

Über Karnin und Inosinsäure

(III. Mitteilung)

von

F. Haizer und **F. Wenzel**.

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

(Vorgelegt in der Sitzung am 4. März 1909.)

Die Formel der Inosinsäure und damit stillschweigend ihre Molekulargröße wird auf Grund der Analyse ihres bei 100° im Vakuum getrockneten Bariumsalzes $C_{10}H_{11}N_4PO_8Ba$ zu $C_{10}H_{13}N_4PO_8$ angenommen. Nun lassen es aber verschiedene Beobachtungen zweifelhaft erscheinen, ob tatsächlich diese einfache Formel der Inosinsäure zukommt oder etwa ein Multiplum derselben. Während von den Spaltprodukten der Inosinsäure das Hypoxanthin und die Phosphorsäure quantitativ mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten, bietet dies für den in derselben enthaltenen Zucker erhebliche Schwierigkeiten. Vor allem konnte das Pentosazon bisher von der größeren Zahl der Forscher nur in außerordentlich schlechter Ausbeute erhalten werden und auch bezüglich der Fufurolmenge, welche bei Destillation von Inosinsäure mit Salzsäure erhalten werden kann, weichen die Angaben von C. Neuberg und Brahn¹ sowie Bauer² einerseits und diejenigen von P. A. Levene und W. A. Jakobs³ andererseits stark voneinander ab, so daß die letztgenannten Forscher sich veranlaßt

¹ Biochemische Zeitschrift, V, 446.

² Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, X, 354.

³ Ber. der Deutschen chem. Ges., 41, 2707.

sahen, an das Vorhandensein einer Hexose neben der Pentose zu denken, was eben ein höheres Molekulargewicht voraussetzen würde. Auch der ausgesprochene Geruch nach arabischem Gummi, welchen wir¹ an den Lösungen des Gemisches von Pentosephosphorsäure und Pentose wiederholt beobachteten, ließ uns die Anwesenheit einer Polyose möglich erscheinen, wenngleich dieser Geruch wohl auch der Pentosephosphorsäure oder ihren Zersetzungsprodukten eigentümlich sein könnte. Um diese Unsicherheit bezüglich der Molekulargröße der Inosinsäure zu beseitigen, haben wir uns bemüht, für das

Molekulargewicht der Inosinsäure

beweisende Beobachtungen zu gewinnen, was uns mit größerer Zuverlässigkeit gelang, als wir erwarten konnten. Wir haben schon in der letzten Mitteilung auf die seltenen Schwierigkeiten hingewiesen, die in unserem Falle der Ausführung einer Molekulargewichtsbestimmung nach der Gefrier- oder Siedemethode entgegenstehen. Die freie Inosinsäure ist nur bei mäßigen Temperaturen genügend beständig, während beim Erwärmen bald Zerfall eintritt, und konnten wir bisher für dieselbe nur zwei Lösungsmittel auffinden, das Wasser und die absolute Ameisensäure, welche beide aber elektrolytische Dissoziation bewirken, letztere außerdem auch teilweise Zersetzung der Substanz herbeiführt. Geeignete Derivate der Inosinsäure, namentlich Ester derselben in reiner Form darzustellen, ist uns aber bisher nicht gelungen. Wir haben daher versucht, durch Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit des Natronsalzes der Inosinsäure sowie durch Kombination der Gefrierpunktserniedrigung des Wassers durch Inosinsäure und der Leitfähigkeit dieser Lösung ausreichende Beweismittel für die richtige Wahl des Molekulargewichtes beizubringen. Beide Verfahren führten zu dem gleichen Resultate. Der Vergleich der Äquivalentleitfähigkeit des neutralen Natronsalzes der Inosinsäure bei den Verdünnungen 32 und 1024 ergab, daß dem Natronsalz eine zweibasische Säure zugrunde liegt, woraus der Schluß gezogen werden muß, daß die oben

¹ Monatshefte für Chemie, XXX, 158.

angeführte Formel der Inosinsäure richtig ist. Andererseits zeigte die Molekularleitfähigkeit der wässrigen Lösung der Inosinsäure, daß diese innerhalb der für die Gefrierpunkts-erniedrigungsbestimmung in Betracht kommenden Verdünnungen in zwei Ionen gespalten ist, wodurch wir in die Lage versetzt sind, den Grad der Dissoziation der Inosinsäure und damit auch das richtige Molekulargewicht derselben aus der Gefrierpunktserniedrigung berechnen zu können. Wir erhielten so Werte, welche der der Formel $C_{10}H_{13}O_8N_4P$ entsprechenden Zahl sehr nahe kommen.

Dadurch haben wir eine sichere Grundlage für das weitere Studium der Inosinsäure und ihrer Spaltprodukte geschaffen. Vor allem erweisen sich mühevolle Untersuchungen zur eventuellen Auffindung eines zweiten Zuckermoleküls überflüssig und es kann die weitere Arbeit auf die am Schlusse der zweiten Mitteilung angeführten Aufgaben konzentriert werden.

Die Lösung einer derselben ist uns in der Zwischenzeit gelungen, indem wir durch Darstellung des Benzylphenylhydrazons beweisen konnten, daß die

Inosinpentose die *d*-Lyxose

ist. Die Pentose selbst haben wir bisher nicht krystallisiert erhalten, so daß wir die in unserer zweiten Mitteilung angeführte Differenz im Drehungsvermögen aufzuklären noch nicht in der Lage sind. Wir haben damals eine etwas größere Linksdrehung gefunden, als für die *d*-Lyxose festgestellt ist, und müssen Versuchsfehler für ausgeschlossen halten, da unsere beiden Bestimmungen an Präparaten verschiedener Darstellung in zwei verschiedenen Polarisationsapparaten ausgeführt wurden. Man könnte in erster Linie daran denken, daß unsere sirupöse Inosinpentose durch kleine Mengen des stark linksdrehenden Inosins verunreinigt ist. Dagegen spricht jedoch das Gewichtsverhältnis zwischen abgespaltenem Hypoxanthin und restierender Pentose, welches, wie wir mehrmals nachgewiesen haben, den für quantitative Spaltung erforderlichen Mengen gut entspricht. Außerdem war der Sirup stickstofffrei. Es wäre also wohl nur anzunehmen, da nach den Angaben von C. Ruff

und G. Ollendorff¹ Multirotation in entgegengesetztem Sinne zur Geltung kommen müßte, daß die *d*-Lyxose aus dem Inosin in einer Form abgespalten wird, die von der, die sie in krystallisiertem Zustand besitzt, abweicht. Man könnte sich dies in der Weise vorstellen, daß etwa die krystallisierte Lyxose in einer α -Form existiert, während das Inosin ein β -Lyxosid ist und bei der Spaltung die Lyxose in der β -Form liefert, wobei diese beiden Formen sich in den Bindungsverhältnissen in analoger Weise unterscheiden wie das α - und β -Methylglukosid. Wir hoffen, auch hierüber gelegentlich noch Aufklärung schaffen zu können, wiewohl diese Aufgabe keineswegs verlockend erscheint.

Die Beobachtung, daß bei der Zersetzung der Inosinsäure in alkalischer Lösung Karnin entsteht, welche ja den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen bildete, haben unter Zuhilfenahme unserer in der ersten Mitteilung publizierten diesbezüglichen Vorarbeiten in jüngster Zeit P. A. Levene und W. A. Jacobs² als zutreffend nachgewiesen. Es ist ihnen gelungen, das Inosin sowohl als auch das Karnin unter den Spaltprodukten der Inosinsäure aufzufinden und sicherzustellen. Daraus ergibt sich nun, daß in der Inosinsäure dieselbe Pentose enthalten ist wie im Inosin, was bisher noch keineswegs einwandfrei nachgewiesen war, obwohl wir aus Inosinsäure und aus Karnin dasselbe Osazon erhalten hatten, da dieses sowohl aus *d*-Lyxose wie auch aus *l*-Xylose entstanden sein konnte, die Pentose aus Inosinsäure jedoch noch nicht in solcher Menge und solcher Reinheit erhalten werden konnte, um eine Drehungsbestimmung durchzuführen oder ein Hydrazon darzustellen.

Das Ergebnis, daß Inosin und Inosinsäure Lyxosederivate sind, ist insofern bemerkenswert, als hier zum ersten Male das Vorkommen von *d*-Lyxose in Naturprodukten nachgewiesen ist.

¹ Ber. der Deutschen chem. Ges. 32, 1801.

² Ber. der Deutschen chem. Ges., 42, 335.

Experimenteller Teil.

Basizitätsbestimmung der Inosinsäure.

Nach der von W. Ostwald empirisch festgestellten Regel kann die Basizität einer Säure aus den Werten für die Äquivalentleitfähigkeit des neutralen Natronsalzes derselben bei den Verdünnungen 32 und 1024 nach der Formel $\alpha = \frac{\Lambda_{1024} - \Lambda_{32}}{10}$ gefunden werden. Mit Rücksicht auf die Schwierigkeit der Darstellung reiner Inosinsäurelösung haben wir die Lösung des Natronsalzes durch Umsetzung des Baryumsalzes mit Natriumsulfat dargestellt. Es wurden 0·7828 g bei 100° getrockneten inosinsauren Baryums ($C_{10}H_{11}O_8N_4PBa + H_2O$) in einem 50 cm^3 -Meßkolben in zirka 30 cm^3 Leitfähigkeitswasser gelöst, mit einer wässrigen Lösung von 0·2216 g durch schwaches Glühen entwässerten reinsten Natriumsulfats versetzt, auf 50 cm^3 aufgefüllt und nach öfterem Umschütteln über Nacht ruhig stehen gelassen. Es hatte sich nach dieser Zeit das Baryumsulfat vollständig abgeschieden und von der überstehenden klaren Lösung, deren Verdünnung einem Grammäquivalent in 16 l entspricht, wurden 20 cm^3 zu den Leitfähigkeitsbestimmungen herauspipettiert. Die erhaltenen Werte der Äquivalentleitfähigkeit für fortschreitende Verdünnung sind in Kolonne I angeführt. Da die Lösung des Natriumsalzes gegen Lakmus doch eine beträchtlich alkalische Reaktion zeigte, obgleich Phenolphthaleinlösung nicht gerötet wurde, haben wir die Lösung des Natronsalzes bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum eingeengt und das Natronsalz durch Alkohol in feinen Nadelchen ausgefällt. Dasselbe wurde im Vakuum bei 100° zur Gewichtskonstanz gebracht und 0·2450 g desselben in Wasser zu 20 cm^3 gelöst, so daß eine Lösung von der Grammäquivalentverdünnung 16 entstand. Die an dieser Lösung ermittelten Äquivalentleitfähigkeiten sind in Kolonne II eingetragen. Sämtliche Leitfähigkeitsmessungen wurden bei einer Temperatur von 25° ausgeführt.

Äquivalentverdünnung	I	II
	Δ_v	Δ_v
16	61·3	60·8
32	67·0	66·5
64	71·5	71·7
128	76·6	76·0
256	80·7	80·1
512	84·5	83·9
1024	88·3	87·1.

Die Anwendung obiger Formel ergibt für die Basizität der Inosinsäure die folgenden der Zahl 2 naheliegenden Werte:

$$\text{I} \quad \frac{88\cdot3 - 67\cdot0}{10} = 2\cdot13$$

$$\text{II} \quad \frac{87\cdot1 - 66\cdot5}{10} = 2\cdot06$$

Nach der Leitfähigkeit des Natronsalzes ist also die Inosinsäure eine zweibasische Säure und es ist daher die gebräuchliche Formel derselben als richtig zu betrachten.

Gefrierpunktserniedrigung des Wassers durch Inosinsäure.

Für diese Bestimmung wurde die Inosinsäure in der bereits in der zweiten Mitteilung¹ angegebenen Art und Weise in trockene und wägbare Form gebracht. Die Bestimmung wurde in einem Beckmann'schen Apparate ausgeführt und ergab bei Verwendung von 20 cm^3 Leitfähigkeitswasser als Lösungsmittel die folgenden Resultate:

	Substanz	Verdünnung für 1 g Molekulargewicht	Depression
I	0·3471 g	20·05 l	0·125°
II	0·4731 g	14·71 l	0·160°.

Molekulargewicht.

Gefunden		Berechnet
$M_I = 256\cdot8$	$M_{II} = 273\cdot5$	$M = 348$

¹ Monatshefte für Chemie, XXX, 158.

Die gefundenen Werte für das Molekulargewicht sind natürlich zu niedrig, da ein Teil der Inosinsäure elektrolytisch gespalten ist, worüber uns die

Leitfähigkeit der Inosinsäure

Aufschluß gibt. Dieselbe wurde unmittelbar nach der Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung an der für diese verwendeten Lösung ermittelt. Es wurden 10 cm^3 derselben in das Leitfähigkeitsgefäß übergeführt und die erste Messung also bei einer Verdünnung von $14\cdot7$ ausgeführt. Um zur Verdünnung 20 zu gelangen, welche der bei der ersten Gefrierpunktbestimmung angewendeten Konzentration ungefähr entspricht, wurden aus dem Leitfähigkeitsgefäß $2\cdot64\text{ cm}^3$ Lösung herausgenommen und durch $2\cdot64\text{ cm}^3$ Wasser ersetzt. Für die nächste Verdünnung wurden einfach 10 cm^3 zugefügt und dann weiter je 10 cm^3 Lösung durch 10 cm^3 Wasser ersetzt. Hierbei wurden die Resultate der Meßreihe I erhalten. Um jedoch auch die Molekularleitfähigkeiten für die üblichen Verdünnungen festzustellen, haben wir die nach der ersten Messung dem Leitfähigkeitsgefäß entnommenen $2\cdot64\text{ cm}^3$ Lösung mit dem im Gefrierpunktsgefäß enthaltenen Reste vereinigt und konnten abermals 10 cm^3 der Lösung von der Verdünnung $14\cdot7$ für Leitfähigkeitsbestimmungen verwenden. Nach Kontrolle des bei dieser Konzentration bereits festgestellten Wertes wurden $0\cdot80\text{ cm}^3$ Lösung entfernt und $0\cdot80\text{ cm}^3$ Wasser zugefügt, so daß die Verdünnung 16 erreicht wurde. Die für diese und die weiteren den höheren Potenzen von 2 entsprechenden Verdünnungen erhaltenen Werte für die molekulare Leitfähigkeit sind unter μ_v in Kolonne II eingetragen.

Die in den beiden Meßreihen erhaltenen Werte für die molekularen Leitfähigkeiten der Inosinsäure ergeben, in ein Koordinatensystem eingezeichnet, zwei Kurven, die fast vollständig identisch sind.

V		I.		II.	
		μ_v	k	μ_v	k
14·7		122	0·0108	123	0·0108
	16			125·7	0·0107
20		136·7	0·0106		
	32			161	0·01024
40		171	0·0097		
	64			190	0·0083
80		199·8	0·0077		
	128			216	0·0062
160		221	0·0054		
	256			229	0·0038
320		232	0·0037		
	512			242	0·0023
640		242·7	0·0019		
	1024			243·6	0·0012
1280		243·6	0·0010		
	2048			243·7	0·0006

Die Konstanten sind mit dem nach Ostwald aus der Atomzahl geschätzten Grenzwert 373 nach der für binäre Elektrolyte gültigen Formel berechnet.

Da nämlich die Ionisierbarkeit der drei Wasserstoffatome der Phosphorsäure eine wesentlich verschiedene ist, wie aus ihrem Verhalten gegen Indikatoren hervorgeht, darf ein ähnliches Verhalten auch bei der Inosinsäure vermutet werden. Es ist darum zu erwarten, daß die Inosinsäure ebenso wie die meisten zweibasischen organischen Säuren in größeren Konzentrationen sich als einbasische Säure verhält. Auffallend ist das bei einer organischen Säure von der Stärke der Inosinsäure ganz ungewöhnlich starke Sinken der Konstanten mit der Verdünnung; ob dies auf die Natur der Inosinsäure als amphoterer Elektrolyt zurückzuführen ist oder auf andere Ursachen, soll dahingestellt bleiben.

Jedenfalls gibt der nach der Formel $\alpha = \frac{\mu}{\mu_{\infty}}$ berechnete Dissoziationsgrad ein annäherndes Maß für die abgespaltenen Wasserstoffionen, welches auch durch mäßige Fehler in der angenommenen Endleitfähigkeit nur wenig beeinflusst wird.

Bei unseren Gefrierpunktsbestimmungen sind unter Zugrundelegung der einfachen Formel statt eines Moleküles $1 - \alpha + 2\alpha = 1 + \alpha$ Moleküle, respektive Ionen in Lösung und zwischen dem früher gefundenen Molekulargewichte M_1 , respektive M_{11} und dem richtigen Werte M besteht die Beziehung

$$M_1 : M = 1 : 1 + \alpha.$$

Wir müssen also M_1 und M_{11} mit den entsprechenden Werten von $1 + \alpha$ multiplizieren, um das Molekulargewicht der Inosinsäure zu erhalten. Dasselbe ergibt sich dadurch zu:

Gefunden			Berechnet
$M_1 = 256 \cdot 8$	$\alpha_1 = 0 \cdot 3664$	$M = 350 \cdot 9$	$M = 348$
$M_{11} = 273 \cdot 5$	$\alpha_{11} = 0 \cdot 3270$	$M = 362 \cdot 9$	

Da wir die Leitfähigkeitsmessungen der bequemerer Ausführbarkeit halber bei 25° vorgenommen haben und nicht bei der Temperatur der Gefrierpunktsbestimmungen, sind die Werte für α und auch die gefundenen Molekulargewichtswerte etwas zu hoch. Die Differenz in letzteren würde jedoch, wie eine Überschlagsrechnung ergab, nur wenige Einheiten betragen und wir glaubten daher, für unseren Zweck von der Leitfähigkeitsbestimmung bei 0° Abstand nehmen zu können.

Die Annahme eines doppelten Molekulargewichtes endlich würde wesentlich andere Werte für die Gefrierpunktserniedrigung erfordern.

Benzylphenylhydrazon der Inosinpentose.

In unserer zweiten Mitteilung gelangten wir zu dem Ergebnis, daß die Inosinpentose höchstwahrscheinlich *d*-Lyxose ist. Da wir die Inosinpentose nicht krystallisiert erhalten konnten, versuchten wir aus derselben das einzige in der Literatur vorfindliche charakteristische Derivat der Lyxose, das Benzylphenylhydrazon, darzustellen.

Das Benzylphenylhydrazinchlorhydrat haben wir nach den Angaben von G. Minunni¹ bereitet und bis zum konstanten Schmelzpunkt umkrystallisiert. Hierauf wurden zirka 0.2 g der sirupösen Pentose in $\frac{1}{2}$ cm³ Wasser gelöst, mit einer Lösung äquivalenter Mengen von Benzylphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat in 5 cm³ Alkohol versetzt und über Nacht stehen gelassen. Durch Versetzen mit Wasser bis zur beginnenden Trübung wurde sodann das Hydrazon ausgeschieden, welches zunächst ölig erscheint, beim Reiben mit dem Glasstab jedoch bald in krystallinischen Zustand übergeht. Die abgesaugte Substanz wurde aus 30prozentigem Weingeist unter Anwendung von Tierkohle viermal umkrystallisiert und zeigte dann den Schmelzpunkt 127°. Nachdem für das Benzylphenylhydrazon der *d*-Lyxose der Schmelzpunkt 128° angegeben ist, erscheint die Inosinpentose mit der gegenwärtig möglichen Zuverlässigkeit als *d*-Lyxose charakterisiert.

Schließlich sei es uns gestattet, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Rudolf Wegscheider für das wohlwollende Interesse, welches er uns bei der Ausführung dieser Arbeit angedeihen ließ, unseren Dank auszusprechen.

¹ Gazzetta chimica italiana 22, 2, 217.