

Bestimmung der Purinbasen in Nucleinsäuren nach huminfreier Spaltung.

Von
R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 1. Mai 1918.)

Ein quantitativer oder auch nur qualitativer Nachweis der Purinbasen in Nucleinsäuren ist nur möglich durch Isolierung der Basen bzw. geeigneter Verbindungen derselben nach voraufgegangener Aufspaltung. Einer Reindarstellung der Basen stehen aber besonders bei den Nucleinsäuren vom Typus der Thymonucleinsäure große Schwierigkeiten entgegen, zumal wenn nur geringe Mengen Nucleinsäure zur Verfügung stehen.

Es bilden sich nämlich bei der Hydrolyse dieser Nucleinsäuren, die zu 50% aus äußerst leicht verharzendem Kohlenhydrat bestehen, stets große Mengen Huminstoffe, die die Hydrolysenflüssigkeit braun-schwarz färben. Da nun von allen stickstoffhaltigen Bestandteilen der Nucleinsäure im Laufe der Aufarbeitung immer zuerst die Purinbasen durch Fällung abgeschieden werden, so haften gerade diesen Niederschlägen große Mengen adsorbierter melaninähnlicher Stoffe an, zumal da die beiden Purinbasen nur zu je 10% in der Nucleinsäure vorkommen, also gegenüber dem verharzenden Kohlenhydrat und gegenüber der Gesamtmenge der gespaltenen Nucleinsäure nur in geringer Menge vorhanden sind. Die Entfärbung der braun-schwarzen Rohprodukte ist eine sehr unerfreuliche Aufgabe; nachträgliche Anwendung von oxydierenden oder reduzierenden Mitteln ist ohne Erfolg, und bei Verwendung von Tierkohle treten wegen der Notwendigkeit verhältnismäßig großer Mengen Kohle und wegen ihrer stark adsorbierenden Wirkung

auch auf die Basen in schwefelsaurer Lösung große Verluste auf, sodaß eine Orientierung über die wirklich vorhandene Menge sehr erschwert ist.

Dazu kommt die Schwierigkeit der Trennung des Guanins vom Adenin. Sie wird wohl meist mit der Ammoniakmethode ausgeführt, indem verdünntes Ammoniak zwar Adenin löst, Guanin aber ungelöst lassen soll. Aber gerade bei den Spaltprodukten der Nucleinsäure versagt diese Methode häufig, weil leider meist das Guanin kolloidal in Lösung geht, ein Umstand, der zu großen Irrtümern Veranlassung geben kann, wenn dem Beobachter, der Methode blind trauend, wegen der starken Färbung das Vorhandensein einer kolloidalen Trübung entgeht. H. Steudel äußert sich über die Trennung von Guanin und Adenin folgendermaßen:¹⁾ «Die in ihren Fällungsverhältnissen fast gleichen Basen Guanin und Adenin lassen sich absolut rein nur mit relativ großen Verlusten voneinander trennen». Natürlich werden auch hier die Schwierigkeiten noch größer, wenn nur geringe Mengen besonders wertvollen Materials ausgespalten werden können.

Sehr vereinfacht und erleichtert wurde die quantitative Purinbasenbestimmung durch die Abspaltung der Purine mittels starker Salpetersäure nach H. Steudel. Diese Methode liefert bei vorsichtiger Durchführung ohne wesentliche Huminbildung direkt ein Gemenge der schwerlöslichen Nitrate der Basen, die dann aber mit der Ammoniakmethode noch getrennt werden müssen. Da man aber die Salpetersäurespaltung wegen der Gefahr der Desamidierung der Purine nicht bis zur vollständigen Aufspaltung des ganzen Nucleinsäuremoleküls ausdehnen kann, zumal eine Temperaturerhöhung aus demselben Grunde ausgeschlossen ist, so verbietet sich diese Methode von selbst bei Nucleinsäuren, deren Purine nicht, wie bei der Thymonucleinsäure, äußerst leicht abspaltbar sind. Ist die leichte Abspaltbarkeit z. B. bei einer unbekanntem Nucleinsäure nicht sicher, so wird man vorziehen, die Hydrolyse nach einer indifferenten Methode bis zur vollkommenen Abspaltung aller Phosphorsäure fortzusetzen.

¹⁾ Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden.

In Anbetracht all dieser Schwierigkeiten schien mir eine Methode von Vorteil, die

1. eine vollständige Aufspaltung ohne die geringste Huminbildung gestattet,

2. eine automatische vollkommene Trennung des Guanins und Adenins erfolgen läßt,

3. Ausbeuten an reinem Guanin von ca. 95%, an Adenin von ungefähr 80–85% gewährleistet. (Die geringere Ausbeute an Adenin ist die Folge des immer notwendigen öfteren Fällens bei der Isolierung.)

Es ergab sich nämlich, daß in Gegenwart von schwefligsauren Salzen eine vollkommen huminfreie Spaltung zu erzielen war, und zwar sowohl in schwach alkalischer als auch in neutraler und saurer Reaktion. Die Wirkung der Sulfiten bei der Farblosmachung ist wohl eine oxydierende, da auftretender Schwefel eine Reduktion der Sulfiten anzeigt. Da die Sulfiten aber bereits aufgetretene Huminstoffe nicht wesentlich zu entfärben vermögen, so ist ihr Zusatz zur Nucleinsäure so zu bemessen, daß überhaupt Färbungen vermieden werden. Freie schweflige Säure ist nicht brauchbar, hier ist offenbar die verharzende Säurewirkung zu groß. Zur quantitativen Isolierung der Purinbasen haben sich aber nur die sauren schwefligsauren Salze (käufliche Lösung von Natriumbisulfit) als geeignet erwiesen.

Man erhält hiermit leicht eine vollkommen wasserhelle Hydrolysenflüssigkeit, aus der sich das Guanin schon während des Erhitzens im Drucktopfe geradezu quantitativ als farblose, derbe, grobflockige Masse abscheidet. Das so gewonnene Guanin läßt sich leicht filtrieren im Gegensatze zu den nach den bisherigen Methoden erzielten gelartigen Niederschlägen, bei denen man ohne Zentrifuge kaum auskommt. Eine Neigung, kolloidal in Lösung zu gehen, besteht nicht. Das Adenin bleibt in der sauer reagierenden Flüssigkeit in Lösung. Es besteht keine Gefahr, daß das Guanin etwa Adenin einschließen könnte; denn das Guanin scheidet sich schon bei hoher Temperatur im Drucktopfe aus, also unter einer Bedingung, unter der das Adenin unter allen Umständen noch leicht löslich ist.

Die Trennung von Guanin und Adenin ist also nicht nur eine automatische, sondern auch eine vollkommene. Auch Thymin läßt sich aus der Hydrolysenflüssigkeit gewinnen, jedoch kein Cytosin. Wahrscheinlich ist es zu Uracil oxydiert worden. Wegen Materialknappheit wurde das Verbleiben des Cytosins nicht weiter verfolgt, ebensowenig wie das Schicksal des Kohlenhydrates. Da aber bei der Aufarbeitung der Basen nach der üblichen Schwefelsäurespaltung die Hauptmenge der Huminstoffe bereits mit den Purinniederschlägen entfernt werden, so macht die Darstellung des Thymins und Cytosins nach der alten Methode weniger Schwierigkeiten als die Entfärbung des Guanins und Adenins, zumal, wenn man dabei die Purinbasenfraktion, weil mit Huminstoffen überladen, einfach verwirft.

Liegt eine unbekannte Nucleinsäure vor, so muß man erst die Dauer der Hydrolyse bei einer bestimmten Temperatur erproben: Es soll einerseits eine farblose Hydrolysenflüssigkeit entstehen, andererseits aber soll auch alle Phosphorsäure abgespalten sein. Eine übermäßig lange Dauer des Prozesses ist hinwiederum zu vermeiden, da bei jeder Hydrolyse — auch der mit verdünnter Schwefelsäure — wenn übermäßig angewandt, eine teilweise Desamidierung oder gar vollständige Zerstörung der Purinkörper platzgreifen kann.

Zur Vorprobe werden 0,5 g nucleinsaures Natrium in einem Röhrchen mit 5 ccm der verdünnten Sulfitlösung gelöst, und das Rohr nach dem Zuschmelzen 5 Stunden auf 160° erhitzt. Nach dem Abkühlen macht man unter gleichzeitiger Verdünnung mit Ammoniak stark alkalisch, fällt mit Magnesiämischung die anorganische Phosphorsäure aus und filtriert in einen Veraschungskolben von $\frac{3}{4}$ Liter Inhalt hinein. Das Filtrat wird nun bis fast zur Trockne eingedampft, und sodann die Veraschung nach der Neumannschen Methode vorgenommen. Notwendig sind etwa 30 ccm des Neumannschen Säuregemisches. Nach der Veraschung verdünnt man mit 150 ccm Wasser, versetzt mit 50 ccm 50%iger Ammoniumnitratlösung, erhitzt zum Sieden und fügt endlich zu der heißen Flüssigkeit 20 ccm 10%iger Ammoniummolybdatlösung hinzu:

Es darf weder ein gelber Niederschlag noch eine nennenswerte gelbe Färbung auftreten.

Bei der von mir benutzten Sulfitlösung war ein Verhältnis von 15 ccm Sulfitlösung auf 35 ccm Wasser passend; in dieser Mischung wurde dann das nucleinsaure Natrium zu etwa 10% gelöst. Am besten findet die Spaltung in einem Kölbchen aus Jenenser Glas nach dem Zuschmelzen statt. Erhitzt wurde 5 Stunden lang, wobei das Thermometer in der Thermometerhülse des Drucktopfes unkorrigiert 160° zeigte. Höhere Temperaturen sind zu vermeiden.

Zur Purinbasenbestimmung genügen wenige Gramm Substanz; 5 g sind unter allen Umständen ausreichend, aber es werden auch mit einem einzigen Gramm gute Resultate erzielt.

Ausführung der Bestimmung.

5,000 g nucleinsaures Natrium (von lufttrocknem entsprechend mehr) werden in 35 ccm Wasser gelöst, 15 ccm käufliche Sulfitlösung zugesetzt, und die Flüssigkeit, in einem Einschlußkölbchen eingeschmolzen, 5 Stunden auf 160° erhitzt. Alsdann läßt man zur restlosen Abscheidung des Guanins mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehen.

Guanin.

Man entleert den Inhalt des Einschlußgefäßes in ein Becherglas, wobei durch Einfüllen von etwas Wasser und Erwärmen über der Flamme auch alles an der Glaswand etwa festsetzende Guanin gelockert wird, und filtriert unter anfänglichem vorsichtigen Abgießen durch ein mit verdünnter Sulfitlauge (15 : 35) und Wasser ausgewaschenes und sodann bei 100° konstant gemachtes Filter. Der Rückstand wird wiederholt mit Wasser ausgekocht und dann ebenfalls auf das Filter gebracht. Die Menge des Filtrates soll ungefähr 150 ccm betragen. Das Filter samt dem Guanin wird bei 100° getrocknet und gewogen. Ausbeute: 0,510 g = 10,2% des nucleinsauren Natriums (ber. 10,87%).

Es entsteht hier zunächst die Frage, ob das gewogene Guanin als genügend rein angesehen werden kann. Dies ist

zu bejahen, da durch einfaches Lösen in verdünnter Schwefelsäure nach dem Erkalten sich reines krystallisiertes Guaninsulfat mit einer Ausbeute von 90% der Theorie aus dem amorphen Guanin gewinnen läßt, wobei die in der Mutterlauge verbleibende Menge nicht einmal berücksichtigt worden ist.

Zu diesem Zwecke und zur Identifizierung des Guanins wird dieses in der 20fachen Menge 10%iger Schwefelsäure in Siedehitze gelöst. Nach dem Abkühlen scheidet sich das mit 2 Molekülen Krystallwasser krystallisierende Salz in schönen Nadeln ab. Die Krystalle werden abgesaugt und mit Alkohol nachgewaschen.

Ausbeute an Guaninsulfat: 0,654 g.

Das Salz wurde als Guaninsulfat erkannt:

1. An dem äußeren Verhalten der Krystalle: Mit Krystallwasser sehr lockeres Filzwerk, das aber nach dem Trocknen bei 140° unter Verlust des Krystallwassers diese Eigenschaft verliert und in ein grobes Krystallpulver übergeht.

2. Durch Ermittlung des Krystallwassergehaltes.

3. Durch Ermittlung des Stickstoffgehaltes.

4. An der Eigentümlichkeit des Guaninsulfates, mit Wasser unter Zerfall des Salzes durch hydrolytische Dissoziation freies unlösliches Guanin ausfallen zu lassen.

0,1112 g	exsikkatortrocken verloren bei 140°	0,0090 g	Wasser
0,1072 g	wasserfrei entsprachen	26,7 ccm	$\frac{n}{10}$ -Säure (Kjeldahl)
0,0980 g	»	24,5 ccm	»

Berechnet für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4$:

N 35,00 %.

Gefunden:

34,90 %; 35,06 %.

Adenin.

Das Filtrat vom Guanin wird mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure, die erst mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt wird, versetzt und ohne Rücksicht auf den sich milchig abscheidenden Schwefel mit 10 g Phosphorwolframsäure in 50 ccm Wasser gelöst, vollständig ausgefällt. Nach halbstündigem Stehen saugt man den Niederschlag durch ein Filter, das zuvor durch Ansaugen einer Talkumaufschwemmung gedichtet worden war, und wäscht den Rückstand mit 100 ccm

10%iger Schwefelsäure, die 1 g Phosphorwolframsäure enthält, gut aus. Man verreibt jetzt den Filtrerrückstand mit Wasser, bringt die Aufschwemmung in einen Kolben, erwärmt auf dem Wasserbade, versetzt mit ein paar Tropfen Phenolphthaleinlösung und zersetzt den Niederschlag mit heiß gesättigter Barytlösung, bis bleibende Rotfärbung das Ende des Prozesses in bequemer Weise anzeigt. Den Niederschlag von phosphorwolframsaurem und schwefelsaurem Baryum saugt man ab und wäscht ihn gut mit heißem Wasser aus. Aus dem Filtrat entfernt man sodann das Baryumhydroxyd durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure bis etwas über die völlige Entfärbung hinaus und saugt das Baryumsulfat durch ein Talkumfilter ab. Das Filtrat wird jetzt durch Kochen in einem Kolben auf etwa 100 ccm eingedampft. Man berichtigt nunmehr die Acidität der Flüssigkeit, indem man erst mit Natronlauge bis eben zur Rotfärbung neutralisiert und sodann mit 5 ccm 10%iger Schwefelsäure ausäuert, und gießt endlich die noch heiße Lösung in ein Kölbchen, in dem sich 1,5 g fein pulverisiertes Silbersulfat mit etwas Wasser zu einem Brei angefeuchtet befinden. Es entsteht sofort ein dichter Niederschlag von Silbersulfat-Adenin. Die Fällung, die durch Umschütteln befördert wird, ist beendet, wenn der Niederschlag sich sehr schnell absetzt, und die darüberstehende Flüssigkeit klar ist. Etwas kalt gesättigte Silbersulfatlösung, in die klare überstehende Flüssigkeit hineingegossen, darf keinen Niederschlag mehr hervorrufen.

Nach Abkühlen unter der Wasserleitung und halbstündigem Stehen in Eis wird abgesaugt, und der Niederschlag mit etwas kalt gesättigter Silbersulfatlösung ausgewaschen. Die Filtration verläuft sehr schnell. Jetzt bringt man den Niederschlag in einen Kolben und kocht ihn wiederholt mit im ganzen 100 ccm n-Salzsäure und dann noch öfter mit Wasser aus, wobei die Lösung jedesmal von dem sich schnell zu Boden setzenden Chlorsilber abgegossen wird. Beim Abkühlen der salzsauren Adeninlösung pflegt sich stets etwas Chlorsilber in sehr fein verteilter Form abzuscheiden. Einmaliges Durchsaugen durch ein Talkumfilter beseitigt schnell

die kolloidale Trübung. Die saure Lösung wird nun nach Zusatz von etwas Phenolphthaleinlösung mit Natronlauge fast ganz neutralisiert, auf 100 ccm eingekocht, mit Natronlauge bis zur eben bestehen bleibenden Rotfärbung versetzt, und die Flüssigkeit nunmehr heiß in ein Becherglas hineingegossen, in dem sich 2 g Pikrinsäure befinden. Diese geht sofort in Lösung, während sich sogleich das Adenin-pikrat abscheidet. Nach völligem Erkalten saugt man ab, trocknet bei 100° , entfernt die überschüssige Pikrinsäure durch Verreiben und Ausziehen mit Benzol, trocknet und wiegt.

Ausbeute an Adenin-pikrat: 1,014 g = 0,376 g Adenin = 7,51% des nucl. Natriums (berechnet: 9,71%).

Auch das zur Wägung kommende Adenin-pikrat besitzt bereits einen genügenden Grad von Reinheit, weil es in einer Ausbeute von 85–87% der Theorie durch einmaliges Umkrystallisieren in völlig reinen Zustand übergeführt werden kann. Weitere 10% bleiben in der Mutterlauge; denn zum Umkrystallisieren von 1 g Adenin-pikrat sind 350 ccm Wasser erforderlich, in denen 0,1 g gelöst bleiben (Löslichkeit des Adenin-pikrates 1 : 3500 bei 20°).

Das reine Adenin-pikrat zeigt ein charakteristisches Verhalten: Beim Abkühlen der heißgesättigten Lösung scheidet es sich in schönen glänzenden, dünnen, besenartig angeordneten Krystallen aus. Die Krystalle bilden ein lockeres Filzwerk und durchziehen breiartig die ganze Flüssigkeit. Es sieht so aus, als ob gelbe Watte darin flottiere. Beim Absaugen verfilzen die Krystalle vollkommen und bilden auf dem Filter eine feste gewebeähnliche Platte.

Ausbeute an reinem krystallisierten Adenin-pikrat: 0,878 g.

Abgesehen von diesen charakteristischen Eigenschaften wurde das Adenin-pikrat am Stickstoffgehalte erkannt.

0,2522 g lieferten 65,6 ccm Stickstoff; $p = 762$, $t = 15,0$ (Dumas).

Berechnet für $(C_5H_5N_5)(C_6H_3N_3O_7)$:

N 30,78%.

Gefunden:

30,60%.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln aus der «Gräfin Bose-Stiftung» ausgeführt.