

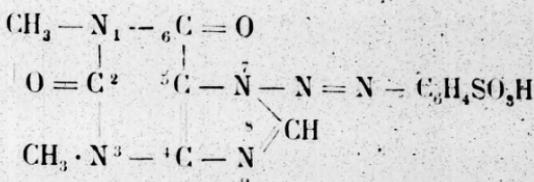
# Zur Frage der Bindung der Purinbasen im Nucleinsäuremolekül.

Von  
Hans Fischer.

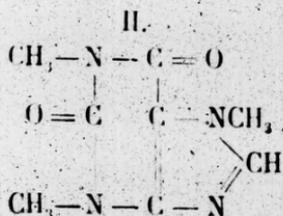
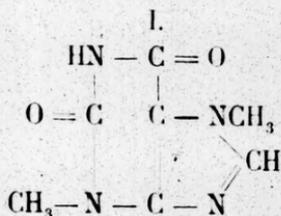
(Aus der II. medizinischen Klinik in München.)

Der Redaktion zugegangen am 9. April 1909.

In verschiedenen Arbeiten hat Burian<sup>1)</sup> gezeigt, daß Purinbasen und Imidazole, soweit deren Imidwasserstoffatom (bei 7) nicht substituiert ist, sich mit Diazobenzolsulfosäure zu gefärbten Verbindungen vereinigen, die er für Diazoaminoverbindungen hält, z. B. schreibt er der Theophyllinverbindung folgende Konstitution zu:



Dagegen fand er, daß die Diazoreaktion ausbleibt, wenn das Imidwasserstoffatom (an Stelle 7) substituiert ist z. B. bei Theobromin (I) und Coffein (II)

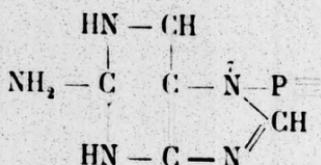


oder wenn der Imidazolring, wie in der Harnsäure, die Struktur eines cyklischen Harnstoffes besitzt.

Da die Nucleinsäuren selbst mit Diazobenzolsulfosäure keine Farbstoffe geben, so hat er aus den angeführten Tatsachen den Schluß gezogen, daß die Bindung der Purinbasen

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 686 u. 708.

im Nucleinsäuremolekül im Imidazolanteil bei 7 stattfindet nach dem Schema:



Von Steudel<sup>1)</sup> und Pauly<sup>2)</sup> wurden gegen diese Auffassung verschiedene Einwände erhoben, denn einerseits kuppelt Adenin, welches bei Stellung 7 eine unsubstituierte Imidgruppe hat, mit Diazobenzolsulfosäure unter den von Burian angegebenen Bedingungen (alkalische Reaktion) gar nicht, andererseits reagieren mit der letzteren Pyrimidinderivate wie z. B. Thymin. Burian suchte diese Einwände zu widerlegen, indem er erstens zeigte, daß Adenin bei Abänderung der zuerst von ihm angegebenen Bedingungen, nämlich bei neutraler Reaktion<sup>3)</sup> glatt mit Diazobenzolsulfosäure kuppelt, zweitens darauf aufmerksam machte, daß das Verhalten der Pyrimidinderivate mit dem der Purinbasen gar nichts zu tun habe.

Pauly<sup>4)</sup> zog bereits die Möglichkeit in Betracht, daß die Farbstoffe der Imidazole nicht Diazoaminoverbindungen, sondern Azofarbstoffe seien, indem er auf ihre Beständigkeit in saurer Lösung aufmerksam machte. Auch mir war dies aufgefallen, ebenso wie die lebhaftere Färbung der Farbstoffe und ihre relative Beständigkeit gegen verseifende Einflüsse im allgemeinen.

Dazu kommt noch das von Burian (l. c.) beschriebene Verhalten der Imidazoldicarbonsäuren, bei denen die Kuppelung unter Abspaltung von Kohlensäure erfolgt. Bei Bildung einer Diazoaminoverbindung wäre dieses Verhalten nicht zu erklären, sofort aber bei Entstehung eines Azofarbstoffes. Offenbar entsteht dieser, indem der Diazorest die Carboxylgruppe aus ihrer Stelle verdrängt.

Dies sind jedoch nur Wahrscheinlichkeitsgründe für das Vorliegen von Azofarbstoffen, die Natur der Farbstoffe konnte jedoch sehr leicht exakt festgestellt werden durch ihr Verhalten

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 428.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 512.

<sup>3)</sup> Zit. n. Burian, «Chemie der Spermatozoen», Ergebnisse der Physiologie.

<sup>4)</sup> l. c.



Nach kurzem Stehen wird der entstandene Farbstoff abgesaugt und mit Wasser gewaschen, ein kleiner Rest kann im Filtrat noch durch Ansäuern gewonnen werden. Der Farbstoff ist in Wasser sehr schwer löslich: durch Umkrystallisieren aus Alkohol oder Eisessig wird er in schönen roten Nadeln erhalten.

### Reduktion.

Der Farbstoff wird nun mit Natriumhydrosulfit in alkalischer Suspension reduziert und das Hydrosulfit solange zugegeben, bis Entfärbung eintritt. Nun wird heiß durch ein feuchtes Filter von dem ölig abgeschiedenen Dichloranilin abfiltriert: die letzten Reste können mit Wasserdämpfen abgetrieben werden. Beim Erkalten krystallisieren 5 g Aminotheophyllin heraus, das aus Wasser in sternförmig verwachsenen Platten oder auch in feinen Nadelchen erhalten werden kann. F. P. über 300°.

Der Körper stimmt mit dem im D. R. P. Nr. 156900 beschriebenen Aminotheophyllin (erhalten aus 8-Chlortheophyllin durch Erhitzen mit Ammoniak unter Druck) in allen angegebenen Eigenschaften überein.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl hatte folgendes Ergebnis:

Das Ammoniak aus 0,1155 g Substanz neutralisiert 29,40 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.

Für  $C_7H_9N_5O_2$  (M. G. 195,27) berechnet: N = 35,94%,  
gefunden: N = 35,74%.

Der Körper gibt mit Nitrit in saurer Lösung eine in gelben Nadeln krystallisierende Diazoverbindung von ziemlicher Beständigkeit, die sich mit R-Salz zu einem intensiv-violetten Farbstoff kuppelt. Verkocht man die Diazoverbindung mit Wasser, so entsteht ein schmutzig-violett gefärbter Farbstoff. Auch in saurer Lösung gehen beim Verkochen komplizierte Reaktionen vor sich; die entstehenden Körper sollen demnächst an anderer Stelle beschrieben werden. Mit Diazoverbindungen kuppelt das Aminotheophyllin nicht.

Durch die Bildung des Aminotheophyllins bei der Reduktion des Einwirkungsproduktes von Dichlordiazobenzol auf Theophyllin ist der sichere Beweis erbracht, daß in diesem Ein-

wirkungsprodukt ein Analogon der wahren Azofarbstoffe vorliegt. Es konnte jedoch noch immer mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß mit Diazobenzolsulfosäure, besonders unter den von Burian angegebenen Bedingungen, ein Diazoaminoprodukt entstände. Daß dies nicht zutrifft, konnte ich feststellen, indem auch der hierbei entstandene Farbstoff bei der Reduktion das Aminotheophyllin liefert: 1 g Theophyllin wird entsprechend der Burianschen Vorschrift in 20 ccm Wasser, das 3,6 ccm Normalnatronlauge enthält, aufgelöst und in die Lösung 1,5 g feste Diazobenzolsulfosäure eingerührt. Nach kurzer Zeit gibt man 20—25 ccm gesättigte Barytlösung zu, worauf das Baryumsalz des Farbstoffes in Nadeln ausfällt. Dieses läßt sich aus Wasser leicht umkrystallisieren, in dem es in der Kälte sehr schwer löslich ist. Das Baryumsalz wird nun durch Ammoniumcarbonat zerlegt, mit Natriumhydrosulfit in alkalischer Lösung reduziert. Man filtriert heiß, beim Erkalten krystallisiert das Aminotheophyllin aus (erhalten 0,4 g).

Ammoniak aus 0,100 g Substanz neutralisiert 25,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.

Berechnet: N = 35,94%; gefunden: N = 36,08%.

### Verhalten des Xanthins.

#### Darstellung des Xanthinfarbstoffes.

4 g Xanthin<sup>1)</sup> werden in 130 ccm 3%iger Natronlauge gelöst und unter Rühren p-Dichlordiazobenzolchlorid in salzsaurer Lösung einlaufen gelassen, bis eine Probe auf Filterpapier, mit R-Salzlösung versetzt, im Auslauf durch Farbstoffbildung einen Überschuß der Diazoverbindung anzeigt. Hierbei wird eine etwa 4 g Dichloranilin entsprechende Menge Diazoverbindung verbraucht.

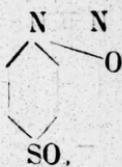
(Vorsicht ist am Platze; da durch Alkalien allein sehr leicht eine Umwandlung der Diazoverbindung stattfindet — vgl. Bucherer, Ber., Bd. XLII, S. 881 —, so fällt auch beim Eintragen von Dichlordiazobenzolchlorid in konzentrierte Natronlauge sofort ein braunschwarzer Körper aus.)

Es scheidet sich schnell ein braun-roter unlöslicher Farbstoff ab, der abgesaugt und erst mit verdünnter Natronlauge, dann mit Wasser gewaschen wird.

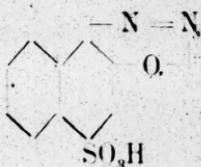
<sup>1)</sup> Erhalten aus Guanin nach E. Fischer A 215, 253.



Solche Anhydridbildungen sind bei gewissen Diazoverbindungen nicht selten, und derartige Körper pflegen sich durch eine gewisse Stabilität auszuzeichnen. So ist z. B. bereits die p-Diazobenzolsulfosäure, welche in freiem Zustande als



aufzufassen ist, ziemlich beständig, in erhöhtem Maße gilt dies noch von gewissen Naphthalinabkömmlingen. Die Diazoverbindung aus 1,2-Aminonaphthol-4-sulfosäure z. B. von der Formel



läßt sich glatt aus heißem Wasser umkrystallisieren. Die Verbindung kann bei höherer Temperatur getrocknet und sogar nitriert bzw. sulfiert werden.

Überführung der Diazoverbindung in Harnsäure. 0,089 g Diazoverbindung wurden mit 20%iger Salzsäure zur Trockene eingedampft und dieses Verfahren dreimal wiederholt. Mikroskopisch waren jetzt nur typische Harnsäurekrystalle zu erkennen. Das erhaltene Produkt wurde mit kaltem Wasser auf ein Filter gebracht, chlorfrei gewaschen und gewogen (erhalten 0,069 g). Da das Filtrat Spuren von Schwefelsäure enthielt, so wurden diese quantitativ bestimmt (gewonnen 0,002 g BaSO<sub>4</sub>). Die Schwefelsäure, herrührend von der vorausgegangenen Diazotierung mit Natriumnitrit und verdünnter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, scheint der Diazoverbindung in den letzten Spuren einigermaßen hartnäckig anzuhängen.

Die Harnsäure wurde weiterhin durch die stark positiv ausfallende Murexidprobe und die Schiff'sche-Probe identifiziert. Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl hatte folgendes Ergebnis:

Ammoniak aus 0,0484 g Substanz neutralisiert 11,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.

Für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> berechnet: N = 33,33%.

gefunden: N = 33,29%.

Damit ist zum ersten Male im Reagensröhre eine Überführung von Xanthin in Harnsäure durchgeführt.

## Verhalten des Guanins.

## Darstellung des Guaninfarbstoffes.

5 g Guanin werden in 3%iger Natronlauge gelöst und langsam unter Rühren Dichlordiazobenzolchlorid in der oben beschriebenen Weise zulaufen gelassen. Hierbei wird eine ca. 5 g Dichloranilin entsprechende Menge Diazoverbindung verbraucht. Der dunkelrot gefärbte Farbstoff scheidet sich bald aus, besonders beim Abstumpfen der alkalischen Reaktion. Bei noch alkalischer Reaktion wird der Farbstoff abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Er hat wenig Neigung zur Krystallisation.

Reduktion des Farbstoffes. Die Reduktion wird in der üblichen Weise mit Hydrosulfit und Natronlauge vorgenommen. Heiß wird filtriert, beim Abstumpfen der überschüssigen Natronlauge scheidet sich der neue Körper in gallertigen Massen aus, die man absaugt und mit Wasser wäscht. Aus 10%iger Schwefelsäure, in der der Körper erheblich schwerer wie Guanin löslich ist, krystallisiert das schwefelsaure Salz in langen Nadeln.

Die bei 40° C. zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz enthält 2 Moleküle Krystallwasser, das bei 120 bis 130° vollständig entweicht.

I.	0.7075 g verloren bei 130°	0.0540 g H <sub>2</sub> O
II.	0.3970 » » » 130°	0.0300 » »
III.	0.7847 » » » 130°	0.0598 » »

Analyse: Berechnet für  $(C_5H_7N_6O)_2 \cdot H_2SO_4 + 2H_2O$ :  
Prozente H<sub>2</sub>O: 7,68

Gefunden » » » 7,63, 7,55, 7,62.

- I. 0.1655 g bei 130° getrockneter Substanz gaben 0,0883 g BaSO<sub>4</sub>
- II. 0,6000 » » 130° » » » 0,3225 » »
- III. Ammoniak aus 0,1232 g trockener Substanz neutralisierten 34,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.
- IV. Ammoniak aus 0,2410 g trockener Substanz neutralisierten 66,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.

Analyse: Berechnet für  $(C_5H_7N_6O)_2 \cdot H_2SO_4$ :

Prozente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 22,67

N: 38,98

Gefunden » » » 22,41, 22,56.

Gefunden » 39,43, 38,89.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß hier 8-Aminoguanin-(2-8-Diamino-6-oxypurin) vorliegt. 2-6-Diamino-8-oxypurin ist be-

kannt,<sup>1)</sup> so daß jetzt nur noch das dritte Isomere 6-8-Diamino-2-oxypurin fehlt, das sicher auch über den Azofarbstoff aus 6-Amino-2-oxypurin<sup>2)</sup> erhalten werden kann.

Aminoguanin kuppelt nicht mit Diazobenzolsulfosäure. Die Schiffsche Probe ist hier bemerkenswerterweise stark positiv, während Aminotheophyllin erst nach einiger Zeit eine positive Reaktion gibt. Kupfer- und Wismutlösung werden alkalisch nicht reduziert. In der Kälte ist das Amin nicht oder jedenfalls nur sehr langsam und spurenweise diazotierbar, in der Wärme dagegen, etwa bei 40°, bildet sich die Diazoverbindung, die mit R-Salz zu einem violetten Farbstoff kuppelt.

Diese Eigenschaft ist den drei hier beschriebenen in 8 amidierten Purinen gemeinsam, während Guanin, das ja nur im Pyrimidinkern amidiert ist, keine kuppelbare Diazoverbindung liefert. Scheinbar kann man so entscheiden, ob eine Amidogruppe im Imidazol- oder im Pyrimidinanteil des Purinkerns sitzt.

Nachdem nun der Beweis erbracht ist, daß die Verbindungen der Purinbasen mit Diazokörpern Azofarbstoffe sind, ist nur noch das Verhalten des Coffeins und Theobromins, die beide nicht kuppeln, obwohl die CH-Gruppe bei Stellung 8, wo ja der Diazorest eingreift, frei ist, zu erklären. Es könnte hier ein Fall von sterischer Hinderung vorliegen. Eine Analogie dafür habe ich nicht gefunden. Tribromphenol, Mesidin und Mesitol kuppeln zwar nicht.<sup>3)</sup> Aber hier ist der Grund offenbar nur darin zu suchen, daß der Eingriff der Diazoverbindungen nie in die Metastellung zur Auxochromengruppe erfolgt.

Der Grund des Nichtreagierens des Theobromins und Coffeins dürfte vielmehr in der Substitution des Imidwasserstoffs (bei Stellung 7) liegen. Die Imidogruppe, die ja den Imidazolkern auch zur Salzbildung befähigt, ist es offenbar, die ihm, ähnlich wie dem Phenol die Oxygruppe, die Fähigkeit der Farbstoffbildung verleiht. Ist das Imidwasserstoffatom besetzt, so kann die Farbstoffbildung nicht mehr eintreten, geradeso wie Anisol, in dem auch das Wasserstoffatom der Oxygruppe des Phenols durch Methyl ersetzt ist, nicht mehr kuppelt.

Burian hat aus den eingangs zitierten Untersuchungen den Schluß gezogen, daß in den Nucleinsäuren die Purinbasen

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXX, S. 2217.

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXX, S. 2226.

<sup>3)</sup> Nölting u. Cohn, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVII, S. 358.

bei Stellung 7 gebunden seien. Er<sup>1)</sup> sagt: «Für die Auffassung der Bindung der Purinbasen im Nucleinsäuremolekül muß maßgebend bleiben, daß der Ersatz des Imidwasserstoffs bei 7 den Eintritt der Diazoreaktion verhindert, während Substitution im Pyrimidinanteil ohne Einfluß ist. Solange nicht der Beweis erbracht ist, daß ein Versagen der Diazoreaktion bei Purinbasen auch noch durch andere Substitutionen als solche bei 7 verursacht werden kann, so lange werden meine Deduktionen über die Bindung der Purinbasen im Nucleinsäuremolekül ihre Richtigkeit behalten.»

Dieser Beweis ist durch die vorliegende Untersuchung erbracht. Die bei 8 substituierten Purine reagieren ebenfalls nicht mit Diazokörpern. Damit verliert natürlich auch die oben zitierte Schlußfolgerung Burians ihre Grundlage. Die Bindung kann ebensogut bei 8 wie bei 7 statthaben. An einer dieser beiden Stellen müssen die Purinbasen im Nucleinsäuremolekül gebunden sein, da andernfalls die Nucleinsäuren mit Diazokörpern Farbstoffe liefern müßten.

Ich glaube durch vorliegende Arbeit folgendes festgestellt zu haben:

1. Die Verbindungen der Purinbasen (Theophyllin, Xanthin, Guanin)<sup>2)</sup> mit Diazokörpern sind keine Diazoaminoverbindungen, sondern Azofarbstoffe. Der Eintritt der Diazogruppe findet bei 8 statt.

2. Die bei 8 substituierten Purinbasen kuppeln nicht mit Diazokörpern.

3. Im Nucleinsäuremolekül sind die Purinbasen entweder bei Stellung 7 oder 8 gebunden.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 298.

<sup>2)</sup> Das Verhalten des Adenins und Hypoxanthins soll noch studiert werden.