

Beiträge zur Kenntniss der Nucleine.

Von

Dr. Hans Malfatti.

(Aus dem Laboratorium für angew. med. Chemie der Universität Innsbruck.)

(Der Redaction zugegangen am 10. August 1891.)

Gelegentlich der Entscheidung der Frage, ob die Schleimsubstanz des Harnes den Mucinen oder den Nucleoalbuminen zuzuzählen sei, war ich genöthigt, mich mit der letzteren Klasse von Eiweisskörpern eingehender zu befassen. Besonders waren es die in letzter Zeit von Altmann¹⁾ aufgefundenen Nucleinsäuren, welche die Aufmerksamkeit in Anspruch nahmen. Die Entdeckung dieses Atomcomplexes, der einerseits als Spaltungsproduct, anderseits als Mittel zur Synthese der Nucleoalbumine, für diese Körperklasse charakteristisch ist, war nämlich im Stande, die von Liebermann²⁾ aufgestellte und allerdings nicht widerspruchslos angenommene Auffassung der Nucleine, als Verbindungen von Eiweiss mit Metaphosphorsäure umzustossen; und dieses um so mehr, als in letzter Zeit Kossel³⁾ zeigte, dass gerade dieser Complex es ist, der bei Behandlung mit Säuren die auch aus manchen natürlich vorkommenden Nucleinen erhältlichen Xanthinkörper liefert.

¹⁾ Altmann, Du Bois-Reymond's Archiv, Physiol. Abth. 1889, S. 514.

²⁾ Liebermann, Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 21, S. 598.

³⁾ Kossel, Du Bois-Reymond's Archiv, Physiol. Abth., 1891, S. 191.

Die Möglichkeit, aus den Nucleinen eine charakteristische Atomgruppe abzuspalten, gibt aber anderseits ein Mittel an die Hand zur Entscheidung der Frage, ob das Liebermann'sche Nuclein den in der Natur vorkommenden Nucleinen zuzurechnen, oder von ihnen zu trennen sei. Jedenfalls musste die aus Liebermann'schem Nuclein darstellbare Säure jener Klasse von Nucleinsäuren angehören, die aus den von Hoppe-Seyler als Nucleine der zweiten Gruppe bezeichneten abstammen, d. h. von jenen, die bei der Zersetzung keine Xanthinkörper liefern, und die Kossel darum unter dem Namen «Paranucleine» von den eigentlichen Nucleinen abgetrennt wissen will. Ferner kann diese Reaction (Abspaltung der Nucleinsäure) dazu dienen, um zu entscheiden, ob jene von Liebermann¹⁾ dargestellten Körper, in denen Eiweiss, Metaphosphorsäure und Xanthinbasen zu einem den Nucleinen der ersten Gruppe (Hoppe-Seyler) ähnlichen Complexe vereinigt sind, diesen letzteren thatsächlich zugehören oder nicht.

Diese Fragen habe ich durch Versuche zu entscheiden gesucht und glaube dieselben im bejahenden Sinne beantworten zu dürfen.

Als Ausgangsmaterial für diese Versuche diente ein möglichst phosphorreiches Liebermann'sches Nuclein. Ein solches erhält man am besten, wenn man eine sehr gehaltreiche Eiweiss- oder Acidalbuminlösung zu einer concentrirten Lösung einer vorher zu berechnenden Menge von Metaphosphorsäure unter Umschwenken rasch hinzugiesst. Ich löste gewöhnlich 25 gr. Eiweiss aus Blutserum in 1 Liter verdünnter Salzsäure von 3‰ Säuregehalt unter Erwärmen auf, und vermischte diese Lösung nach dem Filtriren in der oben beschriebenen Weise mit 6,5 gr. Metaphosphorsäure, mit einer Menge, die ausreicht, um für 25 gr. Eiweiss 10% P zu liefern. Die so erhaltenen Fällungen hatten fast regelmässig einen Gehalt von etwa 6% P.

¹⁾ Liebermann, Centralbl. f. d. med. Wissensch., 1889, S. 210 und 225.

Es ist nämlich der P-Gehalt des Liebermann'schen Nucleins durchaus nicht ein constanter, wie das ja auch das ungemeine Schwanken der P-Werthe der natürlich vorkommenden Nucleine vermuthen lässt. Der entgegengesetzte Befund von Pohl¹⁾ dürfte wohl dadurch zu erklären sein, dass dieser bei der Darstellung seines zweiten Präparates, das nicht der wiederholten Einwirkung von Alkalien und Säuren unterworfen war und deswegen P-reicher als die übrigen Präparate hätte sein müssen, von vorneherein die fällende Metaphosphorsäure im Verhältniss zu den ersteren Versuchen in geringerer Menge zusetzte. Die Menge des zugesetzten Fällungsmittels hat nämlich einen ganz bedeutenden Einfluss auf den P-Gehalt des entstehenden künstlichen Nucleins; in welch' hohem Grade dies der Fall ist, möge folgender Versuch zeigen.

Eine Lösung von etwa 1 gr. Metaphosphorsäure in 300 cbcm. Wasser wurde fractionsweise mit kleinen Mengen einer verdünnten Lösung von reinem Serumalbumin versetzt; die jedesmal entstehenden geringfügigen Niederschläge wurden, sobald sie sich zu Boden gesetzt hatten, durch Decantiren von der Hauptmasse der Flüssigkeit getrennt, dann auf einem kleinen Filterchen gesammelt, einmal mit Wasser, dann mehrmals mit Alkohol gewaschen und der Phosphorsäurebestimmung zugeführt. Diese wurde, wie in den folgenden Versuchen, durch Titration mit essigsaurer Uranlösung ausgeführt. Die Art der Ausführung werde ich am Schlusse noch näher zu besprechen haben.

Die bei den eben erwähnten Versuchen gefundenen P-Werthe waren folgende:

Fraction I	0,1705 gr. Subst.	verbrauchten	3,95 cbcm. Uranlösung	= 5,2	P
»	II 0,1535	»	»	3,25	»
»	III 0,1040	»	»	2,1	»
»	IV 0,1290	»	»	2,3	»

Nun wurde durch Zusatz von mehr Eiweisslösung der grösste Theil der Metaphosphorsäure entfernt, und darauf

¹⁾ Pohl, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 13, S. 292.

wiederrum eine kleine Menge der erwähnten verdünnten Eiweisslösung zugefügt. Die jetzt erhaltene Fällung ergab:

Fraction V 0.0670 gr. Subst. verbrauchten 1.0 chem. Uranlösung = 2.5% P.

Da die Flüssigkeitsmenge schon eine bedeutendere und der Einfluss der Verdünnung schon zu gross geworden war, wurde der Versuch unterbrochen.

In einem anderen Versuche, bei dem ich eine grössere Menge einer verdünnten Syntoninlösung (aus Eiweiss durch concentrirte Salzsäure erhalten) mit Metaphosphorsäure gefällt hatte, und wo das Fällungsproduct 4,8% P¹⁾ enthielt, konnte ich durch weiteren Zusatz von Metaphosphorsäure zum klaren Filtrate einen Niederschlag erhalten von 6,1% P-Gehalt²⁾.

Dass natürlich ausser der Menge des Fällungsmittels auch die Einwirkung des Wassers, der Säuren und Alkalien den P-Gehalt der Metaphosphorsäure-Verbindungen des Eiweisses und des Leims³⁾ in hohem Maasse beeinflussen, ist bekannt: So wurde z. B. das eben erwähnte Präparat von 6,1% P-Gehalt durch 12maliges Aufschwemmen mit Wasser und darauffolgendes Decantiren der Flüssigkeit, auf einen P-Gehalt von 1,6%⁴⁾ gebracht, was allerdings auf eine ausnahmsweise grosse Veränderlichkeit desselben schliessen lässt. Der P spaltet sich dabei in gebundener Form ab, ob als Nucleinsäure oder als Metaphosphorsäure ist unentschieden, doch ist das Letztere nach Liebermann's⁵⁾ neueren Untersuchungen das Wahrscheinlichere.

Auch als dasselbe Präparat, welches zu dem oben erwähnten Versuche gedient hatte, in etwa 200 chem. Wasser

¹⁾ 0.146 gr. Subst. verbrauchten 3.15 chem. Uranlösung = 4,85% P.

0.2165 » » » 4.5 » » = 4,81% »

²⁾ 0.1227 gr. Subst. verbrauchten 3.25 chem. Uranlösung = 5,96% P.

0.2085 » » » 5.75 » » = 6,2% »

³⁾ A. Lorenz, Pflüger's Archiv, Bd. 47, S. 189.

⁴⁾ 0.123 gr. Subst. verbrauchten 1.2 chem. Uranlösung = 1,79% P.

0.050 » » » 0.5 » » = 1,43% »

⁵⁾ Liebermann, Pflüger's Archiv, Bd. 46, S. 155.

aufgeschwemmt und dann 5mal nach einander mit Hilfe von möglichst wenig Ammoniak gelöst und jedesmal gleich darauf wieder mit Essigsäure gefällt wurde, sank der P-Gehalt desselben ebenfalls auf 1,6%¹⁾). Der P spaltete sich in diesem Falle in Form einer P-reichen, vielleicht der Nucleinsäure nahe stehenden Verbindung ab, denn aus dem ziemlich stark essigsäurehaltigen Filtrate — ich hatte bei den letzten Fällungen stark ansäuern müssen, damit noch ein Niederschlag entstanden war — schied sich nach dem Zusatz von Salzsäure nach längerem Stehen, ohne dass Alkohol zugefügt worden wäre, ein weisser Niederschlag mit 5,9% P²⁾ ab.

Ich konnte überhaupt mehrfach die Erfahrung machen, dass die P-reichen Nucleine schon durch die Einwirkung von viel geringeren Mengen vom Alkali — in diesem Falle z. B. schon durch öfteres Lösen in möglichst wenig Ammoniak — zur Abspaltung der Nucleinsäure oder ähnlicher Körper gebracht werden, als die P-armen Nucleine.

Nichtsdestoweniger hielt ich mich bei meinen Versuchen, aus der Metaphosphorsäure-Eiweiss-Verbindung eine Nucleinsäure darzustellen, stets an das von Altmann³⁾ angegebene Verfahren. Das in Anwendung gebrachte Liebermann'sche Nuclein wurde mit der entsprechenden Menge von Natronlauge (1 : 30) durch 5 Minuten behandelt, die Lösung verdünnt, mit Salzsäure fast neutralisirt und mit verdünnter Essigsäure vorsichtig angesäuert. Dabei zeigte die Flüssigkeit eine stark saure Reaction, schon lange bevor noch ein Niederschlag entstand. Dieser Niederschlag, der gewöhnlich lichtbräunlich oder gelblich gefärbt, manchmal auch rein weiss ist, setzt sich, wenn genügend Essigsäure zugefügt wurde, rasch in Flocken ab; er enthält keinen oder nur sehr wenig Phosphor. Ich fand nämlich bei Präparaten, die von verschiedenen Operationen stammten, nur Spuren von P, d. h.

¹⁾ 0,1232 gr. Subst. verbrauchten 1,2 ccm. Uranlösung = 1,71 P.
0,1007 „ „ „ 0,9 „ „ = 1,47

²⁾ 0,0825 gr. Subst. verbrauchten 2,3 ccm. Uranlösung = 5,94 P.

³⁾ Altmann, l. c.

bei der P-Bestimmung brachten schon die ersten Tropfen der zur Titration verwendeten Uranlösung eine Braunfärbung der als Indicator dienenden Ferrocyankalium-Lösung hervor; die Grenze der erhaltenen P-Werthe nach oben schwankte und wuchs mit der Menge der zur Fällung verwendeten Essigsäure, weil durch einen Ueberschuss dieser Säure ein P-reicherer Körper mit gefällt wird.

Verwendet man zur Darstellung der künstlichen Nucleinsäure, aus Alkalialbuminat erhaltenes Liebermann'sches Nuclein, indem man am einfachsten zu einer Lösung von Eiweiss in Alkali von der entsprechenden Concentration die Metaphosphorsäure-Lösung giesst und dann in der beschriebenen Weise vorgeht, so ist der erwähnte Niederschlag eigenthümlich zäh, fast harzartig, und, wahrscheinlich weil man gewöhnlich viel Essigsäure zusetzen muss, um ihn zu erhalten, etwas P-reicher als der aus Acidalbumin erhaltene, nämlich 1—3% P-haltig. Auch ist bei Anwendung von Alkalialbuminat die überstehende Flüssigkeit häufig milchig trüb, und es ist nicht möglich, eine gute Nucleinsäure daraus zu erhalten; gelingt aber die Reaction dennoch, so ist die Ausbeute wenigstens dem Augenmasse nach eine beträchtlich bessere, als bei Anwendung von Eiweiss oder Acidalbumin. Der Sicherheit der Ausbeute wegen zog ich jedoch vor, bei meinen Versuchen Liebermann'sches Nuclein aus Syntonin mit Metaphosphorsäure gefällt zu verwenden.

Nachdem nun der oben erwähnte, durch Ansäuern des Reactionsproductes erhaltene P-arme Niederschlag abfiltrirt war, wurde das Filtrat mit kleinen Mengen von verdünnter Essigsäure versetzt und der jedesmal entstehende Niederschlag abfiltrirt; und da zeigte es sich nun, dass man zu jeder späteren Fällung mehr Essigsäure brauchte, damit noch ein Niederschlag entstände, als zu dem vorhergehenden, und zugleich zeigten die späteren Fällungsproducte einen mit jeder Fraction steigenden P-Gehalt. Ich fand bei verschiedenen Operationen alle möglichen Werthe bis zu 9.5% P. Diese letzten P-reichen Niederschläge sind aber immer sehr spärlich und schliesslich bringt verdünnte Essigsäure gar keinen Nieder-

schlag mehr hervor, und nur mehr concentrirte Essigsäure ist noch manchmal im Stande, im Ueberschuss eine Fällung entstehen zu lassen; der eben erwähnte Werth 9,5% P stammt von einer derartigen Fällung.

Alle diese nur durch einen Ueberschuss von Essigsäure hervorgebrachten Niederschläge unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nicht sehr von der Altmann'schen Nucleinsäure; sie sind in ammoniakalischem Wasser leicht löslich und die Lösung zeigt bei genügend vorsichtiger Versuchsanordnung saure Reaction; durch Essigsäure werden sie nur in einem bestimmten Ueberschuss gefällt. Eine schwach essigsäure Lösung wird durch Alkohol in nicht unverhältnissmässig grosser Menge nicht gefällt, fällt aber ihrerseits Eiweisslösungen in ausgezeichneter Weise. Bemerkenswerth ist auch die leichte und vollständige Löslichkeit des Körpers in concentrirter Salpetersäure, und das Fehlen oder nur schwache Auftreten der Millon'schen Reaction.

Wegen des wechselnden P-Gehaltes halte ich diese Körper für Gemische von Eiweisskörpern mit Nucleinsäure, obwohl es mir nicht gelang, durch Auflösen der Producte in Ammoniak und fractionirtes Fällen der Lösung mit Essigsäure sie in ihre Bestandtheile zu zerlegen. Der von dem letzterem Umstande begünstigten Annahme, es handle sich da um eigentliche Verbindungen, steht zwar auch nichts entgegen, da wir ja wissen, wie leicht der grosse Gruppencomplex, den wir Eiweissmolecul nennen, kleinere Atomgruppen aufnimmt oder abgibt, ohne dadurch seine charakteristischen Eigenschaften zu verlieren. Man könnte hierbei vielleicht an eine durch den Essigsäure-Ueberschuss bewirkte Bildung einer Anhydridform denken, wie solche bei manchen Farbstoffen, z. B. Eosinen, vorkommen, deren Farbstoffsäuren in selbst säurehaltigem Wasser zwar löslich sind, durch einen etwas grösseren Säure-Ueberschuss jedoch unter Bildung einer Anhydridform gefällt werden. Auch Miescher¹⁾ fordert eine ähnliche Einwirkung

¹⁾ Miescher, Verhandlungen d. naturforschenden Gesellsch. Basel, Bd. 6, Heft 1.

der Säure, um ein ähnliches Verhalten des Spermanucleins zu erklären: und er spricht sich am selben Orte dahin aus, dass jede neue Combination von Nuclein, Alkali, Protamin, alkalischen Erden wieder ein Körper für sich sei, der . . . vielleicht auch sonst seine eigenthümliche Molecülanordnung hat. In ähnlicher Weise mag auch jede der Combinationen von Nucleinsäure und Eiweiss, von denen ich oben sprach, als ein Körper für sich aufgefasst werden.

Ich erwähnte vorher, dass ich den eben besprochenen nucleinsäureartigen Körper in Fractionen aus der Reactionsflüssigkeit gefällt habe. Diese Vorsichtsmassregel erwies sich als nothwendig, denn als ich in einem Falle die ganze zur Fällung nothwendige Essigsäuremenge auf einmal zusetzte, fiel mit dem entstehenden Niederschlage des nucleinsäureartigen Körpers auch die gesammte eigentliche Nucleinsäure aus, und das Verfahren musste unter Anwendung der erwähnten Vorsicht und diesmal mit Erfolg wiederholt werden.

Die eigentliche Nucleinsäure, die zum Schluss in der ziemlich stark sauren Lösung verbleibt, wurde genau nach Altmann¹⁾ mit verdünnter Salzsäure als rein weisser Niederschlag oder auch nur als milchige Trübung gefällt und mit Alkohol zum Absitzen gebracht. In einem Falle habe ich aus 10 gr. trockenen Liebermann'schen Nucleins 0,5 gr. dieser rohen Nucleinsäure erhalten, doch dürfte diese gute Ausbeute zu den Ausnahmen gehören. Die Substanz zeigte alle von Altmann²⁾ für die Nucleinsäure angegebenen Reactionen und erwies sich als äusserst P-reich, ich fand Werthe von 12,3—11,6% P³⁾. Dabei gelang es mir aber nicht, den Körper schwefelfrei zu erhalten.

¹⁾ Altmann, l. c.

²⁾ Altmann, l. c.

1. 0,0865 gr. Subst.	verbrauchten 4,35 cchem. Uranlösung	= 11,3 % P.
2. 0,1180 »	»	6,00 » = 11,44 »
3. 0,1200 »	»	6,2 » = 11,62 »
4. 0,1210 »	»	6,2 » = 11,53 »

Die Analysen 3 und 4 stammen von demselben Präparate, die von 1 und 2 von je einem verschiedenen.

Die künstliche Nucleinsäure unterscheidet sich also von den Altmann'schen, aus natürlichen Nucleinen dargestellten Nucleinsäuren durch den hohen P-Gehalt und ferner durch eine grössere Veränderlichkeit in Bezug auf ihre Löslichkeitsverhältnisse, sie wird nämlich durch das Reinigungsverfahren — wiederholtes Lösen in Ammoniak, Fällen mit Salzsäure, Behandeln mit Alkohol und Aether, Trocknen u. s. f. — leicht vollständig oder theilweise in eine in Ammoniak weniger leicht lösliche und durch Essigsäure fällbare Modification übergeführt, die vielleicht dasselbe ist, wie der früher besprochene nucleinsäureartige Körper (S. 73).

Ein tiefer greifender Unterschied zwischen der künstlichen und den natürlichen Nucleinsäuren ist aber durch die Möglichkeit geboten, aus den letzteren Xanthinkörper abzuspalten, aus der ersten aber nicht. Wenn man möglichst reine oder auch noch mit Eiweiss verunreinigte künstliche Nucleinsäure mit Wasser verrührt, so entsteht, ebenso wie bei den Versuchen mit Hefenucleinsäure, eine sauer reagirende, trübe Flüssigkeit, welche dann beim Erhitzen, unter Abscheidung geronnener Flocken, klar, stärker sauer und phosphorsäurehaltig wird. Aber weder bei dieser Behandlung, noch beim anhaltenden Kochen mit verdünnten Mineralsäuren war es möglich, in dem Reactionsproduct mit Hilfe von ammoniakalischer Silberlösung eine xanthinähnliche Substanz nachzuweisen. Aus Hefenucleinsäure jedoch entsteht eine solche leicht, auch unter Anwendung viel kleinerer Substanzmengen, als ich sie zu meinen Versuchen an künstlicher Nucleinsäure in Arbeit nahm.

Es ist also die besprochene Nucleinsäure sicher nicht identisch mit jener aus Hefe, und insofern man die Nucleine als Verbindungen von Eiweiss mit Nucleinsäuren auffassen kann, also auch das Liebermann'sche Nuclein verschieden von dem Hefenuclein.

Nun hat aber Altmann¹⁾ aus dem Nuclein des Eidotters eine Nucleinsäure abgespalten, und mir gelang es, aus dem

¹⁾ Altmann, l. c.

Casein — es wurde sogenannter Topfen verwendet — in 2 Versuchen nach dem Altmann'schen Verfahren eine geringe Menge einer Substanz darzustellen, die in Ammoniak löslich, durch Essigsäure nicht, wohl aber durch Salzsäure fällbar war, in essigsäure Lösung Eiweiss reichlich fällte, und beim Zerlegen mit verdünnter Schwefelsäure in der Wärme, wie es nicht anders zu erwarten war, keine Spur eines Xanthinkörpers lieferte. Eine solche Substanz muss in Betracht ihrer Herkunft und Darstellungsweise sowohl, als auch ihrer Eigenschaften ebenso wie der von Altmann aus dem Eidotter erhaltene Körper zu den Nucleinsäuren — Paranucleinsäuren — gerechnet werden.

Zu diesen «Paranucleinsäuren» ist auch die beschriebene Nucleinsäure aus der Eiweissmetaphosphorsäure-Verbindung zu zählen, und das Liebermann'sche Nuclein stellt sich damit, durch die Möglichkeit der Abspaltung einer solchen Säure, in die gleiche Reihe mit den natürlich vorkommenden Paranucleinen.

Der Umstand aber, dass die letztgenannte Körperklasse überhaupt im Stande ist, bei der bekannten, verhältnissmässig einfachen Behandlung eine Nucleinsäure zu liefern, legte den Gedanken an eine grosse constitutionelle Aehnlichkeit dieser Körper mit den eigentlichen Nucleinen sehr nahe. Nur die Fähigkeit, bei der Zersetzung Xanthinkörper zu liefern, unterscheidet sowohl die ursprünglichen Körper, als auch die davon abgespalteten Säuren der Nucleinreihe, von denen der Paranucleinreihe.

Da nun aber Liebermann¹⁾ aus Eiweiss, Metaphosphorsäure und Xanthinkörpern eine Verbindung darstellte, die dem Hefenuclein in einigen ihrer Reactionen ähnlich war, also sich zum gewöhnlichen Liebermann'schen Nuclein verhielt wie ein echtes Nuclein zu einem Paranuclein, wollte ich den Versuch machen, wie sich ein solcher Körper zur Altmann'schen Reaction verhielte, um zu entscheiden, ob nur gemeinschaftliche Unlöslichkeit, oder aber eine innigere Bindung die beiden

¹⁾ Liebermann, l. c.

Körper zu einem Niederschlage vereinige. Kossel¹⁾ konnte bekanntlich aus Hefenucleinsäure Guanin und Adenin abscheiden. Ich benützte mir zu Gebote stehendes Guanin zu meinem Versuche. Dieses wurde in verdünnter Kalilauge gelöst und zu einer Aufschlammung von Liebermann'schem Nuclein — aus Alkalialbuminat bereitet — gebracht und so viel Kalilauge zugefügt, dass die Mischung die entsprechende Verdünnung (1 : 30) erhielt. Dann ging ich in der schon beschriebenen Weise weiter vor. Die mit Essigsäure erhaltenen Niederschläge verhielten sich, wie schon beschrieben, und gaben nach dem Zerlegen mit Schwefelsäure in der Wärme eine Flüssigkeit, in welcher durch Ammoniak und Silberlösung keine oder nur Spuren von Xanthinkörpern nachgewiesen werden konnten. Nachdem die gerade besprochenen Niederschläge aus der nucleinsäurehaltigen Flüssigkeit entfernt waren, wurde letztere mit Salzsäure gefällt und die Hälfte des Volums Alkohol zugefügt. Eine Probe des Niederschlages löste sich bei Ammoniakzusatz klar auf und erst nach längerem Stehen in der Sonne hatte sich ein geringer Niederschlag, der aus Guanin bestand, am Boden des Gefässes abgesetzt.

Die übrigbleibende Menge der Nucleinsäure wurde auf einem Filter gesammelt, und für den Fall, dass etwa der Alkohol allenfalls vorhandenes Guanin gefällt hätte, öfters (4—5 Male) mit salzsäurehaltigem Wasser auf dem Filter gewaschen. Diese Waschwässer enthielten Metaphosphorsäure, sie waren im Stande, in Eiweisslösung einen Niederschlag hervorzubringen; jedoch mit Ammoniak und Silberlösung gaben sie selbst nach dem Eindampfen einer Probe nur eine leichte Trübung. Desto auffallender war es, dass der auf dem Filter verbleibende Niederschlag nach dem Zerlegen mit verdünnter Schwefelsäure in der Wärme eine Flüssigkeit lieferte, welche mit Ammoniak und Silberlösung eine dichte Fällung ergab. Diese Letztere wurde aus heisser Salpetersäure unter Harnstoffzusatz umkrystallisirt, und lieferte reichlich Krystalle von der Form gekrümmter, gewöhnlich zu Kugeln vereinigtcr Nadelchen, wie man sie auch aus dem Zersetzungsproducte

¹⁾ L. c.

der Hefenucleinsäure durch die gleiche Behandlung und aus dem käuflichen Guanin erhalten kann.

Massgebend an diesem Versuche, den quantitativ zu verfolgen ich gegenwärtig durch äussere Umstände verhindert bin, ist der Umstand, dass jene durch Säuren bewirkten Fällungen, die nicht Nucleinsäure waren, kein Guanin enthielten, diese Letztere aber, der Schätzung nach, wohl die ganze anfänglich zugesetzte Menge.

Ein ähnlicher Versuch, mit Hypoxanthin angestellt, misslang. Wohl erhält man ein Endproduct, das mit Alkohol und dann mit Aether, wie es bei der Darstellung der gewöhnlichen Nucleinsäure üblich ist, gewaschen, nach dem Zerlegen mit Schwefelsäure etwas Hypoxanthin liefert; aber durch salzsäurehaltiges Wasser lässt sich dieser letztere Körper so rasch und vollständig aus dem Nucleinsäure-Niederschlage auswaschen, dass an eine, wenn auch lockere chemische Bindung der beiden Körper diesmal wohl nicht gedacht werden kann.

Der Versuch mit Guanin zeigt, dass wenigstens dieser eine Xanthinkörper mit dem Liebermann'schen Nuclein eine chemische Bindung eingehen kann, und dass diese Bindung an jenem Complex erfolgt, der später als Nucleinsäure abgespalten wird und als solcher charakteristisch für die echten Nucleine ist. Der Versuch zeigt aber auch mit Sicherheit, dass die «Paranucleine» nicht in einem Gegensatz stehen zu den Nucleinen, sondern dass Letztere durch den einfachen Hinzutritt des betreffenden Xanthinkörpers aus den Ersteren entstehen können. Ob eine einfache Addition oder eine Bindung unter Ersatz einer anderweitigen Atomgruppe vorliegt, muss unentschieden bleiben.

Die Annahme, dass die Xanthinkörper liefernden Nucleinsäuren durch den Hinzutritt der betreffenden Atomgruppen zu den gewöhnlichen Para-Nucleinsäuren entstünden, würde auch den hohen P-Gehalt der künstlichen Nucleinsäuren erklären. Während Altmann für seine Nucleinsäure aus Lachsperma 9,6% P fand, und sich aus den zweiten der von

Kossel¹⁾ gegebenen Formeln $C_{25}H_{36}N_9P_3O_{20}$, 10,6% P, aus der Ersteren $C_{17}H_{26}N_6P_2O_{14}$ gar nur 6,2% P berechnen, finden sich in meinen Präparaten, die noch schwefelhaltig, also vielleicht sogar noch verunreinigt sind, bis zu 11,6% P.

Wenn man nun von dem einfachen oder dem verdoppelten Moleculargewicht von $C_{25}H_{36}N_9P_3O_{20}$ das Moleculargewicht des Guanins $C_5H_5N_3O$ abzieht und aus den jeweils bleibenden Resten den P-Gehalt berechnet, so ergeben sich die Zahlen 12,8% P oder aber 11,6% P. Wenn man dasselbe Rechnungsverfahren auf die von Miescher²⁾ für das Spermanuclein von 9,6% P-Gehalt aufgestellte Formel $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$ anwendet, so ergibt sich ein P-Werth von 11,38%.

Bei den grossen Schwankungen in der Zusammensetzung der besprochenen Körper, haben solche Berechnungen keinerlei entscheidenden Werth, aber sie machen im Zusammenhalte mit den übrigen Thatsachen die Annahme sehr wahrscheinlich, dass die Verschiedenheiten des P-Gehaltes zwischen den Nucleinsäuren davon herrühren, dass das Molecül der Letzteren dem der Ersteren gleich, jedoch um einen Atomcomplex, ähnlich dem des Guanins, vergrössert ist.

Die Auffassung, dass die Xanthinkörper nur zufällige Beimengungen, Verunreinigungen der Nucleine darstellten, ist jedenfalls fallen zu lassen, andererseits ist aber die Ausscheidung jener Nucleine, die beim Behandeln mit Säuren keine Xanthinbasen liefern, aus der Gruppe der Nucleinkörper nicht gerechtfertigt.

Zum Schlusse liegt es mir ob, über die Art und Weise, wie ich die P-Bestimmungen zu machen pflegte, zu berichten. Da ich nämlich bei den im Vorhergehenden erwähnten Versuchen in die Lage kam, möglichst rasch und oft den P-Gehalt

¹⁾ Kossel, l. c.

²⁾ Miescher: Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel, Bd. 6, Heft I (Maly's Berichte, Bd. 4, S. 337).

irgend welcher Verbindungen zu bestimmen, so wählte ich unter den zu Gebote stehenden Methoden die Titration, und zwar die mit Uranlösung aus. Diese Bestimmungsart bot noch den besonderen Vortheil, dass sie gestattete, mit sehr kleinen Substanzmengen zu arbeiten, man kann z. B. bei Vorproben, die in der Eprouvette gemacht werden, ganz leicht und rasch sich einen Ueberblick über die auftretenden Veränderungen des P-Gehaltes der betreffenden Substanz verschaffen. Durch die Anwendung kleiner Substanzmengen wird aber auch die Verbrennung der nucleinähnlichen Körper, um die es sich hier ja hauptsächlich handelte, wesentlich erleichtert. Mein Verfahren bei diesen Verbrennungen war folgendes:

Die Substanz wurde, wenn nur wenig davon zur Verfügung stand, und die beim Ablösen eines eiweissartigen Niederschlages vom Filter unausbleibliche Verunreinigung desselben mit Filterfasern einen Einfluss auf die Bestimmung fürchten liess, als Lösung in einem geeigneten Lösungsmittel in den hier besprochenen Fällen verdünnte Ammoniakflüssigkeit — sonst aber in Pulverform in ein vorher gewogenes kleines Platinschälchen oder auch in einen Porzellantiegel gebracht, getrocknet und gewogen. Dabei zeigte sich häufig die Erscheinung, dass bei Einhaltung einer Temperatur von 100–110° das Gewicht der Substanz rasch sank, dann aber wieder stetig zu steigen begann, und nur durch Erhöhung der Temperatur bis zu 130° wieder zu den ursprünglichen oder noch niedrigeren Werthen gebracht werden konnte; dabei nahmen aber die Substanzen einen gelblich-grauen Farbton an. Ich pflegte daher im Anfang der Trocknung häufige Wägungen (auf 0,5 mgr. genau) anzustellen und den niedrigsten der gefundenen Werthe auszuwählen.

Die so zur Analyse fertige Substanz wurde mit einer Lösung von Kalium- und Natriumcarbonat von ungefähr bekanntem Gehalt übergossen, dann in grosser Entfernung über einer kleinen Flamme zum Trocknen gebracht und durch langsame Steigerung der Wärme verkohlt. Die kohlige Masse, deren Verbrennung sonst sehr grosse Schwierigkeiten bot,

würde bei nicht zu hoher Temperatur durch Zusatz kleinster Mengen feingepulverten Salpeters verbrannt; man kann so bei einiger Uebung die gesammte Masse ohne Feuererscheinung und unter Verbrauch von nur äusserst geringen Mengen des salpetersauren Salzes einschmelzen. Den Zusatz der Lösung der kohlen-sauren Salze machte ich bei nucleinartigen Substanzen, um das überaus lästige sich Aufblähen der Kohle zu vermeiden oder zu verringern, besonders aber um die beim Glühen allenfalls mögliche Bildung von Pyrophosphaten zu verhüten. Die Schmelze wurde im Schälchen mit Wasser in der Wärme gelöst, die Lösung in ein Bechergläschen gebracht, und mit heissem Wasser nachgespült, bis die Menge der Flüssigkeit etwa 50 ccm. betrug. Diese Flüssigkeit wurde nun mit Essigsäure ungefähr neutralisirt, mit 5 ccm. der bekannten essigsäuren Natronacetatlösung versetzt, und in gewöhnlicher Weise mit essigsaurer Uranlösung titrirt, wobei ich mich des Ferrocyankaliums als Indicator bediente. In wichtigen Fällen oder bei überstürzten Titrationen habe ich die Resultate der Titration durch die Wägung des entstehenden Niederschlages, nachdem derselbe gesammelt und geglüht war, bestätigt oder berichtigt.

Da es nun häufig vorkam, dass in Folge der geringen Menge der zu Gebote stehenden Substanz, oder ihrer Armut an Phosphor, nur äusserst geringe P-Mengen zur Bestimmung gelangten, und darum der Verbrauch an Uranlösung ein sehr geringer war, bildete die gerade unter solcher Umständen bedeutende Inconstanz des Titers der Uranlösung eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle. Da nun in der Haswell'schen¹⁾ Reductionstabelle auch für ganz geringen Verbrauch von Uranlösung die Titerwerthe nur von einem zum andern ccm. angegeben sind, jedem ccm. mehr oder weniger aber schon grosse Differenzen der Titerangabe entsprechen, die noch dazu nicht der Menge der verbrauchten ccm. Uranlösung proportional sich ändern, suchte ich die so

¹⁾ Alexander E. Haswell, nach Fresenius' Zeitschr. f. anal. Chemie, Bd. 22, S. 91.

gebildeten Lücken durch Bestimmung des Titerwerthes der Uranlösung für deren Verbrauch von je 0,3 bis 0,4 cbcm. auszufüllen.

50 cbcm. der Phosphorsäurelösung, aus reinem umkrystallisirten Dinatriumphosphat bereitet, hinterliessen einen Glührückstand von 0,1835 gr., entsprechend 0,09796 gr. P_2O_5 oder 0,4277 gr. P. 50 cbcm. dieser Lösung gebrauchten zu ihrer Titirung genau 19 cbcm. der essigsäuren Uranlösung. Um nun den Wirkungswerth dieser letzteren Lösung für niedrige P-Werthe festzustellen, habe ich eine bestimmte Anzahl von cbcm. der Phosphorsäurelösung auf ungefähr 50 cbcm. (im markirten Becherglas) verdünnt, mit 5 cbcm. der essigsäuren Natronacetatlösung versetzt und dann titirt.

Der Zusatz von Natronacetat zu der zu titirenden Flüssigkeit erwies sich bei den geringen Mengen des angewendeten phosphorsauren Salzes als nothwendig, obwohl mit essigsäurem Uran titirt wurde, und keine freie Mineralsäure vorhanden war: denn als ich statt des Essigsäure-Natronacetatgemisches nur Essigsäure von 3% Säuregehalt zufügte, konnte ich keine richtige Titration ausführen. In Folge des mangelnden Salzgehaltes fällt nämlich der entstehende Niederschlag in einer besonderen, schleimigen Modification aus, die die Eigenschaft hat, sich mit einer Lösung von Ferrocyankalium bald braun zu färben. Darum erhält man bei der Titration einer sehr salzarmen Flüssigkeit, lange schon bevor alle Phosphorsäure verbraucht ist, bei der Probe mit Ferrocyankalium eine Braunfärbung, die allerdings etwas verspätet und in Form von Körnchen oder Flocken auftritt, aber immerhin im Stande ist, die eigentliche Endreaction vorzutäuschen oder aber zu verdecken. Die Angabe also, das essigsäure Natron könne bei Anwendung von essigsäurem Uran zur Titration weggelassen werden¹⁾, kann sich nur auf die Bestimmung der Phosphorsäure in ohnehin salzhaltigen Flüssigkeiten, wie z. B. der Harn eine solche ist, beziehen.

Von den Titrationen mit weniger als 7 cbcm. der Phosphorsäurelösung, habe ich jede wenigstens 5 mal wiederholt und dabei dafür gesorgt, dass ich nie wusste, welche Phosphorsäuremenge ich eben in Arbeit hatte: doch wichen die Zahlen der abgelesenen cbcm. Uranlösung gewöhnlich um weniger als 0,1 cbcm. von einander ab. Abweichungen von 0,2 cbcm.

¹⁾ Cfr. Huppert u. Thomas: Anleitung zur Analyse des Harns, Wiesbaden 1890, S. 452.

gehörten zu den Seltenheiten. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen habe ich in folgender Tabelle zusammengestellt:

Anzahl der verbrauchten cbem. Uranlösung.	Titerwerth der Uranlösung für 1 cbem. berechnet auf P.	Differenz der P-Werthe.	Titerwerth der Uranlösung für 1 cbem. berechnet für P ₂ O ₅ .	Differenz der P ₂ O ₅ -Werthe.
0,6	0,001426		0,003265	
1,0	0,001171	0,000285	0,003918	0,000653
1,3	0,001974	0,000263	0,004520	0,000602
1,7	0,002013	0,000039	0,004610	0,000090
2,07	0,002067	0,000054	0,004733	0,000123
2,4	0,002139	0,000072	0,004898	0,000165
2,75	0,002168	0,000029	0,004965	0,000067
3,07	0,002229	0,000061	0,005104	0,000139
3,42	0,002251	0,000022	0,005155	0,000051
3,8	0,002251	—	0,005155	—
19,0	0,002251	—	0,005155	—

Vorliegende Tabelle ist aus den Titrationsergebnissen der ersten 10 cbem. der Phosphorsäurelösung von bekanntem Gehalt zusammengestellt. Es stellt sich heraus, dass schon bei Bestimmung von 9 cbem. der Phosphorsäurelösung, entsprechend einem Verbrauch von 3,42 cbem. der Uranlösung, der Titerwerth dieser letzteren genau der gleiche wird wie für den Verbrauch von 19 cbem. Wenn ich zu der Titration mehr als 10 cbem. der Phosphorsäurelösung verwendete, bis zu 25 cbem., so schwankten die gefundenen Titerwerthe für die Uranlösung in engen Grenzen und vollständig regellos um die für 10 cbem. gefundenen Zahlen, so dass die zufällig vollständige Uebereinstimmung der beiden untersten Ziffern der Tabelle als Ausdruck der Constanz des Titerwerthes für den Verbrauch von mehr als 3 cbem. Uranlösung aufgefasst werden muss.

Ich gebrauchte daher in meinen Berechnungen in jedem Falle, wenn mehr als 3 cbcm. verbraucht worden waren, den Titerwerth 0,00225; für gefundene Werthe unter 3 cbcm. Uranlösung stellte ich mir durch einen aus der folgenden Tabelle leicht erkennbaren Vertheilungsmodus aus obiger Tabelle eine Zahlenreihe für die Titerwerthe für jeden 0,1 cbcm. Uranlösung her, und hielt mich in allen Fällen an diese.

Anzahl der verbrauchten cbcm.	Titerwerth für 1 cbcm. Uranlösung.	cbcm.	Titerwerth.	cbcm.	Titerwerth.
0,6	0,00143	1,1	0,00177	1,6	0,00201
0,7	0,00151	1,2	0,00183	1,7	0,00202
0,8	0,00158	1,3	0,00189	1,8	0,00203
0,9	0,00165	1,4	0,00194	1,9	0,00204
1,0	0,00171	1,5	0,00200	2,0	0,00205

Ferner setzte ich bis zum Verbrauch von 2,5 cbcm. den Titerwerth 0,00213 und bis zu 3,0 cbcm. den Werth 0,00222.

Wenn man die gegebene Tabelle mit der von Haswell¹⁾ vergleicht, so zeigt sich in beiden Tabellen das Ansteigen der Titerwerthe der Uranlösung bei steigendem Verbrauch derselben; jedoch ist in meinen Tabellen das Ansteigen ein viel rascheres, die Differenzen zwischen den einzelnen Zahlen sind anfänglich viel grösser, verringern sich aber ungemein viel schneller als bei Haswell¹⁾ und erreichen schon bei einem Verbrauch von 3 cbcm. Uranlösung den Werth 0, während dieser Werth bei Haswell erst bei einem Verbrauch von 19 cbcm., in der fortsetzenden Tabelle von Broockmann²⁾ überhaupt gar nicht erreicht wird. Ich kann den Grund dieser Verschiedenheiten nicht angeben, vielleicht ist er in der verschiedenen Concentration der zur Anwendung kommenden Flüssigkeiten zu suchen.

¹⁾ Haswell, l. c.

²⁾ Broockmann, Fresenius' Zeitschr. für analyt. Chemie, Bd. 22, S. 99.

Trotz der Schwierigkeiten und der kleinen Ungenauigkeiten, welche die besprochene Inconstanz des Titerwerthes der Uranlösung allenfalls mit sich bringen kann, ist die Sicherheit der Methode, für die hier in Frage kommenden Zwecke, eine vollständig ausreichende. Denn bei Verbrauch von wenig Uranlösung fällt ein durch eine mangelhafte Correctur gegebener kleiner Fehler nicht schwer in die Waagschale, und bei Verbrauch von grösseren Mengen von Uranlösung ist der Unterschied zwischen den corrigirten und nicht corrigirten Titerwerthen nur ein höchst geringer. Die kleinen Fehler, die durch diese Verhältnisse gegeben werden — sie betragen in ungünstigen Beispielen 0,1% — werden durch die grössere Einfachheit des Arbeitens, durch welche Arbeitsfehler hintangehalten werden, reichlich ausgeglichen; desswegen und in Anbetracht ihrer übrigen Vortheile, kann ich die Titrimethode für ähnliche Arbeiten, wie die hier vorgeführte, nur empfehlen.