

# Die Guanylsäure der Pancreasdrüse und deren Spaltungsprodukte.

Von  
**Ivar Bang**, Christiania.

---

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Upsala.

(Der Redaktion zugegangen am 17. September 1898.)

---

Aus den Arbeiten Miescher's, Altmann's, Kossel's und Anderer geht hervor, dass sich aus dem Zellenkern eine Reihe organischer, phosphorhaltiger Verbindungen herstellen lässt, welche sich sogar als ziemlich starke Säuren charakterisiren. Nach ihrem Ursprung vom Zellenkern nennt man sie Nucleinsäuren.

Die Nucleinsäuren, welche im Organismus meistens im Verein mit Eiweiss als ausserordentlich complicirte Verbindungen vorkommen, lassen sich auf der anderen Seite wiederum weiter in mehrere neue Substanzen spalten. Diese Spaltungsprodukte sind verschieden, je nachdem die zertheilende Einwirkung stärker oder schwächer ist. Die Nucleinsäuren sind daher sehr complicirte Verbindungen, gleichzeitig wie deren leichte Spaltbarkeit sie als sehr labile Verbindungen charakterisiren.

Diese ihre labile Natur hat in hohem Grade ihre Untersuchung erschwert.

Von den Spaltungsprodukten der Nucleinsäuren kommen einzelne regelmässig vor, während andere dagegen bei einigen Nucleinsäuren fehlen, bei anderen aber gefunden werden.

Die Spaltungsprodukte, welche für alle Nucleinsäuren gemeinsam sind, sind vor allen Dingen der Phosphor, welcher schliesslich als Phosphorsäure abgespalten wird. Weiter werden

regelmässig Xanthinbasen gefunden. Das dritte Spaltungsprodukt, welches man bisher immer gefunden hat, ist das Thymin. Von diesen nehmen die Xanthinbasen eine Sonderstellung ein. Aus Kossel's Untersuchungen geht hervor, dass man bei einzelnen Nucleinsäuren überwiegend einzelne Basen findet, während andere oft hauptsächlich andere Xanthinbasen enthalten. Vor einiger Zeit glaubte Kossel sogar eine Nucleinsäure gefunden zu haben, welche ausschliesslich eine Base enthielt, nämlich Adenin: fortgesetzte Untersuchungen haben jedoch Kossel die Ueberzeugung verschafft, dass dies ein Irrthum gewesen ist.

Wenn daher das Verhältniss der Xanthinbasen die Existenz verschiedener Nucleinsäuren wahrscheinlich macht, findet dies seine bestimmtere Bestätigung dadurch, dass man mehrere Spaltungsprodukte in einzelnen Nucleinsäuren gefunden hat, nach welchen man vergebens in anderen gesucht hat. Ein solches Spaltungsprodukt ist Zucker. Während sich bei der Spermanucleinsäure überhaupt kein Zucker als Spaltungsprodukt nachweisen lässt, findet man nach Kossel in Hefenucleinsäure sowohl eine Hexose wie eine Pentose. Endlich kommt in der Thymusnucleinsäure eine Zuckergruppe vor, welche jedoch dergestalt gebunden ist, dass sie nicht als Zucker abgespalten werden kann, sondern nur nach weiterer Spaltung als Lävulinsäure nachgewiesen werden kann.

Schliesslich deutet die Art, auf welche man die Nucleinsäuren im Organismus gebunden findet, auf dasselbe hin. Die Nucleinsäuren findet man nämlich theils in ungepaartem Zustande oder gebunden an Protamin (die Spermanucleinsäure) und theils in loser Verbindung mit Eiweiss, wo man leicht die Nucleinsäure isoliren kann (die Thymusnucleinsäure) und endlich nimmt man eine feste Verbindung zwischen der Nucleinsäure und dem Eiweiss an (das Nucleoproteid von Pancreas), bei welcher es bisher nicht gelungen ist, die Nucleinsäure zu isoliren.

Von diesem Nucleoproteid lässt sich indessen auch eine Nucleinsäure durch Anwendung einer von der gewöhnlichen etwas abweichenden Methode herstellen.

Mit Hilfe dieser neuen Methode ist es zuerst Professor Hammarsten gelungen, hieraus eine Nucleinsäure herzustellen. Die Untersuchung dieser neuen und besonders eigenthümlichen Nucleinsäure ist mir von Professor Hammarsten überlassen worden, wofür ich mir hiermit erlaube, meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Um die Nucleinsäure von Pancreas herzustellen, kann man entweder von Pancreas selbst ausgehen oder noch besser von dem Nucleoproteid.

Das Princip der Herstellung ist, das Proteid resp. Pancreas selbst im Wasserbad mit Alkali zu kochen. Dadurch wird das Proteid so gespalten, dass, ausser anderen noch nicht untersuchten Produkten, Alkalialbuminat, Eisenoxydhydrat und nucleinsaures Alkali gebildet werden. Die Flüssigkeit wird neutralisirt und kochend heiss filtrirt. Auf dem Filter findet man das geronnene Alkalialbuminat und Eisenoxyd, während das Filtrat hellgelb und klar ist. Während des Abkühlens des Filtrates bemerkt man einen stets zunehmenden Niederschlag, welcher nach und nach zu einem weissen voluminösen Bodensatz steigt. Dieser Bodensatz ist das nucleinsaure Alkali. Wärmt man die Flüssigkeit aufs Neue auf, so verschwindet der Bodensatz vollständig und kommt wieder durch Abkühlung zum Vorschein. Das nucleinsaure Alkali ist leicht auflöslich in der warmen Flüssigkeit und scheidet sich in jedem Falle theilweise wiederum durch Abkühlung aus.

Auf dieselbe Art verhält sich das nucleinsaure Alkali gegenüber destillirtem Wasser. Diese Eigenschaft gibt uns ein Mittel in die Hände, um die Nucleinsäure noch mehr zu reinigen. Der Bodensatz wird in destillirtem Wasser aufgeschlämmt und zum Kochen erhitzt, worauf die Flüssigkeit kochend heiss filtrirt wird. Auf dem Filter bleibt aller Schmutz und man erhält ein klares, schwach gelb gefärbtes Filtrat, worin sich das nucleinsaure Alkali nach dem Abkühlen reiner und weisser als früher ausscheidet.

Wird das nucleinsaure Alkali noch einmal auf dieselbe Weise behandelt, erhält man ein vollkommen wasserklares

Filtrat, worin sich die Nucleinsäure durch Abkühlung vollständig weiss ausscheidet.

Da die Ausbeute an Nucleinsäure mit jeder Reinigung abnimmt, muss man entweder annehmen, dass die Nucleinsäure zum Theil durch die Behandlung mit kochendem Wasser zerstört wird oder auch muss das nucleinsaure Alkali theilweise in kaltem Wasser löslich sein, obgleich viel weniger als in warmem.

Dass diese letzte Annahme richtig ist, wird dadurch bewiesen, dass man eine neue Portion Nucleinsäure erhalten kann, wenn man das Filtrat von dem ausgeschiedenen nucleinsauren Alkali concentrirt.

Das schliesst jedoch auf der anderen Seite nicht aus, dass das nucleinsaure Alkali zum Theil auch durch die Behandlung mit dem kochenden Wasser zerstört sein könnte. Im Gegentheil sollte man a priori dies erwarten, da Kossel durch nur 10 Minuten langes Kochen im Wasserbade seine Thymusnucleinsäure spaltet. Specielle Versuche, welche ausgeführt wurden, um dies zu untersuchen, zeigten jedoch, dass sogar ein Kochen von 15 Minuten über freier Flamme nicht die geringste schädliche Wirkung hatte. In Uebereinstimmung hiermit konnte eine ähnliche Auflösung von nucleinsaurem Alkalisalz stundenlang in kochendem Wasserbade ohne Schaden stehen, und zwar ungeachtet dass die Flüssigkeit dabei stark eingedampft wurde.

Aus Gründen, die später angeführt werden, benenne ich diese Nucleinsäure Guanylsäure.

Das Alkalisalz der Guanylsäure, nach obengenanntem Princip hergestellt, gab nicht Millon's Reaction, dagegen eine allerdings schwache, jedoch deutliche Biuretreaction.

Um zu entscheiden, wie weit diese schwache Biuretreaction sich von Verunreinigung mit einem eiweissartigen Körper her schrieb oder von der Guanylsäure selbst stammte, wurde die Guanylsäure aufs Neue mehrere Male mit kochendem Wasser etc. gereinigt, wodurch die Biuretreaction jedes Mal schwächer wurde, bis sie endlich verschwand. Ging man von dem Material aus, das durch Abkühlung der neutralisirten und filtrirten

ursprünglichen Auflösung ausgefallen war, so war man schon, nachdem man einige Male mit kochendem Wasser gereinigt hatte, von der Biuretreaction befreit.

Weiterhin verschwand die Biuretreaction, wenn man nach mehrmaliger Reinigung durch Wasser das guanylsäure Alkali in Lauge löste und die freie Guanylsäure durch Zusatz von einer Säure im Ueberschuss ausschied.

Die Biuretreaction muss daher als Zeichen einer Verunreinigung angesehen werden und schreibt sich nicht von der Guanylsäure selbst her.

Meine Methode zur Herstellung von Guanylsäure ist die folgende:

Zu 12 gr. Nucleoproteid werden 400 ccm. 2%ige KOH-Lauge in einem Becherglas zugesetzt und  $\frac{1}{2}$  Stunde lang in einem kochenden Wasserbad hingesezt, wonach die Flüssigkeit neutralisirt und kochendheiss durch einen Faltenfilter filtrirt wird. Das Filtrat bleibt bis zum nächsten Tag stehen. Der Bodensatz, der im Laufe der Nacht entstanden ist, wird abgetrennt und mit destillirtem Wasser in einem kleinen Becherglas aufgeschlämmt. Darauf wird über freier Flamme bis zum Kochen erhitzt und kochendheiss filtrirt. Das Filtrat bleibt 24 Stunden stehen. Der Bodensatz wird noch einmal auf dieselbe Weise gereinigt und die Lösung bleibt noch 24 Stunden stehen. Der Bodensatz, welcher sich gebildet hat, wird in circa 1%iger KOH aufgelöst. Es wird filtrirt. Dem Filtrat wird unter Umrühren Essigsäure von 5% bis zu einem kleinen Ueberschuss zugesetzt. Der Bodensatz, der aus der freien Guanylsäure besteht, wird abfiltrirt und sorgfältig mit Alkohol ausgewaschen. Nach weiterer Behandlung mit Alkohol und Aether erhält man die Guanylsäure als ein weisses, staubendes Pulver, welches nicht hygroskopisch ist.

Es springt sofort in die Augen, dass man hier die freie Nucleinsäure mit Essigsäure ausscheidet und nicht mit Salzsäure, welche sonst hierzu benutzt wird. Im Gegensatz zu den übrigen Nucleinsäuren, welche stärkere Säuren als Essigsäure sind, ist die Guanylsäure eine ganz schwache Säure, weshalb auch die Essigsäure die freie Nucleinsäure ausscheidet

aus ihrer alkalischen Auflösung. Salzsäure vermag allerdings diese Spaltung auch auszuführen, aber der Gebrauch dieser Säure ist mit ganz grossen Unannehmlichkeiten verbunden. Die Guanylsäure ist fürs Erste leicht löslich in Salzsäure, selbst wenn diese etwas verdünnt ist, während sie in 5<sup>o</sup> oiger Essigsäure schwerer auflöslich ist als in Wasser. Ferner wird die Guanylsäure theilweise durch längeres Stehen in salzsaurer Lösung selbst bei gewöhnlicher Temperatur zerstört, was ich betreffs der Essigsäure nicht beobachtet habe. Bei Benutzung von Essigsäure ist daher auch das Risiko geringer.

Ausser durch Kochen des Proteids mit Alkali kann die Guanylsäure auch durch Kochen des Pancreas mit Alkali hergestellt werden. Das fein zerschnittene Pancreas wird 3 Stunden mit 2<sup>o</sup> oiger KOH gekocht. Das Filtrat muss etwas eingedampft werden. Das Präparat, welches man erhält, ist sehr unrein.

Endlich ist es mir gelungen, Guanylsäure herzustellen durch Kochen des Nucleoproteids allein mit Wasser. Man kocht dasselbe über freier Flamme ca. 2 Minuten und filtrirt. Nach Abkühlung fällt die Guanylsäure theilweise aus. Die Ausbeute ist geringer als beim Kochen mit KOH.

Die Guanylsäure selbst hat dieselbe Eigenschaft wie ihr Kalisalz: sie ist leicht löslich in warmem Wasser und scheidet sich beim Abkühlen theilweise wiederum aus.

Ihre Löslichkeit in kaltem Wasser beträgt 0,3<sup>o</sup> %.

Die Guanylsäure hat in wässriger Lösung eine schwach saure Reaction. Ihre Alkalisalze reagiren neutral.

Die Guanylsäure löst sich ziemlich leicht in Alkali und Ammoniak. Aus dieser Auflösung scheidet sie sich durch Neutralisation resp. Ansäuern mit einer Säure wiederum aus. In alkalischer Auflösung wird sie auch durch Zusatz von Alkohol gefällt.

Ferner ist die Guanylsäure in Mineralsäuren leicht löslich: selbst in 1<sup>o</sup> oiger HCl wird sie leicht gelöst. Dagegen wird sie schwer gelöst in 5—10<sup>o</sup> oiger Essigsäure. In concentrirter Essigsäure wird sie jedoch mit Leichtigkeit gelöst. In einer Mineralsäure oder in concentrirter Essigsäure aufgelöst, wird die Guanylsäure durch Zusatz eines Alkalis aus-

geschieden. Dagegen wird sie in salzsaurer Auflösung von Alkohol nicht gefällt.

Die Guanylsäure bildet im Wasser unlösliche Verbindungen mit den meisten schweren Metallen.

Die Kupferverbindung erhält man durch Zusatz einer Auflösung von  $\text{CuSO}_4$  zu guanylsaurem Alkali. Diese Verbindung ist grün gefärbt, unlöslich in warmem Wasser, unlöslich im Ueberschuss von  $\text{CuSO}_4$ .

Das Silbersalz ist weiss, unlöslich in kaltem und warmem Wasser. Es entsteht durch Zusatz von Silbernitrat zu guanylsaurem Alkali.

Das Zinksalz ist unlöslich in kaltem und warmem Wasser, unlöslich im Ueberschuss des Reagens.

Das Bleisalz verhält sich wie das Zinksalz.

Wird Eisenchlorid zu einer Auflösung von guanylsaurem Alkali hinzugesetzt, erhält man eine braungelbe Ausscheidung von guanylsaurem Eisen. Dies ist unlöslich in der Wärme, aber löslich im Ueberschuss des Fällungsmittels.

Mit  $\text{HgCl}_2$  erhält man das Hg-Salz, unlöslich im Ueberschuss von  $\text{HgCl}_2$ , löslich in Essigsäure. Mit  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  erhält man eine Ausscheidung, unlöslich im Ueberschuss von  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ . Mit  $\text{HgJ}_2$  JK allein, keine Ausscheidung. Ebenso wenig mit Zusatz von Essigsäure. Setzt man dagegen Alkohol hinzu, erhält man selbstverständlich einen Niederschlag. Setzt man  $\text{HCl}$  und Alkohol hinzu, erhält man dagegen keine Ausscheidung. Hieraus geht hervor, dass man keine Beimengung dieser Nucleinsäure riskirt, wenn man Glycogen aus Pancreas nach Brücke-Külz's Methode herstellt.

Die Guanylsäure scheidet sich in wässriger Lösung nach dem Zusatz von Phosphorwolframsäure in saurer Auflösung aus, ebenso wird sie von Gerbsäure und Pikrinsäure gefällt.

Die Guanylsäure gibt nicht Millon's Reaction. Ebenso wenig gibt sie die Biuretreaction, weder in wässriger Auflösung noch in Substanz. Dagegen gibt sie beim Kochen mit  $\text{HNO}_3$  die Xanthoproteinreaction, welche nach Zusatz von  $\text{NH}_3$  stärker hervortritt. Mit Adamkiewicz's Reaction erhält man braunrothe Farbe, welche bald in Schwarz übergeht.

Auf Grund der Schwerlöslichkeit der Guanylsäure in Wasser ist es von geringerer Bedeutung, dass Ca- und Ba-Wasser keine Ausscheidung geben, falls sie einer wässrigen Guanylsäureauflösung zugesetzt werden. Ferrocyankalium und Essigsäure geben ebenfalls keine Ausscheidung, wenn man sie einer gleichen Auflösung zusetzt.

Die Schwerlöslichkeit der Guanylsäure im Wasser bringt es auch mit sich, dass ihre Eiweiss fällenden Eigenschaften nicht genau studirt werden konnten. Eine wässrige Guanylsäurelösung gab mit Serumeiweiss in essigsaurer Lösung keine Ausscheidung, wohl aber mit Hühnereiweiss eine leichte Trübung.

Die Guanylsäure gibt mit  $\text{CuSO}_4$  und Alkali eine blaue klare Flüssigkeit, die durch Kochen nicht reducirt wird. Mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung erhält man eine klare Flüssigkeit. Mit Ammoniak und Magnesiamixtur erhält man keine Ausscheidung.

Ebenso wie die Guanylsäure frei von Eiweiss ist, ist sie auch frei von einer Verunreinigung mit Zucker, Xanthinbasen oder Phosphorsäure.

Stellt man Guanylsäure aus dem Nucleoproteid nach der angeführten Methode dar, so erhält man nur eine verhältnissmässig geringe Ausbeute — ca. 10% —, wenn schon ich Grund habe, zu glauben, dass das Nucleoproteid sich in etwa gleiche Theile Eiweiss und Guanylsäure spaltet. Die Ursache der geringen Ausbeute ist gewiss darin zu suchen, dass die Guanylsäure zum Theil beim Kochen mit Alkali zerstört wird. Kocht man sodann die Nucleinsäure weiter mit 2% iger KOH, so erhält man ein gelécartiges Produkt, welches noch stickstoffreicher als die Guanylsäure ist. Diesen Körper habe ich noch nicht untersucht. Ausserdem geht sicherlich ein Theil Guanylsäure beim Reinigen verloren.

Die reine Guanylsäure enthält kein Fe: sie ist auch S-frei. Beim Verbrennen hinterlässt sie eine schwer verbrennbare Kohle. Sie ist beinahe aschefrei. Beim Schmelzen mit Kali und Salpeter erhält man eine reichliche Menge Phosphorsäure.

Zur Analyse wurden 3 Präparate Guanylsäure hergestellt.

jedes von ca. 5 gr. Die Methode war die obengenannte. Das mit Alkohol und Aether behandelte Präparat wurde zuerst an der Luft, später bei 95° zum constanten Gewicht getrocknet. Die Erhitzung auf 95° hatte keine zersetzende Wirkung. Es wurden N-, P-, sowie C- und H-Bestimmungen ausgeführt.

Die N-Analysen wurde nach Kjeldahl mit Wilfarth's Modification vorgenommen.

### Präparat Nr. I.

- 1) Abgewogen 0,1396 gr. Substanz  $H_2SO_4$ ,  
verbraucht 14,10 ccm. = 18,18% N.
- 2) Abgewogen 0,1206 gr. Substanz  $H_2SO_4$ ,  
verbraucht 12,25 ccm. = 18,28% N.

1 ccm.  $H_2SO_4$  = 1,8 mgr. N.

### Präparat Nr. II.

Eine N-Bestimmung ergab einen Gehalt von 18,20% N.

Die Notizen über die Menge abgewogener Substanz und verbrauchter  $H_2SO_4$  sind leider verloren gegangen.

### Präparat Nr. III.

- 1) Abgewogen 0,1370 gr. Substanz  $H_2SO_4$ ,  
verbraucht 17,93 ccm. = 18,32% N.
- 2) Abgewogen 0,2110 gr. Substanz  $H_2SO_4$ ,  
verbraucht 27,27 ccm. = 18,09% N.

Die benutzte Säure war  $\frac{1}{10}$  normal.

Die P-Analysen wurden ausgeführt durch Schmelzen der Substanz mit der zehnfachen Menge Kali und darauf etwas Salpeter. Nach beendigter Schmelzung wurde mit Wasser ausgezogen und mit HCl übersättigt. Darauf wurde im Wasserbad bis zur Trockenheit eingedampft und sodann die Salzsäure bei 150° C. verjagt. Der Rest wurde mit destillirtem Wasser ausgezogen, filtrirt, ausgewaschen etc. Das Filtrat wurde zuerst mit Molybdänflüssigkeit in der gebräuchlichen Weise ausgefällt. Dieser Bodensatz wurde, nachdem er 24 Stunden bei ca. 40° C. gestanden hatte und mit Molybdänflüssigkeit ausgewaschen war, in Ammoniak gelöst und filtrirt. Das Filtrat wurde

mit Magnesiainmischung gefällt, und der Phosphor als pyrophosphorsaures Magnesium bestimmt.

Präparat Nr. I.

Abgewogen 0,3300 gr. Substanz. Pyrophosphat = 0,0890 gr. P = **7,53**

Präparat Nr. II

1. Abgewogen 0,2208 gr. Substanz. Pyrophosphat = 0,0620 gr. P = **7,84**

2. Abgewogen 0,2398 gr. Substanz. Pyrophosphat = 0,0656 gr. P = **7,78**

Präparat Nr. III.

Abgewogen 0,2448 gr. Substanz. Pyrophosphat = 0,0660 gr. P = **7,53**

Die C- und H-Analysen. Die Substanz gemischt mit Bleichromat im Platinaschiffchen wurde in offener Röhre mit Kupferoxyd und blanker Kupferspirale, sowie durchgeleitetem O-Gas verbrannt.

Präparat Nr. I.

Abgewogen 0,2126 gr. Substanz. CO<sub>2</sub> = 0,2680 gr. = **34,28%** C | H<sub>2</sub>O = 0,0731 gr. H = **3,82%**

Präparat Nr. II.

1. Abgewogen 0,2327 gr. Substanz. CO<sub>2</sub> = 0,2928 gr. C = **34,34%** | H<sub>2</sub>O = 0,0994 gr. H = **4,72%**

2. Abgewogen 0,2360 gr. Substanz. CO<sub>2</sub> = 0,2996 gr. C = **34,61%** | H<sub>2</sub>O = 0,0986 gr. H = **4,62%**

Präparat Nr. III.

1. Abgewogen 0,3514 gr. Substanz. CO<sub>2</sub> = 0,4378 gr. C = **33,98%** | H<sub>2</sub>O = 0,1320 gr. H = **4,18%**

2. Abgewogen 0,2692 gr. Substanz. CO<sub>2</sub> = 0,3326 gr. C = **33,70%** | H<sub>2</sub>O = 0,1114 gr. H = **4,59%**

Zur besseren Uebersicht stelle ich diese Zahlen hier zusammen:

	C	H	N	P
Präparat Nr. I.	34,28	3,82	18,18	7,53
	—	—	18,28	—
Präparat Nr. II.	34,34	4,72	18,10	7,84
	34,61	4,62	—	7,78
Präparat Nr. III.	33,98	4,18	18,32	7,53
	33,70	4,59	18,09	—
Durchschnitt:	34,17%	4,39%	18,21%	7,67%

Von den angeführten Analysen stimmen die N-Analysen hinreichend überein; ebenso darf man die P-Analysen als zufriedenstellend ansehen. Dagegen sind die Differenzen in den C- und H-Analysen grösser, als wünschenswerth ist. Diese fordern in hohem Grade zu fortgesetzten Analysen mit neuen Präparaten auf, um endlich die Zusammensetzung der Guanylsäure festlegen zu können.

Dahingegen habe ich es als überflüssig angesehen, weitere Analysen über dieselben Präparate anzustellen, da die Doppelanalysen zeigen, dass die Unübereinstimmungen nicht wohl von Fehlern bei Ausführung der Analyse herrühren. Hiervon darf jedoch die H-Analyse in Präparat Nr. I ausgenommen werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach mit einem Analysenfehler behaftet ist. Mein Material war leider zu gering, als dass ich mehrere Analysen dieses Präparates hätte ausführen können.

Ebenso wie die Guanylsäure nach ihren Auflösungs- und Ausscheidungsverhältnissen, ihrem Widerstand gegenüber kochendem Wasser etc. sehr ungleich den übrigen Nucleinsäuren ist, so ist auch ihre elementare Zusammensetzung von diesen sehr abweichend.

Von speciellm Interesse sind der Stickstoff und der Phosphor. Während man sonst gewöhnlich einen Stickstoffgehalt von ungefähr 13—15,8% findet, enthält diese Nucleinsäure über 18% N. Auf der anderen Seite enthalten die übrigen Nucleinsäuren ca. 10% Phosphor, während diese Nucleinsäure nicht voll 8% P enthält. Diese grosse Abweichung hat, wie wir später sehen werden, ihre Wurzel in der Grundverschiedenheit, welche im Bau dieser und der übrigen Nucleinsäuren herrscht.

Wie bekannt, steht in den übrigen Nucleinsäuren die Anzahl der P-Atome in einem bestimmten Verhältniss zur Anzahl der N-Atome, nämlich  $P : N_3$ . Dieses Verhältniss ist als charakteristisch angesehen worden für die Nucleinsäuren überhaupt; aber in der Guanylsäure ist das Verhältniss, wie wir bald sehen werden, ein anderes, nämlich  $P : N_5$ .

Da ich keine Salze von Guanylsäure analysirt habe, kann

ich noch keine rationelle Formel für diese aufstellen. Inzwischen habe ich versucht, eine empirische Formel aufzustellen, ohne dass ich dieselbe für mehr als eine vorläufige Formel ansehe. Geht man aus von der Formel:  $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$ , hat sie folgende Zusammensetzung: (Zur Vergleichung setze ich den Durchschnitt der für die Guanylsäure gefundenen Zahlen daneben.)

	Berechnet für $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$	Gefunden für die Guanylsäure	Differenz
C	34.19	34.17	— 0.02 <sup>1</sup>
H	4.40	4.39	— 0.01
N	18.13	18.21	+ 0.08
P	8.03	7.67	— 0.36
O	35.22	35.56	—

Ausser der Formel  $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$  kann die Guanylsäure auch die Formel mit 1 Atom O weniger oder mehr haben:  $2(C_{11}H_{17}N_5PO_5)$  und  $2(C_{11}H_{17}N_5PO_6)$ .

	Berechnet für $C_{11}H_{17}N_5PO_5$	Berechnet für $C_{11}H_{17}N_5PO_6$
C	34.83	33.50
H	4.48	4.31
N	18.42	17.77
P	8.20	7.87
O	—	—

Nach dem Angeführten stimmen meine analytischen Werthe am besten mit der Formel  $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$ , ohne dass ich jedoch mit Bestimmtheit die Möglichkeit ausschliessen möchte, dass eine der anderen 2 Formeln die richtige sein könnte. Wie dies sich nun auch verhalten möge, ändert dies doch nicht die Relation zwischen dem Phosphor und dem Stickstoff, was unbedingt als von grösster Bedeutung angesehen werden muss, speciell mit Rücksicht auf die Constitution der Guanylsäure.

Alle 3 Formeln zeigen nämlich, dass das Verhältniss zwischen P und N = 1:5 im Gegensatz zu dem gewöhnlichen 1:3 ist. Hiernach kann man nicht länger das Verhältniss P: N = 1:3 als charakteristisch für die Nucleinsäuren im Allgemeinen ansehen.

Wir haben hier folglich eine organische phosphorhaltige Säure vor uns, welche nach ihren chemischen Reactionen und weiter nach ihrer Zusammensetzung stark abweicht von dem.

was man sonst Nucleinsäure benennt. Dass meine Säure nichtsdestoweniger eine ächte Nucleinsäure ist, beweisen ihre Spaltungsprodukte.

### Die Spaltungsprodukte der Guanylsäure.

Kocht man die Guanylsäure eine Zeit lang im Wasserbad mit einer Mineralsäure, z. B. 2° oiger HCl oder 5° oiger  $H_2SO_4$ , vollzieht sich eine Spaltung derselben, wodurch mehrere neue Substanzen entstehen.

Wenn man sodann nach dem Kochen mit der Mineralsäure die Flüssigkeit alkalisch macht und  $CuSO_4$  hinzusetzt, erhält man beim Erhitzen eine verhältnissmässig starke Reduction.

Wenn man dagegen an ihrer Stelle allein  $NH_3$  zur alkalischen Reaction hinzusetzt, erhält man nach Abkühlung einen starken Bodensatz, der aus Guanin besteht. Das Filtrat der  $NH_3$ -Fällung gibt eine weitere Ausscheidung mit  $AgNO_3$ , welche Ausscheidung die Reste der Basen enthält.

Wenn man nach dem Kochen mit Mineralsäure die Flüssigkeit abkühlt und Kalkmilch bis zur alkalischen Reaction hinzusetzt, kann man  $NH_3$ -Entwicklung beobachten.

Endlich gibt eine Auflösung von Guanylsäure nach Kochen mit Mineralsäure einen Bodensatz mit Magnesiamixtur und  $NH_3$ . Dieser Bodensatz besteht aus phosphorsaurer Ammoniakmagnesia.

Durch Kochen mit einer Mineralsäure wird also die Guanylsäure gespalten in: 1) eine reducirende Substanz, 2) Xanthinbasen, 3) Ammoniak und 4) Phosphorsäure. Möglicher Weise entstehen in geringen Mengen mehrere noch unbekannt Substanzen.

#### 1) Die reducirende Substanz.

Wie bekannt, hat Hammarsten durch Kochen vom Nucleoproteid aus Pancreas mit einer Mineralsäure eine reducirende Substanz erhalten, welche nach ihren Reactionen aller Wahrscheinlichkeit nach zu der Pentosen-Gruppe gehörte: sie reducirte Kupferoxyd, gährte aber nicht: sie gab Tollens' Reaction mit Phloroglucin und Salzsäure und endlich erhielt man durch

Kochen mit Phenylhydrazin ein Osazon, dessen Schmelzpunkt bei  $159^{\circ}$  C. lag.

Da jedoch die Glycuronsäure auch Tollens' Pentose-reaction gibt und auf der anderen Seite nicht gährungsfähig ist, aber doch Kupferoxyd reducirt, sah Hammarsten es nicht für ganz ausgeschlossen an, dass es Glycuronsäure wäre, welche vorlag. Das Osazon der Glycuronsäure ist nämlich kein sicherer Anhaltspunkt, da sein Schmelzpunkt ziemlich verschieden angegeben wird. Später hat Salkowski durch Elementaranalyse des Osazons seinen Charakter als Pentosazon dargelegt.

Wie zu erwarten war, zeigte die aus Guanylsäure hergestellte reducirende Substanz sich identisch mit Hammarsten's Pentose. Der Zucker reducirte Kupferoxyd auf dieselbe zögernde Weise, worauf Salkowski bezüglich des Proteidzuckers aufmerksam gemacht hat. Er war nicht gährungsfähig. Dagegen gibt er ebenso, wie übrigens die Guanylsäure selbst, Tollens' Pentosereaction. Endlich erhält man durch Kochen mit Phenylhydrazin ein Osazon, dessen Schmelzpunkt zwischen  $151^{\circ}$ — $154^{\circ}$  C. liegt. Das Osazon krystallisirt leicht in feinen Nadeln, welche sich zu Rosetten zusammenhängen.

Alle Versuche, den Zucker krystallisirt zu erhalten, missglückten. Dagegen habe ich das Verhalten des Zuckers im polarisirten Lichte untersucht.

Ein Theil der Guanylsäure wurde mit  $5\%$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 Stunden lang im Wasserbade gekocht. Darauf wurde mit  $\text{PbCO}_3$  neutralisirt und das Filtrat mit ammoniakalischem Bleiessig ausgeschieden. Die Ausscheidung wurde ausgewaschen und mit  $\text{H}_2\text{S}$  in wässriger Auflösung zerlegt. Das wasserklare Filtrat wurde hierauf polarimetrisch untersucht, wonach der Gehalt der Lösung an Zucker durch Titrirung mit Fehling'scher Lösung bestimmt wurde. Die Auflösung drehte die Polarisationsebene nach rechts, aber so schwach, dass der Drehungsgrad nicht bestimmt werden konnte. Der Zuckergehalt der Lösung entsprach  $0,38\%$  Traubenzucker.

Nach der Polarisation zu urtheilen, könnte die in Rede stehende Zuckerart sowohl eine Pentose als auch ebenso gut Glycuronsäure sein.

Gegen den Versuch könnte eingewendet werden, dass die Auflösung möglicher Weise andere Substanzen enthielt, welche das Licht polarisiren. Nach dem Schmelzpunkt des Osazon's zu urtheilen, kann dies jedoch kaum eine Zuckerart sein.

Die Untersuchung der reducirenden Substanz hat also das Resultat ergeben, dass die Guanylsäure eine Pentose enthält. Welches die Pentose ist, ist dagegen nicht gelungen, festzustellen.

Aber wenn diese Frage noch offen steht, ist es auch unmöglich, mit Bestimmtheit festzustellen, wie gross der Bruchtheil der Guanylsäure ist, welcher als Pentose abgespalten wird. Bei meinen quantitativen Versuchen, wo ich die Zuckermenge durch Titrirung mit Fehlings'scher Lösung bestimmt habe, habe ich daher nur die der Reduction entsprechende Traubenzuckermenge angegeben.

Bei der Ausführung dieser quantitativen Versuche ergab sich jedoch sofort die Schwierigkeit, dass der Zucker selbst in neutraler Auflösung leicht zerstört wird, selbst durch die geringste Concentration der Auflösung, indem die Flüssigkeit braun gefärbt wird. Diesem Uebelstand habe ich dadurch vorgebeugt, dass ich stets die Guanylsäurelösung in der ursprünglichen Concentration zum Versuch benutzte.

Zum Andern ist die Zeitdauer, welche die Mineralsäure auf die Guanylsäure resp. die Zuckerlösung einwirkt, von Bedeutung. Und drittens ist die Wahl der Mineralsäure ein Moment, welches in Betracht gezogen werden muss.

Um diese Verhältnisse klar zu stellen, wurden folgende Versuche angestellt: 0,1478 gr. Guanylsäure (Präparat Nr. 1) wurden in 50 ccm. 2<sup>o</sup>/oiger HCl aufgelöst und auf 5 Reagensgläser vertheilt, also für jedes Glas 10 ccm., worauf diese in ein kochendes Wasserbad gestellt wurden, wo sie verschieden lange Zeit stehen blieben. Dass das Volumen der Flüssigkeit die ganze Zeit dasselbe war, wurde sorgfältig im Auge behalten. Nach Beendigung des Kochens wurde die Flüssigkeit sorgsam neutralisirt und nach dem Abkühlen sodann filtrirt. Das Filtrat + Washwasser wurde zur Titirprobe mit Fehling'scher Lösung verwandt. Hierfür wurde eine Fehling'sche Lösung benutzt.

welche bis zur halben Stärke verdünnt war. Davon wurden 2 ccm. zu jeder Titrirung gebraucht. Der Versuch bezweckte nur, die relative Reductionsfähigkeit der verschiedenen Proben zu untersuchen, ohne Rücksicht auf die absolute Zuckermenge.

Nr. I.

Herausgenommen nach halbstündigem Stehen im Wasserbade. Reducirt, enthält aber auch nicht zerstörte Guanylsäure, weshalb keine quantitative Bestimmung ausgeführt wurde.

Nr. II.

Herausgenommen nach 1 Stunde. Die Reduction entsprach 7,0 mgr. Traubenzucker. Die Flüssigkeit sieht noch so aus, als ob sie nicht zerstörte Guanylsäure enthält.

Nr. III.

Hat 1½ Stunde gestanden. Die Reduction entsprach 8,3 mgr. Traubenzucker.

Nr. IV.

Stand 2 Stunden lang im Wasserbade. Die Reduction entsprach 9,4 mgr. Traubenzucker = 31,76%.

Nr. V.

Hat 3 Stunden im Wasserbade gestanden. Während die vorhergehenden Proben farblos waren, ist diese Probe schwach gelb gefärbt. Die Reduction entspricht 8,46 mgr. Traubenzucker = 28,58%.

Der Versuch zeigt, dass man die grösste Ausbeute erhält, wenn man die Salzsäure 2 Stunden lang einwirken lässt. Da man durch Fortsetzung des Kochens eine geringere Ausbeute an Zucker erhält, muss man wohl annehmen, dass Hand in Hand mit der Bildung von Zucker zugleich eine Zerstörung von Zucker in der Flüssigkeit vor sich geht. Was man daher selbst im günstigsten Falle erhält, kann wohl kaum als ein wahrer Ausdruck für die in der Guanylsäure existirende Zuckermenge angesehen werden.

Ein anderer Versuch zeigt, wie die Guanylsäure sich beim Auflösen mit 5% iger  $H_2SO_4$  verhält.

Es wurden 0,1940 gr. Nucleinsäure (Präp. Nr. 1) abgewogen, in 50 ccm. 5%iger  $H_2SO_4$  aufgelöst und zu gleichen Theilen auf 5 Reagensgläser vertheilt, welche in ein Wasserbad gesetzt wurden.

Während die günstigste Einwirkungszeit durch Salzsäure 2 Stunden war, erhielt man hier erst nach 2 $\frac{1}{2}$ stündiger Erhitzung im Wasserbade eine Reduction, die 29,2% Traubenzucker entsprach (11,3 mgr. gefunden). Setzte man die Einwirkung bis 4—5 Stunden fort, so sank die Zuckermenge rapid. (Nach 5 $\frac{1}{2}$  Stunden war sie nur 3,6 mg.) Fortgesetzte Versuche mit 5%iger  $H_2SO_4$  zeigten, dass man die beste Ausbeute beim Kochen von 3 Stunden erhielt.<sup>1)</sup>

Ich konnte nun zur Bestimmung der absoluten Zuckermenge in der Guanylsäure übergehen.

Von Präparat Nr. II wurden 0,1438 gr. Substanz abgewogen, aufgelöst in 50 ccm. 5%iger  $H_2SO_4$  und 3 Stunden lang im Wasserbad hingestellt. Nach beendigtem Kochen und Abkühlung wurde die Flüssigkeit sorgfältig mit Alkali neutralisirt und darauf, nachdem sie eine Zeit lang gestanden hatte, filtrirt. Das Filtrat + Waschwasser machte 73 ccm. aus.

Bei der Titrirung mit Fehling'scher Lösung mussten 60 ccm. Filtrat angewendet werden, um 8 ccm. von einer Fehling'schen Lösung zu reduciren, wovon 10 ccm. 45 gr. Traubenzucker entsprachen:

$$60 \text{ ccm.} = 8 \text{ ccm. Fehling.} \quad 73 \text{ ccm.} = 9,73 \text{ ccm.} = \\ 43,8 \text{ mgr. Traubenzucker.}$$

$$0,1438 \text{ gr. Nucleinsäure} = 0,0438 \text{ gr. Traubenzucker} = 30,46\%$$

Von Präparat Nr. III wurden 0,2170 gr. abgewogen, welche gleichfalls mit 5%iger  $H_2SO_4$  gekocht und im Uebrigen wie beim vorhergehenden Versuch behandelt wurden. Filtrat + Waschwasser = 65 ccm. 36 ccm. reducirten 8 ccm. Fehling'scher Lösung.

<sup>1)</sup> Die Einwirkungszeit für eine Mineralsäure kann sich jedoch vielleicht anders gestalten, wenn man andere Mengen Guanylsäure anwendet. Die gefundenen Resultate gelten daher streng genommen nur unter den vorhanden gewesenen Verhältnissen.

36 ccm. = 8 ccm. Fehling, 65 ccm. = 14.44 ccm. =  
0.0650 gr. Traubenzucker.

0.2170 gr. Nucleinsäure = 0.0650 gr. Traubenzucker = **29.92%**.

Wegen der grossen Verdünnungen der Auflösungen können die gefundenen Zahlen nur als ungefähre angesehen werden, aber hält man die geringen Differenzen in den gefundenen Werthen mit der Thatsache zusammen, dass wahrscheinlich ein Theil des Zuckers beim Kochen vernichtet wird, so wird man die verglichene Menge Zucker nicht zu hoch berechnen, wenn man sie in runder Zahl zu **30%** setzt.

## 2) Die Xanthinbasen.

Im Gegensatz zu den Pseudonucleinsäuren zeichnen sich die echten Nucleinsäuren dadurch aus, dass sie Xanthinbasen enthalten, welche sich abspalten lassen durch Kochen der Nucleinsäuren mit einer Mineralsäure. In einzelnen Fällen ist sogar das Kochen mit Wasser allein hinreichend gewesen, die Abspaltung zu veranlassen.

Die Guanylsäure von Pancreas documentirt sich als eine ächte Nucleinsäure dadurch, dass sie auch Xanthinbasen enthält.

Um indessen diese sichtbar zu erhalten, ist es nothwendig, die Guanylsäure mit einer Mineralsäure zu kochen.

Kocht man die Guanylsäure mit einer solchen Mineralsäure und setzt man dann, nachdem man einige Zeit gekocht hat,  $\text{NH}_3$  bis zur alkalischen Reaction hinzu, tritt sehr schnell ein reichlicher schmutziger weisser Bodensatz in der Flüssigkeit ein.

Der Bodensatz gibt die Murexidreaction mit der für Guanin charakteristischen blau-violetten Farbe. Er wird leicht von Alkalien gelöst, wird ebenfalls von Säuren gelöst und bildet mit Salzsäure und Schwefelsäure krystallinische Verbindungen. Der Bodensatz ist äusserst wenig in Wasser löslich, er ist desgleichen schwer in  $\text{NH}_3$  löslich. In  $\text{NH}_3$  gelöst, gibt er mit Silbernitrat einen voluminösen weissen Bodensatz.

Ein Theil des Bodensatzes wurde in Schwefelsäure gelöst und aus dieser Lösung mit  $\text{NH}_3$  ausgeschieden. Darauf wurde er mit destillirtem Wasser ausgewaschen bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction und endlich bis zum constanten Ge-

wicht getrocknet. Von diesem Präparat wurden N-Analysen nach Kjeldahl ausgeführt.

Abgewogen 0,0598 gr. Substanz. Verbrauchte Titriersäure =

15,22 ccm. = 27,40 mgr. N = 45,82% N.

1 ccm. Titriersäure = 1,8 mgr. N.

Berechnet für	Gefunden	Differenz
$C_5H_5N_5O$		
N 46,35%	45,82%	- 0,53%

Der Bodensatz enthält also Guanin, was mit Hammarstens Fund von Guanin im Nucleoproteid übereinstimmt.

Die nächste Frage bleibt nun, wie weit das Guanin die einzige Base in der Guanylsäure ist, oder ob sich auch noch andere Basen finden.

Wie bekannt, sind die Xanthinbasen mit Ausnahme von Guanin leicht löslich in  $NH_3$ . Enthält daher die Nucleinsäure andere Basen als Guanin, so müssen diese im Filtrat der  $NH_3$ -Fällung gefunden werden. Findet man auch Adenin, kann diese Base auch in der Fällung zusammen mit Guanin vorkommen, aber in solchem Falle muss das Filtrat der  $NH_3$ -Fällung auch mit Adenin gesättigt sein.

Die erste Untersuchung des Filtrats der  $NH_3$ -Fällung zeigte indessen, dass dieses nur eine ganz unbedeutende Menge Basen enthielt. Hieraus kann mit Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass die  $NH_3$ -Fällung frei von Adenin ist und nur Guanin enthält.

Um dies noch sicherer festzustellen und um gleichzeitig eventuelle Basen im Filtrat der  $NH_3$ -Ausscheidung zu untersuchen, wurde eine grössere Portion Guanylsäure mit 5% iger  $H_2SO_4$  zerkocht. Durch Zusatz von  $NH_3$  erhielt man 0,63 gr. Bodensatz, berechnet als Trockensubstanz. Dem Filtrat wurde  $AgNO_3$  zugesetzt, wodurch eine spärliche Ausscheidung entstand. Diese Ausscheidung, welche also die übrigen Xanthinbasen enthalten würde, ausser dem Rest Guanin, welcher etwa durch  $NH_3$  in Lösung gehalten wird, wurde mit einer geringen Menge  $HCl$  zersetzt. Das Filtrat von  $AgCl$  wurde mit  $NH_3$  übersättigt, wodurch aufs Neue ein Bodensatz entstand.

Der Bodensatz wurde durch Centrifuge von der Flüssigkeit getrennt. Der Bodensatz gibt Guaninreaction. Das Filtrat davon wurde aufs Neue mit Silbernitrat ausgeschieden, wodurch man eine sehr unbedeutende Ausscheidung erhielt, und sodann mit einigen Tropfen HCl zersetzt. Durch Zusatz von  $\text{NH}_3$  zum Filtrat hiervon erhielt man aufs Neue eine Ausscheidung, welche Guaninreaction gab.

Aus diesem Versuche geht hervor, dass das Filtrat der  $\text{NH}_3$ -Ausscheidung auch Guanin enthält. Wenn man zugleich andere Xanthinbasen findet, ist dies nur in so geringen Mengen der Fall, dass man sie nicht zu berücksichtigen braucht.

Der nächste Versuch spricht indessen eine noch deutlichere Sprache.

Eine Portion Guanylsäure (Präparat Nr. II) wurde drei Stunden lang gekocht mit 80 cem. 5<sup>o</sup> oiger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und darauf mit  $\text{NH}_3$  gefällt. Der Bodensatz wurde ausgewaschen und zum constanten Gewicht getrocknet. Dies ergab 0,2996 gr. Das Filtrat wurde mit  $\text{AgNO}_3$  gefällt. Die Silberausscheidung wurde getrocknet und gewogen. Sie ergab **0,0312** gr., was 0,012 gr. Guanin entspricht. Im Filtrat wurden also 0,015<sup>o</sup> o Guanin oder dieselbe Menge gefunden, wie nach Wulff in der Lösung von ca. 2—3<sup>o</sup> o  $\text{NH}_3$  gehalten wird. Die Silberausscheidung wurde darauf mit HCl zerlegt, dem  $\text{HNO}_3$  zugesetzt war. Das Filtrat hiervon wurde mit  $\text{NH}_3$  neutralisirt und concentrirt. Darauf wurde  $\text{NH}_3$  im Ueberschuss zugesetzt, wodurch eine Ausscheidung entstand, welche Guaninreaction (Murexidreaction) gab.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass Guanin die einzige Base ist, die in der Guanylsäure gefunden wird; und hiermit ist zum ersten Male eine Nucleinsäure hergestellt, welche **nur eine** Xanthinbase enthält. Indem ich die von Kossel vorgeschlagene Nomenclatur wieder aufnehme, schlage ich vor, diese Nucleinsäure zu benennen: Guanylsäure. Hiermit will ich jedoch nicht das Geringste hinsichtlich der Existenz oder Nicht-Existenz einer Xanthylsäure, Sarkylsäure etc. ausgesprochen haben.

Dass die Guanylsäure nur Guanin enthält, ist übrigens nicht

gar so merkwürdig, wenn man hiermit Hammarsten's Untersuchungen des Nucleoproteids von Pancreas auf Xanthinbasen zusammenhält. Hammarsten fand nämlich, dass das Nucleoproteid hauptsächlich Guanin enthielt. Die übrigen Basen fanden sich nur in so geringer Menge, dass man Grund hatte, sie als Verunreinigung anzunehmen. Wie bekannt, unterliess es Hammarsten, diese Consequenzen aus seinem Funde zu ziehen. Hammarsten vermuthete daher vom ersten Augenblick an, dass diese Nucleinsäure nur Guanin enthalten sollte, welche Vermuthung sich also als richtig erwiesen hat.

Von quantitativen Untersuchungen über die Menge der Xanthinbasen in den übrigen Nucleinsäuren liegen sehr sparsame Mittheilungen vor. Kossel gibt an, dass  $\frac{2}{3}$  des Stickstoffes der Nucleinsäure in Form von Xanthinbasen gefunden werden. Meine quantitativen Untersuchungen der Menge an Guanin in Guanylsäure haben mich bezüglich dieser Säure zu etwas abweichenden Resultaten geführt. Von Präparat Nr. II wurden 0,8620 gr. Substanz abgewogen, 3 Stunden lang mit 5% iger  $H_2SO_4$  gekocht und darauf  $NH_3$  in geringem Ueberschuss zugesetzt. Der Bodensatz wurde ausgewaschen bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction und bei  $105^\circ C.$  zum konstanten Gewicht getrocknet. Es machte 0,2996 gr. aus. Hiervon wurden 0,1032 gr. zur N-Bestimmung nach Kjeldahl abgewogen. Dies enthielt 45,35 mgr. N.

Geht man von dem gefundenen Stickstoff aus, enthielt der Bodensatz 0,2841 gr. Guanin.

Das Filtrat der  $NH_3$ -Ausscheidung wurde mit  $AgNO_3$  ausgeschieden. Spärliche Ausscheidung, welche 0,0312 gr. ausmachte, was 0,012 gr. Guanin entspricht.

Im Ganzen ist also als Guanin gefunden 0,2841 gr. + 0,012 gr., zusammen 0,2961 gr., oder, wenn man von der Gewichtsanalyse ausgeht, 0,2996 gr. + 0,012 gr., zusammen 0,3116 gr. Guanin.

Die Guanylsäure enthält also **34,35%** Guanin, oder wenn man von der Gewichtsanalyse ausgeht, **36,15%** Guanin.

Von Präparat Nr. III wurden 0,2170 gr. Guanylsäure abgewogen, 3 Stunden lang mit 5% iger  $H_2SO_4$  gekocht und dar-

auf sorgfältig mit Alkali neutralisirt. Nachdem sie einige Zeit gestanden hatte, wurde filtrirt, der Bodensatz wurde ausgewaschen bis zum Verschwinden der  $H_2SO_4$ -Reaction, bis zum constanten Gewicht getrocknet und gewogen. Es ergab 0,076 gr. = **35,02%** Guanin. Die Flüssigkeit war nach dem Kochen mit  $H_2SO_4$  farblos, wasserklar. Die Guaninausscheidung war rein gelb-weiss.

Die Gewichtsanalyse ergibt also dasselbe Resultat, ob man das Guanin mit  $NH_3$  ausscheidet und hierzu den Rest Guanin, welcher im Filtrat gefunden wird, hinzurechnet, oder ob man das Guanin ausscheidet, indem man die Auflösung neutralisirt. In beiden Fällen erhält man als Resultat, dass die Guanylsäure **35%** Guanin enthält.

Endlich will ich noch anführen, dass ich versucht habe, ins Reine damit zu kommen, wie weit das hier vorkommende Guanin das gewöhnliche Guanin ist oder ein Isoguanin. Wie bekannt, hat Fischer die Xanthinbasen auf synthetischem Wege hergestellt. Gleichzeitig hiermit hat er auch mehrere neue isomere Basen dargestellt. Demgemäss hat Fischer auch zwei neue Isoguanine hergestellt. Ueber eines von diesen, 6-amido-2-oxypurin, welche von Adenin hergeleitet wird, spricht sich Fischer aus, dass sie möglicher Weise im Organismus vorkommen kann. Leider sind meine Versuche hierüber nicht durchaus beweisend: es geht aus ihnen hervor, dass das Isoguanin, jedenfalls nach den qualitativen Versuchen zu urtheilen, nicht mit Bestimmtheit ausgeschlossen werden kann.

Im Vorhergehenden haben wir gesehen, dass Guanin die einzige Base war, welche die Guanylsäure enthielt. Hiermit ist jedoch durchaus nicht bewiesen, dass Guanin das einzige N-haltige Spaltungsprodukt ist, welches wir von Guanylsäure erhalten.

Es ist früher gezeigt worden, dass die Guanylsäure 18,21% N enthält. Rechnet man das Guanin zu 35%, so entspricht der N des Guanins 16,22% N oder mit anderen Worten ca.  $\frac{2}{3}$  von allem N. Dies zeigt, wie diese Nucleinsäure von den übrigen abweichend ist, wo man, wie gesagt, nur  $\frac{2}{3}$  von dem in der Nucleinsäure enthaltenen N in den Xanthinbasen

wiederfindet. Es bleibt zurück 1,99% N oder ca.  $\frac{1}{10}$  von allem N, über welches von den übrigen N-haltigen Spaltungsprodukten disponirt wird.

Von solchen N-haltigen Spaltungsprodukten von Nucleinsäuren kennt man 2, nämlich Ammoniak und Thymin.

### 3) Ammoniak.

Bei Kossel findet man eine Stelle angegeben, dass er  $\text{NH}_3$  als Spaltungsprodukt von Nucleinsäure erhalten hat. Die Guanylsäure enthält auch einen Theil N, welcher als  $\text{NH}_3$  abgespalten wird.

Kocht man die Guanylsäure 2 Stunden hindurch mit 2%iger HCl, wird man, wenn man nach dem Abkühlen ein Alkali oder Kalkmilch zur alkalischen Reaction hinzusetzt, eine verhältnissmässig reiche Ammoniakentwicklung bemerken. Um zu kontrolliren, wie weit  $\text{NH}_3$  ein primäres Spaltungsprodukt der Guanylsäure war, oder ob das Guanin beim Kochen mit der Mineralsäure  $\text{NH}_3$  abgespalten hat, kochte ich Guanin, hergestellt aus Guanylsäure, die gleiche Zeit mit HCl von derselben Concentration. Ich beobachtete da, dass man auch im letzten Falle Ammoniakentwicklung erhielt. Selbstverständlich wurde gleichzeitig eine blinde Analyse mit HCl allein ausgeführt, um den Einfluss des  $\text{NH}_3$  der Luft auszuschliessen.

Kochte ich dagegen das Guanin 3 Stunden lang mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  statt mit HCl, erhielt ich keine solche  $\text{NH}_3$ -Entwicklung. Dies ist der Grund dafür, dass ich 5%ige  $\text{H}_2\text{SO}_4$  an Stelle von HCl bei meinen Zerlegungsversuchen benutzt habe.

Kochte ich indessen die Guanylsäure mit 5%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 Stunden hindurch, erhielt ich dessen ungeachtet Ammoniakentwicklung, wenn ich die Flüssigkeit mit Alkali übersättigte. Ein Versuch,  $\text{NH}_3$  quantitativ nach Schlösing zu bestimmen, missglückte. Ein vorläufiger Versuch mit einer geringeren Menge Guanylsäure zeigte ca. 0,8%  $\text{NH}_3$ .

Trotzdem das Guanin selbst beim Kochen mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nicht zerstört wurde, sehe ich es doch nicht für ausgeschlossen an, dass dies geschehen kann durch Einwirkung der Schwefel-

säure auf die Guanylsäure selbst. Wir werden gleich sehen, dass mehrere Gründe hierfür sprechen.

Gehen wir indessen davon aus, dass von der Guanylsäure ca. 1%  $\text{NH}_3$  abgespalten wird, gleichgültig ob es ein primäres oder secundäres Spaltungsprodukt ist, bleibt zurück ca. 1% N, von dem angenommen werden kann, dass es zum Thymin gehört. In solchem Falle musste die Guanylsäure ca. 5% Thymin enthalten, was bedeutend weniger ist, als was man sonst gefunden hat.

Thymin ist bisher in allen denjenigen Nucleinsäuren gefunden worden, in welchen man danach gesucht hat. Es wird daher auch von Kossel für ein den Nucleinsäuren charakteristisches Spaltungsprodukt angesehen. Und dies um so mehr, als Thymin im Verein mit Phosphorsäure als Thyminphosphorsäure den Kern in der Thymusnucleinsäure einnimmt, wozu die Xanthinbasen verhältnissmässig lose geknüpft sind. Diese letzteren können daher auch verhältnissmässig leicht abgespalten werden, so dass die Thyminsäure selbst zurückbleibt.

Um die Guanylsäure auf Thymin zu untersuchen, ging ich, um hinreichendes Material zu erhalten, vom Nucleoproteid aus.

17 gr. Nucleoproteid sowie ca.  $\frac{1}{2}$  gr. Guanylsäure wurden während 2 Stunden bei  $150^\circ \text{C}$ . im Autoclaven mit 200 cem. 5% iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gekocht. Nach dem Kochen wurde die Flüssigkeit mit Baryt neutralisirt, darauf das Filtrat mit Phosphorwolframsäure in 10% iger schwefelsaurer Auflösung gefällt. Das Filtrat hiervon wurde aufs Neue mit Baryt gefällt. Endlich wurde mit  $\text{AgNO}_3$  in neutraler Auflösung gefällt. Die Ausscheidung wurde mit  $\text{H}_2\text{S}$  zerlegt. Das Filtrat hiervon wurde stark concentrirt und blieb mehrere Tage stehen, ohne dass Anzeichen einer Krystallisation sich zeigten. Darauf wurde bis zur Trockenheit eingedampft und mit Alkohol extrahirt. Weder in dem im Alkohol löslichen noch in dem unlöslichen Theile liess sich eine Spur von Thymin nachweisen. Die theoretische Ausbeute an Thymin sollte — vorausgesetzt, dass Guanylsäure davon 5% enthielt — sich auf ca. 0,5 gr. belaufen. Da man indessen hier mit Proteid und nicht mit Guanylsäure selbst gearbeitet hat, kann man die Einwendung

machen, dass das Thymin möglicher Weise mit der grossen Menge Albumin etc. geschwunden ist. Ich habe daher auch nach Thymin gesucht, ausgehend von der Guanylsäure selbst, mit Hülfe von Kossel's Sublimationsprobe — aber mit vollständig negativem Resultate.

Wenn ich daher einen endgültigen Beweis für die Nicht-Existenz des Thymins in der Guanylsäure nicht liefern kann, so kann ihr Vorhandensein doch nicht als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Und wenn man weiter bedenkt, dass  $\frac{9}{10}$  von allem N als Guanin gefunden worden ist und dass man mit der grössten Wahrscheinlichkeit davon ausgehen kann, dass die für Guanin berechneten Zahlen altzu niedrig befunden worden sind (bei der Verarbeitung so geringer Mengen wird ja der geringste Verlust bedeutenden Einfluss auf die Resultate haben), während die gute Uebereinstimmung in den Befunden zeigt, dass man jedenfalls nicht die Werthe zu hoch gesetzt hat, bleibt nur sehr wenig N für das Thymin, das ca. 22% N enthält, disponibel.

Die N-haltigen Spaltungsprodukte der Guanylsäure bestehen daher aus Guanin und Ammoniak, während man mit ziemlich grosser Wahrscheinlichkeit Thymin ausschliessen kann.

Vorher habe ich indessen die Möglichkeit hervorgehoben, dass  $\text{NH}_3$  selbst nur ein secundäres Spaltungsprodukt ist, von dem man denken könnte, dass es sich von der Trennung von Guanin herschreibe.

Diese Hypothese, welche also darauf ausgeht, dass Guanin das einzigste N-haltige Spaltungsprodukt der Guanylsäure ist, erhält eine Stütze, wenn man die Formel für die Guanylsäure näher betrachtet. Wenn auch diese Formel noch nicht endgültig festgelegt werden kann, haben alle die Formeln, welche in Betracht kommen können, das Gemeinsame, dass sie 5 Atome N oder ein Vielfaches davon enthalten. Wir haben gefunden, dass  $\frac{9}{10}$  von allem N als Guanin gefunden wird und  $\frac{1}{10}$  also nicht. Wenn nun dies richtig ist, muss das Molekulargewicht der Guanylsäure 3860 sein, während die Molekularzahl 772 wird, wenn aller N als Guanin gefunden wird. Kommt auch Thymin hinzu, wird das Molekulargewicht noch viel grösser.

Obwohl die 5 N-Atome in der Formel vielleicht für die obige Hypothese sprechen, will ich mich noch nicht auslassen über die mögliche Constitution der Guanylsäure in Verbindung mit dem Molekulargewicht. Ich hoffe aber in einer späteren Abhandlung durch die Feststellung des Molekulargewichts dies endgültig zu entscheiden.

Wie es sich nun auch hiermit verhalten mag, so ist doch das Vorkommen einer einzigen Xanthinbase in der Guanylsäure eine Thatsache, welche diese Nucleinsäure auf einen besonderen Platz unter den übrigen Nucleinsäuren stellt. Aber die Art, auf welche das Guanin in der Guanylsäure gefunden wird, ist nicht minder charakteristisch und eigenthümlich. Bekanntlich findet man die Xanthinbasen in den übrigen Nucleinsäuren sehr lose gebunden an einen Kern, der jedenfalls aus Thymin und Phosphorsäure besteht, derartig, dass man sogar beim Herstellen dieser Nucleinsäuren eine besondere Vorsicht anwenden muss, um eine Zersetzung in dieser Richtung zu vermeiden. Anders hier, wo man das Guanin nicht abspalten kann, ohne dass die Guanylsäure gleichzeitig in ihre endlichen Spaltungsprodukte zerlegt wird, während es auf der anderen Seite scheint, als wenn man andere Stoffe abspalten kann und dadurch eine an Guanin reichere Säure erhält. Hierfür spricht der Umstand, dass man durch weiteres Kochen mit Kalilauge einen Körper erhält, reicher an N als die eigentliche Guanylsäure. Die weitere Klarlegung dieser Verhältnisse wird später erfolgen.

Diese Verhältnisse zeigen indessen, dass das Guanin entweder in fester Vereinigung mit dem Kern der Guanylsäure gefunden wird, oder sogar einen Theil dieses Kernes selbst ausmacht. Dies ist ferner ein weiterer Wahrscheinlichkeitsbeweis dafür, dass die Guanylsäure kein Thymin enthält, welches sonst den Kern in den Nucleinsäuren in Verbindung mit Phosphor (Thyminsäure) bildet.

Fasst man zum Schluss das Resultat der quantitativen Versuche zur Bestimmung der Spaltungsprodukte der Guanylsäure zusammen, so hat man zuerst 35% als Guanin, oder wenn man alles N als Guanin gefunden annimmt, ca. 39% e.

Ferner findet man 30% reduciende Substanz, berechnet als Traubenzucker, und endlich enthält die Guanylsäure 7,63% P. was 17,57% ausmacht, berechnet als  $P_2O_5$ . Alles in Allem haben wir also gefunden 86,5% (82,5%) der Guanylsäure und im Reste bleiben 13,5% (17,5%), die wahrscheinlich aus N-freien Spaltungsprodukten bestehen. Was diese letzten Substanzen sind, hoffe ich später auseinandersetzen zu können.

Aus allen vorhergehenden Untersuchungen geht hervor, dass die Nucleinsäuren als überaus complicirte Verbindungen betrachtet werden müssen, mit besonders wechselnder Zusammensetzung. Diese neue Nucleinsäure dagegen dominirt durch ihren einfachen Bau, der als Entgelt so viel fester consolidirt ist. Insofern ist auch die Untersuchung derselben bedeutend leichter. Die grösste Schwierigkeit besteht in der Beschaffung des Materials. Durch Verarbeitung von ca. 1200 Stück Ochsenpancreas habe ich nur ca. 20 gr. Analysenpräparat erhalten.

Darauf gründet sich der Mangel, der, wie ich einsehe, an meinen Untersuchungen klebt: Das Untersuchungsmaterial ist zu gering gewesen. Ich sehe daher fortgesetzte Untersuchungen als erforderlich an und ich behalte mir vor, diese Untersuchungen ungestört vornehmen zu können.

Die vorliegende Arbeit ist mit Unterstützung des Hohen-schen Legats ausgeführt.