

Neue Darstellungsmethoden von Nukleinsäuren.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Gießen.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. August 1920.)

Beim experimentellen Studium verschiedener Nukleinsäuren gewann ich den Eindruck, daß die Darstellungsmethoden dieser Körper verbesserungsbedürftig sind. Über neue Darstellungsweisen werde ich in dieser und den folgenden Arbeiten derselben Überschrift berichten.

I. Mitteilung.

Die Darstellung der Guanylsäure als kristallisierendes Natriumsalz.

Nukleinsäuren gehören zu den Stoffen, die nur schwer zur Kristallisation gebracht werden können. Die komplizierteren Nukleinsäuren — die Thymonukleinsäure sowie die Hefenukleinsäure — sind bisher überhaupt noch nicht kristallisiert erhalten worden, und die Guanylsäure — eine der einfachsten — nur als Brucinsalz.

Diese Levene¹⁾ gelungene Kristallisation der Guanylsäure als Brucinsalz bedeutete einen großen Erfolg in der Nukleinsäure-Chemie; jedoch ist die Darstellung der Brucinsalze — und auch die Darstellung der rohen Guanylsäure nach Levene — eine sehr umständliche und bei weiterer Verwendung der Guanylsäure, sei es zu chemischen, sei es zu biologischen Versuchen, wird es ohnehin notwendig, das Brucin wieder aus dem Molekül zu entfernen²⁾.

¹⁾ Journ. of Biol. Chem. Bd 12 (1912).

²⁾ Während der Drucklegung dieser Arbeit erfuhr ich durch Referat (C. 1920 III 198), daß auch die freie Guanylsäure von Levene kristallisiert. Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. CXI.

Es gelang mir nun, auch ein Natriumsalz der Guanylsäure zur Kristallisation zu bringen, und diesem Umstande lege ich deswegen größere Bedeutung bei, weil Natriumsalze ohnehin als Endprodukt bei der von mir beschriebenen¹⁾ Guanylsäure-Darstellungsmethode erhalten werden, und weil es so gelang, ohne weiteres zu einem leicht zugänglichen kristallisierten Endprodukte zu kommen, wodurch die Brauchbarkeit der Darstellungsmethode meines Erachtens wesentlich erhöht wird.

Das Wesen der von mir angegebenen Darstellungsmethode ist folgendes:

Ich habe nachgewiesen, daß die Guanylsäure in der Pankreasdrüse nicht als selbständige Nukleinsäure vorkommt, sondern mit einer Nukleinsäure vom Typus der echten gepaart; Guanylnukleinsäure nannte ich diese Verbindung, über die ich bereits früher kurz berichtet habe²⁾. Die Auffindung dieses Körpers ist eine strikte Widerlegung der alten Anschauung, daß Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure (vom Typus der echten) als getrennte Proteide vorkommen. Nach diesen Ergebnissen ist die Guanylsäure gleichsam nur ein Kunstprodukt, ein abgespaltenes Nukleotid einer höheren Nukleinsäure.

Diese Anschauungen sind inzwischen von E. Hammarsten³⁾ im wesentlichen bestätigt worden, der mit anderen Methoden zu demselben Resultate kam, und Meinungsverschiedenheiten bestehen nur in dem molekularen Gewichtsverhältnisse, in dem die beiden Nukleinsäuren gepaart sind. Durch schwache alkalische Hydrolyse wird die Guanylnukleinsäure leicht gespalten in die Komponenten Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung der im Pankreas vorkommenden Nukleinsäuren wähle ich stets das β -Nukleoproteid, das nach O. Hammarsten erhalten wird, indem man zerhackte Pankreasdrüsen auskocht und das Filtrat mit Essig-

stallisiert erhalten worden ist, und zwar als Guanin-Nukleotid der Hefenukleinsäure, mit dem sie identisch ist. (Journ. Biol. Chem. Bd. 41, S. 483—93.)

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 249 (1919).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 147 (1919).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 141 (1920).

säure fällt. H. Steudel fällt obendrein noch mit Alkohol, wodurch die Ausbeuten ganz wesentlich erhöht werden. Auch ich benutze zur Darstellung des Ausgangsmaterials die Alkoholfällung, und zwar ausschließlich diese, da Nukleinsäuren ganz besonders in Gegenwart von Eiweiß eine spezifische Fällbarkeit mit Alkohol aufweisen. Ob das durch Alkoholfällung gewonnene Produkt identisch ist mit dem von O. Hammarsten durch Essigsäure dargestellten, ist für mich unerheblich, da ich das Proteid lediglich als Durchgangskörper für die Darstellung der darin vorkommenden Nukleinsäuren benutze.

Da die Darstellung des Nukleoproteids eine sehr einfache und schnelle ist, und es gelingt, durch einfache Manipulationen die Nukleinsäuren in übersichtlichen Verhältnissen und verhältnismäßig einfacher Bindung zu erhalten, so empfehle ich stets den Weg über das Proteid, zumal es auf diese Weise leicht möglich ist, die übergroße Drüsenmasse loszuwerden. Das Proteid ist auch schon deswegen zur Verarbeitung auf die Nukleinsäure besonders geeignet, weil es sehr reich an Nukleinsäuren ist (über 50% des Proteids bestehen aus Guanylnukleinsäure).

Die Verarbeitung des Proteids auf Nukleinsäuren muß nun eine verschiedenartige sein, je nachdem man größeres Gewicht auf die eine oder die andere Nukleinsäure legt. Die wissenschaftlich rationellste Verarbeitung würde die sein, daß man aus dem Proteid zunächst die Guanylnukleinsäure darstellt, ein Weg, den ich bereits früher gewiesen habe¹⁾, während eine genaue Beschreibung der Methode im Rahmen dieser Arbeiten mitgeteilt werden wird. Hat man erst die Guanylnukleinsäure, so sind durch milde alkalische Hydrolyse auch die Bruchstücke, nämlich die Guanylsäure und die Pankreasnukleinsäure, leicht zugänglich, die dann nach der weiter unten beschriebenen Methode getrennt werden können. Dieser Weg wird sich aber nicht empfehlen, wenn es wesentlich auf die Guanylsäure ankommt, weil die Reindarstellung der Guanylnukleinsäure mit erheblichen Verlusten verbunden ist, während die Guanylsäure

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 108, S. 147 (1919).

selbst sich mit guter Ausbeute auch durch direkte alkalische Hydrolyse des Proteids gewinnen läßt.

Auf welchem Wege man auch die Guanylsäure, um die es sich ja hier handelt, darstellt, immer hat man vor der Isolierungsarbeit eine alkalische Hydrolyse vorzunehmen, da ja die Guanylsäure nicht frei, sondern als Guanylnukleinsäure vorkommt, und immer muß man daher auch mit ihrem Begleiter, nämlich der Pankreasnukleinsäure, rechnen. Ich habe nun eine Methode angegeben, mit der eine Trennung der Natriumsalze dieser beiden Nukleinsäuren gelingt, es ist dies die Natriumacetatmethode, die darauf beruht, daß guanylsaures Natrium in neutraler Lösung durch Natriumacetat leicht ausgesalzen werden kann, während das Natriumsalz der Pankreasnukleinsäure (und übrigens auch der Guanylnukleinsäure) unter diesen Bedingungen leicht löslich ist. So kann man nicht nur eine Trennung der beiden Nukleinsäuren erreichen, sondern auch das guanylsaure Natrium durch „Umscheiden“ aus heißer Natriumacetatlösung einer wirksamen Reinigung unterziehen, wodurch vor allem eine völlige Befreiung von Resten der Pankreasnukleinsäure erzielt werden kann. Aber diese Methode genügt noch nicht zur völligen Reinigung des guanylsauren Natriums. Ich habe nämlich gezeigt¹⁾, daß das guanylsaure Natrium sehr leicht von basischen Verunreinigungen, die wahrscheinlich aus dem Eiweiß stammen, begleitet ist, wodurch das Präparat mit Essigsäure fällbar und in verdünnter Essigsäure unlöslich wird, offenbar durch Bildung eines unlöslichen Salzes mit dieser Verunreinigung. Hierdurch aber wird die von Bang angenommene Fällbarkeit der Guanylsäure mit Essigsäure vorgetäuscht. Von dieser basischen Verunreinigung läßt sich die Guanylsäure durch Fällung mit Alkohol aus alkalischer Reaktion befreien, wobei die basische Verunreinigung durch das starke Alkali von einer Salzbindung mit der Guanylsäure abgehalten wird und in der alkoholischen Mutterlauge bleibt. Die Reinigung der Guanylsäure durch Alkoholfällung aus alkalischer Reaktion ist unbedingt erforderlich und kann auch durch

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 250 (1919).

ein Umscheiden des guanylsauren Natriums aus heißer Natriumacetatlösung nicht ersetzt werden.

Diese hier kurz umrissene Darstellungsmethode vermeidet also Schwermetallfällungen mit den damit verknüpften Unbequemlichkeiten.

Wie frühere Analysen zeigten, wies das so gewonnene guanylsaure Natrium bereits einen hohen Grad von Reinheit auf, die durch die nunmehr erfolgende Kristallisation noch erhöht wird.

Das kristallisierte guanylsaure Natrium zeigt jedoch einige Besonderheiten, zu deren Verständnis die Eigenschaften¹⁾ des guanylsauren Natriums herangezogen werden müssen.

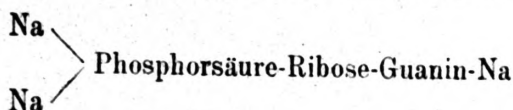
Das neutrale sekundäre guanylsaure Natrium ist in Wasser ziemlich, aber nicht leicht löslich, Zusatz von Mineralsäuren bewirkt Lösung, weil die wasserlösliche Guanylsäure frei wird. In Essigsäure ist das reine und salzfreie guanylsaure Natrium (im Gegensatz zu den Angaben Bangs) nicht unlöslich, vielmehr quillt in Wasser suspendiertes guanylsaures Natrium auf Zusatz von Essigsäure sofort zu einer homogenen sehr hydrophilen Gallerte auf. Durch Alkohol wird die Gallerte als saures guanylsaures Natrium in langen fibrinähnlichen Flocken gefällt; auch Natriumacetat bewirkt Fällung. Versetzt man aber in Wasser suspendiertes neutrales sekundäres guanylsaures Natrium mit Natronlauge, so tritt leicht völlige Lösung ohne Gallertbildung ein, und aus der alkalischen Lösung ist mit Natriumacetat keine Fällung mehr zu erzielen. Dagegen bewirkt Alkohol ölige Fällung, die aber bald, besonders beim Reiben, kristallinisch erstarrt.

Aus diesen Erscheinungen ziehe ich den Schluß, daß eine Salzbildung mit einem weiteren Molekül Natriumhydroxyd stattgefunden hat, daß das so entstandene Salz in Wasser sehr leicht löslich und mit Natriumacetat nicht fällbar ist. Als Ort für den Eintritt eines weiteren Natriumatoms kommt nur das Guanin in Frage, da das Natriumsalz der Guanylsäure, von dem ich ausgegangen war, ja schon das

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 253 (1919).

„neutrale“ Salz darstellt, wenigstens soweit die vertretbaren Wasserstoffatome der Phosphorsäure in Frage kommen. In der Tat kann ja das Guanin auch den Charakter einer Säure haben, indem Imidwasserstoffe durch Metalle ersetzt werden können, und während freies Guanin in Wasser unlöslich ist, löst es sich leicht in starken Alkalien.

Dieses tertiäre Natriumsalz der Guanylsäure kann nun leicht zur Kristallisation gebracht werden. Wie erwähnt, entsteht auf Zusatz von Alkohol zur alkalischen Lösung der Guanylsäure eine ölige Trübung oder sirupöse Fällung, die nach einigem Reiben mit dem Glasstabe zu einer kristallinen Masse erstarrt. Beim Umkristallisieren in der gleichen Weise erhält man leicht makroskopisch sichtbare flache Prismen, die wie kleine Lineale oder manchmal tafelförmig aussehen. Die Analyse deutet darauf hin, daß im ganzen 3 Na-Atome vorhanden sind, von denen nach dem Gesagten 2 an Phosphorsäure gebunden sind, während das dritte am Guanin sitzt. Schematisch würde der Körper also so aussehen:



Da die Glukosidbindung im Purinkerne in der Stellung 7 angenommen wird, so kommt für das Na-Atom nur noch die Stellung 1 in Frage.

Auf Grund dieser Versuche wurde nun die Darstellungsweise der Guanylsäure auf die Erlangung dieses kristallisierten Endproduktes zugeschnitten, so daß sich nunmehr die unten ausführlich auseinandergesetzte Arbeitsmethode ergibt.

Eigenschaften des tertiären guanylsauren Natriums.

Das tertiäre guanylsaure Natrium ist in Wasser äußerst leicht löslich und im Gegensatze zu dem sekundären und primären Natriumsalze nicht mit Natriumacetat aussalzbar. In anderen Lösungsmitteln ist es unlöslich. Da das Guanin eine sehr schwache Säure ist, so ist in wäßriger Lösung diese Dissoziationsstufe des tertiären Salzes weitgehend hydrolytisch dissoziiert, und die Lösung reagiert deswegen gegen Lackmus

stark alkalisch. Die als Säure wirkenden Imidwasserstoffe in dem Körper sind nicht nur schwächer als die Kohlensäure, sondern sogar schwächer als der Säurecharakter des Phenols, denn beide Stoffe vermögen das tertiäre Salz in das sekundäre zu verwandeln. Bei der Darstellung ist daher Kohlensäure sorgfältig fernzuhalten. Beim Erhitzen über 100° bräunt sich das Salz, verkohlt und verbrennt schließlich ohne zu erweichen oder sich aufzublähen und hinterläßt eine leicht weiß zu bekommende alkalisch reagierende Asche, die aus Natriumpyrophosphat und Natriumcarbonat besteht.

Entstehung und Eigenschaften des tertiären guanylsauren Natriums drängen nun zu einem Vergleich mit dem von mir früher beschriebenen analogen Salze der Thymonukleinsäure¹⁾. Auch das neutral reagierende (quaternäre) Natriumsalz dieser Nukleinsäure verbindet sich in verdünnter Natronlauge mit weiteren NaOH-Molekülen, und zwar treten anscheinend 2 weitere Natriumatome bei der Salzbindung ein. Durch diese Salzbildung trat eine Veränderung des Ausgangsmaterials in mehrfacher Beziehung ein:

1. Gelatinierte (im Falle der a-Form) das Natriumsalz nicht mehr,

2. ist von einer optischen Aktivität nichts mehr zu merken, während die spezifische Drehung vorher etwa 80° betrug.

Damals hatte ich als mutmaßlichen Ort für den Eintritt der weiteren Na-Atome den kohlenhydratähnlichen Komplex für wahrscheinlich gehalten, hauptsächlich auch deswegen, weil die Thyminsäure, die keine Purine mehr enthält, ebenfalls in stark alkalischer Reaktion jede erkennbare Aktivität verliert. Die Analogie mit der Guanylsäure veranlaßt mich aber, auch bei der echten Nukleinsäure den Eintritt der weiteren Na-Atome an den Purinen anzunehmen. Es sei hier betont, daß das tertiäre Salz der Guanylsäure nicht etwa die beobachtbare Aktivität einbüßt; denn die freie Säure dreht links, und das tertiäre Salz ebenfalls (siehe unten).

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 189 (1919).

Experimenteller Teil.

A. Darstellung des Nukleoproteids.

Da das Proteid nicht nur als Ausgangsmaterial für die Guanylsäure, sondern auch zur Darstellung der Guanylnukleinsäure dient, so soll die Bereitung desselben hier ausführlich besprochen werden, zumal mehrere Punkte im Interesse einer glatten Durchführung der Operationen beachtet werden müssen, besonders wenn es sich, wie es zur Durchforschung der Nukleinsäuren notwendig ist, um die Verarbeitung größerer Mengen handelt.

a) Allgemeines.

Im Grunde genommen ist die Darstellung des Proteids sehr einfach: Man kocht die in der Fleischhackmaschine zerkleinerte Drüsenmasse mit Wasser aus und fällt nach dem Vorschlag von Steudel die Auszüge mit Alkohol.

Zunächst ist es erforderlich, nur ganz frisch aus dem Schlachthause bezogene Drüsen (Pankreasdrüsen der Rinder) zu benutzen. Da sich diese sehr leicht zersetzen, pflege ich sie nur im Winter bei Frost zu verarbeiten.

Die Isolierung des Proteids als Trockenpräparat wäre nun an sich nicht unbedingt erforderlich; denn man könnte ja die wäßrigen Extrakte gleich evtl. nach Einengen auf Nukleinsäuren weiterverarbeiten. Da aber neben dem Proteid viele andere Stoffe aus den Drüsen ausgelaugt werden, so ziehe ich die Darstellung des Proteids vor.

Da das Proteid aus der Pankreasdrüse nicht in reichlicher Menge (etwa 1,5% der Drüsenmasse) gewonnen werden kann, andererseits aber verhältnismäßig große Drüsenmassen verarbeitet werden müssen, so sind große Flüssigkeitsmengen mit geringen Proteidgehalten zu bewältigen, zumal im Interesse einer guten Ausbeute wiederholtes Auskochen erforderlich ist. Die Frage, ob es vorzuziehen ist, die Extrakte einzuengen oder gleich mit Alkohol zu fällen, muß je nach den Umständen entschieden werden. Im Interesse eines geringen Alkoholverbrauchs ist man geneigt, die Frage im ersteren Sinne zu

entscheiden. Ist man aber im Besitze eines größeren Destillierapparates, so ist es bequemer, die Auszüge ohne Einengen mit einer größeren Menge Alkohol zu fällen und dann aus der Mutterlauge den Alkohol zurückzugewinnen; denn ein Abdestillieren der alkoholhaltigen Mutterlauge ist viel einfacher als das Einengen empfindlicher Flüssigkeiten in größeren Mengen. Will man aber die Auszüge einengen, was heute im Interesse einer besseren Proteidausbeute wohl zu empfehlen ist, so kann man entweder im Vakuum oder in der Schale auf dem Wasserbade eindampfen. Ersteres ist dann unbedingt geboten, wenn man aus dem Proteid die Guanylnukleinsäure darstellen will; denn diese ist sehr empfindlich. Will man aber auf die Guanylsäure hinarbeiten, so genügt auch ein Einengen auf dem Wasserbade in der Schale, besonders wenn man durch Anwendung eines Rührers und Ventilators für ein schnelles Verdampfen sorgt.

Im Zusammenhange hiermit ist auch die Frage zu erörtern, wie oft und mit wieviel Wasser die Drüsen ausgekocht werden sollen. Wendet man zuviel Wasser an, so erhält man das Proteid in den Extrakten verdünnter, man muß dann entsprechend mehr Alkohol aufwenden und trotzdem sinkt die Ausbeute. Dies spielt naturgemäß keine Rolle, wenn man die Extrakte vor der Alkoholfällung einengt. Ich wende meist die direkte Alkoholfällung an und koche die Drüsen dreimal mit Wasser aus, wobei auf je 15 kg Drüsensubstanz 3 l Wasser kommen. Es sei hier bemerkt, daß es nicht gelingt, alles Proteid aus der zerkleinerten Drüsenmasse auszulaugen, was ja bei der histologischen Struktur der Drüsenmasse nicht verwunderlich ist. Aus den ausgelaugten Drüsen lassen sich noch weitere Mengen Guanylsäure gewinnen, wenn man die Rückstände etwa nach der Neumannschen Nukleinsäure-darstellungsmethode mit Natronlauge verflüssigt und nach dem Neutralisieren mit Essigsäure mit Alkohol fällt. Die Gewinnung und Reindarstellung der so erzielten Guanylsäure ergibt sich sinngemäß aus der unten beschriebenen Darstellungsmethode aus Proteid. Es ist aber ohne weiteres klar, daß man aus den Rückständen keine Guanylnukleinsäure mehr

gewinnen kann, da diese durch die Alkaliwirkung auch aufgespalten wird.

Die ausgekochten Drüsenmassen lassen sich sehr leicht siedend heiß abfiltrieren, wenn die Drüsen vorher einigermaßen fettfrei präpariert waren. Die Filtrate sind anfangs fast klar; beim Abkühlen und Stehen entsteht jedoch eine Trübung, zum größten Teil aus Fett bestehend. Diese Unzuträglichkeit wird überwunden durch Erzeugung eines Niederschlages in dem Auszuge dadurch, daß einfach mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht wird. Der entstehende zarte, flockige Niederschlag (wohl meist Erdphosphate) reißt alles kolloidal gelöste Fett mit und es entsteht eine völlig klare Flüssigkeit, die man durch Abhebern vom Niederschlage trennt. Die Entfernung der Erdphosphate empfiehlt sich unter allen Umständen, da sie sonst in großer Menge in das Proteid übergehen. Nach Neutralisation fällt man dann mit Alkohol, evtl. nach vorherigem Einengen. Anderthalb Volumen Alkohol sind wohl meist ausreichend; von zurückgewonnenem, nicht 96%igem Alkohol, nimmt man entsprechend mehr. Es ist zu beachten, daß der Niederschlag vor dem Absaugen durch öfteres Dekantieren mit Alkohol etwas entwässert wird, sonst verschmiert das Filter und die Filtration verläuft sehr langsam. Ein völliges Entwässern mit abs. Alkohol und Äther ist überflüssig, da es nicht auf die Gewinnung staubfeiner Pulver ankommt und große Mengen Alkohol dazu notwendig wären. Das Trocknen geschieht am besten durch Aufstreichen auf Glasplatten und Aufbewahren der Platten an einem warmen Ort. Da in den Präparaten immer noch viel Wasser enthalten ist, kleben die Proteidmassen beim Trocknen zusammen und müssen nachher zerrieben werden.

b) Beispiel für die Verarbeitung von 15 kg Drüsen.

15 kg von Bindegewebe, Fett usw. reinpräparierte Pankreasdrüsen vom Rinde (zur Gewinnung dieser Menge sind etwa 20 kg Schlachthaus-Pankreas notwendig) werden mit der Fleischhackmaschine zerkleinert, der Organbrei in einem Kochkessel mit 3 l siedenden Wassers übergossen und unter ständigem Um-

rühren mit einem starken Holzstabe weiter erhitzt. Die zuerst sehr dickliche Masse wird gegen 50° infolge Koagulation von Eiweißkörpern dünner und weiterhin so dünnflüssig, daß ständiges Umrühren nicht mehr notwendig ist. Man erhitzt bis zum Sieden, läßt $\frac{1}{4}$ Stunde bedeckt stehen und filtriert auf großen Faltenfiltern ab. Nach völligem Abtropfen werden die noch heißen Drüsenmassen samt anhaftenden Filtern in demselben Kessel abermals mit 3 l siedenden Wassers durchgerührt, der dicke Brei unter fortwährendem Umrühren bis zum Sieden erhitzt, nach $\frac{1}{4}$ Stunde abfiltriert und diese Operation des Auslaugens noch einmal mit 3 l Wasser wiederholt. Man erhält so ein Gesamfiltrat von etwa 17 l, für dessen möglichst schnelle Kühlung man Sorge tragen muß, am besten durch Hindurchgießen durch einen kupfernen Schlangenkühler. Der Flüssigkeit setzt man zur Vermeidung von Fäulnis etwas Toluol zu und suspendiert dieses durch Hindurchblasen von Luft durch die Flüssigkeit. Nach völligem Abkühlen versetzt man die Proteidlösung mit 33%iger Natronlauge (10 ccm auf je 1 l), läßt den entstehenden Niederschlag über Nacht sich absetzen, hebert dann die klare Flüssigkeit ab und filtriert vollends den Bodensatz durch ein Faltenfilter ab. Die erzielte klare Flüssigkeit wird jetzt mit Eisessig neutralisiert und mit etwa $1\frac{1}{2}$ Volumen 96%igem Alkohol versetzt. Beim Bewegen der Flüssigkeit mittels Durchblasens von Luft entsteht nach einiger Zeit ein flockiger Niederschlag, von dessen Vollständigkeit man sich durch weiteren Zusatz von Alkohol überzeugt. Man läßt ihn absitzen, hebert die Mutterlauge am folgenden Tage ab, entwässert den Niederschlag durch wiederholtes Verrühren mit Alkohol, Absitzenlassen und Abhebern, saugt endlich ab und trocknet das Proteid nach Aufstreichen auf große Glasplatten an einem warmen Orte (z. B. über einem geheizten Ofen). Ausbeute an lufttrocknem Proteid ca. 200 g = 1,3% der präparierten Drüsen = 1% der rohen Drüsen.

B. Darstellung von kristallisiertem guanylsauren Natrium aus Nukleoproteid.

a) Allgemeines.

Die Darstellung zerfällt in folgende vier Phasen:

1. Alkalische Hydrolyse des Proteids. Hierdurch wird das Eiweiß abgespalten und zugleich die Guanylnukleinsäure aufgespalten in die Komponenten Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure. Durch Alkoholfällung aus der neutralisierten und dann mit Ammoniak alkalisch gemachten Hydrolysenflüssigkeit gewinnt man ein Gemenge der Natriumsalze dieser beiden Nukleinsäuren.

2. Reinigung durch Alkoholfällung bei mit überschüssiger Natronlauge alkalisch gemachter Reaktion. Es empfiehlt sich, diese Operation hier, d. h. vor der Trennung der beiden Nukleinsäuren auszuführen, weil so beide Nukleinsäuren auf einmal in einer Operation gereinigt werden können. Eine Vorbereitung findet diese Operation zweckmäßig dadurch, daß man schon unter 1. die Rohprodukte der Nukleinsäuren bei alkalischer Reaktion mit Alkohol fällt. Es ist aber nicht zweckmäßig, schon unter 1. Natronlauge zur alkalischen Reaktion zu verwenden, es liegt ja nahe, hier einfach die alkalische Hydrolysenflüssigkeit mit Alkohol zu fällen. Vielmehr empfiehlt es sich, bei ammoniakalischer Reaktion zu fällen, weil überschüssige Natronlauge ja mit beiden Nukleinsäuren die alkalisch reagierenden höheren Salze bildet, die mit Alkohol schwieriger zu fällen sind als die neutral reagierenden. Diese Unzuträglichkeit macht sich besonders in den komplexen Lösungen der unter 1. entstehenden Hydrolysenflüssigkeiten geltend, wird aber vermieden, wenn man bei ammoniakalischer Reaktion fällt; denn Ammoniak ist eine zu schwache Base, um mit den Purinen der Nukleinsäuren die schlecht fällbaren höheren Salze einzugehen, man bekommt also ähnlich günstige Fällungen wie bei neutraler Reaktion, hat aber den Vorzug, bei alkalischer Reaktion arbeiten zu können, bei der ja die basischen Zersetzungsprodukte des Eiweißes, die bei neutraler Fällung immer in die Niederschläge

hineingehen, von einer Salzbindung ferngehalten werden, wenn diese Wirkung auch nicht so kräftig ist, als wenn man mit überschüssiger Natronlauge arbeiten würde.

3. Trennung der Natriumsalze der beiden Nucleinsäuren mittels der Natriumacetatmethode. Dieser Vorgang verlangt neutrale Reaktion, also Bedingungen, unter denen das neutral reagierende sekundäre guanylsaure Natrium vorliegt; denn nur das sekundäre, nicht das unter 2. erhaltene tertiäre Salz der Guanylsäure ist mit Natriumacetat aussalzbar. Es hat also zwischen 2. und 3. eine Neutralisation der Lösung mit Essigsäure stattzufinden.

4. Kristallisation des guanylsauren Natriums als tertiäres Salz.

b) Beispiel für die Darstellung.

1. Hydrolyse.

100 g Proteid werden mit 2 l siedenden Wassers übergossen, die Lösung auf über 90° gebracht, 100 ccm 33%ige Natronlauge zugefügt und dann der Kolben sofort in ein siedendes Wasserbad versenkt. Nach 30 Minuten kühlt man unter der Wasserleitung schnell auf etwa 50° ab, neutralisiert das Filtrat genau mit Eisessig und dampft im Vakuum (oder auch in der Schale) auf ungefähr 200 bis 300 ccm ein. Findet das Einengen bei niedriger Temperatur im Vakuum statt, so scheidet sich bald das sekundäre guanylsaure Natrium als feinflockiger Niederschlag ab. Die eingeeengte Flüssigkeit versetzt man mit 30 ccm konz. Ammoniak, verdünnt mit Wasser bis zu einem Volumen von 400 ccm, erwärmt, bis das abgeschiedene sekundäre guanylsaure Natrium wieder gelöst ist, und fällt mit 2 Volumen 96%igem Alkohol. Die sich flockig abscheidenden Natriumsalze der beiden Nucleinsäuren läßt man mehrere Stunden absitzen, entwässert den Niederschlag durch öfteres Dekantieren mit Alkohol, saugt ab und trocknet. Ausbeute an gemischten Nucleinsäuren $43 \text{ g} = 43\%$ des Proteids.

2. Reinigung des Rohproduktes durch Alkoholfällung bei alkalischer Reaktion.

Das Rohprodukt (43 g) wird mit etwa der 4fachen Menge (160 ccm) Wasser heiß gelöst, mit 33%iger Natronlauge (auf 100 ccm zur Lösung benutzten Wassers 10 ccm) stark alkalisch gemacht und die visköse Lösung durch ein Faltenfilter filtriert. Die Filtration geht langsam vonstatten, pflegt aber über Nacht beendet zu sein. Im Filtrate löst man (zur besseren Ausflockung mit Alkohol) 16 g kristallisiertes essigsäures Natrium auf und füllt mit Alkohol (3faches Volumen des angewandten Wassers). Die Fällung nimmt man in einem Kolben vor, den man über Nacht auf einem Strohkranz schräg hinstellt. In dieser Zeit haben sich die ölig ausgefallenen höheren Natriumsalze der Nukleinsäuren abgesetzt und man kann die Mutterlauge abgießen. Den weichen Rückstand löst man jetzt in 100 ccm Wasser, fügt 10 ccm 33%ige Natronlauge hinzu, löst in der Flüssigkeit 10 g Natriumacetat und füllt abermals mit Alkohol (300 ccm). Nach abermaligem Absitzen löst man den Rückstand in 100 ccm Wasser und neutralisiert mit Eisessig, worauf infolge gebildeten Natriumacetats das sekundäre guanylsaure Natrium bereits ausfällt.

3. Trennung der beiden Nukleinsäuren.

Zur völligen Abscheidung des sekundären guanylsauren Natriums löst man in der Flüssigkeit noch 10 g Natriumacetat auf, läßt in der Kälte mehrere Stunden stehen und zentrifugiert das guanylsaure Natrium ab. Dieses löst man jetzt am besten gleich in den Zentrifugengläsern in 100 ccm siedend heißer 20%iger Natriumacetatlösung und zentrifugiert wiederum nach mehrstündigem Stehen in der Kälte. Die abzentrifugierten klaren Lösungen enthalten das Natriumsalz der Pankreasnukleinsäure, das durch Fällern mit dem 3fachen Volumen Alkohol als Rohprodukt gewonnen werden kann. Über seine Reindarstellung werde ich später berichten. Das abzentrifugierte guanylsaure Natrium wird nunmehr zur völligen Be-

freierung von der Pankreasnukleinsäure noch 5 mal aus je 50 ccm 20%iger Natriumacetatlösung aus Siedehitze umgeschieden und endlich mit Alkohol entwässert und getrocknet. Ausbeute an reinem (noch etwas Natriumacetat enthaltendem) sekundären guanylsaurem Natrium 10 g = 10% des Proteids.

4. Kristallisation des tertiären Salzes.

10 g sekundäres guanylsaures Natrium werden in 100 ccm n-NaOH gelöst und das Filtrat mit 400 ccm 96%igem Alkohol versetzt. Es entsteht ein sirupöser Niederschlag, der beim Reiben bald kristallinisch erhärtet. Wenn das Präparat nicht mehr schmiert, läßt man noch einige Stunden stehen, saugt den Körper ab und wäscht mit Alkohol nach. Getrocknet wird über Chlorkalzium oder reiner konz. Schwefelsäure, aufbewahrt über Natronkalk oder dergl. Zum Umkristallisieren löst man das Salz in der 5fachen Menge kalten Wassers, versetzt mit Alkohol (4faches Volumen des angewandten Wassers) und läßt ruhig stehen. Es entsteht eine kolloidale Trübung, die nach einiger Zeit zu einem lockeren Kristallbrei erstarrt. Weitere Behandlung wie vorhin. Ausbeute an tertiärem guanylsauren Natrium etwa 10 g = 10% des angewandten Proteids.

Zur Analyse wurde die Substanz über Phosphorpentoxyd bei 95° im Vakuum getrocknet. Eine C- und H-Bestimmung konnte aus äußeren Gründen nicht vorgenommen werden; da es sich bei dem vorliegenden Körper im wesentlichen um ein anderes Salz einer bereits früher von mir analytisch identifizierten Säure handelt, konnte auch darauf verzichtet werden. Aufschluß über die Natur des Salzes gibt uns vor allem die Na-Bestimmung. Hierzu wurde die Substanz verascht, die Asche in Wasser gelöst, durch Erwärmen mit einem Überschuß von Schwefelsäure die Pyrophosphorsäure in Orthophosphorsäure verwandelt; durch Baryt die Säuren entfernt und nach der Beseitigung des überschüssigen Baryts mittels Schwefelsäure das Natrium in der üblichen Weise als Natriumsulfat gewogen.

0,1527 g entsprechen 17,5 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl),
 0,1639 g „ 18,8 ccm n_{10} -Säure „
 0,1749 g „ 22,1 ccm n_{2} -Lauge (Neumann),
 0,1399 g „ 17,4 ccm n_{2} -Lauge „
 0,4119 g lieferten 0,2079 g Na_2SO_4 .

	Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_8\text{N}_5\text{PNa}_3$	Gefunden:
N	16,32	16,06; 16,10
P	7,23	7,01; 6,90
Na	16,08	16,34

Die Analyse deutete auf einen etwas zu hohen Aschengehalt hin, weswegen die Substanz noch einige Male umkristallisiert wurde:

0,3400 g lieferten 0,1645 g Na_2SO_4 .

	Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_8\text{N}_5\text{PNa}_3$	Gefunden:
Na	16,08	15,70

Polarimetrische Verhältnisse:

$$c = 9,067; l = 1; \alpha = -9,83^\circ; t = 22^\circ; [\alpha]_D^{22^\circ} = -38,3^\circ.$$

Bei dieser Arbeit wurde ich von Herrn M. Behrens unterstützt, wofür ich ihm bestens danke.