

# Über die Zusammensetzung der Nucleinsäure aus Hefe.

Von

**Katharina Kowalevsky.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1910.)

Nach der Entdeckung des Nucleins resp. der echten Nucleinsäure in den Kernen der Leukoeyten durch Miescher<sup>1)</sup> hatte man sofort die neuen Untersuchungsmethoden auf die Hefe übertragen, deren hoher Phosphorgehalt schon seit langem bekannt war und die Gegenwart eines nucleinähnlichen Körpers vermuten ließ. Es wurde denn auch zuerst von Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> konstatiert, daß sich aus der Hefe ein phosphorhaltiger Körper isolieren ließ, der sich in sehr vielen Beziehungen wie das Nuclein aus Eiter verhielt. Kossel,<sup>3)</sup> der die Untersuchungen Hoppe-Seylers weiterführte, konnte die Nucleinsäure aus der Hefe in mehreren Arbeiten genauer charakterisieren und hat schon betont, daß die Hefenucleinsäure unter den verschiedenen Substanzen der Nucleinsäuregruppe eine besondere Stellung einnimmt, weil sich aus ihr mit Leichtigkeit ein reduzierendes Kohlenhydrat darstellen ließ, das aus den damals bekannten Nucleinsäuren tierischen Ursprungs nicht gewonnen werden konnte. Hierbei handelte es sich um eine Pentose und eine nur locker gebundene Hexose.

Nachdem nun durch die Untersuchungen Steudels<sup>4)</sup> Klarheit über den Aufbau der echten Nucleinsäure tierischen Ursprungs geschaffen worden war, lag es nahe, die neuen Methoden und Überlegungen auch auf die Nucleinsäure aus Hefe

<sup>1)</sup> Med. chem. Untersuchungen von Hoppe-Seyler, Heft 4, S. 452.

<sup>2)</sup> Med. chem. Untersuchungen von Hoppe-Seyler, Heft 4, S. 500.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 284; Bd. IV, S. 290. Archiv für [Anat. u.] Physiol., 1893, S. 157.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 406; Bd. LIII, S. 14.

anzuwenden und zu versuchen, ob man hier auch zu einem ähnlichen Bilde würde gelangen können, wie wir es uns jetzt von der echten Nucleinsäure machen können. Die sorgfältigen Bestimmungen der Elementarzusammensetzung allein, wie sie von Herlant<sup>1)</sup> und Boos<sup>2)</sup> unternommen wurden, haben uns in der Erkenntnis der Hefenucleinsäure nicht weiter geführt: sie haben, wie die gleichen Untersuchungen an der Thymus- resp. Lachsnucleinsäure von Schmiedeberg, nur allzu deutlich bewiesen, daß selbst mit der allergrößten Mühe eine Reindarstellung der Substanzen fast unmöglich ist. Eine präparative Darstellung von Nucleinsäure nach Herlant oder Boos für größere Spaltungsversuche ist natürlich ausgeschlossen. Daß man dagegen die Anschauungen Steudels mit Erfolg auf die Hefenucleinsäure übertragen kann, beweist eine Arbeit Levenes,<sup>3)</sup> auf die bei Besprechung der Resultate dieser Arbeit noch einmal zurückzukommen sein wird.

Die nächste Aufgabe bestand nun in der Beschaffung des nötigen Untersuchungsmaterials.

Da die Methoden von Herlant und Boos sich im großen Stil nicht anwenden ließen, so habe ich zunächst die Präparate, die man bei Anwendung der von Altmann<sup>4)</sup> und Neumann<sup>5)</sup> angegebenen Verfahren bekommt, auf ihren P- und N-Gehalt untersucht, um ein Urteil über die Reinheit der erhaltenen Substanzen zu haben. Gleichzeitig wurden kleine Modifikationen versucht, um die Arbeit bequemer und die Ausbeuten womöglich besser zu gestalten. Als Ausgangsmaterial diente mir entweder frische Hefe, die eiskalt aus einer hiesigen großen Brauerei bezogen wurde, oder frische Preßhefe, die mir in zuvorkommendster Weise vom Institut für Gärungsgewerbe<sup>6)</sup> zur Verfügung gestellt wurde.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. XLIV, S. 158.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. LV, S. 16.

<sup>3)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. XVII, S. 123.

<sup>4)</sup> Arch. f. [Anat. u.] Physiol., 1889, S. 526.

<sup>5)</sup> Arch. f. [Anat. u.] Physiol., 1898, S. 374, 1899, S. 552, Spplband.

<sup>6)</sup> Herrn Professor Dr. Schönfeld möchte ich auch an dieser Stelle einen besten Dank für die Überlassung der Hefe aussprechen.

### 1. Darstellung von Hefenucleinsäure nach Altmann.

I. 3000 ccm frischer Hefebrei wurde in der Kosselschen Zentrifuge ausgeschleudert, die Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand mit 9000 ccm Wasser angerührt, dann 300 g NaOH in 750 ccm Wasser hinzugesetzt und die Flüssigkeit jetzt in 2 Teile geteilt.

Die eine Hälfte (A) wurde 24 Stunden stehen gelassen, die andere (B) während 15 Minuten gut umgerührt, mit 200 ccm HCl (1,19 spez. Gew.) versetzt und soviel Essigsäure zugesetzt, bis die Reaktion stark sauer auf Lackmuspapier war, gut gemischt und 24 Stunden stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag abzentrifugiert und die vereinten Lösungen wurden mit HCl, bis ein nicht verschwindender Niederschlag entstand, versetzt und noch auf 5800 ccm Flüssigkeit 40 ccm Salzsäure (1,19) zugesetzt, so daß der Gehalt der Salzsäure gleich 2,5 auf 1000 wurde. Die saure Flüssigkeit wird jetzt mit dem gleichen Volumen 96°igen Alkohols + 2,5‰ Salzsäure ausgefällt (6000 ccm Wasser + 40 ccm Salzsäure) und bis zum folgenden Tage stehen gelassen.

Der Niederschlag, in Wasser unter Zusatz von NaOH gelöst, wird vom Ungelösten abzentrifugiert, mit Essigsäure angesäuert, wieder vom Niederschlag abzentrifugiert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen salzsäurehaltigen Alkohols (3 : 1000) gefällt, im ganzen 1000 ccm Flüssigkeit.

Am folgenden Tage wird die Flüssigkeit vom Niederschlag abgegossen, der Niederschlag durch Dekantieren zuerst mit 50°igem Alkohol + (3 : 1000) Salzsäure, dann mit 96°igem Alkohol gewaschen, abgesaugt, mit 99°igem Alkohol getrocknet, wieder abgesaugt, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Ausbeute 28,8 g.

Für die Stickstoffbestimmung wurde die Substanz bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,2491 g sättigen, nach Kjeldahl verascht, 21,5 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
= 12,12 % N.

0,2200 g sättigen, nach Kjeldahl verascht, 19,2 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
= 12,21 % N.

Mittel: 12,17 % N.

Für die Phosphorbestimmungen wurde die bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz mit Soda und Salpeter verbrannt, mit Ammoniummolybdat gefällt, der Niederschlag in  $\text{NH}_3$ -haltigem Wasser gelöst, mit Mg-Mischung gefällt und als  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  gewogen.

0,2369 g Substanz geben 0,0955 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 11,21% P.

0,2183 „ „ „ 0,0865 „ „ = 11,07% „

Mittel: 11,14% P.

Die erhaltene Nucleinsäure enthält also 12,17% Stickstoff und 11,14% Phosphor. Die Nucleinsäure wurde mit Fehlingscher Lösung gekocht, keine Reduktion. Eine kleine Menge der Nucleinsäure wird mit 5%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und während einer halben Stunde im Wasserbade erhitzt: die neutralisierte Lösung wird mit Fehlingscher Lösung gekocht: es entsteht eine weiße Fällung der Kupferoxydulverbindungen von den Purinkörpern und allmählich eine rötliche Fällung von  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Die erste Hälfte (A) der Flüssigkeit dieses Versuchs, die erst nach 24stündigem Stehen in alkalischer Lösung in Arbeit genommen wurde, wird ebenso behandelt wie die vorige. Ausbeute 14 g. Die Substanz enthält aber nur 3,13% N und 8,79% P.

0,5216 g verbrauchen 11,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 3,00% N (Kjeldahl).

0,3084 „ „ 7,0 „ „ = 3,17% „ „

0,3650 „ „ 8,4 „ „ = 3,15% „ „

0,4037 „ „ 9,1 „ „ = 3,22% „ „

Mittel: 3,13% N.

0,2520 g Substanz geben nach der Veraschung mit Soda und Salpeter 0,0792 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 8,74% P.

0,2312 g Substanz geben 0,0735 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 8,85% P.

Mittel: 8,79% P.

II. 1023 g frische Preßhefe werden mit 8000 ccm Wasser gut vermischt, 201 g NaOH in 500 ccm Wasser zugesetzt und 5 Minuten mit einem Glasstab gerührt. Dann wird die Flüssigkeit in 2 Teile geteilt und die eine Hälfte wie oben bei dem frischen Hefebrei sofort nach Altmann weiterverarbeitet. Ausbeute aus 512 g Preßhefe 9,2 g. Für N-Bestimmungen wird die Substanz bis zu konstantem Gewicht getrocknet.

0,2300 g Substanz verbrauchen 20,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 12,50% N (Kjeldahl)

0,2525 " " " 22,5 " " " = 12,50% " " "

P-Bestimmungen:

0,1653 g Substanz geben 0,0543 g  $Mg_2P_2O_7$  = 9,16% P.

0,2200 " " " 0,0727 " " " = 9,20% " "

Mittel: 9,18%.

Die erhaltene Substanz enthält 12,50% N und 9,18% P, sie reduziert Fehlingsche Lösung nur nach dem Erwärmen mit 5%iger  $H_2SO_4$ .

Die andere Hälfte wurde vor dem Zusatz des salzsauren 96%igen Alkohols mit Soda genau neutralisiert und bis auf 500 ccm eingedampft, die eingedampfte stark braun gefärbte Flüssigkeit wurde mit Salzsäure bis zum Entstehen einer starken Trübung versetzt und mit dem gleichen Volumen 96%igen Alkohols + 3% HCl gefällt. Am folgenden Tage wurde die Flüssigkeit von dem Niederschlag abgossen, der Niederschlag mit 96%igem Alkohol durch Dekantieren gewaschen, abgesaugt, mit 99%igem Alkohol getrocknet, abgesaugt, mit Äther gewaschen, gewogen. Ausbeute 6 g.

Die Substanz enthält 12,83% Stickstoff und 9,44% Phosphor.

N-Bestimmungen:

0,2750 g Substanz verbrauchen 25,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 12,82% N.

0,2200 " " " 20,2 " " " = 12,85% " "

Mittel: 12,83% N.

P-Bestimmung:

0,2298 g Substanz geben 0,0779 g  $Mg_2P_2O_7$  = 9,44% P.

Die erhaltene Nucleinsäure reduzierte Fehlingsche Lösung erst nach dem Kochen mit 5%iger  $H_2SO_4$ .

III. 2285 g frische Preßhefe + 8000 ccm Wasser und 610 ccm 33%iger NaOH während 5 Minuten gut gemischt und genau nach Altmann verarbeitet, Ausbeute 31 g.

Die Substanz enthält 11,59% N und 10,33% P.

0,1385 g verbrauchen 11,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 11,62% N.

0,2130 " " " 17,6 " " " = 11,56% " "

Mittel: 11,59%.

P-Bestimmungen:

0,2420 g Substanz geben 0,0890 g  $Mg_2P_2O_7$  = 10,23% P.

0,2158 " " " 0,0810 " " " = 10,44% " "

Mittel: 10,33%.

Die Substanz reduziert ebenfalls Fehlingsche Lösung nur nach dem Kochen mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

## 2. Darstellung von Hefenucleinsäure nach Neumann.

1000 g derselben Preßhefe + 4000 ccm Wasser + 200 ccm 33%ige NaOH + 400 g Natriumacetat gut gemischt werden in einem Kolben in kochendem Wasserbade während 30 Minuten erhitzt, der größte Teil wird dabei mit dunkelbrauner Farbe gelöst. Nach der Neutralisation durch Zusatz von 150 ccm 50%iger Essigsäure wird die Flüssigkeit auf 1000 ccm eingedampft, der Niederschlag abzentrifugiert und zu der klaren Flüssigkeit ein gleiches Volumen Alkohol (96%ig) zugesetzt. Nach dem Absitzen des Niederschlags wird die Flüssigkeit abgossen: es bleibt eine zähe Masse, die bei weiterem Auswaschen und Zerreiben mit 96%igem Alkohol pulverig wird und sich absaugen läßt. Der so erhaltene Niederschlag wurde in 200 ccm Wasser gelöst und auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis sich am Boden des Glases ein Niederschlag absetzt. Das Filtrat von diesem Niederschlag wurde wieder mit Alkohol gefällt, der erhaltene Niederschlag mit 96%igem Alkohol gewaschen, mit 99%igem Alkohol getrocknet, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 17 g.

Die Substanz enthält 8,64% Stickstoff und 2,70% P.

Die in Wasser gelöste Substanz gibt nach Zusatz von Fehlingscher Lösung eine voluminöse Fällung.

Diese Fällung enthält wahrscheinlich das von Salkowski<sup>1)</sup> beschriebene Hefegummi.

Sie gab nach der Veraschung nur einen geringen Niederschlag mit molybdänsaurem Ammoniak und reduzierte nach der Hydrolyse mit 5%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  stark Fehlingsche Lösung.

Sämtliche Substanzen geben beim Auflösen in Natronlauge nach Zusatz von  $\text{CuSO}_4$  keine Biuretreaktion.

Stellt man die erhaltenen Resultate zusammen, so ergibt sich folgende Übersicht:

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 497 u. 925. — Oshima, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 42. — Meigen u. Spreng, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 50.

Ausgangsmaterial	Ange- wandte Menge	Ausbeute	N- Gehalt %	P- Gehalt %
Frischer Hefebrei	1500 ccm	28,8 g = 19,2 %	12,17	11,14
FrISChe Preßhefe	nach 2285 g	31,0 > = 13,6 %	11,59	10,33
„ „	Alt- 512 >	9,2 > = 17,9 %	12,50	9,18
„ „	mann 512 >	6,0 > = 11,7 %	12,38	9,44
eingeeengt .		Mittel . . .	12,32	10,02
Frischer Hefebrei 24 Std. mit NaOH behandelt, dann nach Altmann verarbeitet	1500 ccm	14 g	3,13	8,79
FrISChe Preßhefe nach Neu- mann	1000 g	17 >	8,64	2,70

Aus dieser Übersicht geht mit Klarheit hervor, daß sich die Neumannsche Methode zur Darstellung einer reinen Nucleinsäure aus der Hefe nicht eignet, so zweckmäßig sie auch für die Darstellung der Nucleinsäure aus der Thymusdrüse ist. Hier wird das Hefegummi immer mitgefällt werden, das dieselben Löslichkeitsverhältnisse besitzt. Aber auch nach der Methode von Altmann bekommt man, wenn man die Hefe zu lange der Einwirkung des Alkalis überläßt, keine reinen Nucleinsäurepräparate, wie sich besonders in dem niedrigen Stickstoffwert von 3,13 % zu erkennen gibt. Dagegen zeigen die übrigen Zahlen eine annähernde Übereinstimmung, aber selbst das Eindampfen der großen Flüssigkeitsmengen, das eine Ersparnis an Alkohol bringen sollte, hat keinen Einfluß auf die Erhöhung der Ausbeute.

Nach diesen Befunden ist es also das zweckmäßigste, an der alten, von Altmann angegebenen Darstellungsmethode festzuhalten.

Vergleicht man nun die hier von mir gefundenen Analysenzahlen, die unter sich ja eine ziemlich befriedigende Übereinstimmung zeigen, so könnte man meinen, daß sie der wahre Ausdruck für die Zusammensetzung der Hefenucleinsäure seien, besonders wenn man sich die von Altmann<sup>1)</sup> und auch von

<sup>1)</sup> Arch. f. [Anat. u.] Physiol., 1889, S. 526.

anderen geäußerte Anschauung zu eigen macht, daß gerade die Präparate mit den höchsten Phosphorwerten am wenigsten zersetzt seien. Wir werden aber später bei Besprechung der Spaltungsversuche sehen, daß der hohe Phosphor- und relativ niedrige Stickstoffgehalt dieser Präparate wahrscheinlich auf eine durch die Salzsäurewirkung verursachte Abspaltung von stickstoffhaltigen Körpern aus dem Molekül der Nucleinsäure zurückzuführen ist. Meine Zahlen stimmen übrigens annähernd mit den von anderen Untersuchern der Hefenucleinsäure gefundenen P- und N-Werten überein.

	Herlant <sup>1)</sup>		Boos <sup>2)</sup>	Levene		Mittel meiner Analysen
	a)	b)		a) <sup>3)</sup>	b) <sup>4)</sup>	
P ‰	8,73	9,66	10,31	8,6	8,93	10,02
N ‰	13,80	15,27	16,84	15,21	17,89	12,32

(Berechnet auf Cu-freie Substanz.)

Eine Darstellung von Hefenucleinsäure im Großen aber nach der Methode von Altmann war im Laboratorium mit großen Schwierigkeiten verbunden, ganz abgesehen davon, daß die zum Schluß erhaltenen Präparate wahrscheinlich noch mehr durch die Reagenzien alteriert worden wären wie die Präparate, die ich bei der Verarbeitung relativ kleiner Mengen erhalten hatte. Eine Inangriffnahme quantitativer Spaltungsversuche wurde daher bedeutend dadurch erleichtert, daß mir die Firma C. F. Boehringer und Söhne in Mannheim-Waldhof<sup>5)</sup> ein großes Quantum Hefenucleinsäure zur Verfügung stellte. Die Substanz war aus gewaschener und entfetteter Bierhefe im wesentlichen nach der Methode von Altmann hergestellt und stellte ein feines weißes staubendes Pulver dar, das sich vollkommen farblos in Wasser auflöst. Es gab die Biuretreaktion nur spurenhaf.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. XLIV, S. 158.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. LV, S. 16.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. XVII, S. 123.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 548.

<sup>5)</sup> Der chemischen Fabrik C. F. Boehringer u. Söhne in Mannheim spreche ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank für ihr freundliches Entgegenkommen aus.

Bei der Analyse des bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Präparates wurde ein Gehalt von 16,16% N und 8,65% P gefunden, also weniger P und mehr N, wie in den von mir dargestellten Präparaten. Wir werden aber, wie schon oben erwähnt ist, später sehen, daß diesen letzten Zahlen jedenfalls der Vorzug zu geben ist.

### Spaltungsversuche mit Hefenucleinsäure.

Es wurde nun zunächst die nach Altmann von mir dargestellte Nucleinsäure aus den verschiedenen Versuchen vereint, sodaß ein Präparat erhalten wurde, das 12,27% N und 10,02% P enthielt.

1. Hiervon wurden 10 g mit Salpetersäure (10 ccm  $\text{HNO}_3$  spez. Gew. 1,4 + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ ) übergossen und fortgestellt: da die Nucleinsäure mit dieser Menge Salpetersäure einen dicken Sirup bildete, der auch nach mehrtägigem Stehen nichts Krystallinisches absetzte, wurden nach einiger Zeit noch 5 ccm  $\text{HNO}_3$  spezifisches Gewicht 1,4 + 5 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  hinzugesetzt. Dann fing in der klaren, hellgelben, viskösen Flüssigkeit allmählich eine Krystallisation an; nach 39 Tagen wurden die Krystalle abgetrennt. Die Flüssigkeit war noch immer sehr zähe, sodaß die Filtration nur äußerst langsam vor sich ging.

Der Niederschlag wurde mit 10% iger  $\text{HNO}_3$ , Alkohol und Äther gewaschen und gewogen, 1,5980 g. Die Lösung des Niederschlages in Wasser färbte sich beim Zusatz von  $\text{NH}_3$  orange-gelb und der ausgeschiedene Niederschlag von Guanin war auch gelb gefärbt.

Erhalten Guanin 0,3440 g mit 45,99% N. Berechnet: 46,36% N.

Das ammoniakalische Filtrat vom Guanin wurde auf Adenin verarbeitet und erhalten Adeninpikrat 1,3620 g vom Schmelzpunkt 278—280° unkor.

Das Filtrat von Adeninpikrat wurde von Pikrinsäure befreit und auf Xanthin- und Hypoxanthin verarbeitet.

Das Filtrat von den auskrystallisierten Nitraten wurde mit 400—500 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und bei 40—50° zur Entfernung des größten Teils der Salpetersäure bis auf 50 ccm eingedampft, mit  $\text{NH}_3$  versetzt — starke orange Färbung und ein

weißer Niederschlag, der bei der weiteren Untersuchung, als Calciumphosphat erkannt wurde. Der Niederschlag wog lufttrocken 0,598 g und enthielt 13,73% Ca. 0,078 g gaben 0,015 g CaO. Das Filtrat hiervon zusammen mit dem Filtrate von Adeninpikrat wurde mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt, der Niederschlag gewaschen, mit HCl zersetzt und die Chloride auf Xanthin und Hypoxanthin verarbeitet und erhalten: Xanthin 0,1730 g mit 36,98% N. Verlangt: 36,85% N. Hypoxanthinchlorid 0,2460 g mit 29,39% N. Verlangt: 29,38% N. Aus dem Filtrate von Hypoxanthinchlorid konnten noch 0,1530 g Hypoxanthinpikrat isoliert werden.

Es wurde gefunden: Guanin und Adeninnitrate 1,5980 g in 9,402, mithin in 10 g = 1,7000 g.

In 9,402 g der Nucleinsäure wurden gefunden:

Guanin aus Nitrat	0,3440 g
Guanin als Xanthin	0,1719 »
	0,5159 g.

Im ganzen wurden also in diesem Versuch wiedergefunden:

Guanin aus Nitrat	0,3440 g
+ Guanin als Xanthin	0,1719 »
	0,5159 g.
Adenin aus Pikrat	0,5051 »
als Hypoxanthin	0,2312 »
	0,7363 g.

Also 5,16% Guanin.

7,36% Adenin.

Analysentabelle der HNO<sub>3</sub>-Spaltung.

Angewandte Menge Substanz in g	Ver- brauchte n/10-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ccm	Ge- fundene N-Menge	% N gefunden	Mittel aus 2 Bestim- mungen	% N berech- net	
Guanin	0,0750	24,7	0,03458	46,10	45,99	46,36
»	0,0720	23,6	0,03304	45,88		
Xanthin	0,0590	15,7	0,02178	36,91	36,98	36,85
»	0,0460	12,2	0,01708	37,06		
Hypoxanthin- chlorid	0,095	20,0	0,0280	29,47	29,39	29,38
	0,064	13,4	0,01876	29,31		

2. 32,91 g Nucleinsäure nach Altmann wurde mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (105 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 210 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ ) hydrolysiert, die nach der Hydrolyse erhaltene Flüssigkeit von der ausgeschiedenen Kohle<sup>1)</sup> abgesaugt, die Kohle mehrmals mit Wasser ausgekocht, die erhaltenen Filtrate bis auf 500 ccm konzentriert und N-Bestimmungen nach Kjeldahl gemacht.

5 ccm der Flüssigkeit verbrauchten 25,1 ccm  $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$  = 0,03514 g N.  
 5 „ „ „ „ 25,0 „ „ = 0,0350 „  
 Mittel aus 2 Bestimmungen 0,03507; in 500 ccm wurden also 3,507 g N gefunden.

Setzt man den Stickstoff der angewandten Menge Substanz 4,180 g N in 32,91 g Nucleinsäure gleich 100, so ergibt sich ein Verlust an Huminstickstoff von 0,673 g oder 16,10% vom Gesamtstickstoff.

In 20 ccm wurde sodann der Ammoniakstickstoff durch Destillation der neutralen Flüssigkeit mit  $\text{BaCO}_3$  im Wasserdampfstrom bestimmt:

20 ccm der Flüssigkeit verbrauchten 14,5 ccm  $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$  = 0,0203 g N.  
 20 „ „ „ „ 14,5 „ „ = 0,0203 „  
 in 500 ccm = 0,5075 g = 12,14% des Gesamtstickstoffs.

Die von Schwefel- und Phosphorsäure befreite Flüssigkeit wurde auf 1000 ccm gebracht und mit Schwefelsäure schwach angesäuert. Beim Stehen über Nacht schied sich ein krystallinischer Niederschlag aus, der abfiltriert wurde, in  $\text{NaOH}$  gelöst und mit Essigsäure wieder ausgefällt wurde. Der nunmehrige Niederschlag wurde in Wasser unter Zusatz von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst, mit Tierkohle gekocht und bis auf ein kleines Volumen eingedampft. Es wurde 0,7300 g Guaninsulfat gewonnen, mit 31,95% und 8%  $\text{H}_2\text{O}$ . Berechnet 32,06% N und 8,24%  $\text{H}_2\text{O}$ .

Aus dem Filtrate vom zuerst ausgefallenen Guaninsulfat wurden die Alloxurbasen bei schwach schwefelsaurer Reaktion mit Silbernitrat gefällt und bei weiterer Verarbeitung der Alloxurbasenfraktion wurden noch 0,1500 g Guaninsulfat erhalten. Adenin wurde als Pikrat gefällt und 1,1780 g erhalten (Sp. 279<sup>o</sup>)

<sup>1)</sup> Bei der Hydrolyse der Hefenucleinsäure scheiden sich große Mengen Kohle ab: schon hierdurch unterscheidet sie sich augenfällig von der Nucleinsäure aus Thymus resp. aus Sperma. Bei diesen kommt es unter den gleichen Bedingungen nur zu einer minimalen Kohleauscheidung.

unkorr.). Das gewonnene Xanthin war etwas dunkel gefärbt und hatte 33,21% N.

Die Fraktion, in der Hypoxanthinchlorid zu erwarten war, 0,25 war ganz braun, enthielt Asche und nur 19,34% N und wird deswegen bei der Berechnung nicht mitberechnet. Cytosin und Uracil wurden aus dem Filtrate von den Alloxurbasen mit  $\text{AgNO}_3$  und  $\text{Ba(OH)}_2$  gefällt. Die Ag-Verbindung wurde wie gewöhnlich verarbeitet und das Cytosin wurde vom Uracil mit Phosphorwolframsäure getrennt. Es wurde Cytosin 0,7800 g mit 13,72%  $\text{H}_2\text{O}$  und 38,00% N erhalten und aus der Mutterlauge mit Pikrinsäure als Cytosinpikrat noch 0,1020 g = 0,0333 g Cytosin gefällt. Uracil wurde erhalten 1,000 g mit 25,10% N. Thymin konnte nicht nachgewiesen werden. Die  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Spaltung gab Guaninsulfat 0,8800 g = 0,3049 g Guanin in 32,91 g.

0,1100 g Xanthin = 0,1094 g Guanin in 32,91 g, mithin 0,3324 in 100 g.

Adeninpikrat 1,1780 = 0,4092 g Adenin in 32,91 g und in 100 g = 1,2430 g.

Cytosin 0,8133 g in 32,91 g = 2,4712 g in 100 g.

Uracil 1,0000 g in 32,91 g = 3,0386 g in 100 g oder = 3,0672 g Cytosin.

Analysentabelle der  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Spaltungsprodukte.

Verwendete Menge Substanz in g	Verbrauchte ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$	Gefundene N-Menge	% N gefunden	Mittel aus 2 Bestimmungen	% N berechnet	g Substanz	Verloren beim Trocknen	% $\text{H}_2\text{O}$ gefunden	% $\text{H}_2\text{O}$ berechnet	
Guaninsulfat	0,138	31,5	0,04410	31,95	31,95	32,06	0,1500	0,0120	8,00	8,24
Xanthin	0,1100	26,1	0,03654	33,21	33,21	36,85	—	—	—	—
Cytosin	0,0580	15,75	0,02205	38,01	38,00	37,86	0,1240	0,0170	13,72	13,95
	0,0490	13,3	0,01862	38,00						
Uracil	0,068	12,2	0,01708	25,11	25,10	25,05	—	—	—	—
	0,0580	10,4	0,01458	25,10						

Setzt man die Stickstoffmenge des Ausgangsmaterials = 100, so sind in diesem Versuch in Prozenten des Ausgangsmaterials wiedergefunden:

Humin-N	=	16,10%
NH <sub>3</sub> -N	=	12,14%
Guanin-N	=	3,38%
Xanthin-N	=	0,97%
Adenin-N	=	5,08%
Cytosin-N	=	7,36%
Uracil-N	=	5,98%
		51,01%

In diesem Versuch konnte also nur die Hälfte des Stickstoffs des Ausgangsmaterials wiedergefunden werden. Zweifellos haben hier aber große Verluste bei der Isolierung der Alloxurbasen stattgefunden, die wohl größtenteils in den Barytniederschlägen verloren gegangen sind, denn die Salpetersäurespaltung hat sehr viel größere Mengen Alloxurbasen geliefert.

In dem Spaltungsversuch mit Salpetersäure wurden wiedergefunden:

5,16% Guanin

7,36% Adenin.

In dem Spaltungsversuch mit Schwefelsäure wurden wiedergefunden:

in 32,91 g Substanz	0,5075 g NH <sub>3</sub>	=	15,43%
	0,3049 » Guanin	=	0,93%
	0,1100 » Xanthin	=	0,33%
	0,4092 » Adenin	=	1,24%
	0,8133 » Cytosin	=	2,47%
	1,0000 » Uracil	=	3,04%

Auffallend ist die große Menge Ammoniakstickstoff 12,14% des Gesamt-N gegenüber 5,20% bei der analogen Spaltung<sup>1)</sup> der Thymusnucleinsäure. Ihre Erklärung findet sie in dem reichlichen Auftreten des Uracils, das sofort rein und ohne eine Beimengung von Thymin isoliert werden konnte. Da das Xanthin, das Hypoxanthin und das Uracil sekundär durch weitergehende Hydrolyse aus dem Guanin, Adenin und Cytosin unter Ammoniakabspaltung hervorgehen, so muß natürlich bei einer Vermehrung des Uracils auch gleichzeitig die Ammoniakmenge vermehrt sein.

<sup>1)</sup> H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 403.

Rechnet man nun die sekundären Spaltungsprodukte in die primären um, so geben

$$0,1100 \text{ g Xanthin} = 0,1094 \text{ g Guanin}$$

$$1,0000 \text{ » Uracil} = 1,0000 \text{ » Cytosin, es wären}$$

dennach wiedergefunden:

$$0,4143 \text{ g Guanin} = 1,26\%$$

$$0,4092 \text{ » Adenin} = 1,24\%$$

$$1,8133 \text{ » Cytosin} = 5,54\%$$

Da sich nun aus diesen Versuchen noch kein Bild vom Aufbau der Nucleinsäure gewinnen ließ, wurden noch 2 analoge Versuche mit der Hefenucleinsäure Boehringer angesetzt:

I. 10 g Nucleinsäure mit 16,16% N und 8,65 g P wurden mit 10 ccm Salpetersäure (1,4 spez. Gew.) + 10 ccm Wasser stehen gelassen. Die Nucleinsäure quillt zuerst, dann wird allmählich alles zu einer farblosen Flüssigkeit gelöst und nach 2 × 24 Stunden erscheinen Krystalle. Nach 8 × 24 Stunden wurde der krystallinische Niederschlag abgesaugt, mit 10%iger HNO<sub>3</sub>, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und nach dem Trocknen an der Luft gewogen. Erhalten 2,8684 g.

Die Nitrate wurden in Wasser gelöst, mit NH<sub>3</sub> wie gewöhnlich behandelt, um Guanin von Adenin zu trennen. Der ausgeschiedene Niederschlag von Guanin wurde nach dem Auswaschen mit 2%iger NH<sub>3</sub>, mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen, erhalten 1,2840 g Guanin mit 47,69% N.

Aus dem Filtrate von Guanin nach Entfernen von NH<sub>3</sub>, Lösen in HCl und Entfernung des Überschusses der HCl durch Abdampfen wurde das Adenin mit Pikrinsäure gefällt und erhalten 0,7640 g Adeninpikrat, das bei 272—280° unkorrr. schmolz.

Das Filtrat von Guanin- und Adeninnitrat wurde mit Wasser versetzt und bei 40—50° vorsichtig eingedampft, um es möglichst von Salpetersäure zu befreien. Nach dem Stehen schied sich ein Niederschlag von Hypoxanthin- und Xanthinnitrat aus. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser gelöst und die Alloxurbasen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung gefällt, das Filtrat von Xanthin- und Hypoxanthinnitrat wurde ebenfalls stark ammoniakalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt: die sämtlichen Silberverbindungen

wurden  $\text{NH}_3$ -frei gewaschen, mit Salzsäure zersetzt, und aus dem Filtrat die überschüssige Säure durch vorsichtiges Abdampfen entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser von  $40^\circ$  behandelt, das ungelöst gebliebene Xanthin abfiltriert, mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen: 0,1910 g Xanthin mit 36,88% N.

Aus dem Filtrate vom Xanthin wurden 0,7503 g Hypoxanthinchlorid mit 30,30% N gewonnen.

Es wurden also im ganzen 1,2840 g Guanin, dann 0,1910 g Xanthin = 0,1898 g Guanin, mithin 1,4738 g Guanin gefunden. Die gefundene Menge Adeninpikrat betrug 0,7640 g = 0,2833 g Adenin und 0,7503 g Hypoxanthinchlorid = 0,5302 g Adenin, mithin 0,8135 g Adenin.

100 g Nucleinsäure geben also 14,74% Guanin und 8,14% Adenin.

Analysentabelle zur Salpetersäurespaltung.

Angewandte Menge Substanz g	Ver- brauchte $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ ccm	Ge- fundene N-Menge	% Stickstoff	Mittel aus 2 Bestim- mungen	% Stick- stoff berech- net	
Guanin	0,0885	30,2	0,04228	47,77	47,69	46,36
"	0,0785	26,7	0,03738	47,61		
Xanthin	0,0341	9,0	0,01260	36,95	36,88	36,85
"	0,0422	11,1	0,01554	36,82		
Hypoxanthin- chlorid	0,037	8,0	0,0112	30,27	30,30	29,38
	0,045	9,75	0,01365	30,33		

II. 100 g Nucleinsäure mit 16,16% N und 8,65% P wurden mit 300 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 600 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  während 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die erhaltene dunkelbraune Flüssigkeit enthält viel Kohle. Die Kohle wurde abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgekocht und sämtliche Filtrate bis auf 1000 ccm eingedampft und N bestimmt.

5 ccm der Flüssigkeit bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl verbrauchten 49,9 ccm  $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$  = 0,06986 g N: in 1000 ccm = 13,972 g N. Von 16,16 g N wurden 13,972 g wieder gefunden, es fehlten 3,188 g N = 19,72% des Gesamt-

stickstoffs. In je 10 ccm der hydrolysierten Flüssigkeit wurde der Ammoniakstickstoff bestimmt.

10 ccm verbrauchten 15,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0,02128 g N.

10 » » 15,0 » » = 0,02100 » »

Mittel aus 2 N-Bestimmungen 0,02114 g, in 1000 ccm sind 2,114 mg Ammoniakstickstoff oder 13,08% des Gesamtstickstoffs.

Die übrig gebliebene Flüssigkeit — 915 ccm — wurde mit Ba(OH)<sub>2</sub> von Schwefel- und Phosphorsäure befreit, der Ba-Niederschlag dreimal mit 3000—4000 ccm Wasser ausgekocht, die sämtlichen Filtrate schwach schwefelsauer bis auf 1 l eingedampft. Beim Erkalten schied sich ein krystallinischer Niederschlag aus. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser unter Zusatz von NaOH gelöst, mit Essigsäure gefällt, die Fällung in Wasser unter Zusatz von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Erwärmen gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt, etwas konzentriert und stehen gelassen, es krystallisierte Guaninsulfat in Form von Nadeln. Die Krystalle wurden abgesaugt und gewogen = 1,3230 g.

Das Filtrat wurde noch auf die Hälfte eingedampft und mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt — es schieden sich schneeweiße Nadeln aus — 1,5630 g, mithin im ganzen 2,8860 g Guaninsulfat mit 32,21% N und 8,22% H<sub>2</sub>O gleich 1,0000 g Guanin in 915 ccm oder 1,0928 g in 1000 g.

Im ursprünglichen, schwach sauren Filtrate von Guaninsulfat wurden die Alloxurbasen mit Silbernitrat gefällt: die Silberverbindungen wurden wie gewöhnlich verarbeitet und das Adenin mit pikrinsaurem Natrium gefällt und erhalten 5,4600 g Adeninpikrat, das zwischen 275—280° uncorr. schmolz. Die 5,4600 g Pikrat sind gleich 2,0242 g Adenin in 915 ccm oder 2,2122 g in 1000 ccm.

Die Xanthinfraktion gab bei der Analyse zu hohe N-Werte — 46,11% N —, was auf eine Verunreinigung mit Adenin hinwies, die erhaltene Menge wurde in Wasser unter Zusatz von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beim Erwärmen gelöst und erhalten 0,2425 g Adeninsulfat mit 35,35% N und 5% H<sub>2</sub>O, diese Menge Sulfat ist gleich 0,0810 g Adenin in 915 ccm oder 0,0885 g in 1000 ccm. Der Rest der Xanthinfraktion gab 0,1347 g Xanthin, das entspricht 0,1339 g Guanin in 915 ccm oder 0,1463 in 1000 ccm.

Die Hypoxanthinfraktion gab als Hypoxanthinpikrat 0,4700 g gleich 0,1751 g Hypoxanthin, das entspricht 0,1739 g Adenin in 915 ccm oder 0,1900 g in 1000 ccm.

Das Filtrat von den Alloxurbasen wurde mit  $\text{AgNO}_3$  und  $\text{Ba(OH)}_2$  versetzt, der Niederschlag mit Salzsäure zersetzt, das Filtrat vom  $\text{AgCl}$  bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft, die abgesaugten Krystalle wurden in warmem Alkohol gelöst; da sie ziemlich viel Alkohol zum Auflösen brauchten, so wurde die alkoholische Lösung auf die Hälfte eingedampft, beim Erkalten schieden sich Krystalle aus, die abfiltriert, in Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und wieder auskrystallisieren gelassen wurden. Sie hatten 25,71 % N und wurden als Uracil gewogen — 3,2810 g.

Die alkoholische Mutterlauge wurde zur Trockene eingedampft, in Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und die Lösung eingedampft, und es wurden noch 0,6800 g Uracil erhalten, da der N-Gehalt gleich 25,20 % war.

Das Filtrat vom Uracil wurde mit Wasser verdünnt, mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vom Baryt befreit, mit 100 ccm 5 %iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und mit Phosphorwolframsäure vorsichtig gefällt, um einen Überschuß von der Säure zu vermeiden. Der Niederschlag wurde abfiltriert und zum Filtrate eine neue Portion der Phosphorwolframsäure zugesetzt, der neue Niederschlag abfiltriert und jeder Niederschlag besonders zersetzt, doch nach den N-Bestimmungen zeigte es sich, daß beide Niederschläge Cytosin enthielten.

Der erste Niederschlag gab 1,3630 g Cytosin mit 37,94 % N und 13,56 %  $\text{H}_2\text{O}$ .

Der zweite gab 0,6980 g Cytosin mit 39,09 % N und 15,00 %  $\text{H}_2\text{O}$ .

Im Filtrat von dem auskrystallisierten Cytosin wurde der Rest von Cytosin mit Pikrinsäure gefällt und erhalten 0,6270 g Cytosinpikrat gleich 0,2109 g Cytosin.

So wurden 2,2719 g Cytosin in 915 ccm gefunden oder 2,4938 g in 1000 ccm.

Aus dem Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlag wurde die Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure

mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  entfernt und die sämtlichen Filtrate und Waschwasser eingedampft. Es wurden noch 0,928 g Uracil gewonnen, mit 24,96% N.

So wurden 4,8890 g Uracil in 915 cem gefunden, oder 5,3431 g in 1000 cem, die gleich 5,3733 g Cytosin sind. Guanin als Sulfat wurde gefunden 1,0928 g und in Xanthin verwandelt 0,1463 g, im ganzen 1,2391 g.

Adenin gefunden als Pikrat 2,2122 g, Adenin als Sulfat 0,0885 g und in Hypoxanthin verwandelt 0,1900 g, im ganzen 2,4907 g.

In 100 g Nucleinsäure bei  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Spaltung wurde also gefunden:

Cytosin	=	2,4938 g	=	0,9142 g N.
Uracil	=	5,3431	=	1,3384
Guanin	=	1,0928	=	0,5066
Adenin	=	2,3007	=	1,1929
Xanthin	=	0,1472	=	0,0542
Hypoxanthin	=	0,1913	=	0,0788
Ammoniak-N	=	2,1140	=	
				6,2291 g N.

Analysentabelle für die  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Spaltung.

Verwendete Menge Substanz in g	Ver- brauchte cem $\frac{1}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$	Ge- fun- dene N- Menge	% N ge- fun- den	Mittel aus 2 Bestim- mungen	% N be- rech- net	g Sub- stanz	Ver- loren beim Trock- nen g	% $\text{H}_2\text{O}$ gefun- den	% $\text{H}_2\text{O}$ be- rech- net
Guaninsulfat	0,1395	0,04494	32,21	32,21	32,06	0,1520	0,0125	8,22	8,24
Adeninsulfat	0,066	0,02310	35,00	35,35	34,65	0,2425	0,0115	5,00	8,91
	0,0490	0,01750	35,71						
Uracil	0,0490	0,01260	25,71	25,71	25,05	—	—	—	—
	0,060	0,01512	25,20	25,20	25,05	—	—	—	—
Cytosin	0,1530	0,0581	37,94	—	37,86	0,1770	0,0240	13,56	13,95
	0,1000	0,03906	39,06	39,05	37,86	0,1000	0,015	15,00	13,95
	0,1108	0,04326	39,04						

In Prozenten des Gesamtstickstoffs (16,16 g) berechnet, ergibt sich aus dieser Schwefelsäurespaltung folgendes Resultat.

Verlust (Humin)-N	=	19,72%
NH <sub>3</sub> -N	=	13,08%
Guanin-N	=	3,14%
Adenin-N	=	7,38%
Xanthin-N	=	0,34%
Hypoxanthin-N	=	0,49%
Cytosin-N	=	5,84%
Uracil-N	=	8,29%

Wiedergefunden: 58,28%.

Diese Schwefelsäurespaltung allein würde also auch nicht genügen, um sich ein Bild von dem Aufbau der Nucleinsäure zu machen; ist doch nur wenig mehr als die Hälfte des Stickstoffs wiedergefunden. Hält man aber die Resultate der Salpetersäurespaltung zusammen mit denen der Schwefelsäurespaltung, so zeigt sich deutlich, daß bei den Alloxurbasen ein großer Verlust bei der Aufarbeitung eingetreten ist.

Gefunden:

Bei HNO <sub>3</sub> -Spaltung	Bei H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Spaltung
Guanin 14,74%	1,24% (Xanthin auf Guanin berechnet)
Adenin 8,14%	2,49% (Hypoxanthin auf Adenin berechnet)

Will man also annähernde Werte für Guanin und Adenin haben, so muß man die Werte der Salpetersäurespaltung nehmen. Rechnet man dazu noch den aus der Schwefelsäurespaltung gewonnenen Wert für Cytosin (mit Addition des Uracils), so erhält man:

14,74% Guanin, 8,14 Adenin und 7,87% Cytosin.

Daß man wirklich für Uracil Cytosin berechnen darf, ebenso wie für Xanthin Guanin und für Hypoxanthin Adenin, ergibt sich unter anderem daraus, daß z. B. das von mir im zweiten H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Versuch gefundene Ammoniak 2,1140 g bei weitem ausreicht, um das beim Übergang der Aminokörper in die Oxykörper freiwerdende Ammoniak nach der theoretischen Berechnung zu decken: es ist sogar nach dieser ein großer Überschuß an Ammoniak gefunden — ein weiterer Beweis, daß bei der Darstellung der Spaltungsprodukte Verluste stattgefunden haben.

Beim Verwandeln von 5,3733 g Cytosin in Uracil wird ab-	
gespalten . . . . .	0,8229 g NH <sub>3</sub>
Beim Verwandeln von 0,1463 g Guanin in Xanthin wird	
abgespalten . . . . .	0,0144
Beim Verwandeln von 0,1900 g Adenin in Hypoxanthin	
wird abgespalten . . . . .	0,0239
	Verlangt . . . 0,8612 g NH <sub>3</sub>
	Gefunden . . . 2,1140

Stellt man nun die Stickstoffwerte für die gefundenen Mengen der drei Spaltungsprodukte zusammen, so erhält man für 10 g Nucleinsäure mit 16,16% N.

1,474 g Guanin = 0,6834 g N = 42,29% vom Gesamt-N.
0,814 » Adenin = 0,4224 » » = 26,14% » »
0,713 » Cytosin = 0,2697 » » = 16,69% » »
85,12%

Somit wären 85,12% vom Gesamtstickstoff wiedergefunden. Die noch fehlenden 15% kann man ohne weiteres als Verlust bei der Darstellung betrachten, da weder die Alloxur-basenfällung und Aufteilung absolut quantitativ arbeitet, noch die Ausbeute an Cytosin der wirklichen Menge an Cytosin resp. Uracil genau entspricht. Die erhaltenen Zahlen sind sämtlich Mindestzahlen.

Es würde demnach der stickstoffhaltige Teil der Hefenucleinsäure aus Guanin, Adenin und Cytosin bestehen und sich von der Thymusnucleinsäure durch das Fehlen von Thymin unterscheiden. Das Fehlen des Thymins unter den Spaltungsprodukten der Hefenucleinsäure war früher schon von Levene<sup>1)</sup> behauptet worden, freilich ohne daß er stichhaltige Beweise vorgebracht hätte. Von Levene<sup>2)</sup> ist ferner in der schon in der Einleitung erwähnten Arbeit behauptet worden, daß das Uracil ein primäres Spaltungsprodukt der Hefenucleinsäure sei. Als Beweis hierfür bringt er aber nur einen Versuch, in dem das Uracil nur qualitativ, und noch nicht einmal quantitativ dargestellt worden ist. Irgendwelche Angaben über die bei der Hydrolyse freiwerdenden Mengen Ammoniak sucht man ebenfalls in der Leveneschen Arbeit.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 8.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. XVII, S. 126.

vergeblich. Diese Bestimmungen sind aber durchaus notwendig, wenn man ein Urteil darüber gewinnen will, ob das Uracil zu den primären oder sekundären Spaltungsprodukten gehört.

Die Bestimmung des stickstofffreien Teils der Hefenucleinsäure, für den von Levene in Analogie mit der Inosinsäure und Guanylsäure als Bestandteil die d-Ribose angegeben worden ist, stößt auf größere Schwierigkeiten.

Zunächst läßt sich leicht feststellen, daß die Boehringer'sche Hefenucleinsäure keine Hexose enthält.

10 g Nucleinsäure wurden mit 100 cem 10%iger HCl 18 Stunden lang im siedenden Wasserbade gehalten und nach Zugabe von 10 cem konzentrierter  $H_2SO_4$  im Ätherextraktionsapparat mit Äther erschöpft. Das Ätherextrakt hinterließ nach dem Verdunsten eine geringe Menge eines Sirups, aus dem sich keine Lävulinsäure gewinnen ließ, der aber kräftige Furfurolreaktionen gab.

Bei einer quantitativen Furfurolbestimmung nach Tollens lieferten sodann 2 g Nucleinsäure 0,3929 g Furfurolphloroglucid — ferner 1 g Nucleinsäure 0,2278 g Phloroglucid, entsprechend einem Gehalt von 19,95 resp. 23,44% Pentose.<sup>1)</sup>

Es besteht also der stickstofffreie Teil der Hefenucleinsäure sicher aus Pentose. Dabei wäre noch eine Beobachtung von Boos<sup>2)</sup> zu besprechen, der aus der Hefenucleinsäure einen Körper der Formel  $C_7H_8O$  mit Hilfe von Benzylphenylhydrazin isoliert hat. Nun ist aber nach Ofner<sup>3)</sup> beim Arbeiten mit Benzylphenylhydrazin zu beachten, daß die Präparate sehr leicht durch Benzylidenbenzylphenylhydrazon verunreinigt werden können, und die Vermutung liegt nahe, daß auch Boos sich durch das Benzylidenbenzylphenylhydrazon hat täuschen lassen.

Es stimmt nämlich sowohl der Schmelzpunkt 114° (Boos) mit dem Schmelzpunkt des Benzylidenbenzylphenylhydrazons überein (111°), als lassen sich auch die von Boos bei der

<sup>1)</sup> Levene, der diese Versuche auch schon angestellt hat, findet 25% Pentose.

<sup>2)</sup> Boos, Journ. of biolog. chemistry, Bd. V, S. 469.

Monatshette für Chemie, Bd. XXV, S. 592/594.

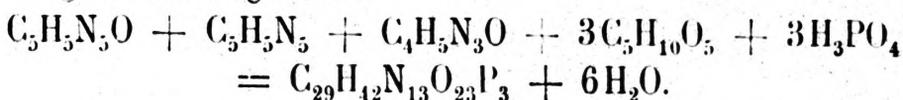
Elementaranalyse seines Körpers gefundenen Zahlen gut mit denen des Benzylidenbenzylphenylhydrazons vereinigen.

Gefunden von Boos (Durchschnitt):	Berechnet von Boos für $C_{29}H_{20}N_2$ :	Berechnet für Benzylidenbenzylphenylhydrazon $C_{29}H_{18}N_2$ :
C = 83,58 %	83,34 %	83,91 %
H = 6,78 %	6,94 %	6,29 %
N = 9,74 %	9,72 %	9,8 %

(Ofner<sup>1)</sup> gibt übrigens am Schluß seiner Arbeit eine Aufzählung von Forschern, die schon vor Boos ein Opfer dieses Irrtums geworden sind. Nachzuprüfen bliebe immerhin die Angabe von Boos, daß sein Körper eine hohe spezifische Drehung gehabt hat  $[\alpha]_D = -62,5$ .

Versucht man nun, aus den von mir erhaltenen Resultaten sich ein Bild von der Hefenucleinsäure zu machen, so müssen augenscheinlich meine beiden ersten Spaltungsversuche ausgeschieden werden. Die Menge der Alloxurbasen in meinem Präparat war sehr viel geringer wie in dem Boehringerschen und es ist anzunehmen, daß aus meinem Präparat während der Darstellung Alloxurbasen abgespalten worden sind.

Die Resultate der Spaltungsversuche mit der Boehringerschen Nucleinsäure erlauben dagegen, wie oben abgeleitet wurde, den Schluß, daß Guanin, Adenin und Cytosin die drei stickstoffhaltigen Bestandteile der Hefenucleinsäure sind. Rechnet man nun wie Steudel bei der Thymusnucleinsäure auf je ein stickstoffhaltiges Spaltungsprodukt ein Molekül Kohlenhydrat (also hier Pentose) und ein Molekül Phosphorsäure, so ergibt sich folgendes:



Man würde also jetzt eine Formel  $C_{29}H_{42}N_{13}O_{23}P_3$  bekommen, die als einfachster Ausdruck der Hefenucleinsäure anzusehen wäre, und es wäre zu prüfen, wie sich die experimentell gefundenen Werte zu den von dieser Formel verlangten verhielten.

<sup>1)</sup> l. c. S. 600—602.

## Zunächst für die Spaltungsprodukte:

	Verlangt:	Gefunden:
Guanin	14,63 %	14,74 %
Adenin	13,08 %	8,14 %
Cytosin	10,75 %	7,87 %
Pentose	39,43 %	23,44 %

Zu diesen Zahlen ist zu bemerken, daß die gefundenen Werte, wie schon erwähnt ist, Mindestwerte vorstellen, daß ferner das Guanin einen etwas zu hohen N-Gehalt hatte und wahrscheinlich noch Adenin beigemischt enthielt. Endlich ist die quantitative Isolierung des Cytosins mit großen Schwierigkeiten verknüpft, die noch dadurch erhöht werden, daß man einen Teil des Cytosins ja als Uracil gewinnt und erst auf Cytosin umrechnen muß. Bedenkt man alle diese Gründe, so wird man zu dem Schluß kommen, daß die gefundenen Zahlen für die N-haltigen Spaltungsprodukte sich ganz gut mit der oben aufgestellten Formel vereinen lassen. Der gefundene Wert für die Pentose will nicht viel bedeuten, erstens ist die Furfurolmethode ja an und für sich rein konventionell und zweitens ist es fraglich, ob die in der Nucleinsäure gebundene Pentose ebensoviel Furfurol liefert wie freie Pentose oder wie Pentosane.

Es bliebe also nur noch übrig, die Zahlen der Elementaranalysen mit denen für meine Formel verlangten zu vergleichen.

Berechnet für $C_{29}H_{42}N_{13}O_{23}P_3$	Gefunden von					
	Verfasser	Herlant <sup>1)</sup>		Boos <sup>2)</sup>	Levene	
		a)	b)		a) <sup>3)</sup>	b) <sup>4)</sup>
C = 33,69 %	—	30,40	33,65	36,29	34,97	36,65
H = 4,10 %	—	4,25	4,08	4,74	4,41	4,57
N = 17,63 %	16,16	13,80	15,27	16,84	15,21	17,89
P = 9,01 %	8,65	8,73	9,66	10,31	8,6	8,93

Das ist aber mit den Analysen der verschiedenen Untersucher eigentlich nicht ohne weiteres angängig, da die verschiedenen

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. XLIV, S. 159 (auf Cu-freie Substanz umgerechnet).

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Path., Bd. LV, S. 20 (dort noch mehrere Analysen nach Herlant).

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. XVII, S. 123.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 548.

untersuchten Präparate nach verschiedenen Methoden gewonnen wurden und keines irgend ein Kriterium der Reinheit besaß.

Von mir selbst sind bisher keine C- und H-Bestimmungen gemacht worden, da ich nicht glaube, daß sie zu der hier behandelten Frage irgend eine Entscheidung liefern werden.

Zum Schluß muß ich noch einige Worte über die von Levene<sup>1)</sup> aufgestellte Formel  $C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29}$  und ihre Begründung sagen. Sie ist dadurch zustande gekommen, daß Levene die Ansicht Steudels über den Aufbau der Thymusnucleinsäure schematisch auf die Hefenucleinsäure übertragen hat und daß er das Uracil für ein primäres Spaltungsprodukt der Hefenucleinsäure gehalten hat. Dies ist aber nach meinen obigen Ausführungen nicht richtig und kann auch schon deswegen nicht richtig sein, weil ich mehr Uracil gefunden habe, als die Levenesche Formel verlangt. Die Formel ist aber an und für sich schon garnicht möglich, weil die Summe der Valenzen keine durch zwei teilbare Zahl ist; dieser Fehler ist dadurch verursacht, daß Levene das Cytosin als solches in die Formel aufgenommen hat, ohne ein Atom H abzuziehen für die Bindung an der Pentose.

Seine Analysenzahlen hat Levene aber gar nicht auf die Formel  $C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29}$  bezogen, sondern er hat (Biochem. Zeitschr., Bd. XVII, S. 123, Zeile 11 von unten) dieser Formel noch  $C_2H_4O_2$  (wohl 1 Molekül Essigsäure?) hinzuaddiert. Hier bleibt er freilich jede Erklärung für diese merkwürdige Berechnung schuldig. Möglicherweise sollten durch diese Art der Berechnung seine Analysenzahlen eine bessere Übereinstimmung mit den verlangten Werten bekommen. Es ist nämlich:

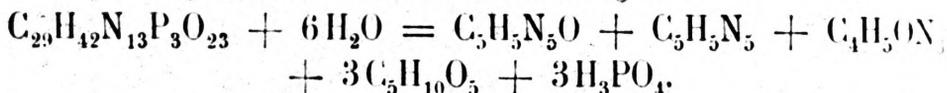
Berechnet für	Berechnet für	Gefunden von
$C_{38}H_{49}N_{15}P_4O_{29}$ :	$C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29} + C_2H_4O_2$ :	Levene (B. Z. XVII, S. 123):
C = 35,00 %	C = 35,17 %	C = 34,97 %
H = 3,79 %	H = 3,98 %	H = 4,41 %
N = 16,13 %	N = 15,40 %	N = 15,21 %
P = 9,52 %	P = 9,08 %	P = 8,6 %

In den Versuchen, auf die Levene jetzt seine neue Formel stützt, vermißt man vor allen Dingen exakte quantita-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. XVII, S. 122.

tive Angaben über die Ausbeuten an den einzelnen Spaltungsprodukten und Angaben über den Grad der Reinheit der in Rechnung gestellten Fraktionen. Es erscheinen wohl Analysen der gereinigten Substanzen, aber diese geben natürlich kein Kriterium ab für die Reinheit der als Ausbeute berechneten Rohprodukte.

Ich glaube also, daß der Hefenucleinsäure als einfachster Ausdruck die Formel  $C_{29}H_{42}N_{13}P_3O_{23}$  zukommt und daß sie bei der Spaltung zerfällt nach der Gleichung:



Je ein stickstoffhaltiger Körper ist analog wie bei der Thyminucleinsäure an ein Kohlenhydrat (Pentose) gebunden und zwar unter Besetzung der reduzierenden Gruppe derselben und das Kohlenhydrat ist andererseits mit der Phosphorsäure in Verbindung.

Eine locker gebundene Hexose enthält die reine Hefenucleinsäure nicht.

Es liegt nun natürlich nahe, zu vermuten, daß die Nucleinsäure des Weizenembryos, die von Osborne und Harris<sup>1)</sup> beschriebene Triticonucleinsäure, einen ähnlichen, vielleicht denselben Aufbau hat wie die Hefenucleinsäure. Nach den Angaben von Osborne und Harris<sup>2)</sup> enthält sie kein Thymin, und das als Spaltungsprodukt aufgefundene Uracil wird man hier wohl ebenso als sekundäres Spaltungsprodukt anzusehen haben wie bei der Hefenucleinsäure. Die bisherigen Untersucher haben das nicht getan, wohl größtenteils aus theoretischen Überlegungen.<sup>3)</sup>

Hierüber sollen gelegentlich Untersuchungen angestellt werden.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Prof. Steudel für seine mannigfachen Anregungen bei diesen Untersuchungen meinen besten Dank auszusprechen.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 85.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 85. Osborne und Heyl, Ann. Jour. of Physiol., Bd. XXI, S. 157.

<sup>3)</sup> Siehe auch H. Steudel, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden von Abderhalden, Bd. II, S. 596.