

# Über die Bestimmung der Nucleinbasen im Saft von *Beta vulgaris*.

Von

**Harry W. Bresler.**

(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1904.)

Unter den Eiweißverbindungen der pflanzlichen Zelle findet man sogenannte Diproteide, d. h. Substanzen, welche durch Zusammentritt zweier Eiweißmoleküle mit einer prosthetischen Gruppe, Nucleine oder Paranucleine, entstehen.

In diesen Diproteiden sind die beiden Eiweißmoleküle nicht gleich fest gebunden: durch die Wirkung des Magensaftes kann die eine Eiweißgruppe abgespalten werden unter Bildung von Nucleinen, welche dann bei weiterer Hydrolyse durch verdünnte Säuren in ein weiteres Molekül Eiweiß und Nucleinsäure zerfallen können.

Diese Nucleinsäuren sind immer noch Verbindungen von sehr komplexer Struktur, welche durch die Einwirkung verdünnter Säuren ebenfalls zersetzt werden: unter den Spaltungsprodukten findet man unter anderem neben Kohlehydräten und Phosphorsäure N-haltige Verbindungen, welche hinsichtlich ihres Baues nicht nur eine nahe Verwandtschaft unter einander selbst, sondern auch mit der Harnsäure zeigen.

Die Körper wurden von Kossel und Krüger unter dem Namen Alloxurbasen zusammengefaßt; sie werden auch Xanthin-, Purin- und Nucleinbasen genannt.

Über den Nachweis dieser Basen in Pflanzensäften liegen nur vereinzelte Angaben vor: qualitativ werden dieselben von E. Schulze<sup>1)</sup> in den keimenden Samen der Wicke, Bohne, Lupine und des Kürbis nachgewiesen; Salkowski<sup>2)</sup> und Kossel<sup>3)</sup> sowie

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 438.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 527.

<sup>3)</sup> Archiv. Physiol., 1893, S. 157; Berichte, Bd. XXVII, S. 2215.

Micko<sup>1)</sup> isolierten sie aus Hefe. E. von Lippmann<sup>2)</sup> wies in den Entzuckerungslaugen, dem Restprodukte der Rübenzuckerfabrikation, Xanthin, Hypoxanthin, Guanin, Adenin und Carnin nach, jedoch ist keine genaue Vorschrift über die angewandte Methode angegeben.

Edmund C. Shorey<sup>3)</sup> isolierte Purinbasen aus dem Saft des Zuckerrohrs, indem er die mit Bleiessig gereinigte und vom Blei befreite alkalische Flüssigkeit mit Fehlingscher Lösung versetzte.<sup>4)</sup> Der ausgefallene Niederschlag wurde gut ausgewaschen, mit Salpetersäure zersetzt und aus der erhaltenen Lösung mit ammoniakalischer Silberlösung ein schmutzigbrauner Niederschlag gefällt, der nach dem Auswaschen mit verdünnter Salzsäure zersetzt wurde. Das Filtrat vom Chlorsilber lieferte beim Eindampfen Kristalle, welche durch den positiven Ausfall der Streckerschen Reaktion, ihr physikalisches Verhalten sowie durch ihre Überführbarkeit in Xanthin mittels salpetriger Säure als Guanin identifiziert wurden.

Auf 100 Teile Gesamtstickstoff wurden im Durchschnitt von 6 Bestimmungen 3.43 Teile Guaninstickstoff erhalten.

Shorey spricht den gesamten mittels Kupferoxydul erhaltenen Stickstoff als Gesamtstickstoff an, da er die anderen Basen nicht isoliert hat. Ob Xanthin und Adenin trotzdem im Saft des Zuckerrohrs enthalten sind, lasse ich dahingestellt; Carnin und Hypoxanthin konnte er nicht finden, da diese beiden Basen durch Bleiessig ausgefällt werden.

Im Saft von noch wachsenden Zuckerrüben habe ich die Xanthinbasen bestimmt, wobei folgende Arbeitsweise befolgt wurde:

Frische Rüben wurden zu einem homogenen Brei verrieben, dieser ausgepreßt, der erhaltene Saft (es wurden allmählich 25 l in Arbeit genommen) mit Bleizucker versetzt und dann Bleiessig zugefügt, solange noch ein Niederschlag ausfiel.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. v. Nahr.- u. Genussmitt. 1904, 257.

<sup>2)</sup> Berichte, Bd. XXIX, S. 2650.

<sup>3)</sup> Journ. of Americ. Chem. Soc., 1899, S. 432.

<sup>4)</sup> Da der Zuckerrohrsaft bedeutende Mengen von d-Glykose enthält, ist die Bedingung für Bildung von Kupferoxydul gegeben und der Zusatz anderer Reagentien überflüssig.

Der Zusatz von Bleizucker hat den Zweck, die Ausscheidung von Carnin und Hypoxanthin zu verhindern, welche durch Bleiessig allein gefällt werden<sup>1)</sup>. Im Filtrat wurde das überschüssige Blei mit Natriumsulfat entfernt, das Filtrat vom Bleisulfat zum Sieden erhitzt und aus der kochenden Lösung durch unmittelbar aufeinanderfolgenden Zusatz von Natriumbisulfid und Kupfersulfat die Xanthinbasen als Kupferoxydulverbindungen ausgefällt. Nach dem Erkalten wurde der flockige, hellbräunliche Niederschlag mit ausgekochtem, mäßig warmem Wasser ausgewaschen, in lauwarmem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Schwefelkupfer wurde abfiltriert, mit Wasser ausgekocht, ausgewaschen, Filtrat und Waschwasser vereinigt, eingedampft, mit Ammoniak versetzt und mit 3%iger Silbernitratlösung ausgefällt. Der ausgeschiedene Silberniederschlag wurde schnell, da er sich beim Stehen schwärzte, durch Dekantieren ausgewaschen; im allgemeinen setzt sich der Niederschlag gut ab. Ist dies nicht der Fall, so fehlt es an Ammoniak, jedoch ist ein allzu großer Überschuß zu vermeiden, da der Silberniederschlag in Ammoniak nicht ganz unlöslich ist. Dann wurde derselbe mit verdünnter Salzsäure in der Wärme zerlegt, wobei man die Vollendung der Zersetzung daran erkennt, daß die Farbe des Niederschlages von rötlichgelb in weiß umschlägt und das gebildete Chlorsilber sich rasch absetzt. Die in Freiheit gesetzten Basen wurden durch Zusatz von Salzsäure in Lösung gebracht, die salzsaure Lösung derselben auf dem Wasserbade eingedampft und der Rest der Salzsäure durch öfteren Zusatz von absolutem Alkohol vertrieben.

Der durch den Alkoholzusatz pulvrig gewordene Rückstand wurde mit Wasser von 40° digeriert; hierbei zersetzen sich die salzsauren Salze des Xanthins, Heteroxanthins und Guanins, wenn solche vorhanden, während Hypoxanthin, Adenin und Carnin als Hydrochlorate in Lösung gehen würden.

Nach 12stündigem Stehen bei 0° wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser salzsäurefrei gewaschen und dann mit Ätheralkohol ausgedeckt. Das Filtrat wurde nochmals auf dieselbe Weise be-

<sup>1)</sup> Annalen, Bd. CLVIII, S. 353; Bd. CII, S. 205; Bd. CVIII, S. 131.

handelt, wobei noch ein geringer in Wasser unlöslicher Rückstand resultierte, welcher mit dem zuerst erhaltenen vereinigt wurde.

Zur Trennung der 3 Basen, Heteroxanthin, Guanin und Xanthin — 1-Methylxanthin war nicht vorhanden — wurden dieselben in der fünfzehnfachen Menge 3,3%iger warmer Natronlauge gelöst: beim Erkalten schied sich ein Niederschlag, 0,846 g Rohprodukt, aus, welcher nach 24 Stunden abfiltriert und mehrere Male aus 3,3%iger Natronlauge unkristallisiert wurde. Die Analyse ergab die für das Natriumsalz des Heteroxanthins stimmenden Werte.

0,4850 g Substanz verloren bei 120° 0,1560 g H<sub>2</sub>O

0,4850 „ „ mit Schwefelsäure abgeraucht gaben 0,1261 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NaN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> + 5H<sub>2</sub>O

32,37% H<sub>2</sub>O

8,27% Na

Gefunden

32,16% H<sub>2</sub>O

8,42% Na.

Aus dem übrig gebliebenen Rest wurde durch Behandeln mit Kohlensäure in der Wärme die freie Base dargestellt und aus heißem Wasser unkristallisiert. Zur Elementaranalyse ausreichende Mengen wurden leider nicht erhalten: es konnte nur der Schmelzpunkt mit 365° und der positive Ausfall der Weidelschen Reaktion festgestellt werden. Die isolierte Substanz dürfte als Heteroxanthin anzusprechen sein.

Das Filtrat wurde mit Salpetersäure angesäuert, mit Silbernitrat versetzt und der erhaltene Silberniederschlag durch Zusatz von heißer konzentrierter Salpetersäure in Lösung gebracht: beim Erkalten schieden sich 4,256 g Silbersalz aus, welche nach zweimaligem Umkristallisieren aus Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,31 analysiert wurden.

0,9542 g Substanz gaben 0,3182 g Ag

Berechnet für Guaninsilbernitrat C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>OAgNO<sub>3</sub>

33,65% Ag

Gefunden

33,35% Ag.

Infolge des gleich hohen Silbergehaltes des Xanthinsilbernitrates, von dem ja die Guaninverbindung getrennt werden sollte, wurde das aus Salpetersäure unkristallisierte Salz mit Salzsäure zersetzt und das Filtrat vom Chlorsilber mit NH<sub>3</sub> übersättigt; der dabei erhaltene Niederschlag wurde mit heißer alkoholischer Kalilauge in Lösung gebracht und mit Essigsäure in der Hitze schwach angesäuert. Beim Erkalten der Lösung



Berechnet für $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_5(NO_2)_3OH$	Gefunden
30.77% N	31.0 % N
36.22% C	36.62% C
2.20% H	1.98% H

Das Filtrat vom Adenin-niederschlag wurde mit Schwefelsäure angesäuert, die Pikrinsäure mit Benzol ausgeschüttelt, die Schwefelsäure mit Baryt, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt, das Filtrat eingedampft, mit Essigsäure angesäuert und in der Kälte mit essigsaurem Kupfer versetzt. Der entstandene grünlichbraune Niederschlag wurde abfiltriert, im Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die vom Schwefelkupfer abfiltrierte Lösung zur Kristallisation eingedampft. Es gelang auch nicht nach 14tägigem Stehen über Schwefelsäure, Kristalle zu erhalten; ebensowenig wurden beim langsamen Erkalten der heißen wässrigen Lösung in Sägemehl Kristalle erzielt, obwohl die Substanz in heißem Wasser bedeutend löslicher als im kalten; erhalten wurden 1.30 g Rohprodukt.

Durch die Analyse wurde die Identität der amorphen Substanz mit Hypoxanthin festgesetzt.

0.2108 g Substanz gaben 0.3424 g  $CO_2$  und 0.0570 g  $H_2O$   
 0.1465 " " " " 53.3 ccm N bei 742 mm und 16°

Berechnet für $C_5H_4N_4O$	Gefunden
44.12% C	44.29% C
2.94% H	3.00% H
41.17% N	41.40% N

Wäre Paraxanthin vorhanden, so müßte es sich ebenfalls in der Kupferfällung vorfinden; durch die genau stimmende Analyse ist jedoch die Abwesenheit von Paraxanthin erwiesen.

Die kupferhaltige Mutterlauge wurde mit Ammoniak übersättigt, dann mit einer 3%igen Silbernitratlösung versetzt und 2 Tage an kühlem Orte stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde erst mit Ammoniak, dann mit Wasser ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und Filtrat sowie Waschwasser im Vacuum eingedunstet. Es hinterblieben 1.420 g Rohprodukt, mikroskopische Kristalle, die denen des Leucins ähnelten; sie wiesen sich nach mehrmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser als Carnin aus.

0,2417 g Substanz bei 100° getrocknet	gaben 0,3820 g CO <sub>2</sub> und 0,0918 g H <sub>2</sub> O
0,1645 » » »	gaben 41,2 ccm N bei 742 mm und 15° C.
Berechnet für C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	
42,85% C	Gefunden
4,08% H	43,10% C
28,57% N	4,22% H
	28,62% N

Der Saft der Zuckerrübe, dessen Stickstoffgehalt 0,2345 g betrug, enthielt demnach im Liter

0,00682 g N als Heteroxanthinstickstoff	= 0,0202 g Heteroxanthin
0,03707 » » » Guaninstickstoff	= 0,0801 » Guanin
0,01899 » » » Xanthinstickstoff	= 0,0515 » Xanthin
0,01451 » » » Adeninstickstoff	= 0,0280 » Adenin
0,02141 » » » Hypoxanthinstickstoff	= 0,0520 » Hypoxanthin
0,01487 » » » Carninstickstoff	= 0,0520 » Carnin.

Auf 100 Stickstoff berechnen sich:

0,29% Heteroxanthinstickstoff
1,58% Guaninstickstoff
0,81% Xanthinstickstoff
0,61% Adeninstickstoff
0,91% Hypoxanthinstickstoff
0,69% Carninstickstoff.