

Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.

(Sechste Mitteilung.)

Von

P. A. Levene.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des pathologischen Instituts
der New-Yorker Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. September 1903.)

Hodennucleinsäure.

Die Nucleinsäuren aus den Hoden der Fische sind die einzigen, welche sorgfältig untersucht worden sind: die aus den Testikeln der höheren Tierarten sind meines Wissens noch nicht rein dargestellt worden. Da eine genaue Kenntnis auch dieser Säuren für die vergleichende Biologie von großer Wichtigkeit ist, habe ich eine Untersuchung dieser Stoffe in Angriff genommen.

Die Darstellung wurde nach dem üblichen, in den früheren Mitteilungen angegebenen Verfahren vollführt. Die Hauptaufgabe war zunächst, eine für die hydrolytische Spaltung genügende Menge der Substanz zu gewinnen, um festzustellen, ob auch hier die bekannten zyklischen Spaltungsprodukte zu finden sind. Es mußten dabei die Bemühungen, ein ganz einheitliches und reines Präparat zu erhalten, in den Hintergrund treten. Frische Rinderhoden, von Membranen und Blutgefäßen befreit, wurden als Ausgangsmaterial gebraucht. Der erste Kupferniederschlag wurde mittels Kalilauge und Seignettesalz in Lösung gebracht und mit 10%iger Salzsäure niedergeschlagen und bei allen Operationen Erhitzen des Präparates vermieden.

Die Auflösung und Ausfällung wurde einigemal wiederholt, und die auf diese Weise vorbereitete Substanz mit Alkohol und Äther entwässert und getrocknet. Die Biuret- und

Millonsche Reaktion fiel mit dieser Säure negativ aus. Nach kurzem Erhitzen mit Mineralsäuren reduzierte sie keine Fehlingsche Lösung, gab aber mit Orcin und essigsaurem Anilin deutliche Furfurolreaktionen.

Ein Kupfersalz, aus diesem Präparate dargestellt, enthielt 8.5% C und 8.75% P.

Purinbasen der Hodennucleinsäure.

Zur Darstellung der Purinbasen wurde die Säure ohne vorheriges Trocknen im Autoklaven mit 1%iger Schwefelsäure zwei Stunden bei 125° C. erhitzt. Das Filtrat wurde dann mit Ammoniak eingedampft. Das Guanin, welches sich dabei niederschlug, wurde in Säure aufgelöst, mit Ammoniak wieder niedergeschlagen, der Überschuß von Ammoniak durch Erhitzen entfernt, und das Guanin so lange mit Wasser gewaschen, bis die Waschwasser mit Pikrinsäure keine Trübung mehr gaben: es wurde dann in das salpetersaure Silbersalz übergeführt und analysiert:

0.1300 g Substanz ergaben 0.043 g Ag.

Berechnet für $C_5H_5N_5O \cdot AgNO_3$:

Ag = 33.65%

Gefunden:

34.00%

Aus dem Guaninfiltrat wurden mit ammoniakalischer Silberlösung die anderen Purinbasen niedergeschlagen. Aus dem Niederschlage ließ sich das Adeninpikrat darstellen.

Das Präparat wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert und im Toluolbad getrocknet, analysiert.

0.1430 g Substanz gaben über 50% KOH-Lösung.

37.75 ccm Stickstoff bei $p = 760$ mm und $t^\circ = 21^\circ$ C.

Berechnet für $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_4NO_2 \cdot 3OH$:

N = 30.71%

Gefunden:

30.80%

Pyrimidinbasen der Hodennucleinsäure.

Auch für die Darstellung der Pyrimidinbasen wurde die Säure ohne vorheriges Trocknen der Spaltung unterworfen: sie wurde in 25%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 150 bis 175° C. drei Stunden erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde nach

dem in den vorhergehenden Mitteilungen angegebenen Verfahren behandelt.

Es gelang auf diese Weise, Thymin darzustellen.

Aus 10% Schwefelsäure umkrystallisiert und im Toluolbad getrocknet, ergab die Substanz die folgenden Zahlen:

0.1216 g der Substanz gaben über 50% KOH-Lösung.

23.75 ccm Stickstoff bei $p = 760.5$ mm und $t^{\circ} = 25^{\circ}$ C.

Berechnet für $C_5H_7N_2O_2$:

N = 22.22%

Gefunden:

22.47%

Aus dem Thyminfiltrat gelang es, das Cytosinpicrat darzustellen: es wurde als basisches Sulfat und als Chloroplatinat untersucht.

0.1075 g des Sulfates ergaben 0.0420 g $BaSO_4$.

Berechnet für $(C_4H_5N_3O)_4H_2SO_4 \cdot 2H_2O$:

S = 5.56%

Gefunden:

5.38%

0.1330 g des Platinats gaben 0.0411 g Pt.

Berechnet für $(C_4H_5ON_3)_2PtCl_4 \cdot 2HCl$:

Pt = 30.84%

Gefunden:

30.90%

Das Filtrat vom Cytosinsulfat reichte nicht aus, um die Anwesenheit von Uracil festzustellen. Es ist aber zu bemerken, daß auch bei den anderen Nucleinsäuren das Uracil nur dann nachzuweisen war, wenn große Quantitäten der Säure zur Hydrolyse angewandt wurden.

Hirnnucleinsäure.

Die Anwesenheit von Nucleinverbindungen im Gehirn wurde von v. Jaksch und Halliburton erwiesen. Nur waren diese Untersuchungen unternommen zu einer Zeit, wo der Unterschied zwischen den echten und den Paranucleinverbindungen noch nicht klargelegt war. Erst später wurde von A. Kossel nachgewiesen, daß zwei Arten von Nucleinstoffen existieren, die in der Zusammensetzung bedeutend von einander abweichen. Halliburton begnügte sich mit der Angabe, daß das Hirnnucleoprotein 0.5% Phosphor enthält. Es ist mir später gelungen, nach einem Verfahren, das dem von Halliburton ganz unähnlich war, dieselbe Verbindung darzustellen und ihre Zugehörigkeit zu den echten Nucleoproteiden zu beweisen. Bei

der hydrolytischen Spaltung der Substanz wurden nämlich Guanin und Adenin aufgefunden. Aber es war mir damals nicht möglich, eine Nucleinsäure darzustellen, entweder wegen Mangel an Substanz, oder weil die angewandten Methoden sich dazu nicht eigneten. Ich habe dann diese Versuche später wieder aufgenommen und mich mit der Aufgabe begnügt, eine eiweißfreie Substanz zu gewinnen, die zu einer hydrolytischen Spaltung dienen könnte. Frische Rindhirne wurden von den Membranen befreit und in üblicher Weise behandelt. Die Reinigung der Säure wurde wie bei der Hodennucleinsäure ausgeführt.

Die so erhaltene Substanz gab weder die Biuret- noch die Millonsche Reaktion. Bei kurzem Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren reduzierte sie die Fehlingsche Lösung nicht. Die Furfurolreaktionen mit Orcin und essigsäurem Anilin fielen positiv aus. Die in dieser Weise dargestellte Säure enthielt etwa 8% auf die freie Säure berechnet.

Purin- und Pyrimidinbasen der Hirnnucleinsäure.

Zum Nachweis der Purin- und Pyrimidinbasen wurde genau dasselbe Verfahren wie bei der Hodennucleinsäure angewandt.

Es gelang, bei der Spaltung zu gewinnen: Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin.

Guanin wurde als salpetersaures Silbersalz untersucht.

0,1245 g der Substanz ergaben 0,0420 g Ag.

Berechnet für $C_5H_5N_5O \cdot AgNO_3$:	Gefunden:
Ag = 33,65%	33,73%

Adenin wurde als Pikrat untersucht.

0,1680 g der Substanz gaben 44,0 ccm Stickstoff (über 50% KOH-Lösung) bei $p = 763$ mm und $t^\circ = 21^\circ$ C.

Berechnet für $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$:	Gefunden:
N = 30,71%	30,63%

Thymin.

0,1200 g der Substanz gaben über 50% KOH-Lösung.

23,5 ccm Stickstoff bei $p = 760$ mm und $t^\circ = 24^\circ$ C.

Berechnet für $C_5H_6N_2O_2$:	Gefunden:
N = 22,22%	22,52%

Cytosin wurde als Pikrat gewonnen und als basisches Sulfat und Chlorplatinat untersucht.

0,1450 g des Sulfates gaben 0,0588 g BaSO_4 .

Berechnet für $(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O})_4\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Gefunden:
S = 5,56 % 5,57 %

0,1364 g des Platinates gaben 0,0421 g Pt.

Berechnet für $(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O})_2\text{PtCl}_4 \cdot 2\text{HCl}$: Gefunden:
Pt = 30,84 % 30,86 %

Auch hier reichte das Filtrat vom Cytosinpikrat zum Nachweis des Uracils nicht aus.

Literatur.

Halliburton, Journal of Physiology, Bd. 15.

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

Levene, Archives of Neurology and Psychopathology, S. 2.

— —, Diese Zeitschr., Bd. XXXVII, XXXVIII, XXXIX.