

# **Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.**

(Zweite Mittheilung.)

Von

**P. A. Levene.**

(Aus der physiologisch-chemischen Abtheilung des pathologischen Instituts der  
New-York-Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaction zugegangen am 9. Februar 1903.)

Meine Arbeit über die Analyse der Nucleinsäuren, die ich vor einigen Jahren unternommen hatte, musste für zwei Jahre unterbrochen werden, und erst im vergangenen Herbst hatte ich die Gelegenheit, sie wieder aufzunehmen.

Nach der ersten Mittheilung schien es festgestellt, dass Nucleinsäuren verschiedener Herkunft eine ziemlich ähnliche elementare Zusammensetzung haben könnten. Es war nun wichtig, die Producte der hydrolytischen Spaltung derselben zu vergleichen. Die Analysen wurden vorläufig auf die Säuren der Milz und der Pancreasdrüse beschränkt.

## **Darstellung der Säuren.**

Da bedeutende Mengen der Substanz für die vorliegende Arbeit erforderlich waren, so erwies sich mein erstes Verfahren zu ihrer Darstellung viel zu kostspielig und es musste deswegen etwas modificirt werden. Das Verfahren, wie ich es für diese Arbeit anwandte, war folgendes: Die Drüsen wurden in einer 5%igen Kochsalzlösung eine Stunde lang gekocht. Zu der abgekühlten Mischung wurde essigsaures

Natron bis zu einem 10%igen Gehalt, dann eine 50%ige Natronlauge bis zum 5%igen Gehalt zugefügt und über Nacht stehen gelassen. Die Eiweisskörper wurden mit Pikrinsäure und Essigsäure entfernt. Es muss hier bemerkt werden, dass die zu diesem Zweck nöthige Essigsäuremenge bei verschiedenen Drüsen eine verschiedene ist. Es ist so viel der Säure erforderlich, dass sich die Eiweisskörper schnell abfiltriren lassen. Um dies zu beurtheilen, stellt man verschiedene kleine Proben an. Aus dem Filtrate wird die Nucleinsäure eiweissfrei mit einer Kupferchloridlösung niedergeschlagen. Das Kupfer kann durch Salzsäure entfernt werden. Auf diese Weise vorbereitete, vollständig eiweissfreie Präparate wurden in den vorliegenden Versuchen gebraucht.

Bei der Analyse wurde die Aufmerksamkeit auf die folgenden Substanzen gerichtet: die Kohlehydratgruppe, die Purinbasen, die Pyrimidinderivate und schliesslich die Anwesenheit des Glycerins.

### Die Kohlehydratgruppe.

Schon in der ersten Mittheilung war erwähnt, dass kein leichtabspaltbares Kohlehydrat im Molekül der von mir untersuchten Nucleinsäuren nachgewiesen werden konnte, nun ist es aber Kossel und Neumann und später Osborne gelungen, bei der Hydrolyse einiger Nucleinsäuren Derivate verschiedener Zuckerarten zu gewinnen.

So erhielten Kossel und Neumann und später auch Noll Lävulinsäure als Zersetzungsproduct der Nucleinsäure. Meine Bemühungen, diese aus den Säuren der Milz und der Pankreasdrüse darzustellen, waren vergeblich, obwohl ich die Angaben von Kossel und Neumann genau befolgte. Die wässrige Lösung des ätherischen Extracts gab zwar eine dunkelrothe Färbung mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge, das Hydrazon der Lävulinsäure konnte aber nicht dargestellt werden. Osborne gelang es, aus seiner Nucleinsäure bei der Hydrolyse mit Salzsäure Furfurol zu gewinnen. Meine Untersuchungen in dieser Richtung stimmen ganz mit denen von Osborne überein. Diese Bemerkung habe ich schon vor einem Jahre

gemacht, nämlich bald nachdem es mir gelungen war, eine Glucophosphorsäure zu gewinnen. Bei der Bemühung, das Hydrazon der Lävulinsäure darzustellen, ist es ein Mal gelungen, sechsseitige Krystallblättchen mit einem Schmelzpunkt von  $95^{\circ}$  C. zu gewinnen, also dem Phenylhydrazon des Furfurols entsprechend. Ich muss schon hier bemerken, dass die Furfurolreaction positiv bei den Säuren folgender Herkunft ausfiel: Milz, Pankreas, Leber, Hefe, Tuberkelbacillen.

### Purinbasen.

Ueber die Anwesenheit des Guanins und Adenins im Moleküle der Pankreasnucleinsäure wurde schon in der ersten Mittheilung berichtet. Auch aus der Milznucleinsäure gelang es, dieselben Basen zu gewinnen.

Das Guanin wurde als Silbersalz identificirt.

0,2500 g der Substanz gaben 0,0834 g Silber.

Berechnet für $C_5H_5N_5O \cdot AgNO_3$ :	Gefunden:
Ag 33,65	33,36.

Das Adenin wurde als Pikrat analysirt.

0,1580 g Substanz gaben 41 ccm H bei  $p = 758$  und  $t^{\circ} = 17^{\circ}$  C.

Berechnet für $C_5H_5N_5 \cdot (C_6H_2(NO_2)_3OH)$ :	Gefunden:
N 30,71 %	30,88 %.

### Pyrimidinbasen.

Nach einigen Vorversuchen wurden 150 g der Milznucleinsäure zu diesem Zwecke verarbeitet. Je 50 g der lufttrockenen Säure wurden mit 200 ccm 25%iger Schwefelsäure zwei Stunden im Autoclaven bei  $150-175^{\circ}$  C. erhitzt. Das Reactionsproduct wurde vom Melanin abfiltrirt, das Filtrat mit Aether ausgeschüttelt und dann nach der Methode von Kossel-Jones auf Thymin verarbeitet. Die Fraction B nach Jones wurde mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und bei vermindertem Druck eingedampft. Die anwesenden Spuren vom Baryt wurden quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, das Filtrat mit Thierkohle entfärbt und das Thymin in üblicher Weise zur Krystallisation gebracht.

Die typischen Thyminkristalle wurden aus verdünnter Schwefelsäure umkrystallisirt und analysirt.

0.1260 g der Substanz gaben 24.25 ccm N bei  $p = 757$  und  $t^\circ = 14^\circ$  C.

Berechnet für  $C_5H_6N_2O_2$ :

N 22.22

Gefunden:

22.70.

Das heisse Thyminfiltrat wurde mit Pikrinsäure versetzt. Beim Abkühlen schieden sich orangegelbe prismatische Krystalle einzeln und in kugelförmigen Aggregaten aus. Der Niederschlag kann in heissem Wasser auf dem kochenden Wasserbade aufgelöst und dann umkrystallisirt werden. Das Pikrat scheidet sich dann oft in langen prismatischen Nadeln aus. Ueber Schwefelsäure getrocknet schmilzt es bei raschem Erhitzen bei  $250-255^\circ$  C. Die Analyse eines derartigen Präparates, im Toluolbad getrocknet, ergab die folgenden Zahlen:

0.1380 g der Substanz gaben 29.5 ccm N bei  $p = 759$  und  $t^\circ = 14^\circ$  C.

0.1380 » » » » » 0.1785 g  $CO_2$  und 0.0352 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $C_4H_5N_3O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ :

C 35.29

H 2.35

N 24.70

Gefunden:

35.56

2.82

25.11.

Das Pikrat wurde dann mit Schwefelsäure und Aether zersetzt, die Säure mit Barythydrat grösstentheils entfernt, das Filtrat vom Baryumsulfat eingedampft und mit Alkohol und Aether versetzt. Es schieden sich dabei lange prismatische Krystalle aus. Diese wurden in Wasser aufgelöst und wieder mit Alkohol versetzt, worauf die Substanz sich wieder in krystallinischer Form ausschied. Im Toluolbad getrocknet ergab die Substanz die folgenden Zahlen:

0.1170 g der Substanz gaben 26.75 ccm N bei  $p = 766.8$  und  $t^\circ = 22^\circ$  C.

0.156 g der Substanz gaben 0.1684 g  $CO_2$  und 0.0563 g  $H_2O$ .

0.1523 g der Substanz gaben 0.1090 g  $BaSO_4$ .

Berechnet für  $(C_4H_5N_3O)_2H_2SO_4$ :

C 30.09

H 3.16

N 26.33

S 9.71

Gefunden:

29.44 %

4.01 %

26.25 %

9.84 %

Nach der Analyse des Pikrates und des Sulfats scheint man also zur Annahme berechtigt zu sein, dass der Substanz die Formel  $C_4H_5N_3O$  zukommt.<sup>1)</sup>

Bei der Hydrolyse der Pankreasnucleinsäure gelangte man auch zu denselben Substanzen, nur scheint die Ausbeute an den Pyrimidinderivaten geringer zu sein. Etwa 75 g der Säure wurden hydrolysiert.

Das Thymin schied sich ohne Schwierigkeiten in sehr typischen Krystallen aus.

0,1315 g der Substanz gaben 25,25 ccm N bei  $p = 759$  und  $t^\circ = 14^\circ$  C.

Berechnet für  $C_5H_6N_2O_2$ :

N 22,22

Gefunden:

22,55.

Aus dem Filtrate von Thymin gelang es auch, das Pikrat der zweiten Base darzustellen. Es wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert, mit Alkohol und Aether gewaschen, über Schwefelsäure getrocknet und besass den Schmelzpunkt von  $250^\circ$  C.

0,1382 g der Substanz gaben 30,00 ccm N bei  $p = 764$  und  $t^\circ = 16^\circ$  C.

Für  $C_4H_5N_3O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ :

N 24,70

Gefunden:

25,40.

### Das Glycerin.

3 g der Säure wurden durch Alkohol und Aether von Extractionsstoffen befreit, mit 200 ccm einer 2%igen Schwefelsäurelösung aufgenommen und mit einem Rückflusskühler erhitzt. Das Reactionsproduct wurde in üblicher Weise auf Glycerin mit negativem Resultat untersucht.

### Litteratur.

W. Jones, Diese Zeitschrift.

Kossel u. Neumann, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 1894.

Kossel u. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII.

Levene, Diese Zeitschrift, Bd. XXXII.

Osborne, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI.

<sup>1)</sup> Bevor diese Resultate dem amerikanischen Physiologencongress zu Washington am 30. December 1902 vorgetragen wurden, war bereits am 22. December die Arbeit von Kossel und Steudel erschienen, in welcher sie dem Cytosin die Formel  $C_4H_5N_3O$  zuschreiben. Auf Grund dieser Arbeit muss man auch die vorliegende Substanz als Cytosin betrachten.