

Zur Kenntniss des Adenins.

II. Mittheilung.

Von

Dr. Martin Krüger.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 30. December 1891.)

Vor einiger Zeit habe ich mitgetheilt¹⁾, dass Adenin bei der Spaltung durch Salzsäure unter Aufnahme von 8 Molekülen Wasser glatt zerlegt wird in 1 Mol. Glykokoll, 4 Mol. Ammoniak, 1 Mol. Kohlensäure und 2 Mol. Ameisensäure, und dass Hypoxanthin, welches nach Kossel dasselbe Radical Adenyl $C_5H_4N_6$, wie Adenin selbst, enthält und als Adenyloxyd aufzufassen ist, bei gleicher Behandlung auch dieselben Spaltungsproducte liefern muss, nur mit dem Unterschiede, dass in diesem Falle ein Molecül Ammoniak weniger entsteht.

Die Vergleichung der bei Hypoxanthin und der bei Harnsäure und Xanthin erhaltenen Resultate hatte ergeben, dass die Zerfallsproducte bei allen dreien die gleichen waren und dass nur ein Unterschied in dem Verhältniss von CO_2 zu $HCOOH$ stattfand.

Dieses Verhältniss ist nämlich bei:

Harnsäure . . . 3 Mol. CO_2 : — Mol. CH_2O_2 .

Xanthin . . . 2 » » : 1 » »

Hypoxanthin . 1 » » : 2 » »

Die successive Zunahme der Ameisensäure und Abnahme der Kohlensäure findet ihre Erklärung in dem verschiedenen O-Gehalte der untersuchten Körper.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 160 etc.

Im Hinblick auf dieses vollkommen gleichartige Verhalten sämtlicher Körper der Harnsäuregruppe gegen Salzsäure darf man vermuthen, dass Adenin und Hypoxanthin eine ähnliche Constitution wie Harnsäure und Xanthin besitzen. Die nächste Aufgabe der weiteren Untersuchung musste es daher sein, den für Harnsäure und Xanthin charakteristischen Alloxankern und Harnstoffkern auch im Adenin und Hypoxanthin nachzuweisen. Dieses Ziel auf dem von E. Fischer beim Caffein erprobten Wege zu erreichen, lag nahe; doch traten den in dieser Richtung von A. Kossel unternommenen Versuchen unerwartete Schwierigkeiten entgegen in Folge der grossen Widerstandsfähigkeit, welche Adenin gegenüber oxydierenden Mitteln zeigt.

Nach Kenntniss dieser Eigenschaften handelte es sich darum, weniger beständige Derivate des Adenins darzustellen. Ein solches Derivat ist das Bromadenin. Die Aufsuchung dieses Körpers wurde durch eine von Kossel gemachte Beobachtung¹⁾ veranlasst, nach der Adenin mit Bromwasser und HNO_3 behandelt einen sich mit Alkalien roth färbenden Rückstand hinterlässt, während Salpetersäure allein ohne Wirkung ist. Das von G. Bruhns im hiesigen Laboratorium in derselben Weise, wie Bromguanin, durch Digeriren von getrocknetem Adenin mit Brom dargestellte Bromadenin²⁾ zeigte in der That die vermuthete Eigenschaft, mit Salpetersäure behandelt die Xanthinprobe zu geben.

Bromadenin.

Der beim Uebergiessen von trockenem Adenin mit Brom erhaltene dunkelrothe Körper ist nach Bruhns bromwasserstoffsäures Bromadenin-Tetrabromid $\text{C}_5\text{H}_4\text{BrN}_5 \cdot \text{Br}_4 \cdot \text{HBr}$; beim Erhitzen auf $110\text{--}120^\circ$ geht er in ein Gemenge von Bromadenin und dessen bromwasserstoffsäurem Salz über.

Nach meinen Versuchen gelingt es nicht in allen Fällen, das Tetrabromid zu erhalten. So wurden z. B. 9,65 gr. bei

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 4.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 5.

120° getrocknetes Adenin mit so viel Brom in kleineren Portionen übergossen, dass das Gewicht des erhaltenen Productes 54,3 gr. ausmachte, verlangt sind für das Tetrabromid 45,5 gr. Trotzdem somit ein Ueberschuss von 9 gr. Brom vorhanden war, nahm dieses Product innerhalb 24 Stunden ab bis zu einem Gewichte von 28,3 gr., so dass ein Molekül Adenin im Ganzen etwas mehr als 3 Atome Brom festgehalten hatte.

Bei einem zweiten Versuche gaben 9,6 gr. Adenin 54,9 gr. Bromid, statt 43,7 gr. Tetrabromid; demnach war ein Ueberschuss von 11,2 gr. Brom vorhanden. Trotzdem nahm auch dieses Product innerhalb 24 Stunden ab bis zu einem Gewichte von 29,9 gr., so dass auf ein Molekül Adenin nur noch $3\frac{1}{2}$ Atome Brom vorhanden waren.

Die Schnelligkeit des Bromzusatzes hatte keinen merklichen Einfluss auf das Resultat; denn im ersten Versuche war das Brom in kleineren Portionen zugesetzt worden; so dass keine erhebliche Wärmeentwicklung eintrat. Bei dem zweiten Versuche wurde dagegen die ganze Menge des Broms in 2 grossen Portionen zugegeben, nach deren Zusatz jedesmal eine heftige Erwärmung und lebhaftes Sieden des Broms erfolgte.

In diesen beiden Versuchen war demnach kein Tetrabromid entstanden, und der ursprünglich erhaltene dunkelrothe Körper ist einfach als ein Gemenge von bromwasserstoffsäurem Bromadenin mit Brom anzusehen.

Für die Bildung des Tetrabromids scheint vielmehr die Grösse des Bromüberschusses massgebend zu sein. Hierfür spricht der folgende Versuch:

10,4 gr. getrocknetes Adenin wurden mit so viel Brom (in einzelnen Portionen zugesetzt) übergossen, dass die Menge des resultirenden Körpers 68,2 gr. betrug, statt 47,4 gr. Tetrabromid. Nach 15stündigem Stehen an der Luft hatte das Product 18 gr., d. h. fast alles überschüssige Brom verloren. Der so erhaltene Körper kann für das Tetrabromid angesehen werden. Er nahm bei längerem Liegen nur langsam an Gewicht ab und behielt durchgehends seine dunkelrothe Farbe

bei, nur die an den Wandungen der Schale fein vertheilten Massen waren hellgelb gefärbt, während bei den ersten beiden Präparaten die ganzen an der Oberfläche liegenden Mengen entfärbt und nur von dem dunkelrothen Körper unterschichtet waren.

Nach dem Trocknen der Präparate bei 130° wurden erhalten aus:

Versuch I. 20,1 gr.: verlangt sind 21,1 gr. HBr , $\text{C}_5\text{H}_4\text{BrN}_5$.

» II 20,4 » » » 20,9 » »

» III 22 » » » 22,7 » »

Die Umwandlung des Adenins in HBr , $\text{C}_5\text{H}_4\text{BrN}_5$ ist auch nach diesen Versuchen eine fast quantitative. Die Entfärbung des rothen Additionsproductes kann nach Bruhns durch Natriumbisulfit oder durch Ammoniak bewirkt werden und das freie Bromadenin wird alsdann durch Versetzen mit Ammoniak bis zur neutralen Reaction ausgefällt.

Zur Darstellung des freien Bromadenins habe ich den rothen Körper durch Erhitzen auf 130° vollkommen von dem addirten Brom befreit, dann das restirende Product in Natronlauge unter Erwärmen gelöst und das Bromadenin durch Einleiten eines CO_2 -Stromes gefällt. Es scheidet sich auf diese Weise in kugeligen Aggregaten aus kleinen mikroskopischen Nadeln bestehend aus. Aus seiner Lösung in Natronlauge kann es auch durch Neutralisation mit Essigsäure erhalten werden. Zur weiteren Reinigung wurde es mit schwach ammoniakalischem Wasser ausgekocht.

In dem Bromadenin kann das Bromatom weder durch die Amido- noch durch die Hydroxylgruppe ersetzt werden (l. c.); selbst beim Erwärmen des Bromadenins mit Natriumalkoholat in Alkohol auf 145° während mehrerer Stunden findet keine Umsetzung statt.

Trockenes Chlorgas über getrocknetes Bromadenin in der Wärme geleitet ist ohne Wirkung. Es traten weder Bromdämpfe auf, noch zeigte das Gewicht der angewandten Substanz eine Veränderung. Wurde jedoch das Bromadenin mit Wasser übergossen und unter Erwärmen mit dem Einleiten des Chlors fortgefahren, so trat schon nach kurzer Zeit eine

reiche Entwicklung von Bromdämpfen ein und das Bromadenin ging bis auf einen geringen Rückstand in Lösung. Beim Verdunsten der Lösung nahm der Rückstand mit Kalilauge befeuchtet intensiv violettrothe Farbe an, Barytwasser erzeugt einen blaugrünen Niederschlag.

Spaltung des Bromadenins durch Salzsäure und chlor-saures Kali.

Aus dem Verhalten des Bromadenins gegen gasförmiges Chlor und gegen Salpetersäure ergibt sich, dass Adenin durch Einführung eines Bromatoms seine Widerstandsfähigkeit gegen oxydirende Mittel verloren hat. Man darf daher vermuthen, durch Oxydation des Bromadenins Spaltungsproducte zu erhalten, welche aus dem Adenin nicht gewonnen werden konnten und die über die Constitution des Adenins selbst näheren Aufschluss geben können.

Die in dieser Richtung angestellten Versuche haben in der That zu einem Resultate geführt, über welches im Folgenden berichtet werden soll. Als Oxydationsmittel wählte ich das Gemenge von Salzsäure und Kaliumchlorat, welches nach E. Fischer wenigstens beim Caffein bessere Resultate liefert als gasförmiges Chlor. Die Ausführung der Versuche geschah in der von dem genannten Forscher¹⁾ beschriebenen Weise.

17 gr. Bromadenin wurden mit 25 cbcm. conc. Salzsäure und 45 cbcm. Wasser auf 50—60° erwärmt und in das auf dieser Temperatur gehaltene Gemisch allmählig 10 gr. Kaliumchlorat eingetragen. Schon nach kurzer Zeit entwichen aus dem sich roth färbenden Gemisch Bromdämpfe in reichlicher Menge. Das Bromadenin schien sich allmählig zu lösen, das Gemisch wurde leichter beweglich, doch trat eine klare Lösung nicht ein; es blieb ein rother, sehr voluminöser, anscheinend amorpher Rückstand. Nach dem Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser wurde zunächst ein starker Luftstrom durch die Flüssigkeit getrieben und filtrirt. Im Rückstande befand sich der erwähnte fleischfarbene Körper, welches zunächst mit verd. Salzsäure, dann mit Wasser vollkommen ausgewaschen wurde.

¹⁾ Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 215, S. 258.

Es schmilzt bei 198° (uncorr.). Die Analyse ergab:

0,1965 gr. Subst. gaben 0,2025 gr. CO_2 und 0,0692 gr. H_2O .

0,1433 gr. Subst. gaben 0,1487 gr. CO_2 und 0,0539 gr. H_2O .

0,1245 gr. Subst. gaben 32,8 ccm. N bei $20,1^{\circ}$ C. und 752,5 mm.

Gefunden:

28,11% C.	28,30% C.
3,91 » H.	4,18 » H.
29,81 » N.	—

Der Körper ist nur wenig löslich in verd. heißen Säuren und in Eisessig, leicht löslich in Alkalien mit purpurrother Farbe, welche beim Erwärmen nicht verschwindet. Aus diesen Lösungen fällt der Körper beim Ansäuern anscheinend unverändert wieder aus. In den alkalischen Lösungen desselben erzeugt Barytwasser einen schmutzig blauen Niederschlag. Die Verbindung entsteht bei der Oxydation des Bromadenins nur in geringer Menge (erhalten waren 1,03 gr.), so dass eine nähere Untersuchung derselben ausgeschlossen ist.

In die von dem eben beschriebenen Körper abfiltrirte Flüssigkeit wurde Schwefelwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet, um die letzten Mengen des Chlors zu beseitigen und etwa vorhandenes Alloxan als schwer lösliches Alloxantin abzuscheiden. Hierbei trübte sich die Flüssigkeit zwar stark, setzte aber erst nach längerem Stehen einen anscheinend nur aus Schwefel bestehenden Niederschlag ab. Als derselbe jedoch auf dem Filter getrocknet wurde, nahm das Filter selbst intensiv purpurrothe Farbe an und in dem Niederschlage zeigten sich stark glänzende, gleichfalls intensiv gefärbte Krystalle. Das Filter wurde daher mit heissem Wasser ausgekocht; beim Erkalten des Filtrates schieden sich schon nach kurzer Zeit kleine, glasglänzende prismatische Krystalle ab, in einer Menge von 1 gr.

Zur Analyse wurde die Substanz über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet:

In 0,2575 gr. der Substanz wurde eine N-Bestimmung nach der Kjeldahl'schen Methode gemacht. Verbraucht wurden zur Neutralisation des alkalischen Destillates 31,86 ccm. $\frac{1}{10}$ -N.-Oxalsäure = 0,0446 gr. N.

Verlangt für	Gefunden:
$\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_7 + 3\text{H}_2\text{O}$:	
17,39% N.	17,32% N.

Die wässrige Lösung des Körpers gibt mit Barytwasser einen veilchenblauen Niederschlag, reducirt Silbernitratlösung sofort und färbt sich endlich mit Ferrosulfat und Ammoniak intensiv indigblau, eine Reaction, die meines Wissens bisher nur für Alloxan, Dimethylalloxan und Amalinsäure bekannt ist. Doch habe ich mich überzeugt, dass auch aus Harnsäure hergestelltes Alloxantin dieselbe Reaction gibt.

In dem Filtrate vom Schwefel und Alloxantinniederschlage wurde die Hauptmenge der freien Salzsäure durch Bleicarbonat abgestumpft und der Rest durch Natriumcarbonat neutralisirt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat im Vacuum destillirt. Der Rückstand wurde alsdann mehrmals nach Digeriren mit wenig Wasser mit Alkohol in der Wärme extrahirt.

Das alkoholische Filtrat wurde dann weiter auf Harnstoff, die gesammten bleihaltigen Niederschläge auf Oxalsäure untersucht.

Zur Isolirung der Oxalsäure wurden die bleihaltigen Rückstände mit verd. Salzsäure behandelt, aus dem Filtrate nach Neutralisation mit Natriumcarbonat das restirende Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Oxalsäure in essigsaurer Lösung durch Calciumchlorid gefällt. Das mit heissem Wasser gewaschene Oxalat wurde in Salzsäure gelöst und nochmals durch Versetzen mit Ammonacetat gefällt.

1,3029 gr. des bei 110° getrockneten Oxalates wurden mit Sodalösung in der Wärme zersetzt; gefunden wurden 0,888 gr. CaCO_3 .

Berechnet für	Gefunden:
$\text{CaC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$:	
27,39% Ca.	27,26% Ca.

Das Filtrat vom CaCO_3 -Niederschlage wurde nach Neutralisation mit Salpetersäure mit Silbernitrat versetzt und das erhaltene Silberoxalat mit kaltem Wasser vollständig ausgewaschen.

0,7946 gr. des an der Luft getrockneten Oxalats gaben 0,7467 gr. AgCl .

Berechnet für $\text{C}_2\text{O}_4\text{Ag}_2$:	Gefunden:
71,05% Ag.	70,72% Ag.

Die alkoholische Lösung, welche auf Harnstoff untersucht werden sollte, wurde zur Trockne verdunstet und der Rück-

stand nochmals mit Alkohol abs. extrahirt. Die nach dem Verdunsten des Alkohols zurückbleibende syrupöse Flüssigkeit wurde mit wenig Wasser übergossen und mit conc. ausgekochter und in Eis gekühlter Salpetersäure versetzt. Der sich ausscheidende Krystallbrei, dessen Menge 4,1 gr. betrug, wurde abfiltrirt und mit eiskaltem Alkohol gewaschen. Da beim Neukrystallisiren der Verbindung aus Alkohol nicht die für salpetersauren Harnstoff charakteristischen Krystalle erhalten werden konnten, so behandelte ich in der Meinung, dass der Grund hierfür in einer Beimengung von Guanidinnitrat zu suchen sei, die wässerige Lösung der Substanz mit überschüssigem Barytwasser in der Wärme, entfernte den Baryt durch Kohlensäure und entzog dem nach dem Eindunsten des Filtrates bleibenden Rückstand den Harnstoff durch Alkohol abs. Nach dem Verjagen des Alkohols krystallisirte Harnstoff in langen, säulenförmigen Krystallen aus; doch auch jetzt waren auf Zusatz von Salpetersäure nicht die Krystalle des Harnstoff-Nitrates zu erhalten, vielmehr schieden sich stets nur skelettförmige blättrige Krystalle aus.

Zur weiteren Reinigung wurde die Verbindung in wenig Wasser gelöst und mit heisser 10 procentiger Oxalsäurelösung versetzt. Nach dem Erkalten scheiden sich glasglänzende, harte, aus Blättchen bestehende Krystalldrusen ab.

Die Analyse des Oxalates ergab folgende Werthe:

1. 0,2976 gr. Substanz gaben 0,2521 gr. CO_2 und 0,1314 gr. H_2O .
2. 0,2456 gr. Substanz wurden nach der Kjeldahl'schen Methode behandelt; verbraucht für das Destillat 47,07 ccm. $\frac{1}{10}$ -N.-Oxalsäure = 0,0659 gr. N.
3. In 0,3394 gr. Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganatlösung titrirt (20 ccm. $\frac{1}{10}$ -N.-Oxalsäure = 16,4 ccm. KMnO_4). Verbraucht wurden 26,66 ccm. KMnO_4 -Lösung = 0,1463 gr. $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$.
4. 0,3516 gr. Substanz wurden in derselben Weise behandelt; verbraucht 27,6 ccm. KMnO_4 -Lösung = 0,1515 $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$.

Berechnet für	Gefunden:
$(\text{CON}_2\text{H}_4)_2 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$:	
22,86 % C.	23,10 % C.
4,76 % H.	4,91 % H.
26,67 % N.	26,83 % N.
42,86 % $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$.	43,11; 43,09 % $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$.

Die Analyse des Oxalates lässt wohl keinen Zweifel an der Identität der erhaltenen Verbindung mit dem oxalsauren Harnstoff zu.

Nach den mitgetheilten Ergebnissen wird Bromadenin unter der Einwirkung von Salzsäure und Kaliumchlorat gespalten in:

Alloxan, Harnstoff, Oxalsäure und einen Körper von säureartigem Charakter, über dessen Constitution nichts angegeben werden kann.

Bei einem zweiten Versuch, welcher in der Absicht angestellt war, eine bessere Ausbeute an Alloxan (resp. Alloxantin) zu erzielen, wurden 20,6 gr. Bromadenin mit 60 ccm. conc. HCl und der gleichen Menge Wassers versetzt, alsdann bei 50—60° allmählig mit 8 gr. KClO₃ oxydirt. Der Versuch ergab nicht das gewünschte Resultat; vielmehr konnte diesmal kein Alloxan nachgewiesen werden, während Harnstoff und die übrigen Zersetzungsproducte in der eben angegebenen Weise isolirt werden konnten.

Dieser Versuch, bei welchem bedeutend grössere Mengen an Salzsäure angewendet wurden, vermag nicht das Resultat des ersten aufzuheben; er beweist nur, dass für die Bildung des Alloxans aus Bromadenin bestimmte Versuchsbedingungen innegehalten werden müssen. Die Bedingungen zu ermitteln, unter welchen die Ausbeute an Alloxan die bestmögliche ist, kann nicht die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung sein; es genügt für unseren Zweck die Entstehung von Alloxan aus Bromadenin, wenn auch nur durch einen Versuch bewiesen und damit gezeigt zu haben, dass ebenso, wie in Harnsäure und Xanthin, auch im Adenin und Hypoxanthin ein Alloxan-kern vorhanden ist, d. h. der Atomcomplex.



Viel wichtiger scheint mir der Umstand, dass fast dieselben Versuchsbedingungen, unter welchen beim Caffein eine so glatte Spaltung erzielt wird, hier beim Adenin eine so

schlechte Ausbeute wenigstens an Alloxan ergeben. Beim Caffein wurden 60% der theoretischen Ausbeute an Dimethylalloxan und Methylharnstoff erhalten, beim Adenin nur 8% an Alloxan und 42% an Harnstoff. Man könnte die Ursache dieser Erscheinung in einer principiellen Verschiedenheit des Alloxankerns im Caffein-, resp. Xanthin-Molekül und desjenigen im Adenin-, resp. Hypoxanthin-Molekül suchen, welche ihren Ausdruck in einer verschiedenen Vertheilung der Valenzen der entsprechenden N- und C-Atome fände. Es lässt sich leicht einsehen, dass ein so veränderter Alloxankern schwieriger Alloxan bei der Oxydation geben wird.

Was das Vorkommen von Oxalsäure unter den Spaltungsproducten des Bromadenins betrifft, so entsteht dieselbe wohl zweifellos aus dem Alloxankern, und vermuthlich bilden hier dieselben C-Atome Oxalsäure, welche wir bei der Spaltung des Adenins durch Salzsäure im Glykokoll wiederfinden.

Für die Entstehung des Harnstoffs aus Bromadenin sind zwei Erklärungen möglich: Entweder ist in dem Adeninmolekül neben dem Alloxankern noch ein Harnstoffkern vorhanden, oder der Harnstoff ist durch Spaltung des Alloxankerns entstanden. Ist das letztere der Fall, so würde damit die geringe Ausbeute an Alloxan bei der Oxydation des Bromadenins erklärt sein. Dem widersprechen jedoch die von E. Fischer beim Caffein erhaltenen Resultate, nach denen Dimethylalloxan und Methylharnstoff eine gleiche Beständigkeit gegen Salzsäure bei Anwesenheit von Kaliumchlorat zeigen. Es liegt kein Grund vor, beim Alloxan und Harnstoff ein anderes Verhalten diesen Reagentien gegenüber anzunehmen. Ich halte daher die erste Erklärung, nämlich das gleichzeitige Vorkommen eines Alloxan- und Harnstoffkernes im Adenin, für wahrscheinlicher und sehe den Grund für die geringe Ausbeute an Alloxan nicht in weiterer Zersetzung des einmal gebildeten Alloxans, sondern in einer geringeren Entstehung desselben, welche durch die oben angedeutete Valenzverschiebung im Alloxankern verursacht ist.

Die Entscheidung der Frage nach dem gleichzeitigen Vorkommen eines Harnstoff- und Alloxankerns im Adenin ist

auf zweierlei Weise möglich: Einmal durch quantitative Bestimmung der Zersetzungsproducte, des Alloxans und des Harnstoffes, welches Verfahren E. Fischer beim Caffein eingeschlagen hat; das andre Mal durch Einführung von Alkylen in das Adeninmolekül und Spaltung der so erhaltenen substituirten Adenine. Der erstere Weg scheint nach den bisher gemachten üblen Erfahrungen aussichtslos zu sein; ob der zweite auf bequeme Weise zu einem entscheidenden Resultate führen wird, müssen weitere Versuche, mit denen ich augenblicklich beschäftigt bin, ergeben.