zwei Faktoren als wichtig erkannt. Zunächst ist die Wasserstoffionenkonzentration des Versuchsmediums für die Bildung des Sols von Bedeutung. Das läßt sich anschaulich zeigen in Versuchen, deren Pufferung aus dem Veronal-Natriumacetat-Gemisch besteht: von Ansätzen bei pH 7.6, 7.9 und 8.5 tritt ein völliges Klarwerden der Flüssigkeiten nur im Falle des mittleren pH (7.9) ein; der Vorgang des Aufhellens ist nach etwa 50 Min. abgeschlossen. Die Flüssigkeit bleibt dann etwa 60 Min. klar und fängt dann an, wieder trübe zu werden. Im Parallelversuch bei pH 7.6 ist die Trübung nach 50 Min. zwar weitgehend verschwunden, allein ein völliges Klarwerden kommt nie zustande. Im dritten Versuch ist eine auffallende Veränderung der Reaktionsflüssigkeit überhaupt nicht zu beobachten. Danach besteht für diesen Vorgang ein Optimum, welches im schwach alkalischen Medium liegt; neutrales Medium ist weniger, stärker alkalisches noch weniger geeignet.

Im Falle des Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffers haben wir bei der üblichen Substratkonzentration 0.1/10 ein völliges Klarwerden der Reaktions-

⁴⁾ Über Bildung und Eigenschaften des Lanthanhydroxyd-Sols s. bei P. Walden, Handb. d. allgem. Chem., Bd. IX, „Hydroxyde u. Oxyhydrate“ von R. Fricke u. G. F. Hüttig unter Mitwirk. von H. Zocher u. H. Saechtling, Akad. Verlagsges. Leipzig 1937, u. zw. S. 126.

flüssigkeit nicht beobachten können. Daß aber ein teilweiser Wechsel vom Gel- zum Sol-Zustand stattfindet, dafür sprechen die Ergebnisse folgenden Versuchs: während man bei Spaltungen im stärker alkalischen Gebiet (p_H 9.0) die abgespaltene Phosphorsäure nicht frei in Lösung, sondern ausschließlich gebunden im Gel vorfindet (Kurve I der Abbild. 4), enthalten in Versuchen im schwächer alkalischen Medium (p_H 8.3) sowohl das Gel als auch die vom Gel durch Zentrifugieren getrennte klare Flüssigkeit Phosphorsäure. Das hat seinen Grund darin, daß bei diesem p_H in den ersten Versuchszeiten ein Teil



Abbild. 4. Bestimmung des Phosphorsäureanteils, der in Versuchen bei p_H 9.0 bzw. 8.3 in Lösung ist (Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer).

Kurve I: Vers. p_H 9.0: Gesamte abgespaltene H_3PO_4 (ausschl. im Gel geb.);

Kurve II: Vers. p_H 8.3: Gesamte abgespaltene H_3PO_4 ;

Kurve III: Vers. p_H 8.3: Der in Lösung sich befindende Anteil der H_3PO_4 .

des Gels in den Sol-Zustand übergegangen ist. Kurve III der Abbild. 4 gibt die Anteile der Phosphorsäure an, die sich im Verlauf des Versuchs jeweils in Lösung befinden, während Kurve II ein Maß für die gesamte abgespaltene Phosphorsäure darstellt.

Der zweite für den Übergang des Gels in den Sol-Zustand maßgebende Faktor ist die Substratkonzentration. Einen Überblick über die bei verschiedener Substratkonzentration in verschiedenen Zeiten eintretenden äußerlich wahrnehmbaren Veränderungen gibt die nachstehende Übersicht.

Beobachtungszeiten	Substratkonzentration			
	0.1/10	0.3/10	0.5/10	1.0/10
Kurz nach Zugabe des $LaCl_3$	trüb	trüb	wenig trüb	sehr wenig trüb
Nach 10 Min.	trüb	wenig trüb	sehr wenig trüb	klar
Nach 20 Min.	trüb	sehr wenig trüb	klar	klar
Nach 3 Stdn.	trüb	sehr wenig trüb	klar	klar
Nach 5 Stdn.	trüb	Trübung nimmt wieder zu		

Die Versuche sind bei einem für die Bildung des Sols ungünstigen p_H , nämlich p_H 9.5, angestellt. (Die entsprechenden Umsetzungsgeschwindigkeiten sind aus der Zusammenstellung im Unterabschnitt 1 unter „Zugabenfolge I“ zu ersehen.)

Danach tritt völliges Klarwerden der Reaktionsflüssigkeit nur in den Versuchen mit sehr hoher Substratkonzentration ein, und zwar im Falle 1.0/10 früher als im Falle 0.5/10. In den übrigen Versuchen kommt es nur zur Ausbildung gradueller Unterschiede in der Trübung.

An diese Erscheinung sind eine Reihe von Fragen geknüpft. Von Interesse halten wir die Frage, ob zwischen Reaktionsfähigkeit und Übergang eines Systems in den Sol-Zustand ein innerer Zusammenhang besteht. Dafür scheint zu sprechen: erstens, daß der p_H -Bereich, in dem das Auftreten der Sole begünstigt ist, zugleich das Gebiet optimaler Spaltung darstellt, zweitens,

daß mit steigender Substratkonzentration erhöhte Umwandlung vom Gel zum Sol und gleichzeitig Zunahme der Umsetzungsgeschwindigkeit zu beobachten ist, und drittens, daß der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene autokatalytische Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit von einem Übergang des Gels in das Sol begleitet ist. Trotz solcher Parallelen halten wir aber vorerst einen inneren Zusammenhang noch nicht für bewiesen. Eine andere Frage betrifft den tieferen Grund für den Übergang des Gels in das Sol. Man könnte versucht sein, ihn in dem Auftreten der Spaltprodukte, insbesondere des Glycerins, zu vermuten, zumal einige hydroxylhaltige Substanzen wie Tartrate und Zucker die Fällung von Lanthanhydroxyd verhindern, und die Eigenschaft des Glycerins, Komplexe zu bilden, in vielen anderen Fällen bekannt ist. Zugabe von Glycerin oder Phosphorsäure oder von beiden Spaltprodukten zu den Ansätzen vermochte aber niemals die Solbildung zu beschleunigen oder herbeizuführen. Nach diesen orientierenden Versuchen scheint der Ester selbst verantwortlich für den Wechsel zum Kolloid-Zustand zu sein.

IV) Prüfung verschiedener Phosphorsäureester.

Das Lanthanhydroxyd ist nicht nur befähigt, die Spaltung der Glycerinphosphorsäure zu beschleunigen, sondern zeigt sich auch gegenüber anderen Phosphorsäureestern wirksam. Von den geprüften Substraten wird allerdings nur die Phenylphosphorsäure ähnlich gut gespalten wie der Ester des Glycerins. Auffallend ist hier die träge Spaltung zu Beginn; erst nach 24 Stdn. setzt eine rasche Zunahme des Umsatzes ein, die bis zu 96 Stdn. anhält. Wahrscheinlich geht hier eine Umbildung des Gels in eine aktivere Form vor sich. Die Diphenylphosphorsäure-Spaltung hingegen kommt auch nach längeren Versuchszeiten nicht besser in Gang⁵⁾. Im Falle beider Ester zeigen übrigens die Suspensionen ein anderes Aussehen: Die Gele erscheinen grobflockiger und ungleichmäßiger in ihrer Verteilung. Über die Reaktionsverhältnisse berichtet Tafel 4.

Tafel 4. Spaltung von Phenylphosphorsäure und Diphenylphosphorsäure. (Die Versuchsansätze von 10 ccm enthielten 0.064 g Phenylphosphorsäure bzw. 0.106 g diphenylphosphorsaures Kalium (entspr. 26.4 mg P_2O_5) sowie 1 ccm NH_3-NH_4Cl -Puffer. Die Zahlen bedeuten Prozent Spaltung.)

Versuchsdauer (Stdn.)	Phenylphosphorsäure			Diphenyl- phosphorsäure pH 8.2
	pH 7.3	pH 8.0	pH 8.7	
2	0.1	0.9	1.2	0
5	0.3	1.5	2.1	—
8	0.5	2.1	2.8	1.0
24	1.6	4.4	7.4	2.2
48	3.4	11.0	22.7	3.4
96	8.0	39.0	55.0	—
192	13.6	58.8	64.0	—

⁵⁾ Wir werden noch prüfen, ob mit den Phosphoesterasen darin Übereinstimmung besteht, daß nur primäre und sekundäre Ester, also Substrate, die noch Säuren sind, gespalten werden. Die tertiären Ester werden nach den bisherigen Erfahrungen enzymatisch nicht gespalten.

Noch weniger gut werden Hexosediphosphorsäure (in Form sowohl des schwer löslichen Calcium- als auch des leicht löslichen Kaliumsalzes) sowie die Inosithexaphosphorsäure (Ca-Mg-Verb. sowie Natrium-Verb.) gespalten. Nach Abzug der Selbstspaltungswerte war aber immerhin nach Tagen eine geringe Wirksamkeit des Lanthanhydroxyds festzustellen. Nur im Falle des Caseins ließen die Ergebnisse eine eindeutige Beurteilung nicht zu.

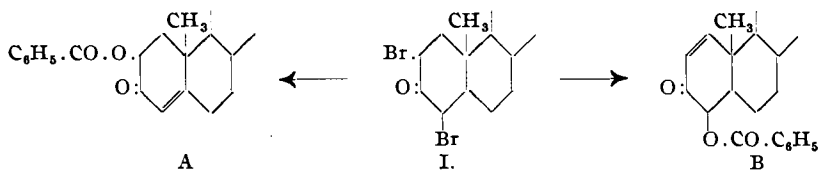
Für die freundliche Mithilfe bei Durchführung der Versuche sprechen wir Hrn. A. Carl unseren besten Dank aus. Zu ganz besonderem Dank sind wir der William G. Kerckhoff-Stiftung zu Bad Nauheim für die Gewährung eines Forschungsstipendiums an Fr. Dr. M. Meisenheimer verpflichtet.

287. Hans Herloff Inhoffen und Huang-Minlon: Umwandlungsreaktionen von bromierten Derivaten des Cholesterins, V. Mitteil.¹⁾: Weitere Versuche mit Dibromcholestanon.

[Aus d. Hauptlaborat. d. Schering A.-G., Berlin.]

(Eingegangen am 20. Juli 1938.)

Durch Einwirkung von Kaliumbenzoat auf 2,4-Dibrom-cholestan-on-(3) (I) in Butanol-Toluol-Lösung erhält man zwei einfach ungesättigte Benzoesäureester der Formeln A und B¹⁾:



Bei dieser Reaktion werden also Verbindungen erhalten, die im Ring A nur einfach ungesättigt sind.

Die angestrebte Darstellung des im Ring A zweifach ungesättigten Ketons, des $\Delta^{1,2,4,5}$ -Cholestadien-ons-(3), gelang schließlich durch Behandeln von I mit Pyridin²⁾; hierbei entsteht ein Gemisch verschiedenartiger Stoffe.

Schwenk und Whitman³⁾, die die Einwirkung von Pyridin auf Dibromcholestanon ebenfalls untersucht haben, isolierten ein Pyridiniumbromid, für das man neben der von Schwenk und Whitman vorgeschlagenen Formel C auch die Formulierung D in Betracht ziehen muß:

¹⁾ IV. Mitteil.: B. **70**, 1695 [1937].

²⁾ Pyridin diente auch zur Abspaltung von Bromwasserstoff aus dem durch Bromierung von Androstan-dion-(3.17) mit 2 Mol. Brom erhaltenen Dibromandrostandion, H. H. Inhoffen, Naturwiss. **25**, 125 [1937]. Die von Marrian („Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung“, S. 437, Akad. Verlagsbuchhandl., Leipzig 1938) für die dort beschriebene Aromatisierungsreaktion späterhin angegebene Formulierung ist daher irrig.

³⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 949 [1937].