

Produkt ab, das roh bei 280° und nach dem Umkrystallisieren aus Salzsäure bei 288° schmilzt.

5.030, 5.266 mg Sbst.: 9.970, 10.395 mg CO₂, 2.010, 2.160 mg H₂O.

C₁₂H₁₂O₇. Ber. C 53.7, H 4.5.

Gef. „ 54.1, 53.8, „ 4.5, 4.6.

Die neue Säure erweist sich gegen Kaliumpermanganatlösung in soda-alkalischer Lösung als gesättigt. Nach Darstellung und Zusammensetzung ist sie als 6-[Oxy-isopropyl]-3-methyl-phthalsäure (VII) anzusprechen.

Hydrierung des Adduktes XI zur Dihydro-Verbindung.

0.3 g des Adduktes XI werden in Essigester-Lösung mit Pt-Oxyd als Katalysator reduziert, wobei die für eine Doppelbindung berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen wird. Nach dem Abfiltrieren vom Platin wird der Essigester abgedampft und der krystalline Rückstand aus Acetonitril umkrystallisiert. Die Dihydro-Verbindung schmilzt bei 202—203° (unter Wasser-Abspaltung). Sie erweist sich gegen soda-alkalische Kaliumpermanganat-Lösung als ungesättigt.

5.168, 4.962 mg Sbst.: 12.66, 12.12 mg CO₂, 3.38, 3.27 mg H₂O.

C₁₄H₂₀O₄ (252). Ber. C 66.7, H 7.9.

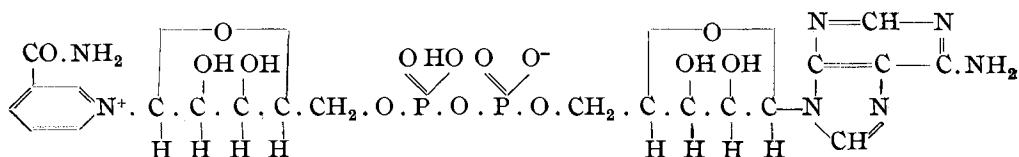
Gef. „ 66.8, 66.6, „ 7.3, 7.4.

239. R. Vestin, F. Schlenk und H. von Euler: Ein Beitrag zur Konstitutionsermittlung der Cozymase; Isolierung des Spaltstückes Adenosin-diphosphorsäure.

[Aus d. Institut für Organ.-chem. Forschung d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 19. Mai 1937.)

Für Cozymase (Codehydrase I), das wasserstoffübertragende Coenzym der alkoholischen Gärung, haben wir vor einiger Zeit die Konstitutionsformel I angegeben¹⁾.



Diese stützt sich auf folgende experimentelle Ergebnisse: a) Summenformel²⁾ C₂₁H₂₇O₁₄N₇P₂, b) Spaltprodukte bei der sauren Hydrolyse: Adenin³⁾,

¹⁾ H. v. Euler u. F. Schlenk, Ztschr. physiol. Chem. **246**, 64 [1937]; F. Schlenk u. H. v. Euler, Naturwiss. **24**, 794 [1936].

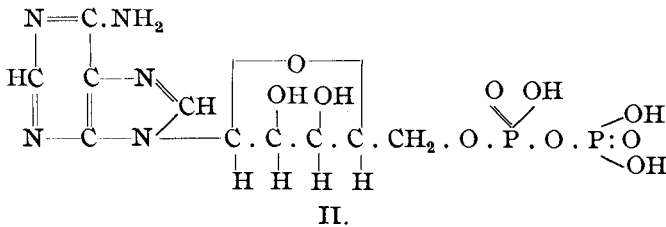
²⁾ H. v. Euler u. F. Schlenk, Svensk kem. Tidskr. **48**, 135 [1936].

³⁾ H. v. Euler u. K. Myrback, Ztschr. physiol. Chem. **177**, 237 [1928].

Nicotinsäure-amid⁴⁾, Pentose-5-phosphorsäure⁵⁾, c) Titration¹⁾. Das Nicotinsäure-amid ist als Pyridiniumbase gebunden⁶⁾, und zwar liegt ein Pyridiniumphosphat vor⁷⁾. In den Adenin-Nucleotiden ist die Ribose an das N-Atom 9 des Adenins gebunden¹¹⁾.

Die Pyrophosphatbindung zwischen den beiden Mononucleotiden wurde auf Grund der Summenformel und der Titration angenommen¹⁾. Besonders in diesem Punkt erschien ein direkter experimenteller Beweis wünschenswert.

Dieser Beweis ist uns jetzt gelungen, da wir unter den Spaltstücken der Alkalihydrolyse Adenosin-diphosphorsäure fanden, welche nach Lohmann⁸⁾ die Konstitution II hat.



Schon früher wurde das Entstehen von Adenosin-diphosphorsäure bei der Alkalihydrolyse der Cozymase vermutet⁹⁾, denn es zeigte sich, daß dabei ein beträchtlicher Teil der organisch gebundenen Phosphorsäure in leicht hydrolysierbare Form übergeht, und daß dem Hydrolysegemisch bzw. den daraus isolierten Rohprodukten die Fähigkeit zukam, als Coenzym bei Umphosphorylierungsvorgängen zu wirken¹⁰⁾.

Alkalische Hydrolyse der Cozymase: In anderem Zusammenhang⁹⁾ ist bereits betreffend die Ausbeute an Adenosin-diphosphorsäure bei alkalischer Hydrolyse von Cozymase folgendes betont worden. Eine Behandlung in der Kälte führt zur Zerstörung der Cozymase, ohne daß leicht hydrolysierbares organisches Phosphat gebildet wird. Findet die Behandlung dagegen in der Wärme mit überschüssigem Alkali statt, so wird das entstandene säurelabile Phosphat weiter gespalten. Um die bestmögliche Ausbeute zu erhalten, wurde die Cozymase in Lösung (enthaltend 1 mg/ccm) unter Luftausschluß mit möglichst geringem Überschuß von Alkali behandelt. Durch sukzessiven Zusatz von Alkali wurden die freigelegten Säureäquivalente neutralisiert. Die Hydrolyse wurde fortgesetzt, bis zwei Säureäquivalente gebildet waren.

⁴⁾ H. v. Euler, H. Albers u. F. Schlenk, *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 113 [1936].

⁵⁾ F. Schlenk, *Svensk Vet. Akad. Ark. f. Kemi* **12**, (B) 17 [1936]; H. v. Euler, P. Karrer u. B. Becker, *Helv. chim. Acta* **19**, 1060 [1936].

⁶⁾ P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz u. U. Solmssen, *Helv. chim. Acta* **19**, 811 [1936].

⁷⁾ E. Adler, H. Hellström u. H. v. Euler, *Ztschr. physiol. Chem.* **242**, 225 [1936].

⁸⁾ *Biochem. Ztschr.* **282**, 120 [1935].

⁹⁾ R. Vestin u. H. v. Euler, *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 1 [1937]; ebenda **247**, 43 [1937]; F. Schlenk, H. v. Euler, H. Heiwinkel, W. Gleim u. H. Nyström, *Ztschr. physiol. Chem.* **247**, 23 [1937].

¹⁰⁾ H. v. Euler, *Die Cozymase, Ergebnisse der Physiologie*, Bergmann, München [1936].

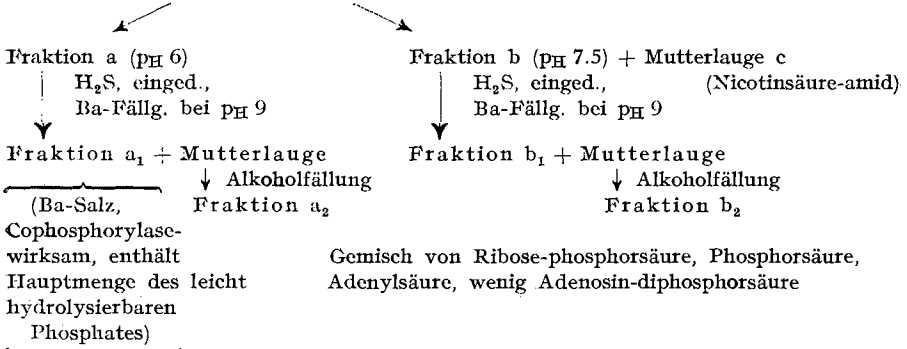
¹¹⁾ J. M. Gulland u. E. R. Holiday, *Journ. chem. Soc. London* **1936**, 765.

Isolierung von Adenosin-diphosphorsäure aus dem Hydrolysgemisch.

Darstellung der Adenosin-diphosphorsäure aus Cozymase:

Übersicht.

Alkalisches Hydrolysgemisch angesäuert, Ag-Fällung ($\text{AgNO}_3 + \text{NH}_3$)



Auflösen in verd. HNO_3 , Fällung mit $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$,
 ↓ Ndschl. + H_2S , Filtr. eingeengt, Alkoholfällung.
 Adenosin-diphosphorsäure, durch geringe Menge Adenylsäure verunreinigt.
 ↓ In H_2O gelöst, mit Ba^{++} bei pH 9 gefällt. (Adenyls. in der Mutterlauge.)
 Adenosin-diphosphorsaures Ba
 ↓ Ba^{++} mit H_2SO_4 entfernt, eingeengt,
 ↓ Alkoholfällung
 Adenosin-diphosphorsäure

Das Hydrolysgemisch wurde neutralisiert und unter vermindertem Druck auf $\frac{1}{3}$ eingedampft, durch Zusatz von verd. HNO_3 auf pH 5 gebracht und mit AgNO_3 versetzt. Der Niederschlag (a) wurde abzentrifugiert und mit wenig verdünnter Silbernitrat-Lösung gewaschen. Mutterlauge und Washwasser wurden vereinigt und mit verdünntem Ammoniak auf pH 7.5 gebracht: Niederschlag b. Die Mutterlauge von b enthielt das abgespaltene Nicotinsäure-amid.

Die Fällungen a und b wurden in H_2O mit H_2S zersetzt, Ag_2S abfiltriert und gewaschen, die Lösungen unter vermindertem Druck ($<40^\circ$) auf geringes Volumen eingeengt.

Lösung a wurde mit wenig 20-proz. Bariumacetat-Lösung und gesätt. Baryt-Lösung bis pH 9 versetzt, die dabei entstandene Fällung a_1 mit absol. Alkohol gewaschen und getrocknet. Aus der Mutterlauge wurde durch Zusatz von überschüssigem Alkohol Fraktion a_2 erhalten.

Aus Lösung b wurden wie bei Lösung a durch Ba^{++} und Alkohol zwei Fraktionen b_1 und b_2 erhalten.

Der Gehalt an Adenosin-diphosphorsäure in den auf diese Weise hergestellten Präparaten a_1 , a_2 , b_1 und b_2 wurde durch Hydrolyse in 1-n. HCl , enthaltend 0.8 mg Substanz/ccm (als Bariumsalz berechnet) ermittelt. Das durch die Hydrolyse freigelegte anorganische Phosphat wurde colorimetrisch gemessen.

Aus Fig. 1 geht hervor, daß die Adenosin-diphosphorsäure hauptsächlich in der Fraktion a_1 enthalten ist, in geringerem Maße in der Fraktion a_2 .

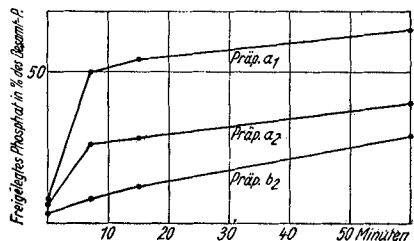


Fig. 1.

Hydrolysegeschwindigkeit in 1-n. HCl bei 100° .

Die übrigen Fraktionen enthalten dagegen kein säurelabiles Phosphat.

Die beiden Fraktionen a_1 und a_2 zeigen auch, im Gegensatz zu den übrigen, eine beträchtliche Aktivität als Cophosphorylase bei der Mineralisierung von Phosphoglycerinsäure im dialysierten Muskelextrakt; siehe folgenden Versuch.

1) Bestimmung der Cophosphorylase-Aktivität der Präparate a_1 , a_2 und b_2 .

Die Präparate wurden vor dem Versuch mit überschüssigem Na_2SO_4 umgesetzt. Als Vergleich wurde Adenylsäure Henning verwendet. System: Totalvolumen 2.0 ccm, enthaltend 9.8 γ -Äquiv. Phosphoglycerinsäure-Na, 0.1 mg Mg und 0.7 ccm Rattenmuskel-Extrakt (Dialyse 3 Std. 20 Min. gegen 0.9% KCl durch Kolloidium) pH 7.5. Inkubation 60 Min. bei 30° . Die Versuchsmischungen enthalten vor der Inkubation 0.43 γ -Atome anorg. P/ccm.

		Adenylsäure (mg)			Präp. a_1 (mg)		Präp. a_2 (mg)		Präp. b_2 (mg)	
Aktivator-	ohne	0.05	0.10	0.25	0.037	0.073	0.039	0.077	0.040	0.080
Konzentrat. . .	Aktivator									
Freigelegtes Phosphat										
γ -Atome P/ccm	0.63	0.68	0.68	4.97	1.23	3.41	1.14	3.01	0.55	0.83
Nach Abzug des Blindwertes . .	—	0.1	0.1	4.4	0.6	2.8	0.5	2.4	0.0	0.2

Die Fraktion a_1 wurde folgendermaßen weiter bearbeitet:

Nach Zusatz von Wasser wurde durch Zutropfen von verd. HNO_3 alles in Lösung gebracht. Dann wurde $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung im Überschuß zugegeben und auf pH 3 abgestumpft. Der Niederschlag wurde zweimal gewaschen und in H_2O mit H_2S zerlegt, nach Filtern auf ein geringes Volumen eingengt und mit überschüssigem Alkohol die Adenosindiphosphorsäure ausgefällt. Die Substanz war noch nicht analysenrein. Sie wurde in wenig Wasser aufgelöst und wenig BaCl_2 -Lösung und $n/10$ -NaOH bis pH 9 wurden zugegeben. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit verd. Bariumchlorid-Lösung gewaschen, dann Ba^{++} durch verd. H_2SO_4 entfernt, die Lösung eingengt und mit überschüssigem Alkohol gefällt, der Niederschlag mehrfach mit absol. Alkohol gewaschen und getrocknet.

Ausbeute (Beispiel): Hydrolyse von Präparat 1344 (8. IV. 1937). Einsatz 433 mg Cozymase. Im Hydrolysegemisch 40% d. Th. Pyrophosphatfraktion, entspr. 111 mg Adenosin-diphosphorsäure. Fraktion a_1 : 120 mg Ba-Salz; 1. Reinigung: 50 mg Adenosin-diphosphorsäure; 2. Reinigung (Analysenpräp.): 22 mg.

Hydrolysegeschwindigkeit der Adenosindiphosphorsäure aus Cozymase.

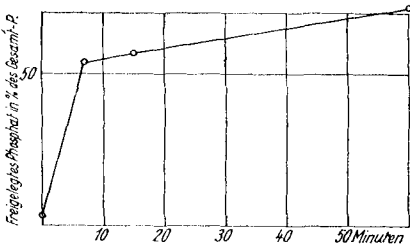


Fig. 2.

Analytische Charakteristik der isolierten Adenosindiphosphorsäure: Das so erhaltene Präparat wurde in oben angegebener Weise in 1-n. HCl hydrolysiert.

Die Hydrolysenkurve zeigt, daß die hergestellte Substanz ein in Säure äußerst leicht und ein schwer abspaltbares Phosphorsäuremolekül enthält.

Die Hydrolysenkurve scheint auch eine geringere Menge ursprünglich vorhandenen anorganischen Phosphats (3% des Gesamtphosphats) anzugeben. Die Gegenwart einer größeren Menge von Pyrophosphat beeinträchtigt bei colorimetrischer Phosphatbestimmung nach der Molybdatmethodik immer die Ergebnisse in dieser Richtung.

Elementaranalyse des Präparates: Gewichtsabnahme beim Trocknen im Hochvak. bei 110° etwa 5%. — 3.727 mg Sbst.: 3.890 mg CO₂, 1.330 mg H₂O. — N-Best. nach Kjeldahl-Friedrich*): 3.364 mg Sbst.: 3.85 ccm *n*₁₀₀-HCl (K. Wallenfels).

7.120 mg Sbst.: 68.470 mg Ammoniumphosphormolybdat (A. Schoeller).

C₁₀H₁₅O₁₀N₅P₂ (427.16). Ber. C 28.10, H 3.54, N 16.39, P 14.52.

Gef. „ 28.47, „ 3.99, „ 16.07, „ 13.98.

Biologische Charakteristik der isolierten Adenosin-diphosphorsäure.

Die erhaltene Substanz zeigte also in analytischer Hinsicht gute Übereinstimmung mit Adenosin-diphosphorsäure. Um einen endgültigen Beweis für die Identität zu erhalten, war eine biologische Charakterisierung notwendig. Zu diesem Zweck wurde das hergestellte Präparat auf seine Wirksamkeit als Cophosphorylase bei der Mineralisierung von Phosphoglycerinsäure in frischem dialysierten Muskelextrakt untersucht. Vers. 1 scheint zu zeigen, daß schon die beiden Fraktionen a₁ und a₂ eine wesentlich größere Wirksamkeit als Phosphatüberträger ausüben als die reine Adenylsäure. Dies tritt noch deutlicher hervor bei Versuchen mit weiter gereinigter Substanz. Indes besteht in diesem System derselbe Unterschied zwischen Adenylsäure und Adenosin-triphosphorsäure. Durch geeignete Behandlung des Enzympräparates kann dieser Unterschied beseitigt werden. (Eine ausführlichere Besprechung dieser Erscheinung wird in anderem Zusammenhang erfolgen.) Vergleicht man die hergestellte Adenosin-diphosphorsäure einerseits und Adenylsäure andererseits unter Verwendung von solchen Enzympräparaten, so zeigt die Aktivatorwirksamkeit der beiden Präparate volle Übereinstimmung. (Die in Vers. 2 verwendete Adenosin-triphosphorsäure war nicht ganz rein und deshalb entsprechend weniger wirksam.)

2) Vergleich der Cophosphorylase-Aktivität folgender Präparate:

- 1) aus Cozymase hergestellte Adenosin-diphosphorsäure,
- 2) Adenylsäure, 3) Adenosin-triphosphorsäure.

System: Mineralisierung der Phosphoglycerinsäure, Totalvolumen 2.0 ccm, enthaltend 0.70 ccm mit Veronalpuffer (pH 7.4) hergestellte Enzym-Lösung. Phosphoglycerinsäure: 5 MM, Mg: 1 MM. Inkubation 60 Min. bei 30°. Die Versuchsmischungen enthalten vor der Inkubation 0.13 γ-Atome anorg. P/ccm.

Als ein weiterer Beweis für die Identität des isolierten Präparates mit Adenosin-diphosphorsäure wurde eine enzymatische Phosphorylierung ausgeführt. Wird das Präparat in gealtertem Muskelextrakt mit geeignetem Phosphat-Donator (Phosphokreatin) behandelt, so erfolgt eine Umesterung, wobei die säurelabile Phosphatfraktion verdoppelt wird, was einem Übergang von Adenosin-diphosphorsäure in Adenosin-triphosphorsäure entspricht.

*) Hrn. Prof. Th. Wagner-Jauregg danken wir für den freundl. Hinweis, daß bei manchen Nucleotiden die N-Bestimmung nach Dumas versagt; vergl. auch Ztschr. physiol. Chem. 239, 188 [1936].

		Adenylsäure (MM)	Adenosin- diphosphorsäure (MM)	Adenosin- triphosphorsäure (MM)
Aktivator- Konzentrat. . .	ohne Akti- vator	0.05 0.10 0.15 0.35	0.05 0.10 0.15 0.20	0.05 0.10 0.15 0.20
Freigelegtes Phosphat γ -Atome P/ccm	0.52	1.55 1.96 2.07 2.48	1.49 1.86 2.04 2.19	1.37 1.61 1.78 1.86
Nach Abzug des Blindwertes ..	—	1.03 1.44 1.55 1.96	0.97 1.34 1.52 1.67	0.85 1.09 1.26 1.34

3) Enzymatische Phosphorylierung der aus Cozymase hergestellten Adenosin-diphosphorsäure.

System: Umesterung mit Phosphokreatin in gealtertem Muskelextrakt. Totalvolumen 2.0 ccm, enthaltend 1.0 ccm Extraktmischung (17 Stdn. gegen Leitungswasser dialysiert, 4 Tage aufbewahrt, Kaninchenmuskel), enthaltend Phosphokreatin und Mg. Inkubation 10 Min. bei 20°. Der Gehalt von anorg. Phosphat (einschl. Phosphokreatin-Phosphat) wird vor und nach der Hydrolyse in 1-n. HCl (7' bei 100°) bestimmt.

Phosphat-Acceptor	γ -Atome P/ccm		Pyro-P
	vor Hydrol.	nach Hydrol.	
Ohne Acceptor	1.23	1.30	0.07
0.40 mg Adenylsäure	0.58	1.18	0.60
0.25 mg Adenosin-diphosphorsäure vor der Inkubation ..	1.07	1.29	0.22
nach der Inkubation :	0.94	1.34	0.40

Zusammenfassung: Durch alkalische Hydrolyse der Cozymase erhielten wir ein Abbauprodukt, welches auf Grund chemischer und biologischer Versuche als Adenosin-diphosphorsäure erkannt wurde. Damit ist eine Pyrophosphatbindung im Cozymasemolekül sichergestellt.

240. O. Hahn, L. Meitner und F. Strassmann: Über die Trans-Urane und ihr chemisches Verhalten.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Chemie, Berlin-Dahlem.]
(Eingegangen am 15. Mai 1937.)

Inhaltsübersicht.

Einleitung: Schemata der Prozesse und Bemerkungen zur Methodik der Messungen.

- I) Unterscheidung aller Trans-Urane (Ordnungszahlen 93—96) vom Uran und den benachbarten tiefer stehenden Elementen.
- II) Chemischer Nachweis der künstlichen Uran-Isotope.
- III) Unterscheidung des Eka-Rheniums ($Z = 93$) von den Homologen der Platinmetalle ($Z = 94, 95, 96$).
- IV) Unterscheidung der Homologe der Platinmetalle untereinander.
 - 1) Trennung des Eka-Osmiums ($Z = 94$) vom Eka-Iridium ($Z = 95$).
 - 2) Trennung des Eka-Platins ($Z = 96$) von den übrigen Homologen der Platinmetalle ($Z = 95$ und 94).
- V) Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Trans-Uranen und ihren niedrigeren Homologen Rhenium und den Platinmetallen.