

Ließ man NOBF_4 (13 mMol) auf die dreifache Menge CH_3NH_2 (40 mMol) in flüss. SO_2 (170 mMol) einwirken, so erfolgte bei Raumtemperatur keine Reaktion, erst nach zweitägigem Erhitzen auf 100° hatte sich das NOBF_4 umgesetzt. Im Gasraum wurden N_2 (8.8 mMol) und N_2O (0.7 mMol) bestimmt, CH_3F konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Der salzartige Rückstand setzte sich mit Wasser unter Schwefel-Abscheidung um, der SO_4^{2-} -Nachweis war stark positiv; das SO_2 mußte also an der Reaktion teilgenommen haben²³⁾.

b) mit Urethan: Äquimolare Mengen (je 10.8 mMol) von NOBF_4 und Äthylurethan ergaben, in flüssigem Schwefeldioxyd umgesetzt, an leichtflüchtigen Produkten N_2 (5.1), NO (3.42) und N_2O (6.73 mMol); in CCl_4 als Reaktionsmedium waren aus je 13.85 mMol der Ausgangsprodukte N_2 (7.2), N_2O (6.87) und SiF_4 (1.0 mMol) entstanden.

263. Eugen Bamann, Luis Fernandez Sanchez und Heinz Trapmann: Lösung der N–P-Bindung in Phosphoamiden durch seltene Erdmetalle¹⁾

[Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München]

(Eingegangen am 25. August 1955)

Die gegenüber Laugen verhältnismäßig sehr stabile N–P-Bindung der Kreatin-, Arginin- und Guanidinphosphorsäure sowie anderer Phosphoamide wird bereits bei schwach alkalischer Reaktion und niedrigen Temperaturen unter dem katalytischen Einfluß gewisser Metall-Ionen gelöst. Besonders wirksam sind Cer und Lanthan.

Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Beweis für die tiefgreifende Einflußnahme der seltenen Erden auf den Stoffwechsel unter gewissen Voraussetzungen dar.

Die N–P-Bindung in Phosphoamiden ist Laugen gegenüber recht resistent. Die Darstellung der Kreatin-, Arginin- und Guanidinphosphorsäure erfolgt in nicht weniger als 17 *n* natronalkalischer Lösung^{2,3)}. Um so überraschender ist das Ergebnis, daß diese energiereiche Bindung bereits bei schwach alkalischer Reaktion und niedrigen Temperaturen unter dem katalytischen Einfluß gewisser Metall-Ionen gelöst wird. Als besonders wirksam haben sich Cer und Lanthan erwiesen. Die Katalyse verläuft über die Metallsalze der Phosphoamide als Zwischenverbindungen, in denen die N–P-Bindung Hydroxyl-Ionen gegenüber instabil geworden ist. Wir haben diese Erscheinung bereits vor einiger Zeit am Beispiel der Kreatinphosphorsäure⁴⁾ beobachtet und finden sie nunmehr an der Arginin- und Guanidinphosphorsäure sowie am Phosphorsäurediamid bestätigt. Somit kommt zu dem bisher bekannten Wirkungsbereich¹⁾ der Ionen seltener Erdmetalle und anderer Metalle, der in der Lösung der C–O–P-Bindung, wie sie in Phosphorsäure-

²³⁾ Vergl. F. Seel, A. K. Bocz u. J. Nogradi, Z. anorg. allg. Chem. **264**, 302 [1951].

¹⁾ XVI. Mitteil. der in Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 1711, 1980, 2086, 2233 [1938], Chem. Ber. **81**, 442, 451, 455, 463 [1948], Biochem. Z. **325**, 413 [1954], **326**, 89, 161, 237 [1954], Chem. Ber. **88**, 199 [1955], Biochem. Z. **326**, 507 [1954/55], Chem. Ber. **88**, 1726 [1955] veröffentl. Untersuchungsreihe. Vergl. auch: E. Bamann, Dtsch. Apotheker-Ztg. **94**, 528 [1954].

²⁾ K. Zeile u. G. Fawaz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **256**, 193 [1938].

³⁾ G. Fawaz u. K. Zeile, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **263**, 175 [1940].

⁴⁾ E. Bamann, Dtsch. Apotheker-Ztg. **94**, 528 [1954].

estern vorliegt, ferner in der Lösung der P—O—P-Bindung, die der Pyrophosphorsäure und den Polyphosphorsäuren zugrunde liegt, und schließlich in der Hydratation der Meta- zur Orthophosphorsäure besteht, ein weiterer hinzu.

Die Abspaltung von Phosphorsäure in Phosphoamiden ist außerdem noch verhältnismäßig leicht durch Wasserstoff-Ionen und auf enzymatischem Wege möglich. Während Kreatin- und Argininphosphorsäure durch H-Ionen ($n/_{100}$ Säure) etwa gleich rasch hydrolysiert werden^{5,6)}, ist die Guanidinphosphorsäure merklich stabiler, die Reaktionskonstante der Spaltung in $n/_{1}$ HCl bei 18° ($7 \cdot 10^{-5}$) beträgt nur etwa $1/_{30}$ des für die Kreatinphosphorsäure-Hydrolyse geltenden Wertes³⁾. Bemerkenswert ist das Verhalten der Phosphagene gegenüber H-Ionen in Anwesenheit von Molybdänsäure. Diese fördert die Hydrolyse bei der Kreatinphosphorsäure^{6,5,2)}, hemmt sie aber bei der Argininphosphorsäure^{5,6,7)}. Überaus leicht werden das Phosphorsäure-mono- und -diamid durch Säure dephosphoryliert⁸⁾. — Was die enzymatische Spaltung der Phosphagene und anderer Verbindungen mit N—P-Bindung betrifft, so werden dafür heute im allgemeinen nicht die üblichen Phosphatasen, sondern „Phosphoamidasen“, also Enzyme, die zur Gruppe der Amidbindungen spaltenden Fermentgruppe zu zählen wären, angenommen^{5,8-11)}. Die Existenz solcher spezifischer Katalysatoren erscheint uns jedoch experimentell noch nicht genügend gesichert¹²⁾.

Unter den geprüften Metall-Ionen entfalten diejenigen des 3-wertigen Cers die stärkste katalytische Wirkung. Überrascht waren wir davon, daß das 4-wertige Cer, das wir in Versuchen an Verbindungen, die eine C—O—P-Bindung besitzen, als praktisch unwirksam gefunden haben¹³⁾, die N—P-Bindung der Guanidinphosphorsäure etwa gleich schnell oder sogar um ein geringes schneller spaltet als das 3-wertige Cer. Während Lanthan noch gut wirksam ist, besitzen Eisen(III)-Salze, verglichen mit Cer und Lanthan, nur geringen katalytischen Effekt. Praktisch wirkungslos gegenüber Guanidinphosphorsäure und Phosphorsäurediamid bei 37° sind Aluminium, Magnesium, Mangan und Zink.

Darin, daß auch die physiologisch wichtigen Verbindungen Kreatin- und Argininphosphorsäure dem dephosphorylierenden Einfluß der seltenen Erden unterliegen, darf man einen weiteren Beweis für die tiefgreifende Beeinflussung des Stoffwechsels durch die seltenen Erdmetalle sehen. Die Aufklärung der interessanten Beobachtungen von F. Fischler und K. W. Roeckl^{14,15)} durch unsere Befunde an Zuckerphosphaten¹⁶⁾, Nucleinsäuren¹⁷⁾, Aneurinphosphaten¹⁸⁾ und Phosphoproteiden¹⁹⁾ erfährt in den Ergebnissen dieser Untersuchung eine bestätigende Erweiterung.

⁵⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, *Biochem. Z.* **196**, 22 [1928].

⁶⁾ K. Lohmann, *Biochem. Z.* **194**, 306 [1928].

⁷⁾ K. Lohmann u. L. Jendrassik, *Biochem. Z.* **178**, 419 [1926].

⁸⁾ M. Ichihara, *J. Biochemistry [Tokyo]* **18**, 87 [1933].

⁹⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. F. Köhler, *Biochem. Z.* **258**, 360 [1933].

¹⁰⁾ K. Lohmann, *Biochem. Z.* **271**, 264 [1934].

¹¹⁾ H. Brederick u. E. Geyer, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **254**, 223 [1938].

¹²⁾ Vergl. hierzu auch: Th. Winnick, *Arch. Biochemistry* **11**, 209 [1947].

¹³⁾ E. Bamann u. H. Trapmann, *Chem. Ber.* **88**, 199 [1955].

¹⁴⁾ F. Fischler u. K. W. Roeckl, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **189**, 1 [1938].

¹⁵⁾ E. Bamann, F. Fischler, H. Trapmann u. K. H. Eberhardt, *Klin. Wschr.* **32**, 588 [1954].

¹⁶⁾ E. Bamann, F. Fischler u. H. Trapmann, *Biochem. Z.* **325**, 413 [1954].

¹⁷⁾ E. Bamann, H. Trapmann u. F. Fischler, *Biochem. Z.* **326**, 89 [1954].

¹⁸⁾ E. Bamann u. A. Schuegraf, *Biochem. Z.* **326**, 507 [1955].

¹⁹⁾ E. Bamann, H. Trapmann u. A. Schuegraf, *Chem. Ber.* **88**, 1726 [1955].

Beschreibung der Versuche

I. Dephosphorylierung von Kreatin- und Argininphosphorsäure
Die Ergebnisse sind in Tafel 1 wiedergegeben.Tafel 1. Spaltung von Kreatin- und Argininphosphorsäure durch Cer(III)- und Lanthan-Salze bei p_H 8.6 und 37° (Der Versuchsansatz von 20 ccm enthielt 0.00002 Mol Substrat, 0.0001 Mol Metallsalz und 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; Zugabefolge B; $t = 37^\circ$.)

Die Zahlen geben die Dephosphorylierung der Phosphagene in % an.

Reakt.-Zeit	Kreatinphosphorsäure		Argininphosphorsäure	
	Ce ³⁺	La ³⁺	Ce ³⁺	La ³⁺
0*) Min.	25.8	25.8	27.4	27.4
10 Min.	38.6	27.7	—	—
15 „	43.5	—	—	—
30 „	77.4	30.7	—	—
45 „	88.8	35.4	—	—
60 „	—	37.1	34.7	31.0
3 Stdn.	—	51.5	—	33.0
4 „	—	—	39.9	—
6 „	—	67.7	45.9	37.0
20 „	—	88.8	—	—
24 „	—	—	68.9	37.5
48 „	—	—	—	43.5
72 „	—	—	—	46.6

*) Während des 30 Min. langen Verweilens der Substrate in 1 n schwefelsaurem Milieu (20 Min. bei 37° , 10 Min. bei 20°), das die kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Phosphorsäure verlangt, erfolgt beachtliche Hydrolyse, die durch den Nullwert angegeben ist. Dieser muß von den in späteren Zeiten gemessenen Werten in Abzug gebracht werden.

10% Spaltung von Kreatin- bzw. Argininphosphorsäure werden erreicht:

mit Ce³⁺ in 9 Min. in 2 Stdn.mit La³⁺ in 50 Min. in 24 Stdn.

Demnach werden die zwei Substrate mit recht unterschiedlichen Geschwindigkeiten gespalten. Im Falle der energiereicheren Kreatinphosphorsäure erfolgt die Dephosphorylierung in 0.001 m Lösung bei p_H 8.6 und 37° durch Cer 13mal, durch Lanthan 29mal rascher als bei der energieärmeren Argininphosphorsäure.

II. Vergleich der Spaltung von Guanidinphosphorsäure und Phosphorsäurediamid mittels Cer(III)-, Cer(IV)-, Lanthan-, Eisen(III)-, Magnesium-, Mangan(II)- und Zink-Salzen

Die Dephosphorylierung von Guanidinphosphorsäure in schwach alkalischem Milieu und bei 37° in Anwesenheit von Cer, Lanthan und Eisen ist aus den Versuchen der Tafel 2 zu ersehen.

Praktisch wirkungslos gegenüber Guanidinphosphorsäure bei p_H 8.6 und 37° oder 70° sind Aluminium-, Magnesium-, Mangan(II)- und Zink-Ionen.

Das Phosphorsäurediamid wird ebenfalls bei Gegenwart geeigneter Metall-Ionen, z. B. von Cer- oder Lanthan-Ionen, in schwach alkalischem Milieu bei 37° katalytisch gut gespalten. Wir beschränken uns bei diesem Substrat auf eine qualitative Aussage. Dieses Phosphoamid ist nämlich in saurem Milieu, das für die Bestimmung der durch Metall-Ionen-Spaltung entstandenen freien Phosphorsäure auf kolorimetrischem Wege notwendig ist, so labil, daß die Feststellung der metallkatalytisch entstandenen Phosphorsäure nur angenähert erfolgen kann. Da Phosphorsäuremonoamid noch säureunbeständiger ist, wurde von der Einbeziehung dieses Substrates ganz abgesehen.

Tafel 2. Spaltung von Guanidinphosphorsäure durch 3- und 4-wertiges Cer, Lanthan sowie 3-wertiges Eisen bei p_H 8.6 und 37°
(Der Versuchsansatz von 20 ccm enthielt 0.00002 Mol Substrat, 0.0001 Mol Metallsalz und 4 ccm 2.5 *n* Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; Zugabefolge B; $t = 37^\circ$.)
Die Zahlen geben die Spaltung des Substrates in % an.

Reakt.-Zeit	Ce ³⁺	Ce ⁴⁺	La ³⁺	Fe ³⁺
0*) Min.	7.3	7.3	7.3	7.2
15 Min.	32.2	33.9	—	—
30 „	48.4	49.3	—	—
45 „	54.8	59.7	—	—
60 „	60.1	69.3	9.7	9.2
2 Stdn.	—	72.6	11.3	11.3
3 „	—	—	12.0	—
4 „	—	—	14.3	—
6 „	—	—	17.0	—
18 „	—	—	29.8	—
20 „	—	—	32.8	—
24 „	—	—	34.8	20.2
48 „	—	—	49.3	25.8
72 „	—	—	56.3	—

*) siehe Fußnote zu Tafel 1.

10% Spaltung von Guanidinphosphorsäure werden erreicht:

mit Ce³⁺ Ce⁴⁺ La³⁺ Fe³⁺
in 4 Min. 4 Min. 7 Stdn. 13 Stdn.

III. Abhängigkeit der Dephosphorylierung von Guanidinphosphorsäure durch Ce³⁺, Ce⁴⁺ und La³⁺ von der Wasserstoffionenkonzentration

Aus den Ergebnissen der Versuche der Tafel 3 ergibt sich, daß Labilität der N-P-Bindung in Anwesenheit geeigneter Metall-Ionen in schwach alkalischem Milieu, bei etwa p_H 8, einsetzt und sich bis ins stärker alkalische Gebiet (p_H 11) erstreckt. Auffallend sind zwei Tatsachen: Im Falle des Lanthans als Katalysator tritt ein Wirkungsoptimum um p_H 9 ein, im Bereich p_H 10–10.5 sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit, um im stärker alkalischen Gebiet wieder anzusteigen. Bei Cer (3- und 4-wertig) nimmt der Umsatz von p_H 8 bis p_H 11 kontinuierlich zu. Da das Substrat unter unseren Versuchsbedingungen bei p_H 11 über Tage hinaus beständig ist, können die beiden Erscheinungen nicht damit erklärt werden, daß der mit der Alkalinität steigende Umsatz einem wachsenden Anteil an Eigenhydrolyse zuzuschreiben wäre.

Tafel 3. p_H -Abhängigkeit der Dephosphorylierung von Guanidinphosphorsäure mittels Ce³⁺, Ce⁴⁺ und La³⁺

(Der Versuchsansatz von 20 ccm enthielt 0.00002 Mol Substrat, 0.0001 Mol Metallsalz und 4 ccm 2.5 *n* Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; Zugabefolge B; $t = 37^\circ$.)
Die Zahlen geben die Spaltung in % an.

p_H	Ce ³⁺			Ce ⁴⁺			La ³⁺		
	Zeit in Min.			Zeit in Min.			Zeit in Min.		
	15	45	60	15	45	60	15	45	60
8.0	0	1.7	4.9	2.5	3.3	4.9	0.9	0.9	3.3
8.6	24.2	46.0	50.9	28.2	54.0	54.0	3.3	7.3	9.0
9.2	31.5	49.2	57.3	52.5	69.0	71.0	6.5	11.3	17.0
9.5	—	—	—	52.5	69.0	71.0	—	—	—
9.7	35.5	52.5	59.7	—	—	—	4.1	6.5	8.3
10.0	—	—	—	52.5	69.0	71.0	—	—	—
10.2	43.6	60.5	68.0	54.0	74.0	74.0	3.3	6.5	8.5
10.5	49.2	64.5	67.0	—	—	—	3.3	8.1	9.1
10.8	—	—	—	59.8	74.0	74.0	8.1	14.6	22.0

IV. Angaben zu den Versuchsansätzen

1. Substrate: Kreatinphosphorsäure als $C_4H_5O_5N_3PCa \cdot 4H_2O$ (321.1), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A. – Argininphosphorsäure als Calciumsalz; aus Arginin, analog der Kreatinphosphorsäure-Darstellung von K. Zeile und G. Fawaz²⁾, durch Phosphorylierung mittels $POCl_3$ in 17 *n* NaOH hergestellt. P-Gehalt des Präparates = 10.16%. – Guanidinphosphorsäure als $CH_4O_3N_3PCa$ (177.1), Darstellung nach G. Fawaz und K. Zeile³⁾. – Phosphorsäurediamid $H_5O_2N_2P$ (96.0), Darstellung nach H. N. Stokes²⁰⁾.

2. Metallsalze: $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 2271); $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 2274); $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 5326); $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 3943); $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ Merck (List. Nr. 1084); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 8883); $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 5964); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ p. a. Merck (List. Nr. 5833).

3. Versuchsansatz: nach den Angaben unserer X. Mitteilung¹⁷⁾.

4. Bestimmung des anorganischen Phosphats: Das bei der Spaltung von Arginin- und Guanidinphosphorsäure anfallende anorganische Phosphat bestimmten wir nach den Angaben unserer IX. Mitteilung¹⁶⁾. Das aus der Kreatinphosphorsäure und dem Phosphorsäurediamid abgespaltene Phosphat wurde wegen der großen Säurelabilität dieser Substrate auf nachstehende Weise ermittelt: In einem 25-cm-Meßkolben wurden 1 cm 0.125 *n* H_2SO_4 , 1 cm 2.5-proz. Ammoniummolybdatlösung, 2–4 cm des zu untersuchenden Reaktionsgemisches sowie 1 cm 2.5-proz. Ascorbinsäurelösung (Ascorbinsäure „Merck“ (List. Nr. 500074)) zusammengegeben und das Gemisch sofort mit Natriumhydrogenphthalat-NaOH-Puffer p_H 5 auf 25 cm aufgefüllt. – Die Entwicklung erfolgte 10 Min. bei 37° und 5 Min. bei 20°. Daran schloß sich dann die Kolorimetrierung der Lösung an. – Das erwähnte Puffergemisch entspricht demjenigen nach W. M. Clark und H. A. Lubs²¹⁾, wobei wir das bei diesen Pufferlösungen verwendete Kaliumsalz zur Vermeidung der Bildung des schwerlöslichen Doppelsalzes $La_2(SO_4)_3 \cdot 3K_2SO_4$ durch Natriumsalz ersetzen.

264. Hans Herloff Inhoffen, Klaus Brückner und Hans-Jürgen Hess: Studien in der Vitamin D-Reihe XIII¹⁾: Bildung einer strukturierten Vitamin D-Verbindung

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig]
(Eingegangen am 1. September 1955)

Mit Hilfe der Wittig-Reaktion wird ein Methylencyclohexan-Derivat hergestellt und dessen Bromid über das Ylid mit dem C_{21} -Abbaualdehyd des Vitamins D_2 umgesetzt. Da wiederum die allyltautomere Form in Reaktion tritt, wird die Methylengruppe in die Bildung einer Drei-Kohlenstoffkette einbezogen.

In unserer XI. Mitteilung²⁾ berichteten wir u. a. von einem Versuch zur Darstellung eines Vitamin D-Modelltrien mit Hilfe der Wittig-Reaktion³⁾, ausgehend von 1-Brom-2-methylen-cyclohexan und Cyclohexylden-acetaldehyd.

²⁰⁾ Amer. chem. J. 16, 154 [1894].

²¹⁾ J. biol. Chemistry 25, 479 [1916]; siehe auch: M. Steiner in: E. Bamann u. K. Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941; Academic Press Inc., New York 1945, S. 782.

¹⁾ XII. Mittel.: H. H. Inhoffen, K. Brückner, K. Irmscher u. G. Quinkert, Chem. Ber. 88, 1424 [1955].

²⁾ H. H. Inhoffen, K. Brückner, G. F. Domagk u. H.-M. Erdmann, Chem. Ber. 88, 1415 [1955]. ³⁾ G. Wittig u. H. Schöllkopf, Chem. Ber. 87, 1318 [1954].