

Chemische Synthesen von Zwischenprodukten des Zuckerstoffwechsels

Von Prof. Dr. HERMANN O. L. FISCHER

Department of Biochemistry, University of California in Berkeley, California, USA

Nach einem Plenarvortrag auf der GDCh-Hauptversammlung in München am 14. September 1955

Im Embden-Meyerhof-Schema der Gärung und der Glykolyse sind Phosphorsäure-Verbindungen entscheidende Zwischenstufen. Sieben dieser Substanzen konnten mit den Hilfsmitteln der organischen Chemie im Laboratorium des Verfassers rein dargestellt werden: Glucose-6-phosphorsäure, D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure, Dioxyacetophosphorsäure, L(-)-Glycerin-phosphorsäure, 3-Phosphoglycerinsäure, 2-Phosphoglycerinsäure und Phosphobrenztraubensäure. Ihre Darstellung und die der D-Erythrose-4-phosphorsäure wird beschrieben. Der Biochemiker besitzt damit für seine Untersuchungen wohldefinierte Substrate, die ihm u.a. neue Ausblicke in die Bildung hydroaromatischer und aromatischer Verbindungen in der Natur ermöglichen.

Milchsäure-Bildung in tierischen Geweben und alkoholische Gärung, die beide Abwandlungen derselben Reaktionsfolge sind, gehören heute zu den bestbekannten biochemischen Vorgängen dank der Arbeiten von *Harden* und *Young*, *Neuberg*, *Emden*, *Meyerhof*, *Warburg* u. a.

Die wichtige Rolle der Phosphorsäure beim Zuckerausbau wurde von *Harden* und *Young* entdeckt. Ohne Phosphat findet weder Gärung noch Milchsäure-Bildung (Glykolyse) statt. Das Kohlehydrat wird erst zerfallsbereit, wenn es mit Phosphorsäure verestert wird.

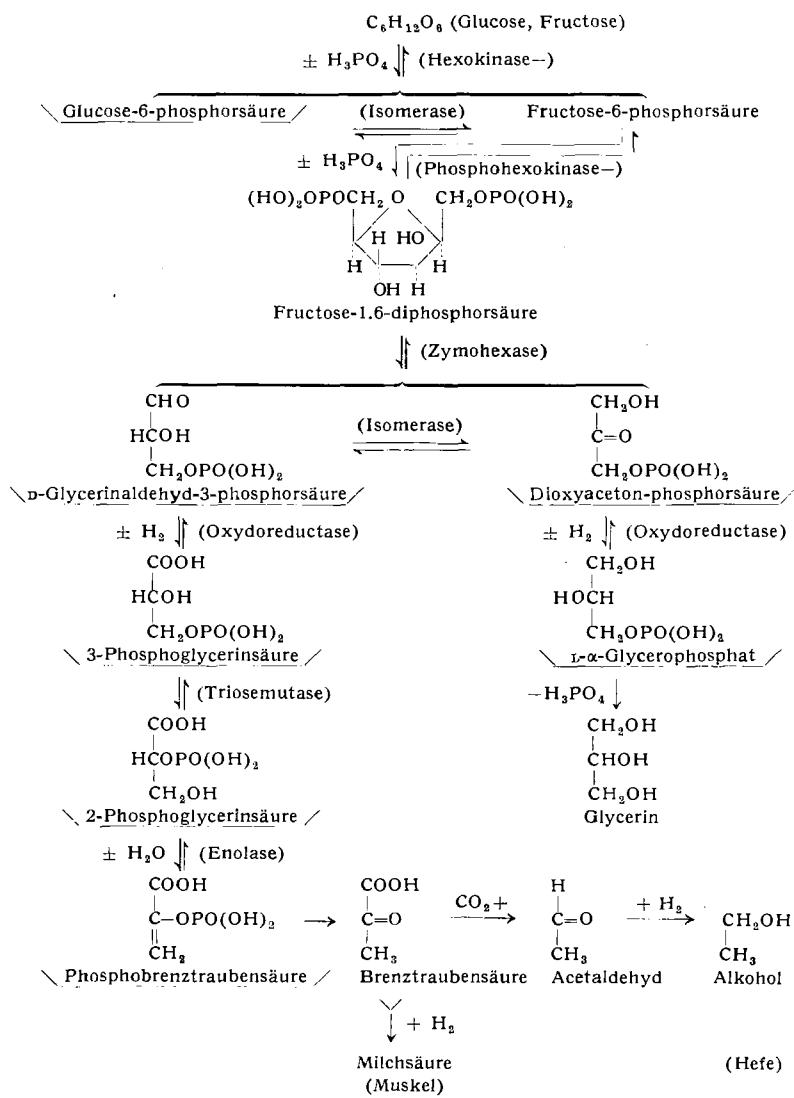
Unsere heutige Kenntnis dieser Vorgänge hat einen Niederschlag gefunden in dem wohlbekannten *Emden-Meyerhof*-Schema der Gärung und der Glykolyse. Ein nicht unwichtiges Hilfsmittel für die Entwicklung dieses Schemas kam von der organischen Chemie: Es wurden im Laboratorium von *Hermann O. L. Fischer* in Berlin, Basel, Toronto und Berkeley im ganzen sieben phosphorsäure-haltige Zwischenprodukte des Schemas synthetisiert. Mitarbeiter auf diesem Gebiet waren *Erich Baer*, jetzt in Toronto, Canada, *H. A. Lardy*, jetzt in Madison, Wisconsin, *C. E. Ballou* und *D. L. MacDonald* in Berkeley, Kalifornien.

Der Besitz dieser Substanzen erfüllte sozusagen einen Wunschtraum der Enzymchemiker, die nun ihren hochgereinigten, in vielen Fällen kristallisierten Enzymen chemisch reine, wohldefinierte Substrate vorsetzen konnten, um die Enzymwirkung qualitativ und quantitativ zu studieren. Die gleichen Substanzen aus einem Gärungsansatz oder Muskelbrei zu isolieren ist meist sehr schwer, wenn nicht unmöglich, weil die Zwischenprodukte im Augenblick nur in winziger Menge vorhanden und obendrein meist äußerst zersetzlich sind.

Die vorstehend erwähnten sieben Zwischenprodukte des *Emden-Meyerhof*-Schemas sind im Schema 1 dadurch gekennzeichnet, daß ihre Namen unterstrichen sind: Glucose-6-phosphorsäure, D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure, Dioxyacetophosphorsäure, L(-)-Glycerin-phosphorsäure, 3-Phosphoglycerinsäure, 2-Phosphoglycerinsäure, Phosphobrenztraubensäure,

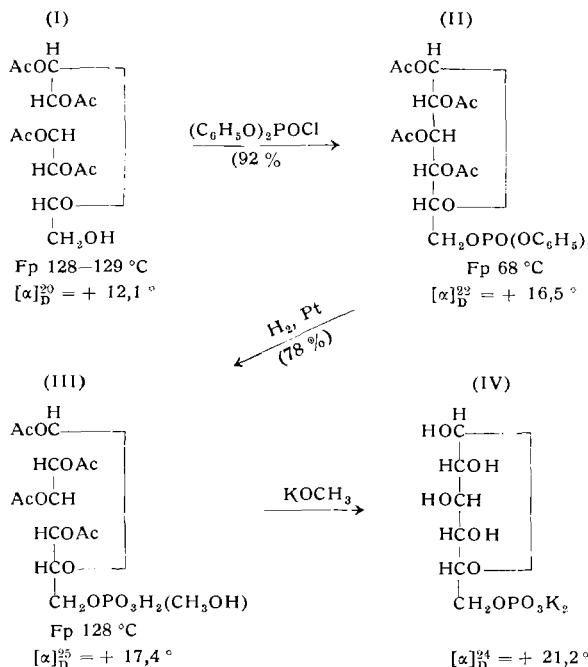
2-Phosphoglycerinsäure und Phosphobrenztraubensäure. Ihre chemische synthetische Darstellung soll in der gleichen Reihenfolge besprochen werden: Der Erfolg in der synthetischen Zuckerchemie beruht auf der zweckmäßigen Verwendung von Schutzgruppen und auf der Erfahrungsregel, daß Phosphorylierungen am besten gelingen, wenn alle Hydroxyl-Gruppen gesperrt sind, bis auf die eine, die die Phosphorsäure-Gruppe tragen soll.

Schema 1
Alkoholische Gärung und Glykolyse (Emden-Meyerhof-Schema)



Glucose-6-phosphorsäure¹⁾

Als Ausgangsmaterial benutzten wir 1.2.3.4-Tetraacetyl-D-glucopyranose (I), die nach *Helferich und Klein*²⁾ aus 6-Trityl-tetraacetyl-D-glucose durch Detritylierung mit Bromwasserstoff in Eisessig hergestellt wurde. Als Phosphorylierungsmittel bewährte sich Diphenyl-phosphorsäurechlorid, $(C_6H_5O)_2POCl$ ³⁾, welches in guter Ausbeute mit dem einen freien Hydroxyl des Zuckerderivats (I) reagierte und ein schön kristallisiertes Kupplungsprodukt (II) lieferte. Es brauchten nur noch die Schutzgruppen unter milden Bedingungen entfernt zu werden. Die Phenol-Gruppen vom Phosphorsäure-Rest wurden mit Wasserstoff



und Platinoxyd (Adams-Katalysator) abgespalten und die Acetyl-Gruppen mit Kaliummethylethylat in Methanol entfernt. Man erhielt so das schön kristallisierte Di-Kalium-salz der Glucose-6-phosphorsäure in guter Reinheit und Ausbeute, ein sehr gutes Ausgangsmaterial für Enzym-Versuche.

Wichtig für die Entwicklung des Gärungsschemas war die synthetische Bereitung der beiden Triosephosphate, Glycerin-aldehyd-3-phosphorsäure und Dioxy-aceton-phosphorsäure. Die Darstellung der racemischen Glycerinaldehyd-phosphorsäure fiel in eine Zeit, in der die Gärungstheorie von *Carl Neuberg* allgemein akzeptiert war. In dieser Theorie war das selbst nicht gärfähige Methyl-glyoxal die zentrale Substanz des Zuckerzerfalls, und Phosphorsäure-Derivate kamen darin überhaupt nicht vor. Heute wissen wir, daß das Methylglyoxal durch den leichten Zerfall der Triose-phosphate in saurer Lösung entsteht. Es wurde in *Neubergs* Versuchen in der Form seines Bis-(2,4-dinitro-phenyl-hydrazons) in reichlicher Menge aus mit Jodessigsäure gehemmten Gärungsansätzen isoliert. Im Jahre 1932 gelang *H. O. L. Fischer* und *Erich Baer* die erste Synthese des racemischen Glycerinaldehyd-3-phosphats⁴⁾ und 1933 beschrieben *Smythe* und *Gerischer*⁵⁾ in *Otto Warburgs* Institut die ersten Experimente, welche die biologische Bedeutung der Substanz demonstrierten. Seither ist das synthetische Material viel benutzt worden und war nützlich in biochemischen Studien von Systemen, in denen

¹⁾ *H. A. Lardy u. H. O. L. Fischer*, J. biol. Chemistry 164, 513 [1946].
²⁾ *B. Helferich u. W. Klein*, Liebigs Ann. Chem. 450, 219 [1926].
³⁾ *P. Brügel u. H. Müller*, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 2121 [1939].
⁴⁾ *H. O. L. Fischer u. E. Baer*, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 337, 1040 [1932].
⁵⁾ *C. V. Smythe u. W. Gerischer*, Biochem. Z. 260, 414 [1933].

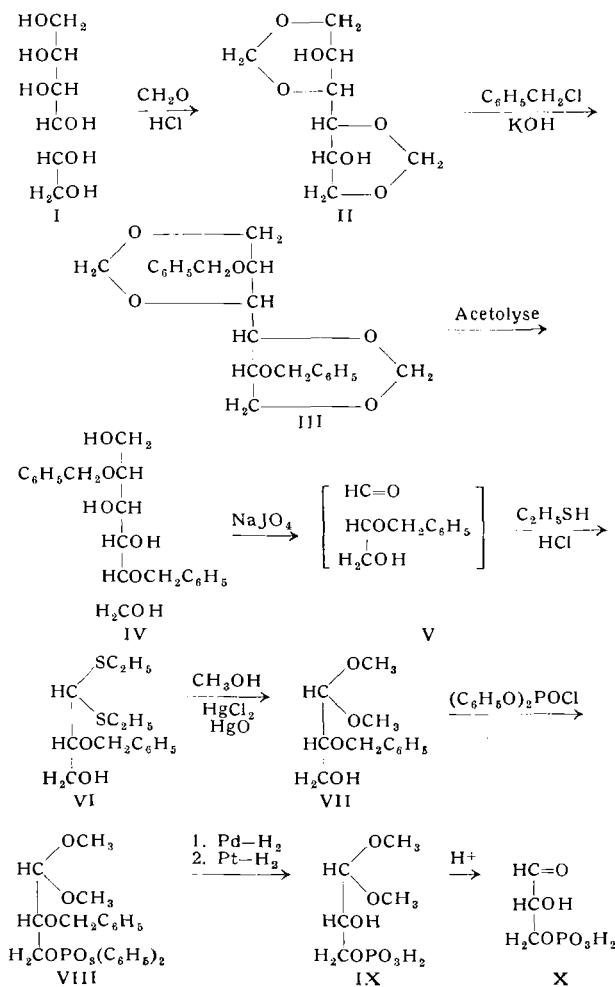
D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure vorkam⁶⁾). So ist die synthetische Verbindung ausgiebig benutzt worden bei der Entwicklung des *Embden-Meyerhof-Schemas* der Alkoholischen Gärung und der Glykolyse. Eine schöne Zusammenstellung über die zentrale Rolle der D-Glycerinaldehyd-phosphorsäure in Gärung und Glykolyse stammt aus der Feder von *B. L. Horecker*⁷⁾.

D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure

Die Synthese der racemischen oder D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure hat inzwischen ihre Bedeutung verloren, da es *C. E. Ballou* und *H. O. L. Fischer* gelang, die natürliche oder D-Komponente chemisch rein darzustellen⁸⁾. Wegen der sterischen Spezifität der biologischen Systeme war dies natürlich sehr erwünscht.

Es war wegen der großen Zersetzungskinetik der Triose-phosphorsäuren von vorne herein eine Spaltung der Racemverbindung in ihre optischen Antipoden aussichtslos. Deshalb sind *Ballou* und *Fischer* von dem leichterhältlichen D-Mannit ausgegangen und haben die Asymmetrie der Kohlenstoffatome 2 und 5 des Mannits für ihre Synthese benutzt. Das gleiche Prinzip unter Verwendung der Aceton-Schutzgruppe ist schon 1937 von *H. O. L. Fischer* und *E. Baer* für die Darstellung der natürlichen L(-)-Glycerin-phosphorsäure erfolgreich verwendet worden⁹⁾.

Im folgenden Schema ist der Weg der Synthese beschrieben.



⁶⁾ *O. Warburg u. W. Christian*, Biochem. Z. 303, 40 [1939]; *S. F. Velick u. J. E. Hayes, Jr.*, J. biol. Chemistry 203, 545 [1953] u. a.
⁷⁾ *B. L. Horecker*: „Phosphorus Metabolism,” Vol. I, The Johns Hopkins Press, Baltimore, Md., 1951, S. 117.
⁸⁾ *C. E. Ballou u. H. O. L. Fischer*, J. Amer. chem. Soc. 77, 3329 [1955].
⁹⁾ *H. O. L. Fischer u. E. Baer*: „Synthese der biologischen L(-)-Glycerinphosphorsäure”, Naturwissenschaften 25, 589 [1937]; s. a. dieses Heft, S. 416.

Die eigentliche Schlüsselsubstanz für die Synthese ist der 2-Benzyl-D-glycerinaldehyd (V). Um zu ihr zu gelangen, mußten die Autoren von dem leicht zugänglichen 1.3:4.6-Di-O-methylen-D-mannit ausgehen¹⁰). Die Methylen-Schutzgruppe ist zwar leicht einzuführen, kann aber nur unter relativ drastischen Bedingungen wieder abgespalten werden. Deshalb war es eine besonders glückliche Beobachtung von C. E. Ballou, daß sich ein in den Stellungen 3 und 5 dibenzylierter Dimethylen-D-mannit III¹¹) unter den Bedingungen der Acetylyse, mit etwa 27% Ausbeute unter Erhaltung der beiden Benzyl-Gruppen vom Methylen befreien läßt. Hat man erst den aus billigen Materialien herstellbaren 2.5-O-Di-benzyl-D-mannit IV in der Hand, dann sind die Ausbeuten der folgenden Stufen durchaus annehmbar. IV wird durch Natriumperjodat in 2 Molekülen 2-O-Benzyl-D-glycerinaldehyd (V) gespalten, dieser über das Mercaptal VI in sein Dimethylacetal VII verwandelt. VII, das nur noch ein freies Hydroxyl erhält, kann mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid zu VIII phosphoryliert werden, und nun kommt es darauf an, eine Benzyl- und zwei Phenol-Gruppen durch möglichst milde Hydrierung zu entfernen. Zuerst wird die Benzyl-Gruppe in Stellung 2 mit Palladium und Wasserstoff abhydriert und dann die beiden Phenol-Gruppen vom Phosphorsäure-Rest mit Platinoxyd und Wasserstoff entfernt. Wenn man versucht, alle drei Schutzgruppen in einem Arbeitsgang mit Platinoxyd mit Wasserstoff abzutrennen, so wird durch den stärkeren Katalysator der Benzyl-Rest zu Methyl-cyclo-hexan hydriert und ist dann nicht mehr abspaltbar¹²). Die katalytische Entfernung der drei Schutzgruppen führt zu dem Dimethylacetal der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure IX, das in Form seines Di-cyclohexylaminsalzes kristallisiert erhalten wird. In dieser Form ist das Triosephosphat lagerfähig und wird von der California Foundation for Biochemical Research, Los Angeles 63, California in den Handel gebracht. Will man sich daraus die freie D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure z. B. für einen Enzymversuch darstellen, so schüttelt man die wässrige Lösung des Salzes für ein paar Minuten mit Dowex 50 (H^+), um das Amin zu entfernen und läßt die filtrierte Lösung der freien Säure 72 h bei 38 °C stehen, um die Acetal-Gruppen abzuhydrolyzieren. Nach dieser Zeit zeigt die Lösung eine konstante Drehung von $[\alpha]_D = +14,5^\circ$ (in 0,1n Salzsäure), ist frei von anorganischem Phosphat und gibt dieselbe Hydrolysenkurve wie die synthetische DL-Verbindung und die natürliche Substanz.

So macht die Synthese dem Biochemiker in beliebiger Menge ein stabiles Derivat der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure zugänglich, aus der er sich leicht die optisch reine, freie Triosephosphorsäure herstellen kann. Die neue chemische Darstellung ist der enzymatischen weit überlegen und vermeidet alle Unsicherheiten der letzteren. Die chemische und optische Reinheit des synthetischen Produkts macht die polarimetrische Verfolgung von Reaktionen, an denen die Substanz teilnimmt, leicht und übersichtlich.

Dioxy-aceton-phosphorsäure

Die isomere Dioxy-aceton-phosphorsäure¹³), die kein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, konnte mit denselben Methoden und unter Benutzung älterer Arbeiten aus unserem Laboratorium¹⁴) verhältnismäßig leicht gewonnen

¹⁰⁾ W. T. Haskins, R. M. Hann u. C. S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. 65, 67 [1943].

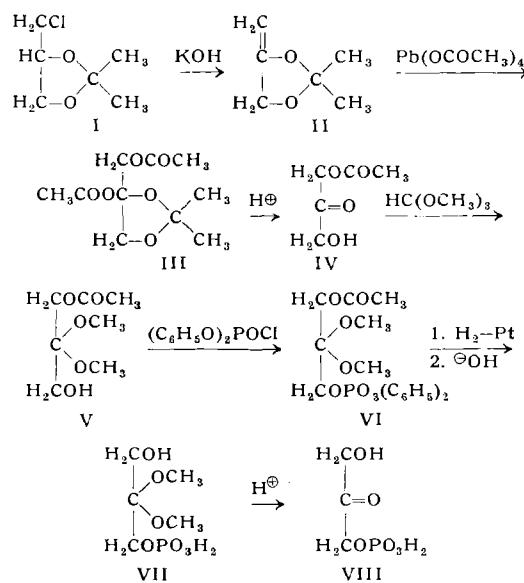
¹¹⁾ H. G. Fletcher, Jr. u. H. W. Diehl, J. Amer. chem. Soc. 74, 3797 [1952].

¹²⁾ J. C. Sowden u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 63, 3244 [1941]; K. Freudenberg, W. Dürr u. K. Hochstetter, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1735 [1928].

¹³⁾ C. E. Ballou u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 78, 1652 [1955].

¹⁴⁾ H. O. L. Fischer, E. Baer u. L. Feldman, Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 1732 [1930]; H. O. L. Fischer u. E. Baer, ebenda 65, 345 [1932].

werden. Acetoniertes Chlorhydrin (I)¹⁵) wurde mit gepulvertem Ätzkali destilliert und das gebildete Isopropyliden-2-propen-1.2-diol (II) mit Bleitetraacetat oxydiert. Das Produkt III gab mit verdünnter Säure Mono-acetyl-dihydroxy-aceton (IV), die eigentliche Schlüsselsubstanz der Synthese. IV ließ sich mit o-Ameisensäuremethylester und Ammoniumchlorid acetalisieren zu V. In V kann man eine

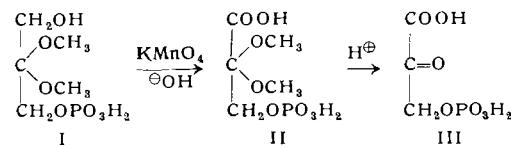


freie Hydroxyl-Gruppe mittels Diphenyl-phosphorsäurechlorid und Pyridin in guter Ausbeute phosphorylieren zu VI. Die Phenol-Schutzgruppen werden mit Platinoxyd und Wasserstoff abhydriert und die Acetyl-Gruppe mit Baryt entfernt. Aus der Lösung ist dann das schön kristallisierte Di-cyclohexylaminsalz der katalysierten Dihydroxy-aceton-phosphorsäure VII zu gewinnen. In dieser Form ist das Triosephosphat haltbar und im Handel. Will man die freie Dihydroxyaceton-phosphorsäure in Lösung erhalten, so entfernt man das Cyclohexylamin durch Schütteln mit Dowex 50 (H^+), worauf alsbald die saure Substanz in wässriger Lösung ihre Acetal-Gruppen verliert und nun für Enzymversuche bereit ist.

Die neue Synthese macht Dihydroxyaceton-phosphorsäure reichlich und in reiner, stabiler Form verfügbar und hat offensichtliche Vorteile gegenüber der enzymatischen Darstellung aus D-Fructose-1,6-diphosphat¹⁶) und der direkten Phosphorylierung von Dihydroxyaceton¹⁷).

Oxybrenztraubensäure-phosphorsäure

Einmal in Besitz des Cyclohexylaminsalzes der katalysierten Dihydroxyaceton-phosphorsäure haben C. E. Ballou und R. Hesse¹⁸) dasselbe in das Kaliumsalz verwandelt und dieses mit KMnO₄ in schwach alkalischer Lösung zu einem Derivat der phosphorylierten Hydroxy-brenztraubensäure II oxydieren können. Aus II läßt sich in analoger Weise zur Freisetzung der Dioxyaceton-phosphorsäure die freie Oxybrenztraubensäure-phosphorsäure III bereiten. Sie kommt nicht im Embden-Meyerhof-Schema vor, hat aber unter anderem insofern biologische Bedeutung, als A. Ichihara und



¹⁵⁾ E. Fischer u. B. Pfäehler, ebenda 53, 1608 [1920].

¹⁶⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, Biochem. Z. 271, 89 [1934].

¹⁷⁾ W. Kiessling, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 869 [1934].

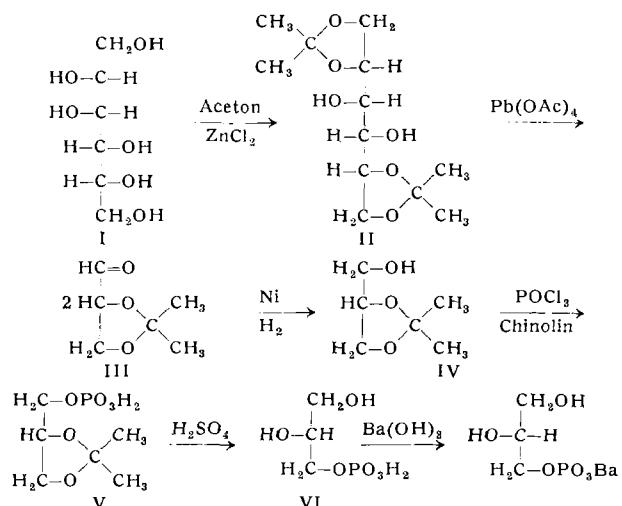
¹⁸⁾ C. E. Ballou u. R. Hesse, J. Amer. chem. Soc. 78, 3718 [1956].

D. M. Greenberg mit dem Präparat von Ballou und Hesse demonstrierten konnten, daß es durch ein Enzym aus Rattenleber und Transaminierung mit Glutaminsäure in guter Ausbeute Serin liefert¹⁹⁾.

L(-)-α-Glycerin-phosphorsäure

Nach dieser Abschweifung kehren wir zum Embden-Meyerhof-Schema zurück: Durch enzymatische Reduktion entsteht hier aus Dioxyaceton-phosphorsäure die L(-)-α-Glycerinphosphorsäure. Daß dies so sein muß, wurde durch die Konfigurationsbestimmung der natürlichen α-Glycerinphosphorsäure der Gärung und der Glykolyse als zur L-Reihe gehörig bewiesen, da eine solche nicht ohne Inversion aus D-Glycerinaldehyd phosphorsäure entstanden sein konnte. Diese Synthese ist schon 1937 durch H. O. L. Fischer und E. Baer in Basel ausgeführt worden und wird durch die folgenden Formeln illustriert²⁰⁾.

D-Mannit (I) wird unter besonderen Bedingungen in den Stellungen 1,2 und 5,6 zu einem Diaceton-mannit II acetoniert, in dem nur die Hydroxyl-Gruppen in 3 und 4 frei sind. II läßt sich durch Bleitetraacetat in Benzol in 2 Molekülen des acetonierten D-Glycerinaldehyds (III) spalten. III wird mit Raney-Nickel und Wasserstoff zu D(+)-Acetonglycerin (IV) reduziert, das die Muttersubstanz nicht nur für die L(-)-α-Glycerinphosphorsäure, sondern auch für die L-Reihe der optisch-aktiven α-Monoglyceride geworden ist²¹⁾. D(+)-Acetonglycerin IV wird mit Phosphoroxychlorid in Chinolin zu V phosphoryliert. V liefert nach saurer Hydrolyse der Aceton-Schutzgruppe die natürliche L(-)-α-Glycerinphosphorsäure VI, die im Gegensatz zu ihrem optischen Antipoden^{21a)}, von den Enzymen des Muskels restlos verarbeitet wird.



Das Prinzip, die optische Aktivität der Zuckeralkohole (Mannit) für die Synthese von kleineren Molekülen mit nur einem asymmetrischen Kohlenstoffatom heranzuziehen, ist am Beispiel der Synthese der L(-)-α-Glycerinphosphorsäure zuerst benutzt und dann bei der vorerwähnten Synthese der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure und den Synthesen der 3-Phospho-D-glycerinsäure und der 2-Phospho-D-glycerinsäure wieder verwendet worden.

Beide Phosphate der D-Glycerinsäure kommen im Embden-Meyerhof-Schema vor; wir wollen zunächst die Synthese der letztgenannten Säure besprechen.

¹⁹⁾ A. Ichihara u. D. M. Greenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 41, 605 [1955].

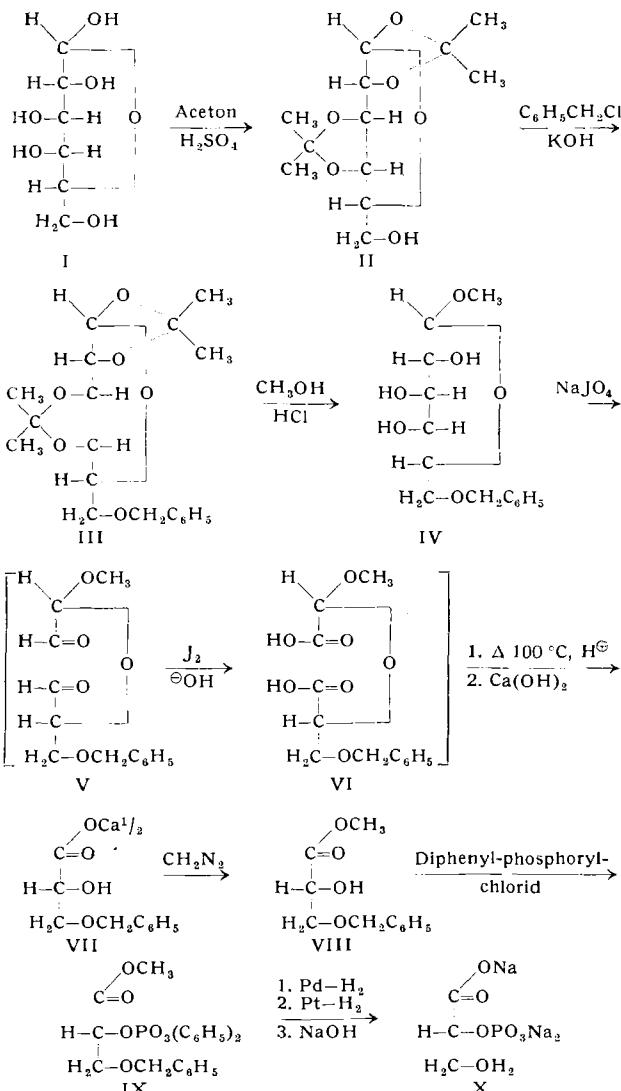
²⁰⁾ H. O. L. Fischer u. E. Baer, Naturwissenschaften 25, 589 [1937]; vgl. dieselben Autoren, J. biol. Chemistry 128, 491 [1939].

²¹⁾ H. O. L. Fischer u. E. Baer: „Preparation and Properties of Optically Active Derivatives of Glycerol“; Chem. Reviews 29, 287 [1941].

^{21a)} E. Baer u. H. O. L. Fischer, „Synthesis of the D(+)-α-Glycero-phosphoric acid“, J. biol. Chemistry 135, 321 [1940].

2-Phospho-D-glycerinsäure²²⁾

Die Darstellung dieser Substanz wurde erreicht durch Phosphorylierung von 3-O-Benzyl-D-glycerinsäure-methylester (VIII) mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid und nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppen. VIII wurde aus D-Galactose (I) durch eine Reihenfolge von üblichen Reaktionen bereitet (vgl. das Schema).



D-Galactose I wird acetoniert zu 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-D-galacto-pyranose II. In II wird die einzige noch freie Hydroxyl-Gruppe in Stellung 6 benzyliert zu III. Bei Behandlung mit methylalkoholischer Salzsäure wird III in 6-O-Benzyl-α-D-galacto-methyl-pyranosid (IV) übergeführt. IV liefert mit Natriumperjodate den Dialdehyd V, der zur entsprechenden Dicarbonsäure VI mit Jod weiteroxydiert wird. VI wird, ohne Isolierung, zu Glyoxalsäure und 3-O-Benzyl-D-glycerinsäure hydrolysiert und diese als Calciumsalz VII isoliert. Aus VII wurde mit Hilfe von Diazomethan der Methylester VIII gewonnen und, wie schon oben erwähnt, phosphoryliert zu IX. Aus IX wurde zunächst die schützende Benzyl-Gruppe in Stellung 3 mit Palladium und Wasserstoff abhydriert und dann mit Platinoxyd und Wasserstoff die beiden Phenol-Gruppen vom Phosphorsäure-Rest entfernt.

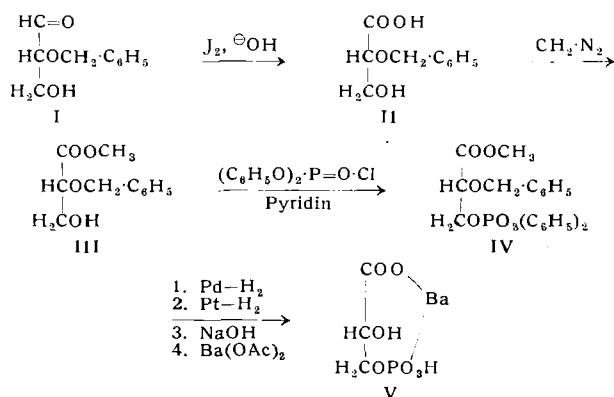
Nach Verseifung des Methylesters ließ sich die 2-Phosphoryl-D-glycerinsäure als schön kristallisiertes Trinatriumsalz X isolieren. Unsere 2-Phospho-D-glycerinsäure zeigte

²²⁾ C. E. Ballou u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 76, 3188 [1954].

eine Drehung von $[\alpha]_D = +13^\circ$ (in 1n Salzsäure). Dieser Wert steht nicht in Übereinstimmung mit älteren Beobachtungen. Wir versuchen in unserer Originalarbeit diese Diskrepanz zu erklären.

3-Phospho-D-glycerinsäure

Um zur 3-Phospho-D-glycerinsäure zu gelangen, geht man neuerdings am besten aus vom 2-Benzyl-D-glycerinaldehyd I. Seine Bereitung aus einem Dimethylen-D-mannit ist vorstehend gelegentlich der Synthese der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure beschrieben worden. In unserer ersten Mitteilung über die Synthese der 3-Phospho-D-glycerinsäure²³⁾ haben wir die Darstellung von I aus einem anderen Ausgangsmaterial, nämlich 3,4-Isopropyliden- α -D-methylarabinosid, beschrieben. Die Einzelheiten der neuen Darstellung werden demnächst an anderer Stelle veröffentlicht werden.



I wird mit Jod in bicarbonat-alkalischer Lösung zur Säure II oxydiert und diese mit Diazomethan in ihren Methylester III übergeführt. III wird unter üblichen Bedingungen mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid in IV verwandelt. Aus IV wird mit Palladium und Wasserstoff zuerst die Benzyl-Gruppe in Stellung 2 abhydriert, dann werden mit Platinoxyd und Wasserstoff die Phenole vom Phosphorsäure-Rest entfernt und schließlich wird mit verd. Natronlauge der Methylester verseift. Mit Bariumacetat läßt sich das kristallisierte saure Bariumsalz fällen²⁴⁾. Drehung der freien Säure $[\alpha]_D = -14,3^\circ$ (in 1n Salzsäure) und $[\alpha]_D = -743^\circ$ (in neutralem Molybdat). Die entsprechenden Werte in der Literatur sind $-14,5^\circ$ und -745° ²⁵⁾.

Die ungewöhnlich hohe Drehung der 3-Phospho-D-glycerinsäure in Molybdat-Lösung dient als Basis für ihre Bestimmung in Gegenwart der isomeren 2-Phospho-D-glycerinsäure²⁶⁾. Da nunmehr die Drehungen beider Phosphate der Glycerinsäure an reinen synthetischen Präparaten beobachtet worden sind, können sie mit großer Zuverlässigkeit polarimetrisch bestimmt werden.

2-Phospho-D-glycerinsäure und 3-Phospho-D-glycerinsäure, chemisch rein dargestellt, sind natürlich ausgezeichnete Substrate für das Studium des Enzyms Glycerinsäure-phosphorsäure-Mutase²⁷⁾. Ebenso ist das Enzym Enolase von F. Wold und C. E. Ballou eingehend studiert worden unter Benutzung der synthetisch bereiteten 2-Phospho-D-glycerinsäure und Phosphobrenztraubensäure²⁸⁾. Es erscheint in diesem Zusammenhange von Interesse, daß die nächst höheren Analogen der 2-Phospho- und 3-Phospho-D-glycerinsäure, nämlich die D-Erythro-2,3-dioxy-butter-

²³⁾ C. E. Ballou u. H. O. L. Fischer, Abstract of Papers, 126th Meeting Amer. chem. Soc., 7D [1954].

²⁴⁾ O. Meyerhof u. W. Kiesling, Biochem. Z. 276, 239 [1935].

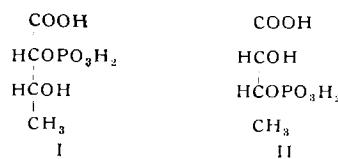
²⁵⁾ O. Meyerhof u. W. Schulz, ebenda 297, 60 [1938].

²⁶⁾ O. Meyerhof u. P. Oeser, J. biol. Chemistry 179, 1371 [1949].

²⁷⁾ R. W. Cowgill u. L. Pizer, Federation Proceedings, 74, 198 [1955].

²⁸⁾ Dissertation Finn Wold, Berkeley, California [1956].

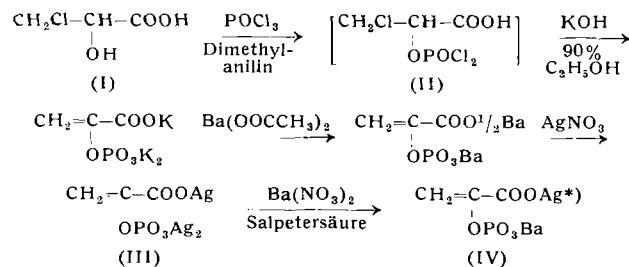
säure-monophosphorsäuren I und II durch die Glycerinsäure-phosphorsäure-Mutase in einander umgewandelt werden, wenn auch sehr viel langsamer als die entsprechenden



Glycerinsäure-phosphate. Dagegen ist I kein Substrat für Enolase, sondern im Gegenteil eine sehr wirksame Hemmungssubstanz für dieses Enzym. Die beiden Phosphate I und II sind von C. E. Ballou nach ähnlichen Verfahren wie die D-Glycerinsäure-phosphorsäure und ausgehend von Derivaten der D-Rhamnose durch chemische Synthese dargestellt worden²⁹⁾.

Phospho-brenztraubensäure

Die letzte phosphorylierte Dreikohlenstoffverbindung im Embden-Meyerhof-Schema ist die Phospho-brenztraubensäure, die von Meyerhof und Lohmann 1934 in Gärungsansätzen entdeckt wurde³⁰⁾. Ein Jahr später wurde sie von W. Kiesling durch direkte Einwirkung von Phosphoroxychlorid und Chinolin auf Brenztraubensäure in einer Ausbeute von 3–5% dargestellt³¹⁾. Erich Baer und H. O. L. Fischer haben eine verbesserte Darstellungsweise der Substanz beschrieben³²⁾, die von β -Chlormilchsäure I ausgeht und deren Gang durch folgende Formeln gezeigt wird:



* Die Platzanweisung von Silber und Barium ist willkürlich. Phosphobrenztraubensäure wird als das Silber-Bariumsalz IV isoliert.

Sie ist ein hochenergiereiches Phosphat, das heute vielfach als solches in Enzym-Ansätzen an Stelle von Adenosintriphosphat verwendet wird.

D-Erythro-4-phosphorsäure

Die vorstehend beschriebenen Resultate auf dem Gebiete der phosphorylierten Drei-kohlenstoffzucker geben uns den Mut, die Phosphorylierung von Vier-kohlenstoffzuckern (Tetrosen) in Angriff zu nehmen. Hier lagen die Verhältnisse folgendermaßen: Es wurde 1954 immer mehr klar, daß in vielen Geweben neben dem glykolytischen Abbau nach Embden-Meyerhof noch ein anderer Weg des Zuckerzerfalls herläuft, der sog. Glucose-6-phosphat-Cyclus (Englisch: glucose-6-phosphate shunt)³³⁾. Mehrere Zucker und Zuckerphosphate, denen man bisher kaum eine Bedeutung für den Stoffwechsel beigemessen hatte, erhielten eine solche in dem neuen Cyclus. Eines der postulierten Zwischenprodukte, das eine zentrale Rolle in diesen und anderen enzymatischen Verwandlungen der Kohlenhydrate spielen könnte, war die D-Erythro-4-phosphorsäure.

²⁹⁾ Clinton E. Ballou, J. Amer. chem. Soc. 79, 984 [1957].

³⁰⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, Biochem. Z. 273, 60 [1934].

³¹⁾ W. Kiesling, Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 597 [1935].

³²⁾ E. Baer u. H. O. L. Fischer, J. biol. Chemistry 180, 145 [1949].

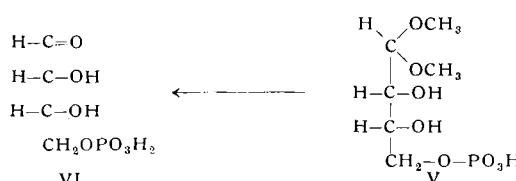
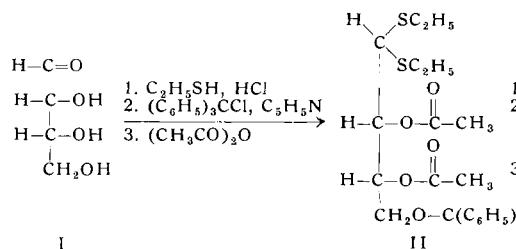
³³⁾ Literatur siehe u. a. S. S. Cohen in „Chemical Pathways of Metabolism“, Bd. I, herausgeg. von D. M. Greenberg, Academic Press, New York 1954, S. 173.

Dieses Tetrosephosphat wurde u. a. angenommen als ein Reaktionsprodukt des Enzyms Transaldolase aus Sedoheptulose-7-phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat³⁴⁾. Ein weiteres Anzeichen für das Vorkommen von D-Erythrose-4-phosphat als Zwischenprodukt war die Isolierung von Sedoheptulose-diphosphat, nachdem man Dioxyacetophosphat und das Enzym Aldolase dem Reaktionsgemisch hinzugefügt hatte³⁵⁾. Ebenso wurde die Bildung des Tetrosephosphats angenommen bei der Einwirkung von Transketolase auf D-Fructose-6-phosphorsäure und D-Glycerin-aldehyd-3-phosphorsäure³⁶⁾.

Überall war die Untersuchung der Stoffwechselreaktionen der D-Erythrose-4-phosphorsäure behindert durch die Schwierigkeit die neue Substanz aus Enzym-Ansätzen zu isolieren. Hier kam unsere neue chemische Synthese im richtigen Augenblick.

Die Methodik war in vielem derjenigen ähnlich, die wir bei der Darstellung der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure benutzt hatten⁷⁾. Zunächst mußte natürlich D-Erythrose (I) in genügender Menge beschafft werden: Dies geschah nach zwei verschiedenen Methoden. In der ersten wurde D-Arabinose in ihr Diäthyl-mercaptopal verwandelt, dieses zum Disulfon oxydiert und das Sulfon mit wäßrigem Ammoniak zu D-Erythrose abgebaut³⁷⁾. Die zweite Methode bestand im Abbau von 4,6-O-Äthyliden-D-glucose³⁸⁾ mit Natriumperjodat zu 2,4-O-Äthyliden-D-erythrose. Das Schema zeigt die Stufen der Phosphorylierung.

Die sirupöse D-Erythrose (I) wurde mit Äthylmercaptan und Salzsäure mercaptalisiert, das Mercaptal wurde trityliert und acetyliert zu II. Nachdem II mit Bariummethyletat deacetyliert war, wurde es unter den von Wolfson und Mitarbeitern empfohlenen Bedingungen³⁹⁾ in das entsprechende Dimethylacetal mit Hilfe von Quecksilberoxyd und -chlorid in Methanol verwandelt und nach Benzoylyierung in Form von III kristallisiert erhalten. Mit Wasserstoff und Palladium wurde die Trityl-Gruppe in Stellung 4 entfernt und die freie Hydroxyl-Gruppe in bekannter Weise mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid phosphoryliert (IV). Um aus



³⁴⁾ B. L. Horecker u. P. Z. Smyrniotis, J. Amer. chem. Soc. 75, 2021 [1953]; J. biol. Chemistry 212, 811 [1955].

³⁵⁾ B. L. Horecker, P. Z. Smyrniotis, H. H. Hiatt u. P. A. Marks, ebenda 212, 827 [1955].

³⁶⁾ E. Racker, G. de la Habá u. I. G. Leder, Arch. Biochem. Biophysik 48, 238 [1954]; J. biol. Chemistry 214, 409 [1955].

³⁷⁾ D. L. MacDonald u. H. O. L. Fischer, Biochim. Biophys. Acta 12, 203 [1953]; L. Hough u. T. J. Taylor, J. chem. Soc. [London] 1955, 1212.

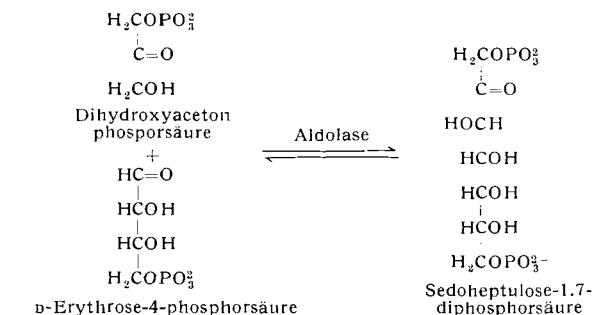
³⁸⁾ R. C. Hockett, D. V. Collins u. A. Scattergood, J. Amer. chem. Soc. 73, 599 [1951].

³⁹⁾ M. L. Wolfson, D. I. Weisblat, W. H. Zophy u. S. W. Waisbrodt, J. Amer. chem. Soc. 63, 201 [1941].

IV die Schutzgruppen zu entfernen, brauchte man nur noch mit Platinoxyd und Wasserstoff die Phenol-Gruppen abzuhydrieren und die Acyle mit Alkali zu verseifen. Man erhielt dann das Dimethylacetal der 4-Phosphoryl-D-erythrose (V), das in Form seines Cyclohexylaminsalzes kristallisierte. Genau wie im Falle des D-Glycerinaldehyd-3-phosphats ist dies auch die Form in welcher die D-Erythrose-4-phosphorsäure lagerfähig ist und in den Handel kommt. Um sich eine wässrige Lösung der freien Säure VI zu bereiten, behandelt man das Cyclohexylaminsalz in H_2O mit Dowex 50 (H^+) und hält die Lösung der freien Säure 18 h bei 40 °C. Durch die Acidität der Phosphorsäure-Gruppe wird das Dimethylacetal zum freien Aldehyd hydrolysiert und man hat die Lösung der gesuchten D-Erythrose-4-phosphorsäure (VI) für Enzymversuche in Händen.

Das Tetrosephosphat ist, ebenso wie sein Acetal, optisch inaktiv in neutraler oder saurer Lösung. In seinem Verhalten gegenüber 1n HCl bei 100 °C ist es der D-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure sehr ähnlich.

B. L. Horeckers bekannter Versuch⁷⁾ der Kondensation von D-Erythrose-4-phosphorsäure und Dihydroxyaceton-



phosphorsäure zu Sedoheptulose-1,7-diphosphorsäure unter dem Einfluß des Enzyms Aldolase aus Kaninchenmuskel läßt sich sehr schön mit unseren beiden synthetischen Präparaten wiederholen (s. obenstehende Formeln).

Reduziert man die D-Erythrose-4-phosphorsäure mit NaBH_4 , so erhält man die D-Erythrit-4-phosphorsäure, die ebenfalls als schön kristallisiertes Cyclohexylaminsalz isoliert wurde⁴⁰⁾. Durch einen glücklichen Zufall konnten wir im Gebiet der Erythrit-phosphorsäuren unsere synthetischen Resultate mit den biologischen von Dr. Janette Shetter⁴¹⁾ in Einklang bringen. Vor Jahren hatten H. A. Barker und F. Lipmann⁴²⁾ gezeigt, daß Erythrit durch Propionibacterium pentosaceum metabolisiert wird. Der Weg geht offenbar über eine direkte Phosphorylierung des Erythrits und als erstes Produkt wurde Erythrit-phosphorsäure angenommen. J. Shetter konnte im Laboratorium von Prof. Barker in Berkeley aus ihrem Bakterienansatz das kristallisierte Cyclohexylaminsalz isolieren, das sich nach

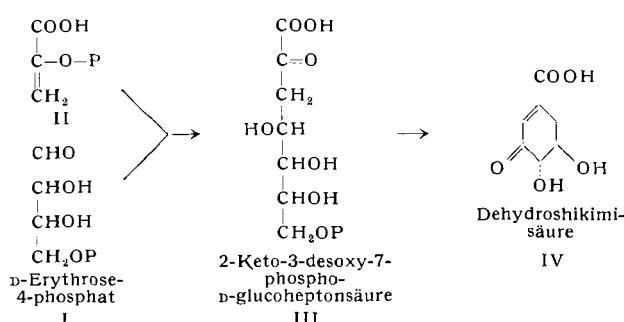
⁴⁰⁾ D. L. MacDonald, H. O. L. Fischer u. C. E. Ballou, J. Amer. chem. Soc. 78, 3720 [1956].

⁴¹⁾ J. K. Shetter, ebenda 78, 3722 [1956].

⁴²⁾ H. A. Barker u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 179, 247 [1949].

Drehung und sonstigen Eigenschaften mit unserem synthetischen Präparat als identisch erwies. Es liegt hier wieder ein Fall vor, wo die organische Synthese in einwandfreier Weise Konstitution und Konfiguration eines interessanten Naturprodukts beweisen konnte. Zum Überfluß wurde dann noch, nach Methoden, die dem Leser nun hinlänglich bekannt sind, die L-Erythrit-4-phosphorsäure synthetisiert. Wie zu erwarten zeigte sie die umgekehrte optische Drehung des natürlichen Produkts⁴⁰.

Von besonders weittragender biologischer Bedeutung erscheint das folgende Enzymexperiment zu sein, das P. R. Srinivasan, M. Katagiri und D. B. Sprinson⁴³) an der Columbia University in New York mit den in unserem Laboratorium bereiteten synthetischen Kohlehydrat-phosphorsäuren ausführten. Diese Autoren kondensierten D-Erythrose-4-phosphorsäure (I) mit Phosphobrenztraubensäure (II)⁴⁴) unter dem Einfluß eines zellfreien Extraktes



⁴³) P. R. Srinivasan, M. Katagiri u. D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. 77, 4943 [1955]. Vgl. auch D. B. Sprinson in „Essays in Biochemistry“, Samuel Graff, Herausgeber. John Wiley and Sons Inc., New York 1956, S. 267.

⁴⁴) E. Baer u. H. O. L. Fischer, J. biol. Chemistry 180, 145 [1949].

von *Escherichia coli* (Mutante 83—24) in einer Ausbeute von 90% zu Dehydroshikimisäure (IV). Als Zwischenprodukt konnte 2-Keto-3-desoxy-7-phospho-D-glucoheptonäure nachgewiesen werden⁴⁵).

Diese enzymatische Bildung einer hydroaromatischen Pflanzensäure aus kleinen Kohlehydrat-phosphorsäuren mit gerader Kette scheint uns ein interessanter Modellversuch zu sein. Von ihm ausgehend kann man überlegen, wie vielleicht in der organischen Welt die hydroaromatischen Verbindungen und aus ihnen die Aromaten gebildet werden könnten. Hat man doch schon immer vermutet, daß Kohlenhydrate das Ausgangsmaterial z. B. für Lignin sein könnten, ohne daß man aber die Stufen des Ringschlusses formulieren konnte.

Die im Pflanzenreich vorkommende Shikimisäure⁴⁶) geht übrigens unter sehr milden Bedingungen in Protocatechusäure über, so daß wir hier einen guten Weg vom Kohlenhydrat zum Benzol-Abkömmling vor uns haben.

Da die Shikimisäure nach B. D. Davis und Mitarbeitern⁴⁷) auch ein Zwischenprodukt bei der Bildung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoesäure im bakteriellen Stoffwechsel ist, so ergibt sich hier ein weiterer biologischer Ausblick.

Es gewährt dem organischen Chemiker Befriedigung, daß mit Hilfe seiner synthetischen Produkte wichtige Reaktionen des biologischen Stoffwechsels chemisch sichergestellt oder sozusagen „untermauert“ werden können.

Eingegangen am 12. April 1957 [A 807]

⁴⁵) D. B. Sprinson in „Essays in Biochemistry“, Samuel Graff, Herausgeber. John Wiley and Sons Inc., New York, 1956, S. 267.

⁴⁶) S. u. a. H. O. L. Fischer u. Gerda Dangschat, Helv. chim. Acta 20, 705 [1937]; Naturwissenschaften 26, 562 [1938].

⁴⁷) B. D. Davis, J. biol. Chemistry 191, 315 [1951]; B. D. Davis, in Amino Acid Metabolism, herausgeg. von W. D. McElroy u. B. D. Glass. The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 799.

Beiträge zur Chemie der Stärke und der Cycoglucane (Schardinger-Dextrine)

Von Prof. Dr. K. FREUDENBERG, Heidelberg

Nach der Ermittlung der Verzweigungsstelle im Amylopektin (1940) wurde die Konstitution der Schardinger-Dextrine (Cyclo-amylosen) aufgeklärt und ihre Fähigkeit zur Bildung von Einschlußverbindungen aus der Molekelform gedeutet. Die Analogie zwischen den Jod-Verbindungen des α -Dextrins und der Stärke führte zur Deutung der Jod-Stärke und Begründung des schraubenförmigen Baues von Teilen des Polysaccharids. Beziehungen zwischen Konstellation (Konformation) und optischem Drehungsvermögen sowie zwischen äquatorialem Bau der Cellulose und Wasserstoff-Bindungen in beiden Polysacchariden wurden aufgefunden (1939—1943).

Kontinuierliche Ketten mit Maltose-Bindung

Bei der Ermittlung der chemischen Konstitution ist die Cellulose der Stärke vorangegangen. Wir wissen heute den Grund: Die Cellulose ist so gut wie einheitlich, während die Stärke aus einem verzweigten Anteil, dem Amylopektin, und einem kleineren unverzweigten, der Amylose, besteht. Eine andere Erleichterung bei der Bearbeitung der Cellulose ist die schwerlösliche und sehr leicht kristallisierende Octacetyl-cellulobiose, der in der Stärkechemie an Kristallisationsfreudigkeit, nicht aber an leichter Darstellbarkeit, nur die Heptacetyl-maltose gegenüberzustellen ist. So kam es, daß der erste Schritt über das Disaccharid hinaus an der Cellulose getan werden konnte. Aus der Kinetik des Abbaus der Cellulose, geprüft an der Ausbeute an

Cellulobiose, ergab sich, daß in ihrer Riesenmoleköl eine Glucose wie die andere gebunden ist¹). Diese Auffassung wurde später bestätigt durch die Messung der Geschwindigkeit der Hydrolyse und der optischen Drehung der Cellulose und ihrer Oligosaccharide^{2, 3}). Kinetik des Abbaus und Drehungsvermögen bestätigen eindeutig die 1921 ermittelte einheitliche Bindung nach Art der Cellulobiose, die als dann W. N. Haworth und H. Staudinger ihren Untersuchungen an der Cellulose zugrunde gelegt haben. Diese Bindungsart ist identisch mit der „Hauptvalenzbindung“, wie sie in einer die folgenden Jahre erfüllenden Polemik genannt wurde.

¹) K. Freudenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 54, 770 [1921].

²) Übersicht in K. Freudenberg: Tannin, Cellulose, Lignin, Berlin 1933; ferner:

³) K. Freudenberg u. G. Blomqvist, Ber. dtsch. chem. Ges. 68, 2070 [1935].