

Über Karnin und Inosinsäure

(II. Mitteilung)

von

F. Haiser und F. Wenzel.

Aus dem Privatlaboratorium Scheibbs und dem I. chemischen Laboratorium der
k. k. Universität in Wien.

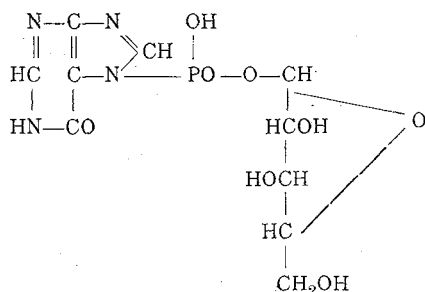
(Vorgelegt in der Sitzung am 10. Dezember 1908.)

Bevor wir unsere in der ersten Mitteilung dargelegten Untersuchungen über das Karnin begannen, hatten wir uns mehrere Sommer mit dem Studium der Inosinsäure beschäftigt. Wir haben zahlreiche Beobachtungen gemacht, die uns zur Überzeugung brachten, daß die Ermittlung der Konstitution der Inosinsäure mit außergewöhnlich großen Schwierigkeiten verknüpft ist und, wenn überhaupt, nur mit großen Materialmengen durchgeführt werden kann. Wir haben damals, es war vor zirka drei Jahren, die zahlreichen verschiedenartigen Beobachtungen nicht publiziert, weil es unserer Gepflogenheit nicht entspricht, eine Auswahl weniger Tatsachen mit entsprechender Theorie und schwach fundierten Schlußfolgerungen möglichst häufig der Mitwelt vorzulegen. Andererseits schien uns aber auch die Mitteilung unseres gesamten experimentellen Materials kaum im Interesse der Wissenschaft gelegen, da in demselben so manche sich scheinbar widersprechende Beobachtungen enthalten waren, die bei wiederholtem Studium derselben wohl ihre Erklärung finden mußten, wodurch die Ermöglichung einer kürzeren, klareren und zuverlässigeren Darstellung der gewonnenen Resultate zu gewärtigen war.

Nun sind aber in der letzten Zeit vier Arbeiten über die Inosinsäure erschienen, in welchen wir manche von unseren Beobachtungen bestätigt finden. So sehr uns dies natürlich freuen kann, bringt es doch für uns den Verlust der Priorität

der Publikation mit sich und wir sehen uns daher veranlaßt, entgegen unseren Absichten und unserer Überzeugung nunmehr, bevor wir noch die Zusammensetzung des Inosins mit der von uns gewünschten Sicherheit feststellen konnten, unsere Anschauungen über die Inosinsäure, welche von den bisher von anderer Seite publizierten in wesentlichen Punkten abweichen, darzulegen und mit dem uns aus früherer Zeit zur Verfügung stehenden experimentellen Material zu belegen. Vorerst aber sei uns eine kurze Besprechung der erwähnten vier Arbeiten gestattet.

Als erste erschien die Abhandlung von C. Neuberg und B. Brahn;¹ durch dieselbe scheint für denjenigen, welcher sich mit diesem Gebiet experimentell nicht beschäftigt hat, die Frage nach der Konstitution der Inosinsäure so ziemlich erledigt zu sein. Die beiden Forscher haben die optische Aktivität der Inosinsäure bestimmt und das Spaltprodukt der Inosinsäure, für welches Hauser² einen »Zusammenhang mit den Isomeren der Trioxyvaleriansäure« wahrscheinlich hält, durch Darstellung des Phenylosazons als Pentose erkannt. Es war ihnen möglich, die Menge der in der Inosinsäure enthaltenen Pentose durch Destillation von inosinsaurem Baryt mit Salzsäure und durch Überführung des entstandenen Furfurols in das Phloroglucid quantitativ zu bestimmen und so nachzuweisen, daß aus einem Molekül inosinsaurem Baryt ein Molekül Pentose abgespalten werden kann. Sie halten diese mit Rücksicht auf die Drehung des Phenylosazons, welches sie in guter Ausbeute erhielten, für *l*-Xylose und stellen für die Inosinsäure die Formel:



¹ Biochemische Zeitschrift, V, 438.

² Monatshefte für Chemie, XVI, 204.

auf, wobei sie bloß die Wahl der Hydroxylgruppe, an welcher die Anhydridbildung zwischen Phosphorsäure und *l*-Xylose vor sich gegangen ist, für unsicher halten.

Fast zu gleicher Zeit wurde von Friedrich Bauer¹ eine Arbeit veröffentlicht, welche im Hofmeister'schen Laboratorium entstanden ist und das Problem in ganz ähnlicher Weise behandelt. Bauer führt den Tatsachen entsprechend aus, daß der eine von uns in der vorstehend zitierten Arbeit an dem damals als Trioxyvaleriansäure benannten Spaltprodukt der Inosinsäure die Pentosenreaktionen, Furfurolbildung und Reduktionsvermögen konstatierte — Neuberg und Brahn machen hiervon in ihrer Abhandlung keine Erwähnung — und sagt, daß diese Angaben ihn darauf gewiesen haben, daß eine Pentose vorliege. Er stellte sich daher die Aufgabe, die Natur dieser Pentose aufzuklären. Nach 24stündigem Sieden einer Lösung von freier Inosinsäure war das Hypoxanthin und die Phosphorsäure vollständig abgespalten und bei darauffolgender Destillation mit Salzsäure hat auch er eine Furfurolmenge erhalten, die einem Molekül Pentose entspricht. Aus einer in gleicher Weise hydrolysierten Inosinsäurelösung, die er optisch inaktiv fand, scheint er nur sehr wenig Phenylsazon gewonnen zu haben, da er für die Bestimmung des Drehungsvermögens desselben nur 0·05 g Substanz anwenden konnte. Aus seinen Versuchen kommt er zu dem Schlusse, daß *d-l*-Arabinose vorliegt und daß der Inosinsäure die Formel



zukommt.

P. A. Levene und W. A. Jacobs² bringen einige experimentelle Angaben über die Hydrolyse der Inosinsäure in saurer und in alkalischer Lösung. Dieselben zeichnen sich durch eine objektive Auffassung der Versuchsergebnisse aus und decken sich vollständig mit einem Teile unserer Beobachtungen. Sie erhielten aus der Inosinsäure eine Pentosephosphorsäure, deren Drehung sie bestimmten, konnten kein Phenylsazon darstellen,

¹ Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., X, 345.

² Ber. der Deutschen chem. Ges., XXXXI, 2703.

welches die Eigenschaften eines Xylosazons oder eines Arabinosazons hätte, und fanden bei der quantitativen Pentosenbestimmung nur ein Drittel der in den beiden vorstehend angeführten Arbeiten angegebenen relativen Mengen.

In einer jüngst erschienenen Mitteilung endlich weisen C. Neuberg und B. Brahn¹ die Berechtigung der Annahme Bauer's bezüglich des Vorhandenseins von *d-l*-Arabinose im Molekül der Inosinsäure aus experimentellen und theoretischen Gründen zurück und unterziehen die Resultate von Levene und Jacobs, die mit ihren »Erfahrungen in vielfachem Gegensatz stehen«, einer Kritik, der wir allerdings nicht beistimmen können.

Die Erscheinung, daß die Ergebnisse, zu welchen die Untersuchung der Inosinsäure in drei namhaften Laboratorien führte, nachdem die wichtigsten Tatsachen bereits von Haiser festgelegt waren, so sehr voneinander abweichen, beweist aufs neue, wie schwierig sich die Forschungen schon bei relativ einfachen Spaltprodukten der Nucleine gestalten.

Bei unseren eingangs erwähnten Untersuchungen über die Inosinsäure hatten wir beobachtet, daß durch Erhitzen derselben mit verschiedenen Basen auf höhere Temperatur neben Phosphorsäure und braunen, sirupösen Zersetzungsprodukten, vermischt mit Hypoxanthin, kleine Mengen eines Produktes erhalten werden, welches sich in der Art der Krystallisation und in den sonstigen Eigenschaften wie das Karnin verhält. Wir haben uns daher zunächst diesem zugewendet mit der Absicht, erst nach Aufklärung dieses Stoffes, welcher uns für die erfolgreiche Bearbeitung der Inosinsäure sehr wertvolle Anhaltspunkte zu liefern versprach, wieder auf die Inosinsäure selbst zurückzukommen. Die bei der Spaltung der Inosinsäure gewonnenen Mengen jenes Produktes, welches uns an Karnin erinnerte, reichten jedoch bei der geringen Charakteristik desselben nicht einmal aus, eine Identifizierung mit aller Sicherheit durchzuführen, um so weniger konnten wir daran denken, auf diesem Wege die zur Ermittlung der Zusammensetzung desselben erforderlichen Materialmengen herstellen zu

¹ Ber. der Deutschen chem. Ges., XXXXI, 3376.

können. Es war uns daher sehr willkommen, daß es uns möglich war, eine Methode auszuarbeiten, nach der es gelingt, das Karnin aus Fleischextrakt zuverlässig darstellen zu können. Mit Hilfe derselben gelangten wir in den Besitz von mehreren Grammen Karnin, unterwarfen dasselbe einem eingehenden Studium und haben es als ein äquimolekulares Gemenge von Hypoxanthin und einem Hypoxanthinpentosid erkannt, welches letzterem wir mit Rücksicht auf seine mögliche Entstehung bei der Spaltung der Inosinsäure den Namen Inosin beigelegt haben. Wir glaubten uns hierzu um so mehr berechtigt, als wir, wie in der ersten Mitteilung ausgeführt, aus beiden Stoffen, wenn auch in sehr verschiedener Ausbeute, ein Osazon vom Schmelzpunkte 163° gewonnen hatten. Wir konnten allerdings reines

Inosin als Spaltprodukt der Inosinsäure

bisher nicht erhalten, doch ist dies vielleicht den beiden amerikanischen Forschern Levene und Jacobs gelungen, welche bei 14stündigem Erhitzen von Inosinsäure mit 5prozentiger Kalilauge auf 130 bis 140° eine Lösung bekamen, die freie Phosphorsäure enthielt, Fehling'sche Lösung nicht reduzierte und mit ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag gab. Dieser letztere Umstand ist nämlich nur dann möglich, wenn bei der eingetretenen Spaltung kein Hypoxanthin entstanden ist, da dieses mit ammoniakalischer Silberlösung eine Fällung gibt, während die Silbersalze der Inosinsäure und des Inosins in Ammoniak vollständig und leicht löslich sind. Levene und Jacobs ziehen aus ihrer Beobachtung auch selbst den Schluß, daß »die Lösung keine freie Base und kein freies Kohlehydrat enthält und daß es so gelingt, einen Komplex zu erhalten, welcher scheinbar aus Kohlehydrat und Hypoxanthin besteht«. Der Einwand hiergegen von Neuberg und Brahn, daß Umwandlungen, die »bei 14stündigem Erhitzen mit Ätzkali auf 140° zustande kommen, bei kohlehydrathaltigen Substanzen keinen Rückschluß erlauben«, scheint uns im vorliegenden Falle nicht unbedingt gerechtfertigt zu sein, da die Pentose in glukosidartiger Bindung mit geschützter Aldehydgruppe vorhanden ist, da ferner sowohl die Inosinsäure als

auch das Inosin das Kochen mit Alkali ohne weiteres aus-
halten.

Die Alkalibeständigkeit der Inosinsäure ergibt sich auch
aus den folgenden, von uns seinerzeit ausgeführten Versuchen:

Da wir das basische Bariumsalz der Inosinsäure für
völlig unlöslich hielten; haben wir mit Rücksicht auf die
Schwerlöslichkeit von Lithiumphosphat die Abspaltbarkeit der
Phosphorsäure aus der Inosinsäure mit Hilfe von Lithium-
hydroxyd untersucht. Nach 24stündigem Kochen einer wässe-
rigen Lösung des Lithiumsalzes derselben mit einem Molekül
Lithiumhydroxyd war jedoch eine Ausscheidung von Lithium-
phosphat kaum bemerkbar. Auch eine Lösung des Cäsium-
salzes war nach mehrstündigem Kochen völlig farblos geblieben
und konnte nach dem Ausfällen mit Bleiessig, Zerlegen mit
Schwefelwasserstoff und Kochen mit Bariumcarbonat nur
inosinsaurer Baryt wiedergewonnen werden.

Wir griffen dann doch wieder auf das inosinsaure Barium
zurück und erhitzten eine wässrige Lösung, welche auf ein
Molekül inosinsauren Baryts ein halbes Molekül Barium-
hydroxyd enthielt, in Einschlußröhren während je 3 Stunden
zunächst auf 120°, dann auf 140°, 160° und 180°. Bei diesen
Temperaturen trat wohl keine Abscheidung von Phosphor-
säure ein, doch konnten wir beobachten, daß das durch
Zugabe des Bariumhydroxydes entstandene basische Barium-
salz der Inosinsäure in Wasser nicht ganz unlöslich ist, sondern
sich bei den angewendeten hohen Temperaturen teilweise löst,
so daß es nach dem Erkalten der Röhren in Form kleiner
Drusen ausgeschieden war. Die Lösungen aber waren stets
farblos geblieben; erst bei Erhitzen auf 200° wurde die Flüssig-
keit braun, es war der gesamte Phosphor als phosphorsaurer
Baryt abgeschieden, das Filtrat war barytfrei und reagierte
stark alkalisch. Der Verdampfungsrückstand war sirupös und
seine weitere Aufarbeitung führte zu keinen sicheren Resul-
taten. Auch bei Anwendung von einem Molekül Barythydrat
und mehr auf ein Molekül inosinsauren Baryts gelingt die
Abspaltung keineswegs früher und waren im übrigen die
Ergebnisse die gleichen.

Drehungsvermögen der Inosinpentose.

Um die Konfiguration der Pentose des Inosins, welche wir als farblosen Sirup erhielten, der bisher nach zweijährigem Aufbewahren im Vakuum und wiederholter Behandlung kleiner Mengen desselben mit Wasser und mit Alkohol nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte, festzustellen, haben wir zunächst versucht, diese durch Anregung mit Hilfe kleiner Kryställchen verschiedener, uns von Herrn Geheimrat Prof. Dr. E. Fischer freundlichst zur Verfügung gestellter Pentosen zu erzielen. Da dies jedoch keinen Erfolg hatte, entschlossen wir uns, das Drehungsvermögen des im Vakuum zur Gewichtskonstanz gebrachten Sirups zu bestimmen.

- I. 0·7530 g Substanz, in Wasser zu 15 cm^3 gelöst, gaben im 22 cm -Rohr eine Drehung von $-2^{\circ} 12'$ bei $17^{\circ} C$.
- II. 0·7260 g Substanz einer anderen Darstellung gaben, in Wasser zu 5 cm^3 gelöst, in einem 5 cm -Rohr bei 17° eine Drehung von $-1^{\circ} 25'$.

Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D^{17}$$

I.	$-19\cdot9^{\circ}$
II.	$-19\cdot3^{\circ}$

Dieses Ergebnis im Zusammenhalte mit der von Neuberger und Brahn¹ ausgeführten Bestimmung der Drehung des Phenylsazons der Inosinsäurepentose, aus welcher sie auf die Anwesenheit von *l*-Xylose schlossen, läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß, falls im Inosin und in der Inosinsäure dieselbe Pentose enthalten ist, diese die *d*-Lyxose ist, welche ja dasselbe Osazon liefert wie die *l*-Xylose, wobei allerdings einzuwenden ist, daß O. Ruff und G. Ollendorf² für die *d*-Lyxose in reinster, krystallisierbarer Form eine spezifische Drehung $[\alpha] = -13\cdot9^{\circ}$ gefunden haben. Wir können daher

¹ Biochemische Zeitschrift, V, 449.

² Ber. der Deutschen chem. Ges., XXXIII, 1801.

mit Rücksicht auf die beträchtliche Differenz im Drehungsvermögen die Identität der Inosinpentose noch keineswegs mit Sicherheit festgestellt betrachten und werden uns auch weiterhin bemühen, die Inosinpentose womöglich in krystallisierter Form zu erlangen, um unsere Resultate zu kontrollieren, zumal auch der Versuch einer Überführung der sirupösen Pentose in eine krystallisierte Trioxyglutarsäure nicht den gewünschten Erfolg hatte.

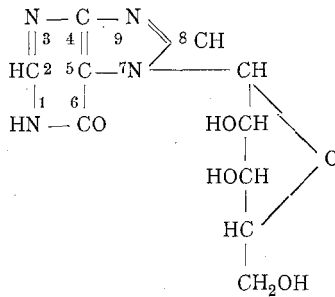
0.5 g Pentose, aus reinstem Inosin als farbloser Sirup erhalten, wurden entsprechend den Angaben von E. Fischer¹ mit Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1.2 während 8 Stunden auf 40° erwärmt. Die Salpetersäure wurde hierauf rasch in einer Platinschale verdampft und der restierende Sirup in Wasser gelöst. Nach dem Aufkochen mit Calciumcarbonat und Abkühlen erfolgte keine Abscheidung eines schwer löslichen Kalksalzes, wie es hätte eintreten sollen, da sowohl das Kalksalz der Trioxyglutarsäure aus *l*-Xylose wie auch dasjenige aus *d*-Lyxose schwer löslich ist. Nach dem Konzentrieren der Lösung hinterblieb ein Sirup, der auch nach Wochen nicht krystallisierte. Als hierauf das Calcium nach dem Lösen des Kalksalzes in Wasser durch Oxalsäure eben entfernt wurde, erhielten wir auch die freie Säure als Sirup, der auch jetzt nach Monaten noch keine Neigung zur Krystallisation zeigt.

Auch den aus 1 g inosinsaurem Baryt durch Kochen mit Schwefelsäure, Ausfällen der letzteren und der etwa abgespaltenen Phosphorsäure mit Baryt und Bariumcarbonat und nach Abscheidung des Hypoxanthins erhaltenen Sirup hatten wir in der gleichen Weise oxydiert. Es zeigte sich, daß nach dem Behandeln mit verdünnter Salpetersäure noch große Mengen von Phosphor in organischer Bindung vorhanden waren, welche erst beim Kochen mit rauchender Salpetersäure nachweisbar wurden. Ein schwer lösliches Kalksalz konnte auch hier nicht zur Abscheidung gebracht werden, so daß auch auf diesem Wege Anhaltspunkte für die Bestimmung der Konfiguration der Pentose der Inosinsäure, respektive für das Vorhandensein von *l*-Xylose oder *d*-Lyxose nicht gewonnen werden konnten.

¹ Ber. der Deutschen chem. Ges., XXIV, 1842.

Im übrigen könnte das Auftreten von *d*-Lyxose in Produkten, die dem tierischen Organismus entstammen, bei ihrer nahen Beziehung zur Galaktose keineswegs auffallend erscheinen, es wäre vielmehr möglich, daß es auch in anderen Fällen, in denen *l*-Xylose konstatiert wurde, sich um *d*-Lyxose handeln könnte.

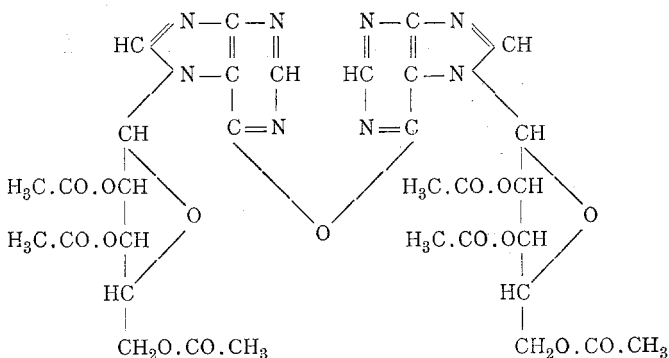
Unter der Voraussetzung, daß tatsächlich im Inosin das Molekül der *d*-Lyxose enthalten ist, sind wir in der Lage, für dasselbe die Strukturformel



aufzustellen. Es erscheint dies dadurch begründet, daß einerseits das Inosin keine Reduktionswirkung zeigt, die Pentose also in der Aldehydgruppe substituiert ist und daß andererseits im Hypoxanthin aller Wahrscheinlichkeit nach die Stelle 7 besetzt ist. Auf eine Bindung zwischen einem Kohlenstoffatom der Pentose und einem Stickstoffatom des Hypoxanthins weist die leichte Zersetzbarkeit durch Säuren und die große Beständigkeit gegen Basen hin. Es kommen daher die Stellen 1 und 7 in Betracht, da nur an diesen vertretbare Wasserstoffatome an Stickstoff sich befinden. Nun liefert aber das Inosin ein in der ersten Mitteilung genau beschriebenes Acetylprodukt, welches drei Acetylreste an Sauerstoff gebunden enthält, wie aus der leichten Verseifbarkeit durch Basen sowie auch aus dem Umstande hervorgeht, daß das Hypoxanthin unter gleichen Verhältnissen nicht acetyliert wird, und welches weiterhin in Form eines durch Wasseraustritt zwischen zwei Molekülen entstandenen Anhydrides erhalten wurde, was die Anwesenheit eines vierten Hydroxyls voraussetzt. Dieses aber kann nur durch Wanderung des Wasserstoffatoms von 1 an das Sauerstoffatom in 6 entstehen, so daß für die Verknüpfung des Hypoxanthins mit der Pentose nur die Stelle 7 freibleibt.

Entsprechend den vorstehenden Ausführungen und unter den bezüglich der Konfiguration der Pentose gemachten Voraussetzungen ergibt sich die Struktur unseres

Acetylinosin.



Auch die Reaktion von Burian¹ konnte als weiterer Beweis dafür herangezogen werden, daß im Inosinmolekül der Wasserstoff von Stelle 7 des Hypoxanthins substituiert ist. Falls man mit eisgekühlten Lösungen arbeitet, gibt nämlich Karnin und Hypoxanthin mit Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart von Alkali sofort eine kräftige Gelbfärbung, welche bald in Rot übergeht, während eine Lösung von Inosin vollkommen farblos bleibt.

Die Spaltung der Inosinsäure durch Säuren.

Beim Kochen mit verdünnten Säuren spaltet die Inosinsäure leicht die Xanthinbase ab und liefert hierbei einen Komplex, der aus Phosphorsäure und einer Pentose durch Wasserabtritt entstanden gedacht werden kann. Das Bariumsalz dieser Glykophosphorsäure hat bereits Haizer² in Händen gehabt und analysiert, Levene und Jacobs³ erhielten es

¹ Ber. der Deutschen chem. Ges., XXXVII, 697.

² Monatshefte für Chemie, XVI, 203.

³ Ber. der Deutschen chem. Ges., XXXXI, 2706.

nunmehr in wohl ausgebildeten Krystallen und haben es genauer untersucht. Haiser hat diese Säure als Trioxyvalerianphosphorsäure angesprochen unter Betonung, daß die Richtigkeit dieser Bezeichnung keineswegs sichergestellt ist. Daß jedoch das Verhalten der vorliegenden Säure leicht zu einer derartigen Annahme führen konnte, beweist der Umstand, daß auch jetzt noch, nachdem durch Neuberg und Brahn wie auch durch Bauer die Anwesenheit von Pentose quantitativ festgestellt erscheint, Levene und Jacobs geneigt wären, eher eine Tetrosecarbonsäure im Molekül anzunehmen als eine Pentose; sie führen auch bei der Berechnung ihrer Analysen die einem tetrosecarbonphosphorsäuren Baryt entsprechenden Zahlen an. Die Pentosephosphorsäure reduziert kräftig Fehling'sche Lösung, wie Haiser gefunden und Levene und Jacobs bestätigen. Nach Neuberg und Brahn tritt nach der Hydrolyse der Inosinsäure »zu einer Zeit, wo alles Hypoxanthin bereits abgespalten ist, noch nicht die ganze Menge der Pentose in freier reduzierender Form auf«, womit sie wohl sagen wollen, daß nach ihrer Anschauung die Pentosephosphorsäure nicht reduziert. Wenn wir auch diese Auffassung ihrer Beobachtung nicht teilen, so müssen wir doch anführen, daß auch wir nach dem Kochen der Inosinsäure mit Schwefelsäure und Entfernung von Schwefelsäure und Hypoxanthin zuweilen Lösungen erhielten, die nur geringes Reduktionsvermögen zeigten. Dieses konnte aber auch durch weiteres Kochen mit Schwefelsäure nicht erhöht werden. Es scheint somit von der mehr oder weniger intensiven Behandlung der Inosinsäure abzuhängen, ob die Reduktionswirkung kräftig auftritt oder nicht. Jedenfalls aber haben wir und auch Levene und Jacobs an analysenreinem Bariumsalz der Pentosephosphorsäure Reduktionswirkung konstatiert.

Versuche zur Isolierung der Pentose der Inosinsäure sind bisher von keiner Seite mitgeteilt. Wir haben das seinerzeit von Haiser erwähnte Bariumsalz derselben $(C_5H_9O_5)_2Ba$ wiederholt dargestellt und versucht, die in demselben enthaltene organische Substanz näher zu charakterisieren. Dieselbe resultierte, da wir das Bariumsalz stets nur in sehr kleinen Mengen erhalten konnten, nach dem vorsichtigen Aus-

fällen des Baryts als eine winzige Menge eines zähen, gelbbraunen Sirups, der allen Versuchen, ihn in brauchbare Form zu bringen, widerstand. Diese Sirupe führten uns namentlich im Hinblick auf die Erscheinung, daß sie einen intensiven Geruch nach arabischem Gummi zeigten — an der Inosin-pentose konnte diese Wahrnehmung niemals gemacht werden —, dazu, die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß in der Inosinsäure vielleicht eine Polyose enthalten ist, die aus zwei oder mehreren Pentosemolekülen besteht, und daß diese die schlechten Ausbeuten an Osazon und die unentwirrbaren Sirupe bedingt. Wir wollen daher im nächsten Sommer wieder auf unsere zahlreichen Versuche aus früheren Jahren zurückgreifen, welche den Zweck hatten, das Molekulargewicht der Inosinsäure festzustellen. In Anbetracht der ungünstigen Löslichkeitsverhältnisse der freien Inosinsäure hatten wir uns bemüht, durch Einführung verschiedener Alkohol- und Säurereste zu krystallisierten Derivaten von geeigneter Löslichkeit zu gelangen, doch führten alle diese Versuche stets nur zu sirupösen Produkten, deren Reinigung untunlich war.

Aus der großen Zahl der Versuche, zum Molekulargewichte der Inosinsäure zu gelangen, wollen wir nur einen hier anführen, obwohl auch dieser zu keinem positiven Resultat führte. Es hatte sich gezeigt, daß die Inosinsäure sich in absoluter Ameisensäure leicht löst und wir wollten dieses Lösungsmittel trotz der voraussichtlich beträchtlichen Dissoziationswirkung zur Molekulargewichtsbestimmung durch Gefrierpunktserniedrigung benutzen. Für diesen Zweck haben wir die Inosinsäure, welche beim Konzentrieren der wässrigen Lösung bei Zimmertemperatur als farbloser Sirup erhalten wird und über Schwefelsäure zu einer harten, glasigen Masse eintrocknet, dadurch in eine wägbare Form gebracht, daß wir ihre ziemlich konzentrierte wässrige Lösung im Exsikkator über Schwefelsäure dem Vakuum einer Ölpumpe aussetzten. Hierbei erstarrte die ganze Masse alsbald, das Eis verdampfte allmählich und die Inosinsäure hinterblieb in Form eines leichten Schaumes, der völlig trocken war und beim Zerdrücken sich in ein feines Pulver verwandelte.

Die Bestimmung ergab:

Angewendete Substanz	Substanz in 100 cm^3 Lösung	Depression	Molekular- gewicht
0·2468	1·493	0·29	144
0·7964	4·817	0·86	156
1·2153	7·352	1·335	154

Die erhaltenen Zahlen für das Molekulargewicht der Inosinsäure weichen von dem Werte 348, welcher der jetzt gültigen Formel derselben entspricht, beträchtlich ab. Dieses Resultat könnte in erster Linie auf starke Dissoziation hinweisen, es zeigte sich jedoch auch bei der Aufarbeitung der Lösung, daß die Inosinsäure nicht wieder völlig zurückgewonnen werden konnte, sondern sich teilweise zersetzt hatte.

Wir sind daher genötigt, noch andere Wege zu versuchen, um das Molekulargewicht der Inosinsäure sicherzustellen, da uns die Entscheidung der Frage von Wichtigkeit scheint, ob die Inosinsäure ein einfaches Pentosenderivat ist, wie gegenwärtig angenommen wird, oder ob es sich von einem komplizierteren Zucker ableitet. Wir möchten bemerken, daß auch Levene und Jacobs diese Möglichkeit in Betracht zogen und in der Inosinsäure neben der Pentose auch nach einer Hexose suchten.

Osazon der Inosinsäurepentose.

Dasselbe wurde von Neuberg und Brahn in reichlicher Ausbeute mit dem Schmelzpunkte 159 bis 160°, von Bauer in, wie es scheint, wesentlich geringerer Menge mit dem Schmelzpunkte 158 bis 159° dargestellt und wir haben seinerzeit eine winzige Quantität, die eben noch für einige Schmelzpunktsbestimmungen ausreichte, nach viermaligem Umkrystallisieren mit dem konstanten Schmelzpunkte 163° erhalten. Levene und Jacobs dagegen führen an, daß alle ihre Bemühungen, ein Phenylosazon mit den Eigenschaften eines Xylosazons oder eines Arabinosazons zu erhalten, vergeblich waren.

Dieser Widerspruch ist für uns keineswegs auffallend, da wir selbst zu wiederholten Malen in die Lage gekommen sind, kein Osazon gewinnen zu können, und zwar immer

dann, wenn wir uns bemühten, mit möglichst reinen Lösungen zu arbeiten. Wir haben daher diese Reaktion näher studiert und gefunden, daß die freie Glykophosphorsäure, respektive das Gemenge von dieser und eventuell vorhandener freier Pentose, zur Osazondarstellung benützt, stets nur braune Produkte ergab, die in kurzer Zeit vollständig verharzten, während bei Anwendung des Bariumsalzes der Pentosephosphorsäure sich in der Hitze hellgelbe, aus feinen Kryställchen bestehende Flocken bildeten, an denen sich beim Erkalten reichlichere Mengen dunkelgelber, derberer Nadelchen ausschieden. Durch Extrahieren der abfiltrierten Masse mit Weingeist konnten die letzteren, welche das Osazon der Pentose darstellen, von der in der Hitze entstandenen Ausscheidung getrennt werden. Die Ausbeute war im Vergleich zu jener aus Inosinpentose immer sehr schlecht. Levene und Jacobs haben nun aller Wahrscheinlichkeit nach vor dem Versuche zur Darstellung des Osazons das Barium entfernt, während Neuberg und Brahn und ebenso auch Bauer mit den bariumhaltigen Flüssigkeiten arbeiteten, woraus sich ohne weiteres die gegenteiligen Resultate erklären. Neuberg und Brahn haben bei Verwendung des Bariumsalzes der Pentosephosphorsäure in der Wärme die Ausscheidung einer »amorphen, gelblichweißen Masse, die organisch gebundenen Phosphor enthält und die Phenylhydrazinverbindung der Pentosephosphorsäure ist«, beobachtet und nach dem Abfiltrieren derselben in der Hitze aus der erkalteten Lösung das Phenylsazon der Pentose erhalten. Wir haben auf die Reindarstellung dieser Phenylhydrazinverbindung der Pentosephosphorsäure viel Mühe verwendet, da uns dieselbe, wie wir später ausführen werden, für die Ermittlung der Bindestelle von Phosphorsäure und Pentose von Wichtigkeit schien, haben jedoch bisher wegen der großen Zersetzlichkeit dieser Verbindung in dieser Richtung keinen Erfolg erzielt.

Vergleich der Drehungswerte.

Wenngleich bisher für die Änderung, welche das Drehungsvermögen einer optisch aktiven Substanz durch Eintritt eines Substituenten erfährt, ein allgemein gültiger Ausdruck nicht

gefunden werden konnte, so läßt sich doch für eine bestimmte Substanz die Richtung und meist auch die ungefähre Größe dieser Änderung voraussehen, wenn bekannt ist, welche Drehungsänderung derselbe Substituent an einem der betreffenden Substanz nahestehenden Stoffe hervorruft. Im Hinblick darauf wollen wir das Drehungsvermögen der Stoffe, die im vorliegenden Thema berührt wurden, einem Vergleich unterziehen, da die Ergebnisse für die Beurteilung der Frage bezüglich eines Zusammenhanges zwischen Inosin und Inosinsäure in Betracht gezogen werden können. Da es sich hier um Stoffe von wesentlich verschiedenem Molekulargewicht handelt, müssen wir für unsere Überlegung die Molekulardrehungen anwenden. Für die Pentose aus Inosin fanden wir eine $[\alpha] = -19.6$, diesem entspricht $[M] = -29.4^\circ$. Für die Pentosephosphorsäure ergibt sich aus der Bestimmung von Levene und Jacobs im Vergleiche mit der Drehung der Inosinsäure $[M] = +42.4^\circ$. Unter der Voraussetzung, daß in der Pentosephosphorsäure aus Inosinsäure die Inosinpentose enthalten ist, bewirkt also die Einführung der Phosphorsäure in das Pentosemolekül eine Veränderung der Molekulardrehung um $+71.8^\circ$. Die analoge Einführung des Phosphorsäurerestes in das Inosin $[M] = -131.8$ würde nun zu einer Inosinphosphorsäure führen, deren Drehungsvermögen ungefähr den Wert $[M] = -131.8 + 71.8 = -60^\circ$ haben sollte, während aus den Angaben von Neuberg und Brahn sich für die Inosinsäure $[M] = -64.2^\circ$ berechnen läßt.

Diese außerordentlich gute Übereinstimmung der Werte kann natürlich bei der Unsicherheit ihrer Grundlagen keineswegs als ein Beweis dafür angesehen werden, daß die Inosinsäure tatsächlich sich vom Inosin ableitet, immerhin jedoch kann sie beim Vorhandensein anderer Beweisgründe als eine weitere Stütze dienen.

Stellung der Phosphorsäure an der Pentose.

Daß es sich im vorliegenden Falle um eine esterartige Bindung zwischen Phosphorsäure und Pentose handelt, kann wohl als feststehend angesehen werden, da in einer Phosphinsäure, welche der gleichen Formel entsprechen würde, die zur

Abspaltung der Phosphorsäure erforderliche Trennung der Bindung zwischen Phosphor und Kohlenstoff nur unter gleichzeitiger Zerstörung des organischen Restes möglich wäre und andererseits die Phosphorsäuremonoester im allgemeinen der Verseifung ja schwer zugänglich sind. Wir wollen also untersuchen, ob gegenwärtig bereits eine Entscheidung darüber, an welchem Kohlenstoffatom der Pentose der Phosphorsäurerest als Substituent sich vorfindet, schon möglich ist.

Direkt beweisende Beobachtungen sind bisher in genügender Anzahl nicht gemacht worden, doch läßt sich mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Wahl treffen, wobei die folgenden Momente in Betracht kommen.

Die Reduktionswirkung, welche die Pentosephosphorsäure zeigt, schließt eine Substitution in der Aldehydgruppe aus.

Die Drehungsänderung, welche beim Übergange von Pentose zu Pentosephosphorsäure auftritt, ist selbst bei Annahme von *l*-Xylose im Molekül der Inosinsäure eine sehr beträchtliche und gibt uns aus diesem Grunde einige Anhaltspunkte dafür, an welchem der vier Hydroxyle der Pentose die esterartige Bindung der Phosphorsäure vorhanden sein könnte.

Bei Eintritt des Phosphorsäurerestes in der δ -Stellung zur Aldehydgruppe würde die Änderung der Drehung nur eine unbedeutende sein können, da die Substitution an einer Gruppe vor sich geht, die kein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, sondern selbst nur Substituent an einem solchen ist, so daß also die Wirkung des Phosphorsäureeintrittes von sekundärer Größenordnung wäre und sich daher wenig fühlbar machen würde. Von den vier mit dem β -Kohlenstoffatom verbundenen Gruppen sind zwei, nämlich diejenigen, welche zwei Kohlenstoffatome enthalten, untereinander ziemlich gleich, was zur Folge hat, daß auch eine Substitution an dem β -Hydroxyl eine bedeutende Veränderung des Drehungsvermögens nicht herbeiführen könnte. Es wird dadurch also sehr wahrscheinlich, daß der Phosphorsäurerest nicht in der β - oder δ -Stellung, sondern in der α - oder γ -Stellung sich vorfindet.

Die Phloroglucin- und Orcinreaktion tritt mit der Pentosephosphorsäure rasch und kräftig ein, wie auch Levene und Jacobs angeben. Über den Mechanismus dieser Reaktion

ist bisher allerdings noch keine Klarheit geschaffen worden, doch verdanken wir Neuberg zahlreiche Angaben über den Eintritt, respektive Nichteintritt derselben bei verschiedenen Stoffen. Nach ihm zeigt Glycolaldehyd die Reaktion nicht, Glycerose und Tetrosen schwach, die Pentosen aber deutlich. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß an ihr das β -, γ - oder δ -Hydroxyl beteiligt sein mag, daß sie aber jedenfalls nicht durch das α -Hydroxyl allein hervorgerufen wird. Es wird somit voraussichtlich auch Substitution in der α -Stellung eine Störung nicht bewirken.

Endlich könnte auch die Phenylhydrazinverbindung aus dem pentosephosphorsauren Barium Aufschluß über die Stellung der Phosphorsäure geben, falls es doch möglich sein sollte, dieselbe in analysenreiner Form zu erhalten und falls sich herausstellen sollte, daß sie ein Zwischenprodukt bei der Bildung des Osazons der Pentose ist.

Auf Grund der vorstehenden Erwägungen hat also die Annahme der Stellung des Phosphorsäurerestes am α -Kohlenstoffatom die größte Wahrscheinlichkeit für sich, nachdem ja außerdem das γ -Hydroxyl für die laktonartige Bindung mit dem einen Hydroxyl der Aldehydgruppe in Anspruch genommen sein dürfte, da schon die Bruttoformel der Inosinsäure eine derartige Bindung erfordert.

Strukturformel der Inosinsäure.

Von den bisher unter Berücksichtigung des Vorhandenseins einer Pentose aufgestellten Formeln entspricht diejenige von Neuberg und Brahn in keiner Weise dem Verhalten der Inosinsäure und ihrer Derivate. Durch die Angliederung der Phosphorsäure an die Aldehydgruppe der Pentose würde eine Pentosephosphorsäure resultieren müssen, die keine Reduktionswirkung zeigt, und andererseits findet auch durch die Verknüpfung des Hypoxanthins mit der Phosphorsäure das Auftreten von reduzierender Pentosephosphorsäure aus der nicht-reduzierenden Inosinsäure bei der Abspaltung der Xanthinbase nicht seine Erklärung. Bezüglich der Konfiguration der Pentose können wir uns natürlich einen Einwand nicht erlauben, da

