

78. Eugen Bamann und Elfriede Nowotny: Über die α -, β -Substrat-Spezifität bei der alkalischen Verseifung der Glycerin- α - und β -phosphorsäure im Ferment-Modell-Versuch*).

[Aus dem Pharmazeut. Institut der ehemaligen Deutschen Karls-Universität Prag.]
(Eingegangen bei der Redaktion der Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 16. Februar 1945.)

Es wurde untersucht, ob bei der alkalischen Verseifung von Glycerin- α - und β -phosphorsäure im Ferment-Modell-Versuch, nämlich in Anwesenheit gewisser Metallsalze, die beiden Isomeren gleich oder unterschiedlich rasch hydrolysiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigten die nach der vorstehenden Mitteilung zu erwartende „ α -, β -Substrat-Spezifität“: Im Falle der Lanthan- und der Cerglycerinphosphate verläuft die Verseifung des β -Esters bei pH 8 und 37° etwa doppelt so rasch als diejenige des α -Esters.

Bei der Einwirkung von Phosphatasen auf die Isomeren der Glycerinphosphorsäure wird meistens der α - oder der β -Ester rascher gespalten, je nach der Herkunft des Enzyms¹⁾. Diese Erscheinung bezeichnet man als α -, β -Substrat-Spezifität²⁾. Im Falle der nichtenzymatischen Verseifung sind dagegen Unterschiede in der Hydrolysengeschwindigkeit nicht bekannt: Gegenüber Hydroxyl-Ionen erweisen sich das α - und β -Isomere gleich widerstandsfähig und Wasserstoff-Ionen verseifen den α - und β -Ester mit praktisch gleicher Geschwindigkeit³⁾.

Zu diesen beiden Möglichkeiten der Verseifung kommt noch eine dritte, die Verseifung im Ferment-Modell-Versuch. Sie geht in alkalischem Medium in Anwesenheit gewisser Metallsalze, besonders der seltenen Erden, vor sich. Ihren Reaktionsmechanismus haben wir in der vorstehenden Abhandlung dahingehend geklärt, daß aus dem Metall-Ion oder Metallhydroxyd und dem Substrat sich hauptvalenzmäßig ein undissoziiertes Salz bildet, welches dann in die Hydrolyseprodukte zerfällt; das eigentliche Reaktionszwischenprodukt ist ein basisches Salz, das in kolloidalem Zustand reagiert.

Es ergibt sich nun die Frage, ob im Ferment-Modell-Versuch Glycerin- α - und β -phosphat gleichmäßig gut hydrolyzierbar sind, oder ob hier, ähnlich wie bei der enzymatischen Verseifung, eine der α -, β -Substrat-Spezifität entsprechende Erscheinung zu beobachten ist. Dies ist in der Tat der Fall. So

*) VIII. Mitteil. der in B. 71, 1711, 1980, 2086, 2233 [1938], B. 81 442, 451, 455 [1948] veröffentlichten Untersuchungsserie.

¹⁾ Allerdings darf man dieser Spezifität für die Charakterisierung einer Phosphatasen keinen zu großen Wert beimessen, da das Verhältnis der α : β -Hydrolysegeschwindigkeit bei einem Enzym derselben Herkunft mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen ist, je nach dem Enzymzustand (lyo-, desmo-Enzym) und dem zufälligen Mg⁺⁺-Gehalt der Lösungen. (E. Bamann u. W. Salzer, B. 70, 1263 [1937]; E. Bamann u. M. Meisenheimer in E. Bamann u. K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, New York 1945, S. 1640).

²⁾ Siehe z.B. H. Albers in F. F. Nord u. R. Weidenhagen, Handb. der Enzymologie, Leipzig 1940, S. 422 usw.

³⁾ Vergl. hierzu R. H. A. Plimmer, Biochem. Journ. 7, 72 [1913]; P. Fleury u. Z. Sutu, Bull. Soc. chim. France [4] 89, 1716 [1926]; I. I. Rae, H. D. Kay u. E. I. King, Biochem. Journ. 28, 143 [1934]; P. E. Verkade, I. C. Stoppelenburg u. W. D. Cohen, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 59, 886 [1940].

sehr dieses Ergebnis zunächst überrascht, so ist es doch bei konsequenter Verfolgung und Auswertung des dem Verseifungsvorgang zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus und bei Berücksichtigung bereits bekannter Tatsachen zu erwarten. Man kennt schon lange die ungleiche Löslichkeit gewisser Salze der Glycerin- α -bzw. β -phosphorsäure; von der schwereren Löslichkeit des Calcium- und Bariumsalzes der β -Estersäure macht man sogar bei der Isolierung und bei der präparativen Darstellung dieses Isomeren aus dem Isomerengemisch Gebrauch⁴⁾. Wenn sich die Löslichkeits-Unterschiede nicht auf die genannten, bisher vornehmlich beschriebenen Salze beschränken, was als unwahrscheinlich gelten darf, und wenn dem Chemismus der Verseifung wirklich Salzbildung zugrunde liegt, wird bei den Modell-Versuchen die Konzentration der zerfallbaren Zwischenverbindung bei der Glycerin- α - und β -phosphorsäure verschieden groß sein; dies hat aber ungleichen Umsatz der beiden Isomeren zur Folge. Wie im Enzym-Versuch die von der jeweiligen Affinität abhängende Konzentration der undissoziierten Enzym-Substrat-Verbindung und deren Zerfallsgeschwindigkeit die Umsetzungsgeschwindigkeit bestimmen, so müssen im Modell-Versuch die durch die Löslichkeitsverhältnisse mitbestimmte Konzentration des undissoziierten Salzes und seine Zerfallsgeschwindigkeit von Einfluß auf die Verseifungsgeschwindigkeit sein. Ob darüber hinaus und in welchem Umfang hier noch weitere Faktoren, wie äußere Zustandsform der Zwischenverbindung, ausschlaggebend sind, läßt sich gegenwärtig noch nicht beurteilen. Die nachstehende Tafel 1 veranschaulicht die beobachtete Erscheinung. Danach wird bei p_H 8 und 37° sowohl im Lanthan- als auch im Cer-Versuch der β -Ester rascher verseift.

Tafel 1. α -, β -Substrat-Spezifität im Ferment-Modell-Versuch bei p_H 8 und 37°
(Die Zahlen bedeuten % Umsatz).

Versuchs-Dauer	Lanthanglycerinphosphat (0.0002 Mol : 100 ccm)		Cerglycerinphosphat (0.0002 Mol : 100 ccm)	
	α	β	α	β
24 Stdn.	8.5%	13.0%	5.9%	10.4%

Beschreibung der Versuche.

Die Versuche erstreckten sich auf die Lanthan- und die Cer-glycerinphosphate. Sie sind bei 37° in den Konzentrationen 0.0002 und 0.002 Mol : 100 ccm sowie bei verschiedenen Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen durchgeführt worden. Die Estersalze wurden in den Versuchsaufzügen jeweils frisch gefällt durch Versetzen der Lösungen von Glycerin- α -phosphat (in Form von $C_3H_5O_4PCa + 2H_2O$ „Merck“) bzw. von Glycerin- β -phosphat (in Form von $C_3H_5O_4PNa_2 + 3H_2O$ „Merck“) mit Lösungen von $La(NO_3)_3 + 6H_2O$ „Merck“ bzw. $Ce(NO_3)_3 + 6H_2O$ „Merck“. Zum gegenseitigen Ausgleich an Ca^{++} und Na^+ enthielten die α -Versuche einen Zusatz an $CaCl_2 + 6H_2O$. Die Reaktionsbedingungen sind also auch in dieser Hinsicht vergleichbar. Die Einstellung von p_H nahmen wir erst nach dem Versetzen der Glycerinphosphat-Lösungen mit den Metallsalz-Lösungen vor; bei der üblichen Konzentration (0.0002 Mol : 100 ccm) bedurften die Versuche bei p_H 6 keines Zusatzes, diejenigen bei p_H 6.8 enthielten 0.8 ccm 0.1 n NH_3 , diejenigen bei p_H 8 und 9.5 5 ccm 2.5 n NH_4OH .

⁴⁾ O. Bailly, Journ. Pharm. et Chim. [7] 11, 204 [1915]; P. Karrer u. H. Salomon, Helv. chim. Acta 9, 3 [1926]; I. I. Rae, H. D. Kay u. E. I. King, Biochem. Journ. 28, 143 [1934] u. a.; s. a. S. Belfanti, A. Ercoli u. M. Francioli in E. Bamann u. K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, New York 1945, S. 93 usw.

NH_4Cl -Puffer mit pH 8 bzw. 9.5; die Versuche der 10-fach höheren Konzentration (0.002 Mol : 100 ccm), die nur bei pH 8 und 9.5 durchgeführt wurden, enthielten die 10-fache Menge Puffer-Lösung, nämlich je 50 ccm pro 100 ccm Ansatz. Als Maß der Verseifung diente die in Freiheit gesetzte Phosphorsäure, deren Bestimmung colorimetrisch wie in den vorgehenden Untersuchungen dieser Reihe erfolgte.

Die Versuchsergebnisse im Falle der Lanthan-glycerinphosphate sind in der Tafel 2, diejenigen im Falle der Cer-glycerinphosphate in der Tafel 3 zusammengestellt. Die Lanthan-Versuche zeigen, daß bei allen Versuchsbedingungen, unabhängig vom pH und vom Konzentrationsbereich, der β -Ester rascher verseift wird als der α -Ester. Bei pH 8 wird in den β -Versuchen bereits in 24 Stdn. ein Umsatz erzielt, zu dem in den α -Versuchen etwa 48 Stdn. notwendig sind: Die Verseifung des β -Esters verläuft also bei pH 8 und 37° etwa doppelt so rasch als diejenige des α -Esters. Bei pH 9.5 sind die Geschwindigkeitsunterschiede etwas geringer. Die Abweichungen im zeitlichen Verlauf der Verseifungen im schwächer und im stärker alkalischen Gebiet (pH 8 und 9.5) sind für diese Untersuchung ohne Belang.

Tafel 2. Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten von Lanthan-glycerin- α - und β -phosphat bei verschiedenen Konzentrationen u. verschiedenem pH (Die Zahlen bedeuten % Umsatz; $t = 37^\circ$).

Vers.-Dauer (Stdn.)	0.0002 Mol : 100 ccm				0.002 Mol : 100 ccm			
	pH 8		pH 9.5		pH 8		pH 9.5	
	α	β	α	β	α	β	α	β
1	0.9	2.1	0.6	1.1	1.1	2.9	0.9	1.3
2	1.5	3.3	1.1	1.8	1.6	4.8	1.4	2.4
5	3.5	6.1	2.0	3.7	4.0	9.0	3.2	5.6
24	8.5	13.0	10.4	14.9	11.4	19.3	14.4	22.4
48	12.7	19.0	17.6	22.0	17.5	26.2	24.9	32.4

Die Cer-Versuche erstrecken sich über das pH -Bereich von 6 bis 9.5. Zwischen pH 6 und 8 wird der β -Ester bei 37° etwa doppelt so rasch verseift wie der α -Ester, bei stärker alkalischer Reaktion (pH 9.5) dagegen sind die Hydrolysegeschwindigkeiten etwa gleich groß; das letztere gilt sowohl für die Versuche der Konzentration 0.0002 Mol : 100 ccm als auch für diejenigen der 10-fach höheren Konzentration. Da diese Erscheinung auch bei den Lanthanversuchen — allerdings nicht so ausgeprägt — vorliegt, sollten Versuche auch bei noch höherem pH angestellt werden⁵⁾. Wir glauben allerdings nicht, daß es dabei zu einer Umkehrung, also zu einer rascheren Spaltung des α -Isomeren, kommen wird. Voraussichtlich beruht die gegenseitige Angleichung der Umsetzungsgeschwindigkeiten im stärker alkalischen Bereich vielmehr darauf, daß das chemische Gleichgewicht in den Reaktionssystemen weitgehend nach der Seite des Metallhydroxyds verschoben ist und die Unterschiede in der Konzentration des α - und β -Reaktions-Zwischenproduktes kleiner werden bzw. praktisch verschwinden.

Tafel 3. Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten von Cerglycerin- α - und β -phosphat bei verschiedenen Konzentrationen u. verschiedenem pH (Die Zahlen bedeuten % Umsatz; $t = 37^\circ$).

Vers.-Dauer (Stdn.)	0.0002 Mol : 100 ccm						0.002 Mol : 100 ccm					
	pH 6		pH 6.8		pH 8		pH 9.5		pH 8		pH 9.5	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
1	—	—	—	—	0.3	0.9	1.1	1.2	0.4	1.2	0.7	1.1
2	0	0	0.2	0.4	0.6	1.2	2.4	2.5	0.8	2.0	1.6	2.4
5	—	—	—	—	1.4	2.5	6.1	5.6	1.9	3.9	4.7	6.1
24	0.5	1.2	2.0	3.8	5.9	10.4	14.1	13.2	8.3	15.5	16.9	17.9
48	1.1	2.1	4.2	7.8	11.7	20.4	19.3	19.0	16.2	26.1	27.0	27.6
120	2.5	4.5	10.4	19.3	—	—	—	—	—	—	—	—

⁵⁾ Auch Veränderung der Versuchstemperatur kann vielleicht den bisher gewonnenen Einblick in die Erscheinung noch erweitern.

Vergleicht man die jeweiligen Umsätze in den Lanthan-Versuchen mit jenen der Cer.-Versuche, so erkennt man außer den bereits besprochenen Abweichungen auch einen voneinander etwas verschiedenen zeitlichen Verlauf der Verseifung; die Umsätze nach längeren Versuchszeiten, z.B. 48 Stdn., sind einander aber jeweils recht ähnlich.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß orientierende Versuche mit Calcium-glycerin- α - und Calcium-glycerin- β -phosphat selbst nach langen Zeiten bei steriler Durchführung (Toluol-Zusatz) keine nennenswerte Verseifung und damit auch keine eindeutigen Unterschiede in den α - und β -Hydrolysegeschwindigkeiten erkennen ließen.