IV.

Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie
zu Strassburg.

146. Ueber die Nucleinsäure aus der Lachsmilch.

Von
O. Schmiedeberg.

Die eingehenden Untersuchungen von Miescher über die Lachsmilch haben es zum erstenmale möglich gemacht, die elementare Zusammensetzung einer Nucleinsäure durch eine Formel auszudrücken¹⁾, was bekanntlich bis dahin nicht gelungen war²⁾. Jetzt konnte an die weitere Erforschung der Natur dieser interessanten und wichtigen Verbindung gedacht werden. Der Wunsch, für diesen Zweck das von Miescher in reichlicher Menge hinterlassene und in meine Hände gelangte Material zu verwerthen, gab die Veranlassung zu den nachstehenden Untersuchungen.

Die von mir vorgenommene Berechnung einer Formel führte zu der Vermuthung, dass die von Miescher dargestellten und analysirten Nucleinsäurepräparate nicht frei von Protamin waren. Directe, von mir ausgeführte Untersuchungen bestätigten diese Vermuthung. Der durch diesen Protamingehalt bedingte Fehler für die Analysenwerthe der Nucleinsäure konnte zwar bei der Berechnung der Formel eliminirt werden, allein für die weiteren Untersuchungen mussten völlig protaminfreie Präparate zur Anwendung kommen, da im anderen Falle auf die Erlangung klarer Resultate nicht zu hoffen war.

Die völlige Entfernung des Protamins gelang in der Weise, dass es durch eine unorganische Base ersetzt wurde. Sehr geeignet erwies sich für diesen Zweck das Kupfer, so dass es sich also um die Darstellung von nucleinsaurem Kupfer handelte.

1) Physiolog.-chem. Untersuchungen über die Lachsmilch. Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. XXXVII. S. 100. 1896.

2) Vergl. A. Kossel, Nucleinstoffe; in Liebreich's Encyclopädie III. Bd.

Zuerst führte das Kupfer-Kaliverfahren zum Ziele, das von mir bei den Untersuchungen über die Chondroitinschwefelsäure ausgearbeitet und seitdem in meinem Laboratorium auch in anderen Fällen mit Erfolg angewendet worden ist. Es beruht dieses Verfahren darauf, dass die Kupferverbindungen zahlreicher Stoffe in kalihaltigem Alkohol unlöslich sind, während kupferhaltige eiweissartige Stoffe, sowie auch das Protamin, darin mit der bekannten Biuretfarbe gelöst bleiben, d. h. aus ihren wässerigen, alkalischen Lösungen durch Alkohol nur sehr schwer gefällt werden.

Bei der Darstellung der Kupferverbindungen nach diesem Verfahren ergab sich, dass die Nucleinsäure in neutraler und nicht zu stark alkalischer Lösung sehr beständig ist und selbst in der Siedehitze keine oder wenigstens keine leichte und rasche Zersetzung erleidet, und dass sie, auch bei Gegenwart von Kupfer, aus ihren alkalischen Lösungen durch Essigsäure nicht gefällt wird, oder umgekehrt, in frisch gefälltem Zustande sich in Kaliumacetat leicht löst. Auf Grund dieser Erfahrungen gelang es dann, die Nucleinsäure auch ohne das Kupfer-Kaliverfahren von Protamin und Eiweissstoffen zu befreien und in die Kupferverbindung überzuführen.

Bemerkt muss noch werden, dass für diese Darstellung, wie für die anderer analysenreiner, amorpher Präparate, einige Uebung und Erfahrung erforderlich ist, die indessen jeder leicht erlangen wird, der auch nur während weniger Semester in einem biologisch-chemischen Laboratorium sich für solche Untersuchungen vorbereitet hat.

I. Darstellung und Analyse der Kupferverbindungen der Nucleinsäure.

1. Darstellung mittelst des Kupfer-Kaliverfahrens nach vorheriger theilweiser Entfernung des Protamins durch verdünnte Salzsäure.

Als Material für die Darstellung des nucleinsauren Kupfers nach diesem Verfahren diente theils frischer Lachshoden, den ich der Gefälligkeit der um die Miescher'schen Untersuchungen so verdienten Firma Glaser in Basel verdanke, theils trockene, bereits jahrelang aufbewahrte Lachsmilch aus dem Nachlass von Miescher. Zuerst wurde das alte, trockene Material verarbeitet, um an diesem die Eigenschaften der Nucleinsäure kennen zu lernen. Die Hauptschwierigkeit, die dabei zu überwinden war, bestand darin, dass dieses Material jene von mir beschriebene, anscheinend esterartige,

festen Verbindung von Nucleinsäure mit Protamin enthielt ¹⁾, die zwar in weit geringerem Maasse, aber doch in gleicher Weise wie die Nucleinsäure in Alkalien löslich und aus diesen Lösungen durch Säuren fällbar ist und deren Entfernung nur nach langwierigen Versuchen gelang. Etwas leichter gestaltete sich die Darstellung aus dem frischen Sperma, die in folgender Weise ausgeführt wurde.

Die Lachshoden, welche mir die Firma Glaser am 28. Nov. 1897, in Eis verpackt, übersandt hatte, gehörten verschiedenen Entwicklungsstufen an, doch waren alle nur sehr wenig blutig. Sie wurden zunächst mit der Hand zerdrückt und zerknetet und die Milch sodann mittels gelinden Druckes durch ein Leinentuch gepresst und in dieser Weise von dem Bindegewebe, den Gefässen und zum Theil auch vom Fett befreit. Dann erfolgte die Trennung der Köpfe von den Schwänzen und ihre Isolirung in der von Miescher beschriebenen Weise ²⁾ durch Waschen mit Wasser in der Centrifuge. Die Köpfe bildeten nach dieser Behandlung eine blendend weisse, schlammartige Masse, die zur theilweisen Entfernung des Protamins durch Decantiren oder durch Centrifugiren drei- bis viermal mit Salzsäure von 0,8 Proc. ausgezogen wurde.

Der Versuch, aus diesen mit Salzsäure extrahirten, frischen Köpfen, in der von Miescher ³⁾ für das in Alkohol erhärtete Material beschriebenen Weise, die Nucleinsäure durch Ausziehen mit verdünnter Kalilösung darzustellen, gelang nicht, weil selbst bei so geringem Zusatz von Kali, dass die Masse nicht alkalisch, sondern bloss neutral oder sogar noch merklich sauer reagirte, der flüssige Antheil eine so stark schleimige oder gallertartige Beschaffenheit annahm, dass auch bei starker Verdünnung ein Abfiltriren von Flüssigkeit nicht möglich war.

Bei der weiteren Verarbeitung ist es daher zweckmässig, zur Einschränkung der Quellung die Köpfe mit etwas Kupferacetatlösung zu vermischen und dann mit Wasser auszuwaschen. Die Köpfe verbinden sich dabei mit Kupfer. Nach dieser Verkupferung rührt man sie mit dem mehrfachen Volum Wasser an, fügt eine reichliche Menge concentrirter Kalilösung hinzu und lässt so lange unter öfterem Umrühren stehen, bis die Flüssigkeit infolge der Auflösung der Köpfe eine schleimige Beschaffenheit angenommen hat. Ist die Masse zu consistent so verdünnt man sie mit Wasser, fügt auch wohl noch Kalilauge hinzu und vermischt sie

1) Physiolog.-chem. Untersuchungen über die Lachsmilch, a. a. O. S. 144 und 147.

2) Physiolog.-chem. Untersuchungen über die Lachsmilch, a. a. O. S. 127 und 128.

3) Physiolog.-chem. Unters. u. s. w., a. a. O. S. 110.

dann ganz allmählich erst mit verdünntem und dann mit so viel concentrirtem Alkohol, dass ein teigartiger Niederschlag von nucleinsaurem Kalium-Kupfer entsteht, der meist nur schwach violett oder bläulich-violett gefärbt ist, während die alkoholische Flüssigkeit, welche das Protamin und Reste von Eiweissstoffen enthält, eine mehr oder weniger tief violette Färbung zeigt.

Man giesst die Flüssigkeit von dem Niederschlag ab, löst den letzteren unter Zusatz von Kali in nicht zu viel Wasser, fällt abermals mit Alkohol und wiederholt diese Operationen so lange, bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit keine Violett-färbung mehr erkennen lässt. Der Niederschlag selbst ist in der Regel durch einen kleinen Rest von nucleinsaurem Protamin schwach röthlich gefärbt. Es ist nicht ganz leicht, diesen Rest von Protamin zu entfernen. Das letztere geht schwerer in die alkoholische Lösung über, wenn diese zu wenig Kupfer enthält. Ist der Niederschlag durch das öftere Umfällen schliesslich zu kupferarm geworden, so löst man ihn in der angegebenen Weise in Wasser auf, neutralisirt die Lösung mit Essigsäure, fügt etwas Kupferacetat hinzu, macht sie stark alkalisch, klärt durch Centrifugiren und fällt schliesslich wieder durch Alkohol. In dieser Weise gelingt es, die letzten Spuren von Protamin zu entfernen.

Sodann vermischt man den Niederschlag, aus dem das Kupfer bis auf einen geringen Rest in Form der Protaminverbindung entfernt ist, mit dem 10—20fachen Volum Wasser, aber ohne Kali. Er quillt dabei stark auf und bildet schliesslich eine gallertartige Masse die durch Neutralisiren mit Essigsäure, Verdünnen mit Wasser und Zusatz von Kaliumacetat in der Regel in eine Lösung umgewandelt werden kann. Zuweilen aber bleiben gallertige Massen ungelöst. Diese bringt man durch einen Zusatz von Kali in Lösung und neutralisirt dann mit Essigsäure. Selbst bei Zusatz der letzteren bis zu ziemlich stark saurer Reaction erfolgt keine Fällung, weil die Nucleinsäure in den Acetaten der Alkalien löslich ist.

Die in dieser Weise erhaltene Lösung ist meist völlig klar und kann dann, allenfalls nach vorherigem Filtriren, unmittelbar, wie unten angegeben, mit Kupferchlorid gefällt werden. Erscheint sie dagegen durch äusserst fein suspendirte Theilchen etwas getrübt, so muss sie vorher scharf centrifugirt werden, wobei die trübenden Bestandtheile, die durch jedes Filter dringen, sich fest am Boden der Centrifugireylinder absetzen. Hierauf fällt man aus der klaren oder zuweilen schwach opalisirenden Lösung die Nucleinsäure durch Salzsäure aus. Sie wird dadurch von Zersetzungsproducten befreit,

falls solche unter der Einwirkung des Kalis entstanden sein sollten. Diese werden durch Salzsäure nicht gefällt und bleiben deshalb in Lösung.

Die gefällte, kupferarme Nucleinsäure bildet eine zähe, kautschukartig dehnbare, teigige Masse. Man löst sie in ganz verdünnter Kalilauge, was wegen der angegebenen Beschaffenheit des Niederschlages nur sehr langsam erfolgt und beständiges Umrühren erfordert. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure ist die Lösung in der Regel klar und trotz des Kupfergehalts wasserhell; nur zuweilen zeigt sie einen Stich ins Gelbliche. Man filtrirt sie der Sicherheit wegen und versetzt sie dann in reichlichem Ueberschuss mit einer nicht zu concentrirten, vorher filtrirten Lösung von chemisch-reinem Kupferchlorid. Die Nucleinsäure wird dabei als Kupferverbindung in Form eines flockigen Niederschlages gefällt. Die Lösung der Nucleinsäure darf aber beim Zusatz von Kupferchlorid nicht zu schwach sauer sein, weil sonst basische Acetate oder Chloride des Kupfers mitgefällt werden. Man wende von der Kupferchloridlösung einen grossen Ueberschuss an, damit ein völlig kalifreier Niederschlag entsteht. Diesen sammelt man sofort auf einem gehärteten Filter und wäscht unter wiederholtem Umrühren so lange mit Wasser aus, bis Washwasser und Niederschlag völlig chlorfrei geworden sind. Bei grösseren Mengen des letzteren sind dazu 2–3 Tage erforderlich. Die Kupferreaction des Washwassers hört früher als die Chlorreaction auf. Dann setzt man das Auswaschen mit Alkohol fort und entfernt schliesslich diesen mit Wasser. Letztere Operation darf nicht unterlassen werden, weil beim Trocknen amorpher, alkoholfreicher Stoffe der Alkohol zuweilen mit letzteren fest verbunden bleibt. Der Niederschlag wird dann am zweckmässigsten zunächst bei gelinder Wärme und unter öfterem Umrühren und Zerreiben an der Luft getrocknet, weil man in dieser Weise ein feines lockeres, grünes Pulver erhält, während die Masse beim raschen Trocknen eine hornartige Beschaffenheit annimmt und sich kaum noch fein zerreiben lässt.

Die Darstellung der Kupferverbindungen der Nucleinsäure aus alter, trockener Lachsmilch erforderte eine intensivere Behandlung mit Kupfer und Kali und ein häufigeres Centrifugiren der Flüssigkeiten, als bei der Darstellung aus dem frischen Material nöthig war. Die trockene, kalkartige, pulverige, mit etwas grösseren Klumpen untermischte, gelblich weisse Masse, welche meist aus den ganzen Testikeln bestand, wurde nach der Extraction mit Salzsäure viele Male in der angegebenen Weise mit Kupfer und Kali behandelt. Als nur noch ein geringer Rest biuret reagirender Substanzen zurück-

geblieben war, wurde die alkalische Masse in ziemlich viel Wasser gelöst, die trübe Flüssigkeit durch Centrifugiren geklärt und aus der bläulichen, noch etwas violett durchscheinenden Lösung die Nucleinsäure durch Salzsäure ausgefällt. Die letzten Reste der biuretartig reagirenden Stoffe konnten nur durch vielfach wiederholte Behandlung mit Kupfer, Kali und Alkohol entfernt werden. Als dies erreicht war, wurde die Lösung in Kaliumacetat hergestellt und aus dieser die Nucleinsäure durch Kupferchlorid ausgefällt.

Hinsichtlich der Ausführung der Analysen ist nur zu bemerken, dass die Substanz bei der Verbrennung im Schiffehen mit Blei- und saurem Kaliumchromat gemischt und für die Cu- und P-Bestimmung mit Soda und Salpeter verbrannt wurde. Die Ueberführung der Phosphorsäure in Ammonium-Magnesiumphosphat erfolgte entweder direct oder nach vorheriger Ausfällung mit Molybdänsäure. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. Die sorgfältige Ausführung der C-, H- und N-Bestimmungen verdanke ich meinem Assistenten, Herrn Dr. E. Faust. Der Berechnung der Formeln sind die von der Commission der Deutschen chemischen Gesellschaft beschlossenen Atomgewichte zu Grunde gelegt, für die Analysen kamen die älteren abgerundeten Atomzahlen zur Anwendung.

1. Präparat B.₅. Aus den frischen, isolirten Köpfen in der vorstehend beschriebenen Weise dargestellt, namentlich sorgfältig, jedoch ohne zu lange Einwirkung von Kali, vom Protamin und von Resten von Eiweissstoffen befreit und mit Salzsäure gefällt. Für die Cu- und P-Bestimmung diente die lufttrockene Substanz, deren Wassergehalt durch Trocknen im Vacuum über Schwefelsäure bei 60—80° bestimmt war. Die nachstehend mitgetheilten Zahlenwerthe beziehen sich alle auf trockene Substanz.

1. 0,3708 Substanz geben $0,4571 \text{ CO}_2 = 0,1246 \text{ C}$
 $= 33,60 \text{ Proc. und } 0,1210 \text{ H}_2\text{O} = 0,0134 \text{ H} = 3,61 \text{ Proc.}$
2. 0,3049 Substanz geben $0,3775 \text{ CO}_2 = 0,1029 \text{ C}$
 $= 33,74 \text{ Proc. und } 0,1054 \text{ H}_2\text{O} = 0,0117 \text{ H} = 3,83 \text{ Proc.}$
3. 0,2467 Substanz geben $0,0343 \text{ N} = 13,90 \text{ Proc.}$
4. 0,3555 Substanz geben $0,1102 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0705 \text{ P}_2\text{O}_5 = 19,83 \text{ Proc.}$ Das Ammonium-Magnesiumphosphat ohne vorherige Molybdäanfällung erhalten, nach dem Auswaschen in Salzsäure gelöst und mit Ammoniak und etwas Magnesiamixtur wieder gefällt.
5. 0,3320 Substanz geben nach vorheriger Molybdäanfällung $0,1024 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0655 \text{ P}_2\text{O}_5 = 19,72 \text{ Proc.}$
6. 0,3125 Substanz geben $0,0442 \text{ CuO} = 0,0352 \text{ Cu} = 11,26 \text{ Proc.}$
7. 0,3701 Substanz geben $0,0522 \text{ CuO} = 0,0416 \text{ Cu} = 11,24 \text{ Proc.}$
8. 0,4165 Substanz geben $0,0581 \text{ CuO} = 0,0463 \text{ Cu} = 11,11 \text{ Proc.}$

Aus dem Mittel dieser Zahlen ergibt sich für dieses nucleinsäure Kupfer die Formel:

	ber.	gef.
C	—33,63—	33,67
H	— 3,60—	3,72
Cu	—11,14—	11,20
N	—13,77—	13,90
P ₂ O ₅	—19,90—	19,77.

Das kupferfreie Präparat hat demnach die Zusammensetzung:

2. Präparat B.₁—₃. Verschiedene Portionen des frischen Spermas, wie vorstehend angegeben, biuretfrei gemacht, dann mit einander vereinigt und aus der Lösung in Kaliumacetat durch Kupferchlorid gefällt. Eine der Portionen war vorher nicht mit Salzsäure gefällt worden. Die in der früher angegebenen Weise ausgewaschene, alkoholfleuchte Substanz wurde über Schwefelsäure getrocknet, dann gepulvert, mit Wasser gewaschen, um die letzten Spuren von Chlor und von Alkohol zu entfernen, und lufttrocken in das Vacuum über Schwefelsäure gebracht. Nach 14 Tagen wurde sie zuerst gewogen und nahm von da ab in den folgenden 9½ Monaten noch etwa um 10 Proc. an Gewicht ab. In diesem Zustande wurde sie analysirt.

1. 0,4555 Substanz geben 0,5638 CO₂ = 0,1537 C = 33,74 Proc. und 0,1511 H₂O = 0,0168 H = 3,68 Proc.
2. 0,3665 Substanz geben 0,0537 N = 14,67 Proc.
3. 0,2353 Substanz geben 0,0345 N = 14,66 Proc.
4. 0,3375 Substanz geben 0,0493 N = 14,60 Proc.
5. 0,4186 Substanz geben ohne vorherige Molybdänfällung 0,1308 Mg₂P₂O₇ = 0,0836 P₂O₅ = 19,97 Proc. und 0,0534 CuO = 0,0425 Cu = 10,15 Proc.

Die Zusammensetzung dieses Präparats ist nach den vorstehenden Analysen:

	ber.	gef.
C	—33,92—	33,74
H	— 3,66—	3,68
Cu	—10,33—	10,15
N	—13,89—	14,64
P ₂ O ₅	—20,07—	19,97

Die Zusammensetzung der kupferfreien Verbindung ist darnach:

Die Substanz wird sodann im Vacuum über Schwefelsäure erst 7 Tage lang bei 80°, dann 14 Tage lang bei 100° getrocknet, bis schliesslich beim weiteren Trocknen eine Gewichtsabnahme nicht mehr eintritt.

1,5481 Substanz haben bei diesem Trocknen 0,0395=2,55 Proc. an Gewicht verloren; 2 Mol. H₂O auf je 1 Mol. der Kupferverbindung verlangen 2,54 Proc., so dass also diese stark getrocknete oder über-trocknete Verbindung im kupferfreien Zustande nach der folgenden Formel zusammengesetzt sein muss:

Wahrscheinlich ist die Nucleinsäure dabei in eine Pyrophosphorsäureverbindung übergegangen, ein Vorgang, wie er von mir auch für die Eisenverbindung des phosphorsäurehaltigen Onuphins aus den Wohnröhren von *Onuphis tubicola* nachgewiesen ist.¹⁾ Beim Trocknen während der 3 Wochen war zwar eine merkliche Bräunung der Substanz eingetreten, doch blieb die Schwefelsäure farblos, so dass sicher kein organischer Antheil, sondern nur Wasser den Gewichtsverlust verursacht hatte.

3. Präparat A.2. Aus altem, trockenem Material in der oben (S. 61 und 62) beschriebenen Weise dargestellt; analysirt nach 3—4 Wochen langem Stehen im Vacuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur.

1. 0,2820 Substanz geben 0,3482 CO₂ = 0,0950 C = 33,68 Proc.
und 0,1037 H₂O = 0,0115 H = 4,07 Proc.
2. 0,3010 Substanz geben 0,3696 CO₂ = 0,1008 C = 33,48 Proc.
und 0,1086 H₂O = 0,0120 H = 3,98 Proc.
3. 0,5059 Substanz geben 0,0721 N = 14,25 Proc.
4. 0,3659 Substanz geben 0,0513 N = 14,02 Proc.
5. 0,3324 Substanz geben 0,0394 CuO = 0,0314 Cu = 9,44 Proc.
6. 0,3677 Substanz geben 0,0434 CuO = 0,0346 C = 9,40 Proc.

Die P-Bestimmungen misslangen wegen fehlerhafter Beschaffenheit der Molybdänlösung. Das Präparat war verbraucht, bevor der Fehler bemerkt wurde.

Nach den gefundenen Analysenwerthen berechnet sich für dieses Präparat die Zusammensetzung:

Die kupferfreie Verbindung hat demnach die Formel:

1) Ueber die Zusammensetzung der Wohnröhren von *Onuphis tubicola* Müll. Mittheil. a. d. zoolog. Station zu Neapel. Heft III. S. 373. 1882.

4. Präparat A.⁵. Das trockene Material, aus dem auch das vorige Präparat dargestellt war, wurde zuerst mit verdünnter Salzsäure ausgezogen und dann 24 Stunden lang der Verdauung durch Magensaft unterworfen, wobei nur ein verhältnissmässig geringer Rest unverdaut blieb, welcher dann nach dem Kupfer-Kaliverfahren weiter verarbeitet wurde. Das Präparat bildete nach dem Trocknen im Vacuum über Schwefelsäure ein grünliches, in neutralem Kaliumacetat leicht lösliches Pulver.

1. 0,2128 Substanz geben $0,2638 \text{ CO}_2 = 0,0719 \text{ C} = 33,78 \text{ Proc.}$
und $0,0723 \text{ H}_2\text{O} = 0,0080 \text{ H} = 3,75 \text{ Proc.}$
2. 0,2516 Substanz geben $0,0350 \text{ N} = 13,91 \text{ Proc.}$
3. 0,2950 Substanz geben $0,0412 \text{ N} = 13,96 \text{ Proc.}$
4. 0,1425 Substanz geben $0,0202 \text{ N} = 14,17 \text{ Proc.}$
5. 0,3365 Substanz geben $0,0414 \text{ CuO} = 0,0330 \text{ Cu} = 9,80 \text{ Proc.}$
6. 0,3080 Substanz geben $0,0364 \text{ CuO} = 0,0290 \text{ Cu} = 9,41 \text{ Proc.}$
und $0,0958 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0613 \text{ P}_2\text{O}_5 = 19,90 \text{ Proc.}$

Die Berechnung führt zu der folgenden Zusammensetzung dieses Präparats:

ber. gef.

C—34,09—33,78

H— 3,70— 3,75

Cu— 9,88— 9,60

N—13,96—14,01

P₂O₅—20,17—19,90

Die Formel der kupferfreien Verbindung ist demnach:

2. Darstellung der Präparate mittelst des Kupfer-Kaliverfahrens nach vorheriger Entfernung des Protamins durch Kupferchlorid.

Für diese Darstellung dienten ganz frische, von Glaser in Basel gegen Ende November 1898 bezogene Lachstestikel.

Die Köpfe wurden in der oben (S. 59) angegebenen Weise isolirt und dann zur Entfernung des Protamins mit einer Lösung von Kupferchlorid behandelt. Sie nehmen dabei Kupfer auf und erhärten derartig, dass sie ein ziemlich schweres, feinkörniges, grünliches Pulver bilden und sich leicht durch Decantiren auswaschen lassen. Das Protamin geht als Chlorhydrat in Lösung und wird durch weiteres Auswaschen der verkupferten Köpfe mit Kupferchloridlösung und schliesslich mit Wasser fast vollständig entfernt. Man bringt die Köpfe

jetzt in eine verdünnte, neutrale Lösung von Kaliumacetat, wodurch sie ausserordentlich stark aufquellen, ohne sich zu lösen. Erst nach der Behandlung mit Alkalien wird die Nucleinsäure in Kaliumacetat löslich. Die Behandlung mit Kaliumacetat hat den Zweck, auch die inneren Theile der Köpfe durch die Quellung für die Einwirkung von Kupferchlorid zugänglich zu machen, das man jetzt der gequollenen Masse in reichlichem Maasse zusetzt, um noch die Reste von Protamin möglichst zu beseitigen.

Die verkupferten und in dieser Weise von neuem erhärteten, fast protaminfreien Köpfe; die man durch Auswaschen mit Wasser vom überschüssigen Kupfer befreit, bestehen zwar der Hauptmasse nach aus nucleinsaurem Kupfer, enthalten aber noch geringe Mengen eiweissartiger Stoffe, die wohl dem Bindegewebe der Testikel entstammen. Diese Stoffe lassen sich jetzt leicht in der Weise entfernen, dass man die kupferhaltigen Köpfe mit verdünnter Kalilösung zu einer blauen, dicklichen, schleimigen Flüssigkeit anrührt und diese mit Alkohol fällt, wobei in der bekannten Weise die Stoffe, welche die Biuretfärbung geben, in Lösung bleiben. Man muss diese Operation zwei- bis dreimal in der oben (S. 60) beschriebenen Weise wiederholen, um jede Spur von Biuretfärbung zu beseitigen. Hierauf löst man das kupferhaltige nucleinsaure Kalium in viel Wasser zu einer verdünnten Lösung, säuert mit Essigsäure mässig stark an, klärt durch Centrifugiren, fällt mit Kupferchlorid und wäscht das nucleinsaure Kupfer bis zum Verschwinden der Chlorreaction mit Wasser aus.

Beim Stehen an einem mässig warmen Orte war das so gewonnene nucleinsaure Kupfer zu einer erbsen- bis bohnen-grosse Stücke bildenden, compacten, durchsichtigen grünen Masse zusammengetrocknet, die sich nicht pulverisiren liess. Die Stücke wurden 14 Tage lang der Einwirkung einer ganz neutralen Lösung von Kaliumacetat unterworfen, dadurch zur Quellung gebracht, dann fein zerrieben, mit Wasser ausgewaschen, durch Behandeln mit Kupferchloridlösung wieder in das reine Kupfersalz übergeführt und schliesslich mit Wasser ausgewaschen.

5. Präparat C.1. In der vorstehend beschriebenen Weise dargestellt. Nachdem es 8 Tage bei gewöhnlicher Temperatur im Vacuum über Schwefelsäure gestanden hatte, wurde es analysirt, bevor noch constantes Gewicht eingetreten war.

1. 0,3831 Substanz geben $0,4755 \text{ CO}_2 = 0,1297 \text{ C} = 33,85 \text{ Proc.}$
und $0,1430 \text{ H}_2\text{O} = 0,0158 \text{ H} = 4,12 \text{ Proc.}$
2. 0,5024 Substanz geben $0,0726 \text{ N} = 14,45 \text{ Proc.}$

3. 0,4165 Substanz geben $0,0427 \text{ CuO} = 0,0340 \text{ Cu} = 8,16 \text{ Proc.}$
 und $0,1267 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0810 \text{ P}_2\text{O}_5 = 19,44 \text{ Proc.}$

Der höhere N-Gehalt dieses Präparates und andere Umstände, auf die wir weiter unten zurückkommen, machen es wahrscheinlich, dass es reicher an Purinbasen ist, als die normale Nucleinsäure. Unter der Voraussetzung, dass es mehr Adenin als gewöhnlich enthält, berechnet sich für dasselbe die folgende Zusammensetzung:

ber. gef.

C—34,06—33,85

H— 3,96— 4,12

Cu— 8,10— 8,16

N—14,47—14,45

P₂O₅—19,74—19,44

Im Vacuum neben Schwefelsäure bei 50—55° verliert die Substanz in den ersten 24 Stunden 2,23 Proc. Wasser, nach weiteren 24 Stunden noch 0,28 Proc. und abermals nach 24 Stunden 0,35 Proc., also zusammen 2,86 Proc. Die 10 Mol. H₂O, welche in dem vorstehenden Formelcomplex ausserhalb der eigentlichen Verbindung stehen, erfordern eine Abnahme von 2,08 Proc. Bei diesem Trocknen hat also die Substanz nicht nur diese 10 Mol. Wasser abgegeben, was verhältnissmässig rasch geschehen ist, sondern ausserdem noch 3 Mol. davon, und diese nur sehr langsam, verloren. Es handelt sich wahrscheinlich, wie bei dem stark getrockneten Antheil von Präp. B.₁₋₃ (S. 64), um eine beginnende Pyrophosphorsäurebildung.

Berücksichtigt man also nur jene 10 Mol. H₂O und sieht von dem Gehalt an überschüssigen Purinbasen ab, so hat die kupferfreie Nucleinsäure dieses Präparats die Zusammensetzung:

3. Darstellung des nucleinsauren Kupfers mittels Kaliumacetatlösung in der Hitze.

Die in der alten, im trockenen Zustande viele Jahre lang aufbewahrten Lachsmilch enthaltene, oben (S. 58 und 59) von mir erwähnte feste Verbindung von Nucleinsäure mit Protamin lässt sich durch das blosse Kupfer-Kaliverfahren nur äusserst schwer spalten oder entfernen. Bei einem solchen Material erwies sich ein Verfahren als zweckmässig, welches darauf beruht, dass jene Verbindung, sowie auch alle übrigen biuretartig reagirenden Bestandtheile der alten,

trockenen Lachsmilch in schwach essigsaurer Kaliumacetatlösung unlöslich sind und sich in der Hitze ausscheiden, während die durch gelinde Einwirkung von Kali aufgeschlossene Nucleinsäure nicht abgeschieden und beim Erhitzen nicht nachweisbar zersetzt wird.

Die durch Ausziehen mit Salzsäure von 1—2 Proc. oder besser durch Behandeln mit einer Kupferchloridlösung vom Protamin möglichst befreite Lachsmilch wurde entweder zuerst in der oben angegebenen Weise zwei- bis dreimal mit Kupfer und Kali behandelt und mit Alkohol gefällt oder direct mit Kali zu einer stark alkalisch reagirenden Masse angerührt. Diese letztere oder die durch Behandeln des noch stark violett gefärbten, alkoholischen Niederschlages mit Wasser erhaltene Flüssigkeit wird mit Essigsäure angesäuert und nach Zusatz von ein wenig neutralem Kaliumacetat auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis sie möglichst klar geworden ist. Dann filtrirt man sie von der ausgeschiedenen bröckligen oder flockigen Masse ab, wobei man zur Klärung nicht zu fein vertheilte Thierkohle anwenden kann. Sollten die ersten Antheile des Filtrats noch etwas trübe oder opalescirend durchgehen, so giesst man sie so lange zurück auf das Filter, bis die Trübung verschwunden ist. Aus dieser Lösung wird die Nucleinsäure mit Salzsäure oder gleich mit Kupferchlorid gefällt und, wenn nöthig, zur Entfernung der letzten Reste biuretartig reagirender Substanzen in Kali gelöst und mit Alkohol gefällt. Diesen Niederschlag löst man in ziemlich viel Wasser auf, säuert die trübe Flüssigkeit mit Essigsäure an, fügt, wenn nicht vollständige Lösung erfolgt, etwas Kali hinzu, säuert wieder mit Essigsäure an, filtrirt und fällt die Nucleinsäure aus der klaren Lösung durch Kupferchlorid.

6. Präparat A.6. In der vorstehend beschriebenen Weise dargestellt. Die erst mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaction, dann mit Alkohol gewaschene Verbindung wurde bei gelinder Wärme getrocknet, hierauf fein zerrieben, nochmals durch Decantiren mit Wasser ausgewaschen, abermals bei gelinder Wärme und schliesslich bei 60° im Vacuum neben Schwefelsäure getrocknet.

1. 0,3259 Substanz geben $0,3799 \text{ CO}_2 = 0,1036 \text{ C} = 31,78 \text{ Proc.}$
und $0,1167 \text{ H}_2\text{O} = 0,0129 \text{ H} = 3,95 \text{ Proc.}$
2. 0,4114 Substanz geben $0,4812 \text{ CO}_2 = 0,1312 \text{ C} = 31,89 \text{ Proc.}$
und $0,1400 \text{ H}_2\text{O} = 0,0155 \text{ H} = 3,76 \text{ Proc.}$
3. 0,2424 Substanz geben $0,0314 \text{ N} = 12,95 \text{ Proc.}$
4. 0,2410 Substanz geben $0,0316 \text{ N} = 13,11 \text{ Proc.}$
5. 0,3520 Substanz geben $0,0444 \text{ CuO} = 0,0354 \text{ Cu} = 10,05 \text{ Proc.}$
und $0,1049 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0670 \text{ P}_2\text{O}_5 = 19,03 \text{ Proc.}$

Die Berechnung führt für dieses Präparat zu der folgenden Zusammensetzung:

Die Elementarformel der kupferfreien Substanz ist demnach:

Auffallend ist, dass dieses Präparat 4 Mol. H₂O mehr enthält, als die Präparate unter 1, 2, 4 und 5, obgleich es im Vacuum neben Schwefelsäure bei 60° getrocknet war. Ob es dieses, wahrscheinlich cementartig gebundene Wasser beim Erhitzen in der schwach essigsauren Lösung aufgenommen hat oder später, als es nach dem Trocknen nochmals gewaschen wurde, lässt sich zunächst nicht entscheiden.

Ueerblicken wir die zur Darstellung der verschiedenen Präparate angewandten Verfahren, so ergibt sich, dass alle zum Ziele führen. Bei Anwendung von frischem Sperma verfährt man am zweckmässigsten in der bei Präparat C.1. beschriebenen Weise. Jedes andere, namentlich trockene Material, wird erst mit Wasser gut gewaschen, dann ebenfalls mit Kupferchloridlösung ausgezogen, der Ueberschuss der letzteren durch Auswaschen mit Wasser entfernt, die Masse sodann der Einwirkung einer verdünnten Kalilösung ausgesetzt, um die Nucleinsäure aufzuschliessen, d. h. in die in Kaliumacetat lösliche Form überzuführen (vergl. S. 66), und schliesslich das Lösen in Kaliumacetat und die weitere Behandlung wie bei Präparat A.6. vorgenommen. Es kann vorkommen, dass das in dieser Weise dargestellte nucleinsäure Kupfer noch eine Spur von Biuretreaction zeigt. Dann muss es mit Kali und Alkohol behandelt und nach der Befreiung von Resten der biuretartig reagirenden Stoffe von neuem in die Kaliumacetatlösung übergeführt und mit Kupferchlorid gefällt werden.

Was die berechneten Formeln betrifft, so diene zunächst zur leichteren Uebersicht derselben die folgende Zusammenstellung:

1. Präp.	B.5.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5$
2. "	B.1—3.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5$
4. "	A.5.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5$
5. "	C.1.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5$
3. "	A.2.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5 + H_2O$
6. "	A.6.	$C_{40}H_{56}N_{14}O_{16}, 2P_2O_5 + 4H_2O$

Wenn wir von der Neigung der Kupferverbindungen, noch weiter Wasser abzugeben, und von 3 Mol. H_2O bei Nr. 6 absehen, so haben wir es mit den beiden Formeln

zu thun. Die erstere unterscheidet sich von der von mir aus den Analysen der Miescher'schen Präparate berechneten Formel

die letztere durch $+\text{H}_2$. Dieser Unterschied erklärt sich in sehr einfacher Weise, wenn man das Verhalten der Nucleinsäure zu Basen näher kennen gelernt hat. Fällt man sie aus kupferhaltigen Lösungen durch Salzsäure, so gelingt es selbst bei einem sehr grossen Ueberschuss der letzteren niemals, sie kupferfrei zu erhalten. Ihre Avidität ist also eine sehr grosse. Daher ist es undenkbar, dass die Miescher'schen Präparate, welche durch Fällen der Natronlösung der Nucleinsäure mit Salzsäure und Alkohol erhalten waren, natronfrei gewesen seien. Sie beständen vielmehr aus einem Gemenge von saurem nucleinsaurem Natrium und saurem nucleinsaurem Protamin. Der Na-Gehalt kam aber als O in Rechnung. Berücksichtigt man dies, so wie den Umstand, dass das saure nucleinsaure Protamin auf 2 Mol. der Säure 1 Mol. der letztgenannten Base enthält, so ist an Stelle der Formelgruppe ¹⁾

wahrscheinlich die folgende, natriumhaltige und etwas wasserstoffreichere zu setzen:

Die zweite, aus den Analysenzahlen eines anderen Miescher'schen Präparates berechnete Formelcombination ²⁾ erhält dann nach entsprechender Umformung den Ausdruck:

Das Verhältniss der gefundenen Zahlen zu den berechneten ist, bis auf ganz geringe Abweichungen, in den neuen Formeln das gleiche wie in den alten.

1) Physiolog.-chem. Untersuchungen über die Lachsmilch, a. a. O. S. 119.

2) a. a. O. S. 120.

Vorstehende Annahme von dem Natriumgehalt der beiden Präparate konnte ich durch die Untersuchung einer in meinem Besitz befindlichen Nucleinsäure bestätigen, die von Miescher im J. 1887 dargestellt, unter Alkohol aufbewahrt und mit der Bezeichnung „prima“ versehen war. Die ohne Vacuum bei 100° getrocknete und nach dem Vermischen mit reinem Barythydrat vorsichtig, aber vollständig verkohlte Substanz gab in Form des Sulfats 1,35 Proc. Na. Die erste der vorstehenden Formeln (14) erfordert 1,22 Proc., die andere (15) 1,08 Proc. Na. Es kann nach diesen Ergebnissen nicht zweifelhaft sein, dass die Nucleinsäure der Lachsmilch in Form der Miescher'schen Präparate auch in Bezug auf die Anzahl der H- und O-Atome die gleiche Zusammensetzung hat, wie in den vorstehend beschriebenen Kupferverbindungen, falls diese nicht übertröcknet sind.

Die elementare Zusammensetzung der Nucleinsäure ist daher:

Auch das von Altmann aus Hefe dargestellte und von Miescher analysirte Nucleinsäurepräparat muss neben Ammoniak reichliche Mengen von Natrium enthalten haben, welches bei der von mir ausgeführten Berechnung der Formel ¹⁾ als O in Rechnung kam. Wahrscheinlich ist auch diese Nucleinsäure eine Nucleotinphosphorsäureverbindung. Die Formelgleichung, welche die Beziehungen der Hefenucleinsäure zur Nucleinsäure aus Lachsmilch ausdrücken soll, ist daher aufzugeben, abgesehen davon, dass sie wegen eines bei der Correctur vorgekommenen Versehens auch an sich fehlerhaft ist.

II. Ueber die Componenten der Nucleinsäure.

An Purinderivaten enthält die Nucleinsäure nur Adenin und Guanin. Von den Versuchen, diese Basen quantitativ zu bestimmen, wird weiter unten die Rede sein. Aus der Anzahl der N-Atome der Nucleinsäure folgt unmittelbar, dass sich in ihr von jeder der beiden Basen nicht mehr als ein Atom finden kann. Daher ist die Frage nicht unberechtigt, ob die obige Formel für eine einheitliche Nucleinsäure Geltung hat, oder ob die analysirten Präparate aus einem Gemenge von Adenin- und Guaninnucleinsäure bestanden haben. Gegen die Annahme eines Gemenges von Monoadenin- und Monoguaninnucleinsäure spricht der Umstand, dass nach Entfernung bloss eines Theiles der Purinbasen, wodurch Nucleinsäuren mit je 1 Atom der Basen entstehen müssen, die Fällbarkeit durch Kupferchlorid auf-

1) Physiolog.-chem. Unters. über die Lachsmilch a. a. O. S. 122.

gehoben wird. Dagegen ist die Möglichkeit, dass es sich um ein Gemenge von Diadenin- und Diguaninnucleinsäure handeln könnte, nicht ganz ausgeschlossen, jedoch unwahrscheinlich.

Zieht man die beiden Purinbasen von der Formel der Nucleinsäure ab, so erhält man die Zusammensetzung des phosphorhaltigen Körpers, mit dem diese Basen zu Nucleinsäure verbunden sind. Nennen wir diesen Körper vorläufig Nucleotinphosphorsäure und lassen die Frage ausser acht, ob sich bei dem Austritt der Purinbasen Wasser betheiligt, so giebt die nachstehende Formelgleichung eine Vorstellung von der Zusammensetzung dieser Säure:

Die Frage, in welcher Weise die Purinbasen mit der Nucleotinphosphorsäure verbunden sind, ob salz- oder esterartig, ist nicht leicht zu beantworten. Kossel¹⁾ giebt an, dass die von ihm aus Thymus dargestellte Nucleinsäure, sowie auch die aus dieser entstandene basenfreie Thyminsäure die Ausfällung der Nucleinbasen durch Metallsalze verhindern, dass also die Nichtfällbarkeit jener durch Silber nicht als ein Beweis gegen ihre salzartige Bindung angeführt werden könne. Diese Angabe findet auch in dem Verhalten der hier in Rede stehenden Nucleinsäure ihre volle Bestätigung. Um ein Urtheil darüber zu gewinnen, in welchem Maasse die Nucleinsäure weitere Mengen der Purinbasen zu binden im stande ist, musste eine an Purinbasen reichere Nucleinsäure, als die gewöhnliche, dargestellt werden. Das Verfahren war einfach folgendes. Frisch bereitetes, nicht vorher getrocknetes nucleinsaures Kupfer, sowie ein aus Nucleinsäure dargestelltes Gemenge von reinem Adenin und Guanin wurden zusammen in kalihaltigem Wasser gelöst, die Lösung 10—15 Minuten auf 40—45° erwärmt, dann abgekühlt, mit Essigsäure angesäuert, filtrirt, Kupferchlorid hinzugefügt, die gefällte Verbindung ausgewaschen, erst an der Luft, dann 1—2 Tage lang bei 70—80° getrocknet und die Cu-, N- und P-Bestimmung vorgenommen. Das Präparat gab 12,32 Proc. Cu, 15,62 Proc. N und 17,13 Proc. P₂O₅, aus welchen Zahlen sich die folgende Zusammensetzung dieses purinbasenreicheren Nucleinsäurepräparats berechnet:

1) Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXII. S. 81. 1896.

Ein Molekül der gewöhnlichen Nucleinsäure, welches bereits 1 Mol. Adenin und 1 Mol. Guanin, also im ganzen 2 Mol. dieser Basen enthält, hat bei dem angegebenen Verfahren von beiden Basen zusammen $\frac{9}{10}$ Mol., also nahezu 1 Mol., aufgenommen. Dieser Antheil der Purinbasen ist sicherlich nicht esterartig gebunden, und dennoch verhält sich eine derartige Nucleinsäure nicht wesentlich anders als die normale. Erhitzt man die letztere mit verdünnter Salzsäure, so wird nach dem Uebersättigen der Flüssigkeit mit Ammoniak ein Theil der Basen durch Silber gefällt. Beim Erwärmen löst sich der Silberniederschlag, scheidet sich aber nach dem Erkalten wieder aus. Die Nucleotinphosphorsäure oder wenigstens ein Theil derselben hat demnach durch das Erhitzen mit Salzsäure die Fähigkeit verloren, die Fällung der Basen durch Silber zu verhindern. Es handelt sich dabei also nicht um eine Abspaltung der Purinbasen, sondern um eine Veränderung der Nucleotinphosphorsäure, deren Natur wir weiter unten kennen lernen werden.

Je ärmer die Nucleotinphosphorsäure an diesen Basen wird, desto schwerer giebt sie den Rest derselben ab. Die letzten Reste lassen sich ohne tiefere Veränderung des Moleküls dieser Säure für die Fällung mit Silber überhaupt nicht frei machen, und wenn das dennoch geschehen ist, so haften nucleinartige Zersetzungsproducte den Basen fest an und werden mit diesen zusammen durch Silber gefällt. Deshalb ist es sehr schwierig, die Basen mit voller Sicherheit quantitativ zu bestimmen. Sucht man sie von solchen Producten zu befreien, so ist dies mit grossen Verlusten verbunden, wägt man sie zusammen mit denselben, so fällt die Bestimmung viel zu hoch aus. So z. B. gaben 2,0 g Substanz vom Präparat A.2 (vergl. oben S. 64) nach dem Erhitzen mit Salzsäure, Fällung der ammoniakalischen Lösung mit Silber und Zerlegen des gut ausgewaschenen Niederschlages mit Salzsäure mehr als 30 Proc. einer Substanz, die beim stärkeren Erhitzen mit concentrirter Salzsäure, namentlich beim Eindampfen zur Trockene, unter Abscheidung melaninartiger Massen eine weitere Zersetzung erfuhr. Nur durch völlige Spaltung der Nucleotinphosphorsäure lassen sich die Purinbasen frei machen.

Nicht anders wie gegen die Purinbasen verhalten sich die Nucleotinphosphorsäure und die Nucleinsäure gegen andere Basen namentlich gegen das Kupfer. Durch Fällen der Lösungen des nucleinsauren Kupfers mit Salzsäure wird zwar ein Theil des Metalls leicht entfernt, aber kupferfrei erhält man die Nucleinsäure, wie bereits oben erwähnt ist, durch solche Fällungen in keinem Falle, auch dann nicht, wenn man die Kupferverbindung in concentrirter Salzsäure löst und aus der Lösung die unveränderte Nucleinsäure und die unter der Einwirkung der Salzsäure entstandene Nucleotinphosphorsäure durch Alkohol fällt. Der gesammte Niederschlag ist stets noch kupferhaltig.

Auch andere Behandlungsweisen waren nicht im stande, das Kupfer zu entfernen. Löst man die Kupferverbindung in Ammoniak und versetzt die Lösung mit Chlorbaryum, so ist der aus nucleinsaurem Baryum bestehende Niederschlag kupferhaltig und lässt sich auch durch Waschen mit Ammoniak nicht vom Kupfer befreien. Ebensowenig vermögen die bei dem Kupfer-Kaliverfahren (oben S. 60) beschriebenen, vielfach wiederholten Fällungen der kupferhaltigen Nucleinsäure aus ihren stark alkalischen Lösungen durch Alkohol weder die Purinbasen, noch das Kupfer zu entfernen. Das letztere geht unter diesen Umständen nur in Verbindung mit Protamin oder eiweissartigen Stoffen leichter in Lösung. Es ist daher sicher, dass die Purinbasen in der Nucleinsäure nicht anders gebunden sind, als das Kupfer oder derartige Basen überhaupt. Die Grundsubstanz — die Nucleotinphosphorsäure — ist also durch die Eigenschaft ausgezeichnet, Basen in salzartiger Bindung äusserst hartnäckig festzuhalten.

Die erwähnten Fällungen der Nucleinsäure aus ihren stark alkalischen Lösungen durch Alkohol und aus den Lösungen in Kaliumacetat durch Kupferchlorid bleiben indess nicht ganz ohne Einfluss auf die Zusammensetzung derselben. Es findet durch diese Fällungen eine veränderte Vertheilung zwischen Nucleotinphosphorsäure und Purinbasen statt, so dass man zuweilen stickstoffreichere Präparate erhält, wie dies namentlich bei den Präparaten B.₁–₃. und C.₁. der Fall ist. Für das letztere beträgt nach der oben (S. 67) mitgetheilten Formel der Ueberschuss an Adenin 1 Mol. auf 6 Mol. Nucleinsäure.

Bei diesem Präparat wurde auch die quantitative Bestimmung der beiden Purinbasen ausgeführt und bestätigte die Annahme eines Ueberschusses an diesen Basen. Das Verfahren bestand darin, dass die Substanz viele Male mit Salzsäure zur Trockene

eingedampft, die salzsaurer Flüssigkeit von den gebildeten melaninartigen Substanzen abfiltrirt und durch Schwefelwasserstoff entkuppert wurde. Das Eindampfen mit Salzsäure muss so lange fortgesetzt werden, bis die von den schwarzen Flocken abfiltrirte Flüssigkeit beim Eintrocknen mit Salzsäure auf dem Wasserbade keine Ausscheidung schwarzer Massen mehr zeigt. Die Fällung der Basen erfolgte dann durch Silber und Ammoniak. Unter diesen Umständen bleibt der Silberniederschlag fast völlig frei von den oben (S. 73) erwähnten Zersetzungsproducten, weil diese durch das wiederholte Eindampfen mit Salzsäure in dieser unlöslich werden.

Die aus der Silberverbindung durch Salzsäure frei gemachten salzsauren Basen wurden unter Wasserzusatz auf dem Wasserbade mehrmals zu Trockene eingedampft, wobei das Guanin durch Verlust der Salzsäure unlöslich wird und sich von dem salzsauren Adenin trennen lässt. Die mit einem Tropfen Ammoniak versetzten Basen wurden dann eingetrocknet, mit ein wenig Wasser abgespült, bei 100° getrocknet, gewogen, dann verbrannt und die Asche in Abzug gebracht. Es wurden bei Anwendung von 0,5997 der im Vacuum bei 50—55° getrockneten Substanz (vergl. oben S. 67) gefunden 0,0730 Adenin = 12,17 Proc. und 0,0719 Guanin = 12,00 Proc. Die oben (S. 67) mitgetheilte Formel, nach welcher an der Zusammensetzung des übertrockneten Präparates 7 Mol. Adenin und 6 Mol. Guanin betheiligt sind, erfordert 11,27 Proc. Adenin und 10,87 Proc. Guanin. — Nach all' den vorstehend mitgetheilten Ergebnissen darf angenommen werden, dass die Nucleinsäure im Molekül regelrecht 14 Atome N enthält, die Nucleotinsäure demnach 4 Atome N.

Es fragte sich nun weiter, in welcher Form der Phosphor in der Nucleotinsäure enthalten ist. Dass beim Erhitzen verschiedener Nucleinsäurepräparate mit verdünnten Mineralsäuren Phosphorsäure abgespalten wird, ist bekannt. Ob aber die letztere unter diesen Umständen vollständig austritt, d. h. in esterartiger Bindung in jener Säure enthalten ist, oder ob ein Theil des Phosphors darin als Phosphinsäureverbindung vorkommt, musste durch besondere Versuche entschieden werden. Diese wurden in folgender Weise ausgeführt:

1. 0,3884g nucleinsäures Kupfer (Präparat B.5, vergl. oben S. 62) wurden in einem Glaskolben mit 80 ccm Salzsäure von 5 Proc. übergossen, auf dem Wasserbade bis zur völligen Lösung der Nucleinsäure erwärmt und die Flüssigkeit dann unter Erneuerung des verdunstenden Wassers $\frac{1}{2}$ Stunde lang im Sieden erhalten. Es war

dafür gesorgt, dass die Flüssigkeit nicht oberhalb ihrer Niveaus eintrocknete, was zur Bildung von Melaninsubstanzen führt, die phosphorhaltig sind. Die Phosphorsäure wurde aus der mit Ammoniak übersättigten Flüssigkeit durch Magnesiamischung gefällt und durch Umfällen gereinigt. Erhalten wurden 0,0695 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,0444 $\text{P}_2\text{O}_5 = 11,43$ Proc. statt 19,90 Proc., welche die Zusammensetzung des Präparats erfordert.

2. 0,3724 g derselben Substanz werden in derselben Weise wie im vorigen Versuch in 80 cem Salzsäure von 5 Proc. gelöst und die Flüssigkeit unter Durchleitung eines mässigen Stromes von Kohlensäure 1 Stunde lang im Sieden erhalten, doch so, dass die Concentration der Salzsäure auf 8—9 Proc. stieg. Nach dem Uebersättigen mit Ammoniak und nach Ausfällung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff ergab die Bestimmung 0,0864 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,0552 $\text{P}_2\text{O}_5 = 14,82$ Proc. statt 19,90 Proc.

3. 0,3885 g desselben Präparats geben nach 2½ stündigem Sieden im Kohlensäurestrom bei einer Concentration der Salzsäure, die zwischen 3—4 Proc. schwankte, durch Fällung der kupferfreien Flüssigkeit 0,0711 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,0455 $\text{P}_2\text{O}_5 = 11,71$ Proc. statt 19,90 Proc.

4. 0,3882 g desselben Präparats geben nach zweistündigem Sieden mit 100 cem Salzsäure von 10 Proc., wobei die Concentration wiederholt auf 14 Proc. und zuletzt auf 20—22 Proc. HCl stieg, sonst aber unter den bei den Versuchen 2 und 3 eingehaltenen Bedingungen 0,1113 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,0712 $\text{P}_2\text{O}_5 = 18,34$ Proc. statt 19,90 Proc. Weiteres, 1½ Stunden anhaltendes Kochen des Filtrats von dem Phosphatniederschlag mit Salzsäure gab noch eine weitere Abspaltung von Phosphorsäure, so dass also in diesem Versuche aller in der Nucleinsäure enthaltene Phosphor abgespalten war.

Eine Abscheidung von Melanin hatte in diesen Versuchen nicht stattgefunden; die ammoniakalischen Flüssigkeiten waren nach der Ausfällung des Kupfers nur ziemlich stark gelb gefärbt. Die Fällungen mit Magnesiamischung gaben völlig weisse Niederschläge. Es kann also keinem Zweifel unterliegen, dass die Phosphorsäure mit der organischen Substanz esterartig verbunden ist. Doch wird nur die Hälfte derselben selbst bei kurzem Kochen mit verdünnten Säuren leicht abgespalten, die andere Hälfte tritt erst bei Einwirkung concentrirter Säuren (10—20 Proc.) allmählich aus, so dass die Bindung dieses Antheils vielleicht unter Austritt von 2 Mol. H_2O für jedes Mol. Phosphorsäure stattgefunden hat. Lassen wir diese Möglichkeit ausser acht und nehmen eine Paarung unter Aus-

tritt von 1 Mol. H_2O für je 1 Mol. H_3PO_4 , so erhalten wir für die Nucleotinphosphorsäure (vergl. oben S. 72) die folgende Formulirung:

Die phosphorfreie Substanz, welche nach Abspaltung der Phosphorsäure zurückbleibt, kann man, um eine einfache Bezeichnung zu haben, zunächst Nucleotin nennen. Dabei muss aber im Auge behalten werden, dass mit den 4 Mol. Phosphorsäure nicht nothwendig ein einzelner, einheitlicher organischer Kern verbunden zu sein braucht, sondern verschiedene Atomgruppen durch Vermittelung der Phosphorsäure an der Bildung der Nucleotinphosphorsäure theiligt sein können.

Vor allen Dingen musste der Versuch gemacht werden, die Nucleotinphosphorsäure darzustellen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Verfahren eingeschlagen, die bei den einzelnen Präparaten angegeben sind.

1. Präparat S.a. Für die Darstellung dieses Präparats diente nucleinsaures Kupfer, das aus einem von Miescher stammenden, mit der Bezeichnung: „Köpfe von Sperm. 7. Dec. 90. absolut frei von Eiweiss“ versehenen Material gewonnen war. Die halbtrockene Kupferverbindung wurde in concentrirter Salzsäure gelöst und dann mit reichlichen Mengen von Alkohol und Aether versetzt. Nucleotinphosphorsäure und andere Producte werden dabei gefällt, während Adenin und Guanin als salzsaure Salze in Lösung bleiben. Der Niederschlag wurde mit Alkohol und Aether gewaschen, wieder in concentrirter Salzsäure gelöst und aus der Lösung die Substanz von neuem mit Alkohol und Aether gefällt, zur Entfernung der anhaftenden Salzsäure mit Alkohol abgespült, dann mit Wasser behandelt, wobei ein Theil in Lösung ging, die ungelöst gebliebene Masse in eine Lösung von Kupferchlorid gebracht, um sie mit Kupfer zu sättigen, und schliesslich diese Kupferverbindung abwechselnd mit Alkohol und Wasser gewaschen, bis sie völlig chlorfrei war.

Die Substanz wurde bei 40° im Vacuum neben Schwefelsäure getrocknet.

1. 0,2424 Substanz geben $0,3435 \text{ CO}_2 = 0,0936 \text{ C} = 38,61 \text{ Proc.}$
und $0,0976 \text{ H}_2\text{O} = 0,0108 \text{ H} = 4,45 \text{ Proc.}$
2. 0,1948 Substanz geben $0,2761 \text{ CO}_2 = 0,0753 \text{ C} = 38,65 \text{ Proc.}$
und $0,0809 \text{ H}_2\text{O} = 0,0089 \text{ H} = 4,56 \text{ Proc.}$
3. 0,1944 Substanz geben $0,0163 \text{ N} = 8,38 \text{ Proc.}$
4. 0,3233 Substanz geben $0,0266 \text{ N} = 8,22 \text{ Proc.}$
5. 0,2780 Substanz geben $0,0270 \text{ CuO} = 0,0215 \text{ Cu} = 7,73 \text{ Proc.}$
und $0,1011 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0646 \text{ P}_2\text{O}_5 = 23,23 \text{ Proc.}$

Bei der Berechnung ergab sich aus dem Verhältniss der Atomzahlen für C, N und P_2O_5 unter einander, dass die Substanz ein Gemenge von Kupferverbindungen der purinbasenfreien und purinbasenhaltigen Nucleotinphosphorsäure und solcher Spaltungsproducte der letzteren ist, die nicht weniger als 2 Mol. H_3PO_4 enthalten. Denn bei der Darstellung nach dem eingeschlagenen Verfahren kann nur der leicht abspaltbare Antheil der Phosphorsäure vollständig oder theilweise ausgetreten sein. Bei der Gliederung der berechneten Formel sind die ursprüngliche Nucleotinphosphorsäure mit 4 Atom Phosphor und ihr Spaltungsproduct mit 2 Atom Phosphor berücksichtigt worden. Als Purinbase nehmen wir der Einfachheit wegen Adenin an. Es ergibt sich dann für dieses Präparat die folgende Zusammensetzung:

Die Vertheilung von H_2O zwischen diesen drei Bestandtheilen ist selbstverständlich eine unsichere. Alle drei aber sind in diesem Gemenge wasserärmer, als ihre direct von der Nucleinsäure abgeleiteten Formeln. Nach dieser Zusammensetzung musste dieses Präparat noch Purinbasen enthalten. Eine Prüfung nach stärkerem Erhitzen mit verdünnter Salzsäure hatte vor der Analyse ein negatives Resultat ergeben. Als aber der Rest der Substanz (0,1 g) sehr stark mit concentrirter Salzsäure gekocht wurde, gab die mit Ammoniak übersättigte und filtrirte Flüssigkeit mit Silber einen Niederschlag, aus welchem guaninhaltiges Adenin isolirt wurde.

2. Präparat S.b. Bei der Darstellung dieses Präparates wurde die Entfernung der Purinbasen durch salpetersaures Silber versucht. Das Verfahren ist ein ziemlich umständliches und beruht darauf, dass beim Erwärmen von nucleinsaurem Kupfer mit verdünnter Salpetersäure und Silbernitrat auf $50-70^\circ$ Nucleotinphosphorsäure und Kupfer in Lösung gehen, während die Purinbasen die bekannte unlösliche Silbernitratverbindung bilden und nach dem Erkalten durch Abfiltriren entfernt werden können. Das Filtrat, das nach nochmaligem Erwärmen keine weitere Ausscheidung der Silberverbindung zeigte, wurde mit viel Alkohol und Aether versetzt, die kupferhaltige Flüssigkeit nach 24 stündigem Stehen

abgegossen, der grünliche, teigartige Niederschlag erst mit Alkohol und dann mit Aether abgespült und mit nicht zuviel einer mässig concentrirten Kupferchloridlösung behandelt, wobei unter Abscheidung von Chlorsilber Lösung erfolgte, während Wasser nur sehr wenig löste. Das Abfiltriren der Flüssigkeit von dem sehr fein vertheilten Chlorsilber war nicht ganz leicht. Das Filtrat wurde mit viel Alkohol und Aether versetzt, die gefällte Kupferverbindung nach dem Abgiessen des Alkoholäthers in wenig Wasser gelöst, was leicht von statten ging, und die filtrirte Lösung abermals mit Alkohol und Aether gefällt. Der grüne, teig- oder syrupartige Niederschlag musste acht- bis zehnmal mit wenig Wasser durchgerührt und mit Alkohol versetzt und durchgeknetet werden, bevor er völlig chlorfrei wurde. Er erhärtete dann sehr rasch unter starkem Alkohol und liess sich sehr leicht zu einem hellgrünen Pulver zerreiben.

Nach dem Trocknen über Schwefelsäure wurde die Substanz in eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre gebracht, nach einigem Stehen an freier Luft auf 40–50° erwärmt, wobei Alkoholdämpfe entwichen, und dieses Anfeuchten und Erwärmen noch einmal wiederholt (vergl. oben S. 61). Beim Trocknen im Vacuum neben Schwefelsäure bei 40° wurde in 2 Tagen constantes Gewicht erreicht.

1. 0,2417 Substanz geben 0,3252 CO₂ = 0,0887 C = 36,69 Proc.
und 0,1044 H₂O = 0,0116 H = 4,79 Proc.
2. 0,2957 Substanz geben 0,0206 N = 6,96 Proc.
3. 0,2280 Substanz geben 0,0162 N = 7,10 Proc.
4. 0,3729 Substanz geben 0,1351 Mg₂P₂O₇
= 0,0864 P₂O₅ = 23,17 Proc.
5. 0,2895 Substanz geben 0,1060 Mg₂P₂O₇
= 0,0678 P₂O₅ = 23,41 Proc.
6. 0,3389 Substanz geben 0,0334 CuO = 0,0266 Cu = 7,84 Proc.

Auch dieses Präparat ist ein Gemenge, ähnlich dem vorigen, und hat die folgende Zusammensetzung:

Das Präparat ist wasserreicher als das vorige, trotzdem es im Vacuum bei 40° bis zur Gewichtconstanz getrocknet war. Der Gehalt an Purinbasen wurde in der bei der quantitativen Bestimmung oben (S. 75) angegebenen Weise festgestellt. Es konnte ein Gemenge von Adenin und Guanin isolirt werden.

Der H ist bei beiden Präparaten höher gefunden worden, als die berechnete Zusammensetzung verlangt. Ob dabei eine Ungenauigkeit der Analysen oder andere Umstände im Spiele sind, lässt sich zunächst nicht angeben.

Das folgende Präparat, von welchem der geringen Menge wegen allerdings keine ganz vollständigen und nicht absolut zuverlässigen Analysen ausgeführt werden konnten, scheint aus Nucleotinphosphorsäure zu bestehen, welche von beiden Basen zusammen nur 1 Mol. enthält.

3. Präparat S.c. Ein Präparat, welches wie das vorige mit Hülfe von Salpetersäure und Silbernitrat dargestellt war, wurde schliesslich so lange mit Wasser allein — ohne Alkohol — geknetet und zerrieben, bis alle löslichen Theile entfernt waren und die ursprünglich teigige Masse eine flockige Beschaffenheit angenommen hatte. Die Substanz löste sich leicht in verdünnter Salzsäure. Sie wurde erst über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur, dann im Vacuum neben Schwefelsäure bei 40° getrocknet.

1. 0,1352 Substanz geben $0,1731 \text{ CO}_2 = 0,0472 \text{ C} = 34,90 \text{ Proc.}$
und $0,0494 \text{ H}_2\text{O} = 0,0055 \text{ H} = 4,06 \text{ Proc.}$
2. 0,2311 Substanz geben $0,0245 \text{ N} = 10,60 \text{ Proc.}$
3. Nach dem Abdestilliren des Ammoniaks bei der N-Bestimmung wurde in der alkalischen Flüssigkeit nach bekannten Methoden das Cu bestimmt. Die 0,2311 Substanz gaben dabei $0,0311 \text{ CuO} = 0,0248 \text{ Cu} = 10,73 \text{ Proc.}$

Die Berechnung ergibt für diese in Wasser unlösliche flockige Substanz die wahrscheinliche Zusammensetzung:

Man könnte diese Verbindung, die nur noch die Hälfte der Purinbasen enthält und einen Bestandtheil der beiden vorigen Präparate bildet, Heminucleinsäure nennen. Sie enthält ausserdem 3 Mol. H_2O weniger, als der Nucleinsäure nach Abzug von 1 Mol. Guanin entspricht. Ihr Kupfersalz ist, entsprechend der Darstellung, nach dem Fällern mit Alkohol in Wasser unlöslich, das der Nucleotin-

phosphorsäure dagegen leicht löslich. Man durfte daher erwarten, dass aus den wässerigen Lösungen von Präparaten wie S.a und S.b durch fractionirte Fällungen mit Alkohol die Kupferverbindung der Nucleotinphosphorsäure sich leicht isoliren lassen werden. Die wässerige Lösung eines derartigen, vorher getrockneten Präparates wurde erst mit wenig Alkohol versetzt und stehen gelassen, die klare Flüssigkeit dann abgegossen, mit einer weiteren Menge von Alkohol versetzt und der erhaltene Niederschlag nochmals in Wasser gelöst und in derselben Weise fractionirt gefällt.

Das nach diesem Verfahren erhaltene Präparat S.d bildete unmittelbar nach der Fällung eine grüne, amorphe, durchsichtige Masse, die nach dem Uebergiessen mit Alkohol von 95 Proc. sofort erhärtete und sich vom Glase ablöste, theilweise in Form feiner, vollkommen kugelig, runder Körnchen, wie sie unter denselben Verhältnissen auch das Chondrosinsulfat bildet.¹⁾

Die Substanz wurde im Vacuum über Schwefelsäure bei 50—55° 8 Tage lang getrocknet und gab bei der Analyse 8,13 Proc. Cu, 8,85 Proc. N und 23,87 Proc. P₂O₅. Die C- und H-Bestimmung unterblieb, weil sich allein aus dem Procent- und Atomverhältniss zwischen N und P berechnen liess, dass es sich auch in diesem Falle um ein ähnliches Gemenge handelte, wie bei den Präparaten S. a und S. b. Der Gehalt an Purinbasen ist aber noch grösser, als bei diesen, weil die Kupferverbindung der purinbasenhaltigen Nucleotinphosphorsäure durch Alkohol leichter gefällt wird als die der purinbasenfreien.

Die Bedeutung der vorstehenden Versuche über die Isolirung der Nucleinsäurecomponenten ist darin zu suchen, dass sie den Weg weisen, der eingeschlagen werden muss, um zu einer weiteren Kenntniss dieser Nucleinsäure zu gelangen. Bei der Reindarstellung der Nucleotinphosphorsäure wird man nach den Resultaten der vorstehenden Versuche auf grosse Schwierigkeiten stossen. Dagegen wird es leichter gelingen, die phosphorfreien Spaltungsproducte der Nucleotinphosphorsäure zu isoliren. Dies kann als die Hauptaufgabe der weiteren Untersuchungen bezeichnet werden, für die aber ein reichliches Material an reinen Nucleinsäureverbindungen hergestellt werden muss. Ob das von Kossel Thymin, von Miescher — nicht von mir, wie Kossel angiebt³⁾ — Nucleosin genannte, krystallisirbare Spaltungsproduct der Nucleinsäure der Grund-

1) Ueber die chemische Zusammensetzung des Knorpels. Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol. Bd. XXVIII. S. 381 und 382. 1891.

2) Cloetta, Ueber die Uroprotsäure. Archiv für experiment. Pathol. u. Pharmacol. Bd. XL. S. 38 und 39. [1897]. 1898.

3) Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXII. S. 189. 1896.

substanz entstammt oder einen selbständigen Atomcomplex bildet, wie die Purinbasen, lässt sich vorläufig nicht beurtheilen.

Von den bisher analysirten, phosphorhaltigen Nucleinspaltungsproducten entspricht die Thyminsäure von Kossel und Neumann¹⁾ den oben (S. 77 und 78) beschriebenen Präparaten S.a und S.b. Nach dem Verhältniss $C_{16}:N_3:P_2 = 2 C_{35} + 3 C_{30}:2 N_9 + 3 N_4:2 P_4 + 3 P_4$ lässt sich vermuthen, dass die Thyminsäure aus purinbasenfreier und purinbasenhaltiger Nucleotinphosphorsäure bestanden hat.

Nach den Resultaten der vorstehenden Untersuchungen ist die Nucleinsäure der Lachsmilch eine zwar feste, aber salzartige Verbindung von Nucleotinphosphorsäure, $C_{30}H_{46}N_4O_{15,2}P_2O_5 + nH_2O$, mit 1 Mol. Adenin und 1 Mol. Guanin. Wahrscheinlich kommen auch Nucleinsäuren vor, die mehr oder weniger von diesen Basen enthalten. Die basenärmeren werden durch Salzsäure überhaupt nicht und aus ihren mit Essigsäure angesäuerten Lösungen auch durch Kupferchlorid nicht gefällt. Dadurch unterscheiden sie sich von der normalen Nucleinsäure. Die Nucleinsäure bildet mit dem Protamin und mit anderen biuretartig reagirenden Stoffen die Nucleine. Ob die Nucleinsäuren und die Nucleine sich mit den wahren Eiweissstoffen zu einheitlichen, wohl charakterisirten Verbindungen vereinigen, ist, trotz der darüber bestehenden positiven Angaben, noch nicht sicher festgestellt.

III. Ueber die Melaninbildung aus Nucleinsäure.

Die Grundsubstanz der Nucleinsäure oder richtiger der Nucleotinphosphorsäure zeichnet sich durch die grosse Neigung zur Melaninbildung aus. Diese ist am geringsten, wenn man so verfährt, wie es oben (S. 75 und 76) bei der Abspaltung der Phosphorsäure durch Kochen mit Salzsäure angegeben ist. Uebergiesst man dagegen die aus ihren Lösungen gefällte, mit Wasser gewaschene Nucleinsäure, oder Präparate wie S.a und S.b mit Essigsäure und dampft auf dem Wasserbade zur Trockene ein, so tritt sofort starke Bräunung oder Schwärzung ein. Bedeutend stärker ist diese beim Eindampfen mit Salzsäure zur Trockene. Die Melaninbildung erfolgt bei der Nucleinsäure noch leichter, als aus der Uroprotsäure²⁾ und kann in geeigneten Fällen zum Nachweis von Nucleotinphosphorsäureverbindungen, also von Nucleinen, benutzt werden.

1) Kossel und Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXII. S. 79 und 80. 1896.

2) Vgl. Cloetta, Ueber die Uroprotsäure. Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol. Bd. XL. S. 29. (1897) 1898.

Erhitzt man Nucleinsäure längere Zeit mit concentrirter Salzsäure, so tritt starke Bräunung der Flüssigkeit ein, und erst nach lange anhaltendem Kochen erfolgt die Abscheidung schwarzbrauner Flocken. Die in Salzsäure löslichen Melaninsubstanzen können nach dem Neutralisiren der Flüssigkeit mit Kali durch Kupferacetat gefällt werden. Am leichtesten entstehen diese schwarzen Producte beim Eindampfen der Nucleinsäurepräparate mit Salzsäure. Es wurde Nucleinsäure in der oben (S. 75) bei der quantitativen Bestimmung der Purinbasen angegebenen Weise viele Male mit Salzsäure zur Trockene eingedampft, das schwarzbraune Melanin auf einem Filter gesammelt, mit verdünnter Salzsäure ausgewaschen, in Ammoniak gelöst, die braune Flüssigkeit von dem ungelöst gebliebenen Antheil abfiltrirt, das Filtrat mit Magnesiamischung versetzt, nach einigem Stehen filtrirt, aus der tiefbraunen, aber völlig klaren Flüssigkeit das Melanin durch Salzsäure gefällt und auf einem Filter gut ausgewaschen. Diese in zusammenhängender dickerer Schicht tief schwarze Masse gab nach dem Verbrennen mit Soda und Salpeter eine reichliche Menge Phosphorsäure. Wir haben es also mit einem phosphorhaltigen Melanin zu thun. Es wird von grossem Interesse sein, zu untersuchen, ob phosphorhaltige Melanine auch im thierischen Organismus unter physiologischen oder pathologischen Verhältnissen vorkommen. In meinen Untersuchungen über die Melanine¹⁾ habe ich darauf hingewiesen, dass die Melaninbildung beim Erhitzen von Eiweissstoffen mit Säuren kein nach der Regel verlaufender Vorgang sein kann, sondern als Nebenreaction aufzufassen ist, so dass bei einer derartigen Einwirkung der Säuren, bei welcher regelrecht Albumosen, Peptone, Tryptone, Antialbumide und schliesslich Amidokörper entstehen, noch eine Reaction Platz greift, bei welcher einzelne wenige Albumose- oder Peptonmoleküle ohne weitere Spaltung bloss durch Ammoniak- und Wasseraustritt rasch so weit wasserstoffärmer gemacht werden, dass sie einer hydrolytischen Spaltung nicht mehr zugänglich sind. Die Entstehung der phosphorhaltigen Melanine bestätigt diese Auffassung vollkommen. Wird die Nucleotinphosphorsäure oder, was dasselbe ist, die Nucleinsäure unter Bedingungen mit Säuren erhitzt, unter denen keine oder nur eine ganz geringe Melaninbildung Platz greift, so wird der gesammte Phosphor in Form von Phosphorsäure abgespalten. Lässt man aber von vorn herein concentrirte Säuren einwirken und dampft, wie es bei der quantitativen Bestimmung der Purinbasen geschehen ist, die Nucleinsäure mit concentrirter Salzsäure oftmals zur Trockene ein, so entstehen reichliche Mengen von Melanin, an welches ein grosser Theil des Phosphors gebunden bleibt. In welcher Form er sich hier findet, darüber werden weitere Untersuchungen Aufschluss geben.

1) Ueber die Elementarformeln einiger Eiweissstoffe und über die Zusammensetzung und die Natur des Melanins. Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol. Bd. XXXIX. S. 69 und 70. 1897.