

# Eine „gekoppelte“ Nucleinsäure aus Pankreas.

## I. Mitteilung.

Von

**Einar Hammarsten.**

Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts zu Stockholm.)  
(Der Redaktion zugegangen am 13. Januar 1920.)

Eine soeben erschienene Publikation in der Form einer vorläufigen Mitteilung von R. Feulgen<sup>1)</sup> über eine zusammengesetzte Nucleinsäure aus Pankreas zwingt mich, meine eigenen Resultate auf demselben Gebiete zu veröffentlichen.

Feulgen konnte nach enzymatischer Digestion vom  $\beta$ -Proteide aus Pankreas eine Nucleinsäure herstellen, die als Spaltungsprodukte Phosphorsäure, Lävulinsäure, Furfurol, Thymin, Cytosin, Guanin und Adenin gab. Nach Digestion in alkalischer Lösung konnte ein Alkalisalz der Guanylsäure mit Natriumacetat ausgefällt werden. Die Nucleinsäure war rechtsdrehend. Infolge dieser Befunde nimmt Feulgen an, daß seine Nucleinsäure eine molekuläre Verbindung zwischen Guanylsäure und Tetranucleotidsäure ist, und nennt sie „Guanylnucleinsäure“.

Schon im Januar 1919 hatte ich eine „Guanylnucleinsäure“ (Feulgen) aus Pankreas isoliert und näher beschrieben. Die Resultate wurden im Januar desselben Jahres als Manuskript den drei Sachkundigen für die Besetzung einer Laboratorstelle am hiesigen Institute zur öffentlichen Prüfung vorgelegt. Daß ich damals keine andere Publikation meiner

<sup>1)</sup> R. Feulgen, Diese Zeitschrift Bd. 107, S. 147 (1919).

Resultate vornahm, gründete sich auf meiner Abgeneigtheit, eine unvollständige Untersuchung zu veröffentlichen.

Meine Resultate stimmen in der Hauptsache mit denen von Feulgen überein, und der Umstand, daß wir offenbar ganz unabhängig voneinander auf verschiedenen Wegen gleichartige Ergebnisse gefunden haben, ist für mich eine sehr erfreuliche Bekräftigung.

Um ein Mißverständnis zu vermeiden, will ich zuerst eine ganz kurze Zusammenfassung der wichtigsten meiner Resultate geben, wie sie im Januar 1919 vorlagen.

Die Methode zur Gewinnung der von mir untersuchten Nucleinsäure war in derselben Form, wie sie unten beschrieben ist, ausgearbeitet. Die Calcium- und Natriumsalze und die entsprechende freie Säure waren analysiert worden. Den

Quotienten  $\frac{N}{P}$  hatte ich in dem Ca-Salze zu 1,9 bestimmt.

Nach der Hydrolyse waren Guanin, Adenin, Thymin (?), Cytosin und Pentose nachgewiesen. Der Quotient  $\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}}$  war = ungefähr 3 gefunden.

Nach Erwärmung sowohl einer neutralen als einer alkalischen Lösung des Alkalisalzes der Nucleinsäure fiel, nach Erkalten, bei neutraler Reaktion das Alkalisalz einer Nucleinsäure aus, die als Guanylsäure identifiziert worden war. In der Lösung befand sich eine Nucleinsäure, die ich nicht näher hatte charakterisieren können. Durch Bestimmung der Änderungen in Wasserstoffionenkonzentration, Leitwiderstand und Gefrierpunkt bei Erwärmung mit Kaliumhydratlösung war gezeigt, daß saure Affinitäten hierbei entstanden waren, d. h. daß eine Hydrolyse eingetreten war.

Im  $\beta$ -Proteid aus Pankreas (gewonnen nach O. Hammarsten) war der Quotient  $\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}}$  = ungefähr 3 gefunden.

Im folgenden sind diese Resultate (im Jahre 1918 gesammelt) mit denen, die später gewonnen sind, zusammengestellt.

Der vorliegenden Arbeit lag zuerst der Gedanke zu Grunde, natürliche Eiweiß-Nucleinsäureverbindungen (Nucleoproteide, Nucleine) aus Pankreas zu isolieren und zu fraktionieren, um dann die Nucleinsäuren aus den verschiedenen Fraktionen darzustellen. Es war dies das schon von mehreren Forschern geübte Suchen nach einer dritten „einfachen“ Nucleinsäure vom Typus der Guanyl- und Inosinsäuren.

Zu diesem Zwecke wurde „Trockenpankreas“ mit ganz schwacher Salzsäure (0,06 n) in der Kälte extrahiert und aus dem Ungelösten die vermuteten „Nucleine“ mit Alkali bei 0° in Lösung gebracht und mit Salzsäure gefällt. Die Fällung wurde durch Auflösung und Fällung gereinigt und mit Alkohol und Äther getrocknet. Das Präparat löste sich vollkommen klar in Alkali schon bei schwach saurer Reaktion. Eine neutrale Lösung des Präparates in Alkali nenne ich der Kürze wegen Nucleinlösung.

Langwierige Versuche, durch Aussalzungen der Nucleinlösung mit verschiedenen Neutralsalzen konstante Fraktionen zu bekommen, gaben indessen kein befriedigendes Resultat. Die höchsten Fraktionen mit Ammoniumsulfat zeigten doch etwas von Interesse. Von etwa 80% iger Sättigung mit diesem Salze bis zur vollständigen Sättigung fiel eine Substanz aus, die im Wasser leicht löslich war und von Säuren gefällt wurde. Sie gab keine Biuretreaktion, hatte (lufttrocken) einen hohen Phosphorgehalt (7,3%) und gab nach Hydrolyse mit Schwefelsäure starke Reaktionen auf Purinbasen. Eine Spaltung Nucleinsäure-Eiweißverbindungen war also herbeigeführt entweder durch die Salzsäure oder durch das Ammoniumsulfat. Die Nucleinsäure wurde nicht näher untersucht. Die Ausbeute war sehr schlecht, und inzwischen hatte ich gefunden, daß eine Nucleinsäure sich direkt aus der neutralen Nucleinlösung in reichlicher Menge durch Ausfällung mit Calciumchlorid isolieren ließ. Dieses schwerlösliche Calciumsalz der Nucleinsäure wurde auf verschiedene Weise gereinigt (s. u.) und daraus die freie Säure und ein Calcium-Natriumsalz hergestellt. Die drei Präparate zeigten alle einen Quotienten

$\frac{N}{P} = 1,88$ . Für die „ideelle“ Tetranucleotidsäure ist ja der Quotient  $\frac{N}{P} = 1,69$  und für die Guanylsäure  $= 2,26$ . Für eine Verbindung zwischen 2 Mol. Guanylsäure mit 1 Mol. Tetranucleotidsäure berechnet sich der Quotient  $\frac{N}{P} = 1,88$ .

Bei Erwärmung der Lösung des Alkalisalzes der Nucleinsäure mit 1%iger Natronlauge stieg die [H]-Konzentration und der el. Leitwiderstand der Lösung, während der Gefrierpunkt unverändert blieb, sichere Zeichen also einer Hydrolyse mit Entstehung saurer Gruppen. Beim Neutralisieren der Hydrolysenflüssigkeit fiel eine Substanz aus, die als Guanylsäure identifiziert werden konnte.

Aus den hier kurz zusammengefaßten Resultaten geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß die von mir untersuchte Substanz aus Guanylsäure und Tetranucleotidsäure, durch wirkliche chemische Bindung miteinander vereinigt, besteht. Möglicherweise sind hier 2 Mol. Guanylsäure an 1 Mol. Tetranucleotidsäure gebunden.

Eine eingehende Beschreibung der Versuche folgt unten.

### Experimenteller Teil.

Pankreasdrüsen von Rind wurden in situ unmittelbar nach dem Schlachten via Art. pancreatica mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült, um den größten Teil des Blutes zu entfernen. Die Drüsen wurden dann in einen Topf, der in einem Eimer mit Kältemischung steckte, gelegt. Nach der Heimkehr wurden die Drüsen von Fett und Lymphgewebe präpariert, zu einem Brei gemahlen und in 96%igen Alkohol eingelegt.

Der Alkohol wurde nach einer Stunde abgepreßt und die Masse aufs neue mit 96%igem Alkohol versetzt. In dieser Weise wurde die Drüsenmasse noch dreimal (nach 3, 12 und 24 Stunden) mit 96%igem Alkohol extrahiert. Dann wurde mit Äther zweimal behandelt, die Masse an der Luft getrocknet und durch eine Scheuermühle getrieben. Die Alkohol-Äther-

behandlung ist notwendig, um später filtrierbare Extrakte mit Natronlauge zu bekommen. 600 g von dem staubenden grauweißen Pulver wurden unter Umrührung mit 4 l 0,06 n. Salzsäure 24 Stunden bei  $+6^{\circ}$  extrahiert, das Ungelöste zu einem festen Kuchen gepreßt, mit 1 l Wasser ausgerührt und auf neue von Flüssigkeit scharf abgepreßt. Die feste Masse wurde mit 2 l Wasser von  $0^{\circ}$  angerieben und dann unter Kühlung des Extraktionsgefäßes und Umrührung nullgradige 0,06 n. Natronlauge in kleinen Portionen zugesetzt. Hierbei wurde genau eingehalten, daß die Temperatur niemals über  $+0,5^{\circ}$  stieg, und daß die Mischung im Extraktionsgefäß unmittelbar nach jedem Alkalizusatz nicht mehr als schwach blauviolette Farbenreaktion mit neutralem Azolithminpapier gab. (Diese war ungefähr dieselbe Reaktion, die von einem Gemenge aus 3 Teilen 0,1 n primärem und 7 Teilen 0,1 n. sekundärem Phosphate gegeben wird.) Während 4 Stunden wurden in allem 4400 ccm 0,06 n. Natronlauge zugesetzt. Die Flüssigkeit, die dann neutrale Reaktion zeigte, wurde durch dichte Leinwand abgeseiht. Das Filtrat war stark getrübt, von braungelber Farbe. Es wurde sofort auf doppelt gefaltete Filtra gegossen. Die Filtrierung wurde im Kälteraum bei  $0^{\circ}$  vorgenommen. Die Filtra wurden jeden Tag mit neuen vertauscht; auf diese Weise konnte das ganze Extrakt in 72 Stunden filtriert werden. Das Filtrat war strohgelb und fast ganz klar, hatte aber eine geringe nebelige Fällung abgesetzt. Diese wurde durch nochmalige Filtrierung in wenigen Minuten entfernt. Das völlig klare Filtrat, das keinen faulen oder dumpfen Geruch hatte, wurde mit 20 g 10%iger Salzsäure pro Liter versetzt. Hierbei entstand eine reichliche grobflockige weiße Fällung, die abzentrifugiert und in der Zentrifuge mehrmals mit 1%iger Essigsäure gewaschen wurde. Der Bodensatz wurde dann mit einem Liter nullgradigem Wasser ausgerührt und mit schwacher Natronlauge bis zur neutralen Reaktion versetzt. Die etwas trübe Flüssigkeit wurde nochmals bei  $0^{\circ}$  filtriert, das ganz klare Filtrat mit 20 g 10%iger Salzsäure gefällt, der Bodensatz mehrmals mit 1%iger Essigsäure und dann sechsmal mit 96%igem Alkohol in der Zentrifuge gewaschen. Zuletzt

wurde zweimal mit absolutem Alkohol und dann mehrmals mit Äther angerieben und jedesmal scharf abgenutscht. An der Luft getrocknet hatte das Präparat eine fast rein weiße Farbe. Es war scheinbar nicht hygroskopisch, in Wasser nicht, in Alkalien dagegen leicht, und schon bei saurer Reaktion, löslich. Eine 2%ige Lösung war völlig klar, von gelblicher Farbe und wurde von Essigsäure, Salzsäure und Calciumchloridlösung grobflockig gefällt.

Das Präparat (der Kürze wegen im folgenden Nuclein genannt) zeigte bei Zimmertemperatur keine Trypsinwirkung, was dadurch bewiesen wurde, daß die formoltitrierbare Stickstoffmenge in einer Lösung des Präparates, während 24 Stunden bei 20° gehalten, keine Änderung erwies.

Die Vernichtung des Trypsins wird durch die 0,06 n. Salzsäure auf Trockenpankreas erreicht, was durch folgende Versuche gezeigt wird.

Tabelle I.

Zeit: 2 × 24 Stunden.

Nr.	Trockenpankreas g	Fibrin g	Flüssigkeit ccm	N. im Filtrate mg
1	0,5	10	150 Wasser	51,6
2	0,5	—	150 0,06 n. Salzsäure	8,5
3	—	10	150 0,06 .. ..	9,8
4	0,5	10	150 0,06 .. ..	19,1
5	0,5	—	150 0,06 .. ..	23,0
6	0,5	—	150 0,06 .. ..	21,0
7	0,5	10	150 Wasser	342,0

Nach 24stündigem Stehen (Nr. 1—6 bei +6°, Nr. 7 bei +37°) wurden Nr. 2—6 mit Natronlauge neutralisiert. Zu Nr. 1 und 7 wurde dieselbe Menge Kochsalz, wie die in den anderen Proben gebildete, zugesetzt. Alle Proben wur-

den genau zu derselben Reaktion gegen Lakmus gebracht. Nr. 1—4 und 7 wurden aufgeköcht, 5 Minuten im Sieden gehalten, abgekühlt und mit Wasser auf 200 ccm gebracht. Nach 24stündigem Stehen bei  $+6^{\circ}$  wurden diese Proben filtriert und der Stickstoff bestimmt. Nr. 5 und 6 wurden nach den ersten 24 Stunden neutralisiert, mit 10 g Fibrin versetzt und 24 Stunden bei resp.  $+37^{\circ}$  und  $+6^{\circ}$  weiter digeriert, dann 5 Minuten gekocht, auf 200 ccm mit Wasser gebracht, filtriert und der Stickstoff in den Filtraten bestimmt. Die erhaltenen Stickstoffwerte sind natürlich nur als ungefähre zu beurteilen.

Trockenpankreas, Fibrin und Salzsäure gaben 19 mg Stickstoff. Der Wert Nr. 2 + Nr. 3 = 18 stimmte damit gut überein. Hier hatte keine Trypsinwirkung stattfinden können, und der Stickstoff stammte von direkt wasserlöslichen stickstoffhaltigen Verbindungen. In Nr. 1 wurden 52 mg N erhalten, also waren ungefähr 30 mg durch Trypsinwirkung in Lösung gebracht. Nr. 5 und 6 zeigten deutlich, daß die Trypsinwirkung nach Salzsäurebehandlung aufgehoben war. Von den gefundenen Stickstoffmengen kamen hier nur 2—4 mg auf die Rechnung der Digestion, Mengen, die sicher innerhalb der Fehlergrenzen lagen. Auf der Digestion kamen in Nr. 7 ungefähr 320 mg, was im Vergleiche damit, daß keine Differenz zwischen den Stickstoffwerten in Nr. 5 und 6 erhalten wurde, sicher bewies, daß die 24stündige Einwirkung der 0,06 n. Salzsäure bei  $+6^{\circ}$  das Trypsin völlig vernichtet hatte.

Bei der Filtrierung des mit Natronlauge bereiteten Extraktes (S. 145) aus Trockenpankreas wurden Formoltitrierungen alle 12 Stunden im Filtrate vorgenommen. In sämtlichen Proben wurde ganz derselbe Wert erhalten. Dies zeigt, daß keine Lösung von Peptidbindungen stattgefunden hatte. Durch die Vorsichtsmaßregeln, die ich bei der Bereitung von Trockenpankreas getroffen habe, glaube ich die Gefahr der Autodigestion in der Drüse auf ein Minimum reduziert zu haben. Durch die Behandlung mit Salzsäure wurde das Trypsin zerstört, und das Nuclein, das von aktivem Trypsin frei war, kann kein enzymatisches Digestionsprodukt sein.

Im Nuclein (lufttrocken) wurden Stickstoff und Phosphor bestimmt. Gefunden: 17,09% N; 5,61% P.

Ein Teil (I) von demselben Präparat wurde in Natronlauge, ein anderer Teil (II) in Ammoniak gelöst. Die Lösungen wurden mit Salzsäure in etwaigem Überschusse gefällt, die Fällungen mit Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet. Gefunden: I. 17,09% N; 4,69% P. II. 17,07% N; 5,15% P.

Auch in Präparaten von verschiedenen Herstellungen (mit derselben Methodik) variierte der Phosphorgehalt zwischen 4 und 5%. Der Stickstoffgehalt dagegen war konstant. Da jener in Nucleoproteiden und Nucleinsäuren große Differenz zeigt, dieser eine bedeutend kleinere, war es wahrscheinlich, daß das Präparat aus einem Gemenge eiweißreicher und eiweißarmer Nucleine oder sogar eiweißfreier Nucleinsäuren bestand.

Eine neutrale 2%ige Nucleinlösung in Natronlauge gab sehr starke Biuretreaktion mit blauvioletter Farbe und wurde unvollständig von Essigsäure, Salzsäure und salzsaurem Alkohol gefällt. Ammoniumsulfat fällt bei 25%iger Sättigung. Die Fällung nahm bis zu vollständiger Sättigung zu. Calciumchlorid- und Baryumchloridlösungen erzeugten starke Fällung.

Die Fällbarkeit mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde näher untersucht. Es zeigte sich, daß in einer 2%igen Nucleinlösung maximale Fällung nach Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  bis 0,5% erreicht wurde. 23% von der totalen Stickstoffmenge waren dann ausgefällt. Zusatz von mehr Calciumchloridlösung (bis zu 5%  $\text{CaCl}_2$  in Lösung) bewirkte keine weitere Fällung.

Es war für die Fällbarkeit gleichgültig, ob die Nucleinlösung schwach sauer oder schwach alkalisch reagierte. Die Kalkfällung (im folgenden A. genannt) wurde mit Wasser mehrmals gewaschen und dann mit Alkohol wiederholt angerieben und abgenutscht, bis 50 ccm des Filtrates nach Verdunstung des Alkohols keine Reaktion mehr auf  $\text{Ca}''$  oder  $\text{Cl}$  gab. 0,5 g von dem lufttrockenen Präparat A. wurde verglimmt und der Rückstand mit Salpetersäure extrahiert. Das Filtrat gab keine Spur einer  $\text{Cl}$ -Reaktion, enthielt aber reichliche Mengen  $\text{Ca}''$ .

Eine neutrale Nucleinlösung in Ammoniak wurde mit Calciumchloridlösung gefällt und die Fällung wie oben gewaschen und getrocknet. 1 g des Präparates wurde in 25 ccm einer 4%igen Sodalösung gelöst und der Ammoniakstickstoff nach Folin bestimmt. Gefunden: 0,9 mg N.

Wenn A. mit Wasser angerieben wurde, reagierte die Flüssigkeit neutral gegen Lackmus, und durch Zusatz von 1 Tropfen 0,1 n. Natronlauge zu 10 ccm wurde die Reaktion deutlich alkalisch.

Aus den Filtraten der Kalkfällungen wurde mit Alkohol ein Niederschlag erhalten, der sich ebenfalls wie ein neutrales Calciumsalz verhielt. Von dieser Substanz (Restsubstanz) wird in einer zweiten Mitteilung die Rede sein.

Neutrale Natrium- und Ammoniumsalze von dem Nuclein gaben also mit  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{BaCl}_2$  verhielt sich ebenso) eine doppelte Umsetzung unter Bildung von neutralen Calciumsalzen und Natriumchlorid resp. Ammoniumchlorid. Die Substanz A. löste sich leicht in 1%iger Natronlauge. Diese Lösung gab noch eine schwache Biuretreaktion. A. wurde mit 2%iger Essigsäure mehrmals angerieben und in der Zentrifuge gewaschen. Reichliche Mengen Calciumacetat gingen in Lösung, aber es gelang nicht, in dieser Weise allen Kalk zu entfernen. Wenn A. mit 2%iger Essigsäure dreimal extrahiert war, löste es sich doch vollständig in Natronlauge bei neutraler Reaktion. Diese Lösung wurde mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gefällt, die Fällung vielmals mit 1%iger  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in der Zentrifuge gewaschen. Der Bodensatz gab nun, in Natronlauge gelöst, nicht die Spur einer Biuretreaktion. Jetzt wurde durch Waschen mit 96%igem Alkohol das Calciumchlorid völlig entfernt und nach Ätherbehandlung an der Luft getrocknet. Das Präparat ( $A_1$ ) wurde teils zur Analyse gebraucht, teils weiter gereinigt. Aus  $A_1$  wurde durch Extraktion mit Essigsäure, Lösung in Natronlauge und Fällung mit Calciumchloridlösung (hierbei wurden 93% des Stickstoffes gefällt) zwei Präparate ( $A_2$  und  $A_3$ ) gewonnen (resp. drei- und viermal mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt). Ein Teil von  $A_1$  wurde nach Essigsäurebehandlung in Natronlauge bei neutraler Reaktion gelöst und

mit 2 Vol. Alkohol, der 0,2% Salzsäure enthielt, gefällt. Die Fällung wurde rasch abzentrifugiert, mit Wasser zweimal und dann mehrmals mit Alkohol gewaschen. Nach Ätherbehandlung wurde an der Luft getrocknet. Das Präparat (B<sub>1</sub>) wurde teils zur Analyse gebraucht, teils weiter gereinigt. Durch zweimalige Auflösung und Fällung mit salzsaurem Alkohol wurde ein Präparat (B<sub>2</sub>) gewonnen. Das Calciumsalz der Nucleinsäure löste sich leicht in Kochsalzlösung. Ein Teil von A<sub>3</sub> wurde mit 10%iger Kochsalzlösung angerührt. Die Lösung wurde von einem sehr unbedeutenden dunkelgefärbten Rest abfiltriert und dann mit 4 Vol. Alkohol gefällt. Die Fällung wurde mehrmals mit Alkohol gewaschen, dann mit Äther behandelt und an der Luft getrocknet. Das rein weiße Pulver wurde in Wasser klar gelöst und nochmals mit Alkohol gefällt, mit 96%igem Alkohol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Präparat wird C. genannt.

Es waren also die aus Tabelle II ersichtlichen Präparate gewonnen.

50 g Nuclein wurden mit 5%iger Schwefelsäure während 5 Stunden in strömendem Wasserdampf von 100° hydrolysiert. Die Flüssigkeit wurde filtriert, der Gehalt an Schwefelsäure im Filtrat mit Ammoniak bis auf 1% abgestumpft, noch heiß mit Ammoniumsulfat gesättigt und von abgeschiedenen dunkelgefärbten Albumosen filtriert. Diese wurden in heißer 1%iger Schwefelsäure gelöst, die Lösung mit Ammoniumsulfat gesättigt und filtriert. Die beiden Filtrate wurden vereinigt.

Durch direkte Versuche habe ich mich davon überzeugt, daß die Purinbasen aus einer eiweißhaltigen Hydrolysenflüssigkeit in dieser Weise quantitativ in den Filtraten bleiben, und daß sie daraus nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser vollständig mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt werden.

Die Filtrate waren licht strohgelb. Sie wurden mit Wasser verdünnt, stark ammoniakalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Die Silberfällung wurde abgenutscht, gewaschen und daraus die Purinbasen in üblicher Weise frak-

Tabelle II.

	Gefällt mit	Farbe	Löslichkeit	Fällbarkeit
<b>Nuclein</b>	Salzsäure zweimal	weiß mit Stich ins Graue	fast unlöslich in Wasser. Leicht löslich in Alkalien	wurde unvoll- ständig von Essigsäure, Salzsäure u. Calciumchlor- id gefällt
<b>Neutrales Kalksalz</b>				
A <sub>1</sub>	CaCl <sub>2</sub> zweimal	weiß mit leich- tem Stich ins Graue	fast unlöslich in Wasser, 2%iger Es- sigsäure und 0.2%ig. Salz- säure. In 10- %iger Koch- salzlösung klar löslich	
A	CaCl <sub>2</sub> dreimal	ebenso		
A <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> viermal	ebenso		
<b>Freie Säure</b> (enthält et- was Kalk)				
B <sub>1</sub>	salzsaurem Alkohol ein- mal	weiß mit leich- tem Stich ins Graue	unlöslich in Wasser. Leicht löslich bei noch sau- rerer Reaktion in Natron- lauge. Eine 2%ige Lö- sung stroh- gelb, eine 10- %ige dunkel- braun	mit Essigsäure erst bei etwa 5% in der Lösung Opal- escenz. Salz- säure und CaCl <sub>2</sub> -lösung fällten fast vollständig
B <sub>2</sub>	salzsaurem Alkohol drei- mal	ebenso		
<b>Doppelsalz von Calcium und Natrium</b>				
C	Alkohol zwei- mal	rein weiß	leicht und völ- lig klar in Wasser und 20%igem Natriumacet- tat löslich. Eine 5%ige Lösung stroh- gelb	Essigsäure fällte erst bei 10% Säure in der Lösung. Salzsäure u. CaCl <sub>2</sub> -lösung fällten fast vollständig

tioniert. Das Guanin, zweimal mit Ammoniak gefällt, wurde aus seiner Lösung in Natronlauge mit Essigsäure gefällt. Das Adeninpikrat wurde zweimal aus der Lösung in Natronlauge durch Zusatz der berechneten Menge Salzsäure ausgeschieden. Aus dem Filtrate der ersten Fällung des Adenins als Pikrat blieb eine so äußerst geringe Menge Purinbasen zurück, daß Xantin und Hypoxantin nicht vorhanden sein konnten. Die Präparate wurden, über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet, analysiert.

Guanin: 0,0476 g entsprachen 21,98 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl).

N, gefunden 46,18%; berechnet 46,36%.

Adeninpikrat: 0,3950 g wurden in Alkali gelöst, die Lösung mit Schwefelsäure sauer gemacht und die Pikrinsäure vollständig mit Äther ausgeschüttelt, der Äther mit Wasser geschüttelt und in Zehnteln der wäßrigen Auszüge der Stickstoff bestimmt. Sie entsprachen 7,60; 7,59; 7,60 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl).

N, gefunden 19,24%; berechnet (auf Adenin) 19,24%.

Das Präparat schmolz (Bloc. Maq.) in 5 Sekunden bei 280°.

30 g von A<sub>1</sub> wurden wie oben mit 5% iger Schwefelsäure hydrolysiert, die Flüssigkeit filtriert und mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherauszuge konnte Lävulinsäure in geringer Menge als Silbersalz isoliert werden.

0,1769 g gaben 0,0113 g AgCl.

Ag, gefunden 48,08%; berechnet 48,43%.

Der Rest der Hydrolysenflüssigkeit wurde in üblicher Weise auf Purin- und Pyrimidinbasen untersucht. Guanin, Adenin- und Cytosinpikrat wurden isoliert. Die Thyminfraktion ging verloren. Doch wurden aus dem Ätherauszug (s. oben) typische Thyminkristalle erhalten (mikroskopischer Nachweis), und A<sub>1</sub> wie auch B und C gaben beim Erhitzen kristallinische Sublimate, die in Alkohol und Wasser löslich waren.

Guanin, in Natronlauge zweimal gelöst und mit Essigsäure gefällt, über Schwefelsäure im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet: 0,0261 g entsprachen 12,09 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl).

N, gefunden 46,32%; berechnet 46,36%.

Adeninpikrat (einmal umkristallisiert, wie oben getrocknet): aus 0,4731 g wurde wie oben die Pikrinsäure entfernt und in Zehnteln der Lösung der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Zwei Portionen entsprachen 9,05 und 9,10 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung.

N, gefunden 19,18%; berechnet (auf Adenin) 19,24%.

Das Präparat schmolz auf Bloc. Maq. in 5 Sekunden bei 281°.

Cytosinpicrat (einmal umkristallisiert, wie die vorigen Präparate getrocknet): 0,1008 g gaben 0,1295 g CO<sub>2</sub> und 0,0223 g H<sub>2</sub>O (Dennstedt); 0,0469 g entsprachen (nach Ausschütteln der Pikrinsäure) 5,75 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl).

%	Gefunden	Berechnet
C	35,05	35,26
H	2,48	2,37
N <sup>1)</sup>	12,26	12,36.

Ungefähr 4 g von A<sub>1</sub> wurden in Natronlauge gelöst und in einer Probe der Stickstoff bestimmt. Der totale Stickstoffgehalt war = 763,5 mg. Die Lösung wurde neutralisiert und mit 5%iger Schwefelsäure in 100%igem Wasserdampf 5 Stunden hydrolysiert. Nach Neutralisieren wurde filtriert und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Die Fällung wurde gewaschen und mit Salzsäure zersetzt. Nach nochmaliger Fällung und Zersetzung wurde das salzsaure Filtrat unter Zusatz von Wasser dreimal im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und die warme Lösung (150 ccm) mit Ammoniak bis auf 3% versetzt. Nach 24stündigem Stehen im geschlossenen Gefäß wurde vom Guanin abfiltriert, dieses mit 3 × 10 ccm 3%igem Ammoniak gewaschen und in Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure sauer gemacht und das Guanin mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt (Guaninfraktion). Filtrat und Waschammoniak von der Fällung des Guanins mit 3%igem Ammoniak (180 ccm) wurden mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt (Adeninfraktion).

Die beiden Silberfällungen wurden mit Salzsäure zersetzt und aus jedem Filtrate zwei Proben genommen. Aus der Guaninlösung (300 ccm) 2 × 10 ccm und aus der Adeninlösung (100 ccm) 2 × 10 ccm. Die vier Proben wurden mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, die Fällungen mit 10 × 5 ccm 1%igem Ammoniak gewaschen, in Wasser suspendiert und, nach Zusatz von Natriumkarbonat, der Ammoniakstickstoff nach Folin vollständig ausgetrieben. In den Rückständen wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Proben

<sup>1)</sup> Auf Cytosin berechnet.

der Guaninfraktion entsprachen 13,15 und 13,19 ccm, die der Adeninfraaktion 14,72 und 14,66 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung. Nach Wulff<sup>1)</sup> lösen 100 cmm 3%iger Ammoniak 0,015 g Guanin. Eine entsprechende Korrektur für das im Filtrate der ersten Guaninfällung in der Lösung gebliebene Guanin war deshalb notwendig. In den 180 ccm müßten nach Wulff 12,52 mg Stickstoff als Guanin vorhanden gewesen sein. Von den 763,5 mg Stickstoff waren also 407,6 mg als Guanin und 134,4 mg als Adenin gefunden. Der Quotient  $\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}}$  war demnach  $\frac{0,8792}{0,2592} = 3,39$ . Die in den Purinbasen gebundene Stickstoffmenge (541 mg) entsprach ungefähr 71% der totalen Stickstoffmenge (763,5 mg). Natürlich können die gefundenen Werte für Guanin und Adenin keineswegs als genaue betrachtet werden. Sie geben doch eine ungefähre Vorstellung über das Verhältnis zwischen Guanin und Adenin, was durch direkte Versuche bestätigt werden konnte.

Guanin und Adenin (bei Analyse resp. 46,20 und 51,86% N [Kjeldahl] gefunden) wurden jedes für sich mit Schwefelsäure in Lösung gebracht. Die Guaninlösung enthielt in allem 40,07 mg N; die Adeninlösung 29,0 mg. Die Lösungen wurden vereinigt, mit Schwefelsäure bis 5% versetzt und 5 Stunden in 100%igem Wasserdampf gewärmt, dann Guanin und Adenin wie oben beschrieben nach Ausfällung als Silberverbindungen usw. getrennt.

Gefunden: 38,07 mg Guanin-N und 26,14 mg Adenin-N.

$$\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}} = \frac{0,0821}{0,0504} = 1,63;$$

Berechnet:  $\frac{0,0864}{0,0559} = 1,55$ ; Verluste = 7% des totalen N.

Es wurde eine Mehrzahl Fraktionierungen der Purinbasen in verschiedenen Präparaten ausgeführt. Der Analysengang war ganz derselbe, der oben beschrieben ist. Versuche wurden auch gemacht, das Verhältnis zwischen Guanin und Adenin

<sup>1)</sup> C. Wulff, Beiträge zur Kenntnis der Nucleinsäure, Diese Zeitschr. Bd. 17, S. 505 (1892).

in O. Hammarstens  $\beta$ -Proteid und in Umbers<sup>1)</sup> Proteid zu bestimmen. Die Silberverbindungen der Purinbasen aus diesen Substanzen wurden aus der mit Ammoniumsulfat gesättigten Hydrolysenflüssigkeit gefällt.

Der totale Gehalt an Basenstickstoff wurde auch direkt bestimmt. Dabei wurde, wie früher angegeben, hydrolysiert, die Silberverbindungen der Purinbasen ausgefällt, die Fällungen gewaschen, mit Salzsäure zersetzt, das Filtrat dreimal im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand in Wasser gelöst, nochmals mit Silber aus ammoniakalischer Lösung gefällt, die Fällung mit 1%igem Ammoniak gewaschen, in Sodalösung suspendiert, aller Ammoniakstickstoff nach Folin ausgetrieben und im Rückstand der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt (s. Tab. III).

10 g von B<sub>2</sub> (S. 150) wurden nach Steudel mit Salpetersäure (20 ccm) von spez. Gewicht 1,02 bei 0° versetzt. Nach sechstägigem Stehen bei 0° wurden die Purinbasen in üblicher Weise fraktioniert. Das Adenin wurde zweimal mit Ammoniak von Guanin gereinigt. Das Guanin und das Adeninpikrat wurden nur einmal gefällt und nicht weiter gereinigt, dann über Schwefelsäure im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

Gefunden: Guanin 1,2087 g (ohne Korr. für das in der ammoniakalischen Mutterlauge gelöste Guanin); Adeninpikrat 1,0894 g (0,4041 g Adenin entsprechend).

Ungefähr 4 g gaben 407,6 mg Guanin-N und 134,4 mg Adenin-N:  
0,8792 g Guanin, 0,2592 g Adenin.

1,6828 g (231,7 mg Tot.-N) gaben 133,1 mg Guanin-N und 49,32 mg Adenin-N: 17,06 % Guanin, 5,65 % Adenin; Purinbasen-N = 78,70 % des totalen N.

1,1754 g (161,9 mg Tot.-N) gaben 99,19 mg Guanin-N und 31,94 mg Adenin-N: 18,22 % Guanin, 5,24 % Adenin; Purinbasen-N = 81,0 % des totalen N.

0,9866 g (135,9 mg Tot.-N) gaben 84,34 mg Guanin-N und 27,18 mg Adenin-N: 18,44 % Guanin, 5,31 % Adenin; Purinbasen-N = 82,06 % des totalen N.

<sup>1)</sup> Umber F., Zeitschr. f. klinische Medizin Bd. 40, S. 464 (1900).

0,5584 g (76,89 mg Tot.-N) gaben 59,96 mg Purinbasen-N: 78,0 %  
des totalen N.

0,8351 g (115,0 mg Tot.-N) gaben 92,75 mg Purinbasen-N: 80,7 %  
des totalen N.

0,6590 g (90,7 mg Tot.-N) gaben 73,86 mg Purinbasen-N: 81,4 %  
des totalen N.

0,4791 g (65,97 mg Tot.-N) gaben 49,15 mg Purinbasen-N: 74,5 %  
des totalen N.

C.

1,6757 g (236,1 mg Tot.-N) gaben 127,4 mg Guanin-N und 45,9 mg  
Adenin-N: 16,40 % Guanin, 5,28 % Adenin; Purinbasen-N =  
73,4 % des totalen N.

2,0481 g (288,6 mg Tot.-N) gaben 158,8 mg Guanin-N und 56,3 mg  
Adenin-N: 16,72 % Guanin, 5,30 % Adenin; Purinbasen-N =  
74,5 % des totalen N.

Ein Präparat des  $\beta$ -Proteides gab 128,9 mg Guanin-N und 44,4 mg  
Adenin-N; Guanin = 0,2781 g, Adenin = 0,0856 g.  $\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}} = 3,25$ .

Umbers Proteid gab: 217,1 mg Guanin-N und 88,2 mg Adenin-N;  
Guanin = 0,4683 g, Adenin = 0,1702 g.  $\frac{\text{Guanin}}{\text{Adenin}} = 2,75$ .

In A<sub>1</sub> wurde der Gewichtsverlust beim Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im  
Vakuum bei Zimmertemperatur bestimmt. Nach zwei Wochen Zeit war  
das Gewicht konstant und verblieb unverändert in sechs Monaten.

1,7928 g verloren in sechs Monaten 0,2770 g = 15,45 % H<sub>2</sub>O.

0,3678 g .. .. . 0,0571 g = 15,52 % ..

0,2926 g .. .. . 0,0456 g = 15,58 % ..

0,1840 g .. .. . 0,0281 g = 15,27 % ..

Bei Bestimmungen der Gehalte an Stickstoff, Phosphor, Pentose und  
Calcium in verschiedenen Präparaten wurden folgende Werte erhalten:

A<sub>1</sub>.

0,1076 g entsprachen 14,81 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl)  
= 13,76 % N.

0,0981 g entsprachen 13,52 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl)  
= 13,78 % N.

0,0714 g entsprachen 9,83 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl)  
= 13,77 % N.

0,2891 g gaben 0,0767 g Mg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> <sup>1)</sup> = 7,40 % P.

0,2717 g .. 0,0700 g .. = 7,18 % P.

0,3106 g .. 0,0820 g .. = 7,36 % P.

<sup>1)</sup> Nach Schmelzen mit Kaliumhydrat und Kaliumnitrat und Fällung  
nach Woy, Chem. Ztg. Bd. 21, S. 442, 469 (1897).

2,5308 g gaben nach Destillation mit Salzsäure<sup>1)</sup> 0,5797 g Furfurolphloroglucid = 23,17 % Pentose.

0,4624 g gaben (Schmelzen mit Kaliumhydrat, Fällung der Phosphorsäure nach der Acetatmethode<sup>2)</sup> und des Calciums als Oxalat) nach Glühen des Calciumoxalates 0,0376 g CaO = 5,81 % Ca.

0,6464 g gaben nach entsprechender Behandlung 0,0523 g CaO = 5,78 % Ca.<sup>3)</sup>

B<sub>1</sub>.

0,0750 g entsprachen 11,19 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 14,92 % N.

0,0664 g entsprachen 9,91 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 14,92 % N.

0,2810 g gaben 0,0791 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Woy) = 7,85 % P.

0,2747 g „ 0,0769 g „ „ = 7,80 % P.

B<sub>2</sub>.

0,0694 g entsprachen 10,24 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 14,76 % N.

0,0843 g entsprachen 12,81 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 15,20 % N.

0,0876 g entsprachen 13,09 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 14,94 % N.

0,2382 g gaben 0,0676 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Woy) = 7,91 % P.

0,2771 g „ 0,0792 g „ „ = 7,97 % P.

1,2080 g „ nach Destillation mit Salzsäure 0,3020 g Furfurolphloroglucid = 25,50 % Pentose.

C.

0,0892 g entsprachen 12,45 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 13,96 % N.

0,0711 g entsprachen 10,13 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl) = 14,25 % N.

0,2270 g gaben 28,0 ccm N (bei 739,0 mm Hg und 20°) (Dumas) = 13,97 % N.

0,2998 g gaben 37,1 ccm N (bei 750,0 mm Hg und 21°) (Dumas) = 14,18 % N.

0,2455 g gaben 0,0675 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Woy) = 7,66 % P.

0,3672 g „ 0,0979 g „ „ = 7,43 % P.

0,3302 g „ 0,0888 g „ „ = 7,50 % P.

1,1357 g „ nach Destillation mit Salzsäure 0,2867 g Furfurolphloroglucid = 25,76 % Pentose.

<sup>1)</sup> Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. II, S 130.

<sup>2)</sup> Treadwell, Kurzes Lehrbuch der Analytischen Chemie Bd. II. S. 381 (1917).

<sup>3)</sup> Die Calciumbestimmungen wurden an getrockneter Substanz (S. 156) ausgeführt.

Tabelle III.

Präparate	N in %	P in %	H <sub>2</sub> O in %	Ca in % auf ge- trockn. Sub- stanz be- stimmt	Gua- nin in %	Adenin in %	Purinbas.-N. in % des totalen N.	Pen- tose in %
A <sub>1</sub>	13,76	7,40	15,45	5,78	17,06	5,65	71,0; 78,7	
	13,78	7,18	15,52		18,22	5,24	81,0; 82,1	
	13,77	7,36	15,58	5,81	18,44	5,31	78,0; 80,7	
	13,77	7,31	15,46	5,80	17,91	5,40	81,4; 74,5	23,17
B <sub>1</sub>	14,92	7,85						
	14,92	7,80						
	14,92	7,83						
B <sub>2</sub>	14,76	7,91						
	15,20	7,97						
	14,94							
	14,96	7,94			12,09	4,04		25,50
C	13,96	7,66			16,40	5,28	73,4	
	14,25	7,43						
	13,97	7,50			16,72	5,30	74,5	
	14,18							
	14,09	7,53			16,56	5,29	74,0	

Ehe ich zur Diskussion der gefundenen Werte gehe, muß ich ausdrücklich hervorheben, daß ich natürlich keine Formel der untersuchten Nucleinsäure, nicht einmal mit Wahrscheinlichkeit, geben kann. Wenn ich trotzdem eine Formel aufstelle, will ich damit nur eine mögliche Gruppierung und ein Mengenverhältnis der Bestandteile angeben, das mit den gefundenen Werten sich einigermaßen vereinigen läßt.

Das Verhältnis zwischen Stickstoff und Phosphorsäure war konstant in den verschiedenen Präparaten, was durchaus dafür spricht, daß eine einheitliche Substanz vorlag. Wie schon hervorgehoben, stimmt der Quotient  $\frac{N}{P} = 1,88$  weder

Tabelle IV.

Präparate	N P	Guanin	Pentose
		Adenin	N
A <sub>1</sub>	1,88	3,02	1,68
		3,48	
		3,47	
		3,32	
B <sub>1</sub>	1,90		
B <sub>2</sub>	1,88	2,99	1,70
C	1,87	3,11	1,83
		3,15	
		3,13	
Mittel	1,88	3,15	1,74

mit dem der gewöhnlichen Tetranucleotidsäure (1,69) oder mit dem eines Purin-Nucleotides (2,26), während für eine Nucleinsäure mit 25 Atomen Stickstoff und 6 Atomen Phosphor der Quotient  $\frac{N}{P}$  sich zu 1,88 berechnen läßt. Die gefundenen Werte für den Quotienten Guanin : Adenin sprachen mit Wahrscheinlichkeit dafür, daß im Moleküle der untersuchten Nucleinsäure 3 Mol. Guanin und 1 Mol. Adenin vorhanden waren.

$$\left( \begin{array}{l} 3 \text{ Mol. Guanin} \\ \text{Ber. } 1 \text{ Mol. Adenin} \end{array} = 3,36 \right).$$

Etwa 75% des totalen N-gehaltes wurden als Purinbasenstickstoff gefunden. 3 Mol. Guanin und 1 Mol. Adenin geben zusammen 20 Atome N. Geht man davon aus, daß 25 Atome N im Moleküle der untersuchten Nucleinsäure vorhanden waren, würden 5 Atome in andersartiger Bindung stecken. Da Cytosin und Thymin (?) nachgewiesen waren, könnten also die 5 restierenden Stickstoffatome (20% des totalen Stickstoffes) durch 1 Mol. Thymin und 1 Mol. Cytosin gedeckt werden. Die bis jetzt diskutierten Werte würden mit einer Verbindung zwischen 2 Mol. Guanylsäure und 1 Mol. Tetranucleotidsäure übereinstimmen können. Mit

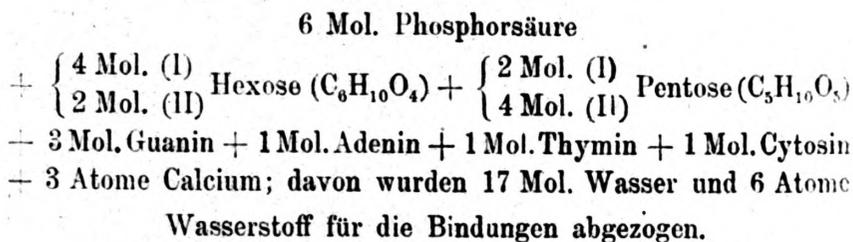
Mit Annahme der von Steudel aufgestellten und von Levene und Feulgen<sup>1)</sup> näher präzisierten, möglichen Formel der ideellen Tetranucleotidsäure könnte man folgende Projekte aufwerfen: 2 Mol. Guanylsäure durch Esterbindung zwischen Phosphorsäure und Kohlenhydrat mit 1 Mol. Tetranucleotidsäure vereinigt (I); oder eine Nucleinsäure, wie die vorige zusammengesetzt, nur mit dem Unterschiede, daß alle Purinbasennucleotide als Kohlenhydrat Pentose enthalten und die Pyrimidinbasennucleotide Hexose (II).

Folgende Werte lassen sich dann für die 6-basischen Calciumsalze berechnen:

Tabelle V.

	Berechnet:		In A <sub>1</sub> ; die gefundenen Werte auf getrocknete Substanz berechnet
	I	II	
N %	16,63	16,57	16,29
P %	8,84	8,81	8,65
Ca %	5,71	5,69	5,80
$\frac{\text{Pentose}}{\text{N}}$	0,857	1,71	1,68

Die Berechnung wurde auf folgende Formeln gegründet:



Ber. Molekulargewicht: 2106,16 (I); 2114,16 (II).

Alle gefundenen Werte stimmen mit sowohl I wie mit II mit Ausnahme für die Pentosenwerte, die entschieden für die Formel II sprechen. Die Furfuroldestillationsmethode zur Bestimmung von Pentosen ist allerdings rein konventionell.

<sup>1)</sup> R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 288 (1918);

und außerdem können offenbar verschiedene Mengen Furfurol dabei auch von Hexosen gebildet werden<sup>1)</sup>.

Ich will nochmals hervorheben, daß ich ganz im klaren darüber bin, daß die obige Formelspekulation gar nicht hinreichend experimentell begründet ist.

Wie schon mehrmals erwähnt, gibt die Substanz C, in alkalischer Lösung erwärmt, beim Neutralisieren mit Essigsäure eine flockige Fällung. Diese Fällung erschien zuerst als eine dichte Opalescenz, um dann bei noch schwach alkalischer Reaktion zu einem gelatinösen Brei zu werden. Nach 24stündigem Stehen in der Kälte wurde die Fällung abfiltriert, mit kaltem Wasser einige Male gewaschen, in Natronlauge gelöst und die Lösung mit Essigsäure neutralisiert. Nach 24 Stunden wurde filtriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen, dann in Wasser gelöst und mit 2 Vol. Alkohol gefällt und mit Alkohol und Äther getrocknet.

In diesem Präparat (lufttrocken) wurden Stickstoff- und Phosphorbestimmungen ausgeführt.

0,0492 g entsprachen 6,96 ccm n/14,01 Thiosulfatlösung (Kjeldahl)  
= 14,15% N.

0,0586 g „ 8,41 ccm n/14,01 „ „

0,2647 g gaben 0,0626 g  $Mg_2P_2O_7$  (Woy) = 6,59% P.

0,4568 g „ 0,1087 g  $Mg_2P_2O_7$  „ = 6,63% P.

N = 14,25

P = 6,61 = 2,16. Für Guanylsäure ber. 2,26.

0,5 g des Präparates wurden mit Salpetersäure nach Steudel zersetzt. Guanin konnte in reichlicher Menge mit Ammoniak ausgefällt werden. In dem ammoniakalischen Filtrate blieben nur Spuren von Purinbasen zurück. Die Substanz bestand offenbar aus einem Alkalisalz der Guanylsäure. Das Präparat war leicht löslich in Wasser, und die wäßrige Lösung gab mit wenig Natriumacetat gelatinöse Fällung; durch Zusatz von Essigsäure wurde sie in eine weiche Gallerte umgewandelt. Mit Calciumchlorid gab die Lösung in Wasser sofort eine feste Gallerte.

<sup>1)</sup> Steudel H., Diese Zeitschr. Bd. 56, S. 212.

Diese Verhältnisse stimmen mit den Beobachtungen von R. Feulgen<sup>1)</sup> über die Löslichkeit der Alkalisalze von Guanylsäure. Nach diesem Forscher ist das neutrale Alkalisalz der Guanylsäure in Wasser leicht löslich und wird nicht durch Essigsäure gefällt, aber in das gelatinierende saure Salz umgewandelt. Weiter sind die Alkalisalze der Guanylsäure in Natriumacetatlösung schwer löslich, worauf Feulgen eine ausgezeichnete Methode, die Guanylsäure zu isolieren, gegründet hat. Die Schwerlöslichkeit in Natriumacetat ist offenbar der Grund, weshalb guanylsaures Alkalisalz in meinen Versuchen beim Neutralisieren der alkalischen Hydrolysenflüssigkeit mit Essigsäure ausfiel.

Das erste Filtrat vom Alkalisalz der Guanylsäure enthielt noch Guanylsäure, die mit Natriumacetat nach Feulgen ausgeschieden werden konnte.

Die Resultate der Untersuchung über die in der Lösung bleibende Nucleinsäure werde ich in einer zweiten Abhandlung mitteilen.

Dem Prozeß bei Erwärmung mit 1%iger Natronlauge wurde unter Beobachtung der Änderungen in Wasserstoffionenkonzentration, Leitwiderstand und Gefrierpunkt gefolgt.

In einer 4%igen Lösung von C in 1%iger Natronlauge wurden  $[H]$ ,  $\omega$ <sup>2)</sup> und Gefrierpunkt<sup>2)</sup> vor und nach Erwärmung bestimmt. Die Lösung wurde unmittelbar vor dem Versuche bereitet und dann während der Bestimmungen, der Erwärmung und des Erkaltes mit peinlichster Sorgfalt mittels Natronkalkröhren vor der Luft-Kohlensäure geschützt. In allen Versuchen wurden 25 ccm 10 Minuten ein- oder mehrmals in siedendem Wasserbade erwärmt. Die Lösung blieb auch nach  $3 \times 10$  Minuten Erhitzung absolut klar. Zu den Bestimmungen von  $[H]$  und  $\omega$  wurde immer eine und dieselbe Lösung gebraucht. Die Überführung der Lösung vom Erwärmungsgefäß in das Messungsgefäß für elektrischen Widerstand und aus diesem in die Wasserstoffelek-

<sup>1)</sup> R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 249 (1919).

<sup>2)</sup> Die direkt gefundenen Werte des Leitwiderstandes in Ohm und des Gefrierpunktes in Graden ohne Rücksicht auf die Widerstandskapazität des Messungsgefäßes und auf die Nulleinstellung des Thermometers.

trode geschah unter Abschluß der Luft-Kohlensäure. Die Gefrierpunktsbestimmungen konnten nicht in 1%iger Natronlauge ausgeführt werden, weil bei der niederen Temperatur trotz der stark alkalischen Reaktion Fällung eintrat. Diese Bestimmungen wurden daher mit 4%igen Lösungen von C in 2%iger Natronlauge ausgeführt. Bei der Erwärmung trat jedoch eine sehr geringe dunkelgefärbte Fällung auf, weshalb die Resultate dieser Bestimmungen vielleicht etwas unsicher sind.

Die Werte für  $\omega$  und den Gefrierpunkt sind die direkt beobachteten ohne Rücksicht auf die Eichung der Apparate, da ja nur die relativen Werte hier interessieren.

C. 4%ige<sup>1)</sup> Lösung in 1%iger Natronlauge:

Tabelle VI.

	$\omega$ in Ohm	[H] Normalität	Gefrierpunkt in Graden <sup>2)</sup>
vor der Erwärmung . . . .	173	8,20-14	2,468
nach 24stündig. Stehen bei 0°	173	8,20-14	—
10 Min. Erwärmung . .	217	1,81-13	2,469
2×10 Min. Erwärmung	217,9	2,21-13	2,460
3×10 „ „	220	2,29-13	—

Mehrere Versuche, auch solche mit dem Präparate B<sub>2</sub>, wurden mit ganz gleichartigen Resultaten ausgeführt.

Das Alkalisalz der Guanylsäure (s. oben) wurde in 1%iger Natronlauge gelöst und  $\omega$  und [H] vor und nach Erwärmung bestimmt.

#### Alkalisalz der Guanylsäure.

4%ige Lösung in 1%iger Natronlauge:

Tabelle VII.

	$\omega$	[H]
vor der Erwärmung .	147	1,31-13
nach 10 Min. Erwärmung	149	1,31-13

<sup>1)</sup> Als ungefähr 0,001 Mol. in Bezug auf Nucleinsäure berechnet.

<sup>2)</sup> 2%ige Natronlauge.

Die Versuche (Tab. VI) zeigen, daß die Wasserstoffionenkonzentration durch Erwärmung der alkalischen Lösung stieg, was mit Verschwinden von OH-Ionen gleich ist. Die Steigerung des Leitwiderstandes wird dann auch auf dem Verschwinden leichtbeweglicher OH-Ionen beruhen. Der Gefrierpunkt wurde durch Erwärmung nicht geändert, woraus man wohl den Schluß ziehen muß, daß auch die absolute Menge einer anderen Ionenart sich vermehrt hatte. Die gefundenen  $\omega$ -, [H]- und Gefrierpunkt-Werte zeigten also in guter Übereinstimmung darauf hin, daß eine Hydrolyse stattgefunden hatte, wobei zwei oder mehrere Moleküle voneinander getrennt wurden.

Durch mehrfach variierte Versuche habe ich mich überzeugt, daß bei Erwärmung mit Natronlauge keine Phosphorsäure abgespalten wurde. Dagegen konnte leicht nachgewiesen werden, daß durch Erwärmung einer Lösung von C in Wasser reichliche Mengen Phosphorsäure abgespalten wurden, und daß diese Spaltung durch sehr kleine Mengen Natronlauge verhindert werden konnte.

Die Abspaltung von Phosphorsäure aus Nucleinsäuren durch Erwärmung deren alkalischen Lösungen geht, wie Feulgen<sup>1)</sup> gezeigt hat, allmählich vor sich. Wie Tab. VI zeigt, war die Hydrolyse jedenfalls nach 10 Minuten (wahrscheinlich viel früher) beendet. Dasselbe zeigt Tab. VII. Hier wurde das aus der Hydrolysenflüssigkeit isolierte Alkalisalz der Guanylsäure in 1 % iger Natronlauge erwärmt, ohne daß Wasserstoffionenkonzentration oder Leitwiderstand sich änderten.

Ich finde es sehr wahrscheinlich, daß durch die Hydrolyse in alkalischer Lösung esterartige Bindungen zwischen zwei oder mehreren Nucleinsäuren (von denen die eine Guanylsäure ist) gelöst wurden.

Die von Feulgen<sup>2)</sup> durch enzymatische Digestion vom  $\beta$ -Proteide aus Pankreas hergestellte und von ihm „Guanylnucleinsäure“ genannte Substanz steht zweifelsohne der oben

<sup>1)</sup> R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 165.

<sup>2)</sup> l. c.

beschriebenen nahe. Feulgen gibt dieselben Spaltungsprodukte für seine Nucleinsäure an, die ich gefunden habe. Mit Natriumacetat konnte er nach alkalischer Hydrolyse ein Alkalisalz der Guanylsäure ausfällen. Nach der gefundenen Menge Guanylsäure berechnet er, daß 1 Mol. Guanylsäure mit 1 Mol. Tetranucleotidsäure vereinigt ist. Nach meinen Befunden müssen in meiner Nucleinsäure mindestens 2 Mol. Guanylsäure im Moleküle vorhanden sein. Feulgens Guanylnucleinsäure war rechtsdrehend, was ich auch für die meine gefunden habe.

Von größerem Interesse als die endgültige Feststellung der quantitativen Zusammensetzung dieser komplizierten Substanzen scheint mir der sichere Nachweis wirklicher, hydrolysierbarer Bindungen zwischen „einfachen“ und „zusammengesetzten“ Nucleinsäuren zu sein. Ich schlage für derartige Verbindungen den allgemeinen Namen „gekoppelte Nucleinsäuren“ vor. Inwieweit „gekoppelte Nucleinsäuren“ als solche im Organismus vorkommen oder Laborationsprodukte sind, darüber wird natürlich durch vorliegende Arbeit nichts gesagt.

Die Untersuchung wird von mir fortgesetzt.