

162. Zur spektrophotometrischen Bestimmung der sauren und alkalischen Phosphatasen mit o-Carboxy-phenyl-phosphat. Ein Vergleich mit der Spaltungsgeschwindigkeit anderer Substrate¹⁾

von Hans Brandenberger²⁾ und Wolf H. Weihe.

(1. VII. 55.)

Einer der Autoren³⁾ hat kürzlich zusammen mit R. Hanson eine spektrophotometrische Bestimmungsmethode für saure und alkalische Phosphomonoesterasen ausgearbeitet. o-Carboxy-phenylphosphat (I) wird in einer Beckman-Quarz-Küvette durch zugesetztes Enzym zu Salicylsäure (II) hydrolysiert. Da II bei 297–298 m μ ein stark ausgeprägtes Absorptions-Maximum besitzt, während I in diesem Wellenbereich nur geringe Endabsorption zeigt, kann die Hydrolysengeschwindigkeit durch Messung der Extinktions-Erhöhung z. B. bei 298 m μ kontinuierlich verfolgt werden. Für genaue Bestimmungen soll dabei das Spektrophotometer mit einem der käuflichen Einsätze zur Regulierung und Konstanthaltung der Küvetten-Temperatur versehen sein. Die Vergleichsküvette enthält den gleichen Ansatz, jedoch an Stelle der aktiven Fermentlösung Wasser oder durch Erhitzen oder Zusatz von Hemmstoffen inaktiviertes Enzym. Die nichtenzymatische Hydrolyse von I wird dadurch automatisch aus den Messergebnissen subtrahiert, und die ΔE -Werte sind ein direktes Mass der Ferment-Aktivität⁴⁾.

Bei Dosierung mit der geeigneten Fermentmenge beansprucht unsere Methode nicht über 10 Min. Inkubationszeit (als Vorbereitung 10 Min. für Pipettieren und Austemperieren). Die Extinktion wird in kurzen Abständen (z. B. 1 Min.) abgelesen. So können 3 Parallelansätze (1 Vergleich- und 3 Mess-Küvetten) gleichzeitig ausgeführt werden. Die spektrophotometrische Bestimmung ist im Hinblick auf Genauigkeit allen uns bekannten Phosphatase-Bestimmungen weit überlegen (siehe Kurve im exp. Teil). Die Tatsache, dass der Spaltungsgrad von I in beliebigen Zeitintervallen abgelesen werden kann,

¹⁾ 2. Mitteilung über Phosphatasen, 1. Mitteilung siehe ³⁾.

²⁾ Jetzige Adresse: Laboratoires Nestlé, Vevey.

³⁾ H. Brandenberger & R. Hanson, Helv. **36**, 900 (1953).

⁴⁾ Ein Jahr nach dem Erscheinen unserer Arbeit ist von B. H. J. Hoistee in Arch. Biochemistry Biophysics **51**, 139 (1954) eine Bestimmungsmethode für Phosphatasen auf dem genau gleichen Prinzip und unter Benützung des gleichen Substrates beschrieben worden.

ohne dass der Enzymversuch unterbrochen werden muss¹⁾, erleichtert besonders die Ausführung von kinetischen Messungen. Wir verwenden das Verfahren aber auch für die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in Körperflüssigkeiten wie z. B. Harn²⁾, sowie in tierischen und pflanzlichen Gewebs-Extrakten.

*Walker & King*³⁾ haben vor einigen Jahren auf einem anderen Wege als wir o-Carboxy-phenyl-phosphat hergestellt. Sie liessen darauf eine Phosphatase einwirken und bestimmten das freigesetzte Phosphat. Der enzymatische Abbau war gering. Im Gegensatz zu diesen Befunden haben wir bei der Arbeit mit verschiedenen Enzymquellen jeweils eine starke Hydrolyse von I beobachtet. Um deren Geschwindigkeit mit der Spaltungsgeschwindigkeit von anderen Phosphatase-Substraten vergleichen zu können, haben wir 3 verschiedene Enzympräparate bei sehr ähnlichen Bedingungen auf verschiedene Substrate einwirken lassen und die durch gleiche Enzymmengen in gleichen Zeiteinheiten bewirkte Spaltung – ausgedrückt in μMol Substrat pro 1 – einander gegenübergestellt. Ein solcher Vergleich ist auch deshalb nützlich, weil sich unser spektrophotometrisches Verfahren nur für Lösungen eignet und man sich deshalb für das Arbeiten mit Gewebs-Homogenaten oder -Schnitten besser eines anderen Substrates bedient. Bei einem Wechsel der Substrate sind Anhaltspunkte über deren relative Spaltungsgeschwindigkeit immer von Wert, wobei bedacht werden muss, dass solche Verhältniszahlen für jedes Enzym verschieden sein können.

Die Resultate unserer Bestimmungsreihen sind in der nebenstehenden Tab. zusammengefasst.

Die Zahlen bezeichnen die pro Min. und 1 umgesetzte Anzahl μMol Substrat, umgerechnet auf die gleiche Endkonzentration des Enzympräparates in der Reaktionslösung. Bei den spektrophotometrischen Bestimmungen mit I ergeben sich diese Zahlen wie folgt:

$$\left. \begin{array}{l} \varepsilon_{298 \text{ m}\mu} \cdot 10^{-3} \text{ von II} = 3,690 \\ \varepsilon_{298 \text{ m}\mu} \cdot 10^{-3} \text{ von I} = 0,240 \end{array} \right\} \Delta \varepsilon_{298 \text{ m}\mu} \cdot 10^{-3} = 3,450^4).$$

¹⁾ Bei älteren Methoden, welche die Phosphatase-Aktivität durch Bestimmung der freigesetzten farbigen oder fluoreszierenden Komponente messen, ist es notwendig, den Farbton vor seiner quantitativen Erfassung zu stabilisieren und/oder zu intensivieren, z. B. durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes. Dies verunmöglicht jedoch eine kontinuierliche Messung der Substratspaltung im gleichen Ansatz. Einzig für alkalische Bestimmungen mit Phenolphthalein-diphosphat ist eine kontinuierliche Methode beschrieben worden⁵⁾. Doch ist auch hier die Farbentwicklung bei den zu verwendenden pH-Werten und längeren Inkubationszeiten ungleichmäßig. Eine einwandfreie Aktivitätskurve ergibt sich nur, wenn man eine grössere Anzahl von Ansätzen zu verschiedenen Zeiten unterricht.

²⁾ *H. Brandenberger & R. Hanson*, Helv. **36**, 900 (1953).

³⁾ *P. G. Walker & E. J. King*, Biochem. J. **47**, 93 (1950).

⁴⁾ In unserer ersten Mitt. (l. c.) haben wir irrtümlicherweise für diesen Wert 1,600 angegeben. Die Extinktionen für das Spektrum der Salicylsäure in Fig. I (S. 902) liegen zu tief.

⁵⁾ *C. Huggins & P. Talalay*, J. biol. Chemistry **159**, 399 (1945).

Die umgesetzte Substratmenge in μMol erhalten wir darnach durch Multiplikation der $\Delta E_{298\text{m}\mu}$ -Werte mit 290 (dem reziproken Wert von $3,450 \cdot 10^{-3}$). Diese Zahlen gelten sowohl für Phosphatase-Bestimmungen in saurem wie auch in alkalischem Medium, da – wie wir früher gezeigt haben¹⁾ – $\Delta E_{298\text{m}\mu}$ in dem für Phosphatase-Teste wichtigen pH-Bereich von 4 bis 9,5 nahezu konstant ist.

Tabelle.

Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeiten von o-Carboxy-phenyl-phosphat mit der anderer Phosphat-Ester. In μMol umgesetztes Substrat/1 Reaktionsgemisch · Min.

Enzym-Lösungen	Verwendetes Substrat	β -Glycero-phosphat	Phenol-phtalein-diphosphat	Phenyl-phosphat ²⁾
Saure Worthington-Phosphatase:				
Enzymkonz. verw.	0,0033%	0,00455%	0,0091%	—
pH	5,0	5,0	5,0	5,0
umgesetzte Zahl $\mu\text{Mol}/1 \cdot \text{Min.}$. . .	14,5	10,0	1,8	—
umgerechnet auf Enzymkonz. 0,01%	43,5	22,0	1,98	ca. 28
Alkalische Worthington-Phosphatase:				
Enzymkonz. verw.	0,066%	0,0367%	0,091%	—
pH	9,1	9,2	9,2	9,3
umgesetzte Zahl $\mu\text{Mol}/1 \cdot \text{Min.}$. . .	8,4	9,6	0,56	—
umgerechnet auf Enzymkonz. 0,1%	12,6	26,2	0,615	(350) ³⁾
Alkalische Nieren-Phosphatase:				
Enzymkonz. verw.	0,33%	0,0455%	0,182%	—
pH	9,1	9,1	9,1	—
umgesetzte Zahl $\mu\text{Mol}/1 \cdot \text{Min.}$. . .	13,1	6,4	0,62	—
umgerechnet auf Enzymkonz. 1,0%	39,3	141	3,41	—

Aus der tabellarischen Übersicht ergibt sich, dass die saure Phosphatase von den 4 benutzten Substraten das o-Carboxy-phenyl-phosphat (I) am schnellsten hydrolysiert. Die zwei alkalischen Phosphatasen greifen β -Glycero-phosphat hingegen etwas schneller an als I. Im Vergleich mit Phenolphthalein-diphosphat ist die Spaltungsgeschwindigkeit von I in allen Fällen über zehnmal grösser. Wenn auch diese Zahlen nicht ohne weiteres auf andere Enzyme übertragen

¹⁾ H. Brandenberger & R. Hanson, Helv. **36**, 900 (1953).

²⁾ Diese Vergleichswerte wurden von der Firma Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J., USA., übernommen. Die Zahlen können, da zwar gleiche Präparate, aber nicht gleiche Lösungen verglichen wurden, nicht streng gewertet werden.

³⁾ Dieses Enzym ist nur beschränkt wasserlöslich. Für alle unsere Bestimmungen wurde die Suspension durch Zentrifugieren geklärt, was mit einem bedeutenden Aktivitätsverlust verbunden ist. Der hohe Wert kann daher nicht mit unserer Bestimmungsreihe verglichen werden.

werden können, so zeigen sie doch, dass I ein sehr geeignetes Substrat für den quantitativen Nachweis von Phosphatasen ist. Auch in Fällen, in denen β -Glycero-phosphat oder ein anderer hier nicht getesteter Phosphatester vom Enzym schneller abgebaut wird, ist dieser relativ kleine Nachteil mehrfach aufgewogen durch die Einfachheit, Schnelligkeit und vor allem die hohe Genauigkeit unserer Bestimmungsmethode.

Experimenteller Teil.

1. Spektrophotometrische Phosphatase-Bestimmungen mit o-Carboxy-phenyl-phosphat. Ansätze: 2,0 ml Pufferlösung, 0,5 ml Substratlösung und 0,5 ml Enzymlösung (bzw. Bruchteil davon, mit H_2O auf 0,5 ml ergänzt) oder H_2O (für Vergleichsküvette).

Pufferlösungen: $\mu = 0,15$; Acetat pH 5,0 für saure, Glycinpuffer pH 9,1 für alkalische Phosphatasen.

Substratlösung: $3 \cdot 10^{-3}$ -m. Lösung von o-Carboxy-phenyl-phosphat in H_2O ; kann in gefrorenem Zustand einige Wochen, zwischen 0 und 5° einige Tage aufbewahrt werden.

Ausführung: Pufferlösung, Enzym und H_2O werden in die Quarz-Küvetten pipettiert und 8 Min. im auf 38° konstant gehaltenen Küvettenraum austemperiert. Wir verwendeten ein Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, dessen Küvettenraum an 2 Platten grenzt, durch die aus einem Durchlaufthermostaten Wasser von 38° zirkuliert. 5 Sek. vor Reaktions-Auslösung wird das Substrat zupipettiert, zur Zeit 0 werden die mit Parafilm¹⁾ bedeckten Küvetten geschwenkt und dann sofort in den Küvettenraum zurückgestellt. Auslösung der Reaktion in den einzelnen Küvetten in Abständen von 15 oder bei gleichzeitiger Durchführung von 3 Enzymtesten, von 10 Sek. Einstellung des Nullwertes (mit Vergleichsküvette) und Extinktions-Ablesungen (mit Messküvetten) in den gleichen Zeitabständen wie Reaktions-Auslösung. Ablesen von $E_{298\text{ m}\mu}$ nach jeder Min. über eine Dauer von ca. 10 Min. $\Delta E_{298\text{ m}\mu}/\text{Min.}$ ergibt sich als Mittelwert im linearen Bereich. Beispiel siehe Fig. 1.

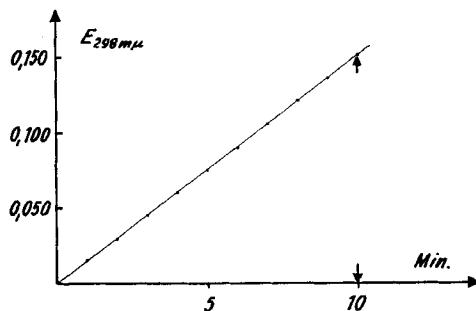


Fig. 1.
 $\Delta E_{298\text{ m}\mu}/\text{Min.} = 0,0152$. Aktivität in $\mu\text{Mol/l} \cdot \text{Min.} = 4,41$.

2. Phosphatase-Bestimmungen mit β -Glycero-phosphat nach Bodansky²⁾, mit Veronalpuffer für die saure und die alkalischen Phosphatasen.

¹⁾ Marathon Corporation, Menasha, Wis., USA.

²⁾ O. Bodansky, J. biol. Chemistry **99**, 197 (1932); **101**, 93 (1933). I. Abelin, Spezielle klinisch-chemische Methoden, 1952, Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart.

3. Phosphatase-Bestimmungen mit Phenolphthalein-diphosphat¹⁾ nach Huggins & Talalay²⁾, mit Acetatpuffer für die saure und Veronalpuffer für die alkalischen Phosphatasen.

4. Fermentpräparate. Saure Worthington-Phosphatase aus Weizenkeimlingen³⁾: 100 mg wurden bei 2° mit 5 ml H₂O versetzt und 2 Std. auf einer Rollmaschine bewegt, dann weitere 2 Std. stehengelassen. Die Spuren an ungelöstem Material wurden bei 3000 Touren abzentrifugiert.

Alkalische Worthington-Phosphatase³⁾: 100 mg wurden bei 2° auf einer Rollmaschine mit 5 ml H₂O extrahiert, das Ungelöste wurde nach 2 Std. wie oben abzentrifugiert.

Rattennieren-Extrakt: Frisch präparierte Rattennieren wurden homogenisiert, mit H₂O zu einem 10-proz. Homogenisat verdünnt und 12 Std. bei 2° aufbewahrt. Klärung durch Zentrifugieren in einer Kältezentrifuge bei 3000 Touren.

Während dieser Arbeit wurde einer der Autoren (H. B.) vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt, der andere (W. H. W.) von der Rockefeller-Stiftung, durch die ihm ein Gastaufenthalt an der Universität Bern ermöglicht worden ist.

SUMMARY.

The rate of enzymatic hydrolysis of o-carboxy-phenyl-phosphate (I) has been compared with that of other substrates commonly used for phosphatase determinations. An acid phosphatase from wheat germ hydrolysed I faster than β -glycero-phosphate, phenyl-phosphate and phenolphthalein-diphosphate. Two alkaline phosphatasen decomposed I somewhat more slowly than β -glycero-phosphate, but still over 10 times faster than phenolphthalein-diphosphate. Even in cases where another substrate is hydrolysed faster, the use of I is recommended because of the high accuracy and simplicity of the spectrophotometric determination described in an earlier communication⁴⁾.

Theodor Kocher-Institut und
Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Bern.

¹⁾ Wir verwendeten die Komplexverbindung mit Pyridin der Firma C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim, Deutschland. Für die Überlassung des Präparates danken wir der Firma auch an dieser Stelle bestens.

²⁾ C. Huggins & P. Talalay, J. biol. Chemistry **159**, 399 (1945). K. Linhardt & K. Walter, Z. physiol. Chem. **289**, 245 (1952).

³⁾ Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J., USA. Auch dieser Firma danken wir für die Präparate.

⁴⁾ H. Brandenberger & R. Hanson, Helv. **36**, 900 (1953).