

423. W. Kiessling: Verbesserungen in der Darstellung der (Enol-)Brenztraubensäure-phosphorsäure.

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

(Eingegangen am 19. September 1936.)

Vor einiger Zeit wurde von mir die Synthese der (Enol-)Brenztraubensäure - phosphorsäure (Phosphobrenztraubensäure, $\text{CH}_2\text{:C}[\text{O}.\text{PO}_3\text{H}_2].\text{CO}_2\text{H}$) beschrieben¹⁾, die von K. Lohmann und O. Meyerhof²⁾ als Zwischenprodukt des enzymatischen Kohlehydrat-Abbaues gefunden worden war. Damals wurde das Kondensationsprodukt, das aus Brenztraubensäure mit Phosphoroxchlorid entsteht, über das kristallisierte Ag-Ba-Salz gereinigt. In der Zwischenzeit wurde nun sowohl die Ausbeute verbessert als auch die Reinigung vereinfacht. Zur Gewinnung größerer Mengen wurde der Weg über das Ag-Ba-Salz wieder verlassen, da die Ausbeuten damit nicht sehr günstig sind. Die Isolierung erfolgt jetzt über das Ba-Salz. Nicht untersuchte, phosphorhaltige Verunreinigungen, wahrscheinlich phosphorylierte Produkte der kondensierten Brenztraubensäure, lassen sich als Na-Salze in schwach alkalischer Lösung (pH 8.5) mit Alkohol abtrennen und zur Entfernung phosphorfreier Nebenprodukte dienen die Schwerlöslichkeit des Ba-Salzes der Brenztraubensäure-phosphorsäure in der Hitze und die Fraktionierung in lackmussaure Lösung mit Alkohol. Da die Menge und Zusammensetzung der Verunreinigungen von Versuch zu Versuch wechseln, ist es erforderlich, sich vor jedem neuen Arbeitsgang von der Zusammensetzung der Lösungen bzw. der Niederschläge durch P-Bestimmungen zu orientieren, wobei der Phosphobrenztraubensäure das mit Jod in alkalischer Lösung abspaltbare Phosphat entspricht.

Darstellung.

6 Ansätze von je 30 g Phosphoroxchlorid (Merck) in 30 ccm Chinolin (Merck puriss.) werden in je 30 g Brenztraubensäure (Merck) in 30 ccm Chinolin innerhalb von 20 Min. eingetropfelt. Die Gemische sollen kräftig reagieren bei einer Temperatur gegen 70°. Überschäumen der Reaktionsmasse kann durch rasches Abkühlen mit Eiswasser vermieden werden. Nachdem alles eingetragen ist, wird zur besseren Durchmischung der dunkelbraunen, zähen Masse mit einem Glasstab solange durchgerührt, bis die Reaktion zu Ende ist, was man an dem Sinken der Temperatur erkennen kann. Das Reaktionsprodukt wird dann mit Eiswasser und 25-proz. NaOH herausgelöst (Flüssigkeitsmenge 1.5 bis 2 l), damit neutralisiert, das obenstehende Chinolin abgehebert und unter Umrühren bei pH 8.5—9 die doppelte Menge Alkohol zugegeben. Dabei fallen außer anorganischem Phosphat annähernd quantitativ ein phosphorsäurehaltiges Nebenprodukt und ganz wenig Brenztraubensäure-phosphorsäure (etwa 3 bis 5%) aus. Die vom Niederschlag abgetrennte Lösung wird mit 25-proz. Ba-Acetat versetzt, bis keine weitere Fällung mehr entsteht. Diese Fällung enthält an P-Verbindungen außer anorganischem Phosphat nur mit Jod und Alkali aufspaltbaren P-Ester. Zur Abtrennung des anorganischen P wird der Niederschlag mit Wasser aufgeschlämmt, das

¹⁾ B. 68, 597 [1935].

²⁾ Biochem. Ztschr. 273, 60 [1934].

Ba mit 25-proz. H_2SO_4 gefällt und dann in ammoniakalischer Lösung Mg-Mischung zugegeben. Beide Niederschläge werden abzentrifugiert, die Lösung wird wieder mit Ba-Acetat versetzt und bei neutraler Reaktion mit 1 Tl. Alkohol gefällt. Der abgetrennte braungelbe Niederschlag wird in Wasser und 25-proz. HCl angerührt, bis die Reaktion kongosauer ist (ungefähr 1 l Flüssigkeit), mit Tierkohle durchgeschüttelt, diese zusammen mit dem ungelösten Bariumsulfat abzentrifugiert und die Lösung mit dem gleichen Teil Alkohol in schwach lackmussaurer Lösung gefällt. Eine getrocknete Probe dieses Niederschlags enthält, auf die Gesamt-Einwage bezogen, etwa 5% mit Jod und Alkali aufspaltbares P_2O_5 (= 2.2% P), was einem Reinheitsgrad von etwa 25% entspricht. Der Niederschlag wird nochmals in verd. HCl gelöst, mit Tierkohle geschüttelt, von dieser abgetrennt, die Lösung neutralisiert (1 l Flüssigkeit), Alkohol zugegeben bis eine bleibende Trübung entsteht, zum Sieden erhitzt und durch eine Dampfnotsche rasch abgesaugt. Die Zugabe von Alkohol zum Abscheiden der Substanz in der Hitze kann einige Male wiederholt werden, bis die Gesamt-Alkoholkonzentration ungefähr 25% beträgt. Die vereinigten Niederschläge haben nun einen der Brenztraubensäure-phosphorsäure zukommenden P_2O_5 -Gehalt von etwa 10% (Reinheitsgrad etwa 50%). Die weitere Reinigung geschieht durch fraktionierte Fällung mit Alkohol. Man löst in verd. HCl und gibt unter kräftigem Umrühren bei lackmussaurer Reaktion $\frac{1}{2}$ Vol.-Teil Alkohol zu. Der P_2O_5 -Gehalt der Fällung steigt dann auf 13 bis 15%. Dieser Reinheitsgrad (etwa 80%, aber 100% in bezug auf P-Verbindungen) genügt für biologische Zwecke. Derartig dargestellte Produkte wurden in diesem Institut für die verschiedensten enzymchemischen Arbeiten verwendet³⁾. Falls durch diese Arbeitsgänge der angegebene Reinheitsgrad nicht erreicht sein sollte, so muß entweder die Fällung in der Hitze oder die fraktionierte Fällung mit Alkohol wiederholt werden. Ausbeute zwischen 25 und 35 g Ba-Salz. Durch weitere Zugabe von Alkohol bis zu 1 Vol.-Teil zur Mutterlauge lassen sich noch 5 bis 10 g Ba-Salz mit einem P_2O_5 -Gehalt von 8 bis 10% gewinnen. Für vollständige chemische Reinheit ist jedoch die Überführung in das kristallisierte Ag-Ba-Salz notwendig, wie in der vorangehenden Mitteilung beschrieben.

³⁾ O. Meyerhof u. W. Kiessling, *Biochem. Ztschr.* **281**, 249 [1935]; H. Lehmann, *Biochem. Ztschr.* **281**, 271 [1935]; O. Meyerhof u. W. Schulz, *Biochem. Ztschr.* **281**, 292 [1935]; P. Ohlmeyer, *Biochem. Ztschr.* **287**, 212 [1936].