

Über eine neue Spaltungsmethode der Nucleinsäure.

Von

H. Steudel und E. Peiser.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. November 1920.)

Die nähere Charakterisierung des in der echten Nucleinsäure enthaltenen Kohlenhydrates stößt bei Anwendung der bisher üblichen Spaltungsmethoden auf Schwierigkeiten, man erhält meist viel huminartige Nebenprodukte oder sofort Spaltstücke des Kohlenhydrates: Lävulinsäure, Ameisensäure, Furfurol. Es mußte also nach einem sehr milden Spaltungsmittel gesucht werden, und als solches ist von dem einen von uns (St.) schon seit mehreren Jahren die sogenannte Sulfitlauge, wie sie in den Sulfitcellulosefabriken angewandt wird, benutzt worden. Es ist ja bekannt, daß in den Endlaugen der Sulfitcellulosedarstellung sich viel reduzierende Substanzen, hervorgegangen durch Hydrolyse aus den Gummistoffen und Pentosanen des Holzes, befinden, und Tollens und Hauers¹⁾ haben die Sulfitflüssigkeit benutzt für die Hydrolyse von Kirschgummi, Rübenschnitzeln, Buchenholz und Kiefernholz und die günstigsten Bedingungen festgestellt, unter denen eine Höchstaussbeute an reduzierenden Substanzen gewonnen werden kann. Es erschien nun nicht aussichtslos, mit Hilfe dieser Methode auch bei dem Kohlenhydrat der Nucleinsäure zu neuen Resultaten zu kommen. Während man nämlich bei den üblichen Spaltungen der Nucleinsäure mit Schwefelsäure, Salzsäure, selbst mit Oxalsäure dunkelbraunschwarze Reaktionsflüssigkeiten erhält, so bleiben bei der Spaltung mit Sulfitflüssigkeit

¹⁾ Berichte Bd. 36, S. 3315 (1903).

die Lösungen vollkommen wasserklar, höchstens tritt eine leichte hellbernsteingelbe Färbung auf. Aus der Reaktionsflüssigkeit setzt sich ein schwerer pulveriger Niederschlag ab, der den größten Teil der Alloxurbasen enthält¹⁾, und es war nun zu erwarten, daß die bei der Spaltung der Nucleinsäure freiwerdende reduzierende Gruppe des Kohlenhydrates vor weiterer Veränderung durch die schweflige Säure geschützt würde, die sich ja leicht mit Aldehyden und Ketonen verbindet.

Bei den ersten Versuchen wurden nun Versuchsbedingungen eingehalten, die sich an die von Tollens und Hauers gefundenen günstigsten Bedingungen anlehnten. Als Spaltungsflüssigkeit benutzten wir eine Calciumbisulfitlösung, die durch Einleiten von SO_2 in eine Aufschwemmung von 30 g Calciumcarbonat pro 1 l Wasser bis zur Lösung und vollkommenen Sättigung hergestellt war.

Je 50 g nucleinsaures Natrium aus Heringssperma wurden mit 500 ccm Sulfitlösung 2 Stunden im Drucktopf auf 120 bis 130° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde vom Bodensatz filtriert und die klare, hellgelbe Lösung mit Alkohol versetzt; hier entstand nur ein spärlicher Niederschlag, der durch Filtration entfernt wurde. Nunmehr wurde tropfenweise konzentrierte Calciumacetatlösung hinzugesetzt und der voluminöse Niederschlag nach einigem Stehen von der Mutterlauge getrennt und mit wäßrigem Alkohol ausgewaschen. Dann wurde wieder in Wasser gelöst, schwach mit Essigsäure angesäuert und mit Bleiacetat versetzt. Da hierbei kein nennenswerter Niederschlag entstand, konnte in der Lösung keine unzersetzte Nucleinsäure mehr vorhanden sein. Beim darauffolgenden Zusatz von basischem Bleiacetat entstand nun ein dicker, weißer Niederschlag, der nach vollständigem Absitzen von der Mutterlauge getrennt, sorgfältig mit Wasser wiederholt verrieben und ausgewaschen wurde. Er wurde dann in Wasser

¹⁾ Bei den Versuchen hatte ich mich anfangs der Hilfe des Herrn Dr. Feulgen, jetzt Privatdozent in Gießen, zu erfreuen. Von ihm ist inzwischen schon mitgeteilt (Diese Zeitschr. Bd. 102, S. 244), wie man aus der Hydrolysenflüssigkeit die Purinbasen quantitativ gewinnen kann.

aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Lösung mit reinem Baryumcarbonat in geringem Überschuß versetzt, aufgekocht und vom Bleisulfid und überschüssigen Baryumcarbonat getrennt. Dann wurde das Filtrat im Vakuum bei niedriger Temperatur auf ein kleines Volumen eingeeengt — es blieb hierbei vollkommen farblos — und mit Alkohol gefällt. Das ausgefallene Baryumsalz wurde noch einmal in Wasser gelöst und wieder mit dem gleichen Volumen Alkohol unter Zusatz eines Tropfens konzentrierter Baryumacetatlösung ausgefällt, mit Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es resultiert ein feines, weißes, staubendes Pulver, in dem zur Orientierung der Stickstoff- und Phosphorsäuregehalt bestimmt werden (die Substanz enthielt keine mit Magnesia-mixtur fällbare Phosphorsäure und wurde vakuumtrocken analysiert):

0,2742 g	neutralisieren	6,4 ccm	n/10 Säure (Kjeldahl)	= 3,27% N
0,2062 g	"	5,5 "	n/10 "	= 3,74% N
0,2430 g	"	26,2 "	n/2 NaOH (Neumann)	= 5,97% P
0,2300 g	"	24,0 "	n/2 "	= 5,77% P.

Berechnet man sich aus den Mittelzahlen 3,50% N und 5,87% P das Verhältnis von P : N, so erhält man 1 : 0,596.

Ein anderes Präparat, in gleicher Weise hergestellt, gab folgende Werte:

0,1179 g	neutralisieren	1,9 ccm	n/10 Säure (Kjeldahl)	= 2,23% N
0,1481 g	"	2,2 "	n/10 "	= 2,08% N
0,1492 g	"	11,9 "	n/2 Lauge (Neumann)	= 4,42% P
0,1442 g	"	11,8 "	n/2 "	= 4,53% P.

Hier berechnet sich aus den Mittelzahlen ein Wert für P : N gleich 1 : 0,486.

Diese Werte stimmen zu dem Werte, den das Verhältnis P : N in der Thyminsäure verlangt. In dieser Säure kommen auf 5 N-Atome 4 P-Atome, und das Verhältnis P : N verlangt 1 : 0,566. Gefunden 1 : 0,596 und 1 : 0,486.

In einem dritten Präparat fand sich:

0,1297 g	neutralisieren	2,6 ccm	n/10 Säure (Kjeldahl)	= 2,81% N
0,1346 g	"	12,6 "	n/2 Lauge (Neumann)	= 5,19% P.

Gefunden P : N = 1 : 0,542, berechnet P : N = 1 : 0,566.

Schweflige Säure ließ sich in den Präparaten, abgesehen davon, daß Baryumsulfit so gut wie unlöslich in Wasser ist, mit Hilfe von Nitroprussidnatrium und Zinksulfat oder Ferrocyankalium nicht nachweisen. Auch gebundene schweflige Säure ließ sich durch Erwärmen mit einem geringen Überschuß von Baryumhydroxyd auf 70–80° nicht nachweisen. Die Präparate reduzierten kräftig und stark Fehlingsche Lösung.

Die Baryumbestimmungen fielen in Übereinstimmung mit früheren Resultaten, die von Steudel und Brigl gewonnen waren, zu hoch aus; so lieferte z. B. das erste Präparat folgende Zahlen:

$$\begin{array}{l} 0,2444 \text{ g gaben } 0,1120 \text{ g BaSO}_4 = 26,43\% \text{ Ba} \\ 0,2300 \text{ g } \quad \quad \quad 0,1054 \text{ g BaSO}_4 = 26,97\% \text{ Ba.} \end{array}$$

Daraus berechnet sich ein Verhältnis von N : Ba = 1 : 7,629, das ungefähr einem Verhältnis von 5 N : 4 Ba entspricht. Berechnet 1 : 7,85. Ein neutrales Salz würde aber ein Verhältnis von 5 N : 2 Ba = 1 : 3,924 verlangen. Man scheint also gewöhnlich keine neutralen Salze, die 2 Atome Baryum enthalten müßten, zu erhalten, sondern basische Salze¹⁾, ein Verhalten, das dem der echten Nucleinsäure entsprechen würde, die mit Erdalkalien auch leicht basische Salze bildet. Ein neutrales Baryumsalz der Thyminsäure ist bisher nur von Feulgen²⁾ erhalten und analysiert worden.

Wir haben diese Verhältnisse vorläufig nicht weiter untersucht, sondern haben uns bemüht, durch hydrolytische Spaltung einen genaueren Einblick in unsere Substanz zu gewinnen. Eine quantitative Bestimmung aller oder zum mindesten einzelner Spaltstücke halten wir für die nähere Charakterisierung dieser hochmolekularen Körper für durchaus erforderlich. — Elementaranalysen an den meist amorphen Substanzen können leicht irreführen. Selbst bei den kristallisierenden Alkaloidsalzen der einfachen Nucleinsäuren, in denen an die hochmolekulare Säure noch das große Molekül eines Alkaloids

¹⁾ Siehe dazu Steudel und Brigl, Diese Zeitschr. Bd. 70, S. 400.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 305.

angefügt ist, erlebt man gelegentlich Überraschungen, wenn man quantitative Spaltungen durchführt.

20,25 g lufttrockenes Baryumsalz wurde mit Schwefelsäure 14 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht¹⁾ (auf 1 g Substanz wurden 3 g konzentrierte Schwefelsäure und 6 g Wasser genommen). Die Lösung wurde nach dem Erkalten auf 500 ccm gebracht und enthielt 0,610 g N.

10 ccm neutralisieren	8,7 ccm n/10 Säure	= 0,0121 g N
15 ccm	13,0 ccm n/10	= 0,0182 g N
15 ccm	13,1 ccm n/10	= 0,0183 g N.

In 50 ccm wurde nach der Neutralisation mit Baryt und Zusatz von überschüssigem Baryumcarbonat das Ammoniak mit Wasserdampf ausgetrieben und abdestilliert. Es wurden 0,9 ccm n/10 H_2SO_4 verbraucht. In einem zweiten Versuch wurden auf 50 ccm 1,2 ccm n/10 Säure verbraucht = 0,00126 g N resp. 0,00168 g N. In den 500 ccm Ausgangslösung waren also rund 0,0147 g N = 2,41% des Gesamtstickstoffs.

Es wurde dann noch eine zweite Spaltung in gleicher Weise wie vorstehende ausgeführt mit 15 g Substanz; die Lösung, auf 500 ccm aufgefüllt, enthielt 0,4515 g N.

20 ccm neutralisieren 12,9 ccm n/10 Säure = 0,01806 g N.

Die beiden Lösungen wurden vereint, mit Baryt genau neutralisiert und nach Zugabe von Baryumcarbonat das Ammoniak durch einen Wasserdampfstrom abgetrieben. Die Niederschläge waren 3mal mit Wasser ausgekocht und die Washwässer mit der Hauptmenge vereint. Die nunmehr schwefelsäure- und phosphorsäurefreie Lösung gab mit Silbernitrat in schwach saurer Lösung nur einen verschwindend kleinen Niederschlag. Sie wurde auf ein kleines Volumen eingengt und lieferte dann eine Kristallisation, die nach dem Umkristallisieren 1,62 g wog und aus Thymin bestand.

0,1704 g, bei 100° getrocknet, neutralisieren 26,9 ccm n/10 Säure (Kjeldahl) = 22,10% N,

0,1809 g, bei 100° getrocknet, neutralisieren 28,7 ccm n/10 Säure (Kjeldahl) = 22,21% N.

Berechnet für Thymin 22,2% N.

¹⁾ Steudel und Brigl, Diese Zeitschr. Bd. 70, S. 401.

Wenn man sich die Menge Thymin berechnet, die verlangt wird, wenn auf 5 N-Atome 1 Molekül Thymin kommt (Thymin hat 2, Cytosin¹ hat 3 N-Atome), so erhält man, da in der Lösung nach Abzug der für die Bestimmungen verbrauchten Mengen noch 0,9585 g N waren, einen theoretischen Wert von 1,72 g Thymin, der mit dem gefundenen von 1,62 g gut übereinstimmt.

Das Filtrat von der Thyminkristallisation, das zur Bestimmung des Cytosins resp. Uracils dienen sollte, ist uns leider verloren gegangen. Bei den mangelhaften Methoden zur quantitativen Bestimmung gerade dieser beiden Körper und den in Betracht kommenden geringen Mengen halten wir diesen Verlust nicht für so wesentlich, daß wir uns nicht für berechtigt halten, die von uns analysierte Substanz für Thyminsäure anzusehen.

Das Resultat des Versuchs ist sehr bemerkenswert. Bisher galt die Thyminsäure für einen Körper, der nur mit großer Sorgfalt dargestellt werden konnte. Es sind von den bisherigen Untersuchern ausführliche Vorschriften¹⁾ ausgearbeitet worden, nach denen man sehr genau arbeiten mußte, um den höchst labilen Körper zu erhalten. In der Spaltung der Nucleinsäure mit Sulfitlösung haben wir nun ein Mittel, bequem größere Mengen von Thyminsäure darzustellen; sie hat sich bei Anwendung dieser Methode als ein verhältnismäßig recht beständiger Körper erwiesen, verträgt sie doch gut ein mehrstündiges Erhitzen mit der Sulfitlösung auf 120—130°. Den Grund hierfür vermuten wir in der schützenden Wirkung, die die Sulfitlösung auf die reduzierende Gruppe des Kohlenhydrates ausübt. Dieser Schutz scheint so weit zu gehen, daß die Präparate von Thyminsäure, die nach der Sulfitmethode dargestellt wurden, nach länger als einjährigem Liegen weder ihre weiße Farbe noch ihre Leichtlöslichkeit in Wasser verloren hatten, ebensowenig ihre Reduktionskraft gegen Fehlingsche Lösung. Irgend ein Gehalt der Präparate an freier oder gebundener schwefliger Säure war allerdings

¹⁾ Kossel und Neumann, Diese Zeitschr. Bd. 22, S. 74. — Steudel und Brigl l. c. — Feulgen l. c.

auf keine Weise nachzuweisen, so daß möglicherweise doch noch andere Verhältnisse bei der Beständigkeit gerade dieser Präparate von thyminsäuren Salzen in Frage kommen.

Die Untersuchungen der Einwirkung der schwefligen Säure auf die Nucleinsäure, besonders auf die Kohlenhydratgruppe, auch unter anderen Versuchsbedingungen, werden von uns fortgesetzt.

Zusatz (H. Steudel). In den hier mitgeteilten Versuchen habe ich die aus der Nucleinsäure entstandene Substanz noch mit dem alten Namen Thyminsäure bezeichnet. Dieser Name ist seinerzeit von Kossel und Neumann¹⁾ eingeführt, als unsere Kenntnisse von der Struktur der Nucleinsäure und ihrer Derivate noch unvollkommen waren. Nach unseren jetzigen Anschauungen und nach den Bezeichnungen, die für die höheren Spaltstücke der Hefenucleinsäure eingeführt sind, müßte man aber denken, daß die Thyminsäure ein Körper wäre, der nur Thymin als einzige stickstoffhaltige Komponente in seinem Molekül enthielte. Nun enthält der Körper aber neben dem einen Molekül Thymin noch ein Molekül Cytosin, und um dies kurz auszudrücken, möchte ich vorschlagen, in Zukunft die Säure als „Thymosinsäure“ zu bezeichnen. Dieser Vorschlag läßt sich weiter damit rechtfertigen, daß voraussichtlich sich noch eine zweite Säure wird darstellen lassen, die ähnlich wie das freie Cytosin sich leicht in Uracil verwandeln läßt, nun an Stelle von Cytosin Uracil neben Thymin in ihrem Molekül enthält. Dieser Säure müßte dann die Bezeichnung „Thymacilsäure“ zukommen. Sie steht zur Thymosinsäure in derselben Beziehung wie z. B. die Guanylsäure zu der von M. Knopf²⁾ dargestellten Xanthylsäure.

Für die Durchführung der Untersuchungen standen uns Mittel aus der Gräfin-Bose-Stiftung zur Verfügung, für deren Bewilligung wir dem Kuratorium der Stiftung zu besonderem Dank verpflichtet sind.

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 92, S. 159.