

Über Thymonucleinsäure.

Von

S. Kostytschew.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1903.)

Nachdem Miescher aus dem Lachssperma eine phosphorreiche, eiweißfreie Substanz von sauren Eigenschaften dargestellt und analysiert¹⁾ und Altmann die Anschauung begründet hatte, daß die Nucleine als Verbindungen solcher phosphorreichen Säuren — «Nucleinsäuren» — mit Eiweiß aufzufassen sind,²⁾ brachten die Untersuchungen von A. Kossel einen Aufschluß über die chemische Natur dieser Körper. Schon früher hatte Kossel einen Befund gemacht, welcher den bis dahin völlig unbekanntem Ursprung des Hypoxanthins, Guanins und der verwandten Basen aufklärte und diese Körper als hydrolytische Spaltungsprodukte der Nucleine charakterisierte.³⁾ Weiterhin wies er nach, daß sie aus den Nucleinsäuren hervorgehen und daß auch die von Miescher analysierte Nucleinsäure des Lachsspermas bei ihrer Spaltung diese Basen liefert.⁴⁾ Dieser Befund war um so unerwarteter, als man bis dahin die Herkunft des Hypoxanthins, Xanthins und Guanins in anderer Richtung, nämlich im Eiweiß, vermutet hatte. Zu den weiteren Arbeiten Kossels diente hauptsächlich die Nucleinsäure der Thymusdrüse. A. Kossel und A. Neumann⁵⁾ erhielten bei der Zersetzung derselben außer den bereits bekannten Nuclein-

¹⁾ Vortr. d. naturforsch. Gesellsch. in Basel, Bd. VI, S. 138, 1874.

²⁾ Arch. f. Anatomie und Physiologie. Abt. 1889, S. 525.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. III, S. 284; Bd. IV, S. 290; Bd. VII, S. 8; Bd. VIII, S. 404; Bd. X, S. 248.

⁴⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.

⁵⁾ Ber. d. dtsh. chem. Ges., Bd. 27, S. 2215.

basen eine Base, welche sie Cytosin nannten und deren Zusammensetzung und Konstitution (als Aminoxypyrimidin) durch die nachfolgenden Arbeiten von A. Kossel und H. Steudel¹⁾ aufgeklärt worden ist. Neben diesen Substanzen entsteht die Thyminsäure, welche sich von der Nucleinsäure durch das Fehlen der Nucleinbasen unterscheidet.²⁾ Diese wird durch stärkere Einwirkungen unter Bildung der Bruchstücke eines Kohlehydratrestes (Lävulinsäure und Ameisensäure) von Thymin (Methyldioxypyrimidin), Phosphorsäure und anderen noch unbekanntem Produkten zerlegt. Aus den Arbeiten von A. Kossel und seinen Schülern hat sich daher eine durchgreifende Eigentümlichkeit ergeben, welche die Nucleinsäuren gegenüber den Eiweißkörpern charakterisiert: die Kohlenstoffatome dieser phosphorhaltigen Verbindung sind der Hauptsache nach mit den Stickstoffatomen zu heterozyklischen Gruppen vereinigt, die zum Teil als Purinderivate einen Doppelring enthalten, zum Teil als einfache Pyrimidinringe auftreten. Die ersteren sind lockerer an die phosphorhaltige Gruppe gebunden als die letzteren. Neben diesen zyklischen Verbindungen befindet sich mindestens in vielen Nucleinsäuren eine Atomgruppe, welche zur Bildung von Lävulinsäure neben Ameisensäure Veranlassung gibt.

Weitere Untersuchungen führten außerdem zur Kenntnis von Übergangsgliedern zwischen den in den Geweben präformierten Säuren und ihren eben genannten Zersetzungsprodukten. A. Kossel teilte zuerst die von ihm und Neumann gemachte Beobachtung mit,³⁾ daß aus dem als Thymus-«Nucleinsäure» bezeichneten Präparat eine Nucleinsäure isoliert werden kann, welche als Natronsalz in warmem Wasser löslich ist und beim Erkalten der Lösung gelatinisiert, eine Eigenschaft, die andern Nucleinsäuren nicht zukommt. A. Neumann arbeitete sodann ein Verfahren aus,⁴⁾ um diese gelatinisierende Säure, welche er «a-Nucleinsäure» nannte, von andern Nucleinsäuren zu trennen.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 49.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 74.

³⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1894, S. 195.

⁴⁾ Ebenda, 1898, S. 394 u. 1899 Supplbd. S. 552.

Er machte die Angabe, daß in dem nach seinem Verfahren gewonnenen Gemisch außer der genannten gelatinierenden Substanz noch zwei Säuren vorhanden sind, die er als «b-Nucleinsäure» und «Nucleothyminsäure» bezeichnet.

Nach Neumann haben wir also folgende Reihe der betreffenden Substanzen:

1. a-Nucleinsäure. Sie wird bei einer kurzdauernden Extraktion der Thymusdrüsen mit Alkalien bei 100° als Alkalisalz dargestellt.

2. b-Nucleinsäure. Dieselbe wird bei zweistündigem Kochen der Thymusdrüsen mit Alkalien als Alkalisalz gewonnen.

Die beiden genannten Säuren sind weiße, mehligte Pulver, in kaltem Wasser unlöslich, leicht löslich in Alkalien unter Bildung von Salzen, welche, durch Alkohol ausgefällt, durch Mineralsäuren zerlegt werden. Beide Säuren bilden unlösliche Salze mit schweren Metallen und ebenfalls unlösliche basische Salze mit alkalischen Erden; dagegen sind die neutralen Salze der letzteren leicht löslich. Beide enthalten Nucleinbasen in reichlicher Menge. Der Unterschied zwischen beiden Säuren besteht nur darin, daß das Natronsalz von a in einer mindestens 5%igen Lösung gelatiniert, was bei b nicht der Fall ist. Die Gelatinierung anderer Salze von a wurde nicht untersucht. Nach Neumanns Vermutung sind die beiden Säuren a und b isomer.

3. Nucleothyminsäure. Sie wird durch die Hydrolyse der β -Säure bei 60° dargestellt, ist in kaltem Wasser löslich und enthält weniger Nucleinbasen. Daß sie als chemisch individuelle Verbindung zu betrachten ist, bedarf nach meiner Meinung noch weiterer Beweise.

4. Thyminsäure stellt das endgültige Produkt der Hydrolyse von Nucleinsäuren dar. Sie wurde schon früher von Kossel und Neumann¹⁾ eingehend untersucht, welche ihre Zusammensetzung durch die Formel $C_{16}H_{25}N_3P_2O_{12}$ ausgedrückt haben. Die Thyminsäure ist in kaltem Wasser leicht

¹⁾ Kossel und Neumann, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 743.

löslich und aus ihren Lösungen durch Mineralsäuren nicht fällbar; sie enthält keine Nucleinbasen.

Für die Darstellung der a- und b-Nucleinsäuren aus Kalbsthymus hat Neumann¹⁾ eine Methode beschrieben, welche gute Ausbeuten gibt und im wesentlichen darauf beruht, daß man die zerkleinerten Thymusdrüsen mit verdünnter Natronlauge auf dem Wasserbade mit Rückflußkühler eine zeitlang kocht (für die Darstellung der a-Säure soll das Kochen $\frac{1}{2}$ Stunde, für die Darstellung der b-Säure 2 Stunden dauern), die erhaltene Lösung durch Neutralisieren mit Essigsäure von den Eiweißsubstanzen befreit, abfiltriert und aus dem eingedampften Filtrat das Natronsalz der betreffenden Nucleinsäure mit Alkohol ausfällt. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Wiederfällen mit Alkohol wird das Salz vollständig gereinigt. Schließlich wird aus dem gereinigten Natronsalz die freie Säure durch Behandlung mit salzsäurehaltigem Alkohol isoliert.

Diese Methode gestattet eine leichte und sichere Reinigung der beiden Nucleinsäuren von den biuret reagierenden Stoffen; eine scharfe Trennung der beiden Nucleinsäuren untereinander wird aber dadurch nicht ermöglicht; die erhaltenen Produkte sind vielmehr Gemische von beiden Säuren, nur mit dem Unterschied, daß bei dem $\frac{1}{2}$ stündigen Kochen mit Natronlauge ein größtenteils aus der a-Säure, bei dem 2stündigen Kochen ein größtenteils aus der b-Säure bestehendes Gemenge entsteht. Deswegen wurden die beiden Säuren bis jetzt noch nicht analysiert und ihre Eigenschaften nicht eingehender untersucht.

Auf Anregung von Professor A. Kossel habe ich den Versuch gemacht, die beiden Nucleinsäuren einer weiteren Untersuchung zu unterwerfen, deren Ergebnisse in der vorliegenden Abhandlung zusammengefaßt worden sind. Die erhaltenen Resultate sind zum größten Teil auf die wertvollen Ratschläge und die beständige Unterstützung von Herrn Professor A. Kossel zu beziehen; es ist mir darum eine höchst ange-

¹⁾ Neumann, Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiolog. Abteil. 1899. Supplement S. 552.

nehme Pflicht, vor allem Herrn Professor A. Kossel meinen tiefgefühltesten Dank auszusprechen. Herrn Assistenten Dr. H. Steudel möchte ich ebenfalls meinen verbindlichsten Dank abstaten.

I. Darstellungsmethode.

Die erste bei einer chemischen Untersuchung der genannten Nucleinsäuren zu lösende Frage ist die Auffindung einer Methode, um die zu untersuchenden Substanzen rein darzustellen. Zu dem Zweck muß die Neumannsche Darstellungsmethode in der Weise vervollständigt werden, daß eine völlig scharfe Trennung der beiden Nucleinsäuren a und b möglich wird.

Um das zu erreichen, habe ich zunächst verschiedene Methoden des Aussalzens erprobt, die sich aber alle als ungenügend erwiesen, denn es ergab sich, daß die Fällungsgrenzen der beiden nach Neumann dargestellten Substanzen (in Form von löslichen Salzen) bei Anwendung der üblichen Aussalzungsmittel einander zu nahe liegen. Ebenso erfolglos war der Versuch, ein Salz von beiden Säuren darzustellen, dessen Löslichkeit in Wasser für die beiden Säuren verschieden wäre.

Dagegen hat sich folgendes Verfahren, welches auf der Gelatinierungsfähigkeit der Salze der α -Säure beruht, als wirksam ergeben. Ich habe die Beobachtung gemacht, daß die Gelatinierung der a-nucleinsauren Salze durch Zusatz von Salzen der Mineralsäuren in sehr beträchtlicher Weise befördert wird; denn die nicht sehr konzentrierten Lösungen von a-sauren Salzen, welche an sich noch keine Neigung zum Gelatinieren aufweisen, werden durch Zusatz minimaler Mengen von Salzen verschiedener Mineralsäuren plötzlich in eine vollkommene Gallerte verwandelt. Merkwürdig ist dabei das Verhalten von neutralem Baryumsalz der a-Säure gegenüber dem Zusatz von gewissen Salzen, unter denen die Wirkung des Baryumacetates die auffallendste ist. Wenn man eine ganz kleine Menge von Baryumacetat zu einer ziemlich konzentrierten Lösung von a-nucleinsaurem Baryt zugibt, erstarrt die ganze Lösung zu

einer durchsichtigen Gelatine; größere Mengen von Baryumacetat erzeugen eine gelatinöse Fällung, welche sich schwer zu Boden setzt. Das neutrale Baryumsalz der b-Säure gibt bei derselben Behandlung eine nur unbedeutende Fällung, welche zweifellos auf die Verunreinigung durch a-Säure zu beziehen ist.

Auf Grund dieses Verhaltens habe ich eine Methode ausgearbeitet, durch welche ich zunächst die gelatinierende und dann auch die nichtgelatinierende Substanz aus den beiden Neumannschen Säuren rein darzustellen vermochte.

Bevor ich die endgültig ausgearbeitete Methode beschreibe, muß ich erwähnen, daß die Darstellung einigermaßen erheblicher Mengen von ganz reiner gelatinierender Substanz aus der Neumannschen b-Säure ziemlich umständlich ist, da in diesem Falle die Verarbeitung von sehr großen Mengen des Materials nötig ist. Dasselbe gilt natürlich auch für die Darstellung der nicht gelatinierenden Substanz aus der Neumannschen a-Säure.

Für die Darstellung der gelatinierenden Substanz (die ich der Kürze wegen vorläufig als α -Säure bezeichne, um den Namen a-Säure für die rohe Neumannsche Substanz zu bewahren) wird also am besten die a-Säure benützt. 25 g der a-Säure, welche gut gereinigt ist und vor allem keine Biuret- und keine Chlorreaktion¹⁾ aufweist, werden in 300—400 ccm Wasser gebracht und auf dem Wasserbade unter Umrühren und Zusatz von klarer Baryumhydratlösung so lange gelinde erwärmt, bis sich alles aufgelöst hat; die Menge von Barytwasser muß man so berechnen, daß nach erfolgter Auflösung die Reaktion der Lösung neutral ist. Sollte dies nicht vollständig der Fall sein, so neutralisiert man genau mit Essigsäure. Nun versetzt man die heiße Lösung mit einem nicht zu reichlichen Überschuß von festem Baryumacetat, wobei sofort eine

¹⁾ Letzteres kommt vor, wenn bei der Darstellung der freien Säure aus dem Natriumsalz die durch HCl erzeugte Fällung nicht vollständig ausgewaschen wird. Ich erwähne es nur darum, weil gewöhnlich die neutrale Reaktion des Filtrats als Zeugnis eines vollendeten Auswaschens gilt. Tatsächlich werden aber meistens die letzten Spuren von Kochsalz erst viel später entfernt, wenn die Reaktion des Filtrats schon längst keine saure mehr ist.

starke Trübung entsteht, erhitzt noch etwa eine halbe Stunde auf dem Wasserbade unter Umrühren und läßt dann zwölf Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Es scheidet sich dabei eine gelatinöse Fällung ab, teils am Boden des Gefäßes, teils an der Oberfläche der Flüssigkeit. Die klare Flüssigkeit wird abgossen (eventuell durch ein Gaze- oder Tuchfilter), der Niederschlag mit kaltem Wasser ausgewaschen und dann nochmals mit Wasser auf dem Wasserbade unter Umrühren erwärmt; dabei entsteht eine milchartige Flüssigkeit, welche nochmals in der beschriebenen Weise mit Baryumacetat behandelt wird. Die ganze Operation wird zweckmäßig noch zum drittenmal wiederholt; die letzte Fällung, welche schon aus reiner Substanz besteht, wird nun von Baryumacetat befreit, indem sie wieder auf dem Wasserbade durch Umrühren mit Wasser zu einer milchigen Flüssigkeit gelöst und diese nach dem Erkalten bis auf etwa 40° mit Methylalkohol gefällt wird. Der Niederschlag wird abfiltriert, ein paarmal mit Methylalkohol ausgewaschen, dann behufs leichterer Reinigung nochmals in warmem Wasser gelöst, wieder mit Methylalkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert und mit Methylalkohol so lange ausgewaschen, bis eine stark eingedampfte und wieder mit wenig Wasser aufgenommene Probe vom Filtrat keine Trübung mit Schwefelsäure gibt. Zuletzt wird der Niederschlag mit Äther ausgewaschen und bei gewöhnlicher Temperatur im Exsiccator aufbewahrt.

Die vereinigten Filtrate von den Baryumacetatfällungen können, da die Ausfällung keine vollständige ist, noch eine nicht ganz unerhebliche Menge der α -Säure liefern. Zu dem Zweck werden die vereinigten Filtrate mit Alkohol ausgefällt, der erhaltene Niederschlag in Wasser aufgelöst und in der obigen Weise mit Baryumacetat behandelt.

Zur Darstellung der nicht gelatinierenden Säure β werden 25 g der b-Säure in neutrales Baryumsalz verwandelt und in der beschriebenen Weise mit Baryumacetat gefällt. Nach zwölfstündigem Stehen wird die klare Flüssigkeit durch ein Papierfilter abfiltriert, das Filtrat mit Alkohol ausgefällt, der Niederschlag in 200—300 ccm Wasser gelöst und nun das ganze

Baryumacetatverfahren so lange wiederholt, bis eine starke konzentrierte Lösung von β -nucleinsaurem Baryt bei dem Erhitzen mit Überschuß von Baryumacetat und darauf folgendem zwölfstündigen Stehen gar keine Fällung gibt. Ist das erreicht, so wird behufs totaler Reinigung zu der klaren Flüssigkeit so viel Methylalkohol zugegeben, daß nur eine kleine Fällung entsteht. Dieselbe wird filtriert, das Filtrat mit einem Überschuß von Methylalkohol ausgefällt und der Niederschlag, wie bei der α -Säure angegeben, von Baryumacetat befreit.

II. Eigenschaften und Zusammensetzung der dargestellten Substanzen.

Die erhaltenen Baryumsalze von beiden Säuren sind weiße, amorphe, sehr stark hygroskopische Pulver; sie ziehen das Wasser sogar beim Aufbewahren im Exsiccator über Schwefelsäure an, wodurch die Analysen, besonders die Wasserstoffbestimmungen, nicht wenig erschwert werden. Die freien Säuren (durch Behandlung mit salzsäurehaltigem Alkohol aus den Baryumsalzen dargestellt) sind in kaltem Wasser unlöslich. Sie unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, daß α ein rein weißes, β dagegen ein rötliches Pulver ist; durch Übergießen mit Wasser werden die Pulver in schleimige Massen verwandelt, wobei β eine schön rote Färbung annimmt. Bei dauerndem Erhitzen mit viel Wasser wird diese rote Masse zunächst schleimig und bildet dann eine rote Lösung; beim Neutralisieren der sauren Lösung verschwindet die rote Färbung sofort.

Beide Säuren bilden lösliche Salze mit Alkalien und lösliche neutrale Salze mit alkalischen Erden; die basischen Salze derselben, ebenso wie alle Salze der schweren Metalle, sind in Wasser unlöslich. Der auffallendste Unterschied in den Reaktionen der beiden Säuren besteht in dem Verhalten ihrer löslichen Salze zu den Chloriden und Acetaten alkalischer Erden, welche ebenso wie Baryumacetat gelatinöse Fällungen der α -nucleinsauren Salze hervorrufen. Man könnte also die Trennung der beiden Säuren durch verschiedene Reagentien bewirken; doch erwies sich die Anwendung von Baryumacetat als das bequemste Verfahren.

Die Gelatinierung der nucleinsauren Salze erfolgt in stark konzentrierten Lösungen allmählich auch ohne Zusatz von krystalloiden Salzen; verdünnte Lösungen, welche an sich noch keine Neigung zur Erstarrung zeigen, werden durch Zusatz von krystalloiden löslichen Salzen sofort in eine Gallerte verwandelt. Ich habe die Wirkung folgender Salze untersucht und zwar mit folgendem Ergebnis:

I. α -nucleinsaures Natron.

Die Lösung erstarrt zu einer Gallerte auf Zusatz von:

Na_2CO_3 , NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KNO_3 .

Gelatinöse Fällung erfolgt auf Zusatz von:

CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 , $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. (Zusatz von Spuren dieser Salze bewirkt gelatinöse Erstarrung der ganzen Flüssigkeit.)

II. α -nucleinsaures Baryum.

Die Lösung erstarrt zu einer Gallerte¹⁾ auf Zusatz von:

Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 .

Gelatinöse Fällung erfolgt auf Zusatz von:

NaCl , $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, NH_4Cl , CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 , $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. (Zusatz von Spuren dieser Salze bewirkt gelatinöse Erstarrung der ganzen Flüssigkeit.)

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß in allen Fällen, wo ein Chlorhydrat oder Acetat von alkalischen Erden zugesetzt wurde oder sich durch Umwandlung bilden konnte, eine gelatinöse Fällung entsteht; in den übrigen Fällen erstarrt die Flüssigkeit zu einer Gallerte.

Eine ganz andere Wirkung wird durch Zusatz von freien Säuren oder Alkalien hervorgerufen, indem dieselben nicht nur keine Erstarrung bewirken, sondern auch die schon gebildete Gallerte wieder verflüssigen. Die Wirkung von freien Mineralsäuren läßt sich aber nicht bequem beobachten, weil die dabei entstehende Fällung das Resultat verdunkelt; die Wirkung der

¹⁾ Bei Zusatz der Sulfate bildet sich gleichzeitig eine Fällung von BaSO_4 .

Essigsäure läßt sich besser verfolgen; zur Erläuterung desselben möge folgender Versuch angeführt werden: Eine konzentrierte Lösung von frisch dargestelltem α -nucleinsäurem Natron wurde nach Zusatz eines Tropfens von Kaliumnitratlösung in zwei gleiche Mengen geteilt, welche nach dem Erkalten gelatinierten. Eine Portion wurde nun mit 1 ccm 50%iger Essigsäure, die andere mit 3 ccm Wasser versetzt. Während das Wasser keine Änderung der Gelatine hervorrief, wurde die mit Essigsäure versetzte Portion schnell und vollständig verflüssigt; sobald aber die erhaltene Lösung mit Natronlauge neutralisiert wurde, stellte sich die Gelatine wieder her.

Ebenso genügt zum Aufheben der Gelatinierung ein kurz-dauerndes Kochen auf freier Flamme; bei kürzerem Erhitzen bildet sich die anfangs gelöste Gallerte nach einigem Stehen (auch in geschlossenen Gefäßen) wieder zurück.

Meine weiteren Untersuchungen sollen dazu dienen, auf Grund der prozentischen Zusammensetzung das Verhältnis beider Säuren zu einander festzustellen.

Während die Untersuchungen über die Spaltungsprodukte der Nucleinsäuren, wie sie von Kossel und seinen Schülern ausgeführt sind, sehr wichtige Ergebnisse über die Beziehungen der Nucleinsäure zu andern chemischen Produkten des tierischen Organismus geliefert haben und eine große Zahl neuer Arbeiten über bedeutungsvolle physiologische Vorgänge, z. B. über die Entstehung der Harnsäure aus Nucleinstoffen angeregt haben, konnten die Forschungen über die prozentische Zusammensetzung der Nucleinsäure bisher keine sicheren Resultate und keine neuen Gesichtspunkte für die chemische oder physiologische Charakterisierung dieser Stoffe darbieten. Die Schwierigkeit dieser Untersuchungen beruht darauf, daß es sich bei der Nucleinsäure um Atomkomplexe handelt, welche einerseits andere in den Geweben vorhandene Atome oder Gruppen an sich ketten und andererseits lockere, leicht zerstörbare Bindungen in ihrem eigenen Gefüge enthalten.

Zuerst publizierte Miescher¹⁾ Analysen der Nucleinsäure

¹⁾ Verhandlungen der Basler naturforsch. Gesellschaft, Bd. 6.

des Lachsspermas. Die betreffende Substanz wurde mit Hilfe einer komplizierten Methode dargestellt, bezüglich deren auf das Original verwiesen werden muß; besondere Rücksicht wurde darauf genommen, daß während der Darstellung die Temperatur so niedrig als möglich war. Die sehr zahlreichen vom Verfasser ausgeführten Analysen ließen ihn für die Nucleinsäure aus Lachssperma die Formel $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$ berechnen, während spätere von Schmiedeberg publizierte Analysen Miescherscher Präparate die Formel $C_{40}H_{54}N_{14}P_4O_{27}$ wahrscheinlicher machten.¹⁾ Die weiteren Untersuchungen von Schmiedeberg²⁾ führten aber dann zu einer dritten Formel $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{26}$, die bezüglich des Sauerstoffgehalts etwas von den bisherigen abweicht. Als Erklärung hierfür nahm Schmiedeberg an, daß die von Miescher dargestellten Präparate natriumhaltig gewesen sind. Die gleiche Formel glaubt Herlant³⁾ auch der von ihm aus Thymus dargestellten Nucleinsäure zu erteilen zu müssen. Die Berechnung bietet freilich noch manche Unsicherheit, denn die von Schmiedeberg und von Herlant angewandte Darstellungsmethode der Nucleinsäure ist keine unbedingt zuverlässige; die von den Verfassern analysierten Präparate waren immer, trotz sorgfältiger Behandlung, Gemische von mindestens zwei Kupferverbindungen, vielfach auch durch Nucleinbasen, oder durch biuret reagierende Stoffe verunreinigt (l. c.) Die von Schmiedeberg und von Herlant mitgeteilten Analysen können also noch keine Sicherheit betreffs der Zusammensetzung der Nucleinsäure bieten.

Für die Analyse der von mir nach der oben beschriebenen Methode dargestellten Substanzen habe ich folgendes Verfahren angewandt. Die beiden Nucleinsäuren werden als Baryumsalze analysiert; in diesem Falle ist die Möglichkeit eines Gemisches des neutralen und basischen Salzes, wegen der schweren Löslichkeit von letzterem, weniger zu befürchten. Die für die Analysen bestimmten Präparate wurden im Vacuum

¹⁾ Miescher, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Archiv f. experimentelle Pathol. u. Pharmakol., Bd. 37, S. 50.

²⁾ Archiv f. experimentell. Path. u. Pharmakol., Bd. 43, S. 57.

³⁾ Ebenda, Bd. 44, S. 148.

über Schwefelsäure bei 100° getrocknet; dabei tritt keine bemerkbare Veränderung der Präparate ein und die Schwefelsäure im Apparat bleibt vollständig klar. Bei Anwendung von anderen Trockenmethoden ist ein konstantes Gewicht nicht sehr leicht zu erreichen. Für die Baryum- und Phosphorbestimmungen wurden die Substanzen mit Soda und Salpeter verascht; die weitere Behandlung geschah nach den üblichen gewichtsanalytischen Methoden. Die Stickstoffbestimmungen wurden volumetrisch ausgeführt; für die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen wurden die Substanzen im Schiffchen mit feinem Kupferoxyd gemischt. Die Analysen ergaben folgende Resultate:

1. α -Säure.

1. 0,1706 g Substanz ergaben 0,1965 g CO₂ und 0,0702 g H₂O d. i.
C = 31,41%, H = 4,56%.

2. 0,1800 g Substanz gaben 0,2068 g CO₂ und 0,0738 g H₂O d. i.
C = 31,33%, H = 4,58%.

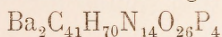
3. 0,2706 g Substanz gaben 30,4 ccm N bei 20° und 754 mm d. i.
N = 12,79%.

4. 0,2390 g Substanz gaben 26,6 ccm N bei 18° und 757 mm d. i.
N = 12,86%.

5. 0,4834 g Substanz gaben 0,1428 g BaSO₄ und 0,1341 g Mg₂P₂O₇
d. i. Ba = 17,40%, P = 7,72%.

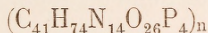
6. 0,4496 g Substanz gaben 0,1340 g BaSO₄ und 0,1217 g Mg₂P₂O₇
d. i. Ba = 17,55%, P = 7,54%.

Aus diesen Zahlen läßt sich folgende Formel berechnen:



Berechnet:	Gefunden im Mittel:
Ba = 17,46%	Ba = 17,47%
C = 31,26%	C = 31,37%
H = 4,48%	H = 4,57%
N = 12,49%	N = 12,83%
P = 7,87%	P = 7,63%

Hiernach läßt sich folgende Formel als Ausdruck der Analysen für die freie Säure aufstellen:



2. β -Säure.

1. 0,1150 g Substanz gaben 0,1221 g CO₂ und 0,0428 g H₂O d. i.
C = 28,96%, H = 4,16%.

2. 0,1221 g Substanz gaben 0,1305 g CO₂ und 0,0436 g H₂O d. i.
C = 29,15%, H = 4,00%.

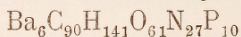
3. 0,2636 g Substanz gaben 23,2 ccm N bei 19° und 758 mm d. i.
N = 10,15%.

4. 0,2444 g Substanz gaben 21,4 ccm N bei 18° und 760 mm d. i.
N = 10,17%.

5. 0,5065 g Substanz gaben 0,1910 g BaSO₄ und 0,1548 g Mg₂P₂O₇
d. i. Ba = 22,19%, P = 8,51%.

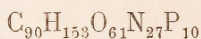
6. 0,4609 g Substanz gaben 0,1734 g BaSO₄ und 0,1398 g Mg₂P₂O₇
d. i. Ba = 22,14%, P = 8,45%.

Aus diesen Zahlen läßt sich folgende Formel berechnen:



Berechnet:	Gefunden im Mittel:
Ba = 22,21%	Ba = 22,16%
C = 29,08%	C = 29,05%
H = 3,83%	H = 4,08%
N = 10,21%	N = 10,16%
P = 8,35%	P = 8,48%

Hiernach kann man folgende Formel für die freie Säure aufstellen:



Wenn diese Analysen auch nicht ausreichen, um die Formeln sicher festzustellen, so ergibt sich doch aus ihnen folgendes:

Die beiden Nucleinsäuren sind nicht isomer; und zwar ist die α -Säure stickstoffreicher und phosphorärmer als die Säure β ; es liegt deswegen die Annahme nahe, daß bei der Umwandlung der α -Säure in die β -Säure eine Abspaltung der Nucleinbasen stattgefunden hat. Um hierüber eine Gewißheit zu erlangen, nahm ich eine quantitative Spaltung der beiden Substanzen vor.

Quantitative Bestimmungen der Nucleinbasen in Nucleinen und den Nucleinsäuren sind seit den ersten Beobachtungen Kossels über die Abspaltung der Nucleinbasen mehrfach versucht worden. Z. B. erhitze Schmiedeberg¹⁾ das Kupfersalz der Nucleinsäure mit Salzsäure, dampfte die Lösung wiederholt zur Trockne ein und nahm mit Salzsäure auf, um die braunen, humusartigen Zersetzungsprodukte zu entfernen. Die filtrierte

¹⁾ Schmiedeberg, l. c.

Lösung wurde dann mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und in üblicher Weise verarbeitet. Herlant¹⁾ digerierte die Nucleinsäure 24 Stunden mit 18%iger Salzsäure bei 40° und schied dann ebenfalls die Basen aus der Lösung ab.

Einige Versuche mit diesen Methoden führten mich jedoch zu unbefriedigenden Resultaten. Bei Anwendung des ersteren Verfahrens sind die braunen Produkte lästig und bei dem zweiten fehlt das Kriterium für die vollständige Abspaltung der Nucleinbasen.

Viel bequemer und sicherer führt eine Methode zum Ziel, welche mir von Professor Kossel empfohlen wurde, nämlich die Spaltung durch Schwefelsäure unter Zusatz von Quecksilbersulfat, wobei sich die abgespaltenen Nucleinbasen zum größten Teil ausscheiden. Sie wurde folgendermaßen ausgeführt:

3 g des Barytsalzes der betreffenden Nucleinsäure werden in einem Rundkolben mit 50 ccm 10%iger Schwefelsäure und 5 g Quecksilbersulfat beschickt und auf dem Wasserbade mit Rückflußkühler 2 Stunden unter zeitweiligem Umschütteln erhitzt, wonach die Flüssigkeit mit dem gebildeten Niederschlage in ein geräumiges Becherglas oder eine Porzellanschale gegossen und mit der vierfachen Menge von Wasser verdünnt wird. Wenn sich dabei die Flüssigkeit stark trübt, wird sie auf dem Wasserbade so lange erhitzt, bis sich eine schwere Fällung zu Boden gesetzt hat. Nach einigem Stehen wird der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gründlich ausgewaschen, dann in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man filtriert von Schwefelquecksilber und Baryumsulfat ab, wäscht den Niederschlag mehrmals mit heißem Wasser aus, befreit die vereinigten Filtrate und Waschwasser durch Eindunsten vom Schwefelwasserstoff, versetzt nun die heiße Lösung mit Überschuß von Ammoniak und fällt mit ammoniakalischer Silberlösung aus.

Da mir leider die Gelegenheit zu einer eingehenden Untersuchung infolge äußerer Umstände versagt war, mußte ich mich damit begnügen, die erhaltenen Silberniederschläge nach dem völligen Auswaschen und darauffolgenden Trocknen bis zum

¹⁾ Herlant, l. c.

konstanten Gewicht zu wägen; daß aber die Methode auch eine genauere Untersuchung, eventuell eine quantitative Bestimmung von Adenin und Guanin ermöglicht, darf wohl kaum einem Zweifel unterliegen. Denn bei Beachtung obiger Regeln ist die Ausscheidung von Nucleinbasen, wie auch durch Vorversuche bewiesen wurde, ganz vollständig; das Filtrat vom Quecksilberniederschlage gibt nach dem Einengen und nach wiederholtem Zusatz von Quecksilbersulfat keine Fällung mehr; auch gibt das Filtrat, nachdem es durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit ist, keine in überschüssigem Ammoniak unlösliche Silberfällung. Wenn man dagegen die vom Quecksilberniederschlage abfiltrierte Flüssigkeit mit mehr Quecksilber versetzt und mehrere Tage ruhig stehen läßt, scheidet sich allmählich ein Niederschlag aus, welcher aber aus anderen, durch ammoniakalische Silberlösung nicht fällbaren Zersetzungsprodukten (Cytosin?) besteht. Es ist also vielleicht auch die Bestimmung von Cytosin durch das beschriebene Zerspaltungsverfahren möglich. Die Untersuchungen mit Hilfe dieser Methode werden im hiesigen Institut fortgesetzt.

Auf die von mir untersuchten Substanzen angewandt, ergab die obige Methode folgende Resultate:

Für die Untersuchung dienten die nicht getrockneten Baryumsalze derselben Präparate, welche für die Elementaranalysen benutzt worden sind.

α -Nucleinsäure 3,000 g mit 17,34% Wassergehalt, entsprechend 2,481 g trockener Substanz.

β -Nucleinsäure 3,000 g mit 16,19% Wassergehalt, entsprechend 2,514 g trockener Substanz.

Von diesen Mengen muß zweckmäßig auch der Baryumgehalt abgezogen werden. Dann sind die abgewogenen Mengen der Nucleinsäure folgende:

α 2,047 g

β 1,957 »

Die aus diesen Mengen von Substanzen dargestellten Silberniederschläge der Nucleinbasen wogen nach dem Trocknen:

α 0,723 g

β 0,221 »

Auf 1 g der verbrauchten Substanzen berechnet, gestalten sich die Resultate folgendermaßen:

α -Nucleinsäure: auf 1 g Substanz 0,353 g
Silberniederschlag

β -Nucleinsäure: auf 1 g Substanz 0,113 g
Silberniederschlag.

Es werden also bei der Umwandlung der α -Säure in die β -Säure zwei Drittel der Nucleinbasen abgespalten.

Zum Schluß möchte ich noch die Frage berühren, ob man die unter verschiedenen Umständen vorkommende Abnahme der Gelatinierungsfähigkeit der Lösungen von Salzen der α -Säure mit der Umwandlung derselben in die β -Säure ohne weiteres identifizieren kann. Nach meiner Meinung würde das kaum zulässig sein, denn einerseits hat sich herausgestellt, daß diese Umwandlung mit einem nicht unbeträchtlichen Abbau verknüpft ist, andererseits kann die Gelatinierung von Salzen der α -Säure durch ziemlich geringe Einwirkungen beeinflusst sein. Besonders wichtig scheint mir in dieser Hinsicht der Umstand, daß die zeitweilig verflüssigte Gelatine in gewissen Fällen, unter Beseitigung des die Gelatinierung störenden Agens wieder hergestellt wird.
