

## 176. Chemische und Fermentchemische Darstellung von Adenosin

von Max Hartmann und Werner Bosshard.

(25. X. 38.)

Die pharmakologische Wirksamkeit von Adenosin und seinen phosphorylierten Verbindungen wurde zum ersten Male eingehend von *Drury* und *Szent-Györgyi*<sup>1)</sup> beschrieben. Seither sind diese Stoffe vielfach Gegenstand physiologischer Untersuchungen gewesen, und ihre Bedeutung für Kreislauf und Herz ist deutlich geworden. Durch Untersuchungen von *H. Bredereck* und Mitarbeitern<sup>2)3)4)</sup> ist neuerdings die Frage nach einer einfachen chemischen Darstellung des bisher nur schlecht zugänglichen Adenosins erfolgreich beantwortet worden. Es war schon lange bekannt, dass gewisse Organfermente und Pflanzenfermente die Polynucleotide zu den Nucleotiden und diese weiter zu den Nucleosiden zu spalten vermögen<sup>5)</sup>, aber diese Fermente zeichneten sich meist durch einen mehr oder weniger grossen Gehalt an Amidasen und Nucleosidasen aus und führten zu den desamidierten Nucleotiden, bzw. Nucleosiden und zu den entsprechenden Basen. Deshalb arbeiten diese Fermente mit schlechten Ausbeuten an unveränderten Nucleosiden. Im Emulsin aus Süssmandeln fand nun *Bredereck*<sup>6)</sup> ein Ferment, das sowohl eine polynucleotidatische wie eine nucleotidatische Wirkung, aber keine nucleosidatische Wirkung zeigt, und so gelang es, aus Hefenucleinsäure direkt oder nach vorangegangener alkalischer Hydrolyse zu den rohen Nucleotiden die nicht desaminierten Nucleoside zu isolieren<sup>7)</sup>. *Bredereck*<sup>8)</sup> hat die Emulsinwirkung auch an den isolierten Nucleotiden mit Erfolg geprüft. Das Adenosin, welches über sein Pikrat bereitet wird, war damit besser zugänglich geworden.

Über die Einheitlichkeit und Reinheit solcher Fermente, der Nucleasen, weiss man nicht viel. Man nimmt an, dass die Polynucleotidase und die Nucleotidase zu den Phosphatasen gehören, und so lag es nahe, solche Phosphatasen, die den Nucleotidasen in Wirkungsoptimum, Aktivierbarkeit und Hemmbarkeit ähnlich sind, auf ihre Wirkung als Nucleasen zu prüfen. Da die phosphatatische Wirkung der Emulsinpräparate ein Optimum bei  $p_H = 4,5 - 5,0$  zeigt, kommen dabei diejenigen „sauren“ unspezifischen Phos-

<sup>1)</sup> J. Physiol. **68**, 214 (1929).

<sup>3)</sup> B. **71**, 408 (1938).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **244**, 102 (1936).

<sup>4)</sup> B. **71**, 1013 (1938).

<sup>5)</sup> *Bredereck*, Erg. d. Enzymforschg. **7**, 105 (1938).

<sup>6)</sup> B. **71**, 408 (1938).

<sup>7)</sup> *Bredereck*, B. **71**, 718 (1938).

<sup>8)</sup> Z. physiol. Ch. **244**, 102 (1936).

phatasen in Frage, von welchen die Harnphosphatase nach W. Kutscher<sup>1)</sup> 2) mit dem Wirkungsoptimum bei  $p_H = 4,0 - 5,0$  und die Kartoffelphosphatase nach E. Pfankuch<sup>3)</sup> mit dem Wirkungsoptimum  $p_H = 5,8 - 5,9$  geprüft wurden. Beide Phosphatasen erwiesen sich als gute Nucleotidasen.

Die nucleotidatische Wirkung der Harnphosphatase aus Männerharn und der Kartoffelphosphatase aus frisch geernteten Kartoffeln wurde an Adenylsäure testiert, die phosphatatische an  $\beta$ -Natriumglycerophosphat. Emulsin wird in gleicher Weise geprüft und verglichen, wobei gleiche P-Mengen in Adenylsäure und Glycerophosphat pro  $cm^3$  Ansatz bei den Spaltversuchen verglichen werden.

600,3 mg  $\beta$ -Natriumglycerophosphat (*Merck*) werden in  $15\ cm^3$  Wasser gelöst, mit 2-n. Essigsäure gegen Lackmus neutralisiert und 99,8 mg Emulsin (*Merck*), in  $10\ cm^3$  Wasser gelöst, zugegeben. Mit Acetatpuffer  $p_H = 4,4$  wird auf  $50\ cm^3$  aufgefüllt und in einen Thermostaten bei  $37^\circ\ C$  eingesetzt. Gesamt- $p_H = 4,5$ .

|                      |    |    |    |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . . | 1  | 3  | 6  | 22 | 30 | 70 |
| % Spaltung . . . .   | 23 | 41 | 40 | 72 | 83 | 80 |

Der Blindversuch, Glycerophosphat ohne Ferment, zeigte keine Spaltung innerhalb der Versuchszeiten.

1007 mg Adenylsäure werden mit 2-n. NaOH mit gegen Lackmus neutraler Reaktion gelöst, mit 100,9 mg Emulsin in  $10\ cm^3$  Wasser versetzt und mittels Acetatpuffer  $p_H = 4,4$  auf  $50\ cm^3$  aufgefüllt. Gesamt- $p_H = 4,9$ . Thermostat  $37^\circ\ C$ .

|                      |    |    |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . . | 1  | 3  | 6  | 22 | 46 |
| % Spaltung . . . .   | 16 | 40 | 44 | 68 | 72 |

Blindprobe Adenylsäure ohne Ferment ergab keine Spaltung bei  $p_H = 4,9$  innerhalb der Versuchszeit.

Die Substrat-Aktivität des Emulsins ist ungefähr gleich gegen Glycerophosphat wie gegen Adenylsäure.

608 mg  $\beta$ -Natriumglycerophosphat in  $15\ cm^3$  Wasser mit 2-n. Essigsäure neutralisiert und mit  $10\ cm^3$  Harnkonzentrat aus Männerharn versetzt, werden mit Acetatpuffer  $p_H = 4,7$  auf  $50\ cm^3$  aufgefüllt und bei  $37^\circ$  im Thermostaten gehalten. Gesamt- $p_H = 6,1$ .  $10\ cm^3$  Harnkonzentrat = 250 mg Trockensubstanz.

|                      |    |    |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . . | 1  | 3  | 22 | 46 | 70 |
| % Spaltung . . . .   | 34 | 43 | 69 | 81 | 86 |

995 mg Adenylsäure mit 2-n. NaOH mit neutraler Reaktion gegen Lackmus gelöst, werden mit  $7\ cm^3$  Wasser verdünnt, mit  $5\ cm^3$  Harnkonzentrat wie oben versetzt und mit Acetatpuffer  $p_H = 4,4$  auf  $50\ cm^3$  aufgefüllt. Thermostat  $37^\circ\ C$ . Gesamt- $p_H = 5,0$ .

|                      |    |    |    |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . . | 1  | 3  | 6  | 22 | 30 | 46 |
| % Spaltung . . . .   | 16 | 38 | 63 | 85 | 95 | 93 |

Nach 96 Stunden wird durch Zusatz von 1 g Pikrinsäure in  $20\ cm^3$  siedendem Wasser Adenosinpikrat gefällt, und nach Stehen im Eisschrank wird das Pikrat abgesaugt. 0,72 g vom Smp.  $180-184^\circ$ .

Der Gehalt des Männerharns an Phosphatase war stark schwankend und die erhaltenen Harnkonzentrate von stark wechselnder .

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. **235**, 62 (1935).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **238**, 275 (1936).

<sup>3)</sup> Z. physiol. Ch. **241**, 34 (1936).

Aktivität. Auch lassen sich, wie schon *Kutscher* bemerkt, Trockenpräparate nur schlecht reproduzieren. Deshalb wurde von weiteren Versuchen Abstand genommen, nachdem die nucleotidatische Wirkungsweise dieses Fermentes studiert war und mit der Isolierung des Adenosinphosphates ihren Beweis gefunden hatte.

598,9 mg  $\beta$ -Natriumglycerophosphat wie üblich angesetzt mit 100,0 mg Kartoffelferment aus neuen Kartoffeln mit Acetatpuffer  $p_H = 5,0$  auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt. Gesamt- $p_H = 5,3$ .

|                    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . | 1  | 3  | 6  | 22 | 30 | 46 | 70 |
| % Spaltung . . . . | 31 | 50 | 58 | 72 | 73 | 76 | 74 |

400,0 mg Adenylsäure werden mit 2-n. NaOH neutral gelöst, mit 2,8 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, 41,1 mg Kartoffelferment mit 4 cm<sup>3</sup> Wasser zugegeben und mit Acetatpuffer  $p_H = 5,0$  auf 20 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Gesamt- $p_H = 5,2$ .

|                    |    |   |    |    |    |    |
|--------------------|----|---|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . | 1  | 3 | 6  | 22 | 30 | 46 |
| % Spaltung . . . . | 24 | — | 40 | 63 | 67 | 68 |

Bei allen Fermentansätzen wird das Emulsin als filtrierte Lösung, das Kartoffelferment als blosse Suspension benützt. Die Substrat-Aktivität der Kartoffelphosphatase ist gegen Glycerophosphat und Adenylsäure etwa gleich und von der gleichen Grössenordnung wie die des Emulsins.

Neue Kartoffeln liefern bessere Ausbeuten an reinerem und aktiverem Ferment als alte, und die gewonnenen Trockenpräparate behalten ihre Aktivität über Monate hinaus.

Im Versuchsteil wird die Darstellung von Adenosin aus Adenylsäure mittels Kartoffelphosphatase beschrieben, womit die nucleotidatische Wirkung des Ferments nachgewiesen ist. Die polynucleotidatische Spaltwirkung von Kartoffelphosphatase soll nun mit derjenigen des Emulsins verglichen werden. Auch soll die polynucleotidatische Spaltwirkung der beiden Fermente mit ihrer nucleotidatischen verglichen werden. Zu diesem Zwecke lässt man Emulsin und Kartoffelphosphatase einmal auf Hefenucleinsäure und einmal auf mit Natriumhydroxyd zu den Nucleotiden aufgeschlossene Hefenucleinsäure einwirken, wobei gefunden wurde, dass die polynucleotidatische Wirkung wesentlich langsamer ist als die nucleotidatische. Die Polynucleotidspaltung ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Es wird wieder bei gleichem P-Gehalt pro cm<sup>3</sup> Ansatz gearbeitet.

3,0 g Hefenucleinsäure (*Merck*) und 11 cm<sup>3</sup> Wasser werden mit 2-n. NaOH gelöst, gegen Lackmus neutralisiert, mit 0,5 g Ferment und 25 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und mit Acetatpuffer  $p_H = 4,7$  auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Gesamt- $p_H = 4,8$ .

|                                 |   |    |      |    |     |     |
|---------------------------------|---|----|------|----|-----|-----|
| Nach Stunden . . . . .          | 0 | 24 | 48   | 72 | 120 | 144 |
| % Spaltung a) Emulsin . . . . . | 0 | 36 | 45   | 53 | 80  | 81  |
| b) Kartoffelferment . . . . .   | 0 | 23 | (38) | 38 | 60  | 62  |

3,0 g Hefenucleinsäure werden mit 11 cm<sup>3</sup> Wasser aufgeschwemmt und mit 2-n. NaOH gelöst und gegen Lackmus neutralisiert, mit 0,39 g NaOH in 0,7 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbade gehalten. Man filtriert, säuert mit

0,74 cm<sup>3</sup> Eisessig, mit 15 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, an, zentrifugiert nach einiger Zeit und gibt zur klaren Lösung 0,5 g Ferment in 25 cm<sup>3</sup> Wasser und füllt mit Acetatpuffer p<sub>H</sub> = 4,7 auf 100 cm<sup>3</sup> auf. Gesamt-p<sub>H</sub> = 4,8. Thermostat 37°.

|                                 |   |    |    |    |    |    |
|---------------------------------|---|----|----|----|----|----|
| Nach Stunden . . . . .          | 0 | 1  | 3  | 6  | 22 | 30 |
| % Spaltung a) Emulsin . . . . . | 0 | 32 | 58 | 61 | 76 | 79 |
| b) Kartoffelferment . . . . .   | 0 | 35 | 55 | 62 | 75 | 86 |

Damit wird gezeigt, dass die nucleotidatische Wirkung der Kartoffelphosphatase auch gegenüber Hefenucleinsäure etwa gleich stark ist wie die des Emulsins, dass diese schneller ist als die polynucleotidatische dieser Präparate und dass die polynucleotidatische Wirkung der Kartoffelphosphatase etwas geringer ist als die des Emulsins.

Die Kartoffelphosphatase und das Emulsin zeigen besonders bei längerer Dauer der Spaltung auch eine amidatische Wirkung. Diese ist bei der Kartoffelphosphatase etwas stärker als beim Emulsin. Die desamidierende Wirkung zeigt sich vor allem im Schmelzpunkt des Rohpikrates des Adenosins: Er wird unscharf und steigt bis gegen 195° bei kontinuierlicher Zersetzung. Das durch die amidatische Fermentwirkung entstandene Ammoniak kann aus diesen Pikraten in Form von Ammoniumpikrat nach der Pikratzerlegung mit Diäthylamin, die im folgenden beschrieben wird, isoliert werden.

Es sind verschiedene Methoden bekannt, Adenosinpikrat zum freien Nucleosid zu zerlegen, insbesondere hat *Bredereck*<sup>1)</sup> eine solche darauf begründet, das Pikrat in wässriger Suspension mit einer Base, die mit Pikrinsäure eine in Wasser schwer lösliche Verbindung einzugehen vermag, zu zerlegen. Mit Vorteil benützt *Bredereck* Kalilauge oder Ammoniak zur Spaltung. Die angegebenen Ausbeuten aus Rohpikraten zeigen jedoch deutlich, dass diese Pikrate nicht immer besonders rein waren. Mit reinem Adenosinpikrat liefert diese Methode jedoch gute Resultate. Es wurde nun durch Zerlegung von Roh-Adenosinpikrat mittels Diäthylamin und nachfolgender Ätherextraktion von Diäthylaminpikrat eine Methode gefunden, die mit besserer Ausbeute an reinem Adenosin arbeitet. Dabei bleiben Diäthylaminpikrat, Adenosin und die Beimengungen in Lösung, in verhältnismässig kurzer Zeit ist das Diäthylaminpikrat aus neutraler Lösung extrahiert, und das Adenosin wird aus dem wässrigen Anteil ausgefroren. Aus der Ätherlösung kann das Diäthylaminpikrat isoliert werden.

Versuche, Adenosin durch neutrale oder saure chemische Hydrolyse der Phosphorsäure aus Adenylsäure zu gewinnen, sind bisher nicht beschrieben worden. Es war zu erwarten, dass sich Phosphorsäure und Zucker gleichzeitig von der Base lösen werden. Die Guanylsäure war von *P. A. Levene*<sup>2)</sup> neutral, d. h. als neutrales Natriumsalz in wässriger Lösung im Einschlussrohr auf 130—135° erhitzt

<sup>1)</sup> B. 71, 1013 (1938).

<sup>2)</sup> B. 42, 2469 (1909).

worden und lieferte so mit mässiger Ausbeute Guanosin. *Levene*<sup>1)</sup> erhielt sogar aus Hefenucleinsäure bei neutraler Hydrolyse der wässrigen Lösung Guanosin. Guanosin ist allerdings dasjenige Nucleosid, welches sich infolge seiner günstigen Löslichkeitsverhältnisse und seiner guten Krystallisationsfähigkeit vor allen anderen Nucleosiden auszeichnet. *Levene*<sup>2)</sup> konnte das Bariumsalz der Inosinsäure mit Wasser zu Inosin zerlegen, allerdings in umständlicher Weise und mit schlechter Ausbeute, da das Bariumsalz der Inosinsäure schwer löslich in kaltem Wasser und nur mässig löslich in heissem Wasser ist. Adenylsäure ist von *S. J. Thannhauser*<sup>3)</sup> in ammoniakalisch wässriger Lösung durch Erhitzen im Autoklaven auf 135° zu Adenosin hydrolysiert worden. Dabei erhielt er jedoch nur sehr wenig reines Adenosin-pikrat. Die Hydrolyse in alkalischem Medium verläuft nur schwer und unvollständig.

Da weder mineralsauer noch alkalisch hydrolysiert werden kann, wurde in neutralem bis schwach saurem Bereich untersucht. Dabei zeigte sich, dass die wasserlöslichen Salze der Adenylsäure mit Alkalien und Erdalkalien bei saurem  $p_H$  glatt und mit guten Ausbeuten zu Adenosin hydrolysiert werden können. Nach Zugabe von 1 Mol Alkali bzw. 0,5 Mol Erdalkali zu 1 Mol Adenylsäure geht diese unter Bildung des sauren Salzes mit einem  $p_H$  von 4,6 in Lösung. Weitere Zugabe von wässrigem Alkali verändert das  $p_H$  kontinuierlich bis ins alkalische Gebiet, ohne dass diese Salze sich aus der wässrigen Lösung ausscheiden. Weitere Zugabe von wässrigem Erdalkali verändert das  $p_H$  bis etwa 5,3, dann beginnt das neutrale Erdalkalisalz der Adenylsäure auszufallen. Erhitzt man nun die wasserlöslichen Salze der Erdalkalien innerhalb des Bereichs von  $p_H$  4,6—5,3 oder die Salze der Alkalien bei einem  $p_H$  von 4,6—6,7 in ihrer wässrigen Lösung längere Zeit, dann verläuft die Hydrolyse glatt und vollständig zu Adenosin. Als das günstigste Gebiet für alle Salze wurde  $p_H = 5,0—5,5$  gefunden, was einem Gemisch von saurem und neutralem Salz entspricht. Als günstigstes Salz hat sich das Bariumsalz gezeigt, weil das ausfallende Bariumphosphat das Gleichgewicht vollständig zugunsten des Adenosins verschiebt und weil es gegenüber dem Calciumsalz bei grösseren Konzentrationen zu arbeiten gestattet. Man fährt dabei etwas besser mit Kochen am Rückfluss als Erhitzen im Rohr auf 140°, weil bei letzterer Temperatur bereits ein Teil des Zuckers abgespalten wird. Das saure Bariumsalz wird direkt aus Adenylsäure durch Zugabe von Bariumhydroxyd in wässriger Lösung bereitet und 17 Stunden am Rückfluss gekocht. Dem ausgeschiedenen Bariumphosphat entsprechend ist die Spaltung nach dieser Zeit zu 85 % verlaufen. Nach der Bariumionen-Entfernung kann aus der eventuell noch zu konzentrierenden

<sup>1)</sup> B. 42, 2703 (1909).

<sup>2)</sup> B. 42, 335 (1909).

<sup>3)</sup> Z. physiol. Ch. 107, 157 (1919).

Lösung direkt Adenosin rein erhalten werden. Die Adenosinabscheidung kann natürlich auch über das Pikrat erfolgen. Man kann daraus das Adenosinpikrat bzw. Adenosin mit 70% bzw. 57% Ausbeute gewinnen. Unter gleichen Bedingungen liefert das saure Natriumsalz in 15 Stunden etwa 75% der theoretischen Pikrat- ausbeute. Bei einem längeren Erhitzen des sauren Natriumsalzes über 82 Stunden steigt die Ausbeute an Pikrat auf 90%, das Calciumsalz gibt nach 31 Stunden eine 80-proz. Pikratausbeute.

Da das neutrale Natriumsalz der Adenylsäure ebenfalls gut wasserlöslich ist, wurde dieses der gleichen Operation unterworfen. Es zersetzt sich jedoch wesentlich schneller als das saure Natriumsalz und liefert entsprechend unreine Pikrate mit 66% Ausbeute und daraus Adenosin nur mit 17% Ausbeute.

### Experimenteller Teil.

#### Die Bestimmung der freien Phosphorsäure.

Die Bestimmung des Verlaufes der Nucleotidspaltung verlangt eine Bestimmung der freien Phosphorsäure. Die freie Phosphorsäure wurde für die beschriebenen Versuche als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt und als Magnesiumpyrophosphat mikroanalytisch bestimmt. Als Vergleichsmethode werden dabei genügend genaue Resultate erzielt.

#### Darstellung von Harnphosphatase.

Toluoldesinfizierter Männerharn wird mit Magnesiamixtur von freier Phosphorsäure befreit, filtriert, mit Salzsäure neutralisiert und durch Eindampfen im Vakuum konzentriert. Man dialysiert dann in Cellophanschläuchen gegen Brunnenwasser, konzentriert auf etwa  $\frac{1}{6}$  des ursprünglichen Volumens und dialysiert gegen destilliertes Wasser bis zur negativen Reaktion auf Chlorionen. Dann konzentriert man noch weiter und zentrifugiert. Eine solche Lösung kann mit Toluol bedeckt längere Zeit im Eisschrank aufbewahrt werden, ohne an Aktivität stark einzubüßen.

#### Darstellung von Kartoffelphosphatase.

30 kg neue Kartoffeln werden in einer Kartoffelschälmaschine geschält und sofort durch eine Fleischhackmaschine getrieben. Die fein zerkleinerten Kartoffeln kommen samt dem Saft in Baumwolltüchern unter eine Handpresse und werden mehrere Stunden lang ausgepresst, bis die Ware einen faserigen, trockenen Kuchen bildet. Man erhält auf diese Art etwa 17 Liter rohen Presssaft. Jetzt versetzt man 4 Liter Presssaft mit 2 Liter Alkohol unter mechanischem Rühren und zentrifugiert nach 20 Minuten. Hat man zweimal je 4 Liter auf diese Weise vorgefällt, so beginnt man mit der ersten Hauptfällung. Dafür werden 3 Liter zentrifugierter, vorgefallter Presssaft

mit 3 Liter Alkohol gefällt. Nach 20 Minuten zentrifugiert man diese Fällung in einer Ultrazentrifuge oder *De Laval*-Zentrifuge. Führt man gleichzeitig mit Vorfällung und Hauptfällung nebeneinander fort, so ist bei einer stündlichen Leistung der Ultrazentrifuge von 10 bis 15 Litern der Prozess in etwa 7 Stunden zu bewältigen. Die Hauptfällungen wurden gesammelt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 35 g.

Ein solches Präparat ist kaum mehr in Wasser löslich, und das aktive Prinzip kann aus einem wässrigen Filtrat nicht mehr mit Alkohol ausgefällt werden. Man verwendet deshalb das Präparat bei den Fermentspaltungen in Suspension.

#### Darstellung von Adenosinpikrat aus Hefenucleinsäure mittels Kartoffelphosphatase.

200 g Hefenucleinsäure in 400 cm<sup>3</sup> Wasser werden mit 2-n. Natronlauge gelöst und neutralisiert, mit 25,8 g Natronlauge (90-proz.) in 45 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach dem Filtrieren wird mit 49 cm<sup>3</sup> Eisessig (gelöst mit 1000 cm<sup>3</sup> Wasser) angesäuert und eine Suspension von 20 g Kartoffelferment mit 1000 cm<sup>3</sup> Wasser, die einige Zeit lang gerührt worden war, zugesetzt. Unter häufigem Umschütteln bleibt dieser Ansatz unter Zusatz einiger Tropfen Toluol so lange im Thermostaten bei 37°, bis die Phosphorsäure zu 80% in Freiheit gesetzt worden ist. Die gallertige Lösung wird über Nacht in den Eisschrank gebracht und dann vom ausgeschiedenen Guanosin abzentrifugiert. Der Rückstand vom Zentrifugieren wird dann auf Nutschen trocken gesaugt und mit Eiswasser nachgewaschen. Zentrifugat und Filtrat werden vereinigt und rasch aufgekocht. Nach dem Abkühlen wird vom ausgeschiedenen Eiweiss filtriert und warm mit 130 g Pikrinsäure unter mechanischem Rühren versetzt. Nach einigem Stehen in der Kälte kann das ausgeschiedene Adenosin-pikrat abgesaugt werden. Die Ausbeute beträgt 91 g Rohpikrat.

Das Guanosin kann aus dem Roh-Guanosin vom beigemengten Ferment durch Umlösen aus Wasser befreit und gereinigt werden.

#### Adenosinpikrat aus Adenylsäure mittels Kartoffelphosphatase.

5 g Adenylsäure in 10 cm<sup>3</sup> Wasser werden mit 2-n. Natronlauge neutralisiert und gelöst. Eine Suspension von 0,5 g Kartoffelferment mit 25 cm<sup>3</sup> Wasser wird zugegeben und mit Acetatpuffer auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, so dass das p<sub>H</sub> der Lösung 5,0 beträgt. Unter Toluol lässt man 67 Stunden lang im Thermostaten bei 37°. Dann wird mit wenig Kohle filtriert, auf 60° aufgewärmt und 3,3 g Pikrinsäure zugegeben. Das ausgefallene Adenosinpikrat wird nach Stehen in der Kälte abgesaugt und ohne zu trocknen zerlegt: 1,46 g Adenosin.

### Adenosinpikrat-Zerlegung mittels Diäthylamin.

10 g Adenosinpikrat werden in 35 cm<sup>3</sup> warmem Wasser suspendiert und mit etwa 2 cm<sup>3</sup> Diäthylamin versetzt bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion gegen Lackmus. Danach ist alles in Lösung gegangen. Man lässt erkalten und extrahiert dann etwa 20 Stunden mit Äther im *Kutscher-Steudel*-Apparat. Dabei wird in gewissen Fällen Ammoniumpikrat aus der wässrigen Lösung ausgeschieden, mit dem Äther abtransportiert und bleibt ungelöst in der Vorlage. Nach Beendigung der Extraktion wird das Ammoniumpikrat von der Ätherlösung abgesaugt, das Filtrat eingedampft: Es krystallisiert Diäthylaminpikrat aus (roh 6 g). Dieses kann aus viel Benzol umkrystallisiert werden, zeigt den Schmelzpunkt von 69° und ist im Mischschmelzpunkt mit synthetischem Diäthylaminpikrat vom gleichen Schmelzpunkt identisch. Das Ammoniumpikrat wurde durch Analyse nachgewiesen. Löslichkeitsverhältnisse und Krystallform waren die gleichen wie bei synthetischem Ammoniumpikrat. Der extrahierte wässrige Teil wird im Eisschrank ausgefroren und liefert sofort reines Adenosin. Die Ausbeuten hängen vom Reinheitsgrad des Pikrates ab.

### Neutrale Hydrolyse von Adenylsäure.

1 g Adenylsäure wird mit 2-n. Natriumhydroxyd neutralisiert und gelöst. Man verdünnt mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> und kocht 82 Stunden am Rückfluss, nach welcher Zeit die Phosphorsäureabspaltung vollständig ist. Die Lösung war dunkel verfärbt. Man versetzt dann mit 1 g Pikrinsäure und erhält 0,75 g Adenosinpikrat.

### Saure Hydrolyse von Adenylsäure.

#### a) Natriumsalz.

1 g Adenylsäure wird mit 1 Mol Natronlauge in wässrige Lösung gebracht: Volumen 50 cm<sup>3</sup>. Nach 30 Stunden Kochen am Rückfluss war die Phosphorsäureabspaltung vollständig. Dann wurde abgebrochen, mit etwa 1 g Pikrinsäure versetzt und 1,02 g Adenosinpikrat erhalten.

Wird nur 16 Stunden am Rückfluss erhitzt, so erhält man 0,85 g Adenosinpikrat. Die Lösung hatte sich fast gar nicht zersetzt.

#### b) Calciumsalz.

1 g Adenylsäure wird mit 115 cm<sup>3</sup> gesättigter, klarer Lösung von Calciumhydroxyd versetzt und 31 Stunden am Rückfluss gekocht. Danach wird vom ausgeschiedenen Calciumphosphat filtriert, die Calciumionen werden mit Oxalsäure ausgefällt, es wird wieder filtriert und aus dem Filtrat mit 1 g Pikrinsäure 1,1 g Adenosinpikrat = 80 % der Theorie erhalten.



c) Bariumsalz.

5 g Adenylsäure werden so lange mit einer kalt gesättigten Bariumhydroxydlösung versetzt, bis nach anfänglicher Lösung eine Trübung entsteht, die nicht mehr verschwindet, was etwa 0,66 Mol Bariumhydroxyd und einem  $p_H$  von 5,3 entspricht. Man kocht dann 17 Stunden lang am Rückfluss, filtriert vom ausgeschiedenen Bariumphosphat und fällt die überschüssigen Bariumionen mit Schwefelsäure aus. Die Lösung wird etwas erwärmt und so lange mit einer kochenden, gesättigten Pikrinsäurelösung versetzt, bis schwache Reaktion auf Kongo eintritt. Dann lässt man einige Zeit im Eisschrank stehen und saugt ab: 5,0 g Adenosin pikrat vom Smp. 183—184°, d. h. 70 % der Theorie. Daraus wurden 2,2 g Adenosin vom Smp. 220—227° erhalten, d. h. 81 % Ausbeute in bezug auf Pikrat und 57 % in bezug auf Adenylsäure.

Die Isolierung des Adenosins über das Pikrat ist nicht notwendig; man kann nach Konzentrieren im Vakuum der von Bariumionen befreiten Lösung das Adenosin direkt ausfrieren und einmal aus Wasser umkrystallisieren. Man erhält so reines Adenosin vom Smp. 233° C korr. in gleicher Ausbeute wie über das Pikrat.

Die Analysen wurden von Dr. H. Gysel ausgeführt.

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba.

---

177. Alexandre Stanislas Pfau

(1889—1938)

(26. X. 38.)

La nouvelle de la mort prématurée d'*Alexandre Stanislas Pfau*, survenue le 14 août dernier, à Vernier, près de Genève, a été une douloureuse surprise pour ceux qui l'approchaient et pour tous les chimistes qui ont pu pleinement ressentir l'irréparable perte que viennent de faire et l'industrie des matières premières de la parfumerie, et la Société suisse de chimie, dont les travaux du disparu ont servi le développement et l'éclat.

---

Pfau est né le 27 décembre 1889 à Cracovie. Après avoir terminé ses études secondaires au Gymnase de sa ville natale, il suivit, de 1907 à 1914, l'enseignement des maîtres de l'Université de Berlin, parmi lesquels on note *Diels, E. Fischer, Gabriel, Hahn, van't Hoff, Houben, Marckwald, L. Meyer, Nernst, Pschorr, Stock*. C'est dans le laboratoire du Prof. *J. Houben*, qu'entre 1911 et 1914, il reçut l'initiation à la recherche chimique.

La guerre vint. Pfau la fit vaillamment, et la termina sur de très beaux états de service. Il reprit ses études aussitôt libéré, il passa