

360. P. A. Levene und W. A. Jacobs: Über Guanylsäure.

(I. Mitteilung.)

[Aus dem Rockefeller-Institute for Medical Research, New York.]

(Eingegangen am 19. Mai 1909.)

Als »Guanylsäure« ist im Jahre¹⁾ 1899 von Bang eine Substanz beschrieben worden, die nach einem Verfahren von Hammarsten aus der Pankreasdrüse dargestellt war und alle Eigenschaften einer Nucleinsäure besaß. Nach Bang sollten als Komponenten dieser Substanz Phosphorsäure, Glycerin, eine Pentose und Guanin fungieren; in Bezug auf die genauere Konstitution der Säure enthält seine Arbeit jedoch keine experimentell begründeten Annahmen. Neuberg²⁾ erweiterte diese Angaben von Bang über die Eigenschaften der Komponenten, indem er die Pentose als *l*-Xylose ansprach. In den letzten Jahren beschäftigten sich v. Fürth und Jerusalem³⁾ mit der Untersuchung der Substanz und erklärten, daß Glycerin unter den Spaltungsprodukten der Guanylsäure nicht vorkomme. Diese Behauptung wurde dann von Steudel⁴⁾ bestätigt. Jones⁵⁾ entdeckte die Guanylsäure auch in der Milz, während Levene und Mandel⁶⁾ sie in der Leber auffanden. Die letzteren Forscher haben unsere Kenntnisse über die Natur der Säure insoweit erweitert, als sie das optische Drehungsvermögen derselben beschrieben und beobachteten, daß die bei der Hydrolyse der Guanylsäure resultierende Zuckerköslung nicht rechtsdrehend (wie dies die *l*-Xylose verlangen würde), sondern linksdrehend war.

Sichere Angaben über die Konstitution der Guanylsäure lagen mithin bisher noch nicht vor.

Nun sind aber während des letzten Jahres unsere Kenntnisse über die Konstitution anderer Nucleinsäuren wesentlich erweitert worden. Levene und Mandel⁷⁾ haben die Beobachtung gemacht, daß bei der partiellen Spaltung der Thymonucleinsäure, außer Phosphorsäure und Basen, Körper entstehen, die nur aus Kohlehydrat und Base zusammengesetzt sind, und ferner Substanzen, die aus Phosphorsäure, Hexose und Base in äquimolekularem Verhältnis bestehen. Sie nannten diese Substanzen Nucleotide. Später haben

¹⁾ Ztschr. für physiolog. Chem. **26**, 133; **31**, 411.

²⁾ Diese Berichte **32**, 3386 [1899].

³⁾ Beitr. zur chem. Physiolog. u. Path. **10/11**, 146 [1908].

⁴⁾ Ztschr. für physiolog. Chem. **53**, 530 [1908].

⁵⁾ Journ. of biolog. Chem. **4**, 289 [1908].

⁶⁾ Biochem. Ztschr. **10**, 221 [1908]. ⁷⁾ Diese Berichte **41**, 1905 [1908].

Levene und Jacobs¹⁾ bei der Hydrolyse der Inosinsäure die Bildung einer Pentose-phosphorsäure und eines Komplexes Pentose-hypoxanthin erwiesen. In einer weiteren Arbeit²⁾ haben sie die letzterwähnte Substanz als das Inosin, welches Haiser und Wenzel³⁾ aus Carnin dargestellt hatten, erkannt. Es ist also wenigstens für eine Nucleinsäure die Anordnung der einzelnen Komponenten aufgeklärt worden.

Es ist uns nun jetzt gelungen, zu beweisen, daß auch die »Guanylsäure« der Inosinsäure in ihrer Konstitution ähnlich ist. Wir erhielten nämlich aus ihr eine schön krystallisierte Substanz von der Zusammensetzung $C_{10}H_{13}N_5O_5$, die sich aus ihren Lösungen in langen Nadeln vom Aussehen des Tyrosins abschied. Sie besaß den Schmp. 237° und — in 1 Mol. Natronlauge gelöst — das Drehungsvermögen von -60.52° . Bei der Hydrolyse mittels verdünnter Mineralsäure bildeten sich eine Pentose und Guanin. Gegen Erhitzen mit Alkalilösungen ist die Substanz dagegen sehr resistent. Sie reduziert Fehlingsche Lösung nicht, wohl aber nach vorheriger Hydrolyse mittels Säuren. Die Substanz enthält also Pentose und Guanin in glykosidartiger Form gebunden. Wir wollen das Guanin-pentosid der Kürze halber Guanosin nennen. Die Existenz dieser glykosidartigen Substanz bringt den Beweis, daß in der Guanylsäure die Purinbase an die Pentose gebunden ist. Wir halten uns ferner für berechtigt, anzunehmen, daß die Pentose an die Phosphorsäure gebunden ist, obwohl wir gegenwärtig die Pentose-phosphorsäure noch nicht isoliert haben. Daß diese Substanz aber bei der Hydrolyse entsteht, schließen wir aus den folgenden Gründen: Die Pentose und das Guanosin sind linksdrehend. Bei der Hydrolyse der Guanylsäure gelangt man zu einer Phase, in der das Guanin fast vollkommen abgespalten, die Lösung aber noch rechtsdrehend ist, um dann bei weiterer Spaltung linksdrehend zu werden. Die Rechtsdrehung kann also durch die Bildung von Pentose-phosphorsäure ergeklärt werden. Wir hoffen indessen, die Substanz noch als solche in reiner Form isolieren zu können.

Wir wollen hier noch erwähnen, daß, während Guanosin ebenso wie Inosin linksdrehend ist, die Guanylsäure ein der Inosinsäure entgegengesetztes Drehungsvermögen besitzt. Diese Tatsache könnte durch die Annahme erklärt werden, daß in den entsprechenden Nucleinsäuren die Phosphorsäure an verschiedene Hydroxylgruppen der Pentose gebunden ist.

¹⁾ Diese Berichte **41**, 2703 [1908]. ²⁾ Diese Berichte **42**, 335 [1909].

³⁾ Monatsh. für Chem. **29**, 157 [1908].

Über die Natur der Pentose¹⁾ wollen wir weiter berichten, daß sie mit der aus Inosin erhaltenen Carnose identisch ist; sie ließ sich in kristallinischer Form erhalten, zeigte denselben Schmelzpunkt und das gleiche Drehungsvermögen und gab auch dasselbe Osazon. Es gelingt, die reine Pentose aus dem Guanosin, wie auch aus der Guanylsäure direkt zu erhalten, doch gewinnt man sie viel leichter aus der ersten Substanz. Die Ansicht von Neuberg, daß die Pentose der Guanylsäure eine *l*-Xylose sei, muß nunmehr aufgegeben werden.

Ferner wollen wir hier noch erwähnen, daß der eine von uns die Bildung von ähnlichen glykosidähnlichen Körpern auch bei der alkalischen Hydrolyse der Hefe-nucleinsäure beobachtet hat, und daß wir mit der Isolierung dieser Substanz, wie auch mit ihrer synthetischen Darstellung beschäftigt sind.

Experimenteller Teil.

Die Säure-Hydrolyse der Guanylsäure.

10 g Guanylsäure, die direkt aus den Pankreasdrüsen nach einer Methode, die in einer späteren Mitteilung veröffentlicht werden soll, dargestellt wurde, haben wir 8 Stunden in 500 ccm 2-prozentiger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung zeigte keine optische Aktivität. Nach Zugabe von 1 % Salzsäure wurde dann das Kochen noch 4 Stunden lang fortgesetzt. Die Lösung erwies sich auch jetzt noch als inaktiv, zeigte aber intensiv reduzierende Eigenschaften und gab stark die Orcinprobe. Organisch gebundener Phosphor war noch zugegen, da aber das Guanin vollständig abgespalten war, wurde die Hydrolyse nunmehr unterbrochen. Die Lösung wurde mittels Silbersulfat von der Purinbase befreit und das Filtrat zuerst mit Schwefelwasserstoff behandelt und dann mit Bariumcarbonat gekocht, bis die Schwefelsäure entfernt war. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand in wenig Wasser gelöst. Das Filtrat zeigte deutlich alkalische Reaktion, was von der Anwesenheit beträchtlicher Mengen anorganischer Materie im Ausgangsmaterial herrührte. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure schwach sauer gemacht und mit viel absolutem Alkohol gefällt. Das Filtrat wurde dann wieder zur Trockne verdampft und von neuem in Wasser gelöst. Die Schwefelsäure wurde wiederum durch überschüssiges Bariumcarbonat entfernt und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der sirupartige Rückstand wurde dann in absolutem Alkohol aufgenommen und ein halbes Volumen Äther hinzugesetzt. Nach dem Stehen im Eisschrank wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft und

¹⁾ Vgl. hierüber die nächstfolgende Mitteilung (S. 2476) derselben Autoren, welche bei der Redaktion später eingegangen ist. Red.

der Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst. Das Rotationsvermögen, auf Carnose berechnet, wie auch die Reduktionskraft zeigten einen Gehalt von 1.0 g Zucker an.

Die wäßrige Lösung wurde wieder zur Trockne verdampft und der Rückstand in wenig absolutem Alkohol aufgenommen. Dann wurden 1.2 g *p*-Bromphenylhydrazin, in wenig Alkohol gelöst, hinzugefügt und die Lösung im Exsiccator über Schwefelsäure über Nacht stehen gelassen. Hierbei schieden sich weiße, kuglige Aggregate aus. Die Krystalle wurden abgesaugt und zweimal aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert. Die Substanz erwies sich dann im Schmelzpunkt und in der optischen Aktivität als mit dem Carnose-*p*-bromphenylhydrazon identisch.

0.1182 g Stbst.: 9.8 ccm N (über 50-prozentiger Kalilauge) (23°, 756 mm).
 $C_{11}H_{15}BrN_2O_4$. Ber. N 8.78. Gef. N 9.28.

Neutrale Hydrolyse.

2.5 g Guanylsäure wurden in einem kleinen Überschuß von normaler Natronlauge unter Erwärmen aufgelöst. Die Lösung wurde dann mit Essigsäure versetzt, bis sie gegen Lackmus neutral reagierte, hiernach auf 75 ccm verdünnt und im Einschlußrohr auf 130–135° erhitzt. Beim Erkalten erstarrte der Inhalt des Rohrs zu einer gelatinösen Masse, die sich unter dem Mikroskop in sehr dünne, verfilzte Nadeln auflöste. Die Mischung wurde einige Zeit in Eis gestellt, dann abgesaugt und die Substanz in wenig heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle aufgelöst. Das Filtrat erstarrte beim Erkalten zu einem Brei von langen, dünnen, seidenartigen, tyrosinähnlichen Nadeln. Sie wurden abermals aus Wasser umgelöst und hiernach an der Luft bis zum konstanten Gewicht stehen gelassen. Die Ausbeute an ganz reinem Produkt betrug 0.75 g.

Die Substanz enthielt keinen gebundenen Phosphor und gab sehr stark die Pentose-Reaktion. Beim Kochen mit Säuren wurde sie leicht gespalten unter Auftreten reduzierender Eigenschaften und Bildung von freiem Guanin. Der Körper ist also eine Verbindung von Guanin und Carnose, die glykosidartig vereinigt sind. Hiermit stimmen auch die Ergebnisse der Analysen überein.

0.0875 g lufttrockner Stbst., im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid auf 110° erhitzt, verloren 0.0100 g H_2O . — 0.1518 g lufttrockner Stbst., im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid auf 110° erhitzt, verloren 0.0167 g H_2O .

$C_{10}H_{13}O_5N_5 + 2H_2O$. Ber. H_2O 11.28. Gef. H_2O 11.44, 11.00.

0.1351 g wasserfreie Stbst.: 0.2078 g CO_2 , 0.0557 g H_2O . — 0.0775 g wasserfreie Stbst.: 17 ccm N (28°, 758 mm).

$C_{10}H_{13}O_5N_5$. Ber. C 42.40, H 4.59, N 24.73.
 Gef. » 41.94, » 4.58, » 24.91.

Die Substanz enthielt immer kleinere Mengen Asche, die nur sehr schwer entfernt werden konnten.

Im Capillarrohr rasch erhitzt, sintert sie bei 237° unter Verkohlen zusammen. In kaltem Wasser ist sie kaum löslich, aber leicht in heißem Wasser. In Mineralsäuren und in Alkalien löst sie sich ebenfalls leicht. Aus der alkalischen Lösung wird sie durch Essigsäure als Gallerte gefällt, in der sich allmählich schöne Krystallbüschel bilden. Für die optische Untersuchung wurde in Alkali gelöst.

0.1511 g der Subst. in 47 ccm n_{10} -Natronlauge (1 Mol) gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4.8641 g. Spez. Gewicht 1.03. Drehte im 0.5-dm-Rohr bei Natriumlicht 0.94° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -60.52^\circ.$$

Nach 48 Stunden war die Rotation dieselbe.

Aus der wäßrigen Lösung wird von Silbernitrat eine durchsichtige Gallerte gefällt, die in verdünnten Säuren und Alkalien leicht löslich ist. Von Bleiessig wird die wäßrige Lösung nicht gefällt, wohl aber nach Zusatz von Ammoniak. Aus den Mutterlaugen des Rohprodukts wurden durch fraktioniertes Fällern mit Bleiessig noch beträchtliche Mengen der Substanz erhalten.

Hydrolyse des Guanosins. 1.5 g Guanosin wurden in 150 ccm n_{10} -Schwefelsäure gelöst und eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Hiernach wurde das Guanin mittels Silbersulfat entfernt und das Filtrat durch Schwefelwasserstoff und Bariumcarbonat von Silber und Schwefelsäure befreit. Das Filtrat wurde dann unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mit heißem, absolutem Alkohol ausgelaut. Die alkoholische Lösung dunstete im Exsiccator über Schwefelsäure zu einem farblosen, süß schmeckenden Sirup ein, der nach Impfen mit einem Kryställchen Carnose nach einiger Zeit erstarrte und ganz fest wurde. Die Masse wurde mit wenig Alkohol verrührt, abgesaugt und mit Äther gewaschen. Der Zucker hatte ganz des Aussehen der Carnose. Im Capillarrohr erhitzt, schmolz er bei 85° (korr.), bei welcher Temperatur sich auch die Carnose verflüssigt.

0.1500 g Subst. wurden in 4 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4.3641 g. Drehte im 0.5-dm-Rohr bei Natriumlicht 0.33° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -19.2^\circ (\pm 0.4^\circ).$$

Für Carnose aus Carnin wurde -19.5° gefunden.