

# Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.

## XII. Mitteilung.

### Nucleinsäure der Spermatozoen des Maifisches (*Alosa*).

Von

**P. A. Levene** und **J. A. Mandel.**

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New-York,  
und aus dem Chemischen Laboratorium der New-York University und Bellevue-Hospital  
Medical College).

(Der Redaktion zugegangen am 3. September 1906.)

Die Untersuchungen über die Nucleinsäuren der Fischspermatozoen sind sehr eingehende und sorgfältige gewesen, doch liegen nur wenige Arbeiten vor, in welchen eine quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte durchgeführt war. Angaben über den Puringehalt finden sich in der Mitteilung von Schmiedeberg<sup>1)</sup> über die Lachsmilchnucleinsäure, und Kossel und Steudel<sup>2)</sup> erwähnen, daß es ihnen gelungen ist, aus 800 g Testikeln 5 g Uracil zu gewinnen. Nun ist aber der prozentische Gehalt dieses Organs an Nucleinsäure nicht bekannt, außerdem ist es durch die Arbeiten von Jones<sup>3)</sup> und von einem von uns (Levene)<sup>3)</sup> klargelegt worden, daß in überlebenden tierischen Organen Cytosin in Uracil umgewandelt wird.

Es ist also ersichtlich, daß unsere Kenntnis über die quantitative Zusammensetzung der Spermatozoennucleinsäure mangelhaft ist. In der vorliegenden Arbeit versuchten wir quantitativ die Spaltungsprodukte der Nucleinsäure der Maifischtestikeln zu bestimmen.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. XLIII, S. 57, 1900.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 245, 1903.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 100, 1904.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 393, 1904; Amer. Journ. of Physiol., Vol. XII, S. 276, 1904.

Die Substanz wurde nach dem Verfahren von einem von uns (Levene) dargestellt und als Kupfersalz analysiert.

Die Zusammensetzung war die folgende:

0,1971 g der Substanz, im Vakuumexsikkator getrocknet, gaben bei Verbrennung 0,2339 g CO<sub>2</sub> und 0,0791 g H<sub>2</sub>O.

$$\text{C} = 32,3\%, \text{N} = 4,46\%$$

0,3853 g der Substanz wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verbraucht. Es verlangte zum Neutralisieren 39,6 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,001382 g N),  $\text{N} = 14,20\%$ .

0,2016 g der Substanz gaben 0,0520 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>,  $\text{P} = 7,22\%$ .

Die Substanz enthielt 27,53% Asche (Kupfer und Phosphorsäure mitgerechnet).

Für kupferfreie Substanz berechnet:

	Milz	Milchdrüse	Niere	Maifischtetikeln
C	37,78	34,67	—	36,27%
H	4,86	4,39	—	5,00%
N	16,51	15,60	15,13	15,96%
P	8,99	8,48	8,66	8,11%
Basen	7,35	7,00	4,56	11,00%

Die Substanz war biuretfrei und besaß alle Eigenschaften der Nucleinsäuren.

### Purinbasen.

Bei den mehrfachen Analysen der Nucleinsäuren verschiedener Herkunft hat einer von uns (Levene) den Eindruck gewonnen, als ob die Resultate, die man bei Anwendung von Kupfersalzen erhält, keine zuverlässige Auskunft über den Gehalt der Substanz an Guanin gaben. In einigen Versuchen, in welchen mäßige Quantitäten des Salzes zur Analyse kamen, war die Ausbeute minimal. Um Klarheit über diese Erscheinung zu gewinnen, wurden zur Analyse der Purinbasen in der vorliegenden Nucleinsäure zwei Präparate in Anwendung genommen, ein Kupfersalz und die freie Säure. — Die Spaltung der beiden Präparate wurde in ganz ähnlicher Weise ausgeführt. Um den Einfluß der Anwesenheit des Kupfers auf die Ausbeute an Guanin bei der hydrolytischen Spaltung der Nucleinsäure genauer zu studieren, wurde in einem Versuche reines Guanin mit Schwefelsäure und Kupfersulfat in Anwesenheit von Zucker in derselben Weise erhitzt, wie die zur Gewinnung der Purinbasen angewandte Nucleinsäure.

Wie zu erwarten, war die Ausbeute an Guanin viel bedeutender bei Anwendung von freier Säure, und im dritten Experimente konnte nur eine ganz geringe Quantität von dem angewandten Guanin zurückgewonnen werden. Die Einzelheiten der Versuche folgen.

Experiment I. 95,0 g des Kupfersalzes wurden mit 500 ccm 10%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler im kochenden Wasserbade 8 Stunden erhitzt. Am Ende dieser Zeit bestand das Reaktionsprodukt aus einem braunen Niederschlage und einer braunen Lösung. Diese wurden durch Filtration getrennt, das Filtrat diente zur weiteren Analyse. Es wurde mit einer 10%igen Phosphorwolframsäure so lange behandelt, als sich noch ein Niederschlag bildete. Dieser wurde in üblicher Weise mit Barythydrat zersetzt und die alkalische Lösung mit Schwefelsäure so lange behandelt, bis die Lösung auf Lackmus sauer, auf Congo aber neutral reagierte. Das Filtrat von Baryumsulfat wurde bis zum ganz kleinen Volumen eingedampft und der Krystallisation überlassen. Nach längerem Stehen bei etwa  $+ 2^{\circ}$  C. bildete sich ein reichlicher krystallinischer Niederschlag. Dieser wurde in einem großen Überschusse von Wasser erhitzt. Ein kleiner Teil blieb unlöslich, und der größere schied sich nach Eindampfen der Lösung wieder in Krystallform aus. Die Mutterlauge von dem letzten Niederschlage wurde mit einem Überschusse von Ammoniak eingedampft, und der entstandene Niederschlag wieder in das Sulfat umgewandelt.

Das umkrystallisierte Sulfat wurde lufttrocken der Analyse unterworfen und erwies sich als Adeninsulfat. Der unlösliche Teil bestand aus Guanin.

Die Ausbeute an Adenin betrug 2,0 g, an Guanin 0,95 g. Die Analyse des Adeninsulfats ergab die folgenden Zahlen:

0,1581 g Substanz gaben bei Verbrennung 0,1748 g  $\text{CO}_2$  und 0,0605 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Für  $(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5)_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

Berechnet:	Gefunden:
C = 29,70%	30,15%
H = 3,96%	4,25%

Die Analyse des Guanins ergab die folgenden Zahlen:

0,1489 g der Substanz gaben 0,2132 g CO<sub>2</sub> und 0,0500 g H<sub>2</sub>O.

Für C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O

Berechnet:	Gefunden:
C = 39,73%	39,05%
H = 3,31%	3,72%

Die Mutterlauge wurde dann mit einer ammoniakalischen Lösung von Silberchlorid behandelt. — Der Niederschlag der Silberpurine wurde mit Salzsäure zersetzt und das Filtrat von Silberchlorid nach Zugabe eines Überschusses von Ammoniak auf dem Wasserbade eingedampft. — Es bildete sich ein amorpher Niederschlag, welcher durch Filtration entfernt wurde. Die zurückbleibende Lösung wurde erwärmt und mit einer wässrigen Pikrinsäurelösung behandelt, so lange sich ein Niederschlag bildete. — Die Mutterlauge wurde von Pikrinsäure in üblicher Weise befreit und wieder mit einer ammoniakalischen Lösung von Silberchlorid behandelt; es bildete sich dabei ein nur ganz unbedeutender Niederschlag, der nicht weiter untersucht wurde. Der braune Niederschlag, der vermutlich aus Guanin bestand, wurde in Salzsäure aufgelöst, mit Tierkohle gekocht, und wieder mit überschüssigem Ammoniak bis zu kleinem Volumen eingedampft; — beim Erkalten bildete sich ein Niederschlag, der zur Analyse verbraucht wurde.

0,1280 g im Xylolbad getrocknete Substanz gaben beim Verbrennen 45,8 ccm Stickstoff (über 50% KOH) bei T. = 24° C. und P. = 760 m. N = 28,44%.

Die Substanz war also kein Guanin.

Das unlösliche Pikrat, welches als Adenin erhalten wurde, lieferte beim Umkrystallisieren nur eine ganz unbedeutende Menge einer Substanz, welche die Beschaffenheit des Adeninpikrates besaß.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in üblicher Weise mit Barythydrat zersetzt, vom Überschusse des Baryts mittels Schwefelsäure befreit und zu kleinem Volumen eingedampft. Es schied sich dabei ein Niederschlag aus, der aus Schwefelsäure umkrystallisiert alle Eigenschaften des Thymins besaß. — Die Mutterlauge von Thymin wurde wieder mit Phosphorwolframsäure behandelt, es bildete sich aber kein Niederschlag.

Die Analyse des Thymins ergab die folgenden Zahlen:  
0,1623 g der Substanz gaben 0,2837 g CO<sub>2</sub> und 0,0711 H<sub>2</sub>O.

Für C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O

Berechnet:	Gefunden:
C = 47,62%	47,67%
H = 4,76%	4,87%

Experiment II. 50 g der kupferfreien Substanz (enthält 40 g der freien Säure) wurden auf demselben Wege wie in vorigem Experimente hydrolysiert.

Die Ausbeute an Guanin betrug 2,0 g, die an Adenin 1,4 g. Aus dem Filtrate vom Phosphorwolframsäureniederschlage ließ sich nur eine ganz unbedeutende Menge von Thymin gewinnen.

Es schien also aus diesen zwei Versuchen, daß beim Erhitzen mit verdünnten Säuren in Anwesenheit von Kupfer das sich bildende Guanin weitere Veränderung erleidet, vielleicht unter Bildung von sekundären komplizierten Substanzen durch synthetische Vereinigung mit anderen Bestandteilen der Nucleinsäure. Um den Vorgang genauer zu erforschen, wurde folgender Versuch angestellt.

Experiment III. 2,0 g Guanin und 20 g Gulose wurden mit 150 ccm 10%iger Schwefelsäure, in welcher 4,0 g Kupfersulfat aufgelöst waren, im Wasserbade mit Rückflußkühler erhitzt. Es bildete sich sofort ein kleiner heller flockiger Niederschlag. Am Ende des Tages wurde die Operation unterbrochen. Während der Nacht schied sich der größte Teil des Guanins in Form des Sulfates aus. Die blaue Flüssigkeit nahm allmählich eine braune Färbung an, an Stelle des amorphen flockigen Niederschlags schied sich eine braungefärbte krystallinische Masse aus, die aus langen prismatischen Nadeln bestand. Die Krystalle lösten sich nicht in heißem Wasser, in mäßig verdünnten Säuren, wohl aber in Alkalien und in konzentrierten Säuren. Die Krystalle enthielten Schwefelsäure und Kupfer, doch nach Zugabe von Ammoniak zu einer Suspension der Substanz in Wasser färbte sich dasselbe blau nur nach längerem Stehen.

Die Substanz hatte die folgende Zusammensetzung:

0,1952 g der Substanz gaben bei Verbrennung 0,1732 g CO<sub>2</sub> und 0,0486 g H<sub>2</sub>O; C = 19,01; H = 2,76.

0,4423 g der Substanz wurden für eine Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung gebraucht. Es verlangte zum Neutralisieren 78,7 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,00133),  $N = 26,1\%$ .

0,4515 g der Substanz, beim Schmelzen mit Natronhydrat (aus Natrium dargestellt), mit Salpeter über einer Gasolinflamme, gaben 0,2018 g  $BaSO_4$ ;  $H_2SO_4 = 18,79\%$ .

0,1364 g der Substanz gaben beim Schmelzen 0,040 g  $CuO$ ;  $Cu = 23,35\%$ .

Ein Teil der Substanz wurde in mäßig konzentrierter Salzsäure aufgelöst. Ein kleiner brauner Niederschlag blieb ungelöst. Aus der Lösung wurde auf übliche Weise mittels ammoniakalischen Silberchlorids Guanin gewonnen. Diese Substanz ist also auch kein Guaninkupferoxydul. Die genauere Natur der Substanz wird eingehend untersucht werden.

Die Mutterlauge von den Krystallen wurde auf ein Volumen von 225 ccm gebracht, und 12,5 ccm von diesen wurden für eine Bestimmung des freien Ammoniaks angewandt. 0,012 g Stickstoff oder 1,39% des gesamten Stickstoffs waren in dieser Form vorhanden. Die Hauptmenge des Filtrates wurde mit einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure behandelt. Der Niederschlag wurde auf übliche Weise auf Purin und Pyrimidinbasen untersucht. Es gelang, 0,150 g Guanin, aber keine merkliche Quantität von Pyrimidinbasen zu gewinnen. Ebensowenig war es möglich, Pyrimidinbasen aus dem Phosphorwolframsäurefiltrat zu gewinnen.

Es geht aus diesem Versuche hervor, daß bei der Spaltung des Kupfersalzes mittels verdünnter Schwefelsäure nur ein Teil des in der Nucleinsäure vorhandenen Guanins wieder aufgefunden wird, und daß das übliche Verfahren zur Darstellung der Purinbasen keine Auskunft über den wirklichen Gehalt an Guanin geben kann, wenn das Kupfersalz zur Analyse angewendet wird.

#### Pyrimidinbasen.

Obwohl die vorherige Erfahrung uns keinen Anlaß zur Vermutung gab, daß die Anwesenheit des Kupfers einen Einfluß auf die Bildung von Pyrimidinbasen besitzt, war es doch wünschenswert, die Resultate der Analyse des Kupfersalzes mit denen der freien Säure zu vergleichen.

Experiment I. 61 g der freien Säure und 500 ccm 25%iger Schwefelsäure wurden 5 Stunden im Autoklaven auf 160° C. erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde einige Tage stehen gelassen. Die Melaninbildung war sehr spärlich. Das Melanin und das Thymin wurden abfiltriert und das Filtrat nach dem Verfahren von einem von uns auf die Pyrimidinbasen weiter verarbeitet. Die Ausbeute an Thymin betrug 5,5 g; in der Cytosinfraktion wurden 10 g eines unlöslichen Pikrates erhalten. Beim Versuche, das Pikrat in Sulfat überzuführen, erhielt man eine Substanz, die das typische Aussehen des Cytosinsulfates nicht besaß. Die Ausbeute an dieser Substanz betrug 2,9 g. Bei der Analyse erwies sich, daß Adeninsulfat vorlag.

0,1631 g der Substanz gaben bei der Analyse 0,1812 g CO<sub>2</sub> und 0,0679 g H<sub>2</sub>O.

Für (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O

Berechnet:	Gefunden:
C = 29,70%	30,29%
H = 3,96%	4,16%

Die Mutterlauge von Adeninsulfat wurde mit ammoniakalischer Lösung von Silberchlorid behandelt. Es bildete sich ein ganz spärlicher Niederschlag von Adeninsilber. Das Filtrat von diesem wurde mit Salpetersäure angesäuert, von Silberchlorid abfiltriert und das Filtrat nach Kossel-Jones auf Pyrimidinbasen untersucht. Es gelang dabei, Cytosinsulfat darzustellen, welches in das Chloroplatinat übergeführt und als solches analysiert wurde.

0,1658 g der Substanz gaben 0,0506 g Pt.

Für 2 (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O)PtCl<sub>4</sub> · 2 HCl

Berechnet:	Gefunden:
Pt = 30,84%	30,52%

Experiment II. 85,0 g des Kupfersalzes wurden auf ähnliche Weise wie im vorigen Experimente behandelt. Es bildete sich dabei 5,0 g Thymin, 2,5 g Adeninsulfat und eine unbedeutende Menge von Cytosin.

Die Melaninbildung war in diesem Experimente viel bedeutender.

Die Filtrate der unlöslichen Pikrate wurden vereinigt, von

Pikrinsäure befreit, mit Barythydrat neutralisiert und auf ein ganz kleines Volumen eingedampft. Die Lösung wurde wieder mit Schwefelsäure angesäuert und mit einer 5%igen Phosphorwolframsäure behandelt. Ein Versuch erwies, daß der Niederschlag aus Purin und Pyrimidinbasen bestand. Die Trennung derselben wurde auf übliche Weise ausgeführt. Die Ausbeute an Purinbasen war sehr spärlich; in der Pyrimidinfraktion konnte Cytosinsulfat nachgewiesen werden.

Das Phosphorwolframsäurefiltrat wurde nach Kossel-Jones auf Pyrimidinbasen untersucht. In dieser Fraktion wurde bei der Analyse von Nucleinsäuren anderer Herkunft Uracil aufgefunden; in dem vorliegenden Versuche konnte aber nur etwa 1 g Thymin, aber gar kein Uracil erhalten werden.

#### Kohlehydrate.

In ihrem Gehalt an Kohlehydraten unterschied sich diese Substanz von anderen Nucleinsäuren nicht. Die freie Säure gab eine positive Orcinreaktion, und bei der Hydrolyse mit 30%iger Schwefelsäure bildete sich eine sehr beträchtliche Menge von Lävulinsäure. Diese wurde in Form ihres Silber-salzes isoliert und identifiziert.

0,2190 g der Substanz gaben 0,1056 g Ag.

Für  $C_5H_7O_3Ag$

Berechnet:  
Ag = 48,43%

Gefunden:  
48,22%

Die Resultate der vorliegenden Analyse unterscheiden sich von denen der anderen Nucleinsäuren wesentlich. Am meisten auffallend sind die Unterschiede im Gehalt an Pyrimidinbasen. Die Ausbeute an Cytosin war sehr spärlich und Uracil konnte überhaupt nicht nachgewiesen werden. Auch ist auffallend, daß beim Erhitzen auf 160° C. mit 30%iger Schwefelsäure noch eine sehr beträchtliche Menge von Adenin unangegriffen bleibt, was bei den anderen Säuren nicht der Fall ist. Nun ist es denkbar, daß das Intaktbleiben des Adenins durch Versuchsbedingungen verursacht war und nicht durch die abweichende Zusammensetzung dieser Säure. Doch wäre es eigen-tümlich, daß sie gerade bei diesen zwei Versuchen zum Vor-schein kamen, und daß sie niemals vorher bei der Analyse



anderer Nucleinsäuren animalischer Herkunft beobachtet worden. Sollte aber die kleinere Ausbeute an Cytosin wirklich mit dem Vorkommen von Adenin in Zusammenhang stehen, dann würde man zur Annahme gezwungen sein, daß das Cytosin nicht präformiert im Molekül vorhanden ist, sondern daß es ein sekundäres Zersetzungsprodukt ist. Weitere Untersuchungen sollen eine Aufklärung dieser Frage geben.

Es ist auch bemerkenswert, daß beim Erhitzen der Säure im Wasserbade mit einer 10%igen Schwefelsäure die Bildung von Thymin zum Vorschein kam. Auf Grund dieses Befundes darf man jedem Zweifel wegen der Zugehörigkeit des Thymins zu den primären Zersetzungsprodukten des Nucleinsäuremoleküls fallen lassen.

Die maximale Ausbeute an den einzelnen Spaltungsprodukten, auf 100 g der freien Säure berechnet, war die folgende:

	In Gramm	In Prozenten des Gesamtstickstoffs
Adenin	4,6	14,4
Guanin	5,0	14,4
Thymin	10,0	13,9
Cytosin	quantitativ nicht berechnet.	

Doch darf man auch diese Zahlen nur als annähernde annehmen. Es werden weitere Versuche gemacht, die sekundären Veränderungen der Basen zu verhindern.

An der Ausführung der Analysen hat auch Dr. W. A. Beatty teilgenommen, wofür wir ihm unseren besten Dank aussprechen.

Als diese Arbeit schon vollendet war, ist diejenige von Katsuji Inouye erschienen, in welcher eine quantitative Analyse der Spaltungsprodukte der Nucleinsäure aus den Spermatozoen des Hamo ausgeführt wurde. Die Resultate dieser Untersuchung weichen von den unsrigen ziemlich beträchtlich ab.

