

**95. P. A. Levene und W. A. Jacobs:
Über die Inosinsäure.**

(Vierte Mitteilung.)

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

(Eingegangen am 7. Februar 1911.)

In früheren Arbeiten¹⁾ ist von uns gezeigt worden, daß die Inosinsäure als eine esterartige Verbindung von Phosphorsäure mit dem Hypoxanthin-ribosid (Inosin) anzusehen ist. Da das Inosin eine glykosidartige Verbindung einer Pentose ist, so folgt daraus, daß die Hydroxylgruppen α , β und δ der Pentose bei der Verbindung mit der Phosphorsäure in Funktion treten können. Die drei Möglichkeiten waren auf experimentellem Wege weder ausgeschlossen, noch bewiesen worden. Zwar haben mehrere Forscher die Behauptung ausgesprochen, daß die *d*-Ribose-phosphorsäure mit Phenylhydrazin ein Osazon bildet. Auch in unseren Experimenten konnte man den Eindruck gewinnen, als ob das Osazon sich wirklich bildete, aber durch analytische Zahlen war seine Existenz nicht bewiesen worden. Wollte man sich also auf experimentelle Tatsachen stützen, so wäre die Möglichkeit der Verbindung der Phosphorsäure mit dem in α -Stellung befindlichen Kohlenstoffatom nicht ausgeschlossen. In der Tat sind Haiser und Wenzel auf Grund spekulativer Betrachtungen zu der Ansicht gelangt, daß gerade der α -Kohlenstoff die Bindungsstelle der Pentose mit der Phosphorsäure ist.

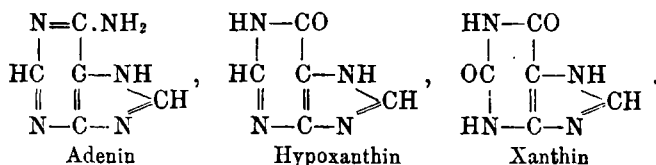
Wie aber aus den vorliegenden Versuchen hervorgeht, läßt sich diese Ansicht nicht bestätigen. Wir haben unsere Aufmerksamkeit zuerst auf die Funktion der primären Alkoholgruppe der Ribose gerichtet. Wie bekannt, läßt sich diese im Zuckermolekül leicht zu einer Carboxylgruppe oxydieren. Sollte sich also in der *d*-Ribose-phosphorsäure die δ -Hydroxylgruppe in freiem Zustand befinden, so würde sie sich oxydieren lassen, und man dürfte in diesem Fall als Produkt der Oxydation eine Trioxyglutar-phosphorsäure erwarten. Wäre dagegen der δ -Kohlenstoff die Bindungsstelle mit der Phosphorsäure, dann könnte unter denselben Bedingungen nur noch eine gepaarte δ -*d*-Ribon-phosphorsäure entstehen. In der Tat fiel das Experiment in diesem Sinne aus, da sich unter den Oxydationsbedingungen, welche zur Bildung von Trioxyglutarsäure aus Pentosen führen, aus der *d*-Ribose-phosphorsäure eine Ribonphosphorsäure bildete. Die Identität dieser Substanz ließ sich auf folgende Tatsachen stützen: 1. Auf die analytischen Zahlen; 2. auf die

¹⁾ B. 41, 2703 [1908]; 42, 335, 1198 [1909].

Tatsache, daß bei der neutralen Hydrolyse aus dieser Substanz die *d*-Ribonsäure entstand und 3. auf die Identität dieser Substanz mit derjenigen, welche bei der Oxydation der Ribose-phosphorsäure durch Brom entsteht. Aus diesen Gründen müssen wir annehmen, daß in der Inosinsäure die Phosphorsäure mit dem δ -Kohlenstoff der *d*-Ribose verbunden ist und sie daher als Hypoxanthin-*d*-ribosid- δ -phosphorsäure betrachten.

Der Erfolg dieser Versuche war durch die merkwürdige Beständigkeit der Esterbindung der Phosphorsäure in dem Inosinsäure-Molekül ermöglicht. Auf diese Eigenschaft der Inosinsäure sind wir schon in früheren Arbeiten gestoßen. Darauf beruht die Schwierigkeit, mit welcher sich die Ribose nach der Hydrolyse der Inosinsäure mittels Mineralsäuren als Osazon nachweisen läßt, und auch die Beobachtung, daß bei derselben Hydrolyse das Reaktionsprodukt rechtsdrehend bleibt. Wie schon in früheren Arbeiten erwähnt, ist die *d*-Ribose-phosphorsäure rechtsdrehend. Allerdings besitzt scheinbar die Phosphorsäurebindung nicht in allen Nucleosiden denselben Grad der Resistenz. Darüber aber soll in einer anderen Mitteilung berichtet werden.

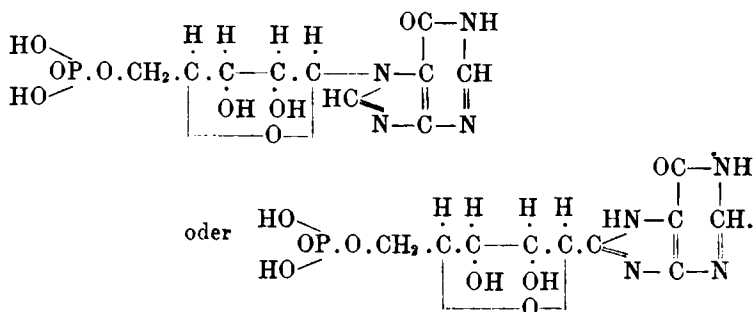
Es bleiben somit nur noch zwei Punkte in der Konstitution der Inosinsäure unaufgeklärt, erstens ob die α - oder β -Form des Pentosids vorliegt, und zweitens die Bindungsstelle der *d*-Ribose am Hypoxanthin. Für die Entscheidung der letzten Frage kann man gewisse Anhaltspunkte schon aus der Betrachtung der üblichen graphischen Formeln der Purinbasen gewinnen. Allerdings muß man dabei von der Ansicht ausgehen, daß die Art der Bindung in allen Nucleosiden ähnlich ist. Man muß auch an die Leichtigkeit, mit welcher sich Adenin in Inosin und Guanosin in Xanthosin überführen lassen, denken. Diese Überlegung und die Betrachtung der folgenden drei Formeln liefern leicht die Überzeugung, daß den drei Basen nur die zwei Bindungsstellen 7 und 8 gemeinsam freistehen.



Hans Fischer, der die Anschauungen von Burian modifizierte, hat auf Grund anderer Betrachtungen dieselbe Ansicht schon früher ausgesprochen¹⁾.

¹⁾ H. 60, 69 [1909].

Die Konstitution der Inosinsäure kann daher durch eine der folgenden Formeln ausgedrückt werden.



Experimenteller Teil.

Die Darstellung der *d*-Ribose-phosphorsäure konnte vereinfacht und verbessert werden, nachdem man über die zwei wesentlichen Eigenschaften der Inosinsäure, die glykosidartige Bindung der Base und den Widerstand der Phosphorsäurebindung im Klaren war. Auf Grund dieser Eigenschaften durfte man erwarten, daß das Hypoxanthin vom Molekül der Inosinsäure sich leicht durch kurzes Aufkochen mit verdünnten Mineralsäuren trennen lassen würde. Diese Erwartung hatte sich vollkommen bestätigt, dabei vollzog sich die Spaltung der Base quantitativ und die Abtrennung der Phosphorsäure nur in ganz unbedeutendem Maße.

20.0 g inosinsaures Barium wurden mit 500 ccm einprozentiger Salzsäure eine Stunde gekocht. Nach dem Abkühlen wurde Schwefelsäure bis zum Gehalt von 2% zugegeben und das Hypoxanthin und die Salzsäure mittels Silbersulfat entfernt. Das überschüssige Silber entfernte man mit Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure durch Neutralisieren mittels Bariumcarbonat. Es ist wichtig, das Bariumcarbonat frisch aus chemisch reinem Bariumhydrat bereitet zu haben.

Das Filtrat enthielt weder Stickstoff noch freie Phosphorsäure. Es wurde unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt, wobei ein basisches Bariumsalz der gepaarten Phosphorsäure neben wenig Bariumcarbonat sich abschied. Das Ganze wurde mittels Essigsäure in Lösung gebracht und filtriert. Aus dieser Lösung wurde das Bariumsalz mittels absolutem Alkohol als amorpher Niederschlag gefällt, der nach dem Abfiltrieren und Waschen mit Alkohol und Äther getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 90% der Theorie. Um das Produkt krystallinisch zu erhalten, haben wir es fein gepulvert und mit 30 ccm Wasser versetzt. Beim Umrühren ging die klebrig gewordene Masse ziemlich rasch in Lösung. Aus dieser Lösung läßt sich das krystallinische Bariumsalz erhalten; die Krystallisation wird durch Einimpfen und durch tüchtiges Reiben beschleunigt. Beim Stehen im

Eisschrank schied sich die Substanz am Boden des Gefäßes als dicke Krystallschicht ab, die aus prachtvollen Aggregaten von sechseckigen Platten bestand. Die Mutterlauge enthielt beträchtliche Mengen des Salzes. Wegen der leichten Bildung von basischem Salz aber kann man die Mutterlauge nicht gut konzentrieren. Zur Gewinnung des krystallinischen Salzes wiederholt man die Fällung mittels Alkohol und verfährt weiter wie bei der ersten Krystallisation.

Die Eigenschaften dieses Salzes waren dieselben wie des schon beschriebenen Präparates, nur war der Gehalt an Krystallwasser etwas abweichend; statt der angegebenen Zahl von 5 Mol. Wasser wurden $5\frac{1}{2}$ Mol. gefunden. Da dieses Präparat durch Umkrystallisieren gereinigt war, muß man die letzte Zahl als die richtige betrachten.

0.4543 g der lufttrocknen Substanz, über Phosphorpentoxyd bei vermindertem Druck bei 110° getrocknet, verloren an Gewicht 0.0984 g.

$C_5H_9O_8PBa + 5\frac{1}{2} H_2O$. Ber. H_2O 21.33. Gef. H_2O 21.67.

0.2331 g getrocknete Sbst.: 0.0721 g $Mg_2P_2O_7$. — 0.1010 g Sbst.: 0.0643 g $BaSO_4$.

$C_5H_9O_8PBa$. Ber. P 8.50, Ba 37.53.
Gef. » 8.61, » 37.48.

Oxydation der Ribose-phosphorsäure mittels Salpetersäure.

50 g inosinsaures Barium wurden wie oben angegeben hydrolysiert und das Bariumsalz der Ribose-phosphorsäure dargestellt. Dieses wurde in Wasser gelöst und das Barium quantitativ mittels Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck zum Sirup verdampft, in 30 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1.2) gelöst und 24 Stunden bei 40° stehen gelassen. Die Lösung wurde dann in vier Teilen behandelt. Jeder Teil wurde auf einem großen Uhrglas auf dem Wasserbade möglichst rasch unter stetem Umrühren zur Trockne verdampft. Auf diese Weise wurde verhältnismäßig wenig Phosphorsäure abgespalten. Das Produkt wurde dann in 2 l Wasser gelöst, mit ein paar Tropfen Phenolphthalein versetzt und sodann Kalkmilch bis zur neutralen Reaktion zugegeben. Die voluminöse Fällung von Calciumphosphat wurde abfiltriert und das Filtrat gekocht. Es schied sich eine Substanz ab, die ganz das Aussehen des unten beschriebenen phospho-ribonsauren Calciums besaß.

Die Mutterlauge wurden auf 500 ccm konzentriert und wieder gekocht. Da im Calciumphosphat-Niederschlag beträchtliche Mengen des Calciumsalzes mitgerissen wurden, wurde zur Wiedergewinnung das Calciumphosphat in Wasser aufgeschwemmt und unter beständigem Turbinieren mit Essigsäure versetzt, bis der Niederschlag vollständig gelöst war. Aus dieser Lösung wurde die Phosphorsäure wieder mit Kalkmilch gefällt und diese Operation mit dem Phosphat-Niederschlag dreimal wiederholt. Aus den vereinigten Mutterlauge,

die neben der Phosphorverbindung viel essigsäures Calcium enthielten, wurde die erste nach dem Konzentrieren mittels Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag wurde in Wasser aufgeschwemmt und mittels Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat wurde nach dem Abdunsten des Schwefelwasserstoffs wie oben mit Kalkwasser neutralisiert, aufgekocht und das Calciumsalz wie oben gewonnen. Die Gesamtausbeute betrug 14 g oder 50 % der Theorie. Die so erhaltene Substanz war analysenrein.

0.2296 g Sbst. (bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 110° getrocknet): 0.0836 g $Mg_2P_2O_7$. — 0.2143 g Sbst.: 0.1491 g $CaSO_4$. — 0.1909 g Sbst.: 0.1366 g CO_2 , 0.0456 g H_2O .

$(C_5H_8O_9P)_2Ca_3$. Ber. C 19.80, H 2.64, P 10.23, Ca 19.81.

Gef. » 19.52, » 2.65, » 10.14, » 20.48.

Diese Zahlen stimmen vorzüglich für das Calciumsalz der Phospho-ribonsäure.

Das Salz zeigte sich unter dem Mikroskop in kugeligen Aggregaten, unter denen keine krystallinische Form zu sehen war. Es ist in kaltem Wasser ziemlich löslich, aber schwer in heißem. Das Salz darf der Luft nicht lange Zeit ausgesetzt werden, da es allmählich Kohlensäure anzieht. Die Säure wird von den Schwermetallsalzen in neutraler Lösung gefällt. Beim Auflösen in Mineralsäuren wandelte sich die freie Säure in das Lacton um. Diese Umwandlung wurde durch die optische Untersuchung bestimmt.

Bei einem anderen Versuch wich das Verfahren von diesem darin ab, daß die Salpetersäurelösung auf einmal eingedampft wurde. Es bildete sich dabei viel freie Phosphorsäure und Trioxyglutarsäure. Durch mühsame und unbequeme Reinigungsoperationen gelang es aber, auch hier die Phospho-ribonsäure zu erhalten.

0.2478 g der Substanz, bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 110° getrocknet, wurden in 5 ccm $\frac{1}{1}$ -Salzsäure gelöst. Im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht und bei 20° betrug die Drehung 15' nach dem Auflösen 0.60°. Die Drehung nahm stets ab und betrug nach 24 Stunden 0.08°. Dann blieb sie konstant.

In allen Eigenschaften stimmte dieses Salz mit demjenigen, das durch Brom-Oxydation aus der *d*-Ribose-phosphorsäure erhalten wurde, überein.

Phospho-*d*-ribonsäure.

7 g ribose-phosphorsaures Barium wurden in Wasser aufgeschwemmt und das Barium quantitativ mittels Schwefelsäure entfernt. Die Lösung wurde auf 25 ccm gebracht und dann mit 5 g essigsäurem Calcium und 3 g Brom versetzt. Die Mischung wurde geschüttelt, bis das Brom vollständig gelöst war, und dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stdn. war das Brom fast verschwunden. Da die Lösung noch stark die Orcinprobe zeigte, wurden noch 5 g essigsäures Calcium und 3 g Brom zugesetzt. Nach zwei Tagen

war die Orcinprobe nur noch ganz schwach. Die Lösung wurde dann erwärmt und das Brom mittels Kohlensäure vertrieben. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde mit Schwefelsäure auf Congopapier angesäuert und dann mittels Silbersulfat das Brom entfernt. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff vom Silber und dann mit Baryt von der Schwefelsäure quantitativ befreit, und nach dem Einengen auf ein kleines Volumen mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Der Niederschlag, der durch Verunreinigung mit essigsauerm Calcium von etwas gelatinöser Beschaffenheit war, wurde abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Aus der Mutterlauge wurde beim Versetzen mit mehr Alkohol ein Niederschlag erhalten, der zum größten Teil aus essigsauerm Calcium bestand. Dieser wurde nach dem Absaugen und Trocknen mittels 75-prozentigem Alkohol ausgekocht, bis das essigsäure Calcium entfernt war. Es blieb ein Rückstand, der, aus phospho-ribonsauerm Calcium bestand. Zur Reinigung wurde diese Substanz zusammen mit dem ersten alkoholischen Niederschlag mit viel Wasser bei 40° geschüttelt, bis sie vollständig gelöst war. Die Lösung wurde filtriert, unter vermindertem Druck auf 250 ccm eingengt und zum Sieden gebracht. Hierbei fiel das Calciumsalz der Phosphorverbindung zum größten Teil aus. Es wurde rasch abgesaugt und mittels heißem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Aus der Mutterlauge konnten beim weiteren Eindampfen weitere Substanzmengen erhalten werden.

Statt dieses sehr unbequemen Verfahrens zur Trennung dieses Calciumsalzes vom essigsaueren Calcium, kann mit Vorteil das Bleiverfahren benutzt werden, das wir oben bei der Salpetersäure-Oxydation beschrieben haben und das später von uns ausgearbeitet wurde. Ohne, wie oben angegeben, in viel Wasser zu lösen, kann man auch die Substanz zum Umlösen in 50 Teilen Wasser aufschwimmen, dann durch Versetzen mit einem kleinen Überschuß von Essigsäure in Lösung bringen und die Lösung mittels Kalkmilch auf Phenolphthalein neutral machen und aufkochen.

0.1890 g Sbst., bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 110° getrocknet, gaben 0.0698 g $Mg_2P_2O_7$. — 0.1984 g Sbst.: 0.1359 g $CaSO_4$.

$(C_5H_8O_9P)_2Ca_3$. Ber. P 10.23, Ca 19.81.

Gef. » 10.28, » 20.17.

Das Salz stimmte in allen Eigenschaften mit der Substanz, die bei der Oxydation mittels Salpetersäure erhalten wurde. Für die optische Untersuchung wurden 0.2565 g Substanz, die im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 110° getrocknet war, in 5 ccm *n*-HCl gelöst. 10 Minuten nach dem Auflösen drehte die Lösung im 1-dm-Rohr bei 20° und mit Natrium-Licht 0.60° nach links. Die Drehung nahm dann infolge von Lactonbildung beständig ab. Nach 24 Std. blieb sie bei -0.08° konstant. Diese Zahlen stimmen sehr gut mit den bei der Salpetersäure-Oxydation erhaltenen überein.

Neutrale Hydrolyse der Phospho-ribonsäure.

Um einen weiteren Beweis für die Konstitution der bei der Salpetersäure-Oxydation erhaltenen Substanz zu erbringen, haben wir

durch neutrale Hydrolyse die Phosphorsäuregruppe abgespalten und *d*-Ribonsäure erhalten.

4 g Calciumsalz wurden in wenig Wasser und einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gelöst und das Calciumsulfat mittels 4 Volumen Alkohol gefällt. Es wurde abgesaugt, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in 50 ccm Wasser aufgenommen. Es wurden dann 4 ccm 25-proz. Ammoniak zugegeben und hierauf Eisessig, bis die Lösung auf Lackmus amphoter reagierte. Die Lösung wurde im Einschluß-Rohr 3 Stdn. auf 130° erhitzt. Beim Höhersteigen der Temperatur ist man der Gefahr der Bildung von Brenzschleimsäure ausgesetzt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und genau mittels Bleiessig gefällt. Das Filtrat wurde sorgfältig mittels Bleiessig und Baryt gefällt und der Niederschlag abfiltriert. Es wurde mittels verdünnter Schwefelsäure zerlegt und die überschüssige Schwefelsäure mittels Bleicarbonat abgestumpft. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt und das Filtrat 1 Stde. mit Cadmiumcarbonat gekocht. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, der Rückstand mit ein wenig ribonsaurem Cadmium geimpft und der Krystallisation überlassen. Nach 24 Stdn. erstarrte das Ganze. Es wurde mit wenig Wasser verrührt und auf einer Nutsche abgesaugt. Das trockne Präparat wog 0.3 g. Zur Analyse wurde es aus ganz wenig Wasser umkrystallisiert.

0.0943 g Sbst. (bei 110° getrocknet): 0.0435 g CdSO₄.

(C₆H₉O₆)₂Cd. Ber. Cd 25.34. Gef. Cd 24.86.

Im Aussehen war die Substanz mit dem Cadmiumsalz der aus der Ribose dargestellten Säure identisch.

d-Ribonsäure.

4 g *d*-Ribose wurden in 20 ccm Wasser gelöst und 4 g Brom zugegeben. Das Brom löste sich nach öfterem Umschütteln ganz. Da nach 24 Stdn. die Lösung noch sehr stark die Pentose-Reaktion zeigte, wurden ein Überschuß von frischem, reinem BaCO₃ und noch 4 g Brom zugegeben. Nach 24 Stdn. fiel die Orcinprobe noch stark aus. Die Mischung wurde dann weiter auf *d*-Ribonsäure verarbeitet. Sie wurde mit Wasser verdünnt und das Barium mittels Schwefelsäure gefällt. Das Filtrat wurde vom Brom mittels Silberoxyd befreit und die überschüssige Schwefelsäure aus dem Filtrat mittels Bleicarbonat entfernt. Nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff wurde die Lösung 1 Stde. mit Cadmiumcarbonat gekocht und das Filtrat auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft. Der Sirup konnte nach längerem Stehen nicht zur Krystallisation gebracht werden, auch nicht nach der Fällung mittels Bleiessig und Baryt. Wir haben deswegen *d*-ribonsaures Cadmium nach der Methode von Fischer und Piloty¹⁾ aus der Arabonsäure durch Pyridin-Umlagerung dargestellt und in das Cadmiumsalz übergeführt. Nach mehreren Monaten krystallisierte das Cadmiumsalz. Nach

¹⁾ B. 24, 4214 [1891].

dem Impfen mit diesem Präparat ist es uns gelungen, schnell das *d*-ribonsaure Cadmium zur Krystallisation zu bringen. Die Ausbeute aus 4 g Ribose war nur 2.5 g. Da ziemlich viel von dem Zucker nicht vom Brom angegriffen wurde, ist die kleine Ausbeute leicht erklärlich.

Für die Analyse wurde das Salz nach zweimaligem Umkrystallisieren aus wenig Wasser rein erhalten.

0.2265 g Subst. (bei 110° getrocknet): 0.1052 g CdSO₄.

(C₅H₉O₆)₂Cd. Ber. Cd 25.34. Gef. Cd 25.04.

96. H. Kauffmann und W. Kugel: Über das 4-Nitro-resorcin.

(Eingegangen am 13. März 1911.)

Aus Anlaß gewisser optischer Untersuchungen haben wir nach einem Verfahren gesucht, das erlaubt, das nichtflüchtige Nitro-resorcin in größeren Mengen und in reinem Zustand zu beschaffen. Die bekannten Verfahren sind teils sehr zeitraubend, teils sehr kostspielig und liefern ein Produkt, dessen Reinheit zweifelhaft ist. Wir haben gefunden, daß man die Nitroprodukte zweiwertiger Phenole dadurch gewinnen kann, daß man zuerst deren Monobenzoate herstellt und diese dann der Nitrierung unterwirft.

Die Nitrierung des Resorcin-monobenzoats ist mit Schwierigkeiten verknüpft. Nach der von uns ausgearbeiteten Nitrierungsmethode, auf welche wir erst nach zahlreichen Versuchen kamen, entstehen als Hauptprodukt zwei isomere Nitro-monobenzoate. Es ist aber erforderlich, sich genau an die Versuchsbedingungen zu halten, da Änderungen in der Temperatur und der Konzentration einen anderen Verlauf bewirken. Die Ausbeute sinkt, und es entstehen höher nitrierte, zum Teil harzige Produkte, oder man erhält das Ausgangsmaterial zurück.

Die beiden Nitro-monobenzoate ergaben bei der Verseifung ein und dasselbe Nitro-resorcin, wodurch bewiesen ist, daß letzteres zweifellos die Konstitution OH:OH:NO₂, 1:3:4 hat. Ein Nitro-resorcin dieser Konstitution ist von Weselsky und Benedikt beschrieben worden¹⁾. Diese gaben den Schmelzpunkt auf 115° an; wir fanden ihn jedoch bei 122°, so daß wir anfangs zweifelhaft waren, ob unser Produkt tatsächlich die angenommene Konstitution besitzt. Da aber beide Nitro-monobenzoate den gleichen Nitro-resorcin-dimethyl-

¹⁾ M. 1, 899 [1881].