

Das braune Reaktionsgemisch verdünnte man mit etwa dem doppelten Volum an Eisessig und versetzte vorsichtig mit Wasser. Das ausfallende, zum Teil ölige Reaktionsprodukt wurde auf Ton abgepreßt, getrocknet und in möglichst wenig heißem Alkohol gelöst. Nach dem Erkalten schieden sich fast farblose, verfilzte Nadelchen ab; Schmp. unscharf 201—204°. Nachmals aus Alkohol umkrystallisiert, Schmp. 206—208°; aus Acetonitril und noch 2-mal aus Alkohol umkrystallisiert, Schmp. 210—211°. Farblose Nadelchen, im Gegensatz zur Monoacetylverbindung leicht löslich in Chloroform; ebenfalls leicht löslich in Acetonitril, schwer löslich in Alkohol und Benzol. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 4 g.

5.400 mg Sbst.: 14.635 mg CO₂, 2.780 mg H₂O. — 5.008 mg Sbst.: 13.510 mg CO₂, 2.440 mg H₂O. — 3.191 mg Sbst.: 0.233 ccm N (25°, 749 mm). — 2.955 mg Sbst.: 0.219 ccm N (24.5°, 745 mm). — 0.1235 g Sbst. in 23 g Nitro-benzol: Δ = 0.076°.

C₃₂H₂₈O₄N₃. Ber. C 73.95, H 5.63, N 8.09, Mol.-Gew. 519.
Gef. „, 73.92, 73.58, „, 5.76, 5.45, „, 8.24, 8.33, „, 500.

Verseifung zu Monoacetyl-triindol: 0.4980 g Tetraacetylverbindung wurden mit 25 ccm alkohol. Kali (entspr. 31.55 ccm 0.2-n. HCl) 1 Stde. auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt. Das unverbrauchte Kali wurde mit 17.38 ccm 0.2-n. HCl zurücktitriert; hieraus ergeben sich 2.96 Acetylgruppen. Die austitrierte Lösung wurde mit viel Wasser versetzt und der ausfallende Niederschlag nach dem Absitzen durch einen Porzellan-Filtriertiegel abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet: 0.3770 g Monoacetyl-triindol vom Schmp. 202°, Theorie 0.3771 g. — Die Verseifung erfolgt auch bei 15—20° sehr schnell. Zwischenprodukte konnten nicht gefaßt werden.

Verhalten gegen salpetrige Säure: 1 g Tetraacetylverbindung, in 25 ccm Eisessig gelöst, wurden bei Eis-Kühlung mit einer konz. wäßrigen Lösung von 0.4 g Natriumnitrit versetzt und 45 Min. stehen gelassen. Das beim Verdünnen mit Wasser in weißen Flocken ausfallende Produkt zeigte nach 1-maligem Umkrystallisieren aus Alkohol einen Schmp. von 209° und gab mit dem reinen Ausgangsmaterial keine Depression. Eine Nitrosamin-Bildung hatte danach nicht stattgefunden.

48. W. Kießling¹⁾: Die Synthese der isomeren Glycerinsäure-phosphorsäuren („Phosphoglycerinsäure“).

[Aus d. Institut für Physiologie am Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg.]

(Eingegangen am 20. Dezember 1934.)

Vor einiger Zeit ist von K. Lohmann und O. Meyerhof²⁾ ein neues Zwischenprodukt der Kohlehydrat-Spaltung, die (Enol-)Brenztraubensäure-phosphorsäure, CH₂:C(O.PO₃H₂).COOH, beschrieben worden. Sie bildet sich aus linksdrehender natürlicher Phosphoglycerinsäure, die ihrerseits bei der Vergärung des Zuckers in Gegenwart von NaF entsteht. Da als Zwischenprodukt dabei die Dioxy-aceton-phosphorsäure auftritt³⁾, wurde die Annahme gemacht, daß die natürliche Phosphoglycerinsäure die (—)-Glycerinsäure-3-phosphorsäure (I) ist, die sich irgendwie in



¹⁾ Stipendiat der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

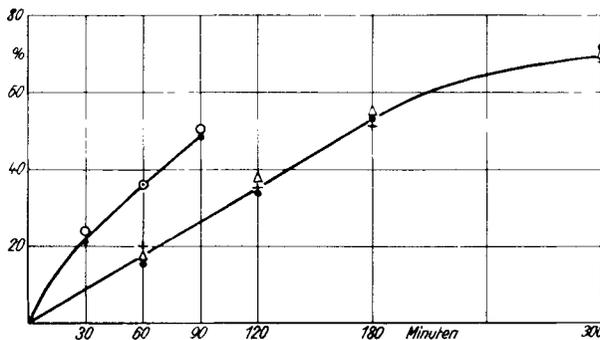
²⁾ Biochem. Ztschr. **273**, 60 [1934].

³⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, Biochem. Ztschr. **271**, 89 [1934]; Kießling, B. **67**, 869 [1934].

die Brenztraubensäure-phosphorsäure umwandelt, wobei als Zwischenprodukt die Glycerinsäure-2-phosphorsäure (II) auftreten könnte. Um diese Frage zu klären, mußten die Glycerinsäure-monophosphorsäuren dargestellt werden.

Eine Darstellung von *racem.* Glycerinsäure-phosphorsäure ist bereits von C. Neuberg⁴⁾ beschrieben; aus ihr geht jedoch nicht hervor, ob sich die H_3PO_4 mit dem 2- oder 3-C-Atom der Glycerinsäure verestert hat. Die Bildung von I bzw. II war zu erwarten, wenn es gelang, die $CH_2(OH)$ -Gruppe der α - bzw. β -Glycerin-phosphorsäure zur $COOH$ -Gruppe zu oxydieren. Dies war der Fall. Oxydiert man die Ba-Salze der beiden Glycerin-phosphorsäuren in schwach lackmus-saurer Lösung mit Brom unter gleichzeitigem Abstumpfen des entstehenden HBr mit $NaOH$, so fallen die Ba-Salze der entstandenen Carbonsäuren, da sie im Gegensatz zu ihrem Ausgangsprodukt in Wasser unlöslich sind, aus, und der Oxydationsprozeß wird an dieser Stelle unterbrochen. Während aus der β -Glycerin-phosphorsäure fast nur II entsteht, bildet sich aus der α -Säure bis zu 30% noch ein anderes phosphor-haltiges Abbauprodukt, wahrscheinlich Glykolsäure-phosphorsäure, das jedoch über die Ag-Verbindung abgetrennt werden kann. Als Ag-Salze können beide Verbindungen kristallisiert erhalten werden.

In den chemischen Eigenschaften beider Säuren besteht weitgehende Übereinstimmung. Die sauren Ba-Salze fallen meistens amorph ohne Krystallwasser aus, während die optisch aktiven Komponenten sehr gut mit 3 H_2O auskristallisieren. Bei den Ag-Salzen ist kein Unterschied zu bemerken. Beide Säuren sind schwer hydrolysierbar. Die K -Werte der Hydrolyse mit $n-HCl$ bei 125° (s. Abbild. 1) sind gleich und stimmen mit denen der natürlichen Säure vollständig überein. Aus den Elektro-titrations-Kurven (s. Abbild. 2)



Abbild. 1: Säure-Hydrolyse mit $n-HCl$ bei 125° . Ordinate % abgespaltene Phosphorsäure:

Obere Kurve:

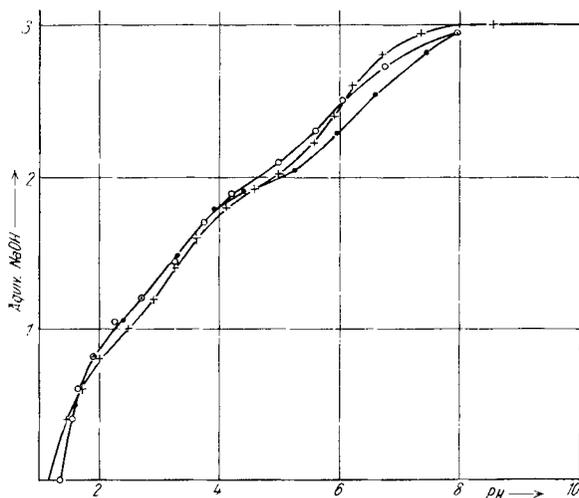
- ○ ○ Glykolsäure-phosphorsäure aus *racem.* Glycerinsäure-3-phosphorsäure,
- ● ● Glykolsäure-phosphorsäure aus natürlicher 3-Phosphoglycerinsäure.

Untere Kurve:

- + + + natürliche 3-Phosphoglycerinsäure,
- Δ Δ Δ Glycerinsäure-3-phosphorsäure (synthet.),
- ● ● Glycerinsäure-2-phosphorsäure (synthet.),

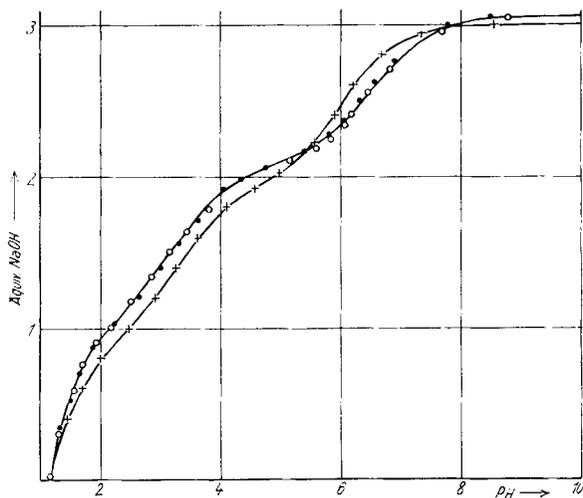
⁴⁾ Neuberg u. Vogt, Biochem. Ztschr. **211**, 3 [1929].

sieht man zunächst, daß bei der Oxydation der α - und β -Glycerin-phosphorsäure eine neue Säure-Valenz entstanden ist, und außerdem, daß die pK' -Werte mit denen der bekannten natürlichen Säure⁵⁾ übereinstimmen bis auf den pK_3' -Wert der II, der um 0.5 p_H alkalischer ist ($pK_3' = 6.48$.)



Abbild. 2: Elektro-titrations-Kurven:

- + + + natürliche Phosphoglycerinsäure,
- o o o Glycerinsäure-3-phosphorsäure (synthet.),
- • • Glycerinsäure-2-phosphorsäure (synthet.),



Abbild. 3: Elektro-titrations-Kurven:

- • • Glykolsäure-phosphorsäure aus Glycerinsäure-3-phosphorsäure (synthet.),
- o o o Glykolsäure-phosphorsäure aus natürlicher Phosphoglycerinsäure,
- + + + natürliche Phosphoglycerinsäure.

⁵⁾ W. Kießling, Biochem. Ztschr. **273**, 103 [1934].

Oxydiert man das Na-Salz von I mit KMnO_4 in schwach lackmus-saurer Lösung, so läßt sich als Ba-Salz ein phosphor-haltiger, gut krystallisierender Körper isolieren, der nach seiner Entstehung und seinen Eigenschaften als Glykolsäure-phosphorsäure anzusprechen ist. Die Elektro-titrations-Kurve (s. Abbild. 3) zeigt 3 Säure-Valenzen an; pK_2' ist um 0.27 pH saurer und pK_3' um 0.42 pH alkalischer als das Ausgangsprodukt, dessen $\text{pK}_2' = 3.42$, $\text{pK}_3' = 5.98$ ist. Mit $n\text{-HCl}$ bei 125° ist diese Substanz leichter hydrolysierbar (Abbild. 1); von Hefe-Macerationssaft kann sie carboxylatisch nicht mehr aufgespalten werden. Von Phosphatase wird die H_3PO_4 langsam abgespalten. Von natürlicher Phosphoglycerinsäure wird derselbe Körper erhalten, der, wie es zu erwarten war, auch keine optische Aktivität mehr besitzt. II kann man unter diesen Bedingungen nicht zu einem phosphor-haltigen Abbauprodukt oxydieren. Die zu erwartende Tartronsäure-phosphorsäure scheint in Gegenwart von KMnO_4 nicht beständig zu sein. Aus der Tatsache, daß die *racem.* Glycerinsäure-3-phosphorsäure und natürliche Phosphoglycerinsäure dasselbe Oxydationsprodukt liefern, war zu schließen, daß die bis dahin bekannte natürliche Säure zum größten Teil aus der 3-Verbindung bestehen mußte.

Die biologischen Eigenschaften sollen nur kurz angedeutet werden⁶⁾. Beide Säuren (I und II) werden von Hefe-Macerationssaft carboxylatisch⁷⁾ mit gleicher Geschwindigkeit zu 50% aufgespalten, und zwar von der 3-Verbindung die (—)- und von der 2-Verbindung die (+)-Komponente. Der Restkörper aus I hat dementsprechend ein $[\alpha]_D^{20} = +14.5^\circ$ und der aus II ein $[\alpha]_D^{20} = -23.5^\circ$. In dialysierten Macerationssaft stellt sich von I und II ein Gleichgewicht Glycerinsäure-3-phosphorsäure \rightleftharpoons Glycerinsäure-2-phosphorsäure ein, das bei 28° bei 80% Glycerinsäure-3-phosphorsäure liegt. Da im dialysierten Macerationssaft auch mit den natürlichen Säuren dasselbe Gleichgewicht besteht, war anzunehmen, daß die bisher bekannte natürliche Phosphoglycerinsäure mehr oder weniger ein Gemisch von (+)2- und (—)3-Phosphoglycerinsäure ist. In der Tat wurde neben der Hauptmenge (—)3-Phosphoglycerinsäure ($[\alpha]_D^{20} = -14.5^\circ$) die bisher unbekannt (+)2-Phosphoglycerinsäure ($[\alpha]_D^{20} = +24.3^\circ$) isoliert.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung der Glycerinsäure-2-phosphorsäure.

20 g β -glycerin-phosphorsaures Na⁸⁾, das nach der Methode von Fleury und Paris⁹⁾ mit Perjodsäure, nicht mehr als 1—2% α -Säure enthalten soll, werden mit 25 g Ba-Acetat in 150 ccm Wasser gelöst und mit 15 g Brom versetzt. Unter kräftigem Rühren läßt man zum Neutralisieren des entstehenden HBr immer gerade soviel 3-n. NaOH zutropfen, daß die Flüssigkeit schwach lackmus-sauer reagiert. Die Reaktion setzt sofort ein, im Verlauf von 20 Min. ist fast das gesamte Brom verbraucht, und das Ba-Salz der Glycerinsäure-2-phosphorsäure amorph ausgefallen.

⁶⁾ vergl. Meyerhof u. Kießling, Biochem. Ztschr. (im Druck).

⁷⁾ Neuberg u. Kobel, Biochem. Ztschr. **264**, 456 [1933]; Meyerhof u. Kießling, Biochem. Ztschr. **267**, 313 [1933].

⁸⁾ Der Firma E. Merck danke ich für die Überlassung größerer Mengen reinen β -glycerin-phosphorsauren Natriums.

⁹⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **196**, 1416 [1933].

Man läßt die Reaktionsflüssigkeit noch 1 Stde. auf Eis stehen, zentrifugiert dann den Niederschlag ab und wäscht ihn mit Wasser 2—3-mal aus. Nach Auflösen in verd. HCl und Fällen des Ba mit H_2SO_4 wird in ammoniakalischer Lösung das anorganische Phosphat mit Magnesia-Mixtur gefällt. Zur weiteren Reinigung wird der Niederschlag wieder in verd. HCl gelöst und durch Abstumpfen mit NaOH und Zugabe von Alkohol in 3 Fraktionen zerlegt. Die 1. Fraktion bei schwach kongo-saurer Lösung mit 1 Tl. Alkohol hat einen Reinheitsgrad von 65—75% (1—2 g). Die 2. Fraktion, die bei schwach lackmus-saurer Reaktion mit 1.5 Tln. Alkohol ausfällt, ist die Hauptfraktion (4—6 g mit einem Reinheitsgrad von 100%), während die 3. Fraktion mit mehr Alkohol beim Neutralpunkt wieder einen geringeren Reinheitsgrad aufweist. Verfolgen kann man den Reinheitsgrad an der carboxylatischen Aufspaltung durch Hefe-Macerationsssaft, die pro 2 Mol Säure 1 Mol CO_2 betragen muß.

Zur Analyse wurde, da das Ba-Salz meist amorph ausfällt, das Ag-Salz dargestellt, das in feinen, kleinen Nadeln kristallisiert. Zu diesem Zweck wird das Ba-Salz in verd. HNO_3 gelöst, das Ba mit H_2SO_4 gefällt, das Filtrat mit 25-proz. $AgNO_3$ -Lösung im Überschuß versetzt und mit Ammoniak neutralisiert. Das abzentrifugierte Ag-Salz, das zunächst amorph ausgefallen ist, wird in heißer verd. HNO_3 gelöst, mit $\frac{1}{3}$ Vol.-Tl. heißen Alkohols vermischt und mit 10-proz. Ammoniak tropfenweise abgestumpft, bis eine bleibende Trübung entsteht. Über Nacht bei 0° kristallisiert dann das Ag-Salz aus.

Die Analysen¹⁰⁾ stimmen auf das neutrale Ag-Salz ohne Krystallwasser. Über siedendem Toluol im Hochvakuum (0.002 mm Hg) erfolgt keine Gewichts-Abnahme.

5.367 mg Ag-Salz: 1.33 mg CO_2 , 0.435 mg H_2O . — 5.540 mg Ag-Salz: 1.39 mg CO_2 , 0.420 mg H_2O . — P_2O_5 wurde kolorimetrisch¹¹⁾ bestimmt. 1.82 mg Sbst.: 0.262 mg P_2O_5 . — 3.056 mg Sbst.: 2.65 mg AgCl.

$C_3H_4O_7PAg_3$. Ber. C 7.11, H 0.797, Ag 63.88, P_2O_5 14.01.
Gef. „ 6.76, 6.84, „ 0.91, 0.83, „ 65.26, „ 14.40.

4.51 mg saur. Ba-Salz: 0.99 mg P_2O_5 . — Ber. P_2O_5 22.12%, gef. 21.95%.

Carboxylatische Spaltung: Zugegeben (ausgedrückt in P_2O_5) 2.74 mg P_2O_5 , aufgespalten 0.170 mg P_2O_5 , CO_2 entwickelt 445 ccm, entspricht 1.41 mg P_2O_5 , Spaltungsgrad = 51.5%.

Darstellung der Glycerinsäure-3-phosphorsäure.

Die Darstellung schließt sich eng an die der Glycerinsäure-2-phosphorsäure an; jedoch entstehen bei der Oxydation der α -Glycerin-phosphorsäure bis zu 30% andere, schwer hydrolysierbare, phosphor-haltige Verbindungen, die als Ba-Salze durch fraktionierte Fällung schlecht abgetrennt werden können. Über die Ag-Verbindungen gelingt dies.

30 g Ba- α -Glycerin-phosphat, das aus dem Ca-Salz von Merck gewonnen wird, und das nach der Methode von Fleury und Paris mindestens 98% α -Säure enthalten soll, werden in 300 ccm Wasser gelöst, mit 15 g Brom vermischt und wie bei der Darstellung der 2-Verbindung weiter behandelt. Da wegen Nebenreaktionen bedeutend mehr Brom als bei der

¹⁰⁾ Ausgeführt von Dr. Roth im Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.

¹¹⁾ Lohmann u. Jendrassik, Biochem. Ztschr. 178, 419 [1926].

2-Säure verbraucht wird, kann man nochmals 10 g Brom zugeben. Das abgeschiedene Ba-Salz der oxydierten Säure wird in verd. HNO_3 gelöst, nach Fällen des Ba mit H_2SO_4 , das anorganische Phosphat in ammoniakalischer Lösung mit Magnesia-Mixtur entfernt, das Filtrat wieder kongo-sauer gemacht, mit 25-proz. AgNO_3 -Lösung im Überschuß versetzt und 1 Tl. Alkohol und 1.5 Tle. Aceton zugegeben; die Lösung soll dann schwach kongo-sauer reagieren. Der ausgefallene Niederschlag wird verworfen. Darauf wird bei schwach lackmus-saurer Reaktion nochmals AgNO_3 zugegeben, bis keine Fällung mehr entsteht, und das ausgefallene Ag-Salz abgetrennt. In der Mutterlauge bleiben die phosphor-haltigen Verunreinigungen größtenteils zurück. Wenn die carboxylatische Aufspaltung mit Hefe-Macerationssaft unter 50% liegt, muß die Silber-Fällung wiederholt werden. Gewonnen wurden auf diese Weise 14 g mit einem Reinheitsgrad von 94%.

Zur Analyse wurde das Ag-Salz wie bei der 2-Säure dargestellt. Im Fisschrank fallen über Nacht kleine, polyedrische Krystalle aus, deren Analyse auf das neutrale Ag-Salz ohne H_2O stimmt.

6.464 mg Ag-Salz: 1.60 mg CO_2 , 0.45 mg H_2O . — 5.907 mg Ag-Salz: 1.53 mg CO_2 , 0.54 mg H_2O . — P_2O_5 wurde kolorimetrisch bestimmt. 1.66 mg Sbst.: 0.228 mg P_2O_5 . — 4.301 mg Sbst.: 3.61 mg AgCl .

$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_7\text{PAg}$. Ber. C 7.11, H 0.797, Ag 63.88, P_2O_5 14.01.
Gef. „ 6.75, 7.06, „ 0.78, 1.02, „ 63.17, „ 13.74.

5.40 mg saur. Ba-Salz: 1.20 mg P_2O_5 .

$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7\text{PBa}$. Ber. 22.12%, gef. 22.22%.

Carboxylatische Aufspaltung: Zugegeben (ausgedrückt in P_2O_5): 1.21 mg, aufgespalten: 0.71 mg CO_2 entwickelt: 194 ccm. entspricht: 0.614 mg P_2O_5 , Spaltungsgrad 50.7%.

Oxydation der Glycerinsäure-3-phosphorsäure zur Glykolsäure-phosphorsäure.

0.4 g *racem.* Glycerinsäure-3-phosphorsäure werden in verd. HCl gelöst, nach Entfernung des Ba mit H_2SO_4 mit 75 ccm $n/_{10}$ - KMnO_4 und einer Spur MnSO_4 vermischt und in schwach saurer Lösung auf 60° erwärmt, bis nach etwa 20 Min. alles KMnO_4 verbraucht ist. Die Lösung wird dann neutralisiert, das ausgefallene MnO_2 abzentrifugiert und das anorganische Phosphat mit Magnesia-Mixtur in ammoniakalischer Lösung abgetrennt. Darauf wird die Lösung stark kongo-sauer gemacht, Ba-Acetat im Überschuß zugegeben, das ausgefallene BaSO_4 abgetrennt und dann in schwach kongo-saurer Lösung das saure Ba-Salz mit Alkohol gefällt. Umkrystallisiert wird das Salz aus verd. HCl bei schwach kongo-saurer Reaktion durch Zugabe von $1/5$ — $1/4$ Vol. Alkohol. Es fällt in stark doppelbrechenden Blättchen aus, die sich leicht zu kugelförmigen Gebilden zusammenlagern. Die Substanz hat 1 Mol H_2O , das auch beim Trocknen über siedendem Toluol im Hochvakuum nicht abgegeben wird.

8.185 mg Sbst.: 2.38 mg CO_2 , 0.97 mg H_2O . — 5.223 mg Sbst.: 1.54 mg CO_2 , 0.59 mg H_2O . — 4.27 mg Sbst.: 3.14 mg BaSO_4 . — P_2O_5 wurde kolorimetrisch bestimmt. 5.20 mg Sbst.: 1.192 mg P_2O_5 .

$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_6\text{PBa} + 1\text{H}_2\text{O}$ (309.38). Ber. C 7.75, H 1.63, Ba 44.28, P_2O_5 22.95.
Gef. „ 7.93, 8.06, „ 1.33, 1.27, „ 43.28, „ 22.92.

Hrn. Prof. Meyerhof danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Unterstützung bei ihrer Ausführung.