

gelb und in der Aufsicht ziegelrot sind. Wahrscheinlich liegt hier das basische Nitrat der Reihe vor.

Zur Analyse trocknen im Vak. bei 145°. Die Krystalle verwittern beim Erwärmen unter Farbvertiefung nach rotbraun.

5.634 mg Sbst.: 0.340 ccm N (23°, 751 mm). — 34.240 mg Sbst. verbr. bei der Titration 0.835 ccm n_{10} -AgNO₃. — 17.838 mg Sbst.: 3.382 mg TiO₂.

C₂₀H₁₅O₃N₂ClTi. Ber. N 6.77, Cl 8.58, Ti 11.55.
Gef. „ 6.87, „ 8.65, „ 11.37.

6) Bas. Salicylaldehyd-*o*-phenylendiimin-titanIV-perchlorat.

Man löst 0.5 g des Chlorids der Reihe in 10 ccm Eisessig und gibt in der Wärme 0.5 ccm 70-proz. wäbr. Überchlorsäure hinzu. Versetzt man dann nach 1/2 Stde. mit Wasser, so scheidet sich das gebildete Perchlorat aus. Es wird scharf abgesaugt und zur Entfernung der Essigsäure mit viel Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Vak. bei 100° stellt die Verbindung ein fein krystallines, zinnoberrotes Pulver dar, das zur Analyse genügend rein ist. Mit gelber Farbe gut löslich in Methyl- und Äthylalkohol, Pyridin, Aceton, Eisessig und Wasser. Kaum löslich in Äther, Benzol und Ligroin. Beim Erwärmen mit verdünnten Laugen und Säuren wird das Salz zerstört.

6.428 mg Sbst.: 0.337 ccm N (21°, 754 mm). — 54.680 mg Sbst. verbr. bei der Titration 1.170 ccm n_{10} -AgNO₃. — 9.296 mg Sbst.: 1.554 mg TiO₂.

C₂₀H₁₆O₇N₂ClTi. Ber. N 5.86, Cl 7.43, Ti 10.01.
Gef. „ 6.04, „ 7.61, „ 10.03.

Bonn, im Dezember 1937.

20. Wilhelm Kiessling und Philipp Schuster: Über die sterische Zugehörigkeit der biologischen Glycerin- α -phosphorsäure und Glycerin-säure-3-phosphorsäure.

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

(Eingegangen am 14. Dezember 1937.)

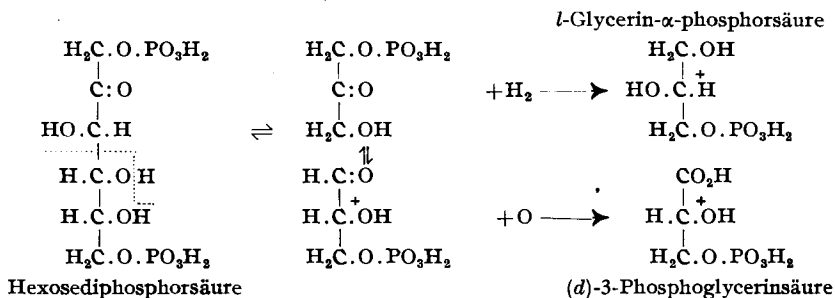
Die natürliche Glycerin- α -phosphorsäure, die neben Glycerinsäure-3-phosphorsäure (3-Phosphoglycerinsäure) durch enzymatische Dismutation der Hexosediphosphorsäure entsteht und in Gegenwart des glykolyisierenden Muskelextrakts Brenztraubensäure zu Milchsäure reduzieren kann, liefert den linksdrehenden Dimethyläther-dimethylester ($[\alpha]_D^{20}$: -4.46°¹). Dieselbe Verbindung erhielten aber H. O. L. Fischer und E. Baer kürzlich durch Phosphorylierung von *d*(+)-Acetonglycerin, wobei das phosphorylierte C-Atom den C-Atomen 3 oder 4 des zur Herstellung von Acetonglycerin dienenden Diacetonmannits entsprach²), so daß hierbei die Bildung der *l*-Glycerinphosphorsäure zu erwarten war. Hieraus ginge hervor, daß die biologische (—)-Glycerin- α -phosphorsäure zur *l*-Reihe gehörte.

Der Befund der HHrn. Fischer und Baer, den sie uns schon vor seiner Veröffentlichung mitteilten, veranlaßte uns, festzustellen, ob wir durch Oxydation der natürlichen, aus Hefe isolierten Glycerin- α -phosphorsäure

¹) O. Meyerhof u. W. Kiessling, Biochem. Ztschr. **264**, 40 [1933].

²) Naturwiss. **25**, 588/589 [1937].

mittels Broms die natürliche (—)-3-Phosphoglycerinsäure oder deren Antipoden erhalten würden. Enzymatisch entsteht die (—)-3-Phosphoglycerinsäure durch Oxydation von Triose-phosphorsäure³⁾, welche ihrerseits mit Muskelextrakt in einem Oxydoreduktionsvorgang aus der biologischen Glycerin- α -phosphorsäure gebildet wird⁴⁾. Außerdem besteht ein enzymatisches Gleichgewicht Dioxyaceton-phosphorsäure \rightleftharpoons *d*-Glycerinaldehyd-phosphorsäure⁵⁾, so daß es zunächst offen war, ob die enzymatische Oxydation auf dem Wege *l*(—)-Glycerin- α -phosphorsäure \rightarrow Dioxyaceton-phosphorsäure \rightarrow (—)-3-Phosphoglycerinsäure oder auf dem Wege *l*(—)-Glycerin- α -phosphorsäure \rightarrow Dioxyaceton-phosphorsäure \rightarrow *d*(+)-Glycerinaldehyd-phosphorsäure \rightarrow (—)-3-Phosphoglycerinsäure vor sich geht. Dagegen ist aus sterischen Gründen der direkte enzymatische Weg *l*(—)-Glycerin- α -phosphorsäure \rightarrow *d*-Glycerinaldehyd-phosphorsäure unwahrscheinlich. Wie bereits in der Arbeit der HHrn. Fischer und Baer vorläufig mitgeteilt, führten unsere Versuche zu dem Ergebnis, daß durch Oxydation der biologischen Glycerin- α -phosphorsäure mit Brom die unbiologische (+)-3-Phosphoglycerinsäure erhalten wird, so daß die natürliche Phosphoglycerinsäure zur *d*-Reihe gehört und damit der zweite, oben genannte Weg der biologischen Oxydation der wahrscheinlichere ist. Insbesondere vollzieht sich dann die Dismutation des Hexosediphosphats nach dem folgenden Schema⁶⁾:



Wie von dem einen von uns früher beschrieben⁷⁾, kann man die Bariumsalze der racemischen α - und β -Glycerinphosphorsäure mittels Broms in neutraler Lösung zu den entsprechenden Carbonsäuren oxydieren, wenn man den entstehenden HBr mit Natronlauge abstumpft. Hierbei fallen die schwerlöslichen Bariumsalze der Phosphoglycerinsäuren aus und werden damit größtenteils einer weiteren Oxydation entzogen. Die Verbindungen lassen sich dann in Gestalt der Silber- oder sauren Barium-Salze rein darstellen. Bei enzymatischem Umsatz ließ sich feststellen, daß von der, aus der Glycerin- α -phosphorsäure gewonnenen 3-Phosphoglycerinsäure die biologische Komponente linksdrehend ist ($[\alpha]_D^{20}$: -14.5° für freie Säure), die von der β -Glycerinphosphorsäure gewonnene biologische Komponente der 2-Phosphoglycerin-

³⁾ O. Meyerhof, W. Kiessling u. W. Schulz, *Biochem. Ztschr.* **292**, 25 [1937].

⁴⁾ O. Meyerhof u. W. Kiessling, *Biochem. Ztschr.* **264**, 40 [1933]; O. Meyerhof u. P. Ohlmeyer, *Biochem. Ztschr.* **290**, 334 [1937].

⁵⁾ O. Meyerhof u. W. Kiessling, *Biochem. Ztschr.* **279**, 40 [1935].

⁶⁾ vergl. hierzu O. Meyerhof, K. Lohmann u. Ph. Schuster, *Biochem. Ztschr.* **286**, 319 [1936].

⁷⁾ W. Kiessling, *B.* **68**, 243 [1935].

säure aber rechtsdrehend ($[\alpha]_D^{20}$: +24.3°). Ferner besteht noch ein enzymatisches Gleichgewicht (—)-3-Phosphoglycerinsäure \rightleftharpoons (+)-2-Phosphoglycerinsäure, so daß trotz der verschiedenen Drehung beide Verbindungen zur gleichen sterischen Reihe gehören müssen..

Die gleiche Methode wurde jetzt benutzt, um, ausgehend von der biologischen (—)-Glycerin- α -phosphorsäure, die sterische Zugehörigkeit der durch Oxydation entstandenen 3-Phosphoglycerinsäure festzulegen. Wir erhielten so die rechtsdrehende Verbindung $[\alpha]_D^{20}$: +13.6° für freie Säure. Diese Verbindung vergärt nicht und ist nicht imstande, sich auf dem Weg über Phosphobrenztraubensäure mit Glucose zu Brenztraubensäure und Hexose-monophosphorsäure umzuestern⁸⁾, wie es die natürliche Verbindung tut. Im Gegensatz zur racemischen 3-Phosphoglycerinsäure kristallisiert das saure Bariumsalz unserer Verbindung wie das der natürlichen 3-Phosphoglycerinsäure in schönen, rechteckigen, doppelbrechenden Platten (vergl. Fig. 1) und enthält gleichviel Krystallwasser, während das saure Bariumsalz der Racemverbindung amorph ist.



Fig. 1. (+)-3-Phosphoglycerinsäure.

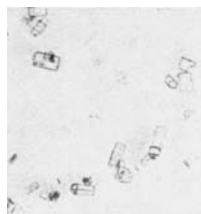


Fig. 2. Natürl. (—)-3-Phosphoglycerinsäure.

Einen unabhängigen Beweis für die sterische Zugehörigkeit der (+)-3-Phosphoglycerinsäure und andererseits der biologischen (—)-3-Phosphoglycerinsäure liefert die Hydrolyse mittels *n*-HCl bei 126°. Nach Neutralisieren der Lösungen mit Bariumacetat und NaOH und Entfernung des Phosphats erhält man für das aus (+)-3-Phosphoglycerinsäure gespaltene glycerinsäure Barium die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$: -10°, berechnet für Ba(C₃H₅O₄)₂, und entsprechend für das Hydrolysat der biologischen (—)-3-Phosphoglycerinsäure $[\alpha]_D^{20}$: +12°⁹⁾, was innerhalb der Fehlergenauigkeit den optischen Drehungen der *l*- bzw. *d*-glycerinsäuren Bariumsalze entspricht.

Die Gesamtausbeute an Phosphoglycerinsäure in dem im Versuchsteil beschriebenen Ansatz beträgt etwa 40% der vorgelegten *l*-Glycerin- α -phosphorsäure, etwa ebenso viel wie bei Ausgehen von racemischer. Abgesehen von einer gewissen, nicht in Reaktion getretenen Menge von Glycerinphosphorsäure bestehen die weiteren Fraktionen zur Hauptsache aus stärker oxydierten phosphorylierten Produkten, die sämtlich keine optische Drehung zeigen und nicht genauer untersucht wurden. Die Menge der gebildeten Phosphoglycerinsäure wurde bestimmt mittels der colorimetrischen Methode von S. Rapoport¹⁰⁾, die sich an das Verfahren von Eegriwe¹¹⁾ zur Bestimmung

⁸⁾ O. Meyerhof u. W. Kiessling, Biochem. Ztschr. **281**, 249 [1935].

⁹⁾ Dieselbe Drehung (+12°) gibt auch das Hydrolysat der natürlichen (+)-2-Phosphoglycerinsäure. ¹⁰⁾ Biochem. Ztschr. **289**, 406; **291**, 429 [1937].

¹¹⁾ Ztschr. analyt. Chem. **95**, 323 [1933].

der Glycerinsäure anlehnt und für unsere Zwecke genügend spezifisch ist (Blaufärbung mit Naphthoresorcin in konz. Schwefelsäure). Da die Drehung mit dem colorimetrisch bestimmten Phosphoglycerinsäuregehalt übereinstimmt, ist daneben keine (—)-3-Phosphoglycerinsäure entstanden, was der Unvergärbbarkeit des Produkts entspricht.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung der natürlichen Glycerin- α -phosphorsäure.

Die Isolierung der natürlichen Glycerin- α -phosphorsäure erfolgt im Prinzip nach dem von O. Meyerhof und W. Kiessling angegebenen Verfahren¹²⁾. Danach bildet sie sich als enzymatisches Dismutationsprodukt des Hexosediphosphats neben Phosphoglycerinsäure, wenn man einen Hefemacerationssaft oder eine Aufschwemmung von Trockenhefe mit Fluorid vergiftet. Als Quelle des Hexosediphosphats diente uns Glucose und anorganisches Phosphat, die, in Abwesenheit von Fluorid, in der raschen Gärperiode sich teils zum Diphosphorsäure-ester, teils zum Monoester kondensieren.

Ansatz: 200 g Trockenhefe (Stamm RS, Löwenbräu-München) wurden in 1 l Wasser suspendiert, mit 310 ccm Lösung versetzt, enthaltend 16 g NaHCO₃, 15 g Glucose und 0.4 g Acetaldehyd (zur Beschleunigung der Angärung) und bei 28° im Thermostaten gehalten. Nach 10 Min., als der größte Teil des aus der Hefe präformierten anorganischen Phosphats verestert war, wurden weitere 300 ccm Glucose-Phosphatlösung zugegeben, mit 45 g Glucose und einem Gemisch von Na₂HPO₄ und KH₂PO₄ (pH 7.4) enthaltend 7 g P₂O₅. Nach weiteren 50 Min. Stehen bei 28° war das anorganische Phosphat zu 86% verestert; es wurden dann 30 ccm *m*-KF hinzugesetzt und weitere 2 Stdn. bei 28° gehalten. Dann wurde mit Trichloroessigsäure entweißt und aus dem Filtrat die Glycerin- α -phosphorsäure in der üblichen Weise gewonnen, nachdem die gleichzeitig entstandene (—)-3-Phosphoglycerinsäure als saures Ba-Salz abgetrennt war. Die Glycerinphosphorsäure wurde dann aus der Lösung über das Pb- und Ag-Salz gereinigt und als Bariumsalz dargestellt. Ausb. 15 g mit 19.4% P₂O₅. Der Glyceringehalt wurde nach Zeisel-Fanto in der Mikroausführung von Pregl bestimmt. Verhältnis Glycerin: P₂O₅ = 1.26; berechnet 1.30. Mit frischem Froschmuskelextrakt und Brenztraubensäure, mit und ohne Fluoridzusatz wurde die biologische Wirksamkeit an der Milchsäureausbeute bestimmt.

Ein kleiner Teil des aus dem Gäransatz gewonnenen glycerinsauren Bariums wurde über die Pb-Fällung als kristallisiertes Silbersalz dargestellt. Nach Entfernen des Pb mit H₂S wurde neutral mit AgNO₃ versetzt und mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. Die Ag-Fällung wurde in 2-*n*.HNO₃ gelöst, heiß mit 1-proz. NH₃ neutralisiert und noch etwas AgNO₃ im Überschub zugesetzt; nach Erkalten kristallisierte das glycerinsaure Silber in schönen farblosen Nadelbüscheln aus.

Gesättigte Lösung des Ag-Salzes (65.5 mg pro ccm) gibt im 2-dm-Rohr α : +0.06°. Für C₃H₇O₆PAg₂ ber. $[\alpha]_D^{20}$: +0.8°, für freie Säure ber. +1.0°.

¹²⁾ Biochem. Ztschr. **267**, 313 [1933].

Darstellung der (+)-Glycerinsäure-3-phosphorsäure.

Die Darstellung erfolgte analog dem bei den racemischen Glycerinsäurephosphorsäuren verwandten Verfahren. 8.7 g *l*-glycerin- α -phosphorsaures Barium + 10 g Bariumacetat wurden in 75 ccm Wasser gelöst und mit 7.5 g Brom sowie unter starkem Rühren mit 30 ccm 3-*n*.NaOH im Verlauf von 20 Min. versetzt. Nach weiteren 80 Min. wurde eine Probe entnommen, in der, nach Entfernung des Ba mit Na₂SO₄ und Eindampfen zur Trockne, unter Zusatz einiger Tropfen konz. HCl der Phosphoglycerinsäuregehalt colorimetrisch nach Rapoport bestimmt wurde. Er entsprach 43% der vorgegebenen Glycerinphosphorsäure. Dann wurde der entstandene Bariumniederschlag abzentrifugiert, mit 50-proz. Alkohol bromfrei gewaschen, mit verd. Salzsäure in Lösung gebracht und schwach kongosauer mit der doppelten Menge Alkohol wieder gefällt. Die Fällung wurde abermals gelöst, das Barium mit Schwefelsäure ausgefällt und die Phosphoglycerinsäure neutral als gallertartiges Mg-Salz mit dem doppelten Volumen Alkohol niedergeschlagen. Das Produkt wurde mit 75-proz. Alkohol gewaschen, in verd. Salpetersäure und Wasser gelöst und wiederholt in neutraler Lösung als Ag-Salz umgefällt. Dann wurde nach Abtrennen des Silbers als Sulfid und Entlüften des Schwefelwasserstoffs die Säure mit Bariumacetat in fast kongoneutraler Lösung als saures Ba-Salz auskristallisiert. Nach langsamem Umkristallisieren im Eisschrank über Nacht war die Verbindung rein. Sie wurde zuerst im Schwefelsäure-Exsiccator bei Zimmertemperatur und dann über Phosphorpentoxyd bei 80° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Ausb. 1.4 g Bariumsalz, entspr. 18% der verwandten Glycerin- α -phosphorsäure.

Krystallwasser-Bestimmung: 19.06 mg Sbst. 140 Min. über P₂O₅ mit siedendem Toluol (107°) im Hochvakuum (<0.001 mm) getrocknet. Gewichtsabnahme = 0.78 mg. Dasselbe wiederholt über siedendem Xylol (137°). Gewichtsabnahme 0.08 mg. Die gesamte Gewichtsabnahme = 4.5% entspricht nicht ganz 1 Mol. Wasser. Danach hatte das saure Bariumsalz, das gewöhnlich lufttrocken mit 3 Mol. Wasser kristallisiert, bereits 1 Mol. durch das Trocknen bei 80° verloren und ein weiteres Mol. durch das Trocknen im Hochvakuum bei höherer Temperatur, während das dritte Mol. H₂O auch dann noch hartnäckig festgehalten wird¹³⁾.

Analyse der bei 80° getrockneten Substanz: 4.870 mg Sbst.: 1.85 mg CO₂, 1.18 mg H₂O. — 9.25 mg Sbst.: 5.99 mg BaSO₄. — 1.69 mg Sbst.: 0.327 mg P₂O₅ (colorimetrisch).

C₃H₅O₇·PBa + 2H₂O. Ber. C 10.07, H 2.54, Ba 38.43, P₂O₅ 19.86.

Gef. „ 10.36, „ 2.71, „ 38.0, „ 19.35.

101.6 mg Ba-Salz in 5 ccm *n*-HCl. 1 ccm enthält 10.3 mg freie Säure. α im 2-dm-Rohr: +0.28°. $[\alpha]_D^{20}$: +13.6°.

Zur Prüfung der Gärfähigkeit wurde das CO₂ bestimmt, das in Ansätzen von Trockenhefe nach Zusatz von Glucose, Monojodessigsäure und Phosphoglycerinsäure erhalten wurde. Hierbei wurden die biologische (—)-3-Phosphoglycerinsäure, die racemische 3-Phosphoglycerinsäure (hergestellt aus racemischer Glycerin- α -phosphorsäure) und die neu erhaltene (+)-3-Phosphoglycerinsäure verglichen. Die Glucose dient zur Beschleunigung der Vergärung der Phosphoglycerinsäure, während durch Jodessigsäure die Vergärbarkeit der Glucose selbst aufgehoben wird⁸⁾.

¹³⁾ O. Meyerhof u. W. Kiessling, Biochem. Ztschr. **265**, 330ff. [1933].

In der folgenden Tabelle sind die über den Kontrollansatz (ohne Phosphoglycerinsäure) gebildeten cmm CO₂ wiedergegeben, in Ansätzen von je 100 mg Trockenhefe unter Zusatz von 3×10^{-4} -m. Jodessigsäure, 10 mg Glucose und Phosphoglycerinsäure.

Benutzte Phosphoglycerinsäure	P ₂ O ₅ -Gehalt der Phosphoglycerinsäure	cmm CO ₂ nach	
		20 Min.	120 Min.
1. (—)	1.04	310	455
2. racemisch	1.32	118	197
3. racemisch	2.64	171	291
4. (+)	0.73	0	0
5. (+)	1.47	0	0
6. (+)	0.73	214	348
(—)	1.04		

Wie aus der obenstehenden Übersicht hervorgeht, wird in Gegenwart von (+)-3-Phosphoglycerinsäure kein CO₂ gebildet, während die Vergärbarkeit der (—)-3-Phosphoglycerinsäure durch Zusatz der Substanz zwar ähnlich wie mit racemischer Säure etwas verlangsamt, aber nicht wesentlich verringert wird (Versuch 6 im Vergleich zu 1 und 4).

Hydrolyse zu freier Glycerinsäure.

213 mg (+)-3-Phosphoglycerinsäure als Ba-Salz in 5 ccm *n*-HCl gelöst, Barium mit 1.5 ccm *n*-H₂SO₄ ausgefällt; α im 2-dm-Rohr: +0.40°. Nach 16-stdg. Hydrolyse bei 126° Phosphat völlig abgespalten. 3 ccm mit 1 ccm 25-proz. Bariumacetat und 0.3 ccm 10-*n*. NaOH neutralisiert, Bariumphosphat abgetrennt, mit Wasser gewaschen. α im 2-dm-Rohr: —0.12°. Die colorimetrische Glycerinsäurebestimmung entspricht 5.9 mg glycerinsaurem Ba; $[\alpha]_D^{20}$: —10°.

Ähnlicher Ansatz, 212 mg Sbst. von biologischer (—)-3-Phosphoglycerinsäure 23 Stdn. in *n*-HCl bei 126° hydrolysiert. Gesamtmenge (5 ccm) mit 2 ccm 25-proz. Bariumacetat und 0.6 ccm 10-*n*. NaOH neutralisiert. Nach Entfernung des Bariumphosphats α : +0.21°. Die Glycerinsäurebestimmung entspricht 8.7 mg glycerinsaurem Ba, danach berechnet $[\alpha]_D^{20}$: +12°. Die Genauigkeit der Messungen ist wegen der niedrigen Drehung und colorimetrischen Bestimmung der Glycerinsäure geringfügig.

21. Robert Fricke: Über das amorphe inaktive EisenIII-oxydhydrat von Alfons Krause. Nach Versuchen zusammen mit W. Schweckendiek.

[Aus d. Laborat. für anorgan. Chemie d. Techn. Hochschule Stuttgart.]
(Eingegangen am 6. Dezember 1937.)

Kürzlich veröffentlichte A. Krause eine Mitteilung, in der geschildert wird, wie man durch 3-stdg. Kochen der 1.25 g FeCl₃·6H₂O oder 1.8 g Fe(NO₃)₃·9H₂O entsprechenden Menge FeIII-hydroxyd mit 200 ccm 1-*n*. Natronlauge in einem 1-*l*-Glaskolben zu einem Oxydhydrat gelangt, das röntgeno-