

Analyse: Ber. für $C_{10}H_6N_2O$.

Procente: N 16.47.

Gef. » » 16.18.

Der Körper ist sonach identisch mit dem Bamberger'schen Naphtalin- β_1 - α_1 -diazooxyd.

Nebenbei entsteht ein in Alkohol unlöslicher, aus Aceton in zu Drusen vereinigten schwarzen Prismen krystallisirender Körper, der bei 115° verpufft; eine genauere Untersuchung desselben haben wir nicht vorgenommen.

Freiburg i. B., Juli 1894.

418. A. Kossel und Albert Neumann: Darstellung und Spaltungsproducte der Nucleinsäure (Adenylsäure).

(Vorgetragen in der Sitzung von Hrn. A. Kossel.)

Eine Reihe von biologischen Thatsachen führt zu dem Schluss, dass die Nucleinsäuren als typische Bestandtheile des Zellkernes in einer engen Beziehung zu den synthetischen Processen des Thierkörpers stehen. Von diesem Gesichtspunkte aus erscheint es daher als eine äusserst wichtige Aufgabe, die chemische Natur dieser Stoffe aufzuklären.

Der Eine von uns, A. Kossel, hat dies Ziel seit längerer Zeit verfolgt. Diese älteren Untersuchungen wurden an den aus Bierhefe dargestellten Nucleinstoffen ausgeführt, später diente jedoch ausschliesslich die aus Thymusdrüsen gewonnene Adenylsäure¹⁾, da diese leichter zu reinigen und unschwer in grösseren Mengen zu erhalten ist.

I. Darstellung der Adenylsäure.

10 kg der käuflichen Drüsen werden durch sorgfältige Präparation von fremden Gewebstheilen befreit, die ungefähr 6 kg betragende reine Gewebssubstanz zerhackt und mit 12 L Wasser 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter Zusatz von 20 ccm Chloroform (zur Verhütung der Fäulniss) digerirt. Die Flüssigkeit wird Colirtücher abgeseiht, das trübe Filtrat mit einer concentrirten Barytlösung (1 kg krystallisirtes Aetzbaryt in 3 L Wasser heiss gelöst) versetzt und zum Absetzen des Niederschlages hingestellt. Der durch Abhebern resp. Filtriren abgetrennte Niederschlag wird mit Barytwasser ausgewaschen, mit $\frac{3}{4}$ L Wasser angerührt, mit Essigsäure bis zur bleibend schwach sauren Reaction versetzt und mit noch 4 L Wasser in einen grossen Kolben gespült. Dann wird die Flüssigkeit 2 Stunden

¹⁾ Diese Berichte 26, 2754.

im Paraffinbade im Sieden erhalten und heiss filtrirt. Dieses Auskochen wird so oft wiederholt, bis eine Probe der filtrirten Flüssigkeit mit Alkohol keinen Niederschlag, sondern nur eine Trübung giebt. Hierzu ist gewöhnlich 4malige Wiederholung der Operation nothwendig. Die vereinigten Filtrate bleiben bis zum nächsten Tage stehen, dann giesst man diese Flüssigkeit unter Umrühren in alkoholische Salzsäure, welche durch Zusatz von 15 ccm concentrirter Salzsäure (1.195 spec. Gew.) zu je einem Liter Alkohol bereitet ist. Auf je einen Liter des Filtrats nimmt man $\frac{3}{4}$ L des salzsäurehaltigen Alkohols. Bei der Mischung der Flüssigkeiten bildet sich ein weisser, pulveriger Niederschlag, welcher aus Adenylsäure besteht. Die alkoholische Flüssigkeit wird möglichst bald von dem Niederschlag abgehebert, der letztere mit dem gleichen Volum Alkohol durchgerührt, abgesaugt, zweimal mit Alkohol, zuletzt mit Aether ausgewaschen, an der Luft getrocknet und gewogen. Die erhaltene fein pulverige Adenylsäure enthält noch Spuren von Baryt und etwas Eiweiss. Zur weiteren Reinigung wird das Pulver in wässrige Ammoniakflüssigkeit gebracht. Für je 100 g Adenylsäure wendet man 1 L Wasser an, dem man 100 ccm 10procentiger Ammoniakflüssigkeit hinzugefügt hat. Man lässt über Nacht stehen, um völlige Lösung zu erzielen. Die Lösung wird (ohne Filtration) mit salzsäurehaltigem Alkohol gefällt. Hierzu ist für je 100 g Adenylsäure $1\frac{1}{2}$ L Alkohol nothwendig, welchem 100 ccm concentrirter Salzsäure zugefügt sind. Bei der Abtrennung und Trocknung des Niederschlages verfährt man wie oben angegeben.

Eine genaue Innehaltung dieser Vorschriften ist durchaus nothwendig, da man sonst klebrige braune Producte oder geringe Ausbeuten erhält. Die Ausbeute beträgt ungefähr 2 pCt. von dem gereinigten feuchten Thymusgewebe, das sind im vorliegenden Falle (bei 10 kg Rohthymus) ca. 120 g Adenylsäure.

Die auf diese Weise erhaltene Adenylsäure stellt ein amorphes Pulver von rein weisser Farbe dar. Sie ist völlig frei von Eiweiss und giebt keine Spur einer Violetfärbung beim Kochen mit Natronlauge und wenig Kupfersulfat.

II. Spaltung der Adenylsäure.

Die Untersuchungen über die Eigenschaften, die Zusammensetzung und die nächsten Spaltungsproducte ¹⁾ des nach diesem Verfahren gewonnenen Präparats sind noch nicht abgeschlossen und wir behalten es uns ausdrücklich vor, hierüber später ausführlicher zu berichten. Zunächst haben wir die weitergehenden Spaltungsproducte untersucht. Wir wandten folgende Methoden der Spaltung an:

¹⁾ Diese Berichte 26, 2754.

1. Einstündige Einwirkung siedender Schwefelsäure von 30 Vol.-Proc. 2. Zweistündige Einwirkung 5procentiger Schwefelsäure bei 150°. 3. 20procentige Schwefelsäure unter den gleichen Bedingungen. 4. Wasser bei 170—180°, zwei Stunden.

Es zeigte sich, dass unter den sub 3. erwähnten Versuchsbedingungen das Adenin völlig zerstört wurde, während dies bei den unter 1., 2. und 4. angeführten Vorschriften nicht der Fall war. Das Verfahren 3. schien uns daher einfachere Bedingungen für die Trennung der Spaltungsproducte darzubieten und es wurden bei Anwendung desselben folgende Substanzen aufgefunden:

- | | |
|------------------|------------------------------|
| 1. Thymin. | 2. eine neue Base »Cytosin«. |
| 3. Lävulinsäure. | 4. Ameisensäure. |
| 5. Ammoniak. | 6. Phosphorsäure. |

Man könnte vielleicht vermuthen, dass das verschwundene Adenin die Quelle für das Thymin oder das Cytosin oder das Ammoniak gebildet habe. Dies ist aber nicht der Fall, denn wir beobachteten bei dem Verfahren 1., 2. und 4. eine reichliche Bildung von Adenin neben den übrigen Spaltungsproducten.

Thymin.

Wir haben die Entstehung dieses Körpers nach einstündigem Kochen mit 30 volumprocentiger Schwefelsäure bereits früher beobachtet und beschrieben¹⁾. Um zu entscheiden, ob das Thymin ein Spaltungsproduct aller Nucleinsäuren sei, unterwarfen wir Nucleinsäure der Hefe und solche aus der Milz des Rindes der zweistündigen Einwirkung 5procentiger Schwefelsäure bei 150°. In beiden Fällen erhielten wir einen Körper, welcher alle Eigenschaften des Thymins zeigte. Das aus Hefenucleinsäure erhaltene Product reichte für die Analyse nicht aus. Das schwefelsaure Reactionsproduct der Milz-nucleinsäure wurde in folgender Weise verarbeitet:

Die Flüssigkeit wird durch vollständige Ausfällung mit Phosphorwolframsäure vom Adenin und anderen Producten befreit, die vom Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrirte Lösung zur Entfernung der Säuren mit Baryt versetzt und das Filtrat durch Quecksilbernitrat in concentrirter Lösung unter gleichzeitiger Neutralisation mit Natronlauge ausgefällt. Der Quecksilberniederschlag wird unter Druck durch Schwefelwasserstoff zerlegt, die durch Kochen vom Ueberschuss des Schwefelwasserstoffs befreite Flüssigkeit mit Ammoniak neutralisirt und die neutrale Lösung mit Silbernitrat gefällt. Das Thymin fällt als Silberverbindung aus, es wird nach gründlichem Auswaschen in Wasser zertheilt und mit Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzt. Aus der vom Schwefelsilber befreiten Flüssigkeit schied sich das Thymin nach dem Eindampfen aus.

¹⁾ Diese Berichte 26, 2754.

Das Thymin stimmte sowohl in seiner Zusammensetzung wie in seinen Eigenschaften mit dem früher aus der Thymusdrüse erhaltenen Körper überein.

Analyse: Ber. für $C_{23}H_{26}N_8O_6$.

Procente: C 54.12, H 5.10, N 21.96.

Gef. » » 53.95, » 5.47, » 21.99.

Als wir später die aus der Thymusdrüse dargestellte Adenylsäure der zweistündigen Wirkung einer 20 volumprocentigen Schwefelsäure bei 150° aussetzten, erhielten wir ein Product, welches alle die früher beschriebenen Eigenschaften des Thymins zeigte, welches aber bei der Analyse völlig andere und für die einfache Formel $C_5H_6N_2O_2$ passende Zahlen gab.

Analyse: Ber. für $C_5H_6N_2O_2$.

Procente: C 47.62, H 4.76, N 22.22.

Gef. Procente: C 47.47, 47.90, 47.46, 47.74, 47.64.

» » H 4.96, 5.18, 5.19, 5.19, 5.05.

» » N 22.16 (Kjeldal), 22.35 (vol.), 22.59 (vol.).

Jede der angeführten Analysenzahlen entsprach einem besonderen Präparat oder einer für sich krystallisirten Fraction. Die gleiche Zusammensetzung zeigte auch das Thymin, welches durch die zweistündige Einwirkung des Wassers bei 170° auf Adenylsäure gewonnen wurde. In diesem Falle gestaltet sich die Darstellung sehr einfach. Die mit Schwefelsäure schwach angesäuerte Reactionsflüssigkeit wird zur Entfernung von Adenin, Cytosin und Ammoniak mit Phosphorwolframsäure völlig ausgefällt und das Filtrat mit Baryt stark alkalisch gemacht. Beim Eindampfen der durch Schwefelsäure vom Barytüberschuss befreiten und filtrirten Flüssigkeit scheidet sich das Thymin aus. Die Krystallisation wird durch Entfernung der ätherlöslichen Spaltungsproducte (s. u.) begünstigt. Die Krystalle ergaben nach dem Entfärben mit Thierkohle und mehrfachem Umkrystallisiren die oben an vierter Stelle angegebenen Zahlen.

Die Formel $C_5H_6N_2O_2$ ist also als die richtige Formel des Thymins anzusehen. Dies wurde ausserdem noch durch die Bestimmung des Moleculargewichts nach der Siedemethode bestätigt.

Berechnetes Moleculargewicht für $C_5H_6N_2O_2$ 126,

Gef. 129.9.

Das Thymin hat also die Zusammensetzung des Methyluracils¹⁾, es scheint aber mit demselben nicht identisch, sondern nur isomer zu sein.

Die früheren Analysenzahlen, welche zu der Formel $C_{23}H_{26}N_8O_6$ führten, sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Thymin mit irgend einer anderen Substanz in constantem Verhältniss zu-

¹⁾ Ann. d. Chem. 229, 8.

sammen krystallisirt. Eine zufällige Verunreinigung ist als Ursache der früheren Zahlen ausgeschlossen, da die Analyse der aus verschiedenen Organen (Thymusdrüse und Milz) und nach verschiedenen Methoden dargestellten Thyminpräparate zu den gleichen Resultaten geführt hatten. Wir gedenken auf diese Frage später zurückzukommen.

Die Ausbeute an Thymin beträgt ungefähr 8 pCt. der angewandten Nucleinsäure.

Cytosin.

Bei der Zersetzung der Nucleinsäure mit 20 volumprocentiger Schwefelsäure bei 150° und ebenso bei der Einwirkung von Wasser bei 170° entsteht ein Product von basischen Eigenschaften, für welches wir den Namen »Cytosin« vorschlagen. Dasselbe befindet sich in dem durch Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschlag und wird aus demselben durch Zersetzen mit Barythydrat in Freiheit gesetzt. Bei der Zersetzung der Adenylsäure mit Schwefelsäure, wobei, wie erwähnt, das Adenin vollständig zerstört wird, gestaltet sich die weitere Verarbeitung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages folgendermaassen: Die vom phosphorwolframsauren Baryt abfiltrirte Flüssigkeit wird zunächst zur Entfernung des mitgefällten Ammoniaks bis zum vollständigen Entweichen desselben im Sieden erhalten, dann mit Schwefelsäure neutralisirt, filtrirt und das Filtrat (eventuell nach der Reinigung mit Thierkohle) eingedampft. Wenn die Flüssigkeit auf ein geringes Volumen eingeengt ist, fügt man Ammoniak hinzu und lässt die Base aus der ammoniakalischen Lösung krystallisiren.

Die Krystalle enthalten Krystallwasser, sie sind bei langsamer Abscheidung centimeterlang und bilden rechtwinklige Tafeln, deren Ecken oft abgestumpft sind. Die Base ist in heissem Wasser leicht löslich und fällt beim Erkalten aus, sie ist sehr schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Aether. Das Krystallwasser entweicht bei 100° vollständig.

Die Analyse führte zu der Formel $C_{21}H_{30}N_{16}O_4 + 5aq.$

Analyse: Ber. für $C_{21}H_{30}N_{16}O_4.$

Procente: C 44.21, H 5.26, N 39.29.

Gef. » » 44.11, 43.93, » 5.27, 5.29, » 39.58.

Die Krystallwasserbestimmung ergab:

Analyse: Ber. für $C_{21}H_{30}N_{16}O_4 + 5aq.$

Procente: H_2O 13.64.

Gef. » » 13.88.

Die Base bildet gut krystallisirende Salze. Das Sulfat krystallisirt in Nadeln, das Chlorhydrat ist leicht löslich und erscheint in Prismen, ferner wurden das Nitrat, Chloroplatinat und das Gold-doppelsalz leicht krystallisirt erhalten. Bemerkenswerth ist das Verhalten des Cytosins zu Jodwismuthjodkalium. Dieses Reagens er-

zeugt selbst in einer sehr verdünnten, angesäuerten Lösung der Base einen ziegelrothen, krystallinischen Niederschlag. Fügt man zu einer Lösung der Base oder eines ihrer Salze Silbernitrat, so entsteht ein Niederschlag, der sich auf Zusatz eines Tropfens Ammoniakflüssigkeit vermehrt, auf Zusatz von mehr Ammoniak sich allmählich verringert. Erhitzt man die ammoniakalische Flüssigkeit zum Sieden, so löst sich der Niederschlag auf, um beim Abkühlen in krystallisirtem Zustand wieder zu erscheinen.

Das Cytosin bildet ein sehr schwer lösliches Pikrat, welches sich auf Zusatz von wässriger Lösung von Natriumpikrat zu der verdünnten Lösung eines Cytosinsalzes in gelben Nadeln abscheidet. Die Analyse desselben ergab 2 Moleküle Pikrinsäure auf 1 Molekül der Basis.

Analyse: Ber. für $C_{21}H_{30}N_{16}O_4$, $2C_6H_3N_3O_7$.

Procente: C 38.53, H 3.50, N 29.97.

Gef. » » 38.45, » 3.66, » 29.66 (Kjeldahl).

Die Ausbeute an Cytosin beträgt ungefähr 2 pCt. der Nucleinsäure. Die grossen Schwierigkeiten, mit welchen die Gewinnung dieses Körpers bisher verknüpft war, gestatteten uns nicht, die obige Formel durch weitere Analysen zu bestätigen. Wir können daher, bis dies erfolgt ist, die Formel $C_{21}H_{30}N_{16}O_4$ nur als eine vorläufig aufgestellte bezeichnen.

Die übrigen Spaltungsproducte.

Wenn man die wässrige Lösung, welche nach der zweistündigen Einwirkung 30procentiger Schwefelsäure bei 150° resultirt, mit Aether ausschüttelt, so geht eine Säure in den Aether über, welche nach dem Abdestilliren des Lösungsmittels als braune dickliche Flüssigkeit zurückbleibt. Diese wurde der Destillation unterworfen. Etwa der vierte Theil geht bei $100-120^{\circ}$ über, dann steigt das Thermometer sehr schnell auf 245° . Die Hauptmenge destillirt zwischen 245 und 255° . Im Kolben bleibt ein stark rothbraun gefärbter, beim Erkalten erstarrender Rückstand.

Der bei $100-120^{\circ}$ übergehende Theil zeigt alle Reactionen der Ameisensäure. Die zweite Fraction ist eine fast farblose, dickliche Flüssigkeit, welche sich leicht in Wasser, Alkohol und Aether löst und durch die folgenden Untersuchungen als Lävulinsäure charakterisirt wird. Die wässrige Lösung giebt die Jodoformreaction mit grosser Leichtigkeit. Wenn man zu der Lösung einige Tropfen einer verdünnten Lösung von Nitoprussidnatrium hinzusetzt und dann Natronlauge hinzutropfen lässt, so entsteht eine dunkel kirschrothe Färbung der Flüssigkeit, welche auf Zusatz von Essigsäure in eine Himbeerfarbe übergeht. Dies ist eine charakteristische Reaction der Lävulinsäure, welche bisher nicht bekannt war. Essigsäures Phenyl-

hydrazin ruft sofort eine milchige Fällung hervor, welche sich nach kurzer Zeit in eine Krystallmasse verwandelt.

Fügt man zu der neutralisirten wässrigen Lösung Silbernitrat, so bildet sich ein krystallinischer, weisser Niederschlag, dessen Analyse zu den Zahlen des lävulinsäuren Silbers führte:

Analyse: Ber. für $C_5H_7O_3Ag$.

Procente: C 26.91, H 3.14, Ag 48.43.

Gef. » » 26.93, » 3.34, » 48.61.

Auch die Krystallform entsprach völlig der von Tollens gegebenen Beschreibung. Das lävulinsäure Silber bildet sechsseitige Tafeln, deren Winkel $a = 99.1$, $b = 131.5$ betragen. Wir fanden für a 100.0 und 100.1, für b 131.0 und 132.0.

Der Siedepunkt der Flüssigkeit lag in Uebereinstimmung mit dem der Lävulinsäure bei 250° .

Die oben erwähnte Phenylhydrazinverbindung ergab folgende Analysenresultate.

Analyse: Ber. für $C_{11}H_{14}N_2O_2$.

Procente: C 64.07, H 6.79.

Gef. » » 64.06, » 6.97.

Die Krystalle bestanden also aus dem Phenylhydrazon der Lävulinsäure, welches von E. Fischer dargestellt ist. In Uebereinstimmung mit den Angaben dieses Forschers zersetzt sich diese Verbindung beim Aufbewahren und färbt sich im Exsiccator schon nach kurzer Zeit gelb. Der Schmelzpunkt unserer Krystalle lag bei $107-108^{\circ}$, nach E. Fischer's Angabe schmilzt das genannte Hydrazon bei 108° .

Die Bildung der Lävulinsäure ist nach den Untersuchungen von Tollens und seinen Schülern eine Reaction, welche die Gegenwart von Kohlehydraten anzeigt, wir gelangen also zu dem Schluss, dass in der aus Thymus dargestellten Adenylsäure eine Kohlehydratgruppe vorhanden ist.

Die Entstehung von Kohlehydraten aus Nucleinsäure wurde zuerst von dem einen von uns, A. Kossel, an der Hefenucleinsäure beobachtet. Die Untersuchungen wurden jedoch an diesem Material nicht fortgesetzt, weil in der Hefe ein gummiartiges Kohlehydrat vorhanden ist, dessen chemische Beziehungen zur Nucleinsäure nicht klargestellt werden konnten und dessen Abtrennung von dem phosphorhaltigen Atomcomplex Schwierigkeiten bereitete. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Richtigkeit der früher an der Hefenucleinsäure gewonnenen Resultate. Bemerkenswerth ist, dass auch Walter aus dem Paranuclein des Ichthulins und Hammarsten aus den Nucleinstoffen der Pankreasdrüse reducirende Kohlehydrate abspalten konnten.

Die Entstehung eines Kohlehydrats aus den Nucleinsäuren ist nicht nur von Werth für die Frage nach der Constitution dieser Säuren, sondern sie enthüllt uns auch eine neue Ursprungsstätte für die Bildung der Kohlehydrate des thierischen Körpers. In welcher Form diese kohlehydratähnliche Gruppe in der Adenylsäure vorhanden ist, wissen wir noch nicht, doch verdient die Thatsache erwähnt zu werden, dass neben der Lävulinsäure und Ameisensäure Ammoniak entsteht. Man wird also die Möglichkeit berücksichtigen müssen, dass hier ebenso wie im Chitin und in der Chondroitinsäure ein Amidderivat aus der Kohlehydratgruppe vorhanden ist.

Berlin. Chemische Abtheilung des Physiologischen Instituts.

419. C. Erlenmeyer jun. und N. Knight: Ueber die Entstehung von Oxylactonen aus Phenylbrenztraubensäure.

(Eingegangen am 3. August.)

Der eine von uns (Erlenmeyer) hat im Anschluss an frühere Mittheilungen über den aus Benzylcyanid und Oxalester entstehenden Phenylcyanbrenztraubensäureester das Verhalten dieses Esters gegenüber Basen und Säuren verfolgt und hofft später sowohl über diesen Gegenstand, als auch über die Condensation des Benzylcyanids mit anderen Estern ausführlich zu berichten. Die vorliegende Mittheilung betrifft einen Körper, der bei der Darstellung der Phenylbrenztraubensäure aus dem Phenylcyanbrenztraubensäureester mit verdünnter Schwefelsäure in grosser Menge als Nebenproduct auftritt und nach den folgenden Beobachtungen als ein Oxylacton aufzufassen ist.

Erhitzt man 40 g reinen Phenylcyanbrenztraubensäureester mit 350 ccm Schwefelsäure (2 Th. Schwefelsäure und 3 Th. Wasser) am Rückflusskühler, so findet sehr bald Gelbfärbung der Flüssigkeit statt, zugleich schmilzt der ungelöste Theil der Substanz zu einem braungelben Oel zusammen. Bei fortgesetztem Erhitzen, etwa nach 12 Stunden, wird die Lösung farblos. Auf der Lösung schwimmt noch eine grosse Menge Oel. Wir trennten heiss das Oel von der Lösung. Die Lösung scheidet beim Erkalten Phenylbrenztraubensäure ab. Das Oel wird immer wieder aufs neue mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, wobei immer neue Mengen Phenylbrenztraubensäure in Lösung gehen, bis endlich nach mehrtägigem Kochen das Oel krystallinisch erstarrt. Der so entstehende feste Körper wird bei weiterem Kochen nicht mehr verändert.

Beim Behandeln dieses Körpers mit Sodalösung ging nun sehr wenig in Lösung. Der zurückbleibende Theil reagirte stark alkalisch und wurde deshalb so lange mit Wasser behandelt, bis neutrale Re-