

# Über die Thyminsäure.

Von

H. Stedel und P. Brigl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)  
(Der Redaktion zugegangen am 11. Dezember 1910.)

Seitdem die Struktur des Moleküls der Thymusnucleinsäure im wesentlichen festgestellt ist, kann es sich nur noch darum handeln, durch Untersuchung größerer, zusammenhängender Bruchstücke aus einer teilweisen Spaltung einen tieferen Einblick in die spezielleren Bindungsverhältnisse zu gewinnen.

Nachdem erst einmal die Möglichkeit gewonnen war, den Aufbau der Nucleinsäuren präzise zu formulieren, hat sich eine Reihe von neuen Fragestellungen ergeben, die für die Erforschung der einfacher gebauten Nucleinsäuren schon sehr fruchtbar geworden sind, besonders seitdem Haiser<sup>1)</sup> und Wenzel ihre Untersuchungen über die Inosinsäure wieder aufgenommen und größtenteils zum Abschluß gebracht haben und Levene diese Anschauungen auch auf die Guanylsäure übertragen hat.

Bei der Thymusnucleinsäure selbst haben wir nun zunächst versucht, dasjenige Abbauprodukt näher zu charakterisieren, das man erhält, wenn man aus der Nucleinsäure mit Salpetersäure die Alloxurbasen abgetrennt hat. Es hinterbleibt bei dieser Reaktion eine Säure, die noch sämtliche Phosphorsäure in organischer Bindung enthält, Fehlingsche Lösung kräftig reduziert und die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts dreht.<sup>2)</sup>

Wir werden diesen Körper, der sich verhältnismäßig leicht isolieren läßt, mit dem Namen «Thyminsäure» bezeichnen, weil

<sup>1)</sup> Monatshefte für Chemie, Bd. XXX, S. 147. — P. A. Levene und W. A. Jacobs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLII, S. 335, 1198, 2102, 3247, 2469, 2474, 2703; Bd. XLIII, S. 3150, 3164.

<sup>2)</sup> H. Stedel, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 410.

Kossel<sup>1)</sup> und Neumann gelegentlich einer Untersuchung der Einwirkung von siedendem Wasser auf Nucleinsäure einen offenbar sehr ähnlichen Körper erhalten haben, den sie damals Thyminsäure genannt haben. Um die Zahl der Namen der Spaltungsprodukte der Nucleinsäure nicht unnötig zu vermehren, halten wir es also für erlaubt, die von uns näher untersuchte Säure mit dem altbekannten Namen zu bezeichnen, trotzdem die Identität beider Substanzen keineswegs feststeht.

Lufttrockenes nucleinsaures Natron wurde in Portionen von je 10 g mit einem erkalteten Gemisch von 10 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 und 10 ccm Wasser unter Kühlung übergossen und unter häufigem Durchrühren 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die Zersetzung der Nucleinsäure noch nicht ganz vollendet. Die Menge des größtenteils krystallinischen Niederschlags beträgt dann 3,2 g statt der theoretisch für die Nitrate der Purinbasen berechneten 2,9 g, da in ihm noch phosphorhaltige Körper vorhanden sind, hauptsächlich wohl die in verdünnten Säuren schwer lösliche, noch nicht angegriffene Nucleinsäure. Der Versuch muß jedoch nach 2 Tagen unterbrochen werden, da sonst weitgehende Hydrolyse eintritt. Dasselbe ist der Fall, wenn man die Temperatur während des Versuchs zu hoch steigen läßt. Hat man jedoch obige Bedingungen eingehalten, so enthält die von den Purinbasen abfiltrierte Flüssigkeit nur wenig anorganische Phosphorsäure. Sie wird auf etwa 100 ccm verdünnt, mit Sodalösung neutralisiert und mit basischem Bleiacetat gefällt. Es entsteht ein voluminöser weißer Niederschlag, der abzentrifugiert und mehrere Male mit Wasser ausgewaschen wird. Dann wird der Bleiniederschlag in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Zuletzt wird, um besser filtrieren zu können, rasch zum Sieden erhitzt und vom Schwefelblei getrennt.

Das schwach gelbliche Filtrat zeigt nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs schwache Reduktionswirkung gegen Feh-

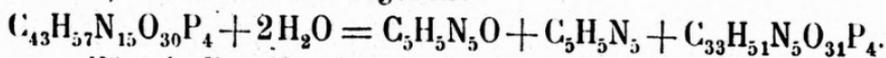
<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 74. Einen offenbar sehr ähnlichen Körper hat Schmiedeberg (Arch. exp. Path., Bd. XLIII, S. 72) später Nucleotinphosphorsäure genannt.

lingsche Lösung, die jedoch im Laufe der weiteren Verarbeitung wieder verschwindet. Es dreht das polarisierte Licht nach rechts. Jetzt wird mit Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, es fällt in geringer Menge ein Niederschlag, der hauptsächlich aus Phosphat besteht. Auf Zusatz des gleichen Volumens Alkohol fällt dann das Barytsalz der gesuchten Säure als weißer Niederschlag, der sich beim Trocknen etwas gelblich färbt. Aus 50 g des nucleinsäuren Natriums erhält man so etwa 20 g des Salzes. Obwohl nur durch Alkoholzusatz ausfällbar, geht der Körper, einmal ausgefällt, rasch in eine in Wasser unlösliche Form über. Schüttelt man ihn direkt nach dem Ausfällen mit Wasser, so geht nur noch ein kleiner Teil in Lösung, der auch mit der Zeit, rascher beim Erhitzen in die unlösliche Form übergeht. Deshalb wurde für die weiteren Versuche das mit Alkohol gefällte Barytsalz direkt verwendet.

Zur Analyse wurde es bei 80° im Vakuum getrocknet, es wurde N, P und Ba bestimmt, die beiden letzteren in derselben Substanzmenge, indem nach dem Veraschen mit Soda und Salpeter zunächst das Baryum als Sulfat abgeschieden und im Filtrat der Phosphor als Magnesiumpyrophosphat bestimmt wurde.

1. 0,1657 g geben 0,0867 g BaSO<sub>4</sub> und 0,0451 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
= 30,8% Ba und 7,6% P.
2. 0,2292 g geben 0,1207 g BaSO<sub>4</sub> und 0,0654 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
= 31,0% Ba und 7,9% P.
3. 0,2818 g geben 12,2 ccm Stickstoff (t = 15°, p = 75,4 cm)  
= 5,0% N.
4. 1,1233 g sättigten 38,5 ccm <sup>n/10</sup>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kjeldahl)  
= 4,8% N.

Nimmt man an, daß die beiden Alloxurbasen unter Wassereintritt aus dem Molekül der Nucleinsäure abgespalten werden, so würde sich ergeben:



Für ein Baryumsalz von der Formel C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>Ba<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>31</sub>P<sub>4</sub> ist verlangt:

32,74% Ba, 7,39% P, 4,18% N.

Da unser Salz nicht umgefällt war und da außerdem zweifellos die freien Aldehydgruppen der Zuckerkomponente weiter verändert — wahrscheinlich oxydiert werden, so erschien uns die Übereinstimmung der verlangten und gefundenen Werte vorläufig befriedigend genug, um an dem Salz eine Hydrolyse auszuführen, die die Art und annähernd die Menge der einzelnen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte feststellen sollte. Auffallend hoch ist der Baryumgehalt der Substanz, für den wir vorläufig keine Erklärung haben.<sup>1)</sup>

In genauer Anlehnung an die Vorschriften für die Thymusnucleinsäure werden 18,3 g Substanz hydrolysiert und auf je 1 g Baryumsalz eine Mischung von 3 g Schwefelsäure und 6 g Wasser verwandt<sup>2)</sup> und die Flüssigkeit 14 Stunden im Sieden erhalten. Dann wurde die Schwefel- und Phosphorsäure durch Baryt entfernt und der Überschuß an Baryt durch Kohlensäure. Die Niederschläge von Baryumsulfat, Baryumphosphat und Baryumcarbonat wurden sorgfältig zweimal mit heißem Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate auf 1 l gebracht. Nunmehr wurde die schwach schwefelsauer gemachte Lösung mit soviel heiß gesättigter Silbersulfatlösung versetzt, bis eine Probe mit Barytwasser keine weiße, sondern eine bräunliche Fällung gab. Hierbei hätten etwa vorhandene Purinbasen ausfallen müssen, die Lösung zeigte jedoch nur schwache Opalescenz. Damit wäre also bewiesen, daß der von uns untersuchte Körper keine Purinbasen mehr enthalten hat, wenn man nicht annehmen wollte, daß diese sämtlich in den Barytniederschlägen stecken geblieben wären. Das erscheint uns aber nach unseren bisherigen Erfahrungen recht unwahrscheinlich.

Aus der so mit Silbersulfat behandelten Lösung wurde durch Zusatz von Barytwasser eine weitere Fällung erzeugt, die die Pyrimidinkörper enthalten mußte. Das Filtrat von dieser Fällung enthielt nur noch ganz geringe Mengen Stickstoff.

<sup>1)</sup> Die Nucleinsäure selbst verhält sich wie eine vierbasische Säure und bildet also mit 2 Atomen Baryum ein neutrales Salz.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 135; Bd. XLIII, S. 402; Bd. XLVI, S. 332.

Der Silberniederschlag wurde in schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Schwefelsäure im Filtrat durch Baryt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt und sämtliche Niederschläge sorgfältig ausgekocht. Die vereinigten Filtrate lieferten nach dem Einengen auf dem Wasserbade 1,8 g Krystalle von 24,2% N-Gehalt.

0,1830 g sättigen 31,6 ccm  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kjeldahl).

Da der Körper nicht mit Phosphorwolframsäure fiel, konnte er kein Cytosin enthalten. Dies schien spurenweise in der Mutterlauge vorhanden zu sein. Da der Stickstoffgehalt für Thymin (22,2% N) zu hoch ist, so muß also auch Uracil (25,05% N) in dem Gemenge enthalten sein. Zur Trennung dieser beiden Körper wurde ein von Treat B. Johnson<sup>1)</sup> angegebenes Verfahren (Behandlung mit rauchender Salpetersäure) benutzt, das Uracil geht hierbei in Nitrouracil über, das in Alkohol in der Kälte so gut wie unlöslich ist, während das entstehende Oxynitrohydrothymin leicht löslich ist.

Das Thyminderivat, von dem die  $\alpha$ -Modifikation erhalten wurde, ist durch Krystallform und Schmelzpunkt zu identifizieren. Das Nitrouracil wurde nach Behrend und Grünwald<sup>2)</sup> in Amidouracil verwandelt und als Pikrat isoliert. Der Schmelzpunkt desselben liegt allerdings nicht bei 147°, sondern, worauf Wheeler und Bristol<sup>3)</sup> aufmerksam gemacht haben, bei 247°. Gefunden wurden bei Verwendung von 1,13 g des Gemisches 0,9311 g Thyminderivat und 0,6621 g Nitrouracil. Das entspräche einem Gehalt von 0,473 g Uracil und 0,62 g Thymin. Ein Gemisch molekularer Mengen würde erfordern 0,53 g Uracil und 0,59 g Thymin. Da jedoch auch Johnson zu viel Thymin und zu wenig Uracil fand, kann man wohl sagen, daß das fragliche Gemisch annähernd aus molekularen Mengen der beiden Komponenten bestand.

Sollen nun aus der Substanz von der Formel C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>Ba<sub>2</sub>N<sub>5</sub>P<sub>4</sub>O<sub>31</sub> Thymin und Uracil (als Derivat des primären Cytosins) in molekularen Mengen hervorgehen, so sind 7,5% Thymin und 6,7%

<sup>1)</sup> Journal of biological chemistry, Bd. IV, S. 407 (1908).

<sup>2)</sup> Ann. d. Chemie, Bd. CCCIX, S. 256.

<sup>3)</sup> Amer. chem. Journal, Bd. XXXIII, S. 437.

Uracil verlangt, zusammen also 14,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Gefunden haben wir 10,72<sup>0</sup>/<sub>0</sub>: wir halten die Übereinstimmung zwischen gefundenem und verlangtem Wert bei einem solchen ersten Versuch für befriedigend genug, um unsere Ansicht zu stützen, daß die Thyminsäure sich von der Nucleinsäure nur dadurch unterscheidet, daß aus letzterer ein Molekül Guanin und Adenin ausgetreten ist, natürlich abgesehen davon, daß die freiwerdenden Aldehydgruppen der beiden Hexosekomplexe sekundär weiter verändert werden.

Unsere Versuche beweisen ferner, daß die Bindungsart der Pyrimidinkörper offenbar anders ist wie die der Purinbasen, die letzteren sind in saurer Lösung äußerst leicht abspaltbar, erstere nicht.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Grälin-Bose-Stiftung ausgeführt.