

Über die Oxydation der Nucleinsäure.

I. Mitteilung.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. Juli 1906.)

Um einen Einblick in den Aufbau der Nucleinsäuren zu gewinnen, hat man sich bisher, wenn man von einem Versuche Kutschers¹⁾ absieht, ausschließlich darauf beschränkt, die Einwirkung siedender Mineralsäuren auf diese Substanzen näher zu verfolgen. So fruchtbar nun aber auch diese Untersuchungsmethode gewesen ist, so hat sie uns doch immer nur ein einseitiges Bild von der Struktur der Nucleinsäuren gegeben, das in vielen Beziehungen noch sehr der Ergänzung bedarf. Man mußte also danach streben, durch andere Abbaumethoden andere Spaltungsprodukte in die Hand zu bekommen, um so zu einer besseren Anschauung von der Atomgruppierung zu gelangen. Da mir nun bei meinen bisherigen²⁾ vergleichenden Spaltungsversuchen ein eigentümliches Verhalten des Kohlehydratkomplexes, der bei der Schwefelsäurespaltung Lävulinsäure und Ameisensäure liefert, aufgefallen war — man erhält z. B. keine Spur von Lävulinsäure bei Nucleasewirkung —, so suchte ich zunächst nach Methoden, die geeignet waren, mir andere Abbauprodukte des Kohlehydratkomplexes zu liefern, aus denen man Rückschlüsse auf seine besondere Konstitution machen konnte. Besonders erfolgversprechend erschien mir dafür das Studium der Zersetzungsprodukte zu sein, die bei Salpetersäurewirkung entstehen. Der Verlauf der Oxydation der Kohlehydrate durch Salpetersäure ist ja genügend bekannt und wenn der Prozeß

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 309.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165; Bd. XLIII, S. 402; Bd. XLVI, S. 332.

auch nicht immer leicht zu leiten ist, so sind doch die Oxydationsprodukte charakteristisch genug, daß sie eine Klassifizierung der zugrunde liegenden Kohlehydratgruppe erlauben.

Die Untersuchungen sind durchaus noch nicht abgeschlossen und haben speziell in bezug auf die Kohlehydratgruppe noch zu keinem positiven Ergebnis geführt, es haben sich aber dabei so eigenartige Resultate ergeben, daß ihre Mitteilung vor dem endgültigen Abschluß wohl gerechtfertigt erscheinen kann.

Zuerst wurde natürlich auf das Entstehen von Zuckersäure und Schleimsäure gefahndet, aber oft wiederholte Versuche, jedesmal an 10 g freier Nucleinsäure¹⁾ ausgeführt, sind bisher ohne Erfolg geblieben.

Als dann die Untersuchungen in größerem Maßstabe aufgenommen wurden, zeigte sich folgendes:

Übergießt man lufttrockenes nucleinsaures Kupfer (100 g) mit Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 (100 ccm), ohne zu kühlen, so findet sehr bald eine starke Erwärmung statt und unter stürmischer Entwicklung braunroter Dämpfe und unter heftigem Schäumen tritt Zersetzung ein. Man erhält, wie sich bei weiterer Untersuchung herausstellte, dieselben Resultate, nur verläuft die Reaktion viel milder und langsamer, wenn man die Salpetersäure vorher auf das doppelte Volumen verdünnt; bringt man also 100 g nucleinsaures Kupfer mit 200 ccm einer Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,2 zusammen, so fällt zunächst die freie Nucleinsäure als zähe Masse zu Boden und es beginnt allmählich eine langsame und stetige Gasentwicklung der niederen Oxyde des Stickstoffs, wobei die Nucleinsäure nach und nach in Lösung geht. Nach 24 Stunden ist sie fast vollständig verschwunden und an ihrer Stelle findet sich ein reichlicher krystallinischer Bodensatz, über dem eine etwas visköse grünliche Flüssigkeit steht. Trennt man nach einem weiteren Tage Stehens den Bodensatz von der Flüssigkeit, so erhält man ein grauweißes Krystallpulver, das mit verdünnter Salpetersäure gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet werden kann. Es besteht fast ganz aus den Nitraten des Guanins und Adenins,

¹⁾ Die Nucleinsäure für diese und die folgenden Versuche wurde von mir aus Heringsmilch dargestellt.

die man also auf diese höchst einfache Weise aus der Zersetzungsflüssigkeit entfernen kann.

Löst man die Krystalle vorsichtig in heißem Wasser und übersättigt mit Ammoniak, so erhält man einen dichten, weißen, amorphen Niederschlag, der nach 12 stündigem Stehen abfiltriert, in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure gefällt wurde.

0,1018 g, bei 100° getrocknet, sättigten, nach Kjeldahl verbrannt,
33,5 ccm $n/10$ -Oxalsäure = 46,20% N.

Berechnet für Guanin: 46,45% N.

Das Filtrat vom Guanin wurde zur Trockne verdampft, um das überschüssige Ammoniak zu vertreiben, dann mit Wasser aufgenommen und mit pikrinsaurem Natron gefällt. Der Niederschlag zeigte sofort einen Schmelzpunkt von 280°, war also reines Adeninpikrat. Im Filtrat vom Adeninpikrat konnte mit ammoniakalischer Silberlösung nur noch ein spurenhafter Niederschlag erhalten werden, so daß also Hypoxanthin und Xanthin, die ja ebenfalls schwer lösliche Nitrats bilden, sich in diesem ersten Niederschlage nicht befanden und wahrscheinlich auch in diesem ersten Stadium der Salpetersäurewirkung noch nicht entstanden waren.

Die Krystallisation der Alloxurbasen gelingt außerordentlich leicht, selbst noch mit den kleinsten Spuren nucleinsaurer Salze, so daß man sie wohl als charakteristische Reaktion gebrauchen könnte. Läßt man z. B. unter dem Mikroskop einen Tropfen starker Salpetersäure zu einem Körnchen nucleinsaurer Natrons oder zu freier Nucleinsäure auf dem Objektträger fließen, so beginnt nach wenigen Augenblicken eine reichliche Abscheidung von Krystallen, von deren Doppelbrechung man sich leicht im polarisierten Licht überzeugen kann. Konzentrierte Salzsäure wirkt in gleicher Weise.¹⁾

Die von den Nitraten der Alloxurbasen abgetrennte Flüssigkeit läßt bei längerer Digestion bei 45–50° einen weiteren grünlich-weißen Niederschlag fallen, der in Wasser fast unlöslich ist und nach seinem Kupfergehalt sich als oxalsaures Kupfer erweist.

¹⁾ Diese Versuche über die Wirkung der Salzsäure werde ich weiter verfolgen, sobald es meine Zeit erlaubt.

0,1256 g liefern 0,0589 g CuO = 37,47% Cu.

Berechnet für $\text{CuC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$: 37,50% Cu.

Bei der weiteren Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit habe ich neben einer Krystallfraktion, die Xanthin und Hypoxanthin enthielt, eine solche erhalten, die aus einem Gemenge von Thymin und Uracil bestand. Die einmal aus Alkohol umkrystallisierte Substanz gab folgenden Stickstoffwert:

0,1470 g sättigten, nach Kjeldahl verbrannt, 24,2 ccm n_{10} -Oxalsäure
= 23,11% N.

Berechnet für Thymin: 22,3%; für Uracil: 25,0% N.

Unter dem Mikroskop zeigten sich außer den charakteristischen Thyminkrystallen mit einem Winkel von $60^{\circ 1)}$ deutlich die zu kreisrunden Scheiben konzentrisch zusammengesetzten Nadeln des Uracils.

Die Körper also, die sich bisher aus der Oxydationsflüssigkeit haben abscheiden lassen, sind bis auf die wenig bedeutungsvolle Oxalsäure von der Hydrolyse her wohlbekannt, auffallend ist nur, daß Thymin und Uracil während der Oxydation schon bei relativ niedrigen Temperaturen entstehen — die Reaktionsflüssigkeiten wurden niemals bis zum Sieden erhitzt. Ein abschließendes Urteil über den Verlauf der Reaktion wird sich aber erst abgeben lassen, wenn die Versuche weiter durchgearbeitet sein werden.

Zusatz: Gelegentlich einer anderen Untersuchung²⁾ hatte ich nebenbei kurz mitgeteilt, daß das Thymin mit Diazobenzolsulfosäure in natronalkalischer, nicht aber in sodaalkalischer Lösung eine rote Farbenreaktion gibt, daß also die Schlüsse, die Burian aus dem Verhalten der Purinbasen gegen Diazobenzolsulfosäure über die Bindung der Phosphorsäure im Molekül der Nucleinsäure³⁾ zieht, nicht zwingend seien. Burian hat darauf, anstatt meine Angaben nachzuprüfen, eine Reihe theoretischer Betrachtungen⁴⁾ angestellt, um seine Hypothese zu retten. Diese Vermutungen zu widerlegen, halte ich für fruchtlos, dagegen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 295.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 170.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, I., S. 708.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 297.

habe ich jetzt das Verhalten der Purinbasen gegen Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung — Natronlauge, die nicht ich, sondern Burian¹⁾ vorgeschrieben hat, ist, wie aus dem Verhalten des Thymins hervorgeht, nicht zu gebrauchen — näher untersucht und ich kann bestätigen, daß das Guanin sich noch in Spuren mit dem Reagens rot färbt. Nun hat aber Burian angegeben, daß die gleiche Färbung beim Adenin eintritt, und er hat sogar den bei der Einwirkung der Diazobenzolsulfosäure auf Adenin gebildeten Körper, das «6-Amino-7-Diazobenzolsulfosäurepurin», als eine bei 180° sich bräunende, bei 270° noch nicht schmelzende Substanz dargestellt.²⁾ Diese Angabe kann ich nicht für richtig halten. Zwar zeigen gewöhnliche Adeninpräparate manchmal positiven Ausfall der Reaktion, dann geben sie aber auch noch die Murexidprobe als Zeichen, daß sie noch nicht ganz rein sind; hat man aber das Adenin z. B. durch wiederholte Krystallisation des Sulfates gereinigt, so verschwindet mit dem positiven Ausfall der Murexidprobe auch die Diazo-reaktion. Das Verhalten der Phosphorsäure in der Nucleinsäure macht eher den Eindruck einer gepaarten Phosphorsäure, die vielleicht analog der Glycerinphosphorsäure eine Kohlehydratphosphorsäure mit einer Kette von 6 anstatt 3 Kohlenstoffatomen ist.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, I., S. 708.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, I., S. 706.
