

358. Theodor Wieland und Rudolf Lambert¹⁾: *Synthese und Eigenschaften des Barium-S-n-butylthiophosphats*

[Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 30. Juli 1956)

Das Ba-Salz $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{SPO}_3\text{Ba}$ kann durch Einwirkung von POCl_3 auf n -Butylmercaptan dargestellt und durch Alkoholfällung aus Wasser kristallin abgeschieden werden. Die Verbindung erweist sich, wie andere energiereiche Phosphate, als alkali-stabil, aber labil gegen Säure. In saurer Lösung vermag sie ihren Phosphorsäurerest nicht nur auf Wasser zu übertragen (Hydrolyse), sondern auch auf verschiedene Alkohole. Diese Phosphorylierung verläuft auch im neutralen Gebiet, aber nur wenn gleichzeitig Jod als Oxydationsmittel zugesetzt wird.

S -Phosphorylverbindungen, Anhydride aus Phosphorsäure und Mercaptanen, $\text{R-S-PO}_3\text{H}_2$, sind bisher noch nicht in definierter Form erhalten worden. Zwar finden sich in der neuen Literatur zwei Angaben über diese Körperklasse, doch konnten die dort beschriebenen Verbindungen obigen Typs, S -Phosphorylcystein²⁾ und S -Phosphoryl-propylmercaptan³⁾, nicht als kristallisierte Derivate isoliert und deshalb in ihrer Reaktionsfähigkeit auch nicht genau studiert werden. Es ist uns gelungen, die S -Phosphorylverbindung des n -Butylmercaptans in Form eines krist. Ba-Salzes zu erhalten.

Analytisches

Alle Versuche zur Darstellung und über die Reaktionsfähigkeit des Thiophosphats wurden mit der Hochspannungselektrophorese⁴⁾ auf Papier in bequemer Weise verfolgt und ausgewertet. Ebenso wurde von der Papierchromatographie ausgiebig Gebrauch gemacht. Zum Nachweis aller Phosphatverbindungen verwendeten wir hierbei die bekannte Molybdänblau-Reaktion⁵⁾. In Abbild. 1 ist eine schematische Zusammenstellung des pherographischen Verhaltens verschiedener Phosphorderivate gegeben, die alle bei p_{H} 1.9, aber mit recht verschiedener Geschwindigkeit zur Anode wandern. Im linken Abschnitt erkennt man, daß Orthophosphorsäure und Thiophosphorsäure hier gleichen Ladungszustand aufweisen, die polyvalenten Pyro- und Trimetaphosphorsäuren dementsprechend weiter wandern und Phosphorige Säure fast doppelt so weit wie Phosphorsäure wandert. Bei den in der Mitte abgebildeten Estern sind ebenfalls große Differenzen zu beobachten, die von den deutlichen Unterschieden in den Dissoziationskonstanten herrühren. So betragen die p_{K_1} -Werte⁶⁾ von

Monomethylphosphat	1.54	Monoäthylphosphat	1.60
Mono- n -butyl-phosphat	1.89	Diäthylphosphat	1.39

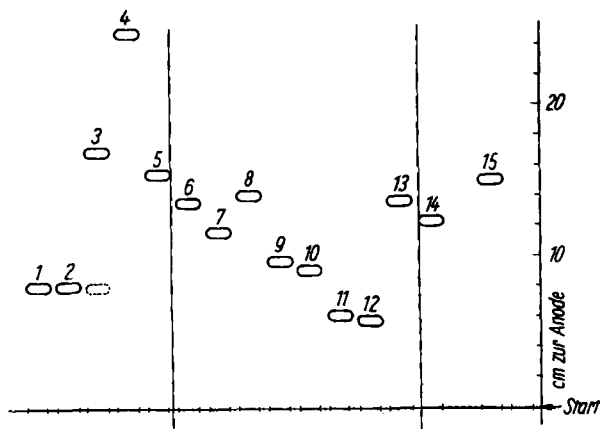
¹⁾ Teil der Dissertat. R. Lambert, Universität Frankfurt a. M. 1956.

²⁾ F. Binkley, *J. biol. Chemistry* **195**, 263 [1952].

³⁾ E. O. F. Walsh, *Nature* [London] **169**, 546 [1952].

⁴⁾ Th. Wieland, u. G. Pfeleiderer, *Angew. Chem.* **67**, 257 [1955].

⁵⁾ C. S. Hanes u. F. A. Isherwood, *Nature* [London] **164**, 1107 [1949].



Abbild. 1. Hochspannungpherogramm verschiedener Phosphorverbindungen bei p_H 1.9; 50 V cm^{-1} , 90 Min.; 1. H_3PO_4 ; 2. $\text{H}_3\text{PO}_3\text{S}$; 3. $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 4. $\text{H}_3(\text{PO}_3)_3$; 5. H_3PO_3 ; 6. Methylphosphat; 7. Äthylphosphat; 8. Diäthylphosphat; 9. *n*-Butylphosphat; 10. *sek.*-Butylphosphat; 11. *tert.*-Butylphosphat; 12. Octylphosphat; 13. Phenylphosphat; 14. *S-n*-Butylthiophosphat; 15. Acetylphosphat

Man erkennt, daß die Wanderung dieser Ester genau im hieraus erwarteten Sinn erfolgt und kann überdies von dem neu hergestellten *tert.*-Butylphosphat (vergl. weiter unten) eine erheblich schwächere Säurenatur ablesen.

Synthese

Da die Einführung des Phosphorylrests mit POCl_3 am einfachsten ist, konzentrierten wir von Anfang an unsere Bemühungen auf die Ausarbeitung der für diese Umsetzung günstigsten Bedingungen. So wurde das Silber- sowie das Triäthylamin-Salz des Mercaptans in Äther mit 1 Mol. POCl_3 zur Reaktion gebracht. In den Pherogrammen dieser Ansätze zeigte sich nach Verseifung der P-Cl-Bindungen in geringen Mengen die erwartete Substanz neben viel anorganischem Phosphat und erheblichen Mengen von Phosphoriger Säure. Daß hierbei ein Teil des POCl_3 oxydierend gewirkt hat, sahen wir auch an der Bildung von Di-*n*-butyl-disulfid, das aus solchen Ansätzen abdestilliert werden konnte. Ähnliches beobachtete man nach Reaktion des Mercaptans in wäßrigem LiOH mit POCl_3 , auch unter strengem Ausschluß von Sauerstoff. Hier entstand vom gewünschten *S*-Phosphat immerhin eine solche Menge, daß es aus mehreren Pherogrammen mikropräparativ eluiert und als deutlich kristallisiertes Ba-Salz aus wäßriger Lösung mit Alkohol ausgefällt werden konnte. Eine bessere Ausbeute (20 %) wurde schließlich durch die Verwendung von absol. Pyridin als Lösungsmittel erhalten, in dem man das Mercaptan mit POCl_3 bei -10° zur Reaktion brachte.

⁶⁾ W. D. Kumler u. J. J. Eiler, J. Amer. chem. Soc. **65**, 2355 [1943].

Eigenschaften des Thiophosphoresters

Das Ba-Salz kristallisiert aus der wäßrigen Lösung beim langsamen Versetzen mit Alkohol in glänzenden Blättchen (Abbild. 2). Diese geben nach dem Trocknen im Exsiccator Analysenwerte, die für den Gehalt von 0.5 Mol.



Abbild. 2. Kristalle von Ba-*S-n*-Butylthiophosphat aus Wasser-Alkohol

Kristallalkohol sprechen. Die Anwesenheit von Äthanol im Kristallisat hat, auch ihrer Quantität nach, Herr Dr. G. Pfeleiderer in der biochemischen Abteilung des Instituts durch spezifische enzymatische Alkoholbestimmung mit Alkoholdehydrogenase⁷⁾ festgestellt. Es ergab sich bei verschiedenen Präparaten ein Gehalt von 5.9–6.15% Äthanol, was recht genau mit 0.5 Mol. pro Mol. Ba-Salz übereinstimmt.

Das Salz ist leicht löslich in Wasser, in den geprüften organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich. Es ist gegen Alkali sehr beständig, wird jedoch in saurer Lösung nach Art eines energiereichen Phosphorsäurederivats rasch hydrolysiert. In dem in der Biochemie gebräuchlichen Test auf „7-Minuten-phosphat“⁸⁾ (Erhitzen mit 1*n* HCl auf 100° für 7 Min.) wird es zu 94% gespalten. Hierdurch rückt es in die Reihe der bekannten biochemischen „energiereichen Phosphate“ (z. B. Adenosintriphosphat u. a.) ein. Die Spaltungsansätze enthalten Phosphat neben Butylmercaptan (Nitroprussid-Reaktion), wodurch eine etwaige Formulierung als isomeres Ba-Salz des *O-n*-Butylesters der Thiophosphorsäure, *n*-C₄H₉O·P(S)O₂Ba, ausgeschlossen wird.

Die Natur unserer Verbindung als *S*-Phospho-mercaptan kann auch auf dem Papierchromatogramm nach einem Vorschlag von F. Lynen⁹⁾ erkannt werden, indem man die Chromatogramme mit Quecksilber(II)-chlorid-Lösung besprüht und dem hierbei „mercurolytisch“ entstandenen Mercaptid das Quecksilber durch anschließendes Besprühen mit NaCN entzieht. Hierauf gibt die Behandlung mit Nitroprussid-Na den deutlichen Fleck des Thiols.

Bei der Papierelektrophorese zeigt die neue Verbindung eine etwas größere Wanderungsgeschwindigkeit als das *O*-Isologe (Abbild. 1), was auf stärker sauren Charakter schließen läßt. Im UV-Spektrum ist keine charakteristische Bande wahrzunehmen.

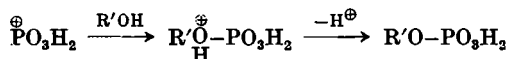
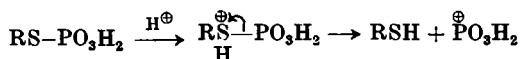
⁷⁾ Th. Bücher u. H. Redetzki, *Klin. Wschr.* **29**, 615 [1951].

⁸⁾ K. Lohmann, *Biochem. Z.* **202**, 466 [1928]; **254**, 332 [1932].

⁹⁾ F. Lynen, private Mitteilung.

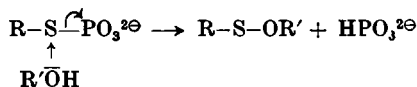
Phosphorylierungen mit dem *S*-Phosphat

Die in saurer Lösung ziemlich rasch verlaufende Hydrolyse des *S*-Phosphats kann unter Protonenkatalyse als Übertragung des Phosphorylium-Ions aus einem Sulfoniumkomplex auf das Lösungsmittel Wasser formuliert werden.



R' = H: Hydrolyse; R' = organ. Rest: Alkoholyse

Ob diese Substitution, wie hier formuliert, als $\text{S}_{\text{N}}1$ - oder aber als $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion abläuft, müßte durch kinetische Messungen ermittelt werden. Ohne Rücksicht auf diese Entscheidung ist aber für beide Fälle zu erwarten, daß in Gegenwart einer leicht phosphorylierbaren Verbindung deren Phosphorylprodukt entstehen würde. So versuchten wir, an Stelle von Wasser verschiedene Alkohole mit dem *S*-Phosphat umzusetzen. Um die optimalen p_{H} -Bedingungen zu finden, wurde zunächst eine Serie von Versuchen mit Äthanol als Acceptor angesetzt. Wegen der Schwerlöslichkeit des Ba-*S*-Butylthiophosphats in Gegenwart dieses Substrats wurde das Ba-Salz zunächst durch doppelte Umsetzung mit Ammoniumsulfat ins NH_4 -Salz verwandelt. 2.5 mg von diesem wurden mit 0.5 ccm Puffer (für p_{H} 1: 0.1 *n* HCl, für p_{H} 2–9: Gemische von Ameisensäure, Essigsäure, Pyridin und Wasser, für p_{H} > 9: wäßriges NH_4OH) und 0.1 ccm Äthanol 24 Stdn. bei 20° stehengelassen und dann papierelektrophoretisch oder -chromatographisch analysiert. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe war, daß sich im stark sauren Bereich, am besten unterhalb von $p_{\text{H}}1$, eine deutliche Menge von Monoäthylphosphat neben Phosphorsäure gebildet hatte und der Thioester völlig verschwunden war. Die Ausbeute an Äthylphosphat war schon bei p_{H} 5 und 6 sehr gering, vom p_{H} 7 ab war gar kein *O*-Ester, sondern nur wenig anorganisches Phosphat entstanden und noch viel vom *S*-Phosphat übrig geblieben. Auffallend war dabei die deutliche Bildung von phosphorigsaurem Salz in den Ansätzen von p_{H} 6 an und besonders im alkalischen Gebiet. Dies legt den Schluß nahe, daß die P–S-Bindung eine, wenn auch geringfügige Solvolyse entgegen ihrer (nicht sehr ausgeprägten) Polarisierung erleiden kann, wobei der Schwefel als elektrophileres Element auftritt.



Im sauren Milieu wurde dann die Phosphorylierbarkeit einiger Alkohole unter modifizierten Bedingungen untersucht, indem man 3 mg des Ba-*S*-Butylthiophosphats in 0.2 ccm des betreffenden Alkohols mit wasserfreier Ameisen-

säure bis zur Lösung versetzte, 7 Stdn. stehen ließ und dann zur Analyse chromatographierte. Die deutliche Bildung der Monophosphate wurde mit folgenden Alkoholen festgestellt: Methanol, Äthanol, *n*-Butanol, *sek.*-Butanol, *n*-Octanol und Phenol. Bei Verlängerung der Alkylkette (*n*-Octanol) waren die Ausbeuten geringer, beim *sek.*-Octanol und *tert.*-Butanol war keine Phosphorylierung zu beobachten. Die zum Vergleich benötigten, zum Teil bisher noch nicht beschriebenen Monophosphate wurden durch Phosphorylierung der betreffenden Alkohole in eiskaltem $4n$ LiOH unter kräftigem Schütteln mit POCl_3 dargestellt und nach Abzentrifugieren des Li-Phosphats direkt in Lösung verwendet. Außer den einfacheren Alkoholen konnten in Formamid, das mit Ameisensäure angesäuert war, mit dem Ba-*S*-Butylthiophosphat auch die biochemisch interessanten Substrate Glucose und Adenosin phosphoryliert werden. Aus mehreren papierelektrophoretisch getrennten Produkten der Glucosephosphorylierung konnte mikropräparativ eine Substanz eluiert werden (Ausb. 5 %, bez. auf Glucose), deren Struktur als Glucose-6-phosphat von Dr. G. Pfeleiderer im spezifischen enzymatischen Test (Oxydation mit Triphosphopyridin-nucleotid—„Zwischenferment“ zu 6-Phosphogluconsäure¹⁰⁾) erhärtet wurde.

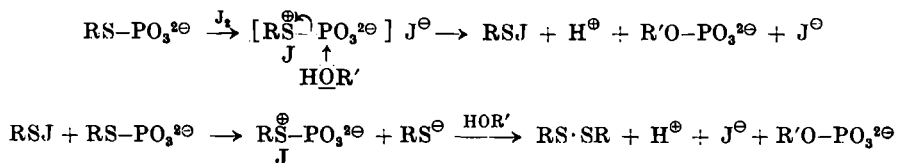
Bei der analogen Umsetzung mit Eisessig wies das Pherogramm eine phosphathaltige Zone auf, die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit mit dem auf andere Weise¹¹⁾ synthetisierten Acetyl-phosphat übereinstimmte. Die vor der Elektrophorese mit Hydroxylamin + Pyridin zur Reaktion gebrachten Ansätze ließen im Chromatogramm eindeutig Acethydroxamsäure erkennen, woraus hervorgeht, daß unser *S*-Phosphat auch in der Lage ist, Essigsäure zum energiereichen Anhydrid $\text{CH}_3\text{-CO-O-PO}_3\text{H}_2$ zu phosphorylieren.

Schließlich fanden wir, daß die phosphorylierende Wirkung der *S*-Phospho-Verbindung erheblich verstärkt und auch in neutralem p_{H} zur Entfaltung gebracht werden kann, wenn man den Ansätzen Jod-Lösung zufügt, die dabei sofort entfärbt wird. Hierbei arbeiteten wir wegen der Unlöslichkeit des Ba-Salzes in Alkohol mit dem Tetramethylammoniumsalz des *S-n*-Butylthiophosphats, das man aus dem Ba-Salz durch doppelte Umsetzung mit Tetramethylammoniumsulfat und anschließende Gefriertrocknung leicht erhält. Dieses Salz ist in den meisten Alkoholen löslich. Versetzte man eine solche Lösung mit Jod im gleichen Alkohol bis zum Bestehen der Farbe, so fand man anschließend im Chromatogramm in guter Ausbeute (bis zu etwa 50 %) das entsprechende Monoalkylphosphat. Hierbei wurde auch die Veresterung des *tert.*-Butanols beobachtet, die bisher mit diesem Alkohol nicht erzielt werden konnte.

Als Mechanismus für diese „oxydative Phosphorylierung“ scheint uns ein solcher plausibel, bei dem das elektrophile Jod mit dem S der *S*-Phosphatbindung reagiert, wodurch ein stark phosphorylierendes „Sulfoniumphosphat“ erzeugt wird, das dann mit Phosphatacceptoren unter nucleophiler Reaktion weiter reagiert:

¹⁰⁾ O. Warburg u. W. Christian, *Biochem. Z.* 287, 291 [1936].

¹¹⁾ E. R. Stadtman u. F. Lipmann, *J. biol. Chemistry* 185, 549 [1950].

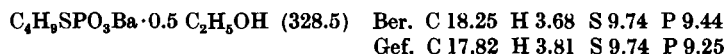


Das bei der Spaltung entstehende Sulfensäurejodid RSJ kann auf eine zweite Molekel *S*-Phosphat unter J^{\ominus} -Abgabe oxydierend einwirken, so daß im Endeffekt bei der Reduktion von 1 Atom Jod eine Molekel Alkylphosphat gebildet wird.

Dem Fonds der Chemischen Industrie hat R. Lambert sehr für eine finanzielle Unterstützung zu danken.

Beschreibung der Versuche

Ba-Salz der *S-n*-Butyl-thiophosphorsäure: 5.25 ccm (0.05 Mol) *n*-Butyl-mercaptan und 4.55 ccm (0.05 Mol) $POCl_3$ werden mit je 5 ccm Pyridin unter guter Kühlung vermischt. Bei -10° gibt man langsam die Mercaptanlösung zur $POCl_3$ -Lösung und stellt die Mischung in den Kühlschrank, wo sie bald unter Ausscheidung von Pyridinhydrochlorid erstarrt. Nach dem Aufbewahren über Nacht wird abgesaugt und der Niederschlag mit wenig kaltem Pyridin gewaschen. Filtrat und Waschlösung läßt man zur Verseifung unter gutem Rühren und Eiskühlung in eine Lösung von 12 g NaOH in 200 ccm Wasser eintropfen und äthert nach 30 Min. einige Male aus. Jetzt wird das anorganische Phosphat mit Magnesiamixtur gefällt¹²⁾ und das Filtrat oder Zentrifugat mit der Lösung von 24 g Ba-Acetat in 60 ccm Wasser versetzt. Auf Zusatz des der wäßrigen Lösung gleichen Volumens Alkohol fällt das Bariumsalz bald in großen Kristallen aus (21% Ausb.), die manchmal leicht gelb gefärbt sind. Durch Behandeln der konz. wäßrigen Lösung mit wenig Aktivkohle und neuerlichem Alkoholzusatz erhält man ein farbloses Salz, das, nach dem Absaugen mit absol. Alkohol, dann mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet wird.



Enzymatische Alkoholbestimmung: 8.956 mg Ba-Salz enthielten 0.522 mg Äthanol = 6.2%; ber. für 0.5 Mol. C_2H_5OH pro Mol. Salz: 7.0%.

Bestimmung des „7-Minuten-phosphats“: 1 ccm Lösung wird mit 1 ccm 2*n* HCl 7 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, dann das abgespaltene Phosphat nach l. c.¹³⁾ kolorimetrisch bestimmt. Hiernach liegen 8.71% des P (ber. 9.23%), also 94.3% als anorganisches Phosphat vor.

Nachweis der Thiophosphatbindung auf dem Papierchromatogramm: Das bei 60–70° im Lufttrockenschrank getrocknete Papier wird mit einer gesätt. $HgCl_2$ -Lösung besprüht und dann nochmals getrocknet. Hierauf besprüht man mit einer 5-proz. wäßrigen Nitroprussid-Na-Lösung und anschließend mit einer wäßrigen KCN-Lösung; es tritt die für Mercaptane charakteristische Rotfärbung auf, die bald wieder verschwindet. Nitroprussid-Na-Lösung ohne vorherige Anwendung von $HgCl_2$ oder unter Verwendung von Ammoniakgas ruft keine oder nur sehr schwache Färbung hervor. Der Nachweis ist nicht sehr empfindlich.

Phosphorylierung von Alkoholen im sauren Medium: 3 mg des Bariumsalzes des Thioesters werden mit 0.2 ccm des betreffenden Alkohols versetzt und wasserfreie Ameisensäure bis zur Lösung des Salzes hinzugeetropt. Nach 7stdg. Stehenlassen können

¹²⁾ E. Baer u. H. O. L. Fischer, J. biol. Chemistry **180**, 148 [1949].

¹³⁾ H. T. Theorell, Biochem. Z. **230**, 1 [1931].

die Ansätze chromatographiert werden. Mit Erfolg wurden folgende Alkohole phosphoryliert: Methanol, Äthanol, *n*-Butanol, *sek*-Butanol, *n*-Octanol, Phenol.

Synthese der Vergleichssubstanzen: Acetylphosphat nach l. c.¹¹); Äthylphosphat nach l. c.¹⁴); Diäthylphosphat nach l. c.¹⁴); Monophenylphosphat nach l. c.¹⁵); *n*-Butylphosphat, *sek*-Butylphosphat, *n*-Octylphosphat sowie Methylphosphat wurden durch Phosphorylierung der entsprechenden Alkohole in eiskaltem 4*n* LiOH mit POCl₃ und anschließendes Abzentrifugieren des Lithiumphosphats in Lösung erhalten.

Phosphorylierung von Adenosin und Glucose: Etwa 50 mg Substrat wurden in möglichst wenig trockenem Formamid unter Erwärmen gelöst und in der Kälte mit 6 mg Thioester sowie einigen Tropfen Ameisensäure zum Lösen desselben versetzt. Nach Aufbewahren über Nacht erfolgte Elektrophorese.

Darstellung des Tetramethylammoniumsalzes des *S*-Phosphoryl-*n*-butylmercaptans: Tetramethylammoniumchlorid wurde mit 1 Äquiv. Silbersulfat in wäßriger Lösung umgesetzt, das Silberchlorid abzentrifugiert und anschließend dieser Lösung 1 Äquiv. Ba-Thioestersalz, in Wasser gelöst, zugegeben. Nach Abzentrifugieren des Bariumsulfats und Gefriertrocknen der Lösung wurde ein farbloses Salz erhalten. Dieses löste sich in Wasser, Methanol, Äthanol und Formamid.

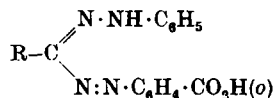
Oxydative Phosphorylierung: 3 mg Tetramethylammoniumsalz wurden in 3 cm Alkohol gelöst und eine Jodlösung des jeweiligen Alkohols tropfenweise bis zum Ende der Entfärbung zugegeben. Hierbei fiel häufig ein Niederschlag aus, der anschließend mit einigen Tropfen Wasser in Lösung gebracht wurde. Anschließende Elektrophorese des Ansatzes ergab in allen untersuchten Fällen eine Phosphorylierung in guter Ausbeute. Es wurden so Methanol, Äthanol, *n*-Butanol, *tert*-Butanol sowie Glucose (zu Glucose-6-phosphat) phosphoryliert.

359. Muvaffak Seyhan und W. Conard Fernelius: Notiz über Formazylokomplexe der Thiophen-Reihe

[Aus dem Department of Chemistry der Pennsylvania State University, University Park, Pa., U. S. A.]

(Eingegangen am 26. Juni 1956)

Bei den von den Formazyloverbindungen der allgemeinen Formel:



sich ableitenden Nickelkomplexen, in denen R einen verschiedenartigen heterocyclischen Rest darstellt, scheint die Natur von R, im Gegensatz zu den entsprechenden Urankomplexen, keinen Einfluß auf die Koordinationszahl des Nickels auszuüben¹). So wurden in allen bis jetzt untersuchten Fällen nur Nickelkomplexe mit der Koordinationszahl 3 isoliert²).

Eine weitere Bestätigung der früheren Befunde konnte nun am Beispiel des *N*-Phenyl-*N'*-[2-carboxy-phenyl]-*C*-[thiophenyl-(2)]-formazans (I) festge-

¹⁴) W. Lossen u. A. Köhler, Liebigs Ann. Chem. **262**, 209 [1891].

¹⁵) R. H. A. Plimmer u. W. J. N. Burch, J. chem. Soc. [London] **1929**, 289.

¹) M. Seyhan u. W. C. Fernelius, J. org. Chemistry **21** [1956], im Druck.

²) M. Seyhan, Mh. Chem. **86**, 545 [1955]; **87**, 234 [1956]; Chem. Ber. **88**, 1454 [1955].