

### 136. Theodor Wagner-Jauregg: Phospho-l-milchsäure.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 11. März 1935.)

Untersuchungen der letzten Jahre haben die biochemische Bedeutung organischer Phosphorsäure-ester immer deutlicher erkennen lassen. Von den Phosphorsäure-estern der Monoxy-carbonsäuren, denen, wie z. B. der Milchsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, als Stoffwechselprodukten eine wichtige physiologische Rolle zukommt, wurde bisher erst ein Vertreter, nämlich ein Pyrophosphorsäure-ester der Citronensäure, beschrieben. E. Wertyporoch und H. Kiekenberg<sup>1)</sup> erhielten diese Verbindung durch Einwirkung von Metaphosphorsäure-ester auf Citronensäure. Im Zusammenhang mit Versuchen über die Dehydrierung der Milchsäure interessierte uns der Phosphorsäure-ester dieser Säure, dessen Darstellung und Eigenschaften hier beschrieben werden.

Zur Darstellung der Phospho-milchsäure,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{O}\cdot\text{PO}_3\text{H}_2)\cdot\text{COOH}$ , eignet sich das bekannte Verfahren der Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf Oxyverbindungen in trockenem Pyridin in der Kälte. Nach dieser Methode läßt sich die Milchsäure mit guter Ausbeute phosphorylieren. In sehr kleiner Menge entstehen neben der Phospho-milchsäure chlorierte Produkte, entsprechend dem, besonders bei höherer Temperatur ausgeprägtem, Vermögen des Phosphoroxychlorides zum Ersatz von OH-Gruppen durch Chlor<sup>2)</sup>. Zur Isolierung der Phospho-milchsäure eignet sich das neutrale Bariumsalz,  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_6\text{PBA}_{1.5}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , das in kaltem Wasser leicht, in Alkohol schwer löslich ist. Beim Erhitzen seiner gesättigten Lösung fällt das Bariumsalz aus und kann auf diese Weise weiter gereinigt werden. Die Verminderung der Löslichkeit in Wasser bei erhöhter Temperatur er-

innert an ähnliche Verhältnisse beim äthyl-phosphorsäuren Calcium<sup>3)</sup>. Aus der l(+)-Milchsäure erhält man eine Phospho-milchsäure, deren Alkalisalze stark links drehen. Die Phospho-milchsäure ist, wie Fig. 1 zeigt, schwer hydrolysierbar.

Als monomolekulare Reaktionskonstante berechnet sich aus den Werten der Figur im Mittel:  $k = 2.6 \times 10^{-3}$ <sup>4)</sup>. Die Abspaltung der Phosphorsäure aus der Phospho-milchsäure durch Salzsäure bei 122° erfolgt ungefähr mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Hy-

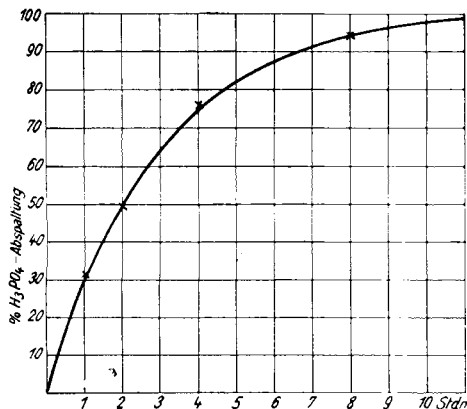


Fig. 1. Hydrolyse der Phospho-milchsäure in 2-n. HCl bei 122°.

<sup>1)</sup> Biochem. Ztschr. **268**, 8 [1934].

<sup>2)</sup> Th. Wagner-Jauregg, Helv. chim. Acta **12**, 61 [1929].

<sup>3)</sup> W. Lossen u. A. Köhler, A. **262**, 209 [1891].

<sup>4)</sup>  $k = 1/t_2 - t_1 \times \log_{10} a - x_1/a - x_2$  (t in Minuten).

drolyse der Phospho-glycerinsäuren<sup>5)</sup>. Dagegen ist die Phospho-milchsäure dephosphorylierenden Enzymen gegenüber offenbar weitaus widerstandsfähiger als die Phospho-glycerinsäure. In einem Versuch mit Froschmuskel-Extrakt erfolgte überhaupt keine Aufspaltung der Phospho-milchsäure, während im Parallelversuch mit Phospho-glycerinsäure eine 90-proz. Phosphorsäure-Abspaltung beobachtet werden konnte.

Bei der sauren Hydrolyse der Phospho-milchsäure tritt die der abgespaltenen Phosphorsäure äquivalente Menge Milchsäure auf, die nach der Oxydation mit Permanganat als Acetaldehyd bestimmt wurde. Vor der Verseifung ist die Phospho-milchsäure beständig gegen  $\text{KMnO}_4$ .

Es wurde auch untersucht, ob der Phosphorsäure-ester der *l*-Milchsäure durch Methylenblau in Gegenwart von Milchsäure-Dehydrase dehydriert wird. In Anwesenheit eines aus *Bacillus coli* dargestellten Lactico-Dehydrase-Präparates wurde Methylenblau im Vakuum wohl durch Milchsäure, nicht aber durch Phospho-*l*-milchsäure entfärbt. Dieser Versuch zeigt, daß der Phosphorsäure-ester der *l*-Milchsäure in diesem Fall kein Zwischenprodukt der Dehydrierung der Milchsäure sein kann.

### Beschreibung der Versuche.

Darstellung von phospho-*l*-milchsaurem Barium.

5.4 g kristallisierte *l*(+)-Milchsäure (Th. Schuchardt, Görlitz) löst man in 5 ccm wasser-freiem Pyridin unter schwachem Erwärmen; zu der auf  $-20^{\circ}$  gekühlten Lösung fügt man in kleinen Anteilen eine ebenso gekühlte Mischung von 9.2 g destilliertem Phosphoroxychlorid und 5 ccm trockenem Pyridin. Man läßt über Nacht im Eisschrank, dann noch  $1\frac{1}{2}$  Stdn. bei  $15-20^{\circ}$  stehen. Nun werden allmählich Eisstückchen und Eiswasser zugesetzt, bis das Volumen der Flüssigkeit 60 ccm beträgt. Zur Hydrolyse von Pyrophosphorsäure, die bei der Zersetzung des überschüssigen Phosphoroxychlorides mit Wasser entsteht<sup>6)</sup> und die bei der weiteren Aufarbeitung stört, erhitzt man 15 Min. im kochenden Wasserbade. Geringe Mengen chlorhaltigen Öles werden abfiltriert und das Filtrat mit 2-*n*. Lithiumhydroxyd gegen Lackmus neutralisiert. Das ausfallende Lithiumphosphat wird abgeschleudert und der Rest der anorganischen Phosphorsäure durch Fällen mit Magnesiumchlorid in schwach ammoniakalischer Lösung gefällt. Das rotbraune Zentrifugat schüttelt man zur Entfernung von Pyridin mit Äther aus und versetzt mit Salzsäure bis zur schwach lackmus-sauren Reaktion. Nun fügt man Bariumacetat-Lösung zu und fällt das phospho-milchsaure Barium mit Alkohol aus.

Zur Reinigung wurde 2-mal aus Wasser:Alkohol umgefällt, dann in kaltem Wasser gelöst und das beim Erhitzen ausfallende Salz heiß filtriert. Dieses Umlösen aus kaltem Wasser wurde noch 1-mal wiederholt. 5 Stdn. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  im Vakuum aufbewahrt, dann an der Luft liegen gelassen. Ausbeute 1.5 g reines Ba-Salz.

Zur Analyse diente die luft-trockne Substanz. 5.177 mg Sbst.: 1.77 mg  $\text{CO}_2$ , 0.93 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 4.860 mg Sbst.: 1.69 mg  $\text{CO}_2$ , 0.84 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 5.726 mg Sbst.: 28.91 mg Ammonium-phosphormolybdat. — 5.617 mg Sbst.: 28.75 mg Ammonium-phosphormolyb-

<sup>5)</sup> O. Meyerhof u. W. Kießling, *Biochem. Ztschr.* **264**, 40 [1933], **276**, 239 [1935]; W. Kießling, *B.* **68**, 243 [1935].

<sup>6)</sup> A. Besson, *Compt. rend. Acad. Sciences* **124**, 1099 [1897].

dat. — 5.347 mg Sbst.: 4.336 mg BaSO<sub>4</sub>. — 7.046 mg Sbst.: 5.60 mg BaSO<sub>4</sub>. — 11.530 mg Sbst. bei 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Vakuum getrocknet: 1.02 mg Gew.-Verlust.



Ber. C 8.81, H 1.96, P 7.58, Ba 50.38, Gew.-Verlust (2H<sub>2</sub>O) 8.81.  
Gef. „ 9.33, 9.48, „ 2.01, 1.93, „ 7.33, 7.43, „ 47.72, 46.75, „ 8.84.

Die gegen die Theorie zu hohen C-Werte erklären sich nach E. Wertyporoch und H. Kiekenberg<sup>7)</sup> dadurch, daß bei der Verbrennung phosphorsäure-haltiger Verbindungen Spuren von P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in die Absorptions-Apparate sublimieren. Die niedrigen Barium-Werte dürften durch geringe Beimengung von saurem Bariumsalz bedingt sein.

Optische Aktivität: Die zur Phosphorylierung benutzte l(+)-Milchsäure war nicht optisch rein; sie besaß in 5.6-proz. Lösung ein  $[\alpha]_D$  von ungefähr +0.2°.

427 mg neutrales phosphor-l-milchsaures Barium wurden in 1.25 ccm 2-n. HCl gelöst, mit 3.3 ccm *m*/<sub>2</sub>-K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> umgesetzt, zentrifugiert, das Bariumsulfat mit 3.5 ccm *n*/<sub>10</sub>-HCl gewaschen. Die vereinigten HCl-sauren Lösungen mit 2-n. NaOH gegen Lackmus neutralisiert und mit dest. Wasser auf 15 ccm aufgefüllt.  $\alpha_D$  der Lösung im 2-dm-Rohr = -0.38°;  $[\alpha]$  des neutralen Alkalisalzes (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>PNa<sub>3</sub> oder C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>PK<sub>3</sub>) = -9.74°.

Saure Hydrolyse: Die Phosphorsäure wurde nach der Methode von K. Lohmann und L. Jendrassik<sup>7)</sup> bestimmt.

Hydrolyse in 2-n. HCl bei 122° (Figur I): 13.3 mg Ba-Salz, gelöst in 8 ccm 2-n. HCl + 0.3 ccm 2-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; für jede Bestimmung wurde 1 ccm verwendet.

Hydrolysen- Zeit in Stdn.	Gef. anorgan. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in mg	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in % (ber. auf Ba-Salz)	% Spaltung	k × 10 <sup>3</sup>
0	0.014	0.87	0	—
1	0.096	5.99	31.2	2.71
2	0.145	9.05	49.7	2.27
4	0.216	13.48	76.7	2.79
8	0.262	16.39	94.5	2.61
∞ (Ver- aschung)	0.277	17.31	100	—
				Mittel: 2.6

In 1-n. HCl waren bei 100° nach 3 Stdn. 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> abgespalten, in 1-n. HCl bei 125° nach 8 Stdn. 86.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Enzymatische Hydrolyse: Die Versuche erfolgten mit 3 Stdn. bei 20° inaktiviertem Froschmuskel-Extrakt, unter Zusatz von Adenyl-pyrophosphorsäure nach K. Lohmann und O. Meyerhof<sup>8)</sup>.

Phospho-glycerinsäure, gespalten bei 20° nach 60 Min.: 90%.

Phospho-milchsäure, gespalten bei 20° nach 60 Min.: 0%.

Den HHrn. Ph. Schuster und K. Schröder, welche die Phosphorsäure-Bestimmungen und Hydrolysen-Versuche im Institut von Hrn. Prof. O. Meyerhof ausführten, danke ich bestens für ihre Hilfe.

Bestimmung der Milchsäure: Diese erfolgte nach dem im Meyerhofschen Institut geübten Verfahren.

a) direkt: 20 mg Ba-Salz: 1.6 ccm *n*/<sub>200</sub>-J.

Ber. 4.4 mg Milchsäure, gef. 0.36 mg.

b) nach Hydrolyse: 40 mg Ba-Salz in 10 ccm *n*/<sub>1</sub>-HCl, 8 Stdn. auf 125° im geschlossenen Rohr erhitzt. 1 ccm dieser Lösung enthielt 0.532 mg anorgan. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ent-

<sup>7)</sup> Biochem. Ztschr. **178**, 419 [1926].

<sup>8)</sup> Biochem. Ztschr. **273**, 65 [1934].

sprechend einer Aufspaltung von 86.4%. 2 ccm dieser Lösung verbrauchten bei der Milchsäure-Bestimmung 6.04 ccm  $n_{200}^J$ .

Ber.<sup>9)</sup> 1.37 mg Milchsäure, gef. 1.36 mg.

Verhalten gegen Milchsäure-Dehydrase: Die Enzym-Lösung wurde nach M. Stephenson<sup>10)</sup> aus *Bacillus coli* durch 5-tägiges Schütteln bei 37° mit  $m_{1/2}$ -Phosphat  $p_H$  7.73, unter Zusatz von 1% NaF, hergestellt.

Je Ansatz: 1.5 ccm Enzym-Lösung; 0.6 ccm Substrat; 0.4 ccm  $m_{1/2}$ -sek.-Phosphat; 0.5 ccm Methylenblau 1:5000. Versuchs-Temperatur 37°.

Substrat:

$m_{15}$ -milchsaures Li .....	nach 12 Min. entfärbt,
$m_{15}$ -phospho- <i>l</i> -milchsaures Na .....	„ 4 Stdn. nicht entfärbt,
H <sub>2</sub> O .....	„ 4 „ „ „

Diese Enzym-Versuche führte Hr. Dr. E. F. Möller aus. Die *Coli*-Bacillen verdanken wir der Freundlichkeit von Hrn. Priv.-Doz. Dr. H. Habs vom Hygienischen Institut der Universität Heidelberg.

### 137. Hellmuth Stamm: Ester der thioschwefligen Säure, $H_2S_2O_2$ .

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Halle.]

(Eingegangen am 8. März 1935.)

Schon vor 40 Jahren erhielt F. Lengfeld<sup>1)</sup> bei der Einwirkung von alkohol-freiem Natrium-methylat bzw. -äthylat auf eine Lösung von Schwefelchlorür in Petroläther bei starker Kühlung Substanzen, denen er auf Grund von Elementar-analysen die Formeln  $S_2(OCH_3)_2$  bzw.  $S_2(OC_2H_5)_2$  zuerkannte, und die er als Ester der hypothetischen thioschwefligen Säure auffaßte. Er beschreibt diese Verbindungen als farblose Öle von unangenehmem und stechendem Geruch. In der Tat ist besonders der Methyl-ester ein heftig wirkender Augen-Reizstoff. Lengfeld hat das chemische Verhalten der beiden Körper nicht näher untersucht, und sie sind später fast in Vergessenheit geraten<sup>2)</sup>. Nur eine amerikanische Patentschrift<sup>3)</sup> erwähnt Diäthyl-thiosulfid als Vulkanisierungsmittel und auch seine Darstellung aus  $S_2Cl_2$  und  $NaOC_2H_5$ . Eine analoge Verbindung  $S_2(SC_2H_5)_2$  hat G. H. Chakravarti<sup>4)</sup> aus  $S_2Cl_2$  und  $NaSC_2H_5$  erhalten.

Ich habe mich schon vor längerer Zeit mit den Lengfeldschen Estern beschäftigt, meine Ergebnisse aber noch nicht veröffentlicht, weil sich mein eigentliches experimentelles Ziel, nämlich Darstellung von Salzen der thioschwefligen Säure, sowie Gewinnung von Schwefelmonoxyd-acetalen (Sulfoxylsäure-estern) durch Abspaltung des einen Schwefelatoms aus den Lengfeldschen Körpern, bisher nicht erreichen ließ. Vor kurzem erschien nun eine Mitteilung von A. Meuwesen<sup>5)</sup> über die Ester der thioschwefligen Säure,

<sup>9)</sup> Entsprechend der bei der Hydrolyse abgespaltenen  $P_2O_5$ -Menge.

<sup>10)</sup> Biochem. Journ. **22**, 605 [1928].

<sup>1)</sup> B. **28**, 449 [1895]; vergl. a. Beilsteins Hdbch., 4. Aufl., I, 282, 325.

<sup>2)</sup> So findet sich kein Hinweis darauf bei F. Foerster u. E. Th. Mommsen, B. **57**, 258 [1924], oder bei O. v. Deines u. H. Grassmann, Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **220**, 337 [1934], wo die Möglichkeit des Auftretens von  $H_2S_2O_2$  bei der Reaktion zwischen  $H_2S$  und  $SO_2$  erörtert wird. <sup>3)</sup> Amer. Pat. 1559393; C. **1926**, I 1303.

<sup>4)</sup> Journ. chem. Soc. London **123**, 966 [1923]. <sup>5)</sup> B. **68**, 121 [1935].