

Weitere Beiträge zur Kenntnis der Diazoaminoverbindungen der Purinbasen.

Von
Richard Burian.

(Der Redaktion zugegangen am 28. März 1907.)

Diazobenzolsulfosäureadenin.

In meiner Arbeit über die Diazoaminoverbindungen der Purinbasen¹⁾ habe ich das Produkt beschrieben, das bei der Vereinigung von Adenin und Diazobenzolsulfosäure entsteht, zugleich aber darauf hingewiesen, daß man beim Versetzen alkalischer Adeninlösungen mit Diazobenzolsulfosäure häufig keine guten Resultate erhält. Das aus 0,75 g natürlichen Adenins gewonnene Material reichte nur zur Untersuchung der Eigenschaften, nicht zur Analyse der Verbindung aus;²⁾ ja, mit einem Präparate von synthetischem Adenin gelang es mir überhaupt nicht, Kuppelung zu erzielen.³⁾ Ich bin jetzt in der Lage, die Ursache dieser Mißerfolge anzugeben. Die Reaktion zwischen Adenin und Diazokörpern verläuft nämlich bei Gegenwart von überschüssigem Alkali mehr oder minder unvollständig und kann bei erheblicherem Alkaliüberschuß sogar vollkommen ausbleiben. Arbeitet man ohne Alkaliüberschuß, so erhält man sowohl aus natürlichem wie auch aus synthetischem Adenin stets eine ganz befriedigende Ausbeute von analysenreinem Kuppelungsprodukt; die Kuppelung scheint unter diesen Umständen fast quantitativ vor sich zu gehen. Auch die fertige Verbindung ist alkaliempfindlich: sie wird durch länger dauernde Berührung

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII. S. 696.

²⁾ l. c., S. 706.

³⁾ l. c., S. 707.

mit überschüssigem Alkali (auch Ammoniak) selbst in der Kälte unter Regeneration von freiem Adenin ganz oder teilweise zersetzt.

Ich teile im Nachfolgenden für die Darstellung des Diazobenzolsulfosäureadenins ein quantitatives Verfahren mit, das mit der größten Sicherheit zum Ziele führt und auch in den Händen des auf diesem Gebiete nicht Erfahrenen gute Resultate geben wird.

In einem Erlenmeyerkölbchen werden 5 g Adenin¹⁾ in 74 ccm n-Natronlauge gelöst und in einem dickwandigen, mit eingeriebenem Glasstopfen versehenen Gefäße 6,8 g Diazobenzolsulfosäure²⁾ in 50 ccm Wasser aufgeschwemmt. Die Mengenverhältnisse sind derartig gewählt, daß auf 1 Molekül Diazobenzolsulfosäure 1 Molekül Adenin und 2 Moleküle NaOH kommen. Beide Flüssigkeiten werden nun in einer (mit Natriumnitrat bereiteten) Kältemischung bis zur beginnenden Eisbildung abgekühlt. Sodann wird die alkalische Adeninlösung portionenweise in die Diazokörperaufschwemmung eingetragen: die letztere wird nach dem Eintragen jeder einzelnen Portion (je 14—15 ccm) in dem durch den Glasstopfen verschlossenen Gefäße einige Minuten lang kräftig durchgeschüttelt und hierauf wieder bis zur beginnenden Eisbildung in der Kältemischung abgekühlt (die ganze Prozedur nimmt etwa drei Viertelstunden in Anspruch). Die Flüssigkeit färbt sich hierbei anfangs bräunlich gelb, später beim weiteren Eintragen der Adeninlösung bräunlich rot, um schließlich, wenn das gesamte Adenin zugesetzt worden ist, eine intensiv rote Farbe aufzuweisen. Trotzdem ist die Kuppelung in diesem Zeitpunkte wegen des immer noch vorhandenen Alkaliüberschusses keine vollständige. Man fügt deshalb zu dem Kuppelungsgemisch unter fortdauernder

¹⁾ Ich verwendete für meine Versuche meist synthetisches Adenin, das ich der Freundlichkeit der Firma C. F. Boehringer u. Söhne verdanke. Ich ergreife gerne die Gelegenheit, dieser Firma auch öffentlich meinen Dank abzustatten.

²⁾ Man benütze rein weiße Diazobenzolsulfosäure, die mit kaltem Wasser (fast) schwefelsäurefrei gewaschen und sodann im evakuierten Exsikkator getrocknet worden ist.

Kühlung und kräftigem Umschütteln langsam 36,5 ccm n-Schwefelsäure hinzu, so daß für 1 Molekül Diazobenzolsulfosäure (resp. Adenin) wenig mehr als 1 Molekül NaOH übrig bleibt,¹⁾ und läßt die tiefrot gefärbte Flüssigkeit, die keine ungelöste Diazobenzolsulfosäure mehr enthalten soll, dann noch einige Zeit in der Kältemischung stehen, bis sie von Eiskristallen gänzlich durchsetzt ist. Die Kuppelung ist jetzt, wie aus der unten folgenden Ausbeuteangabe hervorgeht, ziemlich vollständig. Zur Abscheidung der entstandenen Verbindung gießt man die halbgefrorene Flüssigkeit in ca. 75 ccm gekühlter 20% iger Schwefelsäure; das Kuppelungsprodukt fällt hierbei in dichten, braungelben Flocken aus. Nunmehr wird das Gemisch zentrifugiert²⁾ und der abgesetzte Niederschlag abgesaugt.

Die Reinigung des Rohproduktes machte anfangs erhebliche Schwierigkeiten. Das früher von mir geübte Verfahren — Lösen in wenig Ammoniak und Wiederausfällen mit Essigsäure³⁾ —, das bei den Diazoaminoverbindungen der übrigen Purinbasen vortreffliche Resultate gibt,⁴⁾ liefert beim Diazobenzolsulfosäureadenin wegen der Alkaliempfindlichkeit der Verbindung stets Produkte, die mit freiem Adenin verunreinigt sind. Die einzige brauchbare Methode gründet sich auf eine bisher nicht beschriebene allgemeine Eigenschaft der Diazobenzolsulfosäurederivate der Purinbasen: nämlich auf die Eigenschaft, sich in konzentrierter Schwefelsäure unzersetzt zu lösen und beim Verdünnen der Lösung mit Wasser (unter Kühlung!) mehr oder weniger gut krystallisiert wieder auszufallen.

Ich habe diese Eigenschaft bei den Diazobenzolsulfosäureverbindungen des Xanthins, Theophyllins, Guanins, Hypoxanthins und Adenins ausnahmslos feststellen können. Die Verbindungen lösen sich in kon-

¹⁾ Von vornherein bloß 1 Molekül NaOH für 1 Molekül Diazobenzolsulfosäure (resp. Adenin) anzuwenden, ist deshalb unzweckmäßig, weil es dann nicht gelingt, sämtliche Diazobenzolsulfosäure in Lösung zu bringen.

²⁾ Ohne diese Maßnahme erfordert das Absaugen des Rohproduktes sehr viel Zeit.

³⁾ l. c., S. 706.

⁴⁾ Vgl. die Analysen l. c., S. 704 u. 705.

zentrierter Schwefelsäure mit tief kirschroter Farbe und scheiden sich beim Eingießen der Lösung in das vierfache Volumen bis zur Eisbildung abgekühlten Wassers wieder mit ihrer ursprünglichen Farbe (das Xanthin- und das Theophyllinderivat dotter- bis orange-gelb, das Hypoxanthin- und das Adeninderivat hellgelb, das Guaninderivat rot gefärbt) in Form eines schweren Pulvers ab. Die Niederschläge bestehen aus mikroskopischen Nadelchen und zeigen die unveränderten Reaktionen des betreffenden Ausgangsmaterials. Die Löslichkeit in der überschüssigen verdünnten Schwefelsäure ist am kleinsten für das Guaninderivat, am größten für die Kuppelungsprodukte des Theophyllins und des Adenins; bei den letzteren ist also das Umkrystallisieren aus konzentrierter Schwefelsäure mit fühlbaren Verlusten verbunden.

Man verfährt demgemäß zur Reinigung des nach der obigen Vorschrift erhaltenen Rohproduktes in folgender Weise. Die abgesaugte Substanz wird noch feucht in ein sehr stark abgekühltes Gemenge von 50 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 18 ccm Wasser¹⁾ gebracht und darin unter Verrühren mit dem Glasstabe zur völlig klaren Flüssigkeit gelöst. Dann gießt man die tiefrote, grünlich fluoreszierende Lösung in ca. 200 ccm bis zur Eisbildung abgekühlten Wassers: die Verbindung fällt hierbei mikrokristallinisch mit hellgelber Farbe aus und läßt sich jetzt ohne vorausgehendes Zentrifugieren leicht absaugen. Zum Schlusse wäscht man das Produkt mit 80%igem Alkohol, absolutem Alkohol und Äther.

Die Ausbeute an analysenreiner Substanz beträgt bei genauer Beobachtung aller angegebenen Vorsichtsmaßregeln ca. 50% der Theorie. Aus dieser Tatsache ergibt sich, da in den Mutterlaugen sowohl des Roh- als auch des Reinproduktes nicht unerhebliche Mengen der Verbindung zurückbleiben, mit Notwendigkeit der Schluß, daß die Reaktion zwischen dem Adenin und der Diazobenzolsulfosäure bei dem hier beschriebenen Verfahren ziemlich vollständig verlaufen muß.

Das Diazobenzolsulfosäureadenin bildet hellgelbe mikroskopische Nadeln, die sich bei 200°, ohne zu schmelzen, unter Aufschäumen und hellbrauner Verfärbung zersetzen. In Alkohol,

¹⁾ Diese Mengenangaben beziehen sich auf das aus 5 g Adenin gewonnene Rohproduktquantum. Der Zusatz von etwas Wasser zur konzentrierten Schwefelsäure (1 Molekül H₂O auf 1 Molekül H₂SO₄) befördert die Auflösung der Substanz.

Äther usw. ist es gar nicht, in kaltem Wasser nur wenig löslich. In siedendem Wasser löst es sich unter teilweiser Zersetzung (Stickstoffentwicklung¹⁾): es kann daher nicht aus Wasser umkrystallisiert werden. Sehr leicht, aber gleichfalls unter partieller Zersetzung löst sich die Verbindung in Alkalien, auch in gesättigtem Barytwasser,¹⁾ die Farbe der alkalischen Lösung ist rötlich gelb mit grünlichgelber Fluorescenz. Das Silbersalz des Diazobenzolsulfosäureadenins ist, gleich jenem des Adenins selbst, in Ammoniak unlöslich: versetzt man eine (in der Kälte rasch bereitete) ammoniakalische Lösung der Substanz mit ammoniakalischer Silberlösung, so gesteht das Gemisch sofort zu einer goldgelben durchscheinenden Gallerte, die sich allmählich zusammenzieht und eine farblose Flüssigkeit ausstößt. Ammoniakalische Bleisolution erzeugt in der ammoniakalischen Lösung des Diazobenzolsulfosäureadenins einen helldottergelben, flockigen Niederschlag.

Analyse. — Präparat I. 0.1410 g Substanz: 0.2132 g CO₂, 0.0409 g H₂O. — Präparat II. 0.1427 g Substanz: 38.3 ccm Stickstoff über 40%iger Kalilauge (t = 15.5°, b = 753.5 mm). — 0.1352 g Substanz: 0.1018 g BaSO₄.

Berechnet für C ₁₁ H ₉ N ₇ SO ₃ :	Gefunden:
C = 41.38%	41.23%
H = 2.82%	3.22%
N = 30.72%	31.24%
S = 10.03%	10.33%

In meiner älteren Arbeit (S. 706) habe ich das Diazobenzolsulfosäureadenin folgendermaßen beschrieben: «Braunrote mikroskopische Nadeln, die beim Erhitzen über 180° sich dunkler färben, aber bei 270° noch ungeschmolzen sind. . . . Silbersalz dunkel rotbraun, flockig, Bleisalz purpurfarbig.» Das (nicht analysierte!) Produkt, das mir damals vorlag, unterscheidet sich demnach von der reinen Verbindung in seiner eigenen Farbe, sowie in der Farbe seiner Silber- und Bleiverbindung. Offenbar war durch die mit dem Umfällen aus Ammoniak verbundene partielle Zerstörung eine Verunreinigung des Produktes bewirkt worden. Hierfür spricht nicht nur der niedrige Zersetzungspunkt des letzteren (180° statt 200°), sondern auch die folgende Beobachtung. Löst man reine Substanz in siedendem Wasser, wobei dieselbe, wie

¹⁾ Unterschied gegenüber dem freien Adenin, wie auch gegenüber den Diazobenzolsulfosäurederivaten aller übrigen Purinbasen, welche mit konzentriertem Barytwasser ausnahmslos Niederschläge geben (vgl. meine ältere Arbeit).

erwähnt, teilweise zerstört wird, und fügt man zu der Lösung hierauf Ammoniak und ammoniakalische Silber- resp. Bleisolution, so erhält man nicht gelbe, sondern meiner älteren Angabe entsprechend rotbräune bis rote Niederschläge.

Viel weniger als Natronlauge eignet sich Sodalösung zur Ausführung der Diazoreaktion mit dem Adenin. Diese Purinbase löst sich bekanntlich nicht in Natriumcarbonat: aus ihren sauren Lösungen wird sie durch letzteres zwar bei Zimmertemperatur nicht ausgefällt, aber beim Abkühlen der so gewonnenen sodaalkalischen Lösung scheidet sie sich fast quantitativ aus, so daß dann die Bedingungen für die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure, wie das folgende Beispiel lehrt, recht wenig günstig sind. Zu einer heiß bereiteten Lösung von 1 g Adenin in 7,5 ccm n-Schwefelsäure wurden 22,5 ccm n-Sodalösung hinzugefügt: nach Absättigung der Säure blieben somit 2 Äquivalente Na_2CO_3 pro Molekül Adenin übrig. Beim Abkühlen der Lösung in der Kältemischung fiel das Adenin sofort wieder nahezu vollständig aus. Es wurden ferner 1,36 g Diazobenzolsulfosäure in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt und sodann die beiden Flüssigkeiten auf die früher beschriebene Art vorsichtig miteinander vereinigt. Das abgeschiedene Adenin löste sich beim Eintragen in die Diazokörperaufschwemmung allmählich, jedoch nur sehr langsam auf. Selbst nach 1 $\frac{1}{2}$ stündigem Schütteln des (gut gekühlten) Gemisches war noch viel ungelöstes Adenin zugegen, während die Diazobenzolsulfosäure schon längst vollkommen in Lösung gegangen war; die Reaktionsflüssigkeit besaß zu dieser Zeit jenen bräunlichroten Farbenton, der bei Anwendung von natronalkalischer Adeninlösung bereits ziemlich bald nach Beginn der Operation aufzutreten pflegt. Jetzt wurden 7,5 ccm n-Schwefelsäure zu dem Gemisch zugesetzt, so daß bloß noch 1 Äquivalent Na_2CO_3 pro Molekül (gelösten + ungelösten) Adenins übrig blieb. Zehn Minuten später wurde die Flüssigkeit von dem Adeninbodensatz abgehoben und unter starker Kühlung in ca. 15 ccm 20%iger Schwefelsäure eingegossen: hierbei krystallisierte langsam ein bräunlichgelbes Produkt aus, das die Eigenschaften des Diazobenzolsulfosäureadenins zeigte — charakteristisches Verhalten zu konzentrierter Schwefelsäure und zu ammoniakalischer Silberlösung!

—, doch war die Menge desselben auffallend gering. Das Adenin vermag demnach, auch in Sodalösung suspendiert, mit Diazobenzolsulfosäure zu reagieren, nur ist unter diesen Umständen die Ausbeute eine höchst unbefriedigende.

Als ich zu dem Bodensatze von ungelöstem Adenin, der in dem soeben beschriebenen Versuche zurückgeblieben war, etwas in Wasser aufgeschwemmte Diazobenzolsulfosäure und ein wenig n-Natronlauge hinzufügte, trat sehr rasch unter völliger Lösung der suspendierten Partikel intensive Rotfärbung ein. Beim Eingießen der Flüssigkeit in überschüssige 20%ige Schwefelsäure fiel, trotzdem gar nicht quantitativ gearbeitet worden war, sofort eine ganz beträchtliche Menge von Diazobenzolsulfosäureadenin aus — ein Beweis, wie sehr die Natronlauge der Sodalösung im vorliegenden Falle überlegen ist.

Die Existenz des Diazobenzolsulfosäureadenins ist kürzlich von Steudel¹⁾ in Zweifel gezogen worden. Beim Zusatz von Diazobenzolsulfosäure zur sodaalkalischen Lösung von Adeninpräparaten, die durch wiederholtes Umkrystallisieren des Sulfates gereinigt worden waren, gelang es ihm nämlich nicht, Rotfärbung zu erhalten, während unreine Präparate einen positiven Ausfall der Reaktion zeigten. Steudel ist deshalb der Ansicht, die Reaktionsfähigkeit des Adenins sei mir seinerzeit durch eine Beimengung bloß vorgetäuscht worden. Nach den im Vorstehenden enthaltenen Mitteilungen bedarf diese Ansicht wohl keiner besonderen Diskussion. Steudel hat offenbar mit sehr verdünnten Adenininlösungen (geringe Sodalöslichkeit des Adenins, besonders in der Kälte!) und vermutlich auch mit einem erheblichen Alkaliüberschuß²⁾ gearbeitet: unter solchen Bedingungen aber ist das Adenin — im Gegensatze zum Guanin und Xanthin³⁾ und zu zahlreichen anderen Substanzen — nicht imstande, sich mit Diazobenzolsulfosäure zu verbinden.

Guanin und Xanthin vermögen selbst bei Gegenwart eines sehr beträchtlichen Alkaliüberschusses mit Diazobenzolsulfosäure unbehindert zu reagieren; auch die fertigen Kuppelungsprodukte sind hier nicht

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 429.

²⁾ Über die quantitativen Verhältnisse in seinen Versuchen macht Steudel keine Angaben.

³⁾ Steudel hebt hervor, daß die reaktionsfähige Verunreinigung der Adeninpräparate, bei denen er Kuppelung erhielt, Murexidreaktion gab!

merklich alkaliempfindlich. Etwas anders verhält es sich mit dem Hypoxanthin. Bei dieser Purinbase macht sich bereits ein hemmender Einfluß des Alkaliüberschusses auf das Zustandekommen der Diazoreaktion bemerkbar; doch läßt das einmal gebildete Diazobenzolsulfosäurehypoxanthin keine deutliche Alkaliempfindlichkeit erkennen.

Verhalten des Caffeins, Theobromins und Theophyllins zu Diazobenzolsulfosäure.

Fügt man zu alkalischen Lösungen von Caffein, Theobromin usw., kurz von Purinbasen, in denen der Imidwasserstoff bei 7 durch Methyl ersetzt ist, Diazobenzolsulfosäure hinzu, so tritt, wie ich in meiner älteren Arbeit mitgeteilt habe, keine Rotfärbung ein. Angesichts der beim Adenin gemachten neuen Erfahrungen drängte sich mir der Verdacht auf, diese negativen Resultate möchten vielleicht gleichfalls nur auf einer störenden Einwirkung des Alkaliüberschusses beruhen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Auch wenn man nach demselben quantitativen Verfahren arbeitet, das ich oben für das Adenin angegeben habe, d. h. zunächst 2 Moleküle NaOH auf 1 Molekül Purinbase resp. Diazobenzolsulfosäure anwendet und sodann 1 Molekül NaOH wieder mit Säure absättigt, reagieren Caffein und Theobromin nicht mit der Diazobenzolsulfosäure. Eine Rötlichgelbfärbung der Flüssigkeit pflegt sich zwar während der relativ langwierigen Prozedur (infolge Zersetzung eines kleinen Teiles des diazobenzolsulfosauren Natriums) einzustellen, aber eine echte Farbstoffbildung unterbleibt, und aus dem Gemisch kann unverändertes Caffein resp. Theobromin zurückgewonnen werden.

Daß im Gegensatze hierzu das Theophyllin die Fähigkeit besitzt, mit Diazobenzolsulfosäure zu reagieren, läßt sich ebensogut, wie mittels der in meiner früheren Arbeit (S. 704) beschriebenen Methode, auch mit Hilfe des neuen quantitativen Verfahrens nachweisen. 8 g käuflichen Theophyllinnatriums (Boehringer) werden in 40 ccm Wasser + 40 ccm n-Natronlauge¹⁾ gelöst und 7.2 g Diazobenzolsulfosäure in einem durch

¹⁾ Da das Molekül des Theophyllinnatriums bereits 1 Natriumatom enthält, so fügt man zu der wässrigen Lösung der Verbindung nur ein Molekül NaOH hinzu, das zum Schlusse wieder durch Säure abgesättigt wird.

Glasstopfen verschließbaren Gefäße in 40 ccm Wasser aufgeschwemmt. Die beiden Flüssigkeiten werden unter genauer Beobachtung der beim Adenin angegebenen Maßregeln mit einander vereinigt und zu dem tiefroten Gemisch unter kräftiger Kühlung 40 ccm n-Schwefelsäure hinzugesetzt. Beim Eingießen der Farbstofflösung in 50 ccm ca. 30%iger Schwefelsäure fällt das Kuppelungsprodukt krystallinisch aus; zur Reinigung wird dasselbe auf die oben beschriebene Weise in einem Gemenge von 33 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 12 ccm Wasser gelöst und durch Eintropfen der Lösung in 130 ccm Wasser wieder ausgefällt. Die auf solche Art gewonnene Substanz besitzt alle Eigenschaften, die in meiner älteren Mitteilung als charakteristisch für das Diazobenzolsulfosäuretheophyllin aufgeführt sind, nur zeigt ihre Farbe (wahrscheinlich wegen der sehr feinkrystallinischen Beschaffenheit des Produktes) einen etwas stärkeren Stich ins Rote. Ausbeute an reiner Substanz 6,4 g.

Analyse. — 0,2337 g Substanz: 46,0 ccm Stickstoff über 40%iger Kalilauge (b = 761,0 mm, t = 11½° C). — 0,2762 g Substanz: 0,1712 g BaSO₄.

Berechnet für C ₁₃ H ₁₂ N ₆ SO ₅ :	Gefunden:
N = 23,07%	23,57%
S = 8,79%	8,51%

Beiläufig sei bemerkt, daß sich der Stickstoff im Diazobenzolsulfosäuretheophyllin bei Zusatz von etwas Zucker¹⁾ auch mittels des Kjeldahl-Verfahrens bestimmen läßt. 0,1223 g nach der älteren Methode dargestellten Diazobenzolsulfosäuretheophyllins wurden unter Zugabe von 0,3 g reinsten Traubenzuckers im Siegfriedschen Aufschließungsapparate²⁾ mit konzentrierter H₂SO₄ verbrannt. Zur Neutralisation des gebildeten Ammoniaks verbraucht: 19,35 ccm n-H₂SO₄, entspr. 22,96% N (berechnet 23,07%).

Der größeren Einfachheit halber ist für die Darstellung des Diazobenzolsulfosäuretheophyllins die ältere Methode im allgemeinen dem neuen quantitativen Verfahren vorzuziehen; allerdings pflegt bei Anwendung des letzteren die Ausbeute eine merklich bessere zu sein.

Durch die hier besprochenen Resultate wird aufs neue bekräftigt, daß die Fähigkeit zur Diazoreaktion zwar dem 1,3-,

¹⁾ Vgl. v. Asbóth, Chem. Zentralbl., 1886, S. 161.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 1.

nicht aber dem 3,7-Dimethylxanthin und auch nicht dem 1,3,7-Trimethylxanthin zukommt. Die allein mögliche Deutung für dies Faktum habe ich schon in meiner früheren Arbeit (S. 698) ausgesprochen: daß es nämlich das N-Atom 7 des Purindoppelringes sein muß, an das sich der Diazokörperrest anlagert. Diese Annahme stimmt auch mit allen sonstigen Erfahrungen über das Verhalten der Purinsubstanzen und Imidazole gegen Diazoverbindungen aufs beste überein. Trotzdem ist sie von Steudel¹⁾ angefochten worden, und zwar unter Heranziehung der Beobachtung, daß das Thymin mit Diazobenzolsulfosäure farbstoffbildend reagiert, obgleich es, als 5-Methyluracil, gar kein N-Atom 7 besitzt: aus dieser Beobachtung soll hervorgehen, daß auch bei den Purinbasen die Diazoreaktion nicht mit dem N-Atom 7 in Zusammenhang stehen könne. Ich habe bereits in einer Erwiderung²⁾ nachgewiesen, daß eine derartige Schlußfolgerung nicht angängig ist. Da Steudel indessen meine Erwiderung neuerdings³⁾ als «theoretische Betrachtung» bezeichnet, die ich «angestellt habe, um meine Hypothese zu retten», so muß ich nochmals hervorheben, daß der Einwand von Steudel jeglicher Logik entbehrt. Nicht nur das Thymin, sondern die verschiedenartigsten Stoffe, bei denen «kein Stickstoff in der 7-Stellung vorhanden ist», zeigen ja bekanntlich die Eigenschaft, mit Diazoverbindungen zu reagieren. Was hat das aber mit der Diazoreaktion der Purinbasen zu tun?! Die Tatsache, daß hier eben bloß Substitution bei 7 den Eintritt der Reaktion verhindert, bildet meines Erachtens eine ganz eindeutige Antwort auf die Frage, an welche Stelle des Purinringes der Diazokörperrest herantritt..

Verhalten der Nucleinsäure zu Diazobenzolsulfosäure.

In meiner Untersuchung über die Bindung der Purinbasen im Nucleinsäuremolekül⁴⁾ habe ich aus dem Befunde, daß alkalische Nucleinsäurelösungen beim Zusatz von Diazobenzol-

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

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 297.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 428.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 708.

sulfosäure ungefärbt bleiben, den Schluß gezogen, daß das Guanin und das Adenin im Nucleinsäuremolekül in reaktionsunfähiger Form zugegen seien. Bezüglich des Guanins, das auch bei Gegenwart eines großen Alkaliüberschusses mit Diazokörpern zu reagieren vermag, ist dieser Schluß durchaus einwandfrei. Hingegen schien er mir für das Adenin nach meinen neueren Ergebnissen nicht mehr ohne weiteres zulässig, da hier das negative Resultat einfach durch den Alkaliüberschuß bedingt gewesen sein könnte. Ich habe deshalb die Nucleinsäureversuche unter Zuhilfenahme der eingangs beschriebenen quantitativen Methode wiederholt. Um letztere durchführen zu können, mußte ich statt der Nucleinsäure selbst deren neutrales Natriumsalz anwenden, das ich mir durch Lösen der Nucleinsäure in wenig mehr als der berechneten Menge n-Natronlauge¹⁾ und Ausfällen mit Alkohol (unter Zusatz von etwas Kochsalzlösung) herstellte.

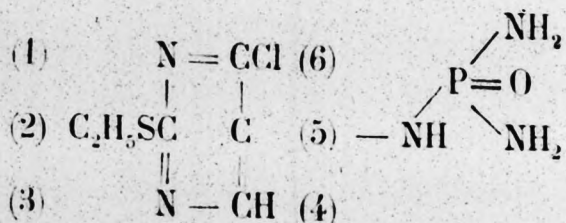
6 g clupeonucleinsauren Natriums — entsprechend 0,66 g Guanin + 0,6 Adenin — wurden in 18 ccm n-Natronlauge + 7 ccm Wasser gelöst, und 1,6 g Diazobenzolsulfosäure in 12 ccm Wasser aufgeschwemmt. Die Mischung der beiden Flüssigkeiten erfolgte unter den bekannten Kautelen; zum Schlusse wurden 9 ccm n-Schwefelsäure zugesetzt. Das Gemisch nahm während der Operation allmählich eine hellrötliche Farbe an, eine echte Farbstoffbildung trat jedoch nicht ein, und beim Eingießen der Lösung in 20 ccm 20%iger Schwefelsäure schied sich kein Niederschlag ab. Zur Kontrolle änderte ich in einem zweiten Versuche die Anordnung in der Weise ab, daß ich zu der Nucleinsäurelösung 1,2 g Adenin hinzufügte, im übrigen aber alle Verhältnisse unverändert ließ. Das Resultat war jetzt: intensive Farbstoffbildung und beim Ansäuern Abscheidung des wohlbekannten Produktes, das sich durch alle seine Eigenschaften als Diazobenzolsulfosäureadenin charakterisierte.

Die Nucleinsäure liefert also — trotz ihres Guanin- und Adeningehaltes und ohne an sich eine störende Einwirkung

¹⁾ 4 Moleküle NaOH pro Molekül Nucleinsäure.

auf die Diazoreaktion zu besitzen — auch bei Anwendung des quantitativen Verfahrens keine Verbindung mit der Diazobenzolsulfosäure. Mit anderen Worten, die im Verbands des Nucleinsäuremoleküls befindlichen Purinbasen vermögen ebensowenig, wie die bei 7 methylierten Purinbasen, mit Diazokörpern zu reagieren. Es ist hiernach sicher die weitaus plausibleste Annahme, daß das Guanin und das Adenin durch Vermittelung des N-Atomes 7 mit dem Reste der Nucleinsäure in Verbindung stehen.¹⁾ Da nun ferner, wie ich in meiner oben zitierten Arbeit S. 711/12 gezeigt habe, das Verhalten der Purinbasen bei der Hydrolyse der Nucleinsäure auf einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen den ersteren und dem Phosphor hindeutet, so darf es wohl als wahrscheinlich bezeichnet werden, daß im Nucleinsäuremolekül das N-Atom 7 des Guanins resp. des Adenins direkt mit Phosphor verknüpft ist.

Eine willkommene Stütze für diese Auffassung bilden Beobachtungen von Johnson,²⁾ die das Verhalten der Pyrimidin-derivate zu Phosphoroxychlorid betreffen. Während 2-Amino-6-oxypyrimidin, 2-Amino-4-oxy-6-methylpyrimidin und 2-Äthylmerkapto-4-oxy-6-aminopyrimidin durch POCl_3 einfach in die entsprechenden Chlorprodukte umgewandelt werden, in welchen der Sauerstoff durch Chlor ersetzt erscheint, vereinigt sich das dem letztgenannten Pyrimidinderivat isomere 2-Äthylmerkapto-6-oxy-5-aminopyrimidin mit POCl_3 zu einer stabilen Verbindung, die bei der Einwirkung von alkoholischem Ammoniak in

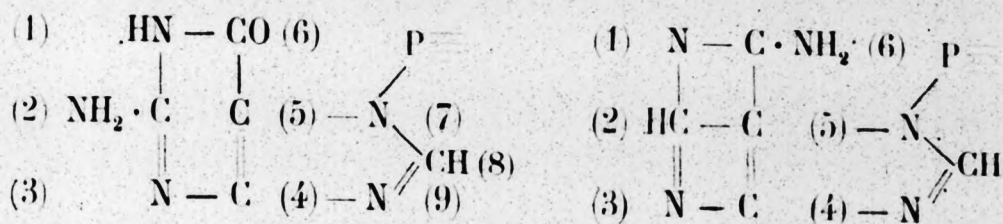


übergeht. Dieser Befund beweist, daß ein an das C-Atom 5

¹⁾ Die zweite in Betracht kommende Möglichkeit, daß nämlich die Purinbasen — speziell hinsichtlich ihres Imidazolringes — in der Nucleinsäure nicht ganz fertig vorgebildet enthalten seien, ist deshalb auszuschließen, weil sich dieselben schon durch ganz kurz dauerndes Kochen der Nucleinsäure mit Wasser größtenteils abspalten lassen.

²⁾ Americ. Chem. Journ., Bd. XXXIV, S. 191.

des Pyrimidinringes gebundenes N-Atom eine höchst auffällige, nur diese Stellung auszeichnende Affinität zu Phosphor besitzt. Johnson hebt nun — unter Bezugnahme auf meine Ansicht über den Bindungsmodus der Purinbasen der Nucleinsäure — hervor, «daß das Stickstoffatom des Aminopyrimidins, das eine solche Affinität zum Phosphor zeigt, dem Stickstoffatom 7 des Purinmoleküles entspricht». ¹⁾ In der Tat ist ja dies letztere N-Atom ebenfalls an das C-Atom 5 eines Pyrimidinringes gebunden: die Analogie zwischen der vorstehenden Strukturformel und den Formelbildern, durch welche ich die Bindung der Purinbasen in der Nucleinsäure veranschaulicht habe,



springt ohne weiteres in die Augen.

Aber selbst wenn man sich der durch diese Formelbilder ausgedrückten Auffassung nicht anschließen wollte, so wird man doch zugeben müssen, daß wenigstens die zwei von Steudel gegen sie vorgebrachten Einwände — Reaktionsunfähigkeit des Adenins und Reaktionsfähigkeit des Thymins gegenüber Diazokörpern. — durchaus hinfällig sind. Denn von diesen beiden Einwänden beruht der erste auf einer tatsächlichen Unrichtigkeit, der zweite aber hat mit unserer Frage überhaupt nichts zu tun.

¹⁾ l. c., S. 197.