

Zur Kenntnis der Thymusnucleinsäuren.

(Erste Mitteilung).

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juni 1904.)

Eine möglichst vollständige Aufteilung der bei der Hydrolyse durch siedende Säuren entstehenden stickstoffhaltigen Zersetzungsprodukte der Thymusnucleinsäuren ist bisher nicht versucht worden: solche Versuche sind aber erforderlich, um als Grundlage für unsere Anschauungen über den Aufbau des Nucleinsäuremoleküls zu dienen. Erst wenn wir über die Menge der einzelnen Bruchstücke, die bei tiefgreifender Spaltung entstehen, genügend unterrichtet sind, wird es erlaubt sein, sich dem Studium der schwerer faßbaren und bisher wenig charakteristischen intermediären Zersetzungsprodukte zuzuwenden. Da die Thymusnucleinsäuren relativ stickstoffarm sind und es durchaus erforderlich ist, die am Ende der Untersuchung erhaltenen kristallinen Körper durch die Analyse zu identifizieren, so konnten die Versuche nur an großen Mengen Ausgangsmaterial vorgenommen werden; als solches habe ich vorläufig, um überhaupt einmal Anhaltspunkte zu bekommen, den nach der Vorschrift von A. Neumann¹⁾ als α -Nucleinsäure gewonnenen Körper in Form seines Kupfersalzes benutzt, von dem je 100 g der Spaltung unterworfen wurden. Hier sollen zunächst die Resultate mitgeteilt werden, die ich bei der Zersetzung dieses Körpers mit Jodwasserstoffsäure bei Gegenwart von phosphoriger Säure erzielt habe. Diese Methode bietet gegenüber der Spaltung mit siedender Schwefelsäure oder Salzsäure manche Vorteile.

¹⁾ Arch. f. Anatomie u. Physiologie. Physiolog. Abteilung 1898. S. 394; 1899 Spbd. S. 552.

Die Versuchsanordnung gestaltete sich ähnlich wie die von Kossel und Kutscher¹⁾ bei der Spaltung der Eiweißkörper.

Zu 28 g amorphem Phosphor und 170 ccm Wasser werden unter Kühlung allmählich 228 g Jod hinzugefügt, dann die Flüssigkeit bis zur Farblosigkeit erhitzt und der überschüssige Phosphor entfernt. Mit dieser Lösung werden etwa 100 g α -nucleinsaures Kupfer im Paraffinbade 14 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Dann wird die Flüssigkeit auf 1 l aufgefüllt und durch eine Stickstoffbestimmung die Menge der angewandten Substanz festgestellt. In diesem Falle sättigten 5 ccm, nach Kjeldahl²⁾ mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einem bohngroßen Stück CuSO_4 1 Stunde lang verascht, 31,3 ccm $\frac{n}{10}$ Oxalsäure ab, sodaß also im Liter 8,736 g N enthalten waren. Da das trockene Präparat von α -nucleinsaurem Kupfer im Durchschnitt 9,35% Stickstoff enthielt, waren also 93,5 g Substanz zur Verarbeitung gekommen. Nun wurde mit Bleiessig gefällt, um den Jodwasserstoff, die Phosphorsäure und die phosphorige Säure zu entfernen, der Niederschlag wiederholt ausgekocht und mit heißem Wasser ausgewaschen. Dann wurde das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff niedergeschlagen, das Schwefelblei ebenfalls wiederholt ausgekocht, sämtliche Filtrate vereinigt und zur Entfernung der Essigsäure mehrmals zur Trockene gebracht. Als nun die weiße zurückgebliebene Kristallmasse in 1 l Wasser wieder gelöst wurde, sättigten 5 ccm 27,6 ccm $\frac{n}{10}$ Oxalsäure, sodaß nur noch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

²⁾ Sämtliche Kjeldahlbestimmungen wurden doppelt ausgeführt und zeigten gute Uebereinstimmung. Selbstverständlich werden weder Kutscher noch ich auf die in gewissen, von uns in unserer Arbeit «Über die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl» (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 12) näher bezeichneten Grenzen höchst zweckmäßige Methode der Stickstoffbestimmung verzichten. Wer unsere Arbeit aufmerksam gelesen hat, wird wissen, daß der größte Teil der gegen unsere Arbeit gerichteten Entgegnungen gar nicht das Wesen der Sache getroffen hat und eigentlich überflüssig war. Auch in den Arbeiten, die uns widerlegen sollten, ist festgestellt und, wenn auch nur zögernd, zugegeben worden, daß sich die von uns untersuchten Substanzen erheblich schwerer nach Kjeldahl veraschen lassen, wie gewöhnlich angenommen wird und wie sich nach Angabe der gebräuchlichen Lehrbücher vermuten ließ.

7,728 g N im Liter waren. 1,008 g waren also als sogenannter Huminstickstoff in den Niederschlägen stecken geblieben. Jetzt wurden je 50 ccm mit BaCO_3 destilliert, zur Bestimmung des Ammoniaks. Abgesättigt wurden 21,9 ccm $\frac{n}{10}$ Säure = 0,03066 g N, sodaß im Liter 0,6132 g Ammoniakstickstoff enthalten waren. Darauf wurde durch Sieden mit BaCO_3 sämtliches NH_3 aus der Flüssigkeit entfernt und sie nun auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, die gut mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschene Fällung mit Ätzbaryt zersetzt, der phosphorwolframsaure Baryt mehrmals ausgekocht und aus dem mit Schwefelsäure schwach angesäuerten Filtrate mit neutralem Silbernitrat die Alloxurbasen in Form ihrer Silbernitratverbindungen¹⁾ ausgefällt.

Fällung I.

Durch längeres Digerieren mit überschüssigem Ammoniak wurden die Silbernitratverbindungen der Purinbasen in die Silberverbindungen übergeführt, diese mit Salzsäure zersetzt und das ablaufende Filtrat nach dem bewährten Verfahren von Krüger und Salomon aufgeteilt, und zwar, da voraussichtlich viel Guanin und Adenin zu erwarten war, nach der von Krüger²⁾ und Schittenhelm angegebenen Modifikation.

Die Lösung wurde bis auf etwa 100 ccm konzentriert, mit Ammoniak im mäßigen Überschuß versetzt und nach 24stündigem Stehen vom Niederschlag getrennt. Der Niederschlag wurde noch einmal mit 2% NH_3 in der Wärme digeriert, wieder nach 24 Stunden filtriert und nun in verdünnter Natronlauge gelöst und mit Essigsäure ausgefällt. Auf diese Weise wurden 0,6790 g Guanin gewonnen, das zur Analyse in das schwefelsaure Salz übergeführt wurde.

0,1534 g sättigen ab 35,0 ccm $\frac{n}{10}$ Oxalsäure = 31,94% N
 Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$: 32,21%

Sämtliche ammoniakalischen Filtrate wurden vereint, mit Salzsäure angesäuert, wiederholt zur Trockne gebracht, zum

¹⁾ Fr. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 124, Anm.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 153.

Schluß unter Zugabe von Alkohol, dann in etwa 150 ccm Wasser gelöst und mit Natriumpikrat vollkommen ausgefällt. Der Niederschlag wurde sofort abgesaugt und erwies sich nach einmaligem Umkristallisieren als vollkommen reines Adeninpikrat vom Schmelzpunkt 281° (unkorrigiert). Erhalten wurden so $6,1490 \text{ g} = 2,264 \text{ g}$ freies Adenin.

Jetzt wurde das Filtrat mit Ammoniak alkalisch gemacht, mit ammoniakalischer Silberlösung der Rest der Basen gefällt, die Fällung mit Salzsäure zersetzt und wie oben die Säure verdampft. Als nun der Rückstand mit Wasser bei 40° längere Zeit digeriert wurde, blieb ein Teil ungelöst, der sich seinem Verhalten starker Salpetersäure gegenüber als Xanthin erwies. Das charakteristische Xanthinnitrat wurde mit Ammoniak übersättigt, zur Trockne gebracht und das freie Xanthin als solches analysiert. Die Ausbeute betrug $1,60 \text{ g}$.

$0,1554 \text{ g}$ sättigen ab $40,5 \text{ ccm}$ n_{10} Säure = $36,5\%$ N.

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_4$: $36,8\%$ »

Der in Wasser lösliche Teil des Rückstandes erwies sich als Hypoxanthin, das erst in das Pikrat und dann in das Nitrat übergeführt wurde. Von diesem wurden $1,753 \text{ g}$ erhalten.

Das von der Fällung I ablaufende Filtrat wurde zunächst mit Silbernitrat so lange versetzt, bis sämtliche Basen in die Silberverbindungen übergeführt worden waren, und dann diese mit Barytwasser ausgefällt.

Fällung II.

Der Niederschlag wurde mit Salzsäure zersetzt, das Filtrat bei niederer Temperatur zur Trockene gebracht, mit Kohle entfärbt und mit Natriumpikrat ausgefällt. Nachdem aus der Fällung die Pikrinsäure mit Benzol und Salzsäure entfernt war, lieferte das Filtrat beim Einengen $4,416 \text{ g}$ Cytosinchlorid.

$0,1823 \text{ g}$ sättigen ab $36,8 \text{ ccm}$ n_{10} Säure = $28,26\%$ N.

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_5\text{ONH}_3\text{Cl}$: $28,54\%$ »

Das Filtrat von Fällung II gibt nach Entfernung des Baryts und des Silbers und nach dem Ansäuern mit Salzsäure keine Fällung mehr mit Phosphorwolframsäure.¹⁾

¹⁾ Fr. Kutscher, Marburger Sitzungsberichte, Juni 1901; Nr. 7.

Nunmehr wurden aus dem Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung die Säuren mit Barythydrat, dann der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure entfernt, bis die Reaktion gegen Lakmus neutral wurde. Als die Flüssigkeit jetzt eingengt wurde, schied sich ein Gemenge von Thymin und Uracil aus, das ich in Ermangelung einer guten Trennungsmethode nicht weiter aufgeteilt, sondern als solches analysiert habe. Die Ausbeute betrug 4,653 g.

0,1976 g sättigen ab 33,0 ccm n_{10} Säure = 23,38% N.

Der Rest des Thymins und Uracils wurde aus der Mutterlauge als schwerlösliches Silbersalz mit Silbersulfat und Barythydrat isoliert und lieferte noch 1,280 g des Gemenges, das mit dem übrigen vereint wurde. Die nun noch verbleibende Flüssigkeit enthielt nur noch spurenhafte Stickstoff.

Stellt man die erhaltenen Resultate zusammen, so haben sich als Zersetzungsprodukte isolieren lassen:

0,6790 g Guanin	mit	0,3151 g N
2,2640 » Adenin	»	1,1750 » »
1,6000 » Xanthin	»	0,5888 » »
1,7530 » Hypoxanthinnitrat	»	0,4539 » »
4,4160 » Cytosinchlorid	»	1,2590 » »
5,933 » Thymin u. Uracil	»	1,3870 » »
dazu noch Ammoniak	»	0,6132 » »
		<hr/>
		5,7920 g N

Setzt man den Gesamtstickstoff des Ausgangsmaterials 8,736 g N = 100, so sind, in Prozenten ausgedrückt, hiervon enthalten:

Im Huminstickstoff	11,54%
» Ammoniak	7,00%
» Guanin	3,61%
» Adenin	13,45%
» Xanthin	6,74%
» Hypoxanthin	5,20%
» Cytosin	11,45%
» Thymin u. Uracil	15,88%
	<hr/>
	74,87%

Es haben sich mithin rund 75% des Stickstoffs wiederfinden lassen. Selbstverständlich kann ich diese Zahlen nur mit aller Reserve geben, da die Schwierigkeiten, einen solchen

Versuch annähernd quantitativ durchzuführen, sehr groß sind und mir vor allen Dingen noch die Zahlen der auf andere Weise durchgeführten Spaltungen fehlen: doch scheinen sich die Mengen Guanin und Adenin, die man bei Schwefelsäurespaltung erhält, nicht wesentlich von den hier gewonnenen zu unterscheiden. Auffallend sind die Mengen Xanthin und Hypoxanthin, die sich möglicherweise erst sekundär während des Siedens gebildet haben. Eine Entscheidung dieser Fragen können nur weitere Versuche geben, die von mir fortgesetzt werden.

Anmerkung: Burian hat in Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft Bd. 37, S. 708 eine Reaktion angegeben, durch die der Ort der Phosphorbindung an den Purinkern in der Nucleinsäure bewiesen sein soll. Nach meinen Versuchen gibt nun das Thymin — vorausgesetzt, daß man Natronlauge anwendet — dieselbe Farbenreaktion, trotzdem hier gar kein Stickstoff in der 7-Stellung vorhanden ist. Die von Burian aus der Reaktion gezogenen Schlüsse erscheinen mir daher durchaus nicht bindend.