

Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

IV. Mitteilung.

Über den Aufbau des Hefenucleinsäuremoleküles und seine gleichartige Aufspaltung durch milde, ammoniakalische und fermentative Hydrolyse.

Von

S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller.

(Aus der zweiten medizinischen Klinik [F. Müller] München.)
(Der Redaktion zugegangen am 4. Mai 1917.)

Triphosphonucleinsäure wurde in der ersten Mitteilung «Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel»¹⁾ von dem einen von uns ein Spaltstück der Hefenucleinsäure genannt, das durch die Verdauung der Hefenucleinsäure mit Duodenalsaft gewonnen war. Dieser Körper gab ein einheitlich-krystallisiertes Brucinsalz, Schmelzp. 200—205° und war das erste Polynucleotid, von dem es gelang, ein krystallisiertes Derivat herzustellen. Aus den Analysenzahlen wurde für die Triphosphonucleinsäure eine Bruttoformel von $C_{32}H_{49}P_3N_{15}O_{23}$ berechnet. Die Substanz würde sich nach dieser Formel nur um einen Phosphorsäurezuckerkomplex von der ursprünglichen Hefenucleinsäure unterscheiden, jedoch wurde schon damals nur Adenosin, Guanosin und Cytidin bei der tiefergreifenden Hydrolyse unter Druck erhalten, während der von der Formel verlangte Uracilkomplex nicht gefunden werden konnte. Um diese Unstimmigkeiten aufzuklären und den chemisch und physiologisch interessierenden Körper experimentell gründlich durchzuarbeiten, wurden größere Mengen dieser Substanz benötigt. Es mußte ein einfacher, chemischer Weg unter Vermeidung der fermentativen Hydrolyse gefunden werden, da diese zur Herstellung beliebiger Mengen von Triphosphonucleinsäure sich nicht als geeignet erwies. Durch die Darstellung des krystallisierten Brucinsalzes der Triphosphonucleinsäure

¹⁾ S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 329 (1914).

war der Weg gezeigt, auf welchem es möglich ist, aus einem Hydrolysendgemisch zu krystallisierten Derivaten von hochmolekularen Spaltstücken einer Nucleinsäure zu gelangen. Es blieb nur noch die Aufgabe, die chemische Hydrolyse so mild zu gestalten, daß eine durchgreifende Zertrümmerung des Nucleinsäuremoleküls nicht eintritt. Eine Reihe von Tastversuchen mit verschiedenen, hydrolysierenden Reagentien verschieden starker Konzentration führte zu dem Resultate, daß eine durch Kochen am Rückflußkühler durchgeführte Hydrolyse mit Ammoniak mäßiger Konzentration in dem gewünschten Sinne verlief. Aus zahlreichen Vorversuchen konnten wir ersehen, daß selbst bei einer ammoniakalischen Hydrolyse unter Druck nach den Vorschriften von Levene nicht eine restlose Abspaltung des Phosphorsäurerestes vom Nucleinsäuremolekül eintrat und sich auch dann noch Polynucleotide in Form der Brucinsalze isolieren ließen. Wir konnten zeigen, daß die Abspaltung der Phosphorsäure mit steigender Konzentration des Ammoniaks und mit Erhöhung des Drucks parallel läuft. Für unsere Zwecke war natürlich diejenige Konzentration und diejenige Temperatur maßgebend, welche die beste Ausbeute an Triphosphonucleinsäure und vielleicht an anderen, hochmolekularen Spaltstücken lieferte. Die beste Ausbeute an Triphosphonucleinsäure wurde durch zweistündiges Kochen der Hefenucleinsäure in 25%iger ammoniakalischer Lösung erhalten. Aus diesem Hydrolysendgemisch wird durch Fällen mit Alkohol das Ammoniumsalz der unveränderten Hefenucleinsäure und die Ammonsalze hochmolekularer Spaltprodukte niedergeschlagen. Durch abermaliges Lösen im Wasser, Fällen mit Bleiessig, Zerlegen des Bleisalzes durch Schwefelwasserstoff und Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen erhält man eine Lösung, welche die Triphosphonucleinsäure und etwas unveränderte Hefenucleinsäure enthält. Bei der Isolierung des Brucinsalzes der Triphosphonucleinsäure aus diesem Gemisch zeigte sich bald durch Unstimmigkeiten in den Analysen des Brucinsalzes, daß noch ein anderes oder mehrere andere, hochmolekulare Spaltstücke in dem Hydrolysendgemisch vorhanden sein mußten, die ebenfalls krystallisierte

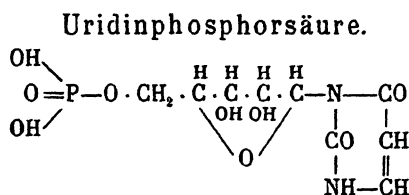
Brucinsalze gaben. Die Isolierung dieser verschiedenen Brucinsalze durch wiederholtes Umkrystallisieren gestalteten sich so verlustreich, daß eine andere Methode gefunden werden mußte, um zu den Brucinsalzen der verschiedenen Spaltstücke zu gelangen. Diese Methode fand sich in der fraktionierten Krystallisation der Brucinsalze. Die Krystallisation von 100—45° wird abgetrennt von der Krystallisation von 45° bis Zimmertemperatur. Das von 100—45° ausfallende Krystallisat ist kein einheitliches Salz und zeigt keinen konstanten Schmelzpunkt. Durch Ausziehen dieses Salzgemisches mit einer bestimmten Menge kochenden Wassers gelingt es das Gemisch zu trennen. Aus dem wässerigen Auszug krystallisiert ein einheitliches Brucinsalz, dessen Schmelzpunkt bei 185—187° liegt, und das auch nach wiederholtem Umkrystallisieren diesen Schmelzpunkt beibehält. Das im Rückstand verbleibende sehr schwer wasserlösliche Brucinsalz wird durch sehr viel kochendes Wasser in Lösung gebracht und umkrystallisiert. Es zeigt nach zweimaligem Umkrystallisieren einen konstanten Schmelzpunkt, der bei 177° festgestellt wurde und sich nicht mehr durch weiteres Umkrystallisieren änderte. Das Krystallisat 45° bis Zimmertemperatur erwies sich sogleich als das Brucinsalz eines einheitlichen Körpers. Es schmilzt nach zweimaligem Umkrystallisieren aus nicht zu viel Wasser bei 205° und zeigte sich als identisch mit dem früher bei der Verdauung erhaltenen Brucinsalz der Triphosphonucleinsäure. Auf diese Weise gelangt man zu drei verschiedenen, einheitlichen Brucinsalzen, welche Salze hochmolekulare Spaltstücke der Hefenucleinsäure darstellen. Die Analysen dieser Brucinsalze zeigten bald, daß die Salze von den Schmelzpunkten 205° und 185° nahezu übereinstimmende Werte gaben, also die gleiche molekulare Zusammensetzung haben mußten. Die Analyse des Salzes 177° lieferte andere Kohlenstoff- und Stickstoffwerte. Dem Salz mußte ein anderes zusammengesetztes Spaltprodukt der Hefenucleinsäure zugrunde liegen. Aus den krystallisierten Brucinsalzen wurden über das Ammon- und Silbersalz die amorphen, freien Säuren hergestellt. Die freien Säuren sind hygroskopisch und werden erst durch wiederholtes Waschen mit Alkohol

und Äther luftbeständig. Sie lösen sich spielend in Wasser und werden aus konzentrierten, wässerigen Lösungen mit Alkohol als weiße, amorphe Pulver niedergeschlagen. Die optische Aktivität der freien Säure aus Brucinsalz 205° ist — 19,6°, sie stimmt also mit der optischen Aktivität der früher mittels der Duodenalsafthydrolyse gewonnenen Säure, der Triphosphonucleinsäure, überein. Ebenso sind die Schmelzpunkte der Brucinsalze der auf chemischem und fermentativem Wege gewonnenen Substanzen übereinstimmend bei 205°. Auch die Mischschmelzpunkte zeigen keine Schmelzpunktserniedrigung. Die Analysenzahlen der Brucinsalze der Triphosphonucleinsäure und die Daten der durch ammoniakalische Hydrolyse gewonnenen Produkte sind gleichfalls übereinstimmend, so daß kein Zweifel bestehen dürfte, daß der durch chemische Hydrolyse gewonnene Körper mit dem von dem einen von uns als Brucinsalz der Triphosphonucleinsäure beschriebenen Substanz identisch ist. Hydrolysiert man die dem Brucinsalz 205° entsprechende freie Säure mit verdünntem Ammoniak unter Druck, so gelangt man zu den Nucleosiden Adenosin, Guanosin und Cytidin. Uridin wurde als Bestandteil der Triphosphonucleinsäure nicht gefunden, obwohl in mehrfach wiederholten Hydrolysen dieser Säure speziell auf die Isolierung dieses Komplexes hingearbeitet wurde. Uridin dürfte also in dem Molekül der Triphosphonucleinsäure nicht vorhanden sein. Die alte Bruttoformel für die Triphosphonucleinsäure ist deshalb nicht mehr aufrecht zu erhalten. In Übereinstimmung mit den Befunden der tiefgreifenden Hydrolyse unter Druck ließ sich aus den Analysenzahlen der freien Säure und des Brucinsalzes 205° die molekulare Zusammensetzung der freien Säure mit $C_{39}H_{42}O_{23}N_{13}P_3$ berechnen. Die Säure krystallisiert mit sechs Molekülen Brucin in prächtigen, weißen Nadeln zu einem Salz von der Zusammensetzung $C_{29}H_{42}O_{23}N_{13}P_3(C_{23}H_{26}O_4N_2)_6$. Die seinerzeit der Triphosphonucleinsäure zugrunde gelegte Bruttoformel ist durch diese Formel zu ersetzen. Das Brucinsalz 185° liefert, wie schon erwähnt, die gleichen Analysenzahlen, wie das Brucinsalz 205°. Auch die Ergebnisse der ammoniakalischen Hydrolyse der freien Säure unter Druck sind die gleichen.

Es wurden auch hier Guanosin, Adenosin, Cytidin als Spaltstücke gefunden und analysiert. Ein Uridinkomplex konnte auch hier nie in den geringsten Spuren nachgewiesen werden. Die analytische Zusammensetzung der freien Säure aus Brucinsalz 205° und 185° ist demnach die gleiche, $C_{29}H_{42}O_{23}N_{13}P_3$. Trotzdem sind die beiden Säuren nicht identisch, sie unterscheiden sich durch ihre optische Aktivität. Die freie Säure des Brucinsalzes 185° ist optisch inaktiv, sie dürfte der Racemkörper der links drehenden Säure aus Brucinsalz 205° sein.

Aus den Daten, welche durch die Analyse des Brucinsalzes der Säure 177° gewonnen wurden, läßt sich eine Zusammensetzung der freien Säure von $C_9H_{13}N_2O_9P$ berechnen. Die optische Aktivität der freien Säure ist $+14,4^\circ$. Bei der ammoniakalischen Hydrolyse unter Druck entsteht aus der freien Säure nur Uridin, bei der sauren Hydrolyse durch 24stündiges Kochen mit 25%iger Schwefelsäure nur Uracil. Es konnte kein anderer Purin- oder Pyrimidinkomplex bei der Hydrolyse isoliert werden. Die Analysenzahlen und die Resultate der Hydrolyse stimmen auf eine Uridinphosphorsäure. Die freie Säure ist außerordentlich leicht in Wasser löslich und krystallisiert aus wässerigen Lösungen mit zwei Molekülen Brucin zu einem Salz von der Zusammensetzung $C_9H_{13}N_2O_9P(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$. Die Brucinsalze 205° und 185° sind krystallisierte Salze eines gemischten Purin-Pyrimidinpolynucleotids. Das Brucinsalz 177° ist das krystallisierte Salz eines Pyrimidinmononucleotids. Während durch milde, ammoniakalische Hydrolyse der Hefenucleinsäure die Brucinsalze 205° und 185° und 177° sich gleichzeitig gewinnen ließen, konnte bei der sauren Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit verdünnter 2%iger Schwefelsäure nur das Brucinsalz 177° der Uridinphosphorsäure isoliert werden. Es ist wahrscheinlich, daß auch der in der Hefenucleinsäure vorgebildete Komplex der Cytidinphosphorsäure gegen saure Hydrolyse beständig ist, er konnte aber bisher mit Sicherheit aus dem sauren Hydrolysengemisch als krystallisiertes Brucinsalz nicht isoliert werden. Das in der Hefenucleinsäure präformierte Molekül der Triphosphonucleinsäure ist gegen verdünnte Schwefelsäure unbeständig und zerfällt in kleine Bruchstücke.

Die Uridinphosphorsäure, welche in dem molekularen Aufbau der Hefenucleinsäure ebenfalls präformiert ist, zerfällt durch verdünnte Säure nicht in ihre Bausteine. Sie ist gegen 2%ige Schwefelsäure, wie schon Levene¹⁾ es wahrscheinlich gemacht hat, beständig und läßt sich als Brucinsalz aus der Hydrolysenflüssigkeit isolieren und mit der bei der milden, ammoniakalischen Hydrolyse entstandenen Säure (Brucinsalz 177°) identifizieren.

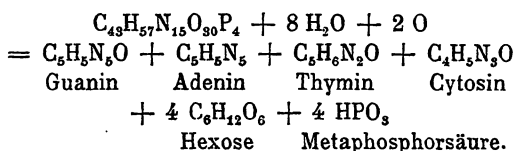


Nachdem es gelungen war, durch die chemische Hydrolyse mit Ammoniak die Hefenucleinsäure in die Triphosphonucleinsäure und die Uridinphosphorsäure zu spalten und mittels der fraktionierten Brucinsalzfällung die krystallisierten Brucinsalze der aktiven und inaktiven Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure herzustellen, schien es sehr wahrscheinlich, daß auch bei der fermentativen Hydrolyse nicht nur die Triphosphonucleinsäure als einziges Spaltstück entsteht, sondern daß auch bei der fermentativen Aufspaltung der Hefenucleinsäure die gleichen Bruchstücke wie bei der ammoniakalischen Hydrolyse in Erscheinung treten. In der Tat glückte es durch die bei der chemischen Hydrolyse angewandte Methode der fraktionierten Krystallisation der Brucinsalze auch aus der Verdauungsflüssigkeit die gleichen Bruchstücke der Hefenucleinsäure zu isolieren, die bei der chemischen Hydrolyse gefunden waren. Es wurde das Brucinsalz der l-Triphosphonucleinsäure, Schmelzp. 200—205°, das Brucinsalz der d-l-Triphosphonucleinsäure, Schmelzp. 185—187°, und das Brucinsalz der Uridinphosphorsäure, Schmelzp. 177°, erhalten und durch Analyse mit den gleichen Produkten der ammoniakalischen Hydrolyse identifiziert. Es dürfte durch diese Befunde der Nachweis

¹⁾ P. A. Levene u. W. Jacobs, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 44, S. 1027 (1911).

materials zu suchen. Eine ideale Methode, Polynucleotide aus den Organen herzustellen, ist nicht gefunden und so begegnen wir bereits verschiedenen Angaben über die Bruttoformel der best-untersuchten Nucleinsäure. Steudel¹⁾ nimmt eine Zusammensetzung von $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$, Schmiedeberg²⁾ $C_{40}H_{56}N_{14}O_{26}P_4$ für die Thymusnucleinsäure an. Diese Abweichungen sind nicht einmal so groß, wenn man bedenkt, daß beide Forscher verschiedene Methoden der Darstellung anwandten und daß die Nucleinsäuren bisher nur als amorphe Pulver isoliert wurden, die wiederum aus amorphen Salzen in Freiheit gesetzt waren.

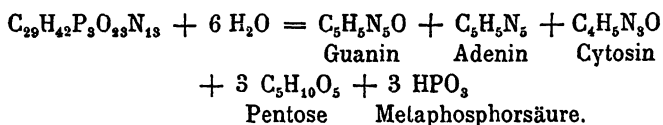
Schmiedeberg stellte sich ein Kupfersalz der Thymusnucleinsäure her, zerlegte mit Schwefelwasserstoff und fällte die freie Säure mit Alkohol. Steudel isolierte zuerst das Natriumsalz der Nucleinsäure, brachte es wieder in wässrige Lösung und fällte die freie Säure mit salzsäurehaltigem Alkohol. Es ist mit beiden Methoden nicht zu entscheiden, ob die Kupfer- und Natriumsalze Salze eines einheitlichen Körpers sind. Es ist sehr leicht möglich, daß sie Salzgemische von verschiedenen Polynucleotiden und Nucleotiden darstellen, die wohl bei dauernd gleicher Arbeitsweise untereinander stimmende Analysenzahlen geben können. Auf die Bruttoformeln dürfen wir also kein zu hohes Gewicht legen, solange nicht der Beweis erbracht ist, daß ihnen einheitliche chemische Individuen zugrunde liegen. Steudel suchte seine Bruttoformel durch quantitative Hydrolyse, d. h. durch quantitative Bestimmung der Spaltprodukte zu stützen. Eine solche quantitative Spaltung des Thymuspolynucleotids führte ihn zu dem Ergebnis, daß in dieser Substanz auf je ein Molekül Guanin, Thymin, Adenin, Cytosin je ein Molekül Hexose und je ein Molekül Metaphosphorsäure treffen. Es wäre also



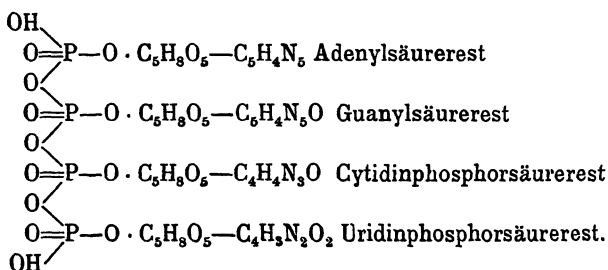
¹⁾ Steudel, Diese Zeitschr., Bd. 49, S. 406 (1906).

²⁾ O. Schmiedeberg, Anh.f.exp.Path.u.Pharm., Bd. 57, S. 309 (1907).

Seine Formel deckt sich ziemlich gut mit der Ausbeute an Spaltprodukten. Die Differenz von 2 O ist bei einem so hochmolekularen Körper kein allzugroßer Fehler. Die Annahme J. Bangs,¹⁾ daß nur drei Kohlenhydratgruppen im tierischen Nucleinsäuremolekül vorhanden seien, hat sich bisher durch keine experimentellen Grundlagen beweisen lassen. Für die pflanzlichen Nucleinsäuren hat Osborne und Harris²⁾ den Ausdruck $C_{14}H_{61}N_{16}P_4O_{31}$ in seinen Untersuchungen für die Tritico-Nucleinsäure angegeben. Er nimmt an, daß ein Molekül Guanin, Adenin, Uracil und Cytosin darin enthalten sei. Die Summe der für diese Spaltprodukte erforderlichen N-Atome ist im Molekül 15, nicht aber N_{16} , wie die Osbornesche Formel angibt. Für die mit der Triticonucleinsäure jedenfalls identische Hefenucleinsäure gibt uns Kowalewski³⁾ in einer Arbeit aus dem Steudelschen Laboratorium die Formel $C_{29}H_{42}N_{13}P_3O_{23}$. Er fand als Spaltprodukt nur Guanin, Adenin, Cytosin.



Levene und Jakobs⁴⁾ konnten aber, wie schon erwähnt, außer diesen Spaltprodukten noch einen Uracilkomplex in der Hefenucleinsäure nachweisen und faßten die Ergebnisse ihrer grundlegenden Untersuchungen in folgender Formel zusammen:



¹⁾ J. Bang, Biochem. Zeitschr., Bd. 27, S. 310 (1911).

²⁾ Th. Osborne und Harris, Amerik. Journ. of Phys., Bd. 21, S. 157 (1907).

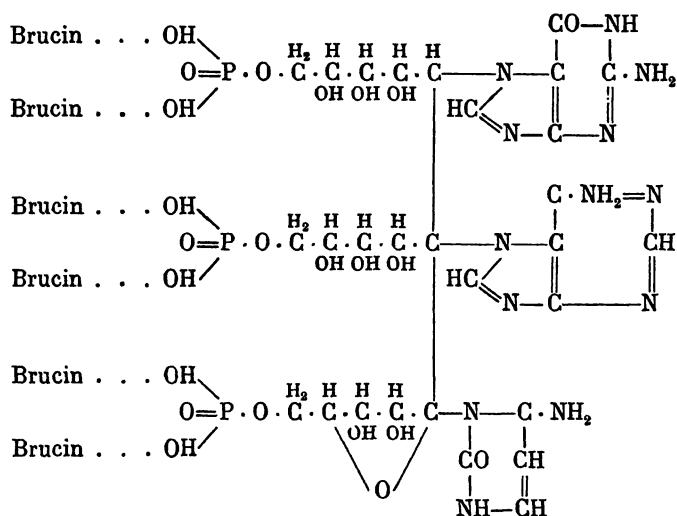
³⁾ Kowalewski, Diese Zeitschr., Bd. 69, S. 240 (1910).

⁴⁾ P. A. Levene und W. Jakobs, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 43, S. 3151 (1910); Bd. 44, S. 1027 (1911).

Levene faßt also die Hefenucleinsäure als ein Tetranucleotid auf, das durch vier anhydrierte Phosphorsäurereste zusammengehalten wird. Ist diese Annahme richtig, dann sind alle vier Mononucleotide nur durch die Phosphorsäureanhydridbindungen zusammengehalten. Es müßte demnach eine milde Hydrolyse, die zur Abspaltung eines Mononucleotids führt, auch die übrigen Phosphorsäureanhydridbindungen, die ja alle gleichwertig sind, aufspalten. Löst die milde, ammoniakalische Hydrolyse, wie wir sie ausgeführt haben, die Phosphorsäureanhydridbindung, welche die Uridinphosphorsäure im Hefenucleinsäuremolekül bindet, so muß sie auch alle übrigen Anhydridbindungen der Phosphorsäure, durch welche die anderen Mononucleotide zusammengehalten werden, lösen. Es müßten also mit der Uridinphosphorsäure noch drei weitere Mononucleotide entstehen. Diese drei Mononucleotide treten aber nicht als solche in Erscheinung, sondern ein Polynucleotid, das aus den drei erwarteten Mononucleotiden aufgebaut ist. Dies kann durch zwei Möglichkeiten verursacht sein. Entweder die Phosphorsäureanhydridbindungen sind wider alle Voraussetzungen eben doch nur bei der Uridinphosphorsäure aufgespalten worden, oder die Phosphorsäureanhydridbindungen sind alle aufgespalten worden, aber die erwarteten drei Mononucleotide sind noch durch weitere intramolekulare Bindungen unter sich verknüpft, so daß ein Auseinanderfallen in die einfachen Nucleotide verhindert wird. Die Zusammensetzung des Brucinsalzes der Triphosphonucleinsäure gibt uns auf diese Fragen eine eindeutige Erklärung. Die aktive und inaktive Triphosphonucleinsäure (Salz 205° und 185°) krystallisiert mit 6 Molekülen Brucin. Eine Salzbildung mit 6 Molekülen Brucin ist bei der Triphosphonucleinsäure nur dann wahrscheinlich, wenn alle Phosphorsäureanhydridbindungen aufgespalten sind und dadurch 6 saure Hydroxylgruppen des Phosphorsäurerestes entstehen. Die milde, ammoniakalische Hydrolyse hat also alle Phosphorsäureanhydridbindungen der Hefenucleinsäure gelöst. Da aber nicht 4 Mononucleotide entstehen, sondern nur ein aus drei Mononucleotiden aufgebautes Polynucleotid, die Triphosphonucleinsäure, und nur ein Mononucleotid, die Uridin-

phosphorsäure, so ist man berechtigt anzunehmen, daß die drei Mononucleotide, aus welchen die 6-basische Triphosphonucleinsäure aufgebaut ist, noch intramolekular verknüpft sind. Die Verknüpfung kann nur durch die Kohlenhydratgruppen geschehen, da innerhalb der Purine und Pyrimidine ein Wasseraustritt unmöglich ist. Durch Auflösung der γ -Lactonbindung der Glykoside und intramolekularen Wasseraustritt zwischen den Kohlenhydratgruppen könnte man sich die gegenseitige Verknüpfung der Nucleotide in der Triphosphonucleinsäure vorstellen.¹⁾

Triphosphonucleinsäure.

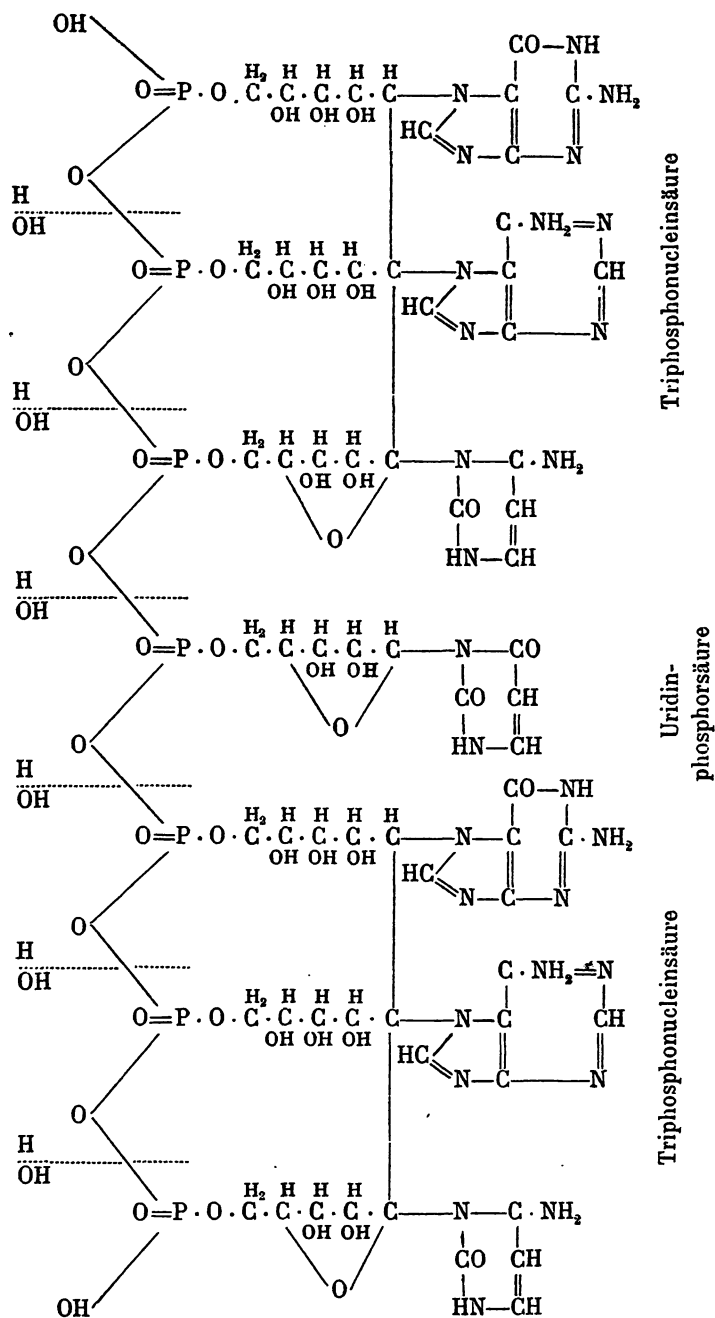


Wenn auch der Ort der intramolekularen Verknüpfung der Mononucleotide innerhalb des Triphosphonucleinsäuremoleküles in der von mir angeschriebenen Art experimentell nicht

¹⁾ Die Annahme einer ätherartigen Sauerstoffbrücke zwischen den Kohlenhydraten des Guanosins und Adenosins erschien uns zunächst wahrscheinlicher als eine C-C-Verkettung dieser Purinzuckerverbindungen, aber die sterische Anordnung der Kohlenhydratgruppen in der d-Ribose macht die Anschreibung einer solchen Ätherbrücke auf dem Papier unmöglich. Die C-C-Bindung der Mononucleotide in der Triphosphonucleinsäure soll lediglich als Arbeitshypothese aufgefaßt werden und die von uns festgestellte Verkettung der Mononucleotide in der Triphosphonucleinsäure verbildlichen.

absolut erwiesen ist, so sind doch die Möglichkeiten des Ortes der intramolekularen Bindung so wenige, daß unsere Annahme sich wohl rechtfertigen lassen dürfte. — Da bei der milden, ammoniakalischen Hydrolyse der Hefenucleinsäure als hochmolekulare Spaltprodukte nur die Triphosphonucleinsäure und die Uridinphosphorsäure entstehen, muß das große Nucleinsäuremolekül aus diesen beiden Bruchstücken aufgebaut sein. Die Wirkung der milden, ammoniakalischen Hydrolyse beruht in der Aufspaltung der Phosphorsäureanhydridbindungen, welche die Triphosphonucleinsäure und die Uridinphosphorsäure zum Hefenucleinsäuremolekül vereinigen. Ob im Hefenucleinsäuremolekül auf eine Uridinphosphorsäure zwei Moleküle Triphosphonucleinsäure treffen, oder ob dieses Verhältnis im großen Molekül eins zu eins oder zwei zu drei ist, konnte mit Sicherheit aus den Ausbeuten nicht berechnet werden. Stellen wir uns den Aufbau der Hefenucleinsäure aus diesen beiden Substanzen im Verhältnis eins zu zwei vor, so erhalten wir nebenstehendes Formelbild für die Hefenucleinsäure.

Die punktierten Linien zeigen die Wirkung der milden, ammoniakalischen Hydrolyse, welche die Phosphorsäureanhydridbindungen aufspaltet und zu der 6 basischen Triphosphonucleinsäure und zu der 2-basischen Uridinphosphorsäure führt. Die beiden Bruchstücke sind durch die bei der Aufspaltung entstandenen freien Hydroxyle des Phosphorsäurerestes außerordentlich leicht wasserlöslich. Mit Alkohol aus den wässerigen Lösungen gefällt, stellt sowohl die Triphosphonucleinsäure, wie auch die Uridinphosphorsäure ein sehr hygroskopisches Pulver dar, das erst durch wiederholtes Waschen mit Alkohol und Äther luftbeständig wird. Durch das Fällern mit Alkohol und Äther wird jedenfalls eine abermalige Anhydrierung des Phosphorsäurerestes bewirkt und dadurch die Unlöslichkeit verursacht. Die Anhydrierung des Phosphorsäurerestes durch die Fällung dürfte aber kaum eine vollständige sein und größtenteils nur an der Oberfläche der amorph ausfallenden Substanz stattfinden, sodaß es erklärlich ist, daß die Elementaranalysen der freien Säuren trotz längeren Trocknens im Vakuum keine einwandfreien Werte geben. Glücklicherweise ist durch die



Isolierung ausgezeichnet krystallisierender Brucinsalze dieser Säuren uns ein Mittel an die Hand gegeben, die Säuren in Form ihrer Salze als reine, einheitliche, chemische Individuen zu fassen und zu charakterisieren und dadurch einen Einblick in den Aufbau des Hefenucleinsäuremoleküls zu gewinnen.

Legen wir das durch die chemische Hydrolyse gewonnene Konstitutionsbild der Hefenucleinsäure der Erklärung der enzymatischen Hydrolyse durch Duodenalsaft zugrunde, so können wir infolge des Fehlens kleiner Bruchstücke des Nucleinsäuremoleküles und gestützt auf die Isolierung der Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure aus dem Verdauungsgemisch den Aufspaltungsmechanismus des Enzyms mit der Wirkung der milden, ammoniakalischen Hydrolyse identifizieren. Durch die fermentative Hydrolyse im Dünndarm wurde wie bei der ammoniakalischen Hydrolyse die Phosphorsäureanhydridbindung der Hefenucleinsäure gelöst und dadurch das ursprüngliche Molekül in die beiden leicht wasserlöslichen Komplexe der Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure aufgespalten. Über die Natur des Fermentes, das im Dünndarm die Aufspaltung der Phosphorsäureanhydridbindungen der Nucleinsäure bewirkt, kann man näheres nicht aussagen. Es ist ungeklärt, ob diese Hydrolyse durch eines der bereits bekannten Fermente des Darmes oder des Pankreas verursacht wird, oder ob es sich um die Wirkung eines bisher noch nicht als spezifisch erkannten Fermentes handelt. Die Funktion des bisher angenommenen nucleolytischen Fermentes im Dünndarm, welches das Nucleinsäuremolekül in seine kleinsten Bruchstücke spalten sollte, kann nach unseren Untersuchungsergebnissen keine so weitgehende sein. Es dürfte berechtigt sein, den zuviel präjudizierenden Namen «Nuclease» für dieses Ferment fallen zu lassen und diese fermentative Funktion als «Nucleotidacidase» zu bezeichnen. Der Name erscheint deshalb zweckentsprechend, weil er die Aufspaltung des anhydridartigen Phosphorsäurerestes der ursprünglichen Nucleinsäure zu den mehrere freie, saure Hydroxyle enthaltenden Nucleotidkomplexen der Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure zum Ausdruck bringt. Die große Wasserlöslichkeit dieser Nucleotid-

komplexe macht es wahrscheinlich, daß sie als solche resorbiert werden und in den intermediären Stoffwechsel kommen. Die Purinbasen Adenin und Guanin dürften also bei normalem, physiologischem Ablauf der Dünndarmtätigkeit beim Menschen nicht als freie, schwer wasserlösliche Purine, sondern als wasserlösliche Nucleotide in den Kreislauf gelangen, um dort bei intakter Purinzuckerbindung zum Auf- oder Abbau zu kommen. Für diese Anschauung sprechen auch die Ergebnisse der in einem früheren Hefte dieser Zeitschrift veröffentlichten Injektionsversuche mit den Nucleosiden Guanosin und Adenosin.¹⁾ Versuche, die Triphosphonucleinsäure und die Pyrimidinnucleotide durch Organextrakte weiter abzubauen, sind von uns beabsichtigt. Auch soll aus autolysierten Organen die Darstellung krystallisierter Brucinsalze von Nucleotidkomplexen versucht werden.

Experimenteller Teil.

Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit Ammoniak. Darstellung der Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure.

50 g Hefenucleinsäure werden mit 140 ccm 25%iger Ammoniaklösung am Rückflußkühler 2 Stunden gekocht. Schon nach gelindem Erwärmen beginnt die Hydrolyse unter starkem Schäumen, man steigert die Temperatur, sobald das Schäumen nachläßt, und erhitzt schließlich bis zum Kochen der klaren Flüssigkeit. Nach zweistündigem Kochen gießt man die erkaltete Lösung in die 3- bis 4fache Menge 96%igen Alkohols ein. Das sofort ausfallende Ammonsalz wird bei intensivem Durchrühren und Kneten mit Alkohol bald körnig und fest. Es wird abgesaugt und abermals mit Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wird in der Siedehitze mit einer kochenden Lösung von basisch-essigsaurem Blei (D.A.B.) gefällt. Das

¹⁾ S. J. Thannhauser und A. Bommes, Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 336 (1914). Die in dieser Mitteilung auf Grund der Nucleosidinjektionen geäußerten Anschauungen über den intermediären Purinstoffwechsel des Menschen wurden neuerdings durch Verfütterungsversuche von Nucleosiden durch J. Severin (Breslau, Habilitationsschrift 1916) bekräftigt.

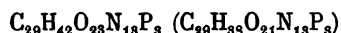
ausfallende Bleisalz wird sofort abfiltriert, in kaltem Wasser sorgfältig aufgeschlemmt und in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Bleisulfid wird abfiltriert und das gelbgefärbte Filtrat im Vakuum zu einem goldgelben, dickflüssigen Sirup konzentriert. Der Sirup wird mit absolutem Alkohol so lange durchgeknetet, bis er eine weiße, trockene, körnige Masse bildet. Ausbeute an so erhaltener Rohsäure 20—22 Gramm. 20 Gramm der Rohsäure werden in der 11fachen Menge Wassers gelöst. Die Lösung bis zur Siedehitze erwärmt und in eine heiße Lösung von 40 Gramm wasserfreiem Brucin in 80 ccm 96%igen Alkohol eingegossen. Es beginnt rasch die Abscheidung von krystallisiertem Brucinsalz. Man läßt bis 45° abkühlen, saugt rasch von dem abgeschiedenen Brucinsalz scharf ab und läßt die Lösung bei Zimmertemperatur über Nacht stehen. Das von 45° bis Zimmertemperatur ausfallende Brucinsalz wird zweimal aus Wasser umkrystallisiert. Schmelzp. 200—205°. Das bei 100—45° ausfallende Krystallinat wird mit 900—1000 ccm siedenden Wassers ausgezogen. Aus dieser wässerigen Lösung krystallisiert beim Abkühlen bis zu 45° ein Brucinsalz, das bei 185—187° schmilzt. Mehrmals aus Wasser umkrystallisiert, behält es diesen Schmelzpunkt. Der Rückstand, der beim Ausziehen des Krystallinates von 100—45° mit 1000 ccm siedenden Wassers nicht in Lösung ging, wird mit sehr viel kochendem Wasser ebenfalls in Lösung gebracht und umkrystallisiert. Dieses Brucinsalz zeigt nach zweimaligem Umkrystallisieren den Schmelzpunkt 175—177°, der durch fortgesetztes Umkrystallisieren nicht mehr verändert wird. Die Darstellung der freien Säuren aus diesen Brucinsalzen geschieht auf folgende Weise: Eine bestimmte Menge Brucinsalz wird in heißem Wasser suspendiert mit 95%iger Ammoniaklösung versetzt und die Lösung in Eis gestellt. Nach mehrstündigem Stehen wird vom ausgeschiedenen Brucin abgesaugt und das Filtrat mit Silbernitratlösung versetzt. Der ausgeschiedene Silberniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt, vom Schwefelsilber abfiltriert und das Filtrat im Vakuum auf ein möglichst kleines Volumen eingengt. Aus dieser sehr

stark konzentrierten Flüssigkeit fällt auf Zusatz der 5—6fachen Menge absoluten Alkohols die freie Säure in schneeweißen, amorphen Flocken aus. Mit Alkohol und Äther wiederholt gewaschen und im Vakuum getrocknet, ist sie einigermaßen luftbeständig. Die freien Säuren sind außerordentlich hygroskopisch und sind stets im Vakuum aufzubewahren. In Wasser sind sie spielend löslich, in allen andern Lösungsmitteln sind sie unlöslich. Ein krystallisiertes Metallzalz konnte bisher nicht erhalten werden. Die Analysenzahlen der freien Säuren sind nicht eindeutig, da die freien Säuren beim Ausfällen mit Alkohol und beim Trocknen teilweise am Phosphorsäurerest wieder anhydriert werden. Die Analysen der freien Säuren sollen nur der Vollständigkeit halber angeführt werden. Die Brucinsalze sind einheitlich krystallisierte, schneeweiße Substanzen und geben einwandfreie Analysenwerte.

Freie Säure aus Brucinsalz 205° (Triphosphonucleinsäure).

0,1422 g Substanz	0,1787 g CO ₂ ,	0,0575 H ₂ O	
0,0970 >	>	0,1242 > CO ₂ ,	0,0398 H ₂ O
0,1881 >	>	0,1373 > HO ₂ ,	0,0436 H ₂ O
0,1605 >	>	26,4 ccm N (15° 758 mm)	
0,1040 >	>	18,2 > N (19° 716 >)	
0,1228 >	>	20,4 > N (19° 749 >)	
0,2031 >	>	0,0649 g Mg ₂ P ₂ O ₇ .	

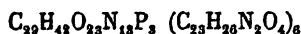
Triphosphonucleinsäure.



Berechnet:	C 33,72 %	H 4,06 %	N 17,60 %	P 9,01 %
(> :	C 34,91 %	H 3,81 %	N 18,26 %	P 9,32 %)
Gefunden:	C 34,26 %	H 4,5 %	N 19,1 %	P 8,91 %
	34,84 %	4,55 %	19,01 %	
	34,61 %	4,48 %	18,90 %	

Brucinsalz 205° (Salz der Triphosphonucleinsäure.).

0,1065 g Substanz	0,2300 g CO ₂ ,	0,0565 g H ₂ O	
0,1233 >	>	0,2665 > CO ₂ ,	0,0657 > H ₂ O
0,1105 >	>	0,2397 > CO ₂ ,	0,0618 > H ₂ O
0,1425 >	>	14,1 ccm N (16° 709 mm)	
0,1106 >	>	10,6 > N (10° 712 >)	
0,1268 >	>	12,2 > N (11° 711 >)	
0,2551 >	>	0,3973 g (P ₂ O ₅) ₂₄ MoO ₃ .	



Berechnet: C 59,01 % H 5,71 % N 10,31 % P 2,74 %

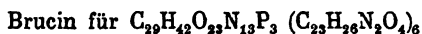
Gefunden: C 58,89 % H 5,89 % N 10,87 % P 2,63 %

58,94 % 5,29 % 10,80 %

59,16 % 6,21 % 10,79 %.

Brucinbestimmung des Salzes, Schmelzp. 205°.

0,4960 g Brucinsalz werden über P_2O_5 im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. In wenig Wasser suspendiert, mit 25 %iger Ammoniaklösung versetzt und in Eis eingestellt. Zum vollständigen Ausfallen des Brucins wird über Nacht bei 0° stehen gelassen. Das ausgefallene Brucin wird abgesaugt im Trockenschrank bei 70° vorge-trocknet und im Vakuum bei 100° über P_2O_5 wasserfrei gemacht und zur Gewichtskonstanz gebracht.



Berechnet: 0,2066 g Brucin

Gefunden: 0,2050 > >

Bestimmung der optischen Aktivität der dem Brucin-salz 205° zugrundeliegenden, freien Säure (Triphosphonuclein-säure). 0,2406 g Substanz werden in 10 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung dreht im 2 dm-Rohr — 0,93°

$$[\alpha]_D = -19,3^\circ$$

früher gefunden: $[\alpha]_D = -19,6^\circ$.

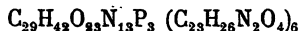
Brucinsalz 185—187° (Salz der d-l-Triphosphonucleinsäure).

0,1103 g Substanz 0,2394 g CO_2 , 0,0601 g H_2O 0,1345 > > 0,2900 > CO_2 , 0,0735 > H_2O 0,1055 > > 0,2285 > CO_2 , 0,0597 > H_2O

0,1047 > > 9,6 ccm N (19° 713 mm)

0,1176 > > 10,8 > N (19° 717 >)

0,1040 > > 9,6 > N (19° 714 >).



Berechnet: C 59,01 % H 5,71 % N 10,31 % P 2,74 %

Gefunden: C 59,11 % H 6,05 % N 10,02 %

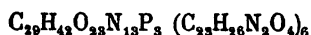
58,83 % 6,12 % 10,12 %

59,07 % 6,26 % 10,02 %.

Brucinbestimmung des Salzes, Schmelzp. 185—187°.

Die Brucinbestimmung wird in der gleichen Weise ausgeführt wie bei Brucinsalz 205°.

0,7570 g Brucinsalz, Schmelzp. 185—187° enthalten:



Berechnet: 0,4960 g Brucin

Gefunden: 0,5320 » »

Bestimmung der optischen Aktivität der dem Brucinsalz 185—187° zugrundeliegenden freien Säure hat ergeben, daß die diesem Brucinsalz zugrundeliegende Säure optisch inaktiv ist. Da die analytische Zusammensetzung die gleiche ist wie bei der dem Brucinsalz 205° zugrundeliegenden Triphosphonucleinsäure, so ist das Brucinsalz 185° das Salz der razemischen Triphosphonucleinsäure.

Brucinsalz 177° (Salz der Uridinphosphorsäure).

0,1243 g Substanz 0,2719 g CO₂, 0,0701 g H₂O

0,1424 » » 0,3105 » CO₂, 0,0780 » H₂O

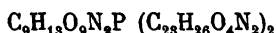
0,1177 » » 0,2565 » CO₂, 0,0655 » H₂O

0,1204 » » 8,5 ccm N (14° 707 mm)

0,1096 » » 7,8 » N (15° 722 »)

0,1218 » » 8,4 » N (17° 714 »)

0,2182 » » 0,3373 g (P₂O₅)₂₄MoO₃.



Berechnet: C 59,35 % H 5,84 % N 7,55 % P 2,78 %

Gefunden: C 59,64 % 6,26 % 7,78 % 2,64 %

59,46 % 6,09 % 7,8 % 2,71 %

59,43 % 6,17 % 7,6 %.

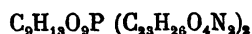
Bestimmung der optischen Aktivität der dem Brucinsalz 177° zugrundeliegenden Uridinphosphorsäure.

0,2420 g Substanz werden in 10 ccm Wasser gelöst, diese Lösung dreht im 2 dm-Rohr + 0,70°

$$[\alpha]_D = +14,4^\circ.$$

Brucinbestimmung des Salzes, Schmelzp. 177°.

0,2849 g Brucinsalz, Schmelzp. 177°, enthalten:



Gefunden: 0,1968 g Brucin

Berechnet: 0,2018 » »

Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure mit Ammoniak unter Druck (nach Levene).¹⁾

20 g Brucinsalz, Schmelzp. 205° werden in ungefähr 100 ccm heißem Wasser suspendiert, mit 15 ccm 25%igen Ammoniak versetzt und die Lösung zugleich in Eis gestellt. Nach mehrstündigem Stehen wird vom Brucinsalz scharf abgesaugt und das Filtrat im Vakuum auf 42 ccm konzentriert. Zu dieser Lösung des Ammonsalzes werden 8 ccm 25%iges Ammoniak zugesetzt, und die Lösung in einem Glasei, das in einer Ammoniaklösung der gleichen Konzentration schwimmt, im Autoklaven $3\frac{1}{2}$ Stunden bei einer Temperatur von 7 Atmosphären hydrolysiert. Innentemperatur des Autoklaven 155° , Außentemperatur 185° . Die hydrolysierte Lösung wird noch heiß aus dem Ei in ein Bechergläschen gegossen und über Nacht in Eis gestellt. Die Lösung erstarrt zu einer gelatinösen Masse, die sich absaugen läßt. Die abfiltrierte Masse enthält das Guanosin. Sie wird in wenig kochendem Wasser gelöst, heiß mit Bleiessig gefällt, heiß von dem ausfallenden Niederschlag abfiltriert, und dann das Filtrat mit Ammoniak versetzt. Der jetzt ausfallende Niederschlag wird mit Hilfe von wenig Essigsäure in wenig Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Bleisulfid stehen gelassen, eventuell etwas eingengt. Nach einigem Stehen fällt das Guanosin in feinen Nadeln aus. (Sollte beim Stehen der ursprünglichen Hydrolysenflüssigkeit das Guanosin nicht als gelatinöse Masse ausfallen, so gießt man die Hydrolysenflüssigkeit in die dreifache Menge Alkohol und behandelt den entstandenen Niederschlag in der eben geschilderten Weise in wässriger Lösung mit Bleiessig und dann mit Bleiessigammoniak).

Guanosin. $C_{10}H_{13}O_5N_5$

Berechnet: 24,74 % N

Gefunden : 24,68 % N

0,0867 g Substanz 19,5 ccm (18° 713 mm).

Das Filtrat von dem in der Hydrolysenflüssigkeit als gelatinöse Masse ausgefallenen Guanosin wird im Vakuum etwas eingengt, mit Ammoniak eventuell schwach alkalisch

¹⁾ Levene u. Jakobs, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 42, S. 2704 (1909).

gemacht und dann mit der 2—3fachen Menge Alkohol versetzt; vom flockigen Niederschlag wird abfiltriert. Das Filtrat wird auf einige Kubikzentimeter im Vakuum eingengt und mit einem Überschuß von kaltgesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Über Nacht fällt ein Pikrat aus, aus dem sich kleine Mengen Adenosin-pikrat isolieren ließen. Das Filtrat vom abgeschiedenen Pikrat wird von Pikrinsäure nach Ansäuern mit Schwefelsäure durch Ausschütteln mit Äther befreit, die Schwefelsäure quantitativ mit Barytwasser entfernt und die Flüssigkeit im Vakuum auf einige Kubikzentimeter konzentriert. In dieser konzentrierten Flüssigkeit scheidet sich Adenosin in Nadelchen ab. Diese werden abfiltriert, aus wenig Wasser umkrystallisiert und als Pikrat zur Analyse gebracht.

Adenosin-pikrat. $C_{10}H_{13}N_5O_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Berechnet: N 22,6%

Gefunden: N 22,3%

0,0951 g Substanz 19,2 ccm N (19° 721 mm).

Das Filtrat vom abgeschiedenen Adenosin, ungefähr 4 bis 8 g werden mit 2%iger Schwefelsäure (40 ccm) 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht und mit einer Lösung von Merkurisulfat in 5%iger Schwefelsäure zur Entfernung der eventuell noch vorhandenen durch die Hydrolyse mit Schwefelsäure abgespaltenen Purine versetzt. Nach 12stündigem Stehen wird der Quecksilberniederschlag abfiltriert. Das Filtrat vom Quecksilberniederschlag wird von überschüssigem Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und von der Schwefelsäure durch Barytwasser befreit, und die Lösung im Vakuum vollständig eingedunstet. Zu der entstehenden sirupösen Masse setzt man heißgesättigte Pikrinsäurelösung und läßt aus der nochmals aufgekochten Lösung das Cytidin-pikrat im Eisschrank ausfallen. Das Cytidin-pikrat wird mehrmals mit Äther nachgewaschen und aus absolutem Alkohol zweimal umkrystallisiert.

Cytidin-pikrat. $C_9H_{13}O_5N_3 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Berechnet: N 17,79%

Gefunden: N 18,1 %

0,0868 g Substanz 14,3 ccm (20° 720 mm).

In dem Filtrat vom Cytidin-pikrat konnte kein Uridin isoliert werden. Auch in mehrfach wiederholten Hydrolysen,

bei denen mit einigen Modifikationen nur auf die eventuelle Isolierung eines Uridinkomplexes hingearbeitet wurde, konnte niemals auch nur eine Spur dieses Körpers festgestellt werden. Die Triphosphonucleinsäure enthält also nur je einen Guanosin-, Adenosin- und Cytidinkomplex, aber keinen Uridinkomplex.

Hydrolyse der d-l-Triphosphonucleinsäure (Brucinsalz 185°) mit Ammoniak unter Druck.

Aus 20 g Brucinsalz, Schmelzp. 185° wurde auf die gleiche Weise wie bei der eben beschriebenen Hydrolyse die Ammonsalzlösung hergestellt und in der gleichen ammoniakalischen Konzentration bei 7 Atmosphären Druck hydrolysiert. Aus der Hydrolysenflüssigkeit wurde auf die eben beschriebene Art ebenfalls Guanosin, Adenosin und Cytidin isoliert. Ein Uridinkomplex wurde nicht gefunden. Die Analysenzahlen der isolierten Komplexe sind:

Guanosin. $C_{10}H_{13}O_5N_5$

Berechnet: N 24,74 %

Gefunden : N 24,81 %

0,0945 g Substanz 21,4 ccm N (18° 712 mm).

Adenosinipikrat. $C_{10}H_{13}N_5O_6 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Berechnet: N 22,6 %

Gefunden : N 22,4 %

0,0742 g Substanz 15 ccm N (19° 720 mm).

Cytidinipikrat. $C_9H_{13}O_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$

Berechnet: N 17,79 %

Gefunden : N 18,00 %

0,0987 g Substanz 16,1 ccm N (19° 720 mm).

Hydrolyse der Uridinphosphorsäure (Brucinsalz 177°) mit Ammoniak unter Druck.

Die aus 20 g Brucinsalz 177° gewonnene wässrige Lösung des Ammonsalzes wird unter denselben Bedingungen wie das Ammonsalz der Triphosphonucleinsäure hydrolysiert. Aus der Hydrolysenflüssigkeit ließen sich weder Guanosin noch Adenosin noch Cytidin isolieren. Die mit Alkohol gefällte

Hydrolysenflüssigkeit wird im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt. Aus dieser, eingeeengten Lösung (ungefähr 1 ccm) schied sich auf Zusatz von Pikrinsäurelösung kein Niederschlag ab. Die zugesetzte Pikrinsäure wurde nach Ansäuern mit Schwefelsäure mit Äther ausgeschüttelt, und alsdann die Schwefelsäure mit Barytwasser quantitativ entfernt. Hierauf wurde basisch-essigsäures Blei im Überfluß zugegeben, vom Niederschlag abfiltriert und ins Filtrat heiße Barytlösung so lange zugetropft, bis sich kein Niederschlag mehr bildet. Die entstandene Fällung wurde mit 5%iger Schwefelsäure angeschlemmt und längere Zeit stehen gelassen. Hernach wird die überschüssige Schwefelsäure durch Bleicarbonat bis zum Verschwinden der Kongoreaktion weggenommen und vom gebildeten Bleisulfat abfiltriert. Im Filtrat werden die Spuren vom Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt, und die etwas gelbliche Lösung bei vermindertem Druck bis zu einem kleinen Volumen eingeeengt; der Rest Flüssigkeit wird dann im Vakuumexsikkator vollständig entfernt. Der Rückstand wird mehrmals mit 96%igem Alkohol zur Entfernung des Wassers aufgenommen. Die dann hinterbleibende, krystallinische Masse wird aus wenig absolutem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzp. 146°. Unter dem Mikroskop feine weiße Nadelchen.

Uridin. $C_9H_{12}O_6N_2$

Berechnet: N 11,48%

Gefunden: N 11,90%

0,0694 g Substanz 7,6 ccm N (716 mm 22°).

Die wässrige Lösung des aus Brucinsalz 177° hergestellten Ammonsalzes wurde auch mit kochender 25%iger Schwefelsäure während 24 Stunden einer tiefgreifenden Hydrolyse unterzogen. Aus der Hydrolysenflüssigkeit konnte als stickstoffhaltiges Bruchstück nur Uracil isoliert und identifiziert werden.

Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit 2%iger Schwefelsäure.

50 g Hefenucleinsäure werden mit 2%iger Schwefelsäure 2 Stunden am Rückflußkühler im Ölbad bei 125° erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Hydrolysenflüssigkeit mit Silberoxyd

im Überschuß versetzt und über Nacht stehen gelassen. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat mit Barytwasser gegen Kongopapier neutralisiert. Vom Bariumsulfat wird abgesaugt, und das Filtrat mit einem Überschuß von basischem Bleiessig gefällt. Der abfiltrierte Bleiniederschlag wird in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und vom Schwefelblei abfiltriert. Die hinterbleibende Flüssigkeit wird im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft und mit soviel absolutem Alkohol zersetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Die ausfallende Substanz wird mehrmals mit Alkohol dekantiert, bis sie vollständig fest geworden ist. Aus dieser Rohsäure wird das Brucinsalz in der bei der ammoniakalischen Hydrolyse beschriebenen Weise hergestellt. Das bei 100—45° ausfallende Krystallisat wird mit heißem Wasser extrahiert und dann aus sehr viel kochendem Wasser umkrystallisiert. Die umkrystallisierte Substanz schmilzt bei 177° und erwies sich als identisch mit dem bei der ammoniakalischen Hydrolyse erhaltenen Brucinsalz 177° der Uridinphosphorsäure.

0,1066 g Substanz 0,2326 g CO₂ 0,0600 H₂O
 0,1280 „ „ 9,1 ccm N (719 mm 22°).

Brucinsalz der Uridinphosphorsäure.

$C_9H_{13}N_2O_9P$ ($C_{23}H_{26}O_4N_2$)₂
 Berechnet: C 59,35 % H 5,84 % N 7,55 % P 2,78 %
 Gefunden: 59,50 % 6,33 % 7,7 %.

Das von 45° bis Zimmertemperatur ausfallende Brucinsalz zeigte einen höheren Stickstoffwert (8,74%). Die diesem Brucinsalz zugrundeliegende Säure wurde bisher nicht näher untersucht. Es dürfte sich nach dem Stickstoffwert um das Brucinsalz der Cytidinphosphorsäure handeln.

Verdauung der Hefenucleinsäure mit menschlichem Duodenalsaft.

Die Gewinnung des Duodenalsaftes ist in einer früheren Mitteilung¹⁾ des einen von uns und in der Dissertation von Graßmann²⁾ eingehend beschrieben.

¹⁾ S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 329 (1914).

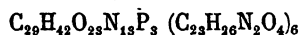
²⁾ K. Graßmann, Inaugural-Dissertation München 1917.

Verdauungsversuch.

40 g Hefenucleinsäure werden in einem 2 Liter-Erlenmeyer-Kolben mit 80—90 ccm Duodenalsaft übergossen und mit ca. 200 ccm destilliertem Wasser versetzt. Das Gemisch wird heftig durchgeschüttelt und unter einer dicken Toluolschicht drei mal 24 Stunden bei 37° im Brutschrank unter wiederholtem Aufschütteln stehen gelassen. Die Flüssigkeit färbt sich bald grün. Die Nucleinsäure geht allmählich bis auf einen geringen Bodensatz in Lösung. Vom Rückstand wird abgegossen und durch ein Faltenfilter filtriert. Die Flüssigkeit wird im Vakuum auf die Hälfte eingengt, abermals filtriert und dann mit soviel 96%igem Alkohol versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Der sehr voluminöse Niederschlag wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Hierauf bringt man den Niederschlag wieder durch nicht zuviel Wasser in Lösung, filtriert eventuell vom Ungelösten ab und engt im Vakuum die wässrige Lösung bis zur vollständigen Trockenheit ein. 20 g des hinterbleibenden Pulvers wird in der 11 fachen Menge heißen Wassers gelöst und die heiße Flüssigkeit in eine Lösung von 40 g wasserfreien Brucin in 80 ccm 96%igem Alkohol eingegossen. Diese Lösung verteilt man auf 3—4 große, flache Glasschalen und läßt einige Tage bei Zimmertemperatur abdunsten. Die Flüssigkeit erstarrt zu einer drusenförmigen Krystallmasse. Die Krystallmasse wird zuerst mit wenig kaltem Wasser angerührt, abgenutscht und wiederholt mit Chloroform dekantiert. Die hinterbleibende Substanz stellt ein Gemisch der durch die Verdauung entstandenen Brucinsalze dar. Ein direktes, fraktioniertes Krystallisieren dieses Gemisches hat sich als unzweckmäßig erwiesen. Man suspendiert deshalb das Brucinsalzgemisch in Wasser, zersetzt mit 25%igem Ammoniak, läßt einige Zeit in Eis stehen und filtriert vom abgeschiedenen Brucin ab. Das Filtrat wird mit basisch essigsaurem Blei solange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Das entstandene Bleisalz wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Bleisulfid abfiltriert und die Flüssigkeit im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingengt. Hierauf wird der Sirup mit Alkohol durchgeknetet, bis er körnig fest geworden

ist. 20 g dieser Substanz wird in der 11 fachen Menge heißen Wassers gelöst und die heiße Flüssigkeit in 80 ccm heißen 96%igen Alkohol, der 40 g wasserfreies Brucin enthält, eingegossen. Man läßt bis 45° abkühlen, filtriert rasch von der ausgeschiedenen Krystallisation ab und läßt die Lösung bei Zimmertemperatur stehen. Die von 100—45° ausfallende Substanzmenge wird mit 900—1000 ccm siedenden Wassers ausgezogen. Aus dieser Lösung krystallisiert beim Abkühlen bis zu 45° ein Salz, das bei 185—187° schmilzt, und auch bei wiederholtem Umkrystallisieren diesen Schmelzpunkt nicht mehr ändert. Der Rückstand, der beim Ausziehen mit 1000 ccm Wasser nicht in Lösung gegangen war, wird in viel heißem Wasser gelöst und umkrystallisiert. Der ausfallende Körper zeigt den Schmelzpunkt 177° und ändert diesen Schmelzpunkt beim Umkrystallisieren nicht mehr. Der von 45° bis Zimmertemperatur ausfallende Körper zeigt nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Wasser den Schmelzpunkt 205°. Proben der 3 Brucinsalze von 205°, 185—187°, 177° wurden mit den gleichschmelzenden Brucinsalzen aus der ammoniakalischen Hydrolyse vermischt. Es konnte keine Schmelzpunkterniedrigung festgestellt werden. Auch die ausgeführten Stickstoffanalysen der durch die Verdauung erhaltenen Brucinsalze stimmen mit den Werten der bei der ammoniakalischen Hydrolyse isolierten Brucinsalze der Triphosphonucleinsäure und Uridinphosphorsäure überein. Dadurch dürfte die Identität der durch fermentative und ammoniakalische Hydrolyse erhaltenen, hochmolekularen Spaltprodukte der Hefenucleinsäure erwiesen sein.

Brucinsalz der l-Triphosphonucleinsäure, Schmelzp. 205°.



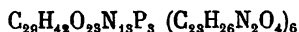
0,0883 g Substanz 8,2 ccm N (20° 715 mm)

Berechnet: C 59,01 % H 5,71 % N 10,31 %

Gefunden: (bei der Verdauung) N 10,86 %

> : (Ammoniak. Hydrolyse) N 10,80 %.

Brucinsalz der d-l-Triphosphonucleinsäure, Schmelzp. 185—187°.



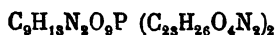
0,1086 g Substanz 9,9 ccm N (20° 714 mm)

Berechnet: C 59,61 % H 5,71 % N 10,31 %

Gefunden: (bei der Verdauung) N 10,00 %

» : (Ammoniak. Hydrolyse) N 10,12 %.

Brucinsalz der Uridinphosphorsäure, Schmelzp. 177°.



0,1137 g Substanz 8,2 ccm N (19° 711 mm)

Berechnet: C 59,35 % H 5,88 % N 7,55 %

Gefunden: (bei der Verdauung) N 7,86 %

» : (Ammoniak. Hydrolyse) N 7,78 %.

