

Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

VII. Mitteilung.

Isolierung der kristallisierten Adenosinphosphorsäure.

Von

S. J. Thannhauser.

(Aus der II. medizinischen Klinik [F. Müller] München.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1919.)

In einer vorläufigen Mitteilung¹⁾ wurden zwei kristallisierte Nucleinsäuren S. P. 227^o und S. P. 208^o kurz beschrieben. Die ausführliche Beschreibung der präparativen Darstellung und des weiteren hydrolytischen Abbaues der Nucleinsäure S. P. 227^o konnte im Anschluß an die vorläufige Mitteilung in dieser Zeitschrift²⁾ erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß die kristallisierte Nucleinsäure S. P. 227^o ein Pyrimidin-nucleotid ist, welches sich aus Cytidin und Phosphorsäure zusammensetzt. Die Cytidinphosphorsäure wurde durch Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure mit Pikrinsäure gewonnen.

Die weitere Durcharbeitung der andern, vorläufig mitgeteilten kristallisierten Nucleinsäure S. P. 208^o konnte infolge meiner abermaligen Abstellung ins Feld erst jetzt durchgeführt werden. Die Nucleinsäure S. P. 208^o entsteht wie die Cytidinphosphorsäure ebenfalls aus der Triphosphonucleinsäure. Das Brucinsalz der Triphosphonucleinsäure³⁾ S. P. 205^o wird mit

¹⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 51, S. 467 (Jan. 1918).

²⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 65 (Aug. 1918).

³⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 121 (1917).

konzentriertem Ammoniak zerlegt und einige Stunden stehen gelassen. Die hierbei entstehenden Ammonsalzgemische der in der Triphosphonucleinsäure (Guanosin-Adenosin-Cytidinphosphorsäure) vorgebildeten Nucleinsäuren bleiben in Lösung und werden von dem quantitativ ausgefallenen Brucin abfiltriert. Die weitere Verarbeitung erfolgt über die Bleisalze. Die Bleisalze der Nucleinsäuren werden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die im Vakuum eingeengte Lösung im Exsikkator über Schwefelsäure langsam eindunsten gelassen. Nach einigen Stunden beginnt sich eine Substanz abzuscheiden, die in feinen, farblosen Nadelchen kristallisiert. Nach 24stündigem Stehen wird vom Kristallinat (I) abfiltriert und weiter im Vakuum stehen gelassen. Im Verlauf von mehreren Tagen entsteht eine zweite Kristallisation (II). Beim Umkristallisieren des Kristallinates I aus Wasser zeigt es sich, daß ein kleiner Teil in heißem Wasser außerordentlich schwer löslich ist. Von diesem wird abfiltriert. Aus dem Filtrat kristallisiert dann eine einheitliche Substanz in makroskopischen Kristallen, die pfahlartig einseitig zugespitzt sind und meistens in Drusen zusammenliegen. Dieser Körper zersetzt sich bei 208° unter starkem Aufschäumen. Er ist optisch aktiv und dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. $(\alpha)_{\text{D}}^{20} - 48,03^{\circ}$. Die in der vorläufigen Mitteilung geäußerte Vermutung, daß diese Substanz ein Dinucleotid der Guanosin- und Adenosinphosphorsäure sei, ist durch den Verlauf des weiteren hydrolytischen Abbaues des Körpers hinfällig geworden. Die Kohlenstoff- und Stickstoffzahlen der Elementaranalyse eines Guanosin-Adenosindinucleotides und die Werte eines Mononucleotides der Adenosinphosphorsäure liegen so nahe zusammen, daß eine Entscheidung über die Zusammensetzung aus den Zahlen der Elementaranalyse nicht zu treffen ist und erst durch den hydrolytischen Abbau eine sichere Aufklärung erfolgen konnte. Ich unterzog die Nucleinsäure S. P. 208° einer ammoniakalischen Hydrolyse unter Druck und konnte aus der Hydrolysenflüssigkeit als Spaltprodukte nur Adenosin und freie Phosphorsäure, andererseits aber noch ungespaltene Nucleinsäure S. P. 208° isolieren. Die Nucleinsäure S. P. 208° ist nach

Sie bräunt sich beim Erhitzen bei 200° und ist bei 255° noch nicht geschmolzen. Da diese Säure neben der Adenosinphosphorsäure durch die gleiche Hydrolyse aus der Triphosphonucleinsäure entsteht, dürfte sie die Guanosinphosphorsäure oder ein Dinucleotid der Guanosincytidinphosphorsäure sein. Der hydrolytische Abbau dieses Körpers ist bereits in Angriff genommen.

Experimenteller Teil.

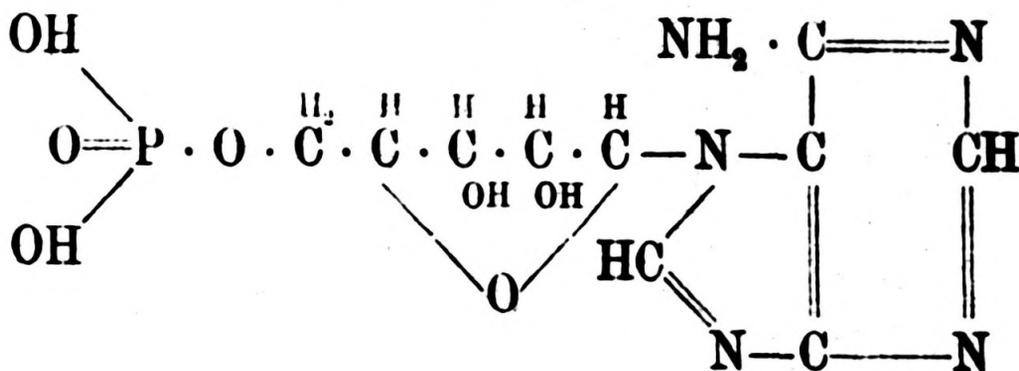
Darstellung der Adenosinphosphorsäure.

40 g Brucinsalz der Triphosphonucleinsäure S. P. 205° wurden in ca. 200 ccm Wasser kochend heiß suspendiert, mit ca. 100 ccm konzentrierter Ammoniaklösung (25%) bis zur Lösung versetzt und stehen gelassen. Nach dem Erkalten wird in Eis eingestellt, bis die Abscheidung des Brucins vollständig beendet ist (ca. 4 Stunden). Das Brucin wird abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen, hierauf engt man das Filtrat im Vakuum bei $40-50^{\circ}$ auf ca. 80—100 ccm ein. Durch das Einengen im Vakuum wird das überschüssige Ammoniak vollständig vertrieben. Sollte sich gallertiges Ammonsalz hierbei abscheiden, so bringt man es durch Zugabe von wenig Wasser in Lösung. Die Ammonsalzlösung wird über Nacht stehen gelassen, um noch Spuren von nicht ausgefälltem Brucin zur Abscheidung zu bringen. Von diesen letzten Resten von Brucin wird abfiltriert und die ammoniakfreie Lösung des Ammonsalzes mit Bleiessig (D.A.B.) gefällt. Das ausgefallene Bleisalz wird abfiltriert, mehrere Male mit Wasser angerührt und wieder abgesaugt, um den Überschuß von Bleiessig vollständig zu entfernen. Die Aufschwemmung des Bleisalzes in Wasser wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert und das ungefärbte, wasserklare Filtrat im Vakuum bei 40° auf ca. 40 ccm eingengt. Diese Lösung stellt man über Schwefelsäure in den Exsikkator. Nach 10 Stunden (beim Animpfen nach kürzerer Zeit) beginnt ein Körper in kleinen Nadeln zu kristallisieren. Nach 24stündigem Stehen wird abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen (Kristalliat I). Im Verlauf von ca. 8 Tagen scheidet

sich im Vakuum abermals aus der Mutterlauge ein Kristallisat ab (Kristallisat II).

Kristallisat I (ca. 1 g) wird in der zwölffachen Menge Wasser gekocht und vom Ungelösten abfiltriert. Aus dem Filtrat scheidet sich die Adenosinphosphorsäure in pfahlartig einseitig zugespitzten Kristallen ab. Nach 3maligem Umkristallisieren ist die Substanz analysenrein. Man kann durch vorsichtiges Auskristallisieren mehrere millimeterlange Kristalle erhalten. Diese Kristalle enthalten Kristallwasser. Die Adenosinphosphorsäure schmilzt bei 208° unter Aufschäumen, nachdem sie sich von 190° an leicht bräunlich verfärbt hat. Zur Analyse wird die Substanz bei 130° im Toluolbad getrocknet.

Adenosinphosphorsäure



0,1620 g Substanz 0,2064 g CO_2 , 0,0623 g H_2O

0,1864 g „ 32,9 ccm N (17° 753 mm)

0,2551 g „ 0,0794 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$

Adenosinphosphorsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{N}_5\text{P}$.

Ber. C 34,58% H 4,03% N 20,16% P 8,93%

Gef. C 34,75% H 4,30% N 20,58% P 8,67%

Löst man 0,3 g Adenosinphosphorsäure in der 11fachen Menge kochenden Wassers und gibt 0,6 g Brucin in 1,5 ccm 96%igen Alkohol gelöst hinzu, so beginnt sofort die Abscheidung eines Brucinsalzes. Aus Wasser umkristallisiert S. P. 180/82. Die Adenosinphosphorsäure kristallisiert mit 2 Mol. Brucin. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{N}_5\text{P}(\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_2)_2$.

Zur Titration werden 0,0955 g Adenosinphosphorsäure in 20 ccm Wasser gelöst, mit 1 Tropfen Phenolphthalein versetzt und mit $\frac{1}{10}$ n. Na-Lauge titriert. Für 0,0955 g Substanz werden 5,5 ccm $\frac{1}{10}$ n. Na-Lauge verbraucht.

Ber. für 2 Mol. NaOH 5,4 ccm

Gef. „ 2 „ NaOH 5,5 „

Es ist bemerkenswert, daß die Adenosinphosphorsäure, bei welcher eine Basizität mit einem Zuckerrest verestert ist, erst nach Absättigung der beiden andern Basizitäten mit Phenolphthalein in Rot umschlägt.

Bestimmung der optischen Aktivität: 0,1555 g Substanz (im Vakuum bei 130° getrocknet) drehen in 4 cm $\frac{1}{2}$ n. Na-Lauge gelöst in einem 18,94 cm-Rohr 3,53 nach links. $(\alpha)_{\text{D}}^{20} = -48,03^{\circ}$.

Hydrolyse der Adenosinphosphorsäure mit Ammoniak unter Druck.

5 g kristallisierte Adenosinphosphorsäure S. P. 208 wird in 21 ccm Wasser und 4 ccm 25% igem Ammoniak gelöst. (Die Mengen des Wassers und Ammoniaks sind entsprechend der Leveneschen Hydrolyse der Hefenucleinsäure genommen¹⁾). Die ammoniakalische Lösung wird im Autoklaven bei 135° Innentemperatur und 185° Außentemperatur $3\frac{1}{2}$ Stunden erhitzt, dabei entsteht ein Druck von 4—5 Atmosphären. Nach dem Öffnen des Autoklaven ist die Flüssigkeit klar, nur einige dunkle Flocken schwimmen in der Lösung. Auch beim Stehen in Eis setzt sich kein Niederschlag (Guanosin) ab. Die ganze Flüssigkeit wird mit der 4—5fachen Menge Alkohol gefällt. Neben einem schmierigen, dunklen Niederschlag kristallisiert eine Substanz in kleinen Drusen aus. Vom Ausgefallenen wird nach 5stündigem Stehen auf der Nutsche abgesaugt (Filtrat I). Der Niederschlag wird in Wasser heiß gelöst und heiß mit Bleiessig (D. A. B.) gefällt. Vom Bleiniederschlag (Blei I) wird in der Hitze abfiltriert und das heiße Filtrat mit Ammoniak versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Dieser Niederschlag (Blei II) ist sehr spärlich.

Der Bleiniederschlag I wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Schwefelblei abfiltriert, im Vakuum auf ca. 50 ccm eingeengt und über Schwefelsäure im Vakuum eindunsten gelassen. Es beginnt nach einigen Tagen ein schön kristalli-

¹⁾ P. A. Levene und W. Jakobs, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 42 (1909).

sierter Körper sich auszuschcheiden. Diese Substanz wird nach 8tägigem Stehen abfiltriert (ca. 1,5 g). Aus der Mutterlauge fällt kein Kristallinat mehr aus, es hinterbleibt nur eine geringe Menge hellgelben Sirups. Die kristallisierte Substanz zeigt nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser den S. P. 208° unter Aufschäumen, wie die Adenosinphosphorsäure. Die Analyse dieses Körpers zeigt, daß die Substanz tatsächlich ungespaltene Adenosinphosphorsäure ist.

0,1604 g Substanz 0,2023 g CO₂, 0,0618 g H₂O

0,1638 g Substanz 28,75 ccm N (19° 753 mm)

Adenosinphosphorsäure C₁₀H₁₄O₇N₅P

Ber. C 34,58% H 4,03% N 20,16%

Gef. C 34,40% H 4,31% N 20,34%

Die Adenosinphosphorsäure spaltet also bei der ammoniakalischen Hydrolyse unter Druck nicht so leicht ihre Phosphorsäure ab, wie es die Hefenucleinsäure und die Triphosphonucleinsäure unter den gleichen Bedingungen tun.

Der Bleiniederschlag II wird in heißem Wasser aufgeschlemmt, mit einigen Tropfen Eisessig bis zur Lösung versetzt. Hierauf wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Schwefelblei abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbad eingeeengt. Es scheiden sich einige Flöckchen ab, die sich nicht als Guanosin erwiesen.

Das Filtrat I der ersten Alkoholfällung wird im Vakuum bei 40° bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt, hierauf mit ca. 300 ccm absolutem Alkohol versetzt und wenig einer krümmelig fadenziehenden Masse nach mehrstündigem Stehen abfiltriert. Die abfiltrierte Substanz wird ebenso wie die erste Alkoholfällung in Wasser gelöst und dann heiß mit Bleiessig und mit Bleiessigammoniak behandelt. Aus beiden nur geringfügigen Bleiniederschlägen konnte eine kristallisierte Substanz nicht isoliert werden. Das alkoholische Filtrat wird wieder bis zur Sirupdicke eingeeengt und mit heißer Pikrinsäurelösung versetzt. Es fällt reichlich hellgelbes Pikrat aus (ca. 1 g). Das Pikrat wird zweimal aus Wasser und einmal aus 70%igem Alkohol umkristallisiert. S. P. 185–187°. Die Analyse erwies die Substanz als Adenosinpikrat.

0,0975 g Substanz 19,3 ccm N (17,5° 754 mm)

Adenosinpikrat $C_{10}H_{13}N_5O_6 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Ber. 22,60% Gef. 22,98%

Die Mutterlauge des Rohpikrates und die Mutterlaugen des umkristallisierten Adenosinpikrates werden zusammengegossen, auf einen Gehalt von 2% Schwefelsäure gebracht und mit Äther von der Pikrinsäure befreit. Die schwefelsaure Lösung wird dann 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten versetzt man zur Ausfällung der Purine mit 10 ccm einer Quecksilbersulfatlösung in 5% Schwefelsäure. Man läßt über Nacht stehen und filtriert andern Tages ab. Die schwefelsaure Lösung wird mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, mit Barytwasser die Schwefelsäure neutralisiert und vom Baryumsulfat abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum bei 40° vollständig bis zur Trockene eingengt. Es hinterbleiben nur Spuren einer gelben sirupösen Masse. Dieser Rückstand wird mit heißgesättigter Pikrinsäurelösung versetzt und in Eis gestellt. Es fällt nur Pikrinsäure, aber kein Pikrat aus. (Niederschlag vollständig ätherlöslich.) Cytidin konnte somit nicht vorhanden sein.

Aus der Hydrolysenflüssigkeit der Nucleinsäure S. P. 208^o (Adenosinphosphorsäure) ließ sich, wie aus der Aufarbeitung der Hydrolysenflüssigkeit hervorgeht, nur ungespaltene Nucleinsäure S. P. 208^o und Adenosinpikrat isolieren. Guanosen und Cytidin konnten nicht nachgewiesen werden. Durch dieses Resultat und gleichzeitig durch die Analysenzahlen ist die Nucleinsäure S. P. 208^o als Adenosinphosphorsäure aufgeklärt.