

# Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

## III. Mitteilung.

### Hochmolekulare, krystallisierte Spaltstücke der Hefenucleinsäure.

Von

**S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller.**

(Aus der II. Medizinischen Klinik zu München, F. v. Müller.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. September 1915.)

In der ersten Mitteilung «Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel»<sup>1)</sup> beschrieb der eine von uns ein hochmolekulares Spaltstück der Hefenucleinsäure, die «Triphosphonucleinsäure von der wahrscheinlichen Zusammensetzung  $C_{33}H_{49}O_{23}N_{15}P_3$ . Diese Säure wurde durch Verdauung der Hefenucleinsäure (Böhlinger) mit menschlichem Duodenalsaft erhalten. Charakterisiert ist diese Substanz durch ein einheitlich krystallisierendes Brucinsalz vom S. P. 200—205° und durch die Drehung des polarisierten Lichtes  $[\alpha]_D = -19,6$ . Bei der alkalischen Hydrolyse unter Druck wurden aus dieser Substanz Guanosin, Adenosin und Cytidin erhalten. Durch die Darstellung der Triphosphonucleinsäure mittels menschlichen Duodenalsaftes war zum erstenmal Einblick gewonnen in die ersten Stadien des menschlichen Nucleinabbaus. Ein eingehenderes Studium der chemischen Konstitution dieser wichtigen Substanz und eine Erforschung ihres weiteren Abbaues im intermediären Stoffwechsel war durch die mühsame Gewinnung des zu ihrer Darstellung nötigen Duodenalsaftes sehr erschwert. Es mußte daher ein rein chemischer Weg gefunden werden, der zu dem gleichen Spaltstück wie die enzymatische Hydrolyse führte. Es ist uns gelungen, aus Hefenucleinsäure durch Hydrolyse

<sup>1)</sup> S. J. Thannhauser, Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 329 (1914).

in ammoniakalischer Lösung unter ganz geringem Druck eine Substanz als Brucinsalz zu isolieren, die nach Schmelzpunkt S. P. 205 und Analysendaten mit der Triphosphonucleinsäure identisch sein dürfte. Zudem konnten wir noch ein weiteres Spaltstück als krystallisiertes Brucinsalz S. P. 182—185° fassen und zur Analyse bringen. Die beiden Spaltstücke wurden auch bei ammoniakalischer Hydrolyse ohne Druck erhalten. Wir behalten uns vor, auch andere Nucleinsäuren unter den von uns angewandten Bedingungen der alkalischen Hydrolyse zu studieren. Durch unsere Einberufung zum Heeresdienst wurde die Arbeit vor Jahresfrist unterbrochen. Wir sehen uns daher veranlaßt, über die noch unvollständigen Ergebnisse vorläufig zu berichten.

50 g Hefenucleinsäure (Böhringer) werden in einer Mischung von 40 ccm 25%iger Ammoniaklösung und 210 ccm Wasser gelöst und die Lösung im Autoklaven bei 120—125° 1<sup>3</sup>/<sub>4</sub> Stunden lang hydrolysiert. Die erkaltete Lösung wird in 800 ccm gutgekühlten Alkohol (96%) eingegossen. Nach längerem Stehen wird die grauweiße hygroskopische Fällung abgenutscht, in kaltem Wasser gelöst und aus der Lösung in Siedehitze mit heißer Bleiessiglösung (D. A. B.) die Säure als ein weißgrauer Niederschlag ausgefällt, der nach Absaugen in kaltem Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wird. Nach kurzem Aufkochen saugt man vom Bleisulfid ab, konzentriert das Filtrat im Vakuum bei 30—35° auf ca. 40 ccm und setzt zur goldgelben Lösung solange Alkohol (96%), als eine gallertartige hygroskopische Fällung entsteht. Sie wird nach Abnutschen in lauwarmem Wasser gelöst. Die Lösung wird im Vakuum bei 30—35° auf ungefähr 35 ccm konzentriert und hierauf in 400 ccm Alkohol (96%) unter ständigem Rühren eintropfen gelassen. Die weiße Fällung wird abgesaugt und sofort mit absolutem Alkohol und Äther nachgewaschen. Ausbeute 2—3 g.

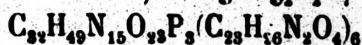
Die Darstellung des Brucinsalzes der Säure erfolgt am besten in nicht allzugroßen Portionen. 2 g der Säure in 25 ccm heißem Wasser gelöst, werden mit 4 g wasserfreiem Brucin, gelöst in 8 ccm siedendem Alkohol, versetzt. Die sehr rasch

ausfallende Rohkrystallisation wird aus siedendem Wasser umkrystallisiert, mit Alkohol nachgewaschen und mit Chloroform ausgekocht. Ausbeute 2 g. S. P. ca. 205.

Als Analysenmaterial wurde über das Silbersalz gereinigtes Brucinsalz verwendet. Zu diesem Zweck wurde das Brucinsalz in viel warmem Wasser suspendiert und mit Ammoniaklösung versetzt. Es geht sehr rasch alles in Lösung. Man filtriert schnell von geringer Verunreinigung ab, kühlt die Lösung durch Stehen in Eis ab und konzentriert nach Absaugen des ausgefallenen Brucins das Filtrat bei 30° im Vakuum. Hierauf fällt man mit Silbernitrat, bis kein Niederschlag mehr entsteht, nutsch das ausfallende weiße Silbersalz ab, suspendiert es in kaltem Wasser und leitet Schwefelwasserstoff ein. Die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung wird bei 30° konzentriert und portionenweise mit Brucin in sehr wenig siedendem Alkohol gelöst, versetzt. Das ausfallende Rohkrystalliat wird aus siedendem Wasser umkrystallisiert, mit Alkohol nachgewaschen und mit warmem Chloroform ausgekocht. Das Brucinsalz wurde über Phosphor-pentoxyd bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. (12<sup>h</sup>)

## Analyse:

0,1577 g Substanz	0,3407 g CO <sub>2</sub>	0,0862 g H <sub>2</sub> O
0,1613 „	14,8 ccm N (bei 17°, 760 mm)	
0,2200 „	0,0231 g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	



Berechnet: C = 58,82%	H = 5,77%	N = 10,9	P = 2,88%
Gefunden: C = 58,92%	H = 6,07%	N = 10,7	P = 2,94%

Wie schon erwähnt, wurde zu der, nach Zerlegung des Bleisalzes mit Schwefelwasserstoff und darauffolgender Konzentration erhaltenen goldgelben Lösung nur solange Alkohol gesetzt, als ein gallertartiger Niederschlag entsteht. Aus dem Filtrat hiervon konnte ein Brucinsalz erhalten werden, welches einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweist und dessen Analysenwerte von jenen des bei 205° schmelzenden Salzes abweichen.

Die von der gallertartigen Fällung abgesaugte Lösung wurde im Vakuum bei 30—35° sehr stark konzentriert, in 300 ccm absolutem Alkohol unter ständigem Rühren tropfen-



weise eingetragen und die ausfallende hygroskopische Substanz nach Äbnutschen mit absolutem Alkohol und Äther sogleich nachgewaschen. Die Substanz reagiert stark sauer und ist, einmal trocken, luftbeständig. Ausbeute 3—4 g.

Zur Darstellung des Brucinsalzes wurden 3,3 g der Säure in 44 ccm warmem Wasser gelöst, mit 6,6 g Brucin in 13 ccm siedendem Alkohol, versetzt. Das auskrystallisierende Brucinsalz wird nach Abkühlen auf Zimmertemperatur abgenutscht und aus siedendem Wasser umkrystallisiert. Ausbeute 2,2 g. S. P. 177—184°.

Das gleiche Brucinsalz konnte auch aus der alkoholisch-ammoniakalischen Lösung erhalten werden, die beim Eingießen der hydrolysierten Hefenucleinlösung in Alkohol entsteht. Das durch Absaugen von der grauweißen hygroskopischen Fällung erhaltene Filtrat wird im Vakuum bei 30—40° stark konzentriert, in Siedehitze mit Bleiessig (D. A. B.) versetzt und die Fällung nach Absaugen in kaltem Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zerlegt, aufgekocht, vom Schwefelblei abfiltriert und bei 30—35° im Vakuum das Filtrat sehr stark konzentriert. Die konzentrierte Lösung läßt man in viel absoluten Alkohol unter Rühren eintropfen. Die abgeschiedene weiße krümelige Substanz wird abgesaugt, mit absolutem Alkohol und mit Äther nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 6 g. S. P. 182—183°.

Zu Analysenzwecken wurde das aus der Säure erhaltene Brucinsalz ebenfalls in der beschriebenen Weise über das Silbersalz gereinigt.

#### Analyse:

0,1733 g Substanz	0,3706 g CO <sub>2</sub> ;	0,0921 g H <sub>2</sub> O
0,1556 „	10,1 ccm N (bei 17° und 766 mm)	
0,1473 „	10,1 „ N ( „ 24° „ 760 „ )	
0,2157 „	0,0228 g Mg <sub>3</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .	

Gefunden: C = 58,32% H = 5,89% N = 7,6% P = 2,98%  
N = 7,7%.