

Über die Guanylsäure, ihre Darstellung und Fällbarkeit.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Juni 1919.)

Die Guanylsäure wird nach Bang dargestellt¹⁾, indem man das Nucleoproteid der Pankreasdrüse des Rindes mit verdünnter Kalilauge kocht und die alkalische Zersetzungsflüssigkeit neutralisiert. Es scheidet sich dann beim Stehen die verlaugte Nucleinsäure ab. Der so gewonnene Körper wurde nun von Bang als „Guanylsäure“ angesehen. Sie soll in kaltem Wasser und verdünnter Essigsäure schwer, in heißem Wasser und Alkalien leicht löslich und aus der alkalischen Lösung mit Essigsäure fällbar sein.

Nun hat H. Steudel²⁾ gezeigt, daß die so gewonnene „Guanylsäure“ keineswegs die freie Säure, sondern deren Alkalisalz ist, und daß man nach öfterem Auflösen in verdünnter Kalilauge und Wiederausfällen mit Essigsäure eine gelatinierende Form der Guanylsäure erhält, die nun nicht mehr mit Essigsäure fällbar war. Nach H. Steudel liegt der gelatinierenden Form das saure Kaliumsalz zugrunde, eine Ansicht, zu der auch ich — auf Grund anderer Methoden — gekommen bin, und ich glanze, daß ein Zweifel nicht mehr bestehen kann, daß das saure Salz der Guanylsäure gelatiniert; ich betone dies, weil Levene der Ansicht ist, daß die Guanylsäure in reinem Zustande überhaupt nicht gelatiniert. (Die freie Säure gelatiniert allerdings nicht.)

Als wesentliches Merkmal des Bangschen Präparates

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 133 (1899) und Bd. 31, S. 411.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 68, S. 40.

blieb aber die Fällbarkeit mit Essigsäure und die Unlöslichkeit in verdünnter Essigsäure.

Diese angebliche Eigenschaft der Guanylsäure soll nun eingehend untersucht werden, ist doch eine völlige Klärung dieser Verhältnisse für die Erkennung und Isolierung der Säure von größter Bedeutung, zumal Bang auf der Fällbarkeit mit Essigsäure seine Theorie von einer α -, β - und γ -Guanylsäure aufbaut.

Zunächst sei folgende Beobachtung mitgeteilt: Kocht man nach Bang das Nucleoproteid mit verdünnter Natronlauge (Natriumsalze der Guanylsäure verhalten sich ebenso wie die Kaliumsalze), so erhält man nach Neutralisation jenes in Essigsäure unlösliche Salz der Guanylsäure. Behandelt man jedoch in genau der gleichen Weise die Drüsenmasse selbst, so bekommt man einen Körper, der, wie die Spaltung mir zeigte, auch guanylsaures Natrium war, der sich aber gegen Essigsäure ganz anders verhielt. Dieser Stoff war — im Gegensatz zu dem Bangschen Präparate — in Wasser ziemlich löslich, aber mit Essigsäure nicht fällbar, vielmehr entstand auf Zusatz von Essigsäure eine Gallerte; jedoch war der Körper fällbar durch Zusatz von Salzen und z. B. mit Natriumacetat leicht aussalzbar (charakteristisches Verhalten). Durch Alkohol-fällung wurde aus der essigsäuren Lösung das Steudelsche gelatinierende saure Salz erhalten. Die Analyse zeigte weiter, daß das Salz vor der Essigsäurebehandlung das neutrale guanylsaure Natrium war, welches mithin mit Essigsäure gar nicht fällbar ist, sondern damit sofort das gelatinierende saure Salz bildet.

Was ist nun aber die Bangsche in Essigsäure unlösliche Form? Die Unterschiede in den Präparaten, die das eine Mal nach Bang aus dem Nucleoproteid, das andere Mal direkt aus der Drüsenmasse hergestellt wurden, sind doch sehr eigenartig. Warum ist das durch alkalische Hydrolyse des Proteids gewonnene Produkt fällbar mit Essigsäure und in dieser unlöslich, während der in genau derselben Weise aus der Drüsenmasse selbst dargestellte Körper leicht löslich in Essigsäure ist?

Ich versuchte nun, ob es gelingen könnte, die eine Form in die andere, oder umgekehrt, überzuführen. Bang ist z. B. der Ansicht, daß ähnlich wie eine a- und b-Nucleinsäure, so auch eine a- und b-Guanylsäure existiere¹⁾, und daß letztere durch alkalische Hydrolyse aus der ersteren gewonnen werden könne. Die a-Form soll mit Essigsäure nicht fällbar sein, wohl aber die b-Form.

Ich versuchte also durch Kochen mit Natronlauge das in Essigsäure lösliche in das unlösliche Präparat umzuwandeln und umgekehrt; jedoch ohne den geringsten Erfolg. Das (nach Neutralisation des Alkalis mit Essigsäure) durch Alkohol-fällung zurückgewonnene Salz der Guanylsäure hatte sich hinsichtlich seines Verhaltens zu Essigsäure nicht verändert. Dagegen gelang es sofort, auch ohne Hydrolyse die unlösliche in die lösliche Modifikation überzuführen, wenn die unlösliche (Bangsche) Form in sehr verdünnter Natronlauge gelöst und in alkalischer Reaktion mit Alkohol umgefällt wurde. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, das Alkali durch Essigsäure neutralisiert und dann mit Alkohol gefällt: Das so aus der unlöslichen Form gewonnene guanylsaure Natrium war nunmehr leicht löslich in Essigsäure unter Gallertbildung und gab viel bessere Analysenzahlen, wie die in Essigsäure unlösliche Form.

Dieser Versuch kann nur in folgender Weise erklärt werden: Das nach der Bangschen Vorschrift gewonnene, in Essigsäure unlösliche Produkt ist kein reines Alkalisalz, sondern enthält noch eine salzartig gebundene basische Verunreinigung. Dieses Salz ist in Essigsäure unlöslich und damit fällbar. Bringt man dieses Rohprodukt in Natronlauge zur Lösung, so bildet sich das reine Natriumsalz und die basische Verunreinigung wird durch die starke Natronlauge freigemacht. Wird die alkalische Lösung nun mit Essigsäure neutralisiert, bzw. angesäuert, so bildet sich nicht etwa das reine guanylsaure Natrium, auch nicht sofort das reine saure Salz, sondern zum Teil noch das in Essigsäure unlösliche Salz

¹⁾ Hofmeister, Beiträge Bd. 4, S. 175.

der basischen Verunreinigung in derselben Weise, wie z. B. thymonucleinsaures Natrium in reinem Zustande mit Essigsäure nicht fällbar ist, wohl aber in Gegenwart von manchen als Base wirkenden Stoffen (Eiweiß, Zersetzungsprodukte des Eiweißes). Erst durch öfteres Auflösen in Alkalilauge und Wiederausfällen mit Essigsäure geht die basische Verunreinigung verloren, und man erhält so allmählich das reine Salz, das sich überhaupt nicht mehr mit Essigsäure fällen läßt; denn es entsteht in essigsaurer Reaktion das reine gelatinierende saure guanylsaure Alkalisalz.

Wird nun aber die alkalische Lösung des in Essigsäure unlöslichen Rohproduktes nicht mit Essigsäure, sondern mit Alkohol gefällt, so bekommt man (nach Abstumpfen des Alkalis im Niederschlage) sofort das reine neutrale guanylsaure Natrium, denn die basische Verunreinigung bleibt in der alkoholischen Mutterlauge. Dieses reine Produkt des guanylsauren Natriums gibt dann mit Essigsäure sofort das nicht fällbare lösliche gelatinierende saure Salz.

Aus dem Dargelegten geht hervor, daß die Methode von Bang zur Darstellung von reiner Guanylsäure nicht geeignet ist, daß sie vielmehr durch eine Fällung mit Alkohol aus alkalischer Lösung ergänzt werden muß. Weiter zeigte sich aber, daß bei der alkalischen Hydrolyse des Proteids noch eine Nucleinsäure vom Typus der echten frei wird. Von ihrem Natriumsalz kann man das guanylsaure Natrium vorzüglich trennen durch Ausflocken mit Natriumacetat, bzw. durch Umscheiden des guanylsauren Natriums aus heißer Natriumacetatlösung, in der das Natriumsalz der echten Nucleinsäure leicht löslich ist. Eine Verunreinigung des guanylsauren Natriums durch die echte Nucleinsäure erkennt man an der optischen Rechtsdrehung; denn Guanylsäure dreht nach Levene schwach links, Nucleinsäure aber stark rechts; so gibt auch Bang in seinen unreinen Präparaten Rechtsdrehung an.

Berücksichtigt man die leichte Aussalzbareit des guanylsauren Natriums mit Salzen, so erkennt man, daß man sehr leicht folgender Täuschung unterliegen kann:

Löst man reines (also in Essigsäure unter Gelatinieren

lösliches) guanylsaures Natrium in Natronlauge, und säuert die alkalische Lösung mit Essigsäure an, so erhält man unter Umständen einen Niederschlag, und es sieht so aus, als ob Guanylsäure in der Tat mit Essigsäure fällbar sei. Diese Fällung wird aber nicht durch die Essigsäure bewirkt, sondern durch das bei der Neutralisation gebildete Natriumacetat hervorgerufen; denn, trennt man den Niederschlag von der natriumacetathaltigen Mutterlauge, so erweist er sich als löslich in verdünnter Essigsäure. Die Ergiebigkeit der Fällung ist dabei abhängig von der Menge des gebildeten Natriumacetats. Mir scheint, daß dieses Verhalten mit zu den irrigen Vorstellungen von dem Verhalten der Guanylsäure beigetragen hat. Daß die Guanylsäure, aus dem Proteid gewonnen, anfänglich mit Essigsäure fällbar ist, verdankte Bang mithin lediglich einem Zufall, und schon geringe Abweichungen von seiner Darstellungsmethode ergaben unübersichtliche Schwierigkeiten.

Im folgenden sollen die Eigenschaften der Guanylsäure bzw. ihrer Alkalisalze noch einmal zusammengestellt werden.

Das neutrale guanylsaure Natrium ist in kaltem Wasser ziemlich, in heißem sehr leicht löslich. Durch Salze (Natriumacetat) wird es in der Kälte fast vollständig wieder abgeschieden, in heißer 20%iger Natriumacetatlösung ist das guanylsaure Natrium in Siedehitze leicht löslich, beim Erkalten scheidet es sich in guter Ausbeute flockig aus. (Als Reinigungsmethode zu empfehlen.)

Auf Zusatz von Natronlauge löst sich in Wasser suspendiertes guanylsaures Natrium sehr leicht auf. Aus der alkalischen Lösung ist es durch Salze nicht mehr abzuscheiden. Es scheint, daß ein Molekül NaOH mit dem Guaninkomplexe eine Salzbindung eingeht; Alkohol fällt aus alkalischer Lösung sirupös, aus neutraler Reaktion jedoch flockig aus.

Auf Zusatz von Mineralsäuren löst sich in Wasser suspendiertes guanylsaures Natrium leicht auf unter Bildung der freien Guanylsäure, die nicht gelatiniert.

Gibt man zu in Wasser suspendiertem guanylsauren Natrium Essigsäure, so löst es sich ebenfalls leicht auf, je-

doch unter Gelatinieren der gesamten Flüssigkeit infolge Bildung des sauren Salzes. Alkohol fällt die Gallerte als saures Salz in langen fibrinartigen fadenähnlichen Flocken, die sich in Wasser wieder zu einer Gallerte lösen.

Die freie Säure dreht nach Levene schwach links. Die Alkalisalze ebenfalls. Durch freies Alkali wird die Drehung nicht verändert, im Gegensatze zu den Nucleinsäuren vom Typus der echten, deren Na-Salz in Gegenwart von NaOH optisch inaktiv wird¹⁾.

Das weitere Studium der Verhältnisse im Pankreasproteid ließ erkennen, daß bei der alkalischen Hydrolyse neben Guanylsäure auch eine Nucleinsäure vom Typus der echten frei wird. Es ergab sich die wichtige Tatsache, daß diese beiden Nucleinsäuren in molekularen Gewichtsverhältnissen im Proteid vorkommen. Über den Schluß, den man daraus ziehen kann, und seine präparative Verwirklichung werde ich in der nächsten Arbeit berichten.

Experimenteller Teil.

Darstellung der Guanylsäure.

- a) Darstellung des Rohproduktes der gemischten Nucleinsäuren.

100 g Nucleoproteid aus der Pankreasdrüse des Rindes (gewonnen durch Auskochen der zerkleinerten Drüsenmasse und Fällen des Filtrates mit dem doppelten Volumen Alkohol) werden in 2 Litern Wasser suspendiert, im siedenden Wasserbade gelöst, die Lösung auf über 90° erhitzt und 100 ccm 33%ige Natronlauge zugesetzt. Man versenkt den Kolben sofort wieder in das lebhaft siedende Wasserbad. Nach 1/2 Stunde kühlt man unter der Wasserleitung schnell auf etwa 50° ab, filtriert vom flockigen Niederschlage ab, löst im Filtrate 100 g Ammoniumchlorid auf und fällt mit 5 Litern 90%igem Alkohol. Unter heftigem Peitschen mit dem Rührstabe entsteht ein flockiger Niederschlag der Natriumsalze

¹⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 189.

der beiden Nucleinsäuren. Man läßt vollständig absitzen, trennt die Mutterlauge vom Niederschlage durch Dekantieren, entwässert letzteren durch Dekantieren mit starkem Alkohol, saugt ab und trocknet. Ausbeute an gemischten Nucleinsäuren etwa 30 g.

b) Reinigen durch Fällung aus alkalischer Lösung.

Das Rohprodukt (30 g) wird in 300 ccm heißem Wasser gelöst, zur heißen Lösung 15 ccm 33%ige Natronlauge zugesetzt, vom geringen flockigen Niederschlage abfiltriert, im Filtrate (zur besseren Ausfällung mit Alkohol) 30 g kristallisiertes Natriumacetat aufgelöst und die Na-Salze der gemischten Nucleinsäuren mit 1200 ccm 90%igem Alkohol gefällt. Das Natriumsalz der Pankreasnucleinsäure befindet sich dabei in inaktivem Zustande¹⁾. Die weiche Fällung, die man in einem geräumigen Kolben vornimmt, bleibt im schräg gestellten Kolben über Nacht stehen. Es kristallisiert ein Teil des Natriumacetats in dem sirupösen Niederschlage aus, wodurch die weiche Masse zusammengehalten wird, so daß man nunmehr die Mutterlauge leicht abgießen kann.

c) Trennung der beiden Nucleinsäuren.

Den im Kolben festsitzenden Niederschlag löst man in 150 ccm Wasser, neutralisiert gegen Lackmus genau mit Eisessig, setzt 15 g kristallisiertes Natriumacetat hinzu, bringt das inzwischen schon abgeschiedene guanylsaure Natrium durch Erwärmen wieder in Lösung und füllt die Lösung heiß in Zentrifugengläser, die über Nacht im Eisschrank stehen bleiben. Es hat sich dann das guanylsaure Natrium abgeschieden, während das pankreasnucleinsaure Natrium in Lösung geblieben ist. Nach dem Zentrifugieren gießt man die Flüssigkeit ab, rührt den Niederschlag mit 100 ccm 20%iger Natriumacetatlösung auf und löst ihn durch Einstellen des Zentrifugenglases in ein allmählich anzuheizendes Wasserbad. Nach mehrstündigem Stehen in Eis und Zentrifugieren wird die Operation des Umscheidens noch zweimal mit je 100 ccm 20%iger Natriumacetatlösung wiederholt.

¹⁾ Siehe voriges Zitat.

Aus den abzentrifugierten klaren Flüssigkeiten kann man durch Alkoholfällung das Natriumsalz der anderen Nucleinsäure gewinnen; jedoch werde ich in der folgenden Arbeit eine mildere Darstellungsmethode angeben.

Zum Entfernen des dem Niederschlage von guanylsaurem Natrium noch anhaftenden Natriumacetats löst man ihn, noch feucht in 150 ccm siedendem Wasser, kocht einmal auf, filtriert vom geringen Niederschlag ab und fällt das wasserhelle Filtrat in einem Kolben mit 450 ccm siedendem Alkohol. Man läßt in schräger Stellung des Kolbens absitzen, dekantiert, entwässert mit starkem Alkohol durch Dekantieren, saugt ab und trocknet. Ausbeute 8,7 g.

Zur völligen Reinigung wird das Präparat in der zehnfachen Menge heißen Wassers gelöst und wie vorhin behandelt. Ausbeute an analysenreinem guanylsaurem Natrium: 8,0 g = 8% des rohen Proteids.

Darstellung des sauren Salzes.

Ein Teil guanylsaures Natrium wird in zehn Teilen heißen Wassers gelöst, ein Teil Eisessig zugesetzt, schnell abgekühlt, und die Gallerte mit dem dreifachen Volumen Alkohol gefällt, durch Dekantieren mit starkem Alkohol entwässert und getrocknet. Zur Analyse wird das Präparat noch einmal in Wasser gelöst und mit Alkohol ausgefällt.

Die Frage, ob ein neutrales oder saures Salz vorliegt, wurde aus dem Verhalten der Asche der Präparate entschieden. Beim neutralen Salz kommen auf ein Molekül Phosphorsäure zwei Atome Natrium; als Asche erhält man also Natriumpyrophosphat. Im sauren Salze jedoch sind auf ein Molekül Phosphorsäure nur ein Atom Natrium vorhanden, die Asche besteht also hier aus leicht schmelzbarem Natriummetaphosphat. In der Tat wurden in den beiden Körpern die berechneten Mengen Pyrophosphat bzw. Metaphosphat gefunden.

Die Analysen wurden in lufttrocknen Präparaten ausgeführt und der Wassergehalt bei 100° über Phosphorpentoxyd bestimmt.

A. Neutrales Salz.

0,2470 g verloren beim Trocknen 0,0522 g Wasser
 0,2620 g entsprachen 25,3 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl)
 0,2610 g entsprachen 25,1 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl)
 0,1260 g entsprachen 13,7 ccm $n_{1/2}$ -Lauge (Neumann)
 0,3068 g lieferten 0,2606 g CO_2 und 0,1366 g H_2O
 0,5072 g lieferten durch Veraschen 0,1294 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

	berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_3\text{PNa}_2$	gefunden:
C	29,46 %	29,37 %
H	3,00	3,32
N	17,20	17,15; 17,08
P	7,62	7,64
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	31,43	32,34

B. Saures Salz.

0,1774 g verloren beim Trocknen 0,0256 g Wasser
 0,2424 g entsprachen 27,0 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl)
 0,1326 g entsprachen 16,9 ccm $n_{1/2}$ -Lauge (Neumann)
 0,1224 g entsprachen 15,6 ccm $n_{1/2}$ -Lauge (Neumann)
 0,3732 g lieferten durch Veraschen 0,0878 g NaPO_3

	berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_8\text{N}_3\text{PNa}$	gefunden:
N	18,18 %	18,23 %
P	8,06	8,25; 8,25
NaPO_3	26,48	27,49

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln aus der „Gräfin Bose-Stiftung“ ausgeführt.