

54. Robert Klement und Richard Weber*): Das Verhalten von Hydroxylapatit in Lösungen.

[Aus d. Institut für anorgan. Chemie d. Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 11. Dezember 1940.)

Erst in neuerer Zeit sind das Vorkommen des Hydroxylapatits $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ und seine Bedeutung erkannt worden¹⁾. Seine Eigenschaften sind jedoch bisher kaum untersucht worden, obwohl der Hydroxylapatit den Hauptbestandteil natürlicher Phosphorite sowie der anorganischen Knochen-substanz²⁾ bildet. Im Hinblick auf diese Bedeutung ist in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von Hydroxylapatit gegenüber reinem Wasser sowie wäßrigen Lösungen von z. B. Aminosäuren, Gelatine und anderen Stoffen untersucht worden.

Ähnliche Versuche sind zwar schon früher, und zwar an „tertiärem Calciumphosphat“ vorgenommen worden³⁾. Da dieses, besonders als Handelsprodukt, nach den Untersuchungen von G. Trömel⁴⁾ kein definierter Stoff von stöchiometrischer Zusammensetzung ist, sondern eigentlich verunreinigten Hydroxylapatit darstellt, so entbehren die damit angestellten Untersuchungen der genügenden Sicherheit. Es erschien deshalb angebracht, das Verhalten von reinem Hydroxylapatit in Lösungen zu erforschen.

I. Die Auflösung von Hydroxylapatit in Wasser.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde für alle Versuche der gleiche Hydroxylapatit benutzt, der durch Fällung aus 60 l gesättigtem Kalkwasser mit der äquivalenten Menge verdünnter Phosphorsäure bei einer Temperatur von 50° hergestellt war⁵⁾. So gewonnener Hydroxylapatit ist bestimmt frei von allen Fremd-Ionen. Das Verhältnis von $\text{Ca}:\text{PO}_4$ wurde analytisch festgestellt zu 1:0.606 (berechnet 1:0.600).

Zur Bestimmung der Löslichkeit von Hydroxylapatit in Wasser wurden bestimmte Einwaagen an Hydroxylapatit 24 Stdn. mit Leitfähigkeitswasser ($\kappa = 0.165 \cdot 10^{-5}$ rez. Ohm) im Thermostaten bei verschiedenen Temperaturen in paraffinierten Flaschen geschüttelt. 250 ccm der durch ein doppeltes Filter filtrierten Lösung wurden in einer Platinschale eingedampft und im Rückstande Calcium und Phosphat bestimmt. Da es sich nur um geringe Mengen handelte, mußten Mikromethoden⁶⁾ zu ihrer Bestimmung angewandt werden. Das Einfüllen des Leitfähigkeitswassers in das Schüttelgefäß und das Filtrieren geschahen nicht unter Luftabschluß. Die Versuchsergebnisse, die in mg Ca/l bzw. mg PO_4 /l angegeben werden, sind in Tafel 1 zusammengestellt.

*) Dissertat. Frankfurt a. M. 1940 (D 30).

¹⁾ A. Schleede, W. Schmidt und H. Kindt, Ztschr. Elektrochem. **38**, 633 [1932].

²⁾ R. Klement u. G. Trömel, Ztschr. physiol. Chem. **213**, 263 [1932].

³⁾ A. Rindell, Akad. Abhandlgn. Helsingfors [1899]; W. Pauli u. M. Samec, Biochem. Ztschr. **17**, 235 [1909]; W. Pauli u. Th. Stenzynger, Biochem. Ztschr. **205**, 71 [1929].

⁴⁾ G. Trömel u. H. Möller, Ztschr. anorgan. Chem. **206**, 227 [1932].

⁵⁾ Diese Darstellung besorgten in dankenswerter Weise die Herren cand. P. Dihn u. K. Köhrer.

⁶⁾ W. Geilmann u. R. Höltje, Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **167**, 128 [1927]; H. Kleinmann, Biochem. Ztschr. **99**, 103 [1919].

Tafel 1. Auflösung von Hydroxylapatit in Wasser bei 25°.

Einwaage mg Hydroxylapatit/250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca:PO ₄
100	3.62	8.59	1:1.00
200	4.50	10.70	1.01
200	4.60	11.10	1.02
400	5.90	16.10	1.18
400	6.10	15.30	1.06
570 *)	6.40	19.20	1.26
570	6.31	18.90	1.26
800	8.10	24.00	1.25
1200	11.00	32.20	1.24

*) Wegen der Einwaage von 570 mg s. S. 379.

Die angestellten Löslichkeitsversuche lassen eine Zunahme der gelösten Anteile an Calcium und Phosphat mit steigender Einwaage an Hydroxylapatit erkennen. Gleiche Beobachtungen sind schon früher für reinen Fluor- und Hydroxylapatit⁷⁾ und für natürliche und technische Calciumphosphate⁸⁾ bei der Auflösung in 2-proz. Citronensäure gemacht worden. Wie aus Tafel 1 hervorgeht, verschiebt sich das Verhältnis von Ca:PO₄ von dem für den Hydroxylapatit gültigen Wert von 1:0.60 zu einem viel höheren Wert von rund 1:1.00, der dem sek. Calciumphosphat entspricht. Daraus folgt, daß von einer eigentlichen Löslichkeit des Hydroxylapatits nicht gesprochen werden kann.

Die Abhängigkeit der Löslichkeit des Hydroxylapatits von der Einwaage wird wegen der sehr geringen Teilchengröße des Apatits beim Auflösen in Wasser durch Oberflächenerscheinungen verursacht werden. Eine derartige Annahme machen auch Schleede u. Mitarbeiter⁷⁾ zur Deutung ihrer Versuche für die Citronensäurelöslichkeit von Phosphaten. Die Tatsache, daß das Verhältnis von Ca:PO₄ in der Lösung dem sek. Calciumphosphat entspricht, könnte auf einer Einwirkung von Kohlendioxyd, das sich während des Einfüllens des Leitfähigkeitswassers in die Schüttelflasche oder während des Filtrierens der Lösungen darin auflöst, beruhen⁹⁾. Sicher werden auch hydrolytische Vorgänge eine Rolle spielen. So können die aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Phosphat-Ionen nach der Gleichung: $\text{PO}_4''' + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HPO}_4'' + \text{OH}'$ reagieren. Die dabei frei werdenden Hydroxyl-Ionen werden auf Grund des Massenwirkungsgesetzes die Auflösung der Hydroxylgruppen aus dem Hydroxylapatit-Molekül hemmen und so die Verschiebung des Verhältnisses Ca:PO₄ bewirken. Derartige hydrolytische Erscheinungen bei der Auflösung von Calciumphosphaten in Wasser hat auch A. Rindell¹⁰⁾ festgestellt.

Aus Lösungsversuchen, die mit gleichbleibender Einwaage bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wurden, läßt sich die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit des Hydroxylapatits in Wasser erkennen (s. Tafel 2).

⁷⁾ A. Schleede, B. Meppen u. O. B. Jörgensen, Angew. Chem. **52**, 316 [1939].

⁸⁾ I. D'Ans, F. Pohle u. W. Schuppe, Ztschr. Pflanzenernährg., Düng. Bodenkunde Abt. A **32**, 70 [1933].

⁹⁾ W. Rathje, Dissertat. Leipzig 1936 (D 15).

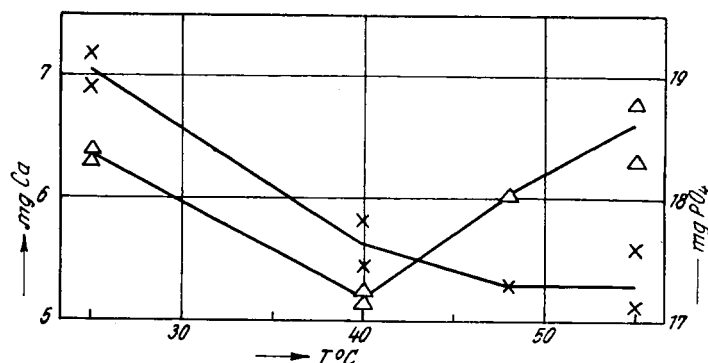
¹⁰⁾ Akad. Abhandlgn. Helsingfors [1899].

Tafel 2. Temperaturabhängigkeit der Auflösung von Hydroxylapatit in Wasser.

t°C	Einwaage mg Hydroxylapatit/250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca:PO ₄
25	100	3.62	8.59	1:1.00
40	100	2.75	7.39	1.13
25	570*)	6.40	19.20	1.26
25	570	6.31	18.90	1.26
40	570	5.25	17.45	1.40
40	570	5.15	17.84	1.46
48	570	6.03	17.30	1.21
55	570	6.30	17.11	1.15
55	570	6.79	17.60	1.09

*) Wegen der Einwaage von 570 mg s. S. 379.

Die Calciummengen durchlaufen bei 40° ein deutliches Minimum, während die Phosphat-Ionen-Konzentrationen der Lösungen mit steigender Temperatur stetig, wenn auch nur wenig, abnehmen (s. Abbild. 1). Eine Erklärung dieser Verhältnisse läßt sich mit Hilfe der Hydrolyse allein nicht geben und kann vielleicht bei Vorliegen von weiteren Versuchsergebnissen erfolgen.



Abbild. 1. Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Hydroxylapatit (vergl. Tafel 2).

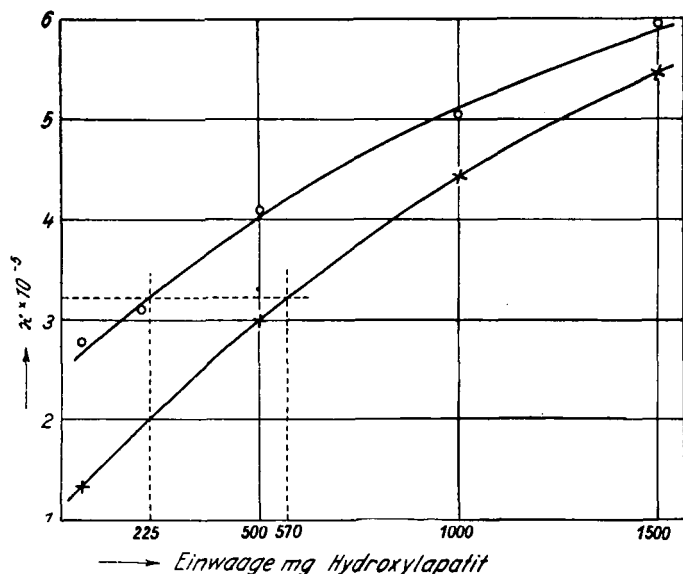
Δ mg Ca gelöst; x mg PO₄ gelöst.

Es sind von verschiedenen Seiten Versuche unternommen worden, das Löslichkeitsprodukt von tertiärem Calciumphosphat in Wasser zu berechnen¹¹⁾. Im Hinblick auf die S. 374 gemachte Bemerkung über die Natur des tertiären Calciumphosphats und auf die verwickelten hydrolytischen Verhältnisse im Zusammenhang mit Oberflächenerscheinungen, die bei der Auflösung von reinstem Hydroxylapatit in Wasser festgestellt wurden, sind derartige Berechnungen hinfällig. So teilen auch Holt u. Mitarbeiter¹¹⁾ mit, daß das Löslichkeitsprodukt des tertiären Calciumphosphats nicht konstant ist.

¹¹⁾ L. E. Holt, V. K. La Mer u. H. B. Chown, Journ. biol. Chem. **64**, 509 [1925]; B. Hastings u. J. Sendroy, Journ. biol. Chem. **71**, 783 [1927]; M. A. Logan u. H. L. Taylor, Journ. biol. Chem. **119**, 293 [1937].

Leitfähigkeitsmessungen in wäßrigen Hydroxylapatit-Lösungen.

Die Leitfähigkeitsmessungen sind in Lösungen ausgeführt worden, die durch 24-stdg. Schütteln einer bestimmten Menge von Hydroxylapatit in Leitfähigkeitswasser erhalten wurden. Alle Messungen beziehen sich auf eine Temperatur von 25°. Bei der Aufzeichnung der Ergebnisse sind in Spalte 1 der Tafel 3 die spezifischen Leitfähigkeiten der wäßrigen Apatit-Lösungen nach dem Schütteln angegeben. Alle Einzelergebnisse sind Mittelwerte, die aus einer Anzahl von Messungen erhalten wurden. In Spalte 2 findet sich dann die spezifische Leitfähigkeit, die durch die Calcium-, Phosphat- u. Hydroxyl-Ionen in der Lösung hervorgerufen wird, nach Abzug der spezifischen Leitfähigkeit von $\kappa = 0.165 \cdot 10^{-5}$ rez. Ohm des verwendeten Leitfähigkeitswassers von den Werten in Spalte 1. Die Leitfähigkeitswerte sind in rez. Ohm ausgedrückt. Die Versuchsergebnisse in Spalte 2 sind in Abbild. 2 graphisch dargestellt.



Abbild. 2. Abhängigkeit der spez. Leitfähigkeit von Hydroxylapatit in Wasser und 1-proz. wässr. Glykoll-Lösung von der Einwaage an Hydroxylapatit. vergl. Tafel 3 und 6.

x Wasser. o 1-proz. Glykoll-Lsg.

Tafel 3. Leitfähigkeitsmessungen in wäßrigen Apatit-Lösungen bei 25° (s. Abbild. 2).

Einwaage mg Hydroxylapatit/250 ccm	1 $\kappa \times 10^5$	2 $\kappa \times 10^5$
50	1.50	1.34
500	3.18	3.02
1000	4.61	4.44
1500	5.63	5.47

Die Werte für die spez. Leitfähigkeit steigen in der gleichen Weise wie die Werte für die Löslichkeit mit steigender Einwaage an Hydroxylapatit an, wodurch die Versuchsergebnisse gegenseitig gestützt werden.

II. Hydroxylapatit und wäßrige Aminosäure-Lösungen.

Die Bestimmung der Auflösung von Hydroxylapatit in wäßrigen Aminosäure-Lösungen geschah in der gleichen Weise wie für Wasser beschrieben. Nach dem Eindampfen der filtrierten Lösungen in einer Platinschale wurde die organische Substanz durch Glühen zerstört. Die Versuchsergebnisse mit Glykokoll und Alanin sind in den Tafeln 4 und 5 angegeben.

Tafel 4. Auflösung von Hydroxylapatit in 1-proz. wäßriger Glykokoll-Lösung.

t°C	Einwaage mg Hydroxylapatit/250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca:PO ₄
25	225*)	8.03	16.64	1:0.87
25	225	7.91	15.40	0.82
25	500	11.00	23.10	0.89
40	225	6.83	14.71	0.91
40	225	6.49	12.89	0.84

*) Wegen der Einwaage von 225 mg (s. S. 379).

Tafel 5. Auflösung von Hydroxylapatit in 2.5-proz. wäßriger Alanin-Lösung bei 40°.

Einwaage mg Hydroxylapatit/ 250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca/PO ₄	pH d. wäbr. Alanin-Lsgg.	pH d. Lsgg. n. d. Schütteln mit Hydroxylapatit
100	10.21	15.26	1:0.63	—	—
100	11.04	15.73	0.60	6.33	6.78
500	12.17	24.40	0.84	6.30	6.77
500	12.92	25.59	0.83	—	—
500	12.39	24.14	0.82	—	—

Wie in rein wäßriger Lösung, so nimmt auch hier mit steigender Einwaage die gelöste Menge zu. Weiterhin ist in den wäßrigen Aminosäure-Lösungen die Löslichkeit des Hydroxylapatits im Vergleich zur Löslichkeit im Wasser deutlich größer. Das Verhältnis Ca/PO₄ weicht fast immer von dem für Hydroxylapatit geforderten Verhältnis von 1:0.6 ab. Es geht jedoch verhältnismäßig nicht so viel Phosphat in Lösung wie in reinem Wasser, so daß das Verhältnis Ca/PO₄ bei beiden Aminosäuren im Durchschnitt sich auf 1:0.85 einstellt. Die Temperaturabhängigkeit der Auflösung in Glykokoll-Lösungen entspricht der in reinem Wasser; die Löslichkeit ist nämlich bei 40° kleiner als bei 25°.

Leitfähigkeitsmessungen wurden nur in Glykokoll-Lösungen ausgeführt. In Tafel 6 sind die Werte für die spezifischen Leitfähigkeiten der Glykokoll-Lösungen des Hydroxylapatits in Spalte II aufgezeichnet. Aus Spalte III ersieht man die Leitfähigkeitswerte, welche durch die Calcium- und Phosphat-Ionen in der Lösung hervorgerufen werden, nach Abzug der spezifischen Leitfähigkeit der 1-proz. reinen Glykokoll-Lösung, die im Mittel den Wert $\kappa = 0.79 \cdot 10^{-5}$ rez. Ohm hat. Die Versuchsergebnisse in Spalte III sind als Funktion der Einwaage in Abbild. 2 dargestellt.

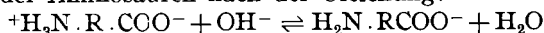
Tafel 6. Leitfähigkeit von Hydroxylapatit in 1-proz. Glykokoll-Lösungen bei 25°.

I Einwaage mg Hydroxylapatit 250 ccm	II $\kappa \times 10^5$	III $\kappa \times 10^5$	pH der wäßrigen Glykokoll-Lösungen	pH der Lösungen nach dem Schütteln mit Hydroxylapatit
50	3.56	2.77	—	—
200	3.88	3.09	—	—
500	4.88	4.09	6.34	6.82
1000	5.83	5.04	6.35	6.83
1500	6.75	5.96	—	—

Die Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen gehen mit denjenigen der Löslichkeitsversuche von Hydroxylapatit in Aminosäure-Lösungen Hand in Hand und beweisen die Zunahme der Löslichkeit mit steigender Einwaage und damit verbunden den Anstieg der Leitfähigkeit. Entsprechend der größeren Löslichkeit des Apatits in Glykokoll-Lösungen gegenüber reinem Wasser ist auch die Leitfähigkeit der Glykokoll-Lösungen entsprechend größer, wie dies aus Abbild. 2 deutlich hervorgeht.

Obwohl in der Literatur mehrfach komplexe Glykokoll-Calcium-Verbindungen erwähnt werden¹²⁾, so kann infolge der beobachteten höheren Leitfähigkeit in den wäßrigen Glykokoll-Lösungen gegenüber Wasser (s. Tafel 3 und 6) die Löslichkeitserhöhung von Hydroxylapatit in Glykokoll-Lösungen nicht auf einer derartigen Komplexbildung beruhen. Dies ergibt sich auch aus folgenden Darlegungen: Zieht man in Abbild. 2 willkürlich bei der spezif. Leitfähigkeit $\kappa = 3.22 \times 10^{-5}$ rez. Ohm eine Parallele zur Abszissenachse und fällt man von den Schnittpunkten dieser Geraden mit den beiden Kurvenzügen jeweils die Lote, so schneiden diese die Abszissenachse bei den Einwaagen 225 bzw. 570 mg. Es wurden also Lösungen mit den entsprechenden Einwaagen an Hydroxylapatit in Wasser und 1-proz. Glykokoll-Lösung bei 25° hergestellt und das in Lösung gegangene Calcium und Phosphat bestimmt. Das Ergebnis ist aus den Tafeln 2 und 4 (s. S. 376 und 378) zu sehen. Bei 570 mg Einwaage an Hydroxylapatit enthielt die reine wäßrige Lösung im Mittel 6.35 mg Calcium/l und 19.05 mg PO_4/l gelöst. Dagegen war in der 1-proz. Glykokoll-Lösung bei 225 mg Einwaage 7.97 mg Ca/l und 16.02 mg PO_4/l in Lösung gegangen. In der wäßrigen Glykokoll-Lösung befindet sich also nur ein Viertel Calcium mehr als in der reinen wäßrigen Lösung, dafür aber ein Fünftel der Phosphatmenge weniger. Die Summe von Calcium + Phosphat ist also in beiden Lösungen ungefähr die gleiche. Wenn nun wirklich in der Glykokoll-Lösung ein nennenswerter Betrag an Calcium komplex gebunden vorläge, dann dürfte die spezifische Leitfähigkeit auf keinen Fall mit derjenigen der wäßrigen Lösung übereinstimmen. Sie müßte vielmehr kleiner sein, da ja andererseits angenommen werden kann, daß in der wäßrigen Lösung alles gelöste Calcium in ionisierter Form vorliegt. Daraus folgt, daß im Bereiche biologischer Calcium-Konzentrationen bei Gegenwart von Aminosäuren alles Calcium in Ionen-Form vorliegt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von O. Harnapp¹³⁾, der die Calcium-Ionenkonzentration in ähnlichen Lösungen festzustellen suchte.

Während der pH -Wert der angewandten reinen wäßrigen Aminosäure-Lösungen bei pH 6.32 lag, war der pH -Wert der Lösungen nach dem Schütteln mit Hydroxylapatit um rund 0.5 pH -Einheiten gestiegen. Es werden also die aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Hydroxyl-Ionen mit den Zwitter-Ionen der Aminosäuren nach der Gleichung:



unter Bildung von Wasser und negativer Ladung der Aminosäure reagieren. Da die anfangs aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Hydroxyl-Ionen verschwinden, so müssen neue Hydroxyl-Ionen aus dem Hydroxylapatit nachgeliefert werden, bis Gleichgewicht eingetreten ist. Mit diesen Hydroxyl-Ionen lösen sich dann auch mehr Calcium- und Phosphat-Ionen als in Wasser

¹²⁾ E. Freudenberg u. O. Budde, Ztschr. ges. exp. Med. **42**, 284 [1924]; C. W. Davies, Journ. chem. Soc. London **1938**, 277.

¹³⁾ Klin. Wschr. **49**, 1731 [1938].

auf. Durch die puffernde Wirkung der Aminosäuren werden die hydrolytischen Vorgänge, wie sie sich im rein wäßrigen System abspielen, zurückgedrängt, und daher nähert sich das Verhältnis von $\text{Ca}:\text{PO}_4$ dem des Hydroxylapatits. Es ergibt sich also als Erklärung für die in wäßrigen Aminosäure-Lösungen stärkere Auflösung des Hydroxylapatits gegenüber reinem Wasser, daß es sich hierbei mit größter Wahrscheinlichkeit nicht um eine Komplexbildung handelt, sondern daß diese Löslichkeitserhöhung hervorgerufen wird durch eine Verschiebung des protolytischen Gleichgewichtes der Aminosäure infolge deren Reaktion mit den Hydroxyl-Ionen, die einerseits aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehen und andererseits durch Hydrolyse der Phosphat-Ionen mit dem Wasser entstehen.

III. Das Verhalten von Hydroxylapatit gegenüber Gelatine.

Die Kenntnis des Verhaltens des Hydroxylapatits in Gelatine ist von Bedeutung wegen der Tatsache, daß Hydroxylapatit den Hauptbestandteil der anorganischen Knochensubstanz bildet²⁾. Da früher angenommen wurde, daß die Knochensubstanz tertiäres Calciumphosphat enthielte, sind auch schon von anderer Seite derartige Löslichkeitsversuche ausgeführt worden¹⁴⁾. Diese Untersuchungsergebnisse sind aus folgenden Gründen als unbrauchbar zu betrachten: Das von W. Pauli u. M. Samec benutzte tertiäre Calciumphosphat ist keine definierte Verbindung⁴⁾, und das Handelsprodukt wird nach der Fällung zum Zwecke des Trocknens auf mehrere 100° erhitzt. Demgegenüber bildet sich die Knochensubstanz bei einer Temperatur von 37°. Um also Modellversuche auszuführen, muß man einen Hydroxylapatit verwenden, der bei einer der Körpertemperatur vergleichbaren Temperatur hergestellt wurde (s. S. 374). Ferner benutzten W. Pauli und M. Samec gewöhnliche Gelatine. Deren beträchtliche Asche enthält insbesondere sehr viel Calcium und reichlich Phosphat. Da anzunehmen ist, daß diese beiden Ionen-Arten auf den in Lösung gehenden Hydroxylapatit nach dem Massenwirkungsgesetz einwirken werden, so muß also eine vollkommen gereinigte Gelatine zur Anwendung kommen. Es wurde daher photographische Gelatine nach dem Verfahren von I. Knaggs, A. Manning und G. Schryver¹⁵⁾ gereinigt, so daß die reine Gelatine einen Aschegehalt von nur 0.01% aufwies.

Die Löslichkeitsversuche mit den im vorstehenden beschriebenen Stoffen wurden in gleicher Weise ausgeführt, wie auf S. 374 und S. 378 dargelegt ist. Als Versuchstemperatur wurde 40° gewählt, da diese genügend nahe bei der Körpertemperatur von 37° liegt, und hierbei Abweichungen in der Löslichkeit kaum zu erwarten sind.

Wie aus Tafel 7 hervorgeht, ist der Anteil der gelösten Substanz beträchtlich größer als in reinem Wasser oder in Aminosäure-Lösungen (vergl. Tafeln 1, 2, 4 und 5). Auch bei der Gelatine-Lösung ergibt sich eine Zunahme des Gelösten mit steigender Einwaage an Hydroxylapatit. Das Verhältnis von $\text{Ca}:\text{PO}_4$ entspricht sehr nahe dem für Hydroxylapatit geforderten Wert von 1:0.60. Daraus folgt, daß hier der Apatit als solcher in Lösung geht. Die Abweichungen zweier Versuche mit gleicher Einwaage und Schütteldauer beruhen wahrscheinlich auf den kolloiden Eigenschaften

¹⁴⁾ W. Pauli u. M. Samec, *Biochem. Ztschr.* **17**, 235 [1909].

¹⁵⁾ *Biochem. Journ.* **17**, 473 [1923].

Tafel 7. Auflösung von Hydroxylapatit in 1-proz. wäßriger Gelatine-Lösung bei 40°.

Schüttelzeit Stdn.	Einwaage mg Hydroxylapatit	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca : PO ₄
24	50	34.64	47.61	1 : 0.593
24	50	32.72	45.52	0.587
24	100	36.92	51.52	0.588
24	100	39.92	54.85	0.579
24	500	44.32	—	—
24	500	48.65	70.10	0.607
24	1000	53.34	76.48	0.605
24	1000	65.56	89.49	0.576
72	100	42.56	62.84	0.622
72	500	50.28	69.00	0.578
bei 25° 24	500	43.60	67.50	1 : 0.653

des untersuchten Systems, da eine sehr feine Verteilung des Hydroxylapatits bei der Auflösung in der Gelatine-Lösung stattfindet.

Infolge dieser unkontrollierbaren Abweichungen muß von reihenmäßigen Leitfähigkeitsmessungen Abstand genommen werden. Es mag jedoch eine Messung angeführt werden, die aus zwei unabhängigen Ansätzen mit 500 mg Einwaage in 1-proz. Gelatine-Lösung bei 25° erhalten wurde (s. Tafel 7 unten). Es wurden die spezifischen Leitfähigkeiten $\kappa = 17.87 \times 10^{-5}$ bzw. 17.34×10^{-5} , also im Mittel 17.60×10^{-5} rez. Ohm, gefunden. Nach Abzug der Eigenleitfähigkeit der wäßrigen 1-proz. Gelatine-Lösung, welche im Mittel $\kappa = 1.68 \times 10^{-5}$ rez. Ohm betrug, ergibt sich für die Leitfähigkeit der anorganischen Ionen allein $17.60 - 1.68 = 15.92 \times 10^{-5}$ rez. Ohm. Demnach ist mit der Löslichkeitserhöhung in 1-proz. Gelatine-Lösung gegenüber reinem

Tafel 8. Vergleich der erhaltenen Löslichkeits- und Leitfähigkeitswerte in der 1-proz. Glykokoll-Lösung mit den entsprechenden Werten für die 1-proz. Gelatine-Lösung bei 25° (vergl. Tafel 4, 7 und Abbild. 2).

Lösungsmittel	Einwaage mg Hydroxyl- apatit	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	$\kappa \times 10^5$
1-proz. Glykokoll-Lösung	225	8.03	16.64	3.22
	225	7.91	15.40	
1-proz. Gelatine-Lösung	500	43.60	67.50	15.92

Wasser und wäßrigen Glykokoll-Lösungen auch ein erheblicher Anstieg der spezif. Leitfähigkeit verbunden. Aus Tafel 8 ergibt sich, daß die Werte für die Löslichkeit und die spezif. Leitfähigkeit in einer Gelatine-Lösung etwa das 5-fache der Werte einer Glykokoll-Lösung betragen. Deshalb möge mit allem Vorbehalt der Schluß gezogen werden, daß entgegen früheren Ansichten^{3) 12)}, auch in Gelatine-Lösungen im Bereiche biologischer Calciumkonzentrationen keine Komplexsalzbildung eintritt.

In den Gelatine-Lösungen steigt der p_H-Wert von p_H 5.28 der reinen wäßrigen Gelatine-Lösung auf p_H 6.19 nach dem Schütteln mit Hydroxylapatit. Demnach beruht die Löslichkeitserhöhung von Hydroxylapatit in wäßriger Gelatine-Lösung ebenfalls auf der Bindung der aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Hydroxyl-Ionen durch das Gelatine-Molekül. Alle hier be-

obachteten Erscheinungen lassen sich in genau der gleichen Weise, wie es auf S. 378 für Aminosäuren beschrieben ist, erklären.

Die eben angeführten Beobachtungen wurden weiter durch Diffusionsversuche erhärtet. Zu diesem Zwecke wurde eine Lösung von Hydroxylapatit in einer 1-proz. wäßrigen Gelatine-Lösung in einen Dialysierschlauch aus Cellophan gefüllt, der während des Diffusionsversuches in einem mit Wasser gefüllten Becherglas rotierte. Das Ganze befand sich in einem Thermostaten eingebaut, welcher auf 40° angeheizt war. Nach 24 bzw. 72 Stdn. wurde sowohl im Inhalt der Hülse als auch im vorgelegten Wasser Calcium und Phosphat bestimmt (s. Tafel 9).

Tafel 9. Diffusionsversuche.

Nr.	Diffusionsdauer Stdn.	Einwaage mg Hydroxylapatit	ccm vorgel. Wasser	diffundiert			nicht diffundiert			Gesamt		
				mg Ca/250 ccm	mg PO ₄ /250 ccm	Ca/PO ₄	mg Ca/250 ccm	mg PO ₄ /250 ccm	Ca/PO ₄	mg Ca/250 ccm	mg PO ₄ /250 ccm	Ca/
1.	24	100	875	3.38	9.24	1:1.15	6.79	4.45	1:0.27	10.17	13.69	1:0.
2.	24	100	875	3.82	9.66	1.07	7.03	4.57	0.27	10.85	14.23	0.
3.	24	100	875	3.21	7.02	1:0.92						
	24		875	1.09	—	—						
	24		875	0.41	—	—	5.75	3.77	1:0.27	10.46	—	—
4.	20	500	875	3.87	10.30	1:1.12	7.45	4.80	1:0.27	11.32	15.10	1:0.

Laut Tafel 9 zeigen die beiden darin an erster Stelle aufgeführten Versuche eine gute Reproduzierbarkeit. Der Versuch 3 wurde so durchgeführt, daß die Außenflüssigkeit nach je 24 Stdn. erneuert wurde, so daß erst nach insgesamt 72 Stdn. der Versuch abgebrochen und auch der nicht diffundierte Anteil bestimmt wurde. Insgesamt sind die diffundierten Beträge größer als bei den Versuchen 1 und 2, aber die beobachteten Verhältniszahlen Ca/PO₄ zeigen völlige Übereinstimmung. Auch eine Änderung der Konzentration der Hydroxylapatit-Lösung, hervorgerufen durch Schütteln einer größeren Menge, bewirkt keine Verschiebung der eben erwähnten Verhältnisse, wie aus Versuch 4 hervorgeht.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß der größere Teil des Calciums, nämlich $\frac{2}{3}$ der Gesamtmenge, in der Gelatine-Lösung zurückbleibt, während $\frac{1}{3}$ der insgesamt vorhandenen Phosphatmenge diffundieren. Es verhält sich das zurückgebliebene Calcium zum Phosphat wie 1:0.27. Bemerkenswert ist die Konstanz dieses Verhältnisses. Nach 24 Stdn. diffundiert kein nennenswerter Betrag an Calcium mehr in das Wasser hinein (vergl. Versuch Nr. 3).

Die aus Tafel 9 erkennbare stärkere „Bindung“ des Calciums an die Gelatine läßt sich an Hand der Reaktionsgleichung, welche für die Auflösung von Hydroxylapatit in Aminosäuren und Gelatine angenommen wurde (vergl. S. 379), ableiten. Hiernach bleibt das neutrale Zwitter-Ion nach der Reaktion mit Hydroxylapatit negativ aufgeladen zurück. Es wird sich demnach bei den gemachten Beobachtungen um eine Einwirkung der negativ geladenen Oberfläche der Gelatineteilchen auf die Calcium-Ionen handeln, die infolge elektrostatischer Kräfte festgehalten werden.

Die beschriebenen Diffusionsversuche sind deshalb bedeutungsvoll, weil eine bevorzugte Bindung des Calciums an das Knorpelgewebe im

Körper von mehreren Forschern angenommen wird¹⁶⁾. Ob es sich hierbei um eine wirkliche chemische Bindung des Calciums an das Eiweiß handelt, oder ob Adsorption angenommen werden muß, war nicht entschieden. Nach den vorliegenden Ergebnissen der Diffusionsversuche, in Verbindung mit den Löslichkeitsversuchen und Leitfähigkeitsmessungen von Hydroxylapatit in Gelatine-Lösungen, wäre die bevorzugte Bindung des Calciums eher als eine Adsorptionserscheinung anzusehen, die durch elektrostatische Kräfte bedingt ist.

IV. Das Verhalten des Hydroxylapatits in Tyrode-Lösung und in Serum.

Es war weiterhin interessant zu erfahren, wie sich der Hydroxylapatit einer physiologischen Lösung gegenüber verhält. Deshalb wurden Löslichkeitsversuche von Hydroxylapatit in Tyrode-Lösung und gleiche Versuche mit einem Zusatz von 1% Gelatine ausgeführt. Die Tyrode-Lösung enthält 0.8% NaCl, 0.1% NaHCO₃, 0.02% KCl, 0.02% CaCl₂·6H₂O, 0.005% Na₂HPO₄·12H₂O. Da diese Lösung schon Calcium und Phosphat gelöst enthält, mußte eine Wechselwirkung mit den aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Ionen erwartet werden. In Tafel 10 ist der Calcium- und Phosphatgehalt der reinen Tyrode-Lösung verzeichnet, und die Calcium- und Phosphat-Konzentration der mit Hydroxylapatit geschüttelten reinen sowie der mit Gelatine versetzten Tyrode-Lösung angegeben.

Tafel 10. Lösungsversuche von Hydroxylapatit in Tyrode-Lösung.

Schüttelzeit Stdn.	Gelatine %	Einwaage Hydroxylapatit mg	Gesamt-Ca/l mg	Gesamt-PO ₄ /l mg	Ca : PO ₄
24	0	100	23.96	7.08	1:0.13
24	0	100	23.44	7.36	0.13
24	1	50	37.80	19.36	1:0.22
24	1	100	34.52	18.24	0.22
24	1	100	34.36	18.88	0.23
24	1	500	26.04	18.08	0.29
24	1	500	27.76	22.76	0.35
24	1	1000	21.12	25.32	0.51
72	1	100	34.52	16.32	0.20

In der Tyrode-Lösung: 38.12 mg Ca/l; 17.28 mg PO₄/l Ca : PO₄ = 1 : 0.19.

Nach dem Schütteln der Tyrode-Lösung mit Hydroxylapatit befindet sich in der wäßrigen Lösung weniger Calcium und viel weniger Phosphat als ursprünglich in der Tyrode-Lösung vorhanden war. Demnach ist sowohl Calcium als auch Phosphat aus der Lösung in den Bodenkörper übergegangen. Wenn derselbe Versuch unter Zusatz von 1% Gelatine ausgeführt wird, dann kann die Tyrode-Lösung an Calcium und Phosphat nicht übersättigt sein, denn es lösen sich in der reinen Gelatine-Lösung ungefähr gleiche Mengen Calcium

¹⁶⁾ R. Schwarz, R. Eden u. E. Hermann, *Biochem. Ztschr.* **149**, 100 [1924]; Pfaundler, *Jb. Kinderheilkunde* **60**, 123 [1904]; E. Freudenberg u. P. György, *Biochem. Ztschr.* **110**, 290 [1920]; **115**, 96 [1921], **118**, 50 [1921].

und größere Mengen Phosphat auf als in der Tyrode-Lösung vorliegen (s. Tafel 7). Trotzdem tritt eine geringe Calcium-Fällung ein und es geht nur sehr wenig Phosphat aus dem Hydroxylapatit in Lösung. Aus den Versuchen folgt, daß die Tyrode-Lösung mit Bezug auf Hydroxylapatit übersättigt ist und daß diese Übersättigung auch bei Anwesenheit von Gelatine erhalten bleibt. Es sollen in diesem Zusammenhange noch zwei Versuche mit Serum¹⁷⁾ mitgeteilt werden.

Tafel 11. Löslichkeit von Hydroxylapatit in Serum.

	Ein- waage Hydr- oxyl- apatit mg	Ca/l nachdem Schüt- teln mg	PO ₄ /l nachdem Schüt- teln mg	Ca:PO ₄	Ca/l Serum mg	PO ₄ /l Serum mg	Ca:PO ₄
Pferdeserum	500	62.48	199.60	1:1.35	110.60	240.12	1:0.92
Diphtherieserum . . .	500	33.08	75.68	1:0.97	0	23.52	—
Aus dem Hydroxyl- apatit sind daher in Lsg. gegangen.			—23.52				
		33.08	52.16	1:0.66			

Nichtdialysiertes Pferdeserum, das außer anderen Ionen Calcium und Phosphat in den angegebenen Mengen enthielt, bzw. dialysiertes Serum, das frei von Calcium war, wurden mit je 500 mg Hydroxylapatit geschüttelt. Nach dem Schütteln enthielt das nichtdialysierte Serum weniger Calcium und weniger Phosphat als vor dem Schütteln, während bei dem dialysierten Serum Apatit in Lösung gegangen war, und zwar 33.08 mg Calcium und 52.16 mg PO₄. Es zeigt also das nichtdialysierte Serum wiederum die Erscheinung der Übersättigung in bezug auf Hydroxylapatit, wodurch die Versuche mit Tyrode-Lösung gestützt werden. Aus diesen wenigen Versuchen folgt also die physiologisch außerordentlich wichtige Beobachtung, daß das Körperserum an Hydroxylapatit offenbar übersättigt ist. Der Hydroxylapatit der anorganischen Knochensubstanz kann also im Serum nicht aufgelöst werden, was für die Beständigkeit des Knochens im Körper von ausschlaggebender Bedeutung ist.

V. Die Auflösung von Hydroxylapatit in organischen Säuren.

Organische Säuren sind in den Kreis der Untersuchungen einbezogen worden, weil einige Phosphatdüngemittel auf Grund der Löslichkeit der Phosphorsäure in Citronensäure-Lösung bewertet werden. Dabei kamen wäßrige Propionsäure- bzw. Milchsäure-Lösungen in Anwendung, die einer 2-proz. wäßrigen Citronensäure-Lösung äquimolekular waren. Die Lösungsversuche wurden in üblicher Weise durch Schütteln der geeigneten Einwaagen an Hydroxylapatit bei 40° mit je 250 ccm der betreffenden Säure-Lösung ausgeführt.

Grundsätzlich geht der Hydroxylapatit in allen Fällen als solcher in Lösung (s. Tafel 12). Auch in diesen Lösungen ist eine Zunahme des gelösten

¹⁷⁾ Für die zu diesen Untersuchungen freundlichst zur Verfügung gestellten Sera sei der I. G. Farbenindustrie A.-G. an dieser Stelle bestens gedankt.

Tafel 12. Auflösung von Hydroxylapatit in wäßrigen, einer 2-proz. Citronensäure-Lösung äquimolekularen Propion- bzw. Milchsäure-Lösungen bei 40°.

Zeit Minuten	Einwaage mg Hydroxylapatit /250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca : PO ₄
a) Propionsäure				
30	500	598.3	849.1	1 : 0.60
30	500	541.9	797.4	0.62
30	1000	1189	1651	0.59
30	1000	1202	1625	0.57
30	2000	1614	2064	0.54
30	2000	1638	2090	0.54
30	4000	1763	2321	0.55
30	4000	1749	2307	0.56
30	8000	1827	2372	0.55
60	1000	1110	1574	1 : 0.60
60	1000	1130	1581	0.59
b) Milchsäure				
30	2000	2775	3860	1 : 0.59
30	2000	2970	4095	0.58
30	4000	5050	6980	0.58
30	4000	5080	7105	0.59
30	8000	5680	7830	0.58

Anteils mit steigender Einwaage zu verzeichnen, die wohl auch durch Oberflächenerscheinungen verursacht wird.

Beim Übergang von einer gewöhnlichen Fettsäure wie Propionsäure bzw. von einer Oxsäure, z. B. Milchsäure, zur entsprechenden Aminosäure, also Alanin, zeigt sich ein starker Abfall der Löslichkeit des Hydroxylapatits (s. Tafel 13). Dieser Abfall zeigt sich auch bei dem Übergang von Anthranilsäure $C_6H_4(NH_2) \cdot CO_2H$ zu Dimethylantranilsäure $(CH_3)_2N \cdot C_6H_4 \cdot CO_2H$.

Tafel 13. Vergleich der Auflösung von Hydroxylapatit in echten organischen Säuren mit der Auflösung in Aminosäure-Lösungen.

	Einwaage mg Hydroxylapatit /250 ccm	mg Ca/l	mg PO ₄ /l	Ca : PO ₄
Propionsäure	500	598.3	849.1	1 : 0.60
$CH_3 \cdot CH_2 \cdot CO_2H$	500	541.9	797.4	0.62
Milchsäure	2000	2775	3860	1 : 0.59
$CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO_2H$	2000	2970	4095	0.58
Alanin	500	12.17	24.40	1 : 0.84
$CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot CO_2H$	500	12.92	25.59	0.83
Anthranilsäure	500	173.8	248.9	1 : 0.604
$H_2N \cdot C_6H_4 \cdot CO_2H$	500	175.0	251.1	0.605
Dimethyl-anthranil- säure	500	8.49	13.42	1 : 0.667
$(CH_3)_2N \cdot C_6H_4 \cdot CO_2H$				

Nach R. Kuhn¹⁸⁾ ist die Anthranilsäure nicht vergleichbar mit Glykokoll und Alanin, denn sie bildet keine Zwitter-Ionen und ist also noch eine, wenn auch ziemlich schwache, Säure. Daher ist Hydroxylapatit in Anthranilsäure-Lösung gut löslich, und zwar als solcher, wie aus dem in Tafel 13 angeführten Verhältnis $\text{Ca}:\text{PO}_4=1:0.604$ hervorgeht. Mit zunehmender Methylierung der Aminogruppe tritt infolge Verstärkung des basischen Charakters dieser Gruppe in steigendem Maße Zwitter-Ionen-Bildung ein, so daß die Dimethylantranilsäure echte Zwitter-Ionen bildet und damit mit Glykokoll und Alanin vergleichbar wird. Wie aus Tafel 13 hervorgeht, sinkt damit die Löslichkeit des Hydroxylapatits in der wäßrigen Lösung von Dimethylantranilsäure zu ähnlichen Werten, wie sie in Glykokoll- und Alanin-Lösung gefunden worden sind. Auch geht der Hydroxylapatit nicht mehr als solcher in Lösung, sondern das Verhältnis von $\text{Ca}:\text{PO}_4$ verschiebt sich zu einem höheren als für diesen gültigen Wert, wie dies auch bei Glykokoll und Alanin gefunden wurde (s. Tafel 4 u. 5).

Es beruht hiernach die starke Löslichkeit in organischen Säuren offenbar auf der Säurestärke bzw. der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, die bei den Säuren groß, bei Glykokoll, Alanin und Dimethylantranilsäure als Zwitter-Ionen dagegen sehr gering ist. Der Unterschied zwischen der Löslichkeit des Hydroxylapatits in Propionsäure und der in Milchsäure läßt sich ebenfalls auf deren verschiedene Säurestärke zurückführen.

Die auffallend hohe Löslichkeit des Hydroxylapatits in Milchsäure (vergl. Tafel 12 u. 13) ist von großer Bedeutung für die insbesondere von zahnmedizinischer Seite her vorgetragene Ansicht über den Zusammenhang zwischen Zahncaries und Milchsäuregehalt des Speichels. So haben z. B. I. W. Trask und Mitarbeiter¹⁹⁾ einen besonders starken Angriff der Milchsäure im Vergleich zu anderen organischen Säuren auf die Zahnschmelzsubstanz, die nach den Untersuchungen von R. Klement²⁰⁾ fast vollständig aus Hydroxylapatit besteht, festgestellt.

Zusammenfassung.

1) Gegenüber Wasser verhält sich Hydroxylapatit einer definierten Herkunft bezüglich seiner Löslichkeit nicht wie ein normales Salz, d. h. er löst sich nicht kongruent auf.

2) Die höhere Löslichkeit des Hydroxylapatits in wäßrigen Aminosäure- und Gelatine-Lösungen gegenüber Wasser beruht auf einer Verschiebung des protolytischen Gleichgewichts infolge der Bindung der aus dem Hydroxylapatit in Lösung gehenden Hydroxyl-Ionen durch die Aminosäure bzw. Gelatine. In den Glykokoll-Lösungen liegt alles gelöste Calcium in Ionen-Form vor. Dies trifft wahrscheinlich auch für die Gelatine-Lösungen zu.

3) Die an Hand von Diffusionsversuchen festgestellte stärkere „Bindung“ des Calciums an die Gelatine wird durch elektrostatische Kräfte, die an der Oberfläche der kolloiden Gelatineiteilchen wirken, verursacht.

4) Lösungsversuche in Tyrode-Lösung und in Sera haben ergeben, daß das Körperserum an Hydroxylapatit übersättigt ist.

5) Die starke Löslichkeit von Hydroxylapatit in wäßrigen Propion- und Milchsäure-Lösungen beruht auf deren Säurestärke.

¹⁸⁾ R. Kuhn, Chem. Ztg. **60**, 858 [1936].

¹⁹⁾ I. W. Trask, E. E. Ziegler u. E. C. Maloof, Journ. Amer. dental Assoc. **27**, 1013 [1940].

²⁰⁾ R. Klement, B. **68**, 2012 [1935].