

Ueber Xanthin und Hypoxanthin.

Von

A. Kossel.

(Der Redaktion zugegangen am 6. April 1882).

I.

In früheren Mittheilungen¹⁾ wurde von mir gezeigt, dass Xanthin und Hypoxanthin durch Einwirkung der verdünnten Säuren und des Wassers bei 100° aus den Nucleinen entstehen, einer Gruppe von Substanzen, deren Repräsentanten innerhalb des Thier- und Pflanzenreichs in entwicklungs-fähigen Zellen überall gefunden sind, wo man sie aufgesucht hat, und die man deshalb mit Recht als nothwendige Bestandtheile der entwicklungs-fähigen lebenden Substanz betrachten muss. Es ergab sich aus den Versuchen die Schlussfolgerung, dass auch diesen Spaltungsprodukten der Nucleine eine allgemeine Verbreitung unter den Organismen zukomme, und dass sie aus den Organen, die man bereits seit längerer Zeit als ihre Bildungsstätte kannte, in grösserer Menge entstehen, als nach den früheren Untersuchungen anzunehmen war.

Ich habe diese nächstliegenden Schlüsse aus meinen früheren Arbeiten durch die Aufsuchung und quantitative Bestimmung des Hypoxanthins in einer Reihe von Thier- und Pflanzenstoffen bestätigt²⁾ und gedenke diese Angabe heute zu ergänzen durch die Mittheilung einiger Versuche in denen auch das Xanthin Berücksichtigung fand.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1879, Bd. III, S. 291; 1880, Bd. IV, S. 290; 1881, Bd. V, S. 152.

²⁾ Diese Zeitschrift 1881, Bd. V, S. 267. Untersuchungen über die Nucleine und ihre Spaltungsprodukte. Strassburg 1881, S. 16 ff.

Für die Gewinnung physiologisch verwerthbarer Vorstellungen schien es geeignet, die für diese Substanzen gefundenen Zahlen nicht allein, wie es bisher geschehen, auf das feuchte Organ als Einheit zu beziehen, sondern zu untersuchen, wieviel von dem gesammten Stickstoff der Organe in Form von Hypoxanthin und Xanthin enthalten ist.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: Das fein zerhackte Gewebe wurde in zwei ungleiche Theile getheilt, beide Theile gewogen. Die kleinere Hälfte diente zu einer (volumetrischen) Stickstoff-Bestimmung, die grössere Hälfte wurde in einem Dampf-Kochtopf mit 1 Liter Wasser, dem 5 cc. concentrirter Schwefelsäure zugesetzt waren, drei bis vier Stunden gekocht. Die erkaltete Flüssigkeit wurde mit Barytwasser alkalisch gemacht, überschüssiger Baryt durch Kohlensäure entfernt, filtrirt, der Filtrerrückstand mehrfach mit siedendem Wasser extrahirt, das Extrakt dem Filtrat zugefügt. Das Filtrat wurde jetzt auf ca. 300 cc. eingedampft, mit grossem Ueberschuss von Ammoniak versetzt und einige Stunden bedeckt stehen gelassen, dann von dem etwa entstandenen Niederschlag abfiltrirt. Das Filtrat wurde mit Silbernitrat gefällt und möglichst schnell durch ein gewogenes Filter filtrirt, der Niederschlag mit Ammoniakwasser ausgewaschen, bei 120° getrocknet und gewogen. In einer abgewogenen Menge dieses Niederschlages wurde dann wiederum eine Stickstoff-Bestimmung ausgeführt.

In dieser Weise wurden folgende drei Versuche angestellt:

Bezeichnung des Organs.	Leber vom Hund.	Milz vom Pferd.	Presshefe.
Stickstoffgehalt des feuchten Organs	3,42‰	3,14‰	2,24‰
Zur Bestimmung von Xanthin + Hypoxanthin angewandte Menge des feuchten Organs	236,5 gr.	270,0 gr.	515,0 gr.
Menge des Silberniederschlags bei 110—120° getrocknet	1,156 gr.	3,267 gr.	7,242 gr.
Stickstoffgehalt des Silberniederschlags	14,55‰	14,46‰	12,57‰

Setzt man für die Menge des in den Organen enthaltenen Gesamt-Stickstoffs die Zahl 100, so ergaben sich für den Stickstoff, der in Form der genannten Verbindungen enthalten ist, folgende Zahlen:

Leber	Milz	Hefe
2,08	5,57	7,91

Nach unseren heutigen Kenntnissen müssen wir annehmen, dass der untersuchte Niederschlag aus den Silberverbindungen des Xanthins, Hypoxanthins vielleicht auch des Carnins und Guanins besteht. Der Stickstoffgehalt des Xanthinsilbers ($C_5 H_4 N_4 O_2 + Ag_2 O$) beträgt 14,62%, der des Hypoxanthinsilbers ($C_{10} H_6 N_8 O_3 Ag_4$ bei 120° getrocknet) 15,6%.

Die aus Leber und Milz dargestellten Silberverbindungen enthalten fast so viel Stickstoff als ein Gemenge von Hypoxanthin- und Xanthin-Silberoxyd verlangt, die aus Hefe gewonnene Substanz zeigt eine bedeutende Abweichung.

Letztere Thatsache ist erklärlich, wenn man sie mit Schützenberger's Angaben²⁾ über die Bildung von Carnin aus der Hefe vergleicht. Das Carnin ist bedeutend stickstoffärmer als Xanthin und Hypoxanthin und wie jene durch ammoniakalische Silberlösung fällbar³⁾.

Vergleicht man die angeführten Zahlen mit den Werthen, welche ich früher für den Hypoxanthin-Gehalt der betreffenden Organe angegeben habe, so bemerkt man, dass in der Leber die Menge des Xanthin (oder der Xanthin bildenden Substanz) ungefähr gleich der des Hypoxanthins ist, in der Milz dagegen die des Hypoxanthins um ein mehrfaches übertrifft.

Will man aus diesen Zahlen einen Schluss ziehen auf den Stickstoff-Antheil, welcher innerhalb der lebenden Zelle dem Xanthin und Hypoxanthin zufällt, so muss man den Gehalt der Leber und Milz an Bindegewebe in Betracht ziehen. Bei dem untersuchten Milzgewebe waren auf mecha-

¹⁾ $2(C_5 H_4 N_4 O + Ag_2 O) - H_2 O$. Cf. Strecker, Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 108, S. 136.

²⁾ Bulletin de la Société chimique de Paris 1874, [2] XXI, p. 207.

³⁾ Die Zusammensetzung dieses Niederschlages ist noch nicht bekannt.

nischem Wege die bindegewebigen Antheile zum grossen Theil entfernt, bei der Leber nicht.

II.

Bei der Darstellung und quantitativen Bestimmung des Hypoxanthins in verschiedenen Thier- und Pflanzenstoffen wurde mehrfach die Beobachtung gemacht, dass die durch Umkrystallisiren aus heisser Salpetersäure erhaltene Silberverbindung des Hypoxanthins nicht die rein weisse Farbe des Hypoxanthin-Silbernitrats besass, sondern mehr oder weniger gelb gefärbt war. Bringt man einen solchen gelb gefärbten Niederschlag in Ammoniak, so färbt er sich intensiv roth. Zersetzt man die durch Digestion mit wässerigem NH_3 von Salpetersäure befreite Silberverbindung mit Schwefelwasserstoff, so erhält man neben dem Hypoxanthin eine schwerer lösliche, gelb gefärbte, undeutlich krystallisirende Substanz. In Folge der Beimengung dieser Substanz müssen natürlich die Hypoxanthin-Bestimmungen zu hoch ausfallen. Das Auftreten des gelben Körpers machte sich besonders bei der Untersuchung des Gehirns und der drüsigen Organe bemerkbar, während aus den Muskeln ein reines Präparat gewonnen wurde. Die gelbe Substanz ist ein nitrirtes Produkt unbekanntes Ursprungs, welches bei der Einwirkung der heissen Salpetersäure entsteht und durch Reduktionsmittel — wie es scheint — in Xanthin übergeführt wird. Kocht man ein in erwähnter Weise verunreinigtes Hypoxanthinpräparat in neutraler Lösung anhaltend mit Zinkstaub, so erhält man (eventuell nach Entfernung des in Lösung gegangenen Zinks) einen Verdampfungsrückstand von weisser Farbe. Wenn man diesen Rückstand in Ammoniak löst, die Lösung mit Silbernitrat fällt, den Niederschlag wieder aus Salpetersäure umkrystallisirt, so erhält man das reine Hypoxanthin-Silbernitrat.

Dass der Fehler, den die Beimengung dieses nitrirten Produktes bedingt, bei quantitativen Bestimmungen nicht zu vernachlässigen ist, ergiebt sich aus folgendem Versuch. Bei einer Untersuchung leukämischer Organe (Blut, Milz, Leber) wurde nach dem früher¹⁾ von mir beschriebenen Verfahren

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 152.

1,6173 gr. Hypoxanthin-Silbernitrat gewonnen, welches gelb gefärbt war. Die Verbindung wurde in Wasser zertheilt mit Schwefelwasserstoff behandelt, die vom Schwefelsilber abfiltrirte Flüssigkeit eingedampft und mit Natriumamalgam behandelt. Aus dieser Flüssigkeit wurden nur 1,3285 gr. Hypoxanthin-Silbernitrat (aus ca. 250 cc. Salpetersäure sp. Gew. 1,10 umkrystallisirt) wiedergewonnen, d. i. 82,14 % der ursprünglich vorhandenen Verbindung.

Es ergeben sich aus den angeführten Thatsachen ohne Weiteres einige Regeln für die quantitative Bestimmung des Hypoxanthins und für seine Darstellung in grösserem Masse. Für letzteren Zweck habe ich mit Vortheil Presshefe benutzt.

1½ Pfund Hefe werden mit 2 Liter Wasser und 10 cc. concentrirter Schwefelsäure 3—4 Stunden im Dampfkochtopf erhitzt, der nach Entfernung der Schwefelsäure und Phosphorsäure in ammoniakalischer Lösung erzeugte Silberniederschlag in bekannter Weise umkrystallisirt, zur Entfernung der Salpetersäure mit Ammoniak digerirt, der Rückstand mit Schwefelwasserstoff behandelt, die heiss filtrirte Flüssigkeit anhaltend mit Zinkstaub gekocht, die Ueberführung in die Silber-Verbindung und das Umkrystallisiren derselben wiederholt. Aus dem so erhaltenen Doppelsalz kann das reine Hypoxanthin dargestellt werden.

Zur Reinigung des Hypoxanthins lässt sich auch seine Widerstandsfähigkeit gegen Oxydationsmittel (z. B. übermangansaures Kali) verwerthen.

Ein durch vorsichtige Anwendung des übermangansauren Kalis in saurer Lösung gereinigtes Präparat erwies sich (in Uebereinstimmung mit den Angaben von Strecker, im Widerspruch mit denen von Weidel¹⁾) als nicht fällbar durch Bleiessig. Mit demselben Präparat gelang die von Weidel als charakteristisch für das Hypoxanthin angegebene Reaktion mit Chlorwasser, Salpetersäure und Ammoniak²⁾ nicht. Dagegen fand ich, dass Xanthin diese Reaktion in vorzüglicher Weise giebt.

¹⁾ Annalen d. Chemie, 158, S. 362.

²⁾ Loc. cit., S. 365.

Die Behandlung des Heisswasserextractes der Organe mit siedender Salpetersäure, wie sie zur Zerstörung des Leims von Salkowski¹⁾ vorgeschlagen und von Salomon²⁾ in Anwendung gezogen wurde, halte ich nicht für zulässig, so lange bis das Verhalten dieser Körper gegen Salpetersäure genauer erforscht ist. Die Reduktionsprodukte dieser Säure, die beim Kochen derselben mit den leicht oxydirbaren Substanzen der Gewebe entstehen, wirken kräftiger auf Xanthin und Hypoxanthin ein, als die Salpetersäure selbst. Ich möchte daran erinnern, dass nach Strecker das nitrierte Xanthin in Salpetersäure schwer löslich ist,³⁾ also bei quantitativen Bestimmungen die Menge des Sarkins anscheinend vermehrt.

Welches der Körper ist, der zu der Bildung des oben erwähnten Nitroprodukts Veranlassung giebt, das habe ich noch nicht entscheiden können. Durch besondere Versuche wurde ermittelt, dass das Hypoxanthin nicht, wie Schützenberger vermuthet (l. cit., S. 208) erst durch die Einwirkung der siedenden Salpetersäure, die zum Umkrystallisiren der Silbersalze dient, aus einem unbekanntem Körper oder aus Carnin entsteht, sondern dass es bereits durch die Einwirkung der verdünnten Schwefelsäure auf die Organe als solches abgespalten wird. Es wurde aus der Leber vom Pferd, ohne Anwendung von Salpetersäure, reines Hypoxanthin dargestellt. Die durch ammoniakalische Silberlösung fällbaren Extractstoffe des mit verdünnter Schwefelsäure gekochten Organs, vom Silber befreit und mehrfach aus Wasser umkrystallisirt, lieferten folgende Zahlen für den Stickstoff:

Berechnet für	Gefunden	
	Präparat I.	Präparat II
Hypoxanthin 41,2	41,4	40,86
Xanthin 36,8		
Carnin 28,6		

Das zur Darstellung von Präparat I benutzte Extract war von den durch Bleiessig fällbaren Substanzen befreit, Präparat II war nicht mit Bleiessig behandelt.

¹⁾ Archiv f. d. ges. Physiologie 4, S. 94.

²⁾ Verhandl. d. physiol. Gesellschaft zu Berlin 1881, Nr. 12—14.

³⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 108, S. 155.

III.

Nach Strecker¹⁾ wird das Hypoxanthin durch rauchende Salpetersäure in ein Nitroprodukt verwandelt, welches bei der Reduction in Xanthin übergehen soll. Diese Reaktion ist von besonderem Interesse, da sie bis jetzt die einzige ist, welche einen Zusammenhang des Hypoxanthins mit der Gruppe des Guanins, der das Xanthin, Theobromin und Caffein angehören, erkennen lässt. Wäre die Angabe Strecker's richtig, so wäre die Constitution der Hypoxanthins der Hauptsache nach festgestellt, da die Constitution des Xanthins durch die neuesten Untersuchungen von E. Fischer²⁾ klar gelegt ist.

Ich habe bis jetzt vergebens versucht, die Angabe Strecker's zu bestätigen.

Das Xanthin ist bekanntlich durch folgende Reaktion ausgezeichnet. Dampft man Xanthin mit reiner Salpetersäure auf dem Wasserbade ein, so hinterbleibt ein gelber Rückstand, welcher, mit Kalilauge befeuchtet, eine schön rothe Färbung zeigt. Das Hypoxanthin giebt diese Reaktion nicht.

Zu dem folgenden Versuch diente ein xanthinfreies, durch eine Stickstoffbestimmung als rein erkanntes Hypoxanthin-Präparat. Das Hypoxanthin wurde mit rauchender Salpetersäure, in der es sich schon in der Kälte unter Aufbrausen löst, auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand wiederum mit rauchender Salpetersäure aufgenommen und nochmals zur Trockne verdunstet. Es hinterblieb ein gelber, in Wasser schwer löslicher Rückstand, der keine Xanthin-Reaktion gab und sich in Kalilauge mit braungelber Farbe löste. Diese Lösung wurde durch Natriumamalgam allmählig entfärbt. Aus der mit Natriumamalgam behandelten alkalischen Lösung fällte Silbernitrat bei Gegenwart von viel Ammoniak einen gelatinösen Körper, der abfiltrirt und in heisser Salpetersäure vom sp. Gew. 1,10 gelöst wurde. Beim Erkalten der Salpetersäure fiel die Substanz fast völlig wieder

¹⁾ Loc. cit., S. 156.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XV, S. 453.

aus. Dieser Niederschlag wurde abfiltrirt (das salpetersaure Filtrat mit Ammoniak übersättigt, gab nur spärliche für eine Untersuchung nicht ausreichende Flocken). Der Niederschlag enthielt 38,6 % Ag (während Hypoxanthin 35,2 % Ag verlangt). Derselbe wurde durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit. Es wurde eine Substanz erhalten, die sich bei Anstellung der oben erwähnten Xanthin-Reaktion weder wie Xanthin noch wie Hypoxanthin verhielt, da sie mit Kalilauge eine braungelbe Färbung gab. Es sei noch erwähnt, dass Xanthin unter ähnlichen Bedingungen mit Natriumamalgam behandelt, nicht die Fähigkeit einbüsst, in der erwähnten Weise gegen Salpetersäure und Kali zu reagiren. Auch Versuche, in denen statt des Natriumamalgams, ein schwächeres Reduktionsmittel, das Eisenoxydul, angewandt wurde, führten zu keinem anderen Resultat.

Die direkte Oxydation des Hypoxanthins zu Xanthin gelang ebensowenig mit übermangansaurem Kali in saurer Lösung. Entsprach die Menge des zugesetzten Oxydationsmittels der Einführung von 1 Atom Sauerstoff in ein Molekül Hypoxanthin, so wurde ein Theil des Hypoxanthins unter Bildung von Oxalsäure oxydirt, ein anderer Theil blieb intact. Aus der Lösung des Oxydationsgemisches erhielt ich beträchtliche Mengen Hypoxanthin, dessen Reinheit durch die N-Bestimmung bestätigt wurde (Ber. 41,2; Gef. 41,3). Dasselbe enthielt keine nachweisbare Spur von Xanthin.

Wird Hypoxanthin im zugeschmolzenen Rohr mit Wasser auf 200° erhitzt, so zersetzt es sich unter Auftreten von Kohlensäure, Ammoniak und einer geringen Menge Ameisensäure.

Mit schmelzendem Kali auf 200° erhitzt, wird das Hypoxanthin unter Bildung von Ammoniak und Cyanwasserstoff zersetzt. Die Einwirkung des schmelzenden Kalis geschah in der früher von Hoppe-Seyler angewandten Weise im Oelbade in einer Retorte durch welche ein Wasserstoffstrom geleitet wurde. Das bei der Reaktion frei werdende Ammoniak wurde in der mit Salzsäure beschickten Vorlage aufgefangen. Die Kalischmelze wurde in Wasser gelöst, mit

Weinsäure angesäuert und destillirt, der Cyanwasserstoff im Destillat mit Silbernitrat gefüllt. Die Einwirkung des schmelzenden Kalis dauerte 3 bis 4 Stunden.

Versuch I. Temperatur 200°.

0,3812 gr. Hypoxanthin geben
 0,0246 gr. Blausäure und
 0,04528 gr. Ammoniak, d. i.
 6,45 % CNH und
 11,9 % NH₃.

Versuch II. Temperatur 225—230°.

0,6450 gr. Hypoxanthin geben
 0,0378 gr. Blausäure und
 0,1141 gr. Ammoniak, d. i.
 5,86 % CNH und
 17,7 % NH₃.

Es ist in diesen Versuchen noch nicht die Hälfte vom gesammten Stickstoff des Hypoxanthins in Form von Blausäure und Ammoniak wiedergefunden.

Die Bildung einer beträchtlichen Menge Cyanwasserstoff durch die Einwirkung des schmelzenden Kalis bei 200° ist eine Reaktion, welche — nach einigen vorläufigen Versuchen, die ich zu ergänzen gedenke — ausser dem Hypoxanthin noch den Methylderivaten des Xanthins, dem Theobromin und Caffein zukommt, während Harnsäure, Guanin, Guanidin, Biuret, Leucin, Glycocoll u. a. sie nicht zeigen. Bei einer Anzahl stickstoffhaltiger Verbindungen treten unter den angegebenen Verhältnissen sehr geringe Mengen von Blausäure auf.

Die Annahme, dass Substanzen aus der Gruppe der Cyanverbindungen als intermediäre Produkte des thierischen Stoffwechsels gebildet werden, ist mehrfach zur Erklärung der in den Organismen verlaufenden chemischen Prozesse herbeigezogen. Die vorliegenden Versuche beweisen, dass in gewissen, vorzugsweise dem Zellkern eigenthümlichen Körpern die Bedingungen für die Bildung von Cyanwasserstoff günstige sind.

Die Blausäure entstand in den vorliegenden Experimenten durch einen Process, dessen Aehnlichkeit mit einzelnen chemischen Vorgängen der lebenden Organe wohl behauptet werden kann. Die Einwirkung der Alkalien¹⁾ bei höherer Temperatur und speciell die des schmelzenden Kalis²⁾ auf organische Stoffe ist bereits von andern Autoren mit der Einwirkung von Fäulnisorganismen verglichen worden.

¹⁾ Hoppe-Seyler. Archiv für die gesammte Physiologie. Band 12, S. 1.

Hoppe-Seyler. Physiologische Chemie. Bd. I, S. 119 und 120.

²⁾ Nencki, Journal für practische Chemie. N. F. Bd. 17, S. 105.

Strassburg, Physiologisch-chemisches Institut, den 4. April 1882.

Nachtrag.

Nach Abschluss der vorliegenden Mittheilung habe ich bei der weiteren Untersuchung des oben erwähnten (S. 423) Silberniederschlags aus Presshefe aus demselben einen Körper isolirt, welcher sich durch seine Eigenschaften und seine Zusammensetzung als Guanin characterisirte. Dasselbe wurde als salzsaures Salz in krystallisirtem Zustand gewonnen. Aus diesem Salz wurde durch Zersetzung mit Ammoniak die freie, in Ammoniak unlösliche Base gewonnen. Die Analyse derselben lieferte folgende procentische Werthe für den Stickstoff:

Berechnet:

für Guanin . . 46,35

für Hypoxanthin 41,2

Gefunden:

45,4

Ich glaube diesem Befunde einiges Interesse beimessen zu dürfen, weil durch denselben das Vorkommen des Guanins im Pflanzenreiche sichergestellt ist.

Bereits Schützenberger (loc. cit.) hat, gestützt auf einige qualitative Reaktionen, die Bildung von Guanin bei der Selbstgährung der Hefe behauptet.

Es liegt die Vermuthung nahe, dass durch die Einwirkung der Säuren bei höherer Temperatur auf organische Gewebe neben Hypoxanthin und Xanthin auch Guanin gebildet wird, dass ferner der oben erwähnte Körper, der unter gewissen Verhältnissen dem Hypoxanthin beigemengt ist, Guanin sei.

A. Kossel.