

# Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

## VI. Mitteilung.

Die Aufspaltung von Nucleotiden durch wässrige Pikrinsäurelösung in der Hitze. Isolierung der kristallisierten Cytidinphosphorsäure<sup>1)</sup>.

Von

S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller.

Aus der zweiten medizinischen Klinik [F. Müller] München.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. August 1918.)

Durch Hydrolyse mit sehr verdünnten (2 %) Mineral- säuren werden die aus Purin- und Pyrimidinnucleotiden auf- gebauten Polynucleotide derartig aufgespalten, daß die im Poly- nucleotidmolekül vorgebildeten Purinnucleotide in ihre Bausteine Purine, Zucker und Phosphorsäure zerfallen, während die Pyri- midinnucleotide als Nucleotidkomplexe erhalten bleiben. Die Isolierung der ungespaltenen Pyrimidinnucleotide aus dem sauren Hydrolysendgemisch gestaltete sich bisher sehr umständlich und verlustreich. Durch Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit 2% iger Schwefelsäure konnten wir die Uridinphosphorsäure als kristallisiertes Brucinsalz isolieren. Die Cytidinphosphor- säure, welche bei der sauren Hydrolyse der Hefenucleinsäure neben der Uridinphosphorsäure ebenfalls entsteht, gibt zwar auch ein kristallisiertes Brucinsalz, es gelang uns aber bisher nicht, dieses Brucinsalz aus der Hydrolysenflüssigkeit voll- ständig rein zu erhalten. Ein anderer Weg mußte gefunden werden, um die Cytidinphosphorsäure darzustellen.

<sup>1)</sup> Die in den Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 51, S. 467 (1918) ange- kündigte ausführliche Veröffentlichung der Darstellung eines kristallisierten Dinucleotides (wahrscheinlich Guanosin-Adenosinphosphorsäure) kann in- folge meiner abermaligen Abstellung ins Feld erst später erfolgen. Th.

Bei der ammoniakalischen Hydrolyse der Hefenucleinsäure am Rückflußkühler zerfällt dieselbe in die Uridinphosphorsäure und die Triphosphonucleinsäure, welche hinwiederum aus den drei Mononucleotiden Guanosin-, Adenosin- und Cytidinphosphorsäure aufgebaut ist.

Eine schwachsaure Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure mußte, falls die von uns angenommene konstitutionelle Zusammensetzung der Triphosphonucleinsäure richtig ist, zur Isolierung des in ihr enthaltenen Pyrimidinnucleotides der Cytidinphosphorsäure führen. Nach unseren Erfahrungen ist die Trennung der Pyrimidinnucleotide von den Reaktionsprodukten der mineralischen Hydrolyse durch die zahlreichen bei dieser Operation nötigen Fällungsreaktionen mit großen Verlusten für das zu isolierende Pyrimidinnucleotid verbunden. Wir suchten daher die Hydrolyse mit einer organischen Säure durchzuführen und fanden hierzu die Pikrinsäure besonders geeignet, weil die Hauptreaktionsprodukte der Hydrolyse, die abgespaltenen Purine, beim Erkalten sofort als unlösliche Pikrate ausfallen. Aus der hinterbleibenden Hydrolysenflüssigkeit läßt sich die gelöste Pikrinsäure leicht durch Äther entfernen und das gesuchte Pyrimidinnucleotid nach dem Konzentrieren der Lösung mit Alkohol fällen. Das mit Alkohol gefällte Rohprodukt gibt ein kristallisiertes Brucinsalz, das nach einmaligem Umkristallisieren bereits rein ist. Wir hydrolysierten auf diese Weise die Triphosphonucleinsäure und erhielten das Brucinsalz der Cytidinphosphorsäure in guter Ausbeute. Zur Darstellung der freien Cytidinphosphorsäure zerlegten wir das Brucinsalz S. P. 205<sup>o</sup> mit Ammoniak, fällten die Lösung des Ammoniumsalzes mit Bleiessig (D. A. B.) und zerlegten das entstehende Bleisalz mit Schwefelwasserstoff. Beim Einengen der wässerigen Lösung im Vakuumexsikkator kristallisiert dann die freie Cytidinphosphorsäure in schönen Kristallen.

In der IV. Mitteilung<sup>1)</sup> unserer experimentellen Studien über den Nucleinstoffwechsel haben wir zwei scheinbar isomere Triphosphonucleinsäuren beschrieben, die sich nur durch ihre

<sup>1)</sup> S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller. Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 121 (1917).

verschiedene optische Aktivität und in dem Schmelzpunkt der Brucinsalze unterscheiden. Die Triphosphonucleinsäure aus Brucinsalz S. P. 205° drehte nach links, während die Triphosphonucleinsäure aus Brucinsalz S. P. 185—187° optisch inaktiv war. Wir unterwarfen nunmehr die freien Säuren beider Brucinsalze der pikrinsauren Hydrolyse. Das aus der Hydrolysenflüssigkeit beider Säuren isolierte Brucinsalz gibt Analysenzahlen, die für das Brucinsalz der Cytidinphosphorsäure stimmen. Zersetzt man aber die beiden Brucinsalze zur Isolierung der freien Cytidinphosphorsäure, so kristallisiert die freie Cytidinphosphorsäure in guter Ausbeute nur aus dem Brucinsalz, das durch die Hydrolyse der Säure Brucinsalz 205° (l-Triphosphonucleinsäure) gewonnen war, während die Cytidinphosphorsäure aus Hydrolyse der Säure Brucinsalz 185—187° (angeblich d-l-Triphosphonucleinsäure) nur in spärlichen Kristallen sich absetzte und zum Teil sirupös blieb.

Ein derartiges Verhalten haben wir auch bei der Darstellung der freien Cytidinphosphorsäure aus einem Brucinsalz, das noch mit Brucinsalz der Uridinphosphorsäure verunreinigt war, beobachtet. Dieser experimentelle Befund veranlaßt uns zu der Feststellung, daß von den beiden isomeren Triphosphonucleinsäuren nur die linksdrehende Triphosphonucleinsäure ein einheitlicher, chemischer Körper ist.

In der gleichen Weise wie die l-Triphosphonucleinsäure haben wir auch die Hefenucleinsäure der Hydrolyse mit Pikrinsäure unterworfen. Nach dem Abfiltrieren der abgespaltenen Purinpikrate und dem Entfernen der überschüssigen Pikrinsäure mit Äther wird durch Alkohol ein Gemisch von Uridin- und Cytidinphosphorsäure niedergeschlagen. Eine Trennung beider Pyrimidinnucleotide gelingt nur mit Hilfe der fraktionierten Kristallisation ihrer Brucinsalze. Da aber die Löslichkeit beider Brucinsalze in Wasser nicht sehr verschieden ist, muß die fraktionierte Kristallisation mehrere Male wiederholt werden und führt schließlich nur zu einer ganz geringen Ausbeute an reinen Brucinsalzen. Es empfiehlt sich daher, zur präparativen Herstellung der Uridin- und Cytidinphosphorsäure die Hefenucleinsäure zuerst durch ammoniakalische Hydrolyse am

Rückflußkühler<sup>1)</sup> in l-Triphosphonucleinsäure und Uridinphosphorsäure aufzuspalten und dann durch Hydrolyse der l-Triphosphonucleinsäure mit kochender Pikrinsäurelösung die Cytidinphosphorsäure darzustellen.

Wir behalten uns vor, die Methode der Hydrolyse mit Pikrinsäure und mit anderen organischen Säuren bei verschiedenen Temperaturen auch mit tierischen Nucleinsäuren auszuführen.

#### Experimenteller Teil.

Hydrolyse der l-Triphosphonucleinsäure mit konzentrierter Pikrinsäurelösung in der Hitze. Darstellung der kristallisierten Cytidinphosphorsäure.

30 g Brucinsalz der Triphosphonucleinsäure S. P. 205<sup>2</sup> werden in reinem Wasser suspendiert, mit überschüssigem Ammoniak versetzt und dann in Eis gekühlt. Das Brucin fällt vollständig aus. Nach dem Abkühlen auf 0° und halbstündigem Stehen wird das Brucin abfiltriert, auf der Nutsche scharf abgepreßt und mit Eiswasser nachgewaschen. Das Filtrat wird bei 40—50° im Vakuum stark konzentriert. Die konzentrierte Lösung des Ammonsalzes wird mit viel Pikrinsäure in Substanz (ca. 30 g) versetzt und die Mischung 1½ bis 2 Stunden am Rückflußkühler im Sieden erhalten. Zuerst löst sich alle Pikrinsäure in der Siedehitze, dann fällt allmählich unter starkem Stoßen ein Pikrat aus. Man kocht vorsichtig trotz des Stoßens die vorgeschriebene Zeit weiter. Nach 2 Stunden läßt man abkühlen und stellt die Hydrolysenflüssigkeit zur vollständigen Ausfällung der Purinpikrate, des Ammoniumpikrates und unveränderter Pikrinsäure über Nacht in den Eisschrank. Die ausgefallenen Pikrate und die Pikrinsäure werden abgenutscht, das Filtrat im Vakuum bei 40—50° stark konzentriert und mehrmals in den Eisschrank gestellt. Es scheidet sich neben Pikrat noch eine gallertige Substanz ab. Man saugt abermals ab, wäscht mit wenig Wasser nach und

<sup>1)</sup> S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 121 (1917).

äthert das mit etwas Wasser noch weiter verdünnte Filtrat aus, bis alle Pikrinsäure entfernt ist. Die ausgeätherte Lösung wird im Vakuum bei 30—40° stark eingengt und im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure vollständig konzentriert. Der hellgelbe Sirup wird mit der 10—11fachen Menge Wasser gekocht und die siedend heiße Lösung in eine heiße alkoholische Brucinlösung, die an Brucin die doppelte Gewichtsmenge des Sirups gelöst enthält, gegossen (Verhältnis des Brucins in Alkohol wie 1:2). Es beginnt alsbald eine Abscheidung von Brucinsalz, die bei längerem Stehen im Eisschrank vollständig wird. Das ausgefallene Brucinsalz wird abgesaugt, mit wenig Alkohol nachgewaschen und mit reinem Chloroform dekantiert. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser schmilzt das Brucinsalz bei 180—182°. In Wasser ist das Brucinsalz ziemlich schwer löslich, in heißem Alkohol ist es leicht löslich.

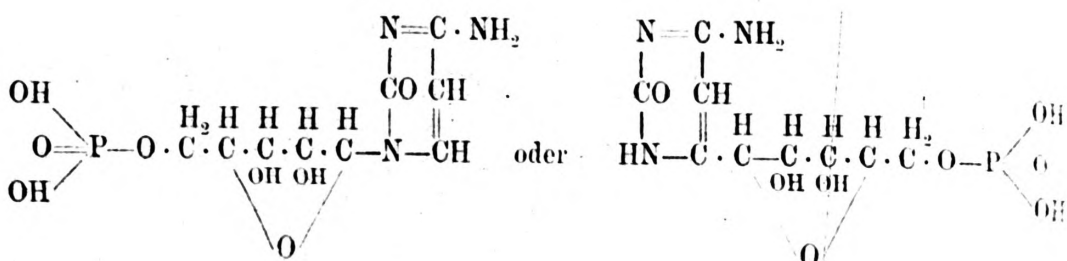
0.1318 g Substanz : 11 ccm N (20°, 722 mm)

$C_9H_{14}O_8N_2C(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$ . Ber.: N 8,82

Gef.: N 9,00.

Zur Darstellung der freien Cytidinphosphorsäure wird das Brucinsalz in heißem Wasser gelöst, mit überschüssigem Ammoniak versetzt und bei 0° unter Eiskühlung stehen gelassen.

Das ausgefallene Brucin wird abgesaugt, das Filtrat im Vakuum konzentriert und die ammoniakfreie Lösung des Ammonsalzes mit Bleiessig (D. A. B.) gefällt. Das ausgefallene Bleisalz wird in Wasser aufgeschlemmt, abfiltriert und mehrere Male unter Aufschlemmen mit Wasser dekantiert. Die Suspension des Bleisalzes in Wasser wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 40° auf 30 ccm eingengt. Diese Lösung läßt man langsam im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure eindunsten. Hierbei scheidet sich die Cytidinphosphorsäure in derben, weißen Kristallen, die in Rosetten angeordnet sind, aus. Aus Wasser umkristallisiert. Schmelzp. 227°. Herr Geheimrat Groth hatte die große Liebenswürdigkeit, die Kristallform zu bestimmen. Die Cytidinphosphorsäure kristallisiert monoclin-sphenoidisch.



## Cytidinphosphorsäure.

0,1227 g Substanz	0,1525 g CO <sub>2</sub>	0,0529 g H <sub>2</sub> O
0,0819 g „	9,6 ccm	N (15°, 718 mm)
0,1285 g Substanz	0,6950 g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> · 24 MoO <sub>3</sub>	
0,1265 g „	0,0844 g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> · 24 MoO <sub>3</sub>	

Cytidinphosphorsäure C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>P.

Ber.: C 33,43 %	H 4,33 %	N 13,00 %	P 9,59 %
Gef.: C 33,89 %	H 4,78 %	N 13,09 %	P 9,32 % 9,33 %

Bestimmung der optischen Aktivität: 0,1115 g Substanz (im Vakuum bei 130° getrocknet) drehen in 4 ccm 1/2 n-Na-Lauge gelöst in einem 18,94 ccm-Rohr 1,24° nach rechts  $[\alpha]_D^{20} = + 23,43^\circ$ .

Die bei der Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure mit Pikrinsäurelösung ausfallenden Pikrate wurden zur Identifizierung auf folgende Weise aufgearbeitet. Das Pikratgemisch wird zuerst zur Entfernung der freien mitausgefallenen Pikrinsäure mit sehr viel Äther in der Wärme behandelt. Die hinterbleibenden Pikrate werden in heißer konzentrierter Salzsäure gelöst und über Nacht stehen gelassen. Von der sich auscheidenden Pikrinsäure wird auf einem gehärteten Filter abfiltriert. Die salzsaure Lösung wird auf ein kleines Volumen eingengt. Die hinterbleibende Substanz wird in Wasser gelöst und mit Ammoniak versetzt. Die ausfallende Substanz wird abfiltriert und mit 2% iger Ammoniak dekantiert und dann mit Wasser gewaschen. Hierauf bringt man die Substanz mit wenig 5% iger Schwefelsäure in Lösung und fällt mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösung. Über Nacht kristallisiert das Guanin als schönes Pikrat aus.

0,0517 g Substanz	14,2 ccm N (24°, 720 mm)	
Guanin-pikrat.	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O. C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> .	Ber.: N 29,47 %
		Gef.: N 29,86 %

Das ammoniakalische Filtrat der Guaninfällung wird zur Trockne eingengt. Das zurückbleibende Kristallisat wird in wenig Wasser gelöst, eventuell vom Ungelösten abfiltriert, und mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Es fällt sofort ein schönes Pikrat aus.

0,0437 g Substanz 12,20 ccm N (16°, 717 mm)  
 Adeninpikrat.  $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_3N_3O_7$ . Ber.: N 30,78%  
 Gef.: N 31,02%

Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit konzentrierter  
 Pikrinsäurelösung in der Hitze.  
 Darstellung des Cytidin- und Uridinphosphorsäure-  
 brucinsalzes.

Zu 100 g Hefenucleinsäure in 500 ccm Wasser werden 60 g Pikrinsäure hinzugegeben und 2 Stunden am Rückflußkühler gekühlt. Die Aufarbeitung der Hydrolysenflüssigkeit geschieht in der gleichen Weise, wie dies bei der vorstehenden Pikrinsäurehydrolyse der Triphosphonucleinsäure beschrieben ist. Nach dem Entfernen der Purinpikrate und der Pikrinsäure wird die Flüssigkeit im Vakuum zum Sirup eingengt. Der Sirup (ungefähr 60—70 g) wird in 500 ccm Wasser siedend heiß gelöst und in eine heiße, alkoholische Brucinlösung, die ca. 60—70 g Brucin gelöst enthält, eingegossen. Die kochende Lösung läßt man bis 60° C. abkühlen, saugt rasch vom ausfallenden Brucinsalz ab und läßt dann weiter bei Zimmertemperatur stehen. Kristallisat I (100—60°) enthält zum größten Teil das Brucinsalz der Uridinphosphorsäure, Kristallisat II (60° Zimmertemperatur) ist ein Gemisch der Brucinsalze der Uridin- und Cytidinphosphorsäure. Kristallisat I wird mit heißem Wasser ausgezogen. Der ungelöste Rückstand aus sehr viel heißem Wasser auskristallisiert. Auf diese Weise erhält man das Brucinsalz der Uridinphosphorsäure. Schmelzpt. 175—177°.

0,1023 g Substanz 7,00 ccm (16°, 709 mm)  
 $C_6H_{13}N_2O_9P(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$ . Ber.: N 7,55%  
 Gef.: N 7,5%

Kristallisat II wird zur Entfernung des Uridinphosphorsäurebrucinsalzes mehrmals auf die beschriebene Art frak-

tioniert kristallisiert. Schließlich erhält man das Cytidinphosphorsäurebrucinsalz in der Fraktion 60° Zimmertemperatur rein. Die Ausbeute ist durch das wiederholte Fraktionieren allerdings sehr gering. Schmelzp. 180—182°.

0,1014 g Substanz 8 ccm (19°, 712 mm)  
 $C_9H_{14}N_3O_8P(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$ . Ber.: N 8,82%  
 Gef.: N 8,61%

Die Isolierung des Guanin- und Adeninpikrates aus dem bei der Pikrinsäurehydrolyse der Hefenucleinsäure ausfallenden Pikratgemische geschieht in der gleichen Weise, wie dies bei der vorstehenden Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure beschrieben wurde.