

142. Feodor Lynen und Hans Bayer: Phosphor-d(+-)-weinsäure^{*}

[Aus dem Chemischen Universitäts-Laboratorium München, Biochemische Abteilung, und dem Laboratorium der Fa. Gebrüder Bayer, Augsburg]

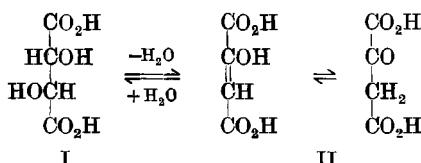
(Eingegangen am 2. April 1952)

Es werden Synthese und Eigenschaften der Phosphor-d(+-)-weinsäure beschrieben und im Zusammenhang damit eine Hypothese zur Biogenese der Weinsäure in Vorschlag gebracht.

Von den im Pflanzenreich weit verbreiteten Fruchtsäuren, zu denen man Citronen-, Äpfel-, Wein- und Oxalsäure zählt, hat der Mensch wohl als erste die Weinsäure rein in Händen gehabt. Zwar wurde die freie Säure erst im Jahre 1769 von Carl Wilhelm Scheele dargestellt, aber in Form ihres sauren Kaliumsalzes war die Weinsäure schon im Altertum bekannt. Um so verwunderlicher ist es, daß über die Biogenese der Weinsäure im Gegensatz zu den übrigen Fruchtsäuren fast nichts bekannt ist und auch der biologische Abbau der Weinsäure, zu welchem neben vielen Einzellern auch die höhere Pflanze befähigt ist¹⁾, noch im Dunkeln liegt.

Bei der Suche nach einer biologisch möglichen Vorstufe wird man von der Annahme ausgehen dürfen, daß die Weinsäure ebenso wie die übrigen Fruchtsäuren in engster Beziehung zum intermediären Stoffwechsel der Kohlenhydrate steht, zwar nicht gerade wie Citronen- oder Äpfelsäure direkt in den cyclischen Prozeß der Oxydation von aus dem Zucker primär gebildeter „aktivierter Essigsäure“²⁾ eingeschaltet ist, aber doch, etwa so wie Oxalsäure³⁾, auf einem Nebengeleise des Citronensäure-Cyclus liegt. Das wird allein schon durch die Tatsache nahegelegt, daß Weinsäure wie die im Cyclus stehenden Säuren, die Bernstein-, Fumar-, Äpfel- und Oxalessigsäure, eine C₄-Dicarbon-säure ist.

In chemischer Hinsicht steht unter diesen Säuren die Oxalessigsäure (II) der Weinsäure (I) am nächsten. Durch Zufuhr bzw. Wegnahme von Wasser geht – zumindest formal – eine Verbindung in die andere über.



O. T. Rotini, E. Damann und F. F. Nord⁴⁾ sprachen die Vermutung aus, daß Weinsäure biologisch auf diesem Wege entsteht, und stützen sich dabei auf Versuche an *Fusarium lini* B., wonach dieser Einzeller beim oxydativen Abbau von Acetat geringe Mengen Weinsäure bildet. Wenn damit auch ein wichtiger Anhaltspunkt für die Beteiligung des Citronensäure-Cyclus bei der Bildung von Weinsäure gewonnen wurde, so lassen

^{*}) Meinem Lehrer zum 75. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ Entgegen früheren Angaben soll der Tierkörper zur oxydativen Verwertung von Weinsäure nicht befähigt sein; vergl. Ph. Finkle, Journ. biol. Chem. 100, 349 [1933].

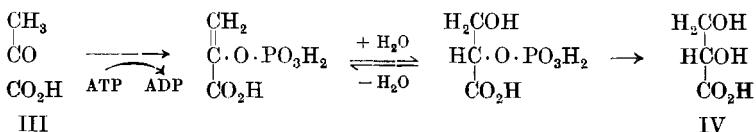
²⁾ F. Lynen, E. Reichert u. L. Rueff, A. 574, 1 [1951].

³⁾ F. Lynen u. F. Lynen, A. 560, 149 [1948]. ⁴⁾ Biochem. Ztschr. 288, 414 [1936].

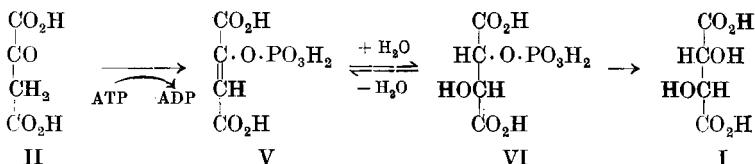
sich andererseits aus diesem Befund keinerlei bindende Schlüsse bezüglich des Reaktionsablaufs im einzelnen, etwa im Sinne obigen Schemas, ziehen. Dazu hätte der Stoffwechselversuch durch den Fermentversuch ersetzt, oder zumindest das Schicksal von zugesetztem Oxalacetat verfolgt werden müssen. Man wird deshalb zwar weiterhin mit der direkten Hydratisierung von Oxalacetat zu Tartrat als Möglichkeit rechnen, daneben aber auch noch andere Wege in Betracht ziehen.

Unter diesem Gesichtspunkt möchten wir eine Reaktionsfolge zur Diskussion stellen, die ebenfalls von Oxalacetat ihren Ausgang nimmt, im übrigen aber der chemischen Verwandtschaft zwischen Oxalessigsäure und Brenztraubensäure einerseits, Weinsäure und Glycerinsäure andererseits Rechnung trägt.

Die Umwandlung von Brenztraubensäure (III) in Glycerinsäure (IV) erfolgt in der Zelle bekanntlich über phosphorylierte Zwischenstufen⁵⁾



Diese Reaktionsfolge auf die um eine Carboxygruppe reichereren Dicarbonsäuren übertragen, führt zu folgender Vorstellung über die Biogenese der Weinsäure:



Die vollständige Oxydation des Tartrats ginge gemäß dieser Vorstellung im Citronensäure-Cyclus vor sich. Sie würde eingeleitet mit einer Phosphorylierung von Weinsäure zu Phosphor-weinsäure (VI) — was unter Mitwirkung von Adenosin-triphosphat möglich sein sollte — und würde von dort über Phosphor-oxalessigsäure (V) zu Oxalessigsäure (II) führen.

Im Zusammenhang damit können wir darauf hinweisen, daß Phosphor-oxalessigsäure (V), über welche gemäß unserer Vorstellung der Anschluß an den Citronensäure-Cyclus zustandekäme, auch schon von anderer Seite^{6,7)} als Stoffwechselprodukt gewisser Organismen postuliert worden ist. Der einwandfreie Nachweis ihres biologischen Vorkommens steht aber ebenso wie für die von uns vermutete Phosphor-weinsäure (VI) noch aus.

Als wir daher das Problem der Biogenese von Weinsäure aufgriffen, war unser erstes Ziel, die hypothetischen Zwischenprodukte auf synthetischem Weg zu bereiten, um dann später die Möglichkeit ihrer enzymatischen Umsetzung prüfen zu können. Über die erste Etappe dieses Weges, die Synthese der Phosphor-d(+) -weinsäure, sei im folgenden berichtet.

⁵⁾ ATP = Adenosin-triphosphorsäure, ADP = Adenosin-diphosphorsäure.

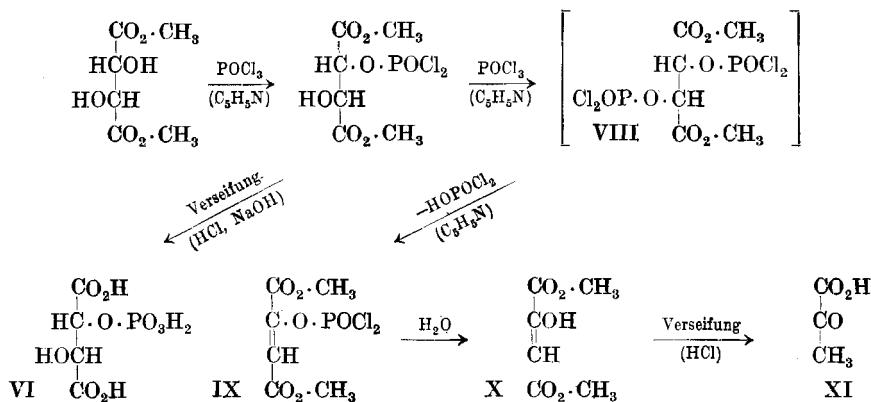
⁶⁾ F. Lipmann, Advances Enzymology 1, 142 [1941].

⁷⁾ A. Lwoff u. H. Jonesco, Compt. rend. Acad. Sciences 225, 263 [1947].

Phosphor-*d*(+)-weinsäure wurde bereits von C. Neuberg u. W. Schuchardt⁸⁾ synthetisch bereitet. Da uns die betreffende Arbeit jedoch erst nachtraglich zur Kenntnis kam und wir auf einem neuen Weg zur Phosphor-*d*(+)-weinsäure gelangt waren, möchten wir unsere Versuche im einzelnen wiedergeben.

Unter den verschiedenen Möglichkeiten für die Synthese dieser Verbindung wurden die Umsetzung von Äthylenoxyd-dicarbonsäure mit sek. Natriumphosphat oder Phosphorsäure – analog der Synthese von Glycerin-phosphorsäure nach O. Bailly⁹⁾ ebenso wie die Phosphorylierung von Weinsäure-ester mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid¹⁰⁾, welches Verfahren sich bei der Synthese von Phosphor-äpfelsäure¹¹⁾ bewährt hat, ohne Erfolg versucht. Zum Ziel führte schließlich die Umsetzung von Weinsäure mit Phosphoroxychlorid. Beim Arbeiten im wässr. Medium war aber die Ausbeute an reiner Phosphorweinsäure sehr klein, weil unter diesen Bedingungen nur etwa 10 % der gewünschten Verbindung entstanden waren und eine Abtrennung der sie im Reaktionsprodukt begleitenden großen Mengen an Weinsäure, Ortho- und Polyphosphorsäuren nur auf umständlichem und verlustreichem Wege möglich war. Wir prüften deshalb die Umsetzung von Weinsäure-dimethylester mit Phosphoroxychlorid in Pyridin. Wie sich ergab, wird hierbei das Säurechlorid zweckmäßigerweise in 40-proz. Überschuß angewandt, weil dann kein unveränderter, den Aufarbeitungsgang störender Weinsäureester unter den Reaktionsprodukten verbleibt.

Der unter diesen Bedingungen primär zweifellos gebildete zweifach phosphorylierte Weinsäureester (VIII) läßt sich nicht fassen. An seiner Stelle tritt ein Derivat der Enol-oxalessigsäure (IX) auf, welches sich nach partieller Hydrolyse mit Salzsäure als Brenztraubensäure (XI), und zwar in der erwarteten Menge nachweisen läßt. Es ist anzunehmen, daß der primär gebildete Bis-[dichlor-phosphoryl]-weinsäure-dimethylester (VIII) unter der Wirkung von überschüssigem Pyridin einen Säurerest verliert, in einer Reaktion, die ihr Vorbild in der von A. Wohl und C. Österlin¹²⁾ aufgefundenen Spaltung von Di-acetyl-weinsäure-anhydrid durch Pyridin hat. Nach H. Bretschneider¹³⁾ ist auch (+)-Dibenzolsulfonyl-weinsäure-diäthylester gegen Pyridin nicht beständig.



⁸⁾ Enzymologia 1, 39 [1936].

⁹⁾ Ann. Chim. [9] 6, 131 [1916].

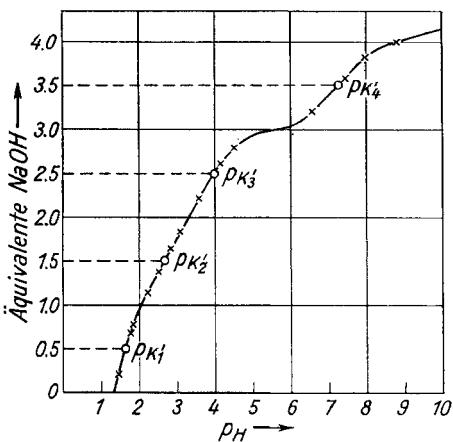
¹⁰⁾ A. May, unveröffentlichte Versuche.

¹¹). M. Friedkin u. A. Lehninger, Journ. biol. Chem. **169**, 183 [1947].

¹²⁾ B. 34, 1139 [1901]. ¹³⁾ Monatsh. Chem. 80, 256 [1949].

Die in den Aufarbeitungsgang eingeschaltete partielle Hydrolyse mit n Salzsäure hat den Zweck, Polyphosphorsäuren, die aus der Umsetzung intermediär entstandener Dichlorphosphorsäure mit Pyridin stammen¹⁴⁾, in Orthophosphorsäure überzuführen. Nachdem letztere in Form von *tert.* Lithiumphosphat abgetrennt worden ist, läßt sich nach vorheriger Verseifung der Estergruppen mit Alkali über das in Wasser schwerlösliche Bariumsalz in nahezu 50-proz. Ausbeute das Dibrucinsalz der Phosphor-*d*(+)-weinsäure vom Schmp. 175–177° (Zers.) isolieren, das in farblosen, glänzenden Prismen kristallisiert.

Die aus dem Brucinsalz in Freiheit gesetzte Phosphor-weinsäure (VI) ist in Wasser spielend löslich; sie erwies sich bei der elektrometrischen Titration (Abbild. 1) als vierbasige Säure. Die ersten drei Dissoziationsstufen beeinflussen



Abbild. 1. Elektrometrische Titration von Phosphor-*d*(+)-weinsäure

sich gegenseitig in geringem Maße, so daß die aus der Titrationskurve abgelesenen pK' -Werte dieser Stufen u.U. mit einem kleinen Fehler behaftet sein dürften. Die letzte Stufe, bei welcher es sich um die zweite Dissoziation der veresterten Phosphorsäure handelt, ist schwächer als freie Phosphorsäure (Tafel 1), ein ungewöhnlicher Fall, der unseres Wissens bisher erst einmal – bei der 2.3-Diphosphor-glycerinsäure¹⁵⁾ – beobachtet worden ist. Normalerweise nimmt nämlich die Stärke der Phosphorsäure bei Bindung an eine alkoholische Gruppe zu^{15,16)}.

Tafel 1. Dissoziationskonstanten

	pK'_{1}	pK'_{2}	pK'_{3}	pK'_{4}
Phosphor- <i>d</i> (+)-weinsäure	1.7	2.7	4.0	7.24
<i>d</i> -Weinsäure	2.98	4.34		
Phosphorsäure	1.99	6.81		

Von den Salzen der Phosphor-weinsäure sind die Alkalosalze und das Magnesiumsalz in Wasser leicht löslich, während die Salze mit den übrigen Erdalkalien, mit zweiwertigem

¹⁴⁾ H. Bayer, Dissertat. München 1950.

¹⁵⁾ W. Kiessling, Biochem. Ztschr. 273, 103 [1934].

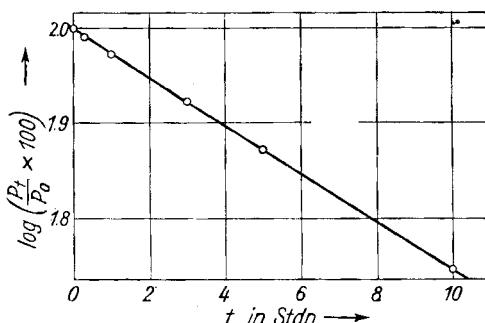
¹⁶⁾ P. Oesper, Phosphorus Metabolism 1, 534 [1951].

Quecksilber, mit Silber und vor allem mit Blei sich durch Schwerlöslichkeit bei neutraler Reaktion auszeichnen. Mit Kupfersulfat bildet sich unter bestimmten Bedingungen ein in Lauge lösliches Komplexsalz.

Die spezifische Drehung der wässr. Lösung von Phosphor-d(+) -weinsäure wurde zu $[\alpha]_D^{20} : +12.0^\circ$ gefunden. Wie bei anderen Oxsäuren wird auch hier die optische Aktivität durch Molybdat-Zusatz im Zusammenhang mit der Bildung eines Komplexes beträchtlich erhöht und erreicht i. Ggw. von 8.3% Ammoniummolybdat mit $[\alpha]_D^{20} : +75.2^\circ$ nahezu den 7fachen Wert.

Wie O. Meyerhof und W. Schulz¹⁷⁾ fanden, erhöht Molybdat bei 3-Phosphor-glycerinsäure die spez. Drehung um etwa das 60fache, bei 2-Phosphor-glycerinsäure dagegen nur um das 3fache. Phosphor-d(+) -weinsäure, die man von beiden Phosphor-glycerinsäuren ableiten kann, nimmt in dieser Hinsicht eine Zwischenstellung ein.

Hydrolysierenden Agenzien gegenüber ist die Phosphor-weinsäure nahezu ebenso widerstandsfähig wie die Phosphor-glycerinsäuren¹⁸⁾, Phosphor-milchsäure¹⁹⁾ oder Phosphor-äpfelsäure¹¹⁾. Gegen kochende Natronlauge ist die Esterbindung praktisch beständig; sie wird auch von heißer Säure nur sehr langsam unter Rückbildung von d(+) -Weinsäure gespalten. Wie die Abbild. 2



Abbild. 2. Hydrolyse von Phosphor-d(+) -weinsäure in *n* HCl bei 100°

Ordinate: P_0 bzw. P_t = org. gebundener P zur Zeit 0 bzw. t
 $P_t \times 100$ gibt somit den Anteil ungespaltener Phosphor-weinsäure in % an
 P_0

bestätigt, verläuft die Hydrolyse in *n* Salzsäure bei 100° als monomolekulare Reaktion. Die Geschwindigkeitskonstante wurde unter diesen Bedingungen zu $k = 0.00098$ [1/Min.] gefunden²⁰⁾, was einer Halbwertszeit von 12 Std. entspricht.

Beschreibung der Versuche

Phosphat-Analyse: Da die Phosphatgruppe der Phosphor-weinsäure schwer hydrolysierbar ist, d.h. beim 1stdg. Erhitzen mit *n* HCl auf 100° nur zu 6.1% abgespalten wird, Polyphosphorsäuren unter denselben Bedingungen aber bereits in 10 Min. vollständiger Hydrolyse anheimfallen, lässt sich der Phosphor-weinsäure-Gehalt eines Synthese-Ansatzes oder eines bei der Reinigung anfallenden Präparates auf einfache Weise mittels der Lohmannschen Hydrolysen-Methode bestimmen. Zur colorimetrischen Messung von präformiertem und während des Kochens abgespaltenem Orthophosphat bedienten wir uns der Methode von M. Martland und R. Robison²¹⁾.

¹⁷⁾ Biochem. Ztschr. 297, 60 [1938]. ¹⁸⁾ W. Kiessling, B. 68, 243 [1935].

¹⁹⁾ Th. Wagner-Jauregg, B. 68, 670 [1935].

²⁰⁾ Neuberg und Schuchardt (s. Fußnote ⁸⁾) fanden für ihr Präparat $k = 0.00054$ [1/Min.]. ²¹⁾ Biochem. Journ. 20, 848 [1926].

Versuche mit Äthylenoxyd-dicarbonsäure: 400 mg *cis*-Äthylenoxyd-dicarbonsäure²²⁾, in 15 ccm Wasser gelöst und mit Natronlauge neutralisiert, wurden mit 1.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ versetzt. Weder bei 8tätig. Stehen in der Kälte noch bei 24 stdg. Kochen erfolgte Aufnahme von Phosphat in organ. Bindung. Ebensowenig trat die gewünschte Umsetzung beim Kochen von 0.5 g Äthylenoxyd-dicarbonsäure mit 0.5 g wasserfreier Phosphorsäure in 25 ccm Äther oder 8 ccm Dioxan ein.

Synthese von Phosphor-d(+)weinsäure (VI)

a) Umsetzung in wäbr. Medium: Zu 30 g *d*-Weinsäure, in 100 ccm Wasser gelöst und mit 40 ccm 10*n* NaOH neutralisiert, wurden im Eisbad 30 g Phosphoroxychlorid und etwa 90 ccm 10*n* NaOH abwechselungsweise in kleinen Anteilen gegeben. Es wurde dabei beachtet, daß die Temperatur im Reaktionsgemisch nicht über 45° stieg und die Reaktion immer alkalisch blieb. Nach Abklingen der Reaktion wurde das pH auf 9–10 eingestellt. Wie die Analyse ergab, verteilte sich das Phosphat zu 85% auf anorgan., zu 5% auf leicht-hydrolysierbares und zu 10% (entspr. 1.9 g) auf schwer-hydrolysierbares PO_4^{3-} . Das Reaktionsgemisch blieb noch 2 Stdn. im Eisbad stehen, wobei ein großer Teil des anorgan. Phosphats als Natriumsalz ausfiel und dann auf der Nutsche abzutrennen war. Anschließend wurde die Hauptmenge der nicht umgesetzten Weinsäure in Form von Weinstein abgeschieden. Zu diesem Zweck dampfte man die mit konz. Salzsäure auf pH 6 abgestumpfte Lösung i. Vak. auf 25 ccm ein, brachte das pH durch Zugabe von konz. Salzsäure auf 3.5 und gab 40 ccm gesätt. Kaliumchlorid-Lösung zu. Nach 3 stdg. Stehen im Eisbad wurde der krist. ausgeschiedene Weinstein abgesaugt und das Filtrat zur Entfernung des restlichen Orthophosphats mit 6 g krist. Magnesiumchlorid und 10 g Ammoniumchlorid, gelöst in 60 ccm Wasser, versetzt. Mittels Ammoniak-Lösung wurde alkalisch gemacht, dann wurden 200 ccm Wasser unter kräftigem Rühren zugesetzt. Nach 1 stdg. Stehenlassen wurde das ausgeschiedene MgNH_4PO_4 abgesaugt. Aus dem mit Wasser auf 450 ccm verdünnten Filtrat, das nur mehr 57% des ursprünglich vorhandenen Esterphosphats enthielt (Verlust bei der Fällung mit Magnesia-Mixtur!), konnte Phosphor-weinsäure bei pH 8 durch Zugabe von 45 ccm 25-proz. Bariumacetat-Lösung quantitativ als Bariumsalz gefällt werden, das nach dem Waschen mit Wasser und dem Trocknen 11.5 g wog und zu 41% aus dem gesuchten Salz bestand.

Um Bariumtartrat, die wesentliche Verunreinigung, abzutrennen, wurde das rohe Bariumsalz in 350 ccm Wasser unter Zusatz von 50 ccm konz. Salzsäure in Lösung gebracht; dann wurde unter kräftigem Rühren 5*n* NaOH langsam zugefügt, bis pH 7–8 erreicht war. Der abfiltrierte und abermals mit 350 ccm Wasser digerierte Niederschlag wurde vom Waschwasser abgetrennt und getrocknet; Ausb. 6.9 g. Er wurde in Wasser aufgeschlämmt, mit der äquiv. Menge Schwefelsäure zerlegt und die Lösung, nach Abtrennung des Bariumsulfats, i. Vak. auf 5 ccm eingedampft. Bei Zugabe von 30 ccm absol. Äthanol fiel ein etwas klebriger Niederschlag aus, der nach Waschen mit absol. Äthanol und Äther getrocknet wurde: 1.4 g Substanz, die zu 80% aus Phosphor-weinsäure, zu 17% aus Polyphosphorsäure und zu 3% aus Orthophosphorsäure bestand.

Eine vollständige Reinigung wurde über die Brucin-Salze erreicht. Dazu wurden 1.4 g der Rohsäure in 40 ccm Wasser gelöst und mit der Lösung von 6.2 g Brucin in heißem Methanol versetzt. Das beim Stehen in der Kälte in langen, schmalen, verfilzten Nadeln ausgeschiedene Tribrucin-Salz wurde aus 40 ccm heißem Wasser umkristallisiert; Ausb. 4.6 g. Zur Zerlegung wurden 4.2 g dieses Tribrucin-Salzes in 120 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst, konz. Ammoniak-Lösung im Überschuß zugefügt, das ausgeschiedene Brucin nach Abkühlen abgesaugt und das Filtrat mit 96 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase wurde mit verd. Essigsäure auf pH 5–6 gebracht und durch überschüss. Bleiacetat-Lösung das unlösliche Bleisalz der Phosphor-weinsäure gefällt. Nach sorgfältigem Auswaschen mit Wasser wurde das Bleisalz in 100 ccm Wasser suspendiert und mittels Schwefelwasserstoffs zerlegt. Die nach Abtrennung des Bleisulfids erhaltene Lösung wurde i. Vak. auf 20 ccm eingeengt, der Säuregehalt durch Titra-

²²⁾ E. Weitz, H. Schobbert u. H. Seibert, B. 68, 1163 [1935].

tion einer Probe bestimmt, und der heißen Lösung 60% der der Säure äquivalenten Brucinmenge (vergl. unten), in konz. methanolischer Lösung, zugesetzt. Beim Abkühlen kristallisierte das Dibrucin-Salz der Phosphor-weinsäure in schwerlöslichen, farblosen, glänzenden Prismen aus, die nach dreimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser analysenrein erhalten wurden. Ausb. 2.2 g (1% d.Th.); Schmp. 175–177° (Zers.).

$C_4H_7O_9P \cdot 2C_{23}H_{26}O_4N_2 \cdot 9H_2O$ (1181.1) Ber. C 50.85 H 6.57 N 4.75 P 2.62 H_2O 13.7
Gef. C 51.28 H 6.59 N 4.81 P 2.56 H_2O 13.5

b) Umsetzung in Pyridin: Eine auf -35° abgekühlte Lösung von 22 g Phosphor-oxychlorid in 150 ccm wasserfreiem, frisch dest. Pyridin wurden langsam und unter kräftigem Rühren zu einer im Kältebad von -35° befindlichen Lösung von 18 g Weinsäure-dimethylester in 150 ccm Pyridin gegeben. Der Ansatz, aus welchem sich Pyridin-hydrochlorid auszuscheiden begann, blieb 10 Min. im Kältebad und anschließend noch 1 Stde. im Kühlschrank stehen. Der vom Pyridin-hydrochlorid abgesaugten orangefarbenen Lösung wurden 150 ccm Eis-Wasser-Mischung zugefügt und das Ganze i. Vak. auf 140 ccm eingeengt, wobei einmal 150 ccm Wasser nachgegeben wurden. Durch Zugabe von 15 ccm konz. Salzsäure (d 1.19) brachte man die Lösung auf 1n HCl und erhitzte 20 Min. im siedenden Wasserbad. Die Lösung enthielt dann 6.9 g anorgan. PO_4 und 6.8 g Ester- PO_4 . Außerdem waren 2.0 g Brenztraubensäure²³⁾ vorhanden, stammend aus dem bei der Reaktion gebildeten Oxalessigester (X), welcher sich vor der Säurehydrolyse durch seine Enolreaktion mit Eisen(III)-chlorid zu erkennen gegeben hatte.

Um die noch gebundenen Methylgruppen abzuspalten wurde die Lösung anschließend mit 30 ccm 10n NaOH stark alkalisch gemacht und 20 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abstumpfen der Reaktion auf pH 8–9 mittels Salzsäure wurden 25 g Lithiumchlorid in konz. währ. Lösung zugefügt, das sich ausscheidende Lithiumphosphat nach 12 stdg. Stehenlassen abgesaugt, in 200 ccm verd. Salzsäure gelöst und mit Natronlauge bei pH 8.5 wieder gefällt. Die Filtrate vom Lithiumphosphat wurden vereinigt, mit Wasser auf 2000 ccm verdünnt und bei pH 8.5 mit überschüss. 25-proz. Bariumacetatlösung versetzt. Der sich bildende Niederschlag wurde abgetrennt und so lange mit Wasser gewaschen, als noch Cl^- im Waschwasser nachweisbar war. Zum Zwecke der Zerlegung wurde der feuchte Niederschlag in 2000 ccm Wasser aufgeschlämmt, die Suspension auf 70° erhitzt und durch Zugabe der äquiv. Menge verd. Schwefelsäure alles Ba^{2+} als Bariumsulfat gefällt, das Bariumsulfat abgetrennt und mit 1400 ccm kochendem Wasser ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und i. Vak. auf 100 ccm eingeengt. Die Lösung enthielt 229 mÄquiv. Säure. Um das Dibrucin-Salz zu erhalten, wurde sie heiß mit der Lösung von 63 g Brucin (60% der äquiv. Menge) in 40 ccm Methanol versetzt. Beim Abkühlen kristallisierte das Dibrucin-Salz der Phosphor-weinsäure in farblosen, glänzenden Prismen aus, das nach einmaligem Umkristallisieren aus 150 ccm heißem Wasser analysenrein war. Ausb. 51 g (42% d.Th.); Schmp. 175–177° (Zers.).

$C_4H_7O_9P \cdot 2C_{23}H_{26}O_4N_2 \cdot 9H_2O$ (1181.1) Ber. C 50.85 H 6.57 N 4.75 P 2.62 H_2O 13.7
Gef. C 50.63 H 6.91 N 4.89 P 2.54 H_2O 13.7

Schmp. des wasserfreien Salzes (100°, über P_4O_{10}) 183–186° (Zers.).

Eigenschaften der Phosphor-d(+)weinsäure

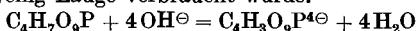
Für die folgenden Versuche dienten Lösungen von freier Phosphor-weinsäure, die, wie oben (S. 910) beschrieben, über das Bleisalz aus analysenreinem Dibrucin-Salz dargestellt worden waren. Sie enthielten keine Spur anorgan. oder leicht-hydrolysierbaren Phosphats mehr.

Im Gegensatz dazu war in der Lösung, die aus der Zerlegung des Tribrucin-Salzes (S. 910) stammte, sowohl anorgan. wie leicht-hydrolysierbares Phosphat vorhanden. Das Tribrucin-Salz schleppt hartnäckig Verunreinigungen mit, so daß die vollkommene Reinigung der Phosphor-weinsäure nur über das Dibrucin-Salz gelingt.

²³⁾ Bestimmung nach H. A. Lardy, in Umbreit, Burris, Stauffer, Manometric Techniques, Minneapolis 1948, S. 105.

a) Elektrometrische Titration: 20 ccm Phosphor-weinsäure-Lösung mit 2.18 mg Ester- PO_4^{3-} /ccm, entsprechend 0.023 m , wurden bei 28° mit $n\text{NaOH}$ titriert. Die pH -Messung erfolgte mittels Glaselektrode und Ultra-Jonograph²⁴⁾; Ergebnis vergl. Abbild. 1, S. 908.

Aus der Titrationskurve ist zu entnehmen, daß die vollständige Neutralisation der Phosphor-weinsäure erst bei pH 8.85 erreicht ist. Dies erklärt die Tatsache, daß bei der Titration mit Phenolphthalein als Indicator, dessen Umschlagspunkt bei pH 8.5 liegt, stets um etwa 3% zu wenig Lauge verbraucht wurde.



Je mg Ester- PO_4^{3-} : Ber. ccm 0.1 $n\text{NaOH}$ 0.421 Gef. ccm 0.1 $n\text{NaOH}$ 0.405, 0.410

b) Salze der Phosphor-weinsäure: Eine neutrale 0.052 m Natrium-phosphortartrat-Lösung gibt mit Lösungen von Calcium-, Strontium- oder Bariumchlorid Niederschläge, die in Wasser schwerlöslich sind, sich aber in verd. Essigsäure lösen. Im Gegensatz dazu löst sich der mit Bleiacetat gebildete Niederschlag in Essigsäure nicht; er ist in Salpetersäure oder Natronlauge löslich.

Bei Zugabe von sehr verd. Kupfersulfat-Lösung bildet sich unter Farbvertiefung eine grünblaue Lösung, mit mäßig konz. Kupfersulfat-Lösung dagegen ein grünlicher Niederschlag.

Bei Zusatz von Magnesia-Mixtur zur Lösung von Phosphor-weinsäure tritt keine Fällung auf. In Ggw. von anorgan. Phosphat gehen aber beträchtliche Mengen Phosphor-weinsäure in den Niederschlag von MgNH_4PO_4 , weshalb es bei der Aufarbeitung der Synthese-Ansätze zweckmäßig ist, die Orthophosphorsäure als *tert.* Lithiumphosphat abzuscheiden.

c) Optische Aktivität: $\alpha_D^{20} +0.055^0$ (2.3 mg Phosphor-weinsäure/ccm, 2-dm-Rohr, 20°) = $[\alpha]_D^{20} : +12.0^0$. 12 ccm dieser Lösung + 6 ccm 25-proz. Ammoniummolybdat im 2-dm-Rohr bei 20° zeigten $\alpha : +0.23^0 = [\alpha]_D^{20} : +75.2^0$.

d) Hydrolyse durch $n\text{HCl}$ bei 100°: Die Kinetik der sauren Hydrolyse von Phosphor-weinsäure ist in der Abbild. 2 wiedergegeben. Zu diesem Versuch kam eine Lösung in Anwendung, die 2.78 mg Ester- PO_4^{3-} /ccm enthielt.

Die bei der Hydrolyse gebildete *d*-Weinsäure ließ sich wie folgt isolieren und identifizieren: 86 mg Phosphor-weinsäure wurden in 17 ccm $n\text{HCl}$ 40 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt, wobei 90% des Esterphosphats abgespalten wurden. Die Lösung wurde nach Neutralisation mit 10 $n\text{KOH}$ auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und mit 2 $n\text{HCl}$ auf pH 3.5 gebracht (Vol. 7 ccm). Durch Zugabe von 7 ccm absol. Alkohol wurde die Abscheidung von Weinstein vervollständigt, der nach 24 stdg. Stichenlassen im Kühlschrank abzentrifugiert, dreimal mit je 1 ccm Wasser und dann mit Alkohol und Äther gewaschen wurde. Zum Zwecke der Reinigung neutralisierte man den rohen Weinstein mit 2.51 ccm $n_{10}\text{KOH}$, verdünnte die Lösung auf 3.5 ccm und brachte dann durch Zugabe der der verbrauchten Lauge äquiv. Menge $n\text{HCl}$ das saure Kaliumsalz wieder zur Abscheidung. Nach Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther wurden 16 mg (25% d.Th.) Weinstein erhalten.

12.4 mg verbr. zur Neutralisation 0.65 ccm $n_{10}\text{KOH}$; ber. für Weinstein 0.66 ccm.

Bei der oxydimetrischen Titration nach Mestrezat²⁵⁾ verbr. 4.22 mg 1.31 ccm $n_{10}\text{KMnO}_4$; ber. für Weinstein 1.35 ccm. Optische Aktivität der neutralisierten Lösung: 2.72 mg (entspr. 3.28 mg neutrales Salz)/ccm im 2-dm-Rohr bei 20° zeigten $\alpha : +0.16^0 = [\alpha]_D^{20} : +24.4^0$ (sek. Kaliumtartrat: $[\alpha]_D^{20} : +27.1^0$ ²⁶⁾).

Gegenüber Lauge ist Phosphor-weinsäure noch beständiger als gegenüber Säure. Bei 1 stdg. Kochen mit $n\text{NaOH}$ werden nur 2% des Phosphats abgespalten.

²⁴⁾ Fa. Lautenschlaeger, München.

²⁵⁾ C. 1907 II, 185.

²⁶⁾ T. S. Patterson, Journ. Amer. chem. Soc. 85, 1118 [1904].