

Die Oxydation der Thymusnucleinsäure mit Calciumpermanganat.

Von

Fr. Kutscher und Martin Schenck.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)
(Der Redaktion zugegangen am 25. März 1905.)

Vor einiger Zeit haben Kutscher und Seemann¹⁾ über Oxydationsversuche an Thymusnucleinsäure berichtet. Sie gewannen damals von Oxydationsprodukten Harnstoff und Imidoharnstoff und zeigten, daß es bei der Oxydation der Thymusnucleinsäure mit Calciumpermanganat nicht zur Bildung von Harnsäure kommt. Wir haben diese Versuche fortgesetzt, dabei ist es uns gelungen, außer den obengenannten eine Anzahl anderer Oxydationsprodukte zu isolieren. Der Gang unserer Untersuchung war folgender:

100 g lufttrockene Thymusnucleinsäure²⁾ mit einem Gehalt von 8.18% P wurden in 3 Litern Wasser aufgeschwemmt. Darauf wurde Barytwasser zugefügt, bis die Nucleinsäure unter Bildung leicht löslicher saurer Barytverbindungen in Lösung gegangen war. Nunmehr wurde die Flüssigkeit bis nahe zum Sieden erhitzt und langsam 10%ige Calciumpermanganatlösung zugefügt, bis das starke Schäumen der Flüssigkeit nachließ. Um dies zu erreichen, wurden ca. 400 g Calciumpermanganat

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 3023.

²⁾ Das Präparat ist uns durch Vermittlung Seiner Exzellenz des Herrn Geheimrats v. Behring durch die Höchster Farbwerke geliefert worden. Wir sprechen an dieser Stelle unseren Dank für die uns dadurch zuteil gewordene Unterstützung aus. Das lufttrockene Präparat gab bei der Analyse folgende Werte:

0.2906 g Substanz: 0.0862 g P_2O_5 , Mg_2 ; gefunden: P = 8,25%

0.3136 „ „ : 0.0914 „ „ : „ : „ = 8,11%

Die Säure enthielt ziemlich reichlich Baryt. Sie war nach dem Verfahren von Kossel und Neumann (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 2215 [1887]) dargestellt.

verbraucht. Noch siedend heiß wurde vom Manganschlamm abfiltriert. Das klare Filtrat reagierte schwach alkalisch. Es wurde zunächst auf freier Flamme, darauf auf dem Wasserbade bis zirka zum Liter eingengt und nach dem Erkalten mit Schwefelsäure stark angesäuert. Dabei fiel reichlich Calciumsulfat aus, das durch Filtration entfernt wurde. Das klare Filtrat unterwarfen wir im Apparat von Kutscher und Steudel einer energischen Extraktion mit Äther. Auch der Manganschlamm wurde mit verdünnter Schwefelsäure ausgezogen, der so gewonnene Auszug mit Äther erschöpft. Die beiden Ätherextrakte wurden später vereinigt.

Verarbeitung der Ätherextrakte.

Nachdem die Ätherextraktion einige Zeit gewährt hatte, begannen sich im Ätherkölbchen reichliche Kristalle abzusetzen, die ihrem Aussehen nach zwei verschiedenen Säuren angehörten. Wir brachen die Extraktion ab, als sich ihre Menge nicht mehr merklich vermehrte, saugten die Kristalle ab, wuschen sie mit etwas Äther und versuchten zunächst, sie durch verschiedene Lösungsmittel, namentlich Wasser und Alkohol, voneinander zu trennen. Doch mißlangen diese Versuche. Nachdem wir festgestellt hatten, daß die eine der vorliegenden Substanzen Oxalsäure war, kamen wir schließlich in folgender Weise zum Ziel: Die Kristallmassen wurden in Wasser gelöst, die Lösung machten wir mit Kalkwasser schwach alkalisch. Dadurch schieden wir die Oxalsäure als Calciumoxalat ab, das wir abfiltrierten. Das Filtrat enthielt die zweite Säure. Es wurde stark eingengt, worauf sich nach dem Erkalten ein Kalksalz in Knollen, die aus feinen Nadeln bestanden, abschied. Dasselbe war in heißem Wasser leicht, in kaltem schwerer löslich. Aus ihm ließ sich durch Zersetzung mit Salzsäure ohne Schwierigkeit die freie Säure gewinnen, die in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich ist. Wir wollen diese neue Säure als Martamsäure bezeichnen. Auf die Eigenschaften dieser Säure werden wir etwas später eingehen. Der aus dem Manganschlamm gewonnene Ätherextrakt enthielt nur diese beiden Säuren. Um die Säuren, die sich nicht schon kristallinisch

aus dem Ätherextrakt abgeschieden hatten, zu gewinnen, verdunsteten wir den Äther bei 40° C. Den Rückstand destillierten wir nach Ansäuern mit Phosphorsäure im Wasserdampfströme. Die mit Wasserdampf flüchtigen Fettsäuren verarbeiteten wir nach dem Verfahren Liebig's. Wir erhielten dabei aus den verschiedenen Fraktionen folgende Silberwerte:

Fraktion I.	0,1344 g Substanz gaben	0,087 g Ag =	64,7% Ag
» II.	0,1706 »	0,1096 »	= 64,3%
		Essigsäures Silber verlangt	64,8% Ag.

Leider verloren wir durch Sprung des Fraktionskölbchens die Hauptmasse der Fettsäuren, doch da wir uns zuerst durch qualitative Versuche überzeugt hatten, daß Ameisensäure vollkommen fehlte, und auch der Geruch nach höheren Fettsäuren sich nicht beobachten ließ, so dürfen wir wohl behaupten: Bei der Oxydation der Thymusnucleinsäure mit Calciumpermanganat bildet sich an flüchtigen Fettsäuren nur Essigsäure.

Den Destillationsrückstand befreiten wir durch Kalkmilch von der Phosphorsäure. Der durch Kalkmilch erzeugte Niederschlag enthielt noch Calciumoxalat, das wir durch Digestion mit Essigsäure vom Calciumphosphat abtrennten und durch Lösen in Salzsäure und Fällen mit Ammoniak reinigten. Die an verschiedenen Stellen gewonnenen Massen von Calciumoxalat wurden vereinigt und eine Stichprobe der Analyse unterworfen.

0,2404 g Substanz gaben	0,0913 g CaO
Gefunden =	27,2% Ca.
Berechnet für	$\text{CaC}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O} \stackrel{?}{=} 27,5\% \text{ Ca.}$

Die Ausbeute an Oxalsäure, auf freie Oxalsäure berechnet, hatte 1,7 g betragen.

Das Filtrat vom Calciumphosphat und Oxalat befreiten wir durch Kohlensäure vom überschüssigen Calcium. Nach dem Einengen kristallisierten nur noch geringe Mengen vom Calciumsalz der Martamsäure. Einen anderen Körper schien das Filtrat nicht zu enthalten. Die Ausbeute an freier Säure hatte ca. 1 g betragen. Die Analysen der bei 120° C. getrockneten Substanz ergaben folgende Werte:

0,1698 g Substanz gaben	52,8 ccm N; T. = 17,5°; Ba = 737,6 mm
0,1396	0,1300 g CO ₂ und 0,047 g H ₂ O
0,1549 »	50,3 ccm N; T. = 18°; Ba = 732,3 mm
0,1457 »	0,1358 g CO ₂ und 0,0542 g H ₂ O.

Die aufgeführten Analysenzahlen stimmen annähernd zu der Formel $C_5H_8N_6O_5$ resp. zu $C_5H_{10}N_6O_5$:

Für $C_5H_8N_6O_5$ ber.:	Für $C_5H_{10}N_6O_5$ ber.:	Gefunden im Mittel:
C = 25,8%	C = 25,6%	C = 25,4%
H = 3,5%	H = 4,3%	H = 3,9%
N = 36,3%	N = 36,0%	N = 36,1%

Durch eine Silberanalyse haben wir bestätigen können, daß der Martamsäure in der Tat eine der beiden obigen Formeln zukommen muß. Sie bildet ein Silbersalz, wenn man ihre Lösung mit Silbernitrat und darauf vorsichtig mit Ammoniak versetzt oder ihr Ammonsalz mit Silbernitrat fällt. Es ist schwach gelb gefärbt und zunächst amorph, wird aber nach einigen Tagen ruhigen Stehens kristallinisch, indem es sich in kleine, aus zarten Blättchen zusammengesetzte Drusen umwandelt. Im überschüssigen Ammoniak und in Salpetersäure ist es leicht löslich, in Wasser und Alkohol unlöslich. Die Analyse der kristallinischen Silberverbindung, von der uns leider eine etwas zu kleine Menge zur Verfügung stand, gab folgenden Wert:

0.0946 g Substanz gaben 0.0558 g Ag

Für $C_5H_7N_6O_5Ag_3$ ber.:	Für $C_5H_5N_6O_5Ag_3$ ber.:	Gefunden:
Ag = 58,33%	Ag = 58,54%	Ag = 58,99%

Die Martamsäure kristallisiert in dünnen, mikroskopischen Nadeln. Sie läßt sich ihrer Formel nach von keinem der bisher bekannt gegebenen Spaltungsprodukte der Nucleinsäuren ableiten. Sie gab weder die Murexid- noch die Weidelsche Reaktion. Die letztere auch nicht in der von Emil Fischer angegebenen Form. Sie ist in kaltem Wasser ziemlich schwer, in heißem Wasser leicht löslich. Die gleichen Lösungsverhältnisse zeigt sie gegen Alkohol, in Äther ist sie schwer löslich. Sie kommt also in ihrem Verhalten gegen die genannten Lösungsmittel der Oxalsäure nahe. Es ist dies auch der Grund, warum wir schließlich die Oxalsäure durch Kalk entfernen mußten, um unsere Säure rein zu erhalten. Im Schmelzröhrchen erhitzt sublimiert sie ohne Rückstand und ohne Zersetzung. Auch im zugeschmolzenen Schmelzröhrchen gelingt es nicht, sie zum Schmelzen zu bringen, sie sublimiert hier aus dem unteren in den oberen Teil des Röhrchens. Die Sublimation beginnt bereits bei 150° C., wie wir bei unseren Versuchen, sie zur Ge-

wichtskonstanz zu trocknen, beobachten konnten: sie nahm bei dieser Temperatur fortwährend an Gewicht ab und das Wagegläschen zeigte in seinem oberen Teil deutlichen Beschlag. Mit Salpetersäure auf dem Wasserbade abgedampft, hinterläßt unsere Säure einen weißen, kristallinen, in Wasser leicht löslichen Rückstand, der, mit Calciumchlorid und Ammoniak versetzt, allmählich einen geringen in Essigsäure unlöslichen Niederschlag gab, also wohl etwas Oxalsäure enthielt.

Verarbeitung der durch Äther erschöpften Reaktionsflüssigkeit.

An den Wandungen des Extraktionskolbens hatten sich neben weißen Kristallen von Calciumsulfat allmählich auch stark gefärbte, kleine, harte Kristalldrüsen abgeschieden, die aus einer organischen Säure bestanden und ihrem Aussehen nach auffallend an Harnsäure erinnerten. Sie wurden nach der Entleerung des Kolbens gesammelt und mechanisch vom anhaftenden Calciumsulfat nach Möglichkeit befreit. Um sie völlig rein zu erhalten, wurden sie mit Natriumkarbonat gekocht, das ausfallende Calciumkarbonat durch Filtration entfernt. Die eingengte Flüssigkeit ließ das ziemlich schwerlösliche Natronsalz unserer Säure in Drüsen von dünnen makroskopischen Nadeln auskristallisieren. Die freie Säure ließ sich durch Zersetzung des Natronsalzes mit Schwefelsäure (auffallenderweise versagte Salzsäure) leicht gewinnen. Nach der Umkristallisation aus heißem Wasser schied sich dieselbe in harten Oktaedern ab, die häufig zu kleinen Drüsen verwachsen waren. Zur Analyse reichte die Menge der rein dargestellten Säure nicht aus, wir mußten uns deshalb auf einige qualitative Reaktionen beschränken.

Die Säure sublimiert im trocknen Röhrchen erhitzt zum Teil scheinbar unzersetzt. Ein Teil verkohlt aber immer, ohne vorher zu schmelzen. Sie gibt weder die Murexid- noch die Weidelsche Probe. Die letztere auch nicht in der von E. Fischer angegebenen Form. Mit Salpetersäure auf dem Wasserbade abgedampft, hinterläßt sie eine weiße Kristallmasse. Dieselbe besteht aus dünnen, rechtwinkligen, rhombischen Täfelchen, die in Wasser schwer, in Ammoniak leicht löslich

sind. Die ammoniakalische Lösung dieser Täfelchen gibt mit Silbernitrat eine weiße amorphe Verbindung, welche sich im überschüssigen Ammoniak und Salpetersäure leicht löst. Das Produkt, das durch Behandlung unserer Säure mit Salpetersäure entstand, schien dem mikroskopischen Bilde nach vollkommen einheitlich zu sein. Oxalsäure wenigstens ließ sich darin nicht nachweisen. Die unveränderte Säure ist in heißem Wasser schwer, in kaltem Wasser kaum löslich. In Alkohol und Äther erschien sie ebenfalls kaum löslich. Versetzt man eine Lösung der freien Säure mit Silbernitrat, Baryumchlorid und Bleizucker, so entstehen kristallinische Niederschläge. Die Ausbeute an dieser Säure mochte 0,1 g betragen haben.

Nach Entfernung der eben geschilderten Säure wurde die Reaktionsflüssigkeit vom Äther befreit und mit Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines stärkeren Überschusses dieses Reagens ausgefällt. Die Fällung saugten wir ab, wuschen sie mit Schwefelsäure. Darauf stellten wir aus den Wolframatn nach bekannter Methode durch Zersetzung mit Baryt etc. die freien Basen dar. Die wässrige Lösung der Basen fällten wir mit heiß gesättigter, wässriger Pikrinsäure, bis eine Probe mit kaltgesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung nicht mehr reagierte. Die reichliche Fällung saugten wir ab, zersetzten sie mit Salzsäure, entfernten die Pikrinsäure durch Äther. Die so erhaltenen Chloride der Basen dampften wir zur Trockne ab. Durch Aufnehmen mit Alkohol und Wasser ließ sich der Rückstand in ein in dem genannten Lösungsmittel schwer und ein darin leichtlösliches Chlorid trennen. Das erste Chlorid war Adeninchlorid, das zweite Guanidinchlorid. Das Adeninchlorid führten wir durch Ammoniak in die freie Base über, die analysiert wurde.

0,0895 g Substanz gaben 41 ccm N; T. = 17,5°; Ba = 735,6 mm

Für $C_5H_5N_5$ ber.: N = 51,9%. Gefunden: N = 52,1%.

Die Ausbeute an Adenin hatte ca. 1 g betragen.

Das Guanidinchlorid führten wir zur Analyse in das Pikrat über.

0,1353 g Substanz gaben 34,9 ccm N; T. = 18°; Ba = 736,8 mm.

Für $CH_5N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$ ber.: N = 29,2%. Gefunden: 29,3%.

Die Ausbeute an Guanidinpikrat betrug 5.99 g. Dieselben entsprechen 1.23 g Guanidin.

Außer den beiden genannten Basen enthielt die Phosphorwolframfällung, wie die weitere Untersuchung ergab, keine anderen Körper oder höchstens Spuren davon.

Das Filtrat von der Phosphorwolframfällung befreiten wir durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt und dampften es auf dem Wasserbade zur Trockene ab. Den Rückstand nahmen wir mit Alkohol auf. Es zeigte sich dabei, daß der gesamte Rückstand, soweit er aus organischen Substanzen bestand, in Alkohol löslich war. Die alkoholische Lösung gab nun, mit alkoholischer Pikrinsäure versetzt, eine reichliche Fällung. Dieselbe bestand, wie die Analyse zeigte, aus Guanidinpikrat. Das Pikrat gab nämlich vor der Umkristallisation folgende Werte:

0.1509 g Substanz gaben 37.9 ccm N; T. = 17.5°; Ba = 736.6 mm
Für $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ ber.: N = 29.2% . Gefunden: N = 28.6% .

Nach einmaliger Umkristallisation wurde gefunden:

0.1406 g Substanz gaben 36 ccm N; T. = 16°; Ba = 734.8 mm
Gefunden: N = 29.2% .

Die Ausbeute an Guanidinpikrat, die wir an dieser Stelle gewannen, betrug 3.26 g, entsprechend 0.67 g Guanidin. Durch Phosphorwolframsäure hatten sich demnach nur zirka zwei Drittel des gebildeten Guanidins niederschlagen lassen. Die gleiche Erfahrung, daß die Phosphorwolframsäure das Guanidin unter Umständen nur sehr unvollkommen ausfällt, machten wir bei der Oxydation des Leims.¹⁾ Wir zogen dort schließlich vor, das Guanidin sofort durch Pikrinsäure abzuscheiden und hinterher die anderen Basen mit Phosphorwolframsäure zu fällen.

Das Filtrat vom Guanidinpikrat säuerten wir mit Schwefelsäure an, nachdem wir den Alkohol daraus verjagt hatten, ätherten es aus, entfernten die Schwefelsäure durch Baryt, den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure. Nachdem wir von neuem die Flüssigkeit zur Trockne verdunstet und den Rückstand mit Alkohol aufgenommen hatten, verblieb nach Verjagen des Alkohols eine Kristallmasse, die starke Biuretreaktion gab.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 455.

Durch qualitative Reaktionen ließ sich weiter Harnstoff darin nachweisen. Doch ist es uns bisher nicht gelungen, eine gute Methode zur Aufteilung dieses Rückstandes auszuarbeiten. Es haben sich demnach zurzeit von den kristallinen Oxydationsprodukten der Thymusnucleinsäure folgende nachweisen lassen.

1. Oxalsäure,
2. Martamsäure,
3. Essigsäure,
4. Säure unbekannter Formel,
5. Adenin,
6. Guanidin,
7. Harnstoff,
8. Eine biuretgebende Substanz.

Von diesen Substanzen läßt sich das Guanidin auf das im Molekül der Thymusnucleinsäure in weitgehender Weise vorgebildete Guanin zurückführen und das Oxydationsverfahren ist sehr wohl geeignet, in den Nucleinsäuren das Guanin quantitativ zu bestimmen, oder die durch Hydrolyse erhaltene Ausbeute an Guanin zu kontrollieren. Das zeigt folgende kleine Rechnung. Von Kossel und Neumann¹⁾ wurden bei ihren Versuchen über die Thyminsäure 6% Guanin aus reiner Thymusnucleinsäure erhalten. Wie sich aus dem P-Gehalt unserer Thymusnucleinsäure berechnen läßt, entsprechen die 100 g derselben, 84,7 g reiner, trockener Thymusnucleinsäure. Dieselben haben 1,9 g Guanidin geliefert. Rechnen wir das Guanidin in Guanin um, so erhalten wir 4,87 g Guanin. Demnach würden nach unserem Versuch 100 g reiner, trockener Thymusnucleinsäure 5,75% Guanin geben, während Kossel und Neumann, wie bereits gesagt, 6% Guanin erhielten. Wir beabsichtigen, unsere Untersuchungen fortzusetzen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 78.