

1,8proz. Phosphorsäure mit 1,4 l Aceton, die niedrig schmelzende Modifikation durch spontane Kristallisation aus einer Lösung von 1,0 g Adenosin „Merk“ (Fp = 227–230 °C) in 5 ml 6,9proz. Phosphorsäure gewonnen wurde.

Die Infrarotspektren (vgl. Bild 1) zeigen im ganzen Spektralbereich von 2–15 μ starke Unterschiede. Das kann so gedeutet werden, daß bei den Salzen verschiedene basische Gruppen des Purin-Kerns als Kation fungieren, verursacht durch die zahlreichen Tautomerie- und Isomeriemöglichkeiten. Das gesamte Schwingungsbild der Molekeln einschließlich der Struktur der OH- bzw. NH-Gruppen ist in den Salzen verschieden.

Überdies wurden von den beiden Modifikationen unter Verwendung eines Zählrohr-Interferenzgoniometers und Fe-gefilterter

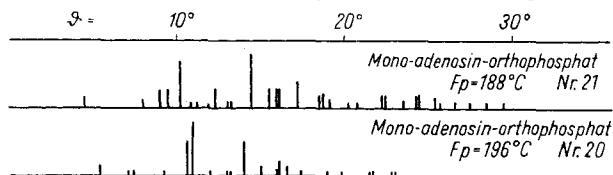


Bild 2. Röntgendiagramme

Co-K α -Strahlung die in Bild 2 schematisch wiedergegebenen Röntgendiagramme erhalten. Sie zeigen, daß sich beide Substanzen auch in ihrem Kristallgitter erheblich unterscheiden.

Eingegangen am 27. Juni 1956 [Z 358]

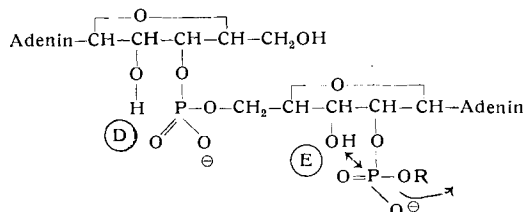
Über die Hydrolyse von Ribonucleinsäuren mit Anionenaustauschern

Von Prof. Dr. K. DIMROTH und Dr. W. MATTHAEUS

Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg/Lahn

Unsere Untersuchungen über die Hydrolyse von Ribonucleinsäuren mit verschiedenen Metallhydroxyden, die je nach Metall und Hydrolysenbedingungen die präparative Darstellung von Nucleosiden, Nucleotiden, Dinucleosidphosphaten oder Di- bis Oligonucleotiden ermöglichen¹), legten nahe, auch die Wirkung von Anionenaustauschern auf die Hydrolyse von Ribonucleinsäuren zu untersuchen. Wir fanden, daß man beim Erhitzen von Ribonucleinsäure-Suspensionen mit OH⁻-beladenen Amberliten auf 80 °C je nach der Basizität der verwandten Austauscher ganz verschiedene Produkte erhalten kann: Mit dem stark basischen Amberlite IRA 401 erhält man praktisch nur Mononucleotide, mit dem schwach basischen IR 4 B vorwiegend Oligonucleotide und mit dem Austauscher IRA 411 mittlerer Basizität neben etwas Adenin und Guanin hauptsächlich Mono- und Dinucleotide. Die Substanzen bleiben am Austauscher haften und werden durch Ameisensäure eluiert, sodann durch Austauschchromatographie und Papierelektrophorese im Acetat- und Borat-Puffer getrennt bzw. identifiziert.

Die Diadenylsäure-Fraktion erschien in vier getrennten Gipfeln bei der Austauschchromatographie. Wir vermuten, daß es sich bei diesen vier Fraktionen um die vier möglichen isomeren Diadenylsäuren handelt, die sich jeweils durch eine Isomerie an C₂' und C₃' unterscheiden. Während die Isomerie an der endständigen Phosphat-Gruppe (E) ohne weiteres verständlich ist, da sich die Abspaltung des endständigen Nucleotid-Restes stets unter 2',3'-Isomerisierung vollzieht²), ist die Isomerisierung an der Phosphorsäure-Diester-Bindung (D) nur durch eine innere Umesterung am Austauscher möglich.

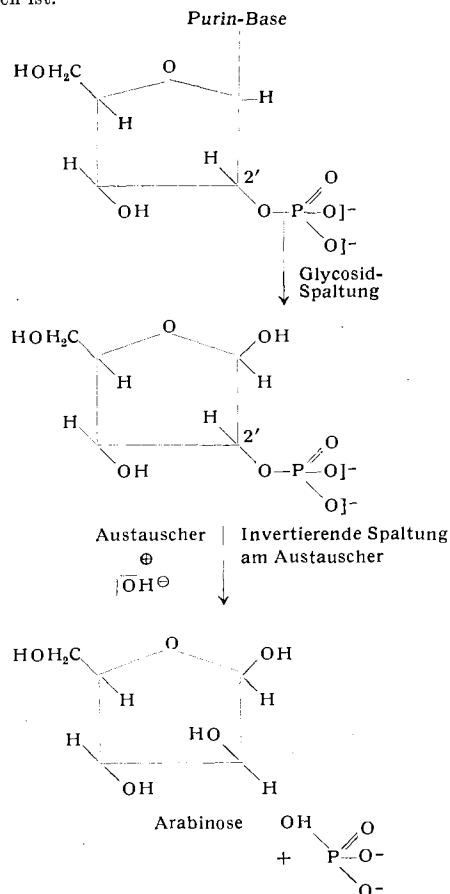


Neben Guanin und Adenin entstehen bei der Austauscherhydrolyse auch Zuckerphosphate: Ribose-2-phosphat, Ribose-3-phosphat und ganz geringe Spuren von Ribose-5-phosphat.

¹) K. Dimroth u. L. Jaenicke, Liebigs Ann. Chem. 566, 206 [1950]; K. Dimroth, L. Jaenicke u. J. Vollbrechtshausen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 289, 71 [1952]; L. Jaenicke, K. Dimroth u. D. Jaenicke, 11. Congrès Internat. de Biochimie, Paris 1952; K. Dimroth u. H. Witzel, G. Neubauer u. H. D. Matheka, diese Ztschr. 67, 518 [1955].

²) D. M. Brown, D. I. Margrath, A. H. Neilson u. A. R. Todd, Nature [London] 177, 1124 [1956].

Weiterhin haben wir auch Pentosen gefunden, und zwar nur Xylose und Arabinose, nicht jedoch Ribose. Das bedeutet, daß die Austauscherhydrolyse der Ribosephosphate unter Waldenscher Umkehr verläuft. Eine solche invertierende Hydrolyse findet aber niemals bei der Hydrolyse der noch mit den Nucleobasen verbundenen Ribose-phosphorsäureester statt, wahrscheinlich weil durch den β -glykosidisch verbundenen Basenrest ein Hydroxylionen-Angriff von der Rückseite aus sterischen oder elektrostatischen Gründen unmöglich ist.



Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemie und der Zellstoffabrik Waldhof für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 7. Juli 1956 [Z 362]

Dinucleosidphosphate durch Wismut-katalysierte Hydrolyse von Ribonucleinsäuren

Von Prof. Dr. K. DIMROTH und Dr. H. WITZEL

Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg/Lahn

Wismuthydroxyd kann Ribonucleinsäuren unter geeigneten Bedingungen zu Dinucleosidphosphaten hydrolysieren¹). Während es uns früher nicht gelang, sämtliche durch Kombination der verschiedenen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil möglichen 16 Isomeren zu isolieren, konnten wir jetzt alle, wenn auch in recht verschiedenen Mengen, auffinden und zum größten Teil rein isolieren. Damit ist nachgewiesen, daß in Ribonucleinsäuren sämtliche Basenkombinationen vorkommen können.

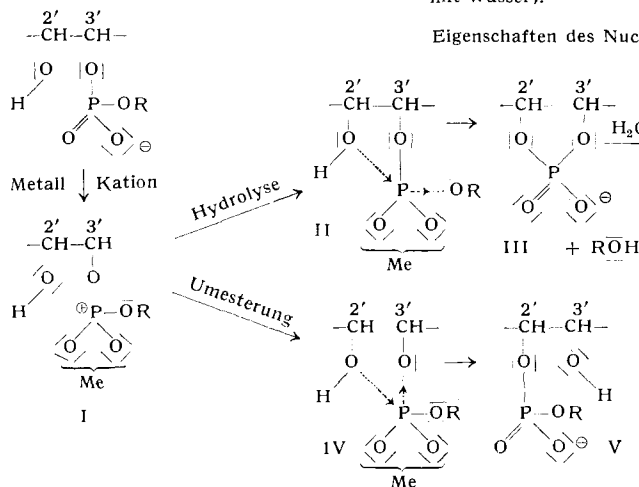
A-P-A	G-P-A	C-P-A	U-P-A
A-P-G	G-P-G	C-P-G	U-P-G
A-P-C	G-P-C	C-P-C	U-P-C
A-P-U	G-P-U	C-P-U	U-P-U

A, G, C und U bedeuten die vier Nucleoside, P den Phosphat-Rest; das zuerst genannte Nucleosid ist an 3', das zweite an 5' mit dem Phosphat-Rest verbunden.

Wir konnten darüber hinaus noch ein zweites Isomeres der Konstitution A-P-C isolieren. Beide Isomeren liefern bei der Hydrolyse mit Natronlauge ein 2'-3'-Gemisch der Adenylsäuren und

¹) K. Dimroth, H. Witzel, G. Neubauer u. H. D. Matheka, diese Ztschr. 67, 518 [1955].

Cytidin. Baut man nach *Brown, Fried und Todd*²⁾ das endständige Nucleosid mit seinen beiden freien Hydroxyl-Gruppen durch Perjodsäure ab, so erhält man aus dem zuerst aus der Austauschersäule mit Ameisensäure eluierten A-P-C die 2'-Adenylsäure, aus dem später eluierten die 3'-Adenylsäure. Beide Isomeren sind also als A₂-P-C und A₃-P-C zu formulieren.



Die Frage, ob das hier gefundene 2'-Derivat ein natürliches Abbauprodukt der Nucleinsäuren oder ein erst im Verlauf der Hydrolyse entstandenes Kunstprodukt ist, möchten wir zugunsten der letzteren Anschauung entscheiden. Der katalytische Effekt des Metall-Ions besteht nach unserer Ansicht darin, daß durch eine komplexe Bindung an den Phosphat-Rest das P-Atom positiviert wird (I). Von hier aus kann dann die Molekel in zweierlei Richtung reagieren³⁾:

1.) Über einen Übergangszustand II tritt unter gleichzeitiger Abspaltung des Nucleosid-Restes von Kohlenstoff-Atom 5' eine Verknüpfung mit dem 2'-Hydroxyl des Zuckers unter Bildung eines cyclischen Esters (III) ein. Dieser zerfällt, besonders im sauren Milieu leicht weiter in das Gemisch von 2'- und 3'-Adenylsäure. Tatsächlich konnten wir bei kurzdauernder vorwiegend alkalisch ablaufender Wismut-Hydrolyse cyclische Ester fassen.

2.) Über einen Übergangszustand IV vollzieht sich unter gleichzeitiger Abspaltung des Phosphat-Restes vom Kohlenstoff-Atom 3' eine Umesterung von 3' nach 2' zu V. Eine solche Umesterung scheint auch bei der mit OH⁻-Austauschern ausgeführten Hydrolyse im Falle der A-P-A-P einzutreten⁴⁾.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemie und der Zellstofffabrik Waldhof für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 7. Juli 1956 [Z 361]

7-(D-Ribofuranosido)-adenin, ein Abbauprodukt des Pseudovitamins B₁₂

Von Dr. W. FRIEDRICH und Prof. Dr. K. BERNHAUER
Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.G., Stockstadt a. M.

Die Strukturaufklärung der Nucleoside der „Benzimidazolcobalamine“^{5, 6)} wurde dadurch ermöglicht, daß sie unter den Bedingungen der hydrolytischen Spaltung der B₁₂-Molekel stabil sind. Dagegen werden die Nucleoside der „Purin-cobalamine“ (also des Pseudovitamins B₁₂ und des Faktors A) unter den Bedingungen, unter denen der Nucleotidanteil abgespalten werden kann (saure Hydrolyse), weiter abgebaut. Wohl aber können mit Hilfe von Cer(III)-Salzen Vitamin B₁₂ und Faktor III zu Faktor B („Ätiocobalamin“) und Nucleosiden gespalten werden⁷⁾. Durch Modifizierung der Abbaubedingungen (Erhöhung der Konzentration an Cer(III)-Salz; Verzicht auf Pufferung, Zusatz von CN⁻-Ionen) konnten wir nun eine quantitative Spaltung aller B₁₂-

Substanz	Fp °C	[α] _D (H ₂ O)	PK (Amino-Gruppe)	R _f - Werte*)	Absorptionsmaxima			
					λ in mμ		ε × 10 ⁻³	
					pH 1	pH 12	pH 1	pH 12
Nucleosid aus ψ-B ₁₂ 7-Methyl-adenin ⁸⁾	218–222	0°	3,9	0,12	273	271	13,6	9,8
Adenosin ^{8, 10)}	229	–60°	3,3	0,22	269	269	14,6	11,4
9-Methyl-adenin ⁸⁾					260	260	14,2	14,3
Adenin ^{8, 10)}	360,5			0,37	260	258	14,2	14,7
							13,2	13,6

*) Aufsteigend, Whatman-1-Papier, Entwicklungsdauer 24 h, Entwickler n-Butanol (gesättigt mit Wasser).

Tabelle 1.

Eigenschaften des Nucleosides aus Pseudovitamin B₁₂ und einiger verwandter Substanzen

Faktoren zu Faktor B, Phosphorsäure und Nucleosid bei 95°C innerhalb 10 bis 20 min bei pH 5, also unter schonenden Bedingungen, erreichen.

Beim Abbau von Pseudovitamin B₁₂ nach dieser Methode erhielten wir nach Chromatographie des Hydrolysates an Dowex-2-Formiat und anschließend an Amberlite IRC-50 das Nucleosid in Form farbloser rhombischer Blättchen vom Fp 218–222°C (Kofler-Heizbank). Für C₁₀H₁₃O₄N₅ (267,2) ber. N 26,2%, gef. N 26,04%. Bei der Hydrolyse mit 0,05 n HCl bei 100°C während 15 min entsteht aus einem Mol Nucleosid 1 Mol Adenin und 1 Mol D-Ribose. 1 Mol des Nucleosides verbraucht während 5 bzw. 20 min 1 Mol Perjodat; [α]_D = 0 (c = 0,262 in Wasser). Das Nucleosid unterscheidet sich deutlich von Adenosin (s. Tab. 1). Sein Absorptionsspektrum ähnelt dem des 7-Methyladenins, woraus ersichtlich ist, daß die Ribose-Molekel nicht am N₉, sondern am N₇ des Adenins haftet⁸⁾. Dieser Befund entspricht der Erwartung, da in das räumliche Modell des Pseudovitamins B₁₂ nur das 7-α-Ribosid des Adenins paßt⁹⁾.

Durch die ermittelten Eigenschaften ist das Nucleosid des Pseudovitamins B₁₂ als 7-(D-Ribofuranosido)-adenin, eine bisher noch nicht beschriebene Substanz, charakterisiert. Über die Konfiguration der glykosidischen Bindung kann erst dann Endgültiges ausgesagt werden, sobald eine Vergleichssubstanz bekannter Konfiguration gefunden ist.

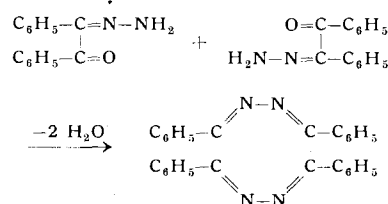
Eingegangen am 9. Juli 1956¹¹⁾ [Z 378]

Das 3,4,7,8-Tetraphenyl-1,2,5,6-tetraaza-cyclooctatetraen

Von Dr. R. METZE

Aus dem II. Chemischen Institut der Humboldt-Universität Berlin

Beim Aufarbeiten des als Nebenprodukt der Darstellung von 5,6-Diphenyl-1,2,4-triazin¹⁾ aus Benzil-monohydrazon und Formamid entstehenden braunen Harzes konnte eine in Alkohol sehr schwer lösliche Substanz isoliert werden, die nach dem Umkristallisieren aus Benzol weiße, verfilzte Nadelchen vom Fp 278°C bildet. Analyse und Molekulargewichtsbestimmung ergaben die Bruttoformel C₂₈H₂₀N₄. Daß es sich bei dieser Verbindung um ein intermolekulares Wasserabspaltungsprodukt aus 2 Molekeln Benzil-monohydrazon handelte, wurde dadurch bestätigt, daß auch bei mehrstündigem Erhitzen des Benzil-monohydrazons über seinen Schmelzpunkt die gleiche Verbindung C₂₈H₂₀N₄ entstand. Die Substanz ist gegen Säuren und Alkalien sehr beständig und wird erst durch halbkonzentrierte Schwefelsäure bei 210–220°C unter Druck hydrolytisch in Benzil und Hydrazin aufgespalten im Molverhältnis 1:1. Ihr muß auf Grund ihrer Bildungsweise aus Benzil-monohydrazon, ihrer Bruttoformel und ihrer Abbauprodukte die Konstitution eines 3,4,7,8-Tetraphenyl-1,2,5,6-tetraaza-cyclooctatetraens zugeschrieben werden:



⁸⁾ Mit Hilfe der gleichen Methode, d. h. durch Vergleich der Spektren des Adenosins und des 9-Methyladenins wurde von J. M. Gulland u. E. R. Holiday (J. chem. Soc. [London] 1936, 765) bewiesen, daß im Adenosin die Ribose am N₉ der Molekel haftet.

⁹⁾ D. C. Hodgkin, Privatmitteilung.

¹⁰⁾ E. Chargaff u. J. N. Davidson: The Nucleic Acids, Academic Press Inc., Publ., New York, 1955, Vol. 1.

¹¹⁾ Auf bes. Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht.

¹⁾ R. Metzke, Chem. Ber. 87, 1540 [1954].

²⁾ J. chem. Soc. [London] 1953, 2040.

³⁾ D. M. Brown, D. J. Margrath, A. H. Neilson u. A. R. Todd, Nature [London] 177, 1124 [1956].

⁴⁾ K. Dimroth u. W. Mathaeus, diese Ztschr. 68, 579 [1956].

⁵⁾ N. G. Brink u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 74, 2856 [1952].

⁶⁾ C. H. Shunk, F. M. Robinson, J. E. McPherson, M. M. Gasser u. K. Folkers, ebenda, im Druck.

⁷⁾ W. Friedrich u. K. Bernhauer, Z. Naturforsch. 9b, 686 [1954].