

## **Die Gewinnung des Adenins aus Theeextract.**

Von

**Martin Krüger.**

(Der Redaction zugegangen am 30. September 1895.)

Das Adenin wurde ursprünglich von seinem Entdecker A. Kossel aus Theeextract, dem lohnendsten Ausgangsmaterial, mit Hilfe des bisher gebräuchlichen Fällungsmittels für Alloxurkörper, ammoniakalischer Silberlösung, niedergeschlagen. Bei einer späteren Darstellung des Adenins in grossen Mengen habe ich dasselbe Fällungsmittel angewendet, habe aber die Silberverbindungen der Alloxurbasen nicht, wie es sonst zu geschehen pflegt, durch Schwefelwasserstoffgas oder dessen Alkaliverbindungen, sondern in bequemerer und sauberer Weise durch Salzsäure zersetzt. Ferner habe ich zur Reinigung des Adenins nicht die Silberverbindung der Rohbase aus Salpetersäure verd. umkrystallisirt, vielmehr denselben Zweck durch Umkrystallisiren des salzsauren Salzes erreicht. Beim Behandeln der stark gefärbten unreinen Silberverbindungen mit Salpetersäure wurden schliesslich Präparate von Adenin erhalten, welche wechselnde Mengen von Hypoxanthin, oft die Hälfte des Gewichtes, enthielten. Die folgende Untersuchung zeigt aber, dass in der Theelauge kein Hypoxanthin oder höchstens nur Spuren desselben vorhanden sind, ein Beweis, dass bei der Darstellung des Adenins nach dem früheren Verfahren ein Theil des Adenins durch salpetrige Säure, d. h. beim Lösen der Silberverbindungen in Salpetersäure, in Hypoxanthin umgewandelt worden ist, ferner ein Beweis dafür, dass selbst

durch Zusatz grösserer Menge von Harnstoff eine solche Zersetzung des Adenins nicht vermieden werden kann.

Weitere Untersuchungen führten im Anschluss an die Arbeiten von Drechsel und P. Balke zur Auffindung eines neuen, specifischen Fällungsmittels für Alloxurkörper, des Kupfersulfates in Verbindung mit Natriumbisulfit. Obwohl die quantitative Ausfällung des Adenins aus reinen Lösungen durch dieses Reagens schon bewiesen ist, schien es mir doch von Wichtigkeit, zu prüfen, wie es sich bei einer Darstellung des Adenins in grösserem Maassstabe, zumal aus einem so unreinen und gefärbten Ausgangsmaterial, wie die Theelauge darstellt, verhält, und ferner, welche Resultate dieses Reagens im Vergleiche mit ammoniakalischer Silberlösung liefert.

Zu dem Zwecke wurden daher 2 Liter Theelauge zunächst mit der sechsfachen Menge Wasser verdünnt und durch verd. Schwefelsäure die Huminsubstanzen ausgefällt. Das Filtrat wurde in zwei gleiche Theile getheilt und in dem einen wurden die Basen durch ammoniakalische Silberlösung nach vorherigem Uebersättigen mit Ammoniak ausgefällt. Der zweite Theil wurde mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaction versetzt, dann zum Sieden gebracht und die Basen durch Zusatz von 50 gr. Kupfersulfat und 250 ccm. Natriumbisulfitlösung als Kupferoxydulverbindungen niedergeschlagen.

Letztere setzen sich als weisse, allmähig braun werdende grosse Flocken sehr schnell ab. Beide Niederschläge wurden zunächst durch Dekantiren, dann auf dem Filter ausgewaschen.

Die weitere Verarbeitung der Fällungen geschah in folgender Weise:

Der voluminöse Silberniederschlag wurde in einem Becherglase mit wenig heissem Wasser übergossen und unter Erwärmen vorsichtig mit Salzsäure zersetzt. Das Filtrat wurde darauf mit Thierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde dann unter Zusatz von wenig Salzsäure in Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniak und zum Schluss mit Ammoncarbonat bis zur schwach alkalischen Reaction versetzt, auf 200 ccm. aufgefüllt und 24 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit

wurde der Niederschlag abfiltrirt, mit kaltem Wasser, darauf mit Alkohol und Aether gewaschen und bei 100° getrocknet. Es wurden 5,84 gr. Rohbase erhalten.

Der Kupferoxydulniederschlag wurde in heissem Wasser mit farblosem Natriumsulfid in geringem Ueberschuss zersetzt. Da das Filtrat ebenso wie die durch Zersetzung des Silberniederschlags erhaltene Lösung noch stark gefärbt war, wurde die Lösung nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure nochmals mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit zur Ausfällung der Basen behandelt. Der nunmehr erhaltene Niederschlag wurde nach gutem Auswaschen unter heissem Wasser mit farblosem Schwefelammon vorsichtig zersetzt und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde unter Zusatz von ein wenig Ammoncarbonat mit Wasser aufgeköcht, auf 200 ccm. aufgefüllt und gleichfalls 24 Stunden stehen gelassen. Die Menge des Niederschlags, der wie oben behandelt wurde, betrug 7,37 gr.

Diese 7,37 gr., sowie die aus dem Silberniederschlage erhaltenen 5,84 gr. nebst den zugehörigen Filtraten wurden nun zur Ermittlung ihres Gehaltes an Adenin in gleichmässiger Weise, natürlich aber getrennt von einander, wie folgt behandelt.

Früher ist, wie oben erwähnt, das reine Adenin aus dem Rohproducte durch Umkrystallisiren der salzsauren Salze gewonnen worden. Für diesen Zweck noch besser geeignet ist das schwefelsaure Adenin, das in Wasser schwerer löslich ist als das salzsaure Salz, ausserdem in grossen, wohlausgebildeten und charakteristischen Krystallen sich ausscheidet, wie sie von A. Kosşel in seiner ersten Abhandlung über Adenin beschrieben sind.

Die 7,37 gr. resp. 5,84 gr. Rohbase wurden daher in verdünnter Schwefelsäure gelöst und die filtrirte Lösung über Nacht stehen gelassen; dann wurden die Krystalle des schwefelsauren Adenins abfiltrirt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Aus dem Filtrate wurde nach vorherigem Abstumpfen der Schwefelsäure der Rest des Adenins durch Natriumpikrat vollständig ausgeschieden, welches nach Bruhns eine quantitative Trennung des Adenins vom Hypoxanthin ermöglicht. Aus

dem Gewichte des bei 100° getrockneten schwefelsauren und pikrinsauren Adenins wurde dann die Menge reinen Adenins berechnet. Selbstverständlich wurden beide Verbindungen jedesmal mittelst vollständiger Analyse auf ihre Reinheit geprüft.

Aus den zu den angegebenen Mengen Rohbase (7,37 resp. 5,84 gr.) gehörigen Filtraten sollte das Adenin gleichfalls durch Natriumpikrat gefällt werden. Da aber beide Filtrate noch stark gefärbt waren, so wurden die Basen zuvor noch einmal durch ammoniakalische Silberlösung, resp. Kupfersulfat und Natriumbisulfit ausgefällt, die Niederschläge in der oben angegebenen Weise zersetzt (durch Salzsäure, resp. Natriumsulfid), und schliesslich in den sauren, resp. mit Salzsäure angesäuerten Flüssigkeiten das Adenin mittelst Natriumpikrat quantitativ bestimmt.

So wurden im Ganzen aus dem einen Liter Theelauge, welcher mit ammoniakalischer Silberlösung behandelt war, 5,98 gr. reines Adenin und aus dem mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit behandelten 6,27 gr. Adenin erhalten.

Die Untersuchung hat also ergeben, dass zur Gewinnung des Adenins das Kupferreagens sehr wohl brauchbar ist, ja dass mit ihm noch bessere Resultate erhalten werden als mit ammoniakalischer Silberlösung. Es wird durch jenes Reagens die Isolirung des Adenins nicht nur billiger, sondern auch wesentlich bequemer bewerkstelligt, da die Kupferoxydulverbindung des Adenins, wie die aller Alloxurkörper sich in der Wärme flockig ausscheiden, sich schnell zu Boden setzen und so leicht ausgewaschen werden können, während hierzu bei den voluminösen und gelatinösen Silberverbindungen viel mehr Zeit und Mühe aufgewendet werden muss.

#### **Verbindung von Adenin mit Theobromin.**

Die Mutterlauge der aus der Silberfällung erhaltenen Rohbase (5,84 gr.) hatte nach mehrtägigem Stehen in einer Menge von 0,90 gr. eine in langen, sehr feinen Prismen kristallisirende Substanz von starkem Seidenglanz ausgeschieden. Die nähere Untersuchung dieses Körpers liess die zuerst gefasste Ansicht, dass eine bisher unbekannte Alloxurbase vor-

läge, sehr bald als irrig erkennen: sie zeigte vielmehr, dass hier Adenin eine merkwürdige Doppelbase mit Theobromin gebildet hatte.

Der Körper löst sich in heissem Wasser leicht, in kaltem schwieriger. Aus der wässerigen Lösung fällte Pikrinsäure, im Ueberschuss zugesetzt 0,36 gr. Adenin aus. Das Filtrat wurde nach dem Ansäuern mit Salzsäure durch Aether von der Pikrinsäure befreit, darauf zur Trockne verdampft: schon während des Eindampfens schied sich ein verhältnissmässig beträchtlicher Niederschlag ab. Der Trockenrückstand löste sich in heissem Wasser selbst unter Zusatz von ein wenig Salzsäure nur schwierig auf; es wurde daher die Flüssigkeit mit Ammoniak im Ueberschuss bis zur völligen Lösung des Körpers erwärmt. Beim Erkalten schied sich sehr schnell ein weisses Krystallpulver aus, welches aus kurzen derben Prismen bestand. Reines Theobromin in ähnlicher Weise aus verd. Ammoniak umkrystallisirt zeigte identische Krystallformen. Die Analyse des Körpers ergab folgendes Resultat:

In 0,0897 gr. Substanz, bei 100° getrocknet, nach Kjeldahl'scher Methode Stickstoff bestimmt, verbraucht 20,00 cbem.  $\frac{1}{10}$  N. Oxalsäure.

Berechnet für

$C_7 H_8 N_4 O_2$ :

31,11% N.

Gefunden:

31,24% N.

Auch sonst zeigte der Körper Reactionen, welche mit denen des Theobromins vollkommen übereinstimmten. So wird die wässerige Lösung desselben nicht gefällt durch das Kupferreagens; wohl aber erzeugt ammoniakalische Silberlösung einen Niederschlag, der in überschüssigem Ammoniak leicht löslich ist. Endlich wird das Platindoppelsalz des Körpers, wie das des Theobromins beim Waschen mit Wasser und Alkohol in die freie Base, Salzsäure und Platinchlorid gespalten.

Hiermit ist zweifellos erwiesen, dass die oben beschriebene in seidenglänzenden Nadeln krystallisirende Substanz eine Verbindung von Adenin mit Theobromin ist, und zwar aus gleichen Molekülen beider Basen bestehend.

Es gelang, dieselbe Verbindung durch Vereinigung von Adenin und Theobromin in wässeriger Lösung zu erhalten.

Krystallisirt man ein Gemenge von einem Molekül Adenin mit einem Molekül Theobromin aus heissem Wasser um, so erstarrt die Lösung beim Erkalten zu einem Krystallbrei, welcher aus rein weissen, feinen Nadeln besteht, jedoch ausserdem zahlreiche Krystalle von Theobromin enthält. Hiernach könnte man vermuthen, dass Adenin und Theobromin sich nicht im molekularen Verhältniss mit einander verbinden, sondern dass ein Mol. Theobromin mit mehr als einem Molekül Adenin eine Vereinigung eingeht. Dies ist jedoch nicht der Fall; denn krystallisirt man ein Gemenge von einem Molekül Theobromin mit drei Molekülen Adenin aus Wasser um, so schieden sich beim Erkalten nur rein weisse, glänzende, lange Nadeln aus, welche der Analyse nach aus gleichen Molekülen Adenin und Theobromin bestanden; der Körper enthielt 19.82% Krystallwasser.

Berechnet	Gefunden:
für $C_5H_5N_5 \cdot C_7H_8N_4O_2$ :	
40,00% N.	39,87% N.

Versucht man diese Verbindung aus Wasser umzu-krystallisiren, so scheidet sich der Körper nicht unzersetzt aus, sondern es erscheinen neben den nadelförmigen Krystallen wiederum auch solche des Theobromins. Diese Erscheinung beweist, dass die Verbindung des Adenins mit Theobromin nur eine lockere ist, und dass schon die verschiedene Löslichkeit beider Alloxurbasen in Wasser zu einer Spaltung ihrer Verbindung führt.

Von Bruhns ist schon vor einigen Jahren auf die Verbindungsfähigkeit von Alloxurbasen untereinander hingewiesen worden. Er beschrieb die Doppelbase Adenin-Hypoxanthin, welche beständig ist und aus Wasser gut umkrystallisirt werden kann. Hiernach ist die genannte Eigenschaft der Alloxurbasen eine allgemeinere, scheint jedoch, wie aus dem Verhalten des Adenin-Theobromins sich ergibt, nur dann zu beständigen Verbindungen zu führen, wenn die Löslichkeit der gegen einander reagirenden Basen annähernd dieselbe ist.

Jedenfalls wird man in allen Fällen, wo es sich um die Untersuchung von Alloxurkörpern handelt, gut thun, auf diese Eigenschaft zu achten.

### Ueber eine neue Base im Theeextract.

Nach Gewinnung des Adenins in der oben beschriebenen Weise wurden alle pikrinsäurehaltigen Filtrate zunächst nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Aether extrahirt. Die entfärbten Flüssigkeiten wurden vereinigt, mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung im Ueberschuss versetzt. Der gut ausgewaschene Niederschlag wurde dann zur Trennung der in ihm enthaltenen Alloxurbasen in der üblichen Weise aus Salpetersäure von spec. Gew. 1,15 umkrystallisirt. Es wurde nur die Hypoxanthinfraktion (nach Salomon), d. h. die in kalter Salpetersäure unlöslichen oder schwerlöslichen Silberverbindungen der Alloxurbasen, in zur weiteren Untersuchung ausreichender Menge erhalten.

Die Hypoxanthinfraktion wurde unter heissem Wasser durch Schwefelwasserstoffgas zersetzt, das Filtrat durch Kochen vom Schwefelwasserstoffgase befreit und mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Es schied sich beim Erkalten sofort ein in langen, feinen, zu Büscheln vereinigten Nadeln krystallisirende weisse Substanz aus. Sie ist in kaltem Wasser schwer, in heissem leichter löslich.

Beim Behandeln der Substanz mit conc. Salpetersäure hinterbleibt ein intensiv gelber Fleck, der in einer Ammoniakatmosphäre stark roth wird, beim Erwärmen aber die ursprüngliche Farbe wieder annimmt. Auch durch Natronlauge wurde der gelbe Verdampfungsrückstand intensiv roth gefärbt, welche Farbe beim Erwärmen in braunroth übergeht.

Setzt man nach der Einwirkung von Salzsäure und chloresaurem Kali den Rückstand Ammoniakdämpfen aus, so färben sich die Ränder violettroth.

Die wässerige Lösung der Base wird gefällt durch ammoniakalische Silberlösung, ferner durch Kupfersulfat und Natriumbisulfid, durch Kupfersulfat und Natriumthiosulfat aber nur in der Wärme, wie Hypoxanthin.

Die Silberverbindung löst sich in heisser Salpetersäure von 1,2 spec. Gew. leicht auf, der in der Kälte sich ausscheidende voluminöse Niederschlag besteht aus sehr feinen, zu Drüsen vereinigten weissen Nadelchen.

Die Base löst sich in 33procentiger Natronlauge spielend leicht auf.

In kalt gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung löst sie sich in der Wärme leicht, beim Erkalten scheiden sich bis centimeterlange gelbe Prismen aus.

Eine Lösung von wenigen Milligramm der Base in 1 cbcm. heisser verd. Salzsäure lässt in der Kälte schwach glänzende, farblose Nadeln auskrystallisiren. Das salzsaure Salz muss demnach ziemlich schwer in Wasser löslich sein. Das salpetersaure Salz fällt erst aus der eingeengten salpetersauren Lösung in Form rundlicher, vielfächiger und glasglänzender Krystalle aus. Das schwefelsaure Salz schied sich selbst nach längerem Stehen der eingeengten schwefelsauren Lösung nicht aus.

Das Platindoppelsalz scheidet sich erst nach längerem Stehen aus der wässerigen Lösung in Form stark glänzender, vierseitiger Prismen von orangerother Farbe aus. Das Gold-doppelsalz wird in ähnlicher Weise in skelettförmigen, farrenblätträhnlichen Gebilden erhalten.

Die Menge der Base war gering, um ausser den genannten Reactionen noch eine Analyse ausführen zu können, welche über die Verschiedenheit oder die Identität der vorliegenden Verbindung mit einer der bisher bekannten Alloxurbasen hätte Aufschluss geben können. Dennoch scheinen mir die erwähnten Reactionen schon hinreichend die Vermuthung zu unterstützen, dass die beschriebene Base eine bisher unbekannte ist.

Da in dem Theeextracte ausser Adenin noch Theophyllin von Kossel entdeckt worden ist, so ist selbstverständlich, dass namentlich in Bezug auf die Identität mit diesem die neue Base untersucht wurde. Jedoch unterscheiden sich beide deutlich durch ihre Krystallform, ferner dadurch, dass die neue Base zur Hypoxanthin-, das Theophyllin dagegen zur Xanthinfrac-tion gehört.

Die Unterschiede zwischen der neuen Base und den Alloxurbasen Guanin, Xanthin, Adenin, Hypoxanthin, Theobromin und Caffein sind so gross, dass sie nicht weiter erörtert werden brauchen. Viel eher könnte man an eine Identität der vorliegenden Base mit dem von Balke gefundenen



Episarkin denken. Doch auch hier zeigen sich mannigfaltige Abweichungen.

Das Episarkin ist nach Balke durch Pikrinsäure nicht fällbar, während die obige Base mit Pikrinsäure eine sehr schön krystallisirende Verbindung giebt. Das Episarkin löst sich in 13,000 Theilen kalten Wassers, zeigt also etwa dieselbe Löslichkeit wie die Harnsäure; die neue Base ist zwar schwerer löslich als Adenin und Hypoxanthin, jedoch wesentlich leichter löslich in Wasser als in Harnsäure, Guanin und Xanthin. Endlich fallen die Farbenreactionen, d. h. die Xanthinreaction und die bei Einwirkung von Salzsäure, Kaliumchlorat und Ammoniakdämpfen auftretenden Farbenerscheinungen, beim Episarkin anders aus als bei der obigen Base.

Auch an eine Identität dieses Körpers mit einer der von C. Wulff und mir aus menschlichem Harn isolirten Basen<sup>1)</sup> ist bei näherem Vergleiche ihrer Eigenschaften nicht zu denken. Vielmehr sprechen alle Reactionen dafür, dass wir es in der vorliegenden Base mit einem bisher unbekanntem Alloxurkörper zu thun haben.

Hypoxanthin konnte unter den Basen des Theeextractes nicht nachgewiesen werden. Wenn es trotzdem bei der ursprünglichen Isolirungsmethode des Adenins neben diesem in grösserer Menge gefunden wurde, so ist der Grund hierfür, wie schon oben angegeben, in der Umkrystallisation der unreinen, starkgefärbten Silberverbindungen der Basen aus verd. Salpetersäure zu suchen. Die hierbei durch Oxydation der Farbstoffe entstehende salpetrige Säure führt einen beträchtlichen Theil des Adenins in Hypoxanthin über, eine Umwandlung, welche selbst durch Anwendung von Harnstoff nur beschränkt, aber nicht völlig verhindert werden kann. Die Anwendung dieses Trennungsverfahrens von Alloxurkörpern kann daher, wie in dem vorliegenden Falle, leicht zu falschen Resultaten in Bezug auf Verbreitung, Vorkommen und gegenseitige Mengenverhältnisse der Basen führen, und es empfiehlt sich das Umkrystallisiren der Silberverbindungen aus Salpeter-

<sup>1)</sup> Verh. der physiolog. Gesellsch. zu Berlin, Jahrgang 1893—1894. XVII. Sitzung.

säure nur dann vorzunehmen, wenn dieselben vorerst möglichst rein, d. h. frei von Farbstoffen und anderen leicht oxydirbaren Substanzen erhalten sind. Dann freilich wird die Methode gute Resultate liefern und vor allem dort Anwendung finden müssen, wo es sich um die Untersuchung und Auffindung neuer Basen handelt.

Die schlechtere Ausbeute an Adenin bei der Fällung desselben mittelst ammoniakalischer Silberlösung erklärt sich daraus, dass die Silberverbindung des Adenins, wenn auch schwer löslich, doch nicht unlöslich in überschüssigem Ammoniak ist, welches bei dieser Fällungsmethode immer angewendet wird. Die Löslichkeit der Silberverbindungen der Alloxurbasen hängt zweifellos mit der Anzahl der in ihrem Molekül vorhandenen und durch Metallatome vertretbaren Imidgruppen zusammen und zwar derartig, dass mit der grösseren Anzahl solcher Imidgruppen die Löslichkeit der Silberverbindungen in Ammoniak abnimmt. Die Silberderivate der Harnsäure, des Guanins und Xanthins werden daher schwerer löslich sein, als die des Adenins und Hypoxanthins, und letztere wiederum schwerer als die Silberverbindungen ihrer Alkylderivate. Die Löslichkeit ist natürlich auch abhängig von der Menge des Ammoniaks. Es darf daher nicht auffallend erscheinen, wenn mit demselben Reagens bei demselben Untersuchungsmaterial, wie Harn, von verschiedenen Forschern verschiedene Resultate erhalten worden sind, so dass man bisher zu keiner bestimmten Ansicht über die Menge der im normalen Harn vorkommenden Alloxurbasen kommen konnte.

Die Anwendung des Kupferreagens beim Harn hat nun gezeigt, dass man mit diesem Fällungsmittel sehr gut übereinstimmende Zahlen für die Alloxurbasen des Harns erhält (siehe M. Krüger und Wulff, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XX, und R. Kolisch und H. Dostal, Wien klin. Wochenschrift, Nr. 23 und 24, 1895), und sie führte ferner zu dem bemerkenswerthen Ergebniss, dass die Alloxurbasen in viel grösserer Menge im Harn enthalten sind, als vordem angenommen wurde.

Auch hier hat sich, wie bei der Theelauge, das Kupferreagens im Vergleich mit der ammoniakalischen Silberlösung als das bessere Fällungsmittel erwiesen, und es steht zu erwarten, dass es diesen Vorrang noch in vielen weiteren Fällen behaupten wird.

Auch dürfte es von Wichtigkeit sein, alle die Untersuchungen über Alloxurbasen, welche ihre Verbreitung und Mengenverhältnisse in thierischen und pflanzlichen Organen und Geweben zum Vorwurf haben, einer Controlle mit Hilfe des Kupfersulfates und Natriumbisulfites zu unterziehen.

Der experimentelle Theil der vorliegenden Untersuchung wurde während des Monates August 1894 in der chemischen Abtheilung des physiologischen Institutes zu Berlin ausgeführt.

Crefeld, königl. Färberei- und Appreturschule,  
im September 1895.