

Über die Darmnucleinsäure.

Von

Katsuji Inouye,
unter Mitwirkung des Herrn **Y. Kotake.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Kyoto.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. August 1905.)

In der folgenden Mitteilung berichten wir über einige Untersuchungen, welche angestellt wurden, um die Zusammensetzung und die Spaltungsprodukte der von Araki¹⁾ entdeckten Darmnucleinsäure zu ermitteln.

Die Darstellung der Darmnucleinsäure erfolgte nach der Methode von A. Neumann,²⁾ welche zur Gewinnung des als α -Nucleinsäure bezeichneten Körpers aus Thymus angewandt wurde. Die gereinigte Darmnucleinsäure gab weder Biuret- noch Millonsche Reaktion und besaß alle Eigenschaften, welche Araki³⁾ für seine Nucleinsäure beschrieben hatte. Es ist nur noch zu bemerken, daß die von uns dargestellte Darmnucleinsäure rechtsdrehend war.

I. Analyse der Darmnucleinsäure.

Hinsichtlich der Ausführung der Analysen ist folgendes zu bemerken: Für die Analysen diente stets die im Vacuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz. Bei den Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen wurde die Substanz im Luft- und Sauerstoffstrom mit Kupferoxyd bei vorgelegten Kupferspiralen verbrannt. Für die Phosphorbestimmungen wurde die Substanz mit Soda und Salpeter verascht, die Überführung der Phosphorsäure in phosphorsaure Ammoniummagnesia geschah nach vorheriger Ausfällung mit Ammoniummolybdat. Die Stickstoffbestimmungen wurden volumetrisch ausgeführt. Der Berechnung der

¹⁾ Araki, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 98.

²⁾ Neumann, Archiv f. Physiol. u. Anatom., physiol. Abt., 1899, Suppl. 552.

³⁾ Araki, a. a. O.

Analysenwerte sind die von Thierfelder¹⁾ angegebenen Atomgewichte zugrunde gelegt.

0,2159 g Substanz	gaben	0,2967 g CO ₂	=	37,47%	C
		und 0,0927 » H ₂ O	=	4,78%	H
0,1692 g Substanz	gaben	0,2313 » CO ₂	=	37,28%	C
		und 0,0730 » H ₂ O	=	4,83%	H
0,2318 g Substanz	gaben	0,3172 » CO ₂	=	37,32%	C
		und 0,0985 » H ₂ O	=	4,76%	H
0,3313 g Substanz	gaben	0,4568 » CO ₂	=	37,60%	C
		und 0,1460 » H ₂ O	=	4,94%	H
0,1993 g Substanz	gaben	0,2780 » CO ₂	=	38,04%	C
		und 0,0851 » H ₂ O	=	4,78%	H
0,1542 g Substanz	gaben	21 ccm feuchten Stickstoff bei 22,2° C.			
		und 759 mm B.,			entsprechend 15,4% N.
0,1686 g Substanz	gaben	23,5 ccm feuchten Stickstoff bei 24,1° C.			
		und 760 mm B.,			entsprechend 15,62% N.
0,1476 g Substanz	gaben	21 ccm feuchten Stickstoff bei 28° C.			
		und 756,2 mm B.,			entsprechend 15,56% N.
0,1789 g Substanz	lieferten	0,0597 g Mg ₂ P ₂ O ₇	=	9,29%	P
0,1888 »	»	0,0638 »	=	9,41%	»
0,2569 »	»	0,0861 »	=	9,33%	»
0,1622 »	»	0,0548 »	=	9,40%	»
0,2363 »	»	0,0789 »	=	9,29%	»

Es wurden gefunden:

	1	2	3	4	5	Mittel
	%	%	%	%	%	%
C	37,47	37,28	37,32	37,60	38,04	37,54
H	4,78	4,83	4,76	4,94	4,78	4,82
N	15,40	15,62	15,56	—	—	15,53
P	9,29	9,41	9,33	9,40	9,29	9,37

Die Mittelwerte der Analysen stimmen ziemlich gut mit der Zusammensetzung der Nucleinsäure aus der Lachsmilch, C₄₀H₅₆N₁₄P₄O₂₆,²⁾ überein.

¹⁾ Thierfelder, Handbuch d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, Berlin 1903, S. 589.

²⁾ Archiv für experiment. Pathol. u. Pharmakol., Bd. XLIII, S. 57.

Für $C_{40}H_{86}N_{14}P_4O_{26}$ berechnet:		Gefundene Analysenwerte der Darmnucleinsäure:
C	37,70%	37,54%
H	4,44%	4,82%
N	15,45%	15,53%
P	9,74%	9,37%

II. Spaltung der Darmnucleinsäure.

100 g nucleinsaures Natron wurden mit 1 l 20-volumprozentiger Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler auf dem Sandbade gekocht. Die dunkelbraune Flüssigkeit wurde von der ausgeschiedenen Huminsubstanz abfiltriert und mit Äther erschöpft. Die Ätherauszüge wurden abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und nach der Neutralisation mit neutralem Silbernitrat ausgefällt. Daß dieses Silbersalz aus dem lävulinsauren Silber bestand, ergab sich sowohl aus der Kristallform als aus der folgenden Analyse:

0,1654 g Substanz gaben 0,1639 g CO_2 = 27,02% C.
 0,0482 g H_2O = 3,27% H und 0,0798 g Ag = 48,25% Ag
 Berechnet für $C_5H_7O_3Ag$: C 26,90%; H 3,17%; Ag 48,40%
 Gefunden: C 27,07%; H 3,27%; Ag 48,25%

Die mit Äther erschöpfte Zersetzungsflüssigkeit wurde mit Baryumcarbonat neutralisiert, filtriert, das Filtrat auf 5% Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt.

A. Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag wurde mit Barythydrat zerlegt und der Überschuß von Baryt durch Kohlensäure entfernt. Es resultierte eine Flüssigkeit, die Purinbasen und Cytosin enthielt. Diese Flüssigkeit wurde nun mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit einer 10%igen Silbernitratlösung gefällt. Die weitere Behandlung der Silberfällung haben wir nach den Angaben von Steudel¹⁾ durchgeführt. Wir erhielten so 1,1020 g Guanin, 5,2100 g Adeninpicrat = 1,9823 g Adenin, 0,1560 g Xanthin und 0,3726 g Hypoxanthin.

Die einzelnen Purinbasen sind sowohl durch die Reaktionen als durch die Analysen identifiziert worden.

¹⁾ Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165.

1. Guanin. Für die Analyse wurde es in verdünnter Schwefelsäure gelöst und bis zur beginnenden Kristallisation eingengt; beim Erkalten schied sich Guaninsulfat in den charakteristischen Kristallen aus.

0,1267 g Substanz gaben 40,2 ccm feuchten Stickstoff bei 26° C.
und 756,4 mm B., entsprechend 35,05% N.

Berechnet für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4$:	Gefunden:
N 35,05%	35,05%

2. Adeninpicrat. Zur Analyse wurden die nadelförmigen Kristalle, deren Schmelzpunkt bei 280° C. lag, verwendet.

0,1273 g Substanz gaben 35 ccm feuchten Stickstoff bei 24° C.
und 756 mm B., entsprechend 30,66% N.

0,1717 g Substanz gaben 0,2278 g CO_2 = 36,18% C
und 0,0347 g H_2O = 2,27% H.

Berechnet für $C_6H_5N_5 \cdot C_6H_3N_3O_7$:	C 36,26%	H 2,30%	N 30,82%
Gefunden:	C 36,18%	H 2,27%	N 30,66%

3. Xanthin. Die Substanz gab sehr schöne Xanthinprobe und prachtvolle Weidelsche Reaktion.

0,1558 g Substanz gaben 51,25 ccm feuchten Stickstoff bei 25,5° C.
und 756,5 mm B., entsprechend 36,42% N.

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$:	Gefunden:
N 36,90%	36,42%

4. Hypoxanthin. Zur Analyse diente Hypoxanthinnitrat, das in Wetzsteinformen kristallisierte.

0,1516 g Substanz gaben 48 ccm feuchten Stickstoff bei 26° C.
und 756,1 mm B., entsprechend 34,95% N.

Berechnet für $C_5H_4N_4O \cdot HNO_3$:	Gefunden:
N 35,23%	34,95%

Aus dem Filtrat von den Silberverbindungen der Purinbasen wurde eine Silberverbindung mit Silbernitrat und Barytwasser ausgeschieden. Diese Silberverbindung wurde in Wasser zerteilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die hieraus resultierende Lösung durch vorsichtigen Zusatz von Schwefelsäure vom beigemengten Baryt befreit. Filtrat und Waschwasser wurden auf dem Wasserbade eingengt. Beim Erkalten kristallisierten schöne Blättchen aus. Die Ausbeute an diesen Kristallen betrug 2,8126 g. Die Analysen ergaben:

0,2135 g Substanz gaben 0,3383 g CO_2 = 43,21% C
 und 0,0889 g H_2O = 4,67% H.

0,1476 g Substanz gaben 50,2 ccm feuchten Stickstoff bei 25° C.
 und 758,2 mm B., entsprechend 37,83% N.

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$: C 43,18%; H 4,54%; N 37,89%

Gefunden: C 43,21%; H 4,67%; N 37,83%

Die Kristallform und die analytischen Daten führen zu dem Schluß, daß die in Rede stehende Substanz das Cytosin ist.

B. Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung.

Dasselbe wurde durch Baryt von der Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Das eingeeengte Filtrat erstarrte beim Stehenlassen zu einer Kristallmasse. Diese Kristallmasse wurde wieder in heißem Wasser gelöst und der Kristallisation überlassen; es schied sich zunächst ein Körper in Form von kleinen Kristallblättchen aus, welcher sich bei der Analyse als Thymin erwies.

0,2565 g Substanz gaben 0,4463 g CO_2 = 47,45% C
 und 0,1098 g H_2O = 4,80% H.

0,1528 g Substanz gaben 30,1 ccm feuchten Stickstoff bei 21,5° C.
 und 755,3 mm B., entsprechend 22,23% N.

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$: C 47,57%; H 4,80%; N 22,26%

Gefunden: C 47,45%; H 4,80%; N 22,23%

Die von den Thyminkristallen abfiltrierte Lösung wurde wieder auf dem Wasserbade eingeeengt, so daß nur wenig Flüssigkeit vorhanden war. Beim Erkalten und Stehen dieses Filtrats fielen nadelförmige Kristalle in reichlicher Menge aus, die sich durch den niedrigen Stickstoffgehalt (14,5%) und die Nichtsublimierbarkeit vom Thymin und Uracil unterschieden. Die weitere Untersuchung dieser Substanz möchten wir uns vorbehalten.

Wenn wir die Ergebnisse des erwähnten Spaltungsversuches noch einmal kurz zusammenfassen, so ist es gelungen, folgende sieben Produkte in der Zersetzungsflüssigkeit mit Sicherheit nachzuweisen: Lävulinsäure, Guanin, Adenin, Xanthin, Hypoxanthin, Thymin, Cytosin.