

Ueber die Darstellung des Thymins.

Von
Walter Jones.

Aus dem physiologischen Institut in Marburg.

Der Redaction zugegangen am 27. April 1900.

Die Constitution des Thymins ist trotz der grossen Bedeutung dieses Körpers für den Aufbau der Nucleinsäure¹⁾ noch nicht bekannt. Wenn die chemische Natur dieses bereits im Jahre 1893 von A. Kossel und A. Neumann aufgefundenen Spaltungsproduktes der Nucleinsäure noch so wenig erforscht ist, so ist dies hauptsächlich auf die schwierige Beschaffenheit des Materials zurückzuführen. Ich habe daher, auf den Rath des Herrn Professor A. Kossel hin, versucht, ein Verfahren zu finden, um das Thymin aus complexen Gemengen darzustellen, ohne dass man erst eine Nucleinsäure zu isoliren braucht. Meine Bemühungen in dieser Richtung sind insofern erfolgreich gewesen, als es jetzt möglich ist, den Körper in verhältnissmässig kurzer Zeit und fast in jeder gewünschten Menge zu erhalten, und ich benutze diese Gelegenheit, Herrn Prof. A. Kossel für die Anregung zu dieser Arbeit, für das Material, das er mir zur Verfügung gestellt hat, und für seine fortwährende Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Die erste Methode zur Isolirung des Thymins wurde von A. Kossel und A. Neumann²⁾ angegeben. Nucleinsäure aus Milz wurde 2 Stunden lang bei 150° mit 5%iger Schwefelsäure erhitzt, das Reactionsprodukt zur Entfernung der Basen mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Filtrat die überschüssige Säure mit Baryumhydroxyd entfernt. Das Thymin

1) A. Kossel in Liebreich's Encyclopädie, III. Band, Artikel: Nucleinstoffe.

2) Bericht d. d. chem. Ges., 27 (1894), S. 2217.

wurde dann durch Zusatz einer concentrirten Lösung von Quecksilbernitrat unter gleichzeitiger Neutralisation mit Natronlauge niedergeschlagen, der Quecksilberniederschlag mit H_2S zersetzt und das Thymin nochmals durch abwechselnden Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak gefällt. Nachdem das Silber aus der Fällung mit H_2S entfernt war, wurde das Filtrat zur Krystallisation eingeeengt. Doch fanden dieselben Autoren, dass die Darstellung sehr vereinfacht werden kann, wenn man Thymusnucleinsäure 2 Stunden lang bei 170° nur mit Wasser erhitzt, da dann die Fällungen mit Quecksilbernitrat und Silbernitrat fortfallen können.

Es wurde sodann von Kossel¹⁾ nachgewiesen, dass der von Miescher aus Salmonnucleinsäure dargestellte und von Schmiedeberg²⁾ als Nucleosin in die Literatur eingeführte Körper nichts anderes wie das von Kossel und Neumann zuerst aufgefundene Thymin war. Die zu seiner Isolirung benutzte Methode war im Wesentlichen dieselbe, die Kossel und Neumann bei der Thymusnucleinsäure schon früher angewandt hatten, nur dass zur Hydrolyse Salzsäure verwendet wurde, deren nachträgliche Fortschaffung eine besondere Operation erforderte.

Der gewichtigste Einwand, den man der Kossel-Neumann'schen Methode machen kann, ist der, dass sie die Darstellung von Nucleinsäure erfordert: die Methode war ja auch eigentlich nicht für die Gewinnung des Thymins ausgearbeitet, sondern für die Auffindung der hydrolytischen Spaltungsprodukte der Nucleinsäure. Gulewitsch³⁾ hat andererseits ein Verfahren benutzt, welches für nucleinsäurereiches Rohmaterial (Haringstestikel) anwendbar ist. Die feuchten Testikel werden mit Schwefelsäure 8 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht, die Schwefelsäure mit Kalk entfernt und das Filtrat mit soviel Silbernitrat versetzt, als für die völlige Ausfällung erforderlich ist.⁴⁾ Nach Entfernung des Silberchlorids

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII 1896, S. 188.

2) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., 37 1896, S. 124.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII 1899, S. 180 u. 293.

4) Kossel, diese Zeitschrift, Bd. XXV 1899, S. 179.

wurde die Flüssigkeit mit Baryt gesättigt und der erhaltene voluminöse Niederschlag mit H_2S zersetzt. Die vom Schwefelsilber befreite Flüssigkeit wurde abwechselnd mit Silbernitrat und Ammoniak versetzt, so lange ein Niederschlag entstand, die Silberverbindung von Thymin und Histidin mit H_2S zersetzt und bis zur beginnenden Krystallisation des Thymins eingeeengt, wobei das Histidin noch in Lösung blieb.

Diese Methode wurde von Gulewitsch zur Isolirung des Arginins angewandt, das Thymin erhielt er dabei nur als Nebenprodukt; und wenn man diese Methode als Darstellungsweise des Thymins anwenden will, so ist zu bemerken, dass der Niederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak mit äusserster Sorgfalt erzeugt werden muss, da bei ungenügendem Zusatz von Ammoniak Thymin in Lösung bleibt, dagegen bei Ueberschuss von Ammoniak sich das Thyminsilber wieder löst. Ich habe daher bei der Ausarbeitung meiner Methode von der Benutzung dieses Niederschlags abgesehen und ferner noch folgende Anforderungen zu erfüllen gesucht: Anwendbarkeit der Methode direkt auf das nucleinsäurehaltige Rohmaterial ohne vorherige Isolirung der Nucleinsäure und Vermeidung jeder Fällung mit Phosphorwolframsäure. Denn sowohl Kossel¹⁾ wie Gulewitsch²⁾ haben gefunden, dass ein Theil des Thymins vom Phosphorwolframsäureniederschlag mitgerissen wird, während ein anderer Theil in Lösung bleibt. Die folgende Methode vermeidet nun die oben angedeuteten Schwierigkeiten und zeichnet sich durch rasche Ausführbarkeit aus.

1300 g Haringstestikel, schon vorher zur Entfernung des Protamins mit Säure extrahirt, wurden zu je 250 g mit 20%iger Schwefelsäure versetzt, sodass ein dicker Brei entstand, und dann im Autoclaven 2 Stunden auf 150° erhitzt. Dabei wird das Adenin vollkommen zerstört, während Thymin unverändert bleibt.³⁾ Das Reactionsprodukt wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, die dunkelbraune Flüssigkeit durch Filtration

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV 1896, S. 189.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII 1899, S. 293.

3) Kossel und Neumann, loc. cit.

von einer beträchtlichen Abscheidung humusartiger Substanz befreit, sodann mit feimpulverisirtem Baryt bis zur schwach, aber deutlich alkalischen Reaction auf Lakmus versetzt, das Baryumsulfat abfiltrirt, mit kochendem Wasser ausgewaschen und die vereinigten Filtrate eingeeengt oder mit Wasser verdünnt, wie es gerade erforderlich war, bis das Volumen der Lösung für je 100 g trockener Testikel 500 ccm. war. Es lässt sich mit nur geringer Sorgfalt beim Zusatz des Baryumhydroxyds leicht eine Flüssigkeit erhalten, die gegen Lakmus deutlich alkalisch ist, aber mit Kohlensäure keinen Niederschlag gibt. Aber selbst wenn ein geringer Ueberschuss von Baryt hinzugefügt sein sollte, so ist seine Entfernung durch Kohlensäure nicht erforderlich. Im Gegentheil ist es durchaus erforderlich, dass die Concentration der Lösung nicht grösser wie angegeben ist, sonst wird bei dem folgenden Zusatze von Silbernitrat der gelbe Niederschlag von Thyminsilber sofort schwarz und Thymin geht wieder in Lösung. In verdünnterer Lösung hingegen sind die reducirenden Substanzen weniger schädlich, sodass unter den angegebenen Bedingungen der Thyminsilberniederschlag viele Stunden lang mit der Flüssigkeit in Berührung bleiben kann, ohne eine bemerkbare Aenderung zu zeigen. Hierauf wurde eine kleine abgemessene Portion dieser alkalischen Lösung schwach mit Salpetersäure angesäuert. Zu dieser Flüssigkeit liess ich aus einer Bürette allmählich eine 2%ige Silbernitratlösung hinzuffliessen, bis ein Tropfen der Flüssigkeit, in einen Ueberschuss von Barytlösung gebracht, keinen weissen, sondern einen gelben Niederschlag gab. Auf diese Weise stellte ich die zur völligen Ausfällung erforderliche Menge Silbernitrat fest.

Eine andere und beträchtlich grössere abgemessene Portion der Flüssigkeit wurde jetzt ebenfalls mit Salpetersäure angesäuert und die erforderliche Menge 2%igen Silbernitrats auf einmal hinzugefügt. Ein sofort entstehender dunkelbrauner Niederschlag reisst fast allen Farbstoff aus der Flüssigkeit mit nieder. Dieser Niederschlag möge mit A bezeichnet werden. Das Filtrat hiervon wurde tropfenweise mit Barythydrat versetzt und dabei die Reaction der Flüssigkeit gegen

Lakmus bestimmt. Sobald dieselbe neutral wurde, bildete sich ein zweiter blassgelber flockiger Niederschlag (B) und ein vermehrter Zusatz von Barytwasser rief zunächst nur Zunahme des Niederschlages hervor, während die Reaction noch neutral blieb. Sobald in Folge weiteren Zusatzes eine schwache Alkal-escenz erreicht war, filtrirte ich diesen Niederschlag ab und fuhr dann mit dem Zusatz von Baryt fort. Selbst ein grosser Ueberschuss von Baryt erzeugte jetzt zunächst keinen Niederschlag mehr und erst, wenn eine sehr beträchtliche Quantität Baryt hinzugefügt worden war, entstand ein dritter Niederschlag (C), zuletzt wurde dunkelbraunes Silberoxyd niedergeschlagen. Die drei Niederschläge sowie eine Mischung von B mit C und A wurden mit kaltem Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff unter Druck zersetzt. Nach Entfernung des Schwefelsilbers wurde jede Flüssigkeit für sich auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingengt und erkalten gelassen.

In A wurden grosse Mengen Chlorwasserstoff und huminartige Stoffe gefunden, aber kein Thymin.

Aus B wurden dunkelgraue krystallinische Aggregate erhalten, die nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle eine schöne Krystallisation von dünnen Blättchen von Thymin ergaben.

C dickte beim Abkühlen zu einem farblosen Syrup ein, aber liess keinen festen Körper ausfallen.

Die Mischungen von B mit C und A lieferten Produkte, aus denen Thymin isolirt werden konnte, aber die so erhaltenen Mengen waren sehr viel geringer wie die einer entsprechenden Menge von B allein.

Diese Versuche zeigen, dass das Thymin gänzlich im zweiten Niederschlag enthalten ist und dass der erste und dritte verworfen werden können. Ausserdem ist es nicht nothwendig, soviel Silbernitrat hinzuzufügen, dass auch die letzte Substanz in C niedergeschlagen wird, da durch wiederholte Versuche gefunden wurde, dass die Mengen von Silbernitrat, die für A+B und für A+B+C erforderlich sind, immer im Verhältniss von 10 : 29 stehen.

Der Thyminsilberniederschlag bietet beim Filtriren nicht so grosse Schwierigkeit, wie man sonst bei gelatinösen organischen Silberverbindungen zu finden gewohnt ist. Doch kommt es zuweilen vor, dass man einen Niederschlag erhält, der sich nicht filtriren lässt: dann hat man sicher nicht genug Silbernitrat hinzugesetzt und es ist nur erforderlich, mit Salpetersäure anzusäuern, eine kleine Menge Silbernitrat hinzuzufügen und mit Baryumhydroxyd wie vorher zu fällen. Nach diesem Vorversuch gestaltete sich die Verarbeitung der ursprünglichen alkalischen Flüssigkeit folgendermassen:

Dieselbe wurde mit Salpetersäure angesäuert und zu je 500 ccm. mit der nach obiger Angabe erforderlichen Menge 2^o oigen Silbernitrat versetzt. Nach Entfernung des Niederschlages wurde Barythydrat bis zur schwach alkalischen Reaction hinzugefügt, der Niederschlag durch Decantiren mit kaltem Wasser gewaschen und an der Pumpe abgesogen. Jede Portion des Niederschlages wurde sofort mit Schwefelwasserstoff unter Druck zersetzt, das Schwefelsilber entfernt, die Filtrate vereint und zur Krystallisation eingedampft. Die erhaltenen krystallinischen Krusten von Thymin wurden aus heissem Wasser mit Thierkohle umkrystallisirt.

Da die Arbeit unterbrochen werden musste, ehe die erhaltene Ausbeute ganz gereinigt war, so ist es mir nicht möglich, ihre Menge genau zu bestimmen. Ein Theil dieses Rohthymins, nach oberflächlicher Schätzung etwa $\frac{1}{20}$ des Ganzen, gab 1,4 g reines Thymin. Hiernach wird man etwa 2^o/_o Ausbeute erwarten können.

Die gereinigte Substanz stimmt in Löslichkeit, Krystallform und chemischen Reactionen mit den für Thymin beschriebenen überein und die Reinheit und Individualität der Substanz ist genügend bewiesen durch ihre quantitative Umsetzung in ein Bromsubstitutionsprodukt, $C_5H_5N_2O_2BrH_2O$, welches ich bereits früher beschrieben habe.¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX (1900), S. 20.