

106. Richard Burian: Zur Kenntniss der Bindung der Purinbasen im Nucleinsäuremolekül.

[Aus dem physiologischen Institut der Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 8. Februar 1904.)

Die Purinbasen des Nucleinsäuremoleküls zeichnen sich vor dessen übrigen Bestandtheilen dadurch aus, dass zu ihrer Abspaltung eine sehr gemässigte Hydrolyse genügt. Schon beim blossen Auflösen der Nucleinsäure in Wasser von 60° tritt eine partielle Abspaltung der Purinbasen ein<sup>1)</sup>, und nahezu vollständig wird dieselbe, wenn man 10 Minuten lang mit Wasser kocht<sup>2)</sup>. Die sonstigen Componenten der Nucleinsäure werden hierbei nicht aus ihrer Verbindung losgelöst.

Die Purinbasen sind also mit dem Reste des Nucleinsäuremoleküls relativ locker verknüpft. Eine präcise Vorstellung von der Art der Verknüpfung fehlt bis jetzt; man weiss nur, dass es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine »salzartige«, sondern um eine sogen. »organische« Bindung handelt<sup>3)</sup>.

Die in der vorhergehenden Mittheilung beschriebene Purinbasen-*Reaction* giebt nun bei ihrer Anwendung auf die Nucleinsäuren Resultate, welche geeignet erscheinen, einen etwas tieferen Einblick in den fraglichen Bindungsmodus zu eröffnen.

Versetzt man eine Lösung von Nucleinsäure in Natronlauge mit Diazobenzolsulfosäure, so erfolgt keine nachweisbare Reaction: das Gemisch bleibt farblos, und die Nucleinsäure lässt sich durch Salzsäure unverändert wieder ausfällen. Die Nucleinsäuren vermögen somit trotz ihres erheblichen Purinbasengehaltes nicht, mit Diazokörpern zu reagiren. Die Ursache hiervon liegt keineswegs in einer Störung, die den Eintritt der Reaction — etwa auch bei Gegenwart reactionsfähiger Stoffe — hemmen würde; denn Guanin, das zu einer Nucleinsäurelösung hinzugefügt ist, verbindet sich völlig unbehindert mit Diazobenzolsulfosäure. Demnach müssen die Purinbasen im Nucleinsäuremolekül unter besonderen Bedingungen stehen, welche ihre Reactionsfähigkeit gegenüber Diazokörpern aufheben. Die Letztere kommt erst zum Vorschein, wenn die Purinbasen durch Hydrolyse abgespalten worden sind: Zusatz von Diazobenzolsulfosäure zu (alkalisch gemachten) Nucleinsäure-

<sup>1)</sup> Neumann, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, 552.

<sup>2)</sup> Kossel und Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 74.

<sup>3)</sup> Die Gründe für diese Annahme s. bei Kossel und Neumann, a. a. O., ferner bei Kossel, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1894, 194 und bei Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 19.

Zersetzungsflüssigkeiten bewirkt die Bildung der Diazoaminoverbindungen in vollkommen typischer Weise.

Experimentelle Belege. — I. Sperma-Nucleinsäure. Als Ausgangsmaterial diente das Sperma von Heringen, die durch Einsalzen conservirt und längere Zeit aufbewahrt waren. Derartiges Material giebt — wahrscheinlich wegen »Denaturierung« des Nucleoproteids — an verdünnte Säuren kein Protamin (Clupein) ab; das Letztere haftet in diesem Falle den Nucleinsäureniederschlägen mit besonders grosser Hartnäckigkeit an. Infolgedessen führen hier weder die Miescher-Altman'sche<sup>1)</sup>, noch die Neumann'sche<sup>2)</sup> Methode der Nucleinsäure Darstellung zum Ziele. Als brauchbar erwies sich schliesslich folgendes Verfahren, bei welchem zunächst (in Anlehnung an die Schmiedberg'sche Methode<sup>3)</sup>) die Kupferverbindungen der Nucleinsäure dargestellt werden.

Das Sperma wird mit Wasser verrieben, zur Beseitigung der bindewebigen Antheile durch ein Tuch gepresst, bis zum fast vollständigen Verschwinden der Chlorreaction mit Wasser centrifugirt und mit Alkohol und Aether entfettet. Den Rückstand löst man nach der Vorschrift von Neumann in heisser Natronlauge unter Zusatz von Natriumacetat, fügt nach dem Abkühlen so lange Kupfersulfat hinzu, bis sich aus der (durch Biuretreaction) violett gefärbten Flüssigkeit nucleinsaures Kupfer und Kupferhydroxyd abscheiden<sup>4)</sup> und versetzt das Gemisch sodann mit dem gleichen Volumen Alkohol. Nach einigem Stehen wird der Kupferniederschlag abgesaugt, mit verdünntem Alkohol (ca. 30 Gew.-pCt.) gewaschen und in einer kleinen Menge warmen verdünnten Ammoniaks gelöst. Die Lösung übersättigt man unter Kühlung in einer Kältemischung mit Salzsäure, fällt den hierbei entstandenen Nucleinsäureniederschlag mehrmals (unter Kühlung) aus Ammoniak mit Salzsäure um und wäscht endlich mit eiskalter verdünnter Salzsäure sorgfältig aus.

P-Gehalt der Nucleinsäure. — 0.4136 g Sbst.: 0.1426 g  $Mg_2P_2O_7$  = 9.62 pCt. P.

a) 1 g des Präparates wurde in 30 ccm warmer, verdünnter Natronlauge gelöst und die Lösung sofort in Eis abgekühlt. Zusatz von Diazobenzolsulfosäure bewirkte keine sichtbare Veränderung. Beim Ansäuern des Gemisches (unter Kühlung) schied sich ein rein weisser Niederschlag ab, der mehrmals aus Ammoniak mit Salzsäure umgefällt wurde: die P-Bestimmung ergab, dass es sich um unveränderte Nucleinsäure handelte.

0.2107 g Sbst.: 0.0700 g  $Mg_2P_2O_7$  = 9.28 pCt. P.

<sup>1)</sup> Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1889, 524.      <sup>2)</sup> Ebenda 1899, 525.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. 43, 57.

<sup>4)</sup> Ob der Niederschlag bereits Kupferhydroxyd enthält, lässt sich dadurch entscheiden, dass man eine Probe des ersteren anhaltend mit Natronlauge kocht: das nucleinsaure Kupfer bleibt hierbei unverändert, während sich die beigemengten Bröckel des Kupferhydroxyds in der bekannten Weise bräunen.

b) Zu einer in genau derselben Weise bereiteten Nucleinsäurelösung wurden 0.05 g Guanin hinzugefügt. Auf Zusatz von Diazobenzolsulfosäure entstand sofort sehr intensive Rothfärbung.

c) 1 g des Präparates wurde 1 Stunde lang mit verdünnter Salzsäure gekocht. Hierauf wurde die Flüssigkeit mit Thierkohle entfärbt, eingeengt, mit Natronlauge alkalisch gemacht und auf ein Volumen von 30 ccm gebracht. — Diazobenzolsulfosäure rief lebhaftere Rothfärbung hervor. Diese Rothfärbung war nicht, oder doch nicht bloss durch die aus der Nucleinsäure abgespaltenen Kohlehydrate bedingt; denn beim Ansäuern mit Salzsäure bildete sich ein gelbrother Niederschlag, der vollkommen die Eigenschaften des Diazobenzolsulfosäure-guanins besass (insbesondere charakteristische Silberverbindung!).

II. Thymus-Nucleinsäure. Darstellung aus Kalbsthymus nach dem Verfahren von Neumann.

a) 2 g Nucleinsäure, in Natronlauge gelöst: Zusatz von Diazobenzolsulfosäure bewirkt keine Reaction.

b) 2 g Nucleinsäure + 0.1 g Guanin, in Natronlauge gelöst: mit Diazobenzolsulfosäure starke Rothfärbung.

c) 2 g Nucleinsäure mit verdünnter Salzsäure zersetzt, weitere Behandlung der Flüssigkeit, wie oben sub c) angegeben: mit Diazobenzolsulfosäure starke Rothfärbung. Beim Ansäuern mit Salzsäure scheiden sich bräunliche Flocken aus, die aus Ammoniak mit Essigsäure umgefällt werden. Die tiefrothe, ammoniakalische Lösung des Productes giebt mit ammoniakalischer Silberlösung einen schwarzrothen, gallertigen Niederschlag, der in Ammoniaküberschuss so gut wie unlöslich ist.

III. Hefe-Nucleinsäure, nach der Altmann'schen Methode dargestellt.

a) 3 g Nucleinsäure, in Natronlauge gelöst: mit Diazobenzolsulfosäure keine Reaction.

b) 3 g Nucleinsäure + 0.1 g Guanin in Natronlauge: mit Diazobenzolsulfosäure Rothfärbung.

c) 3 g Nucleinsäure, mit Salzsäure zersetzt und wie in den vorhergehenden Versuchen verarbeitet: mit Diazobenzolsulfosäure Rothfärbung. Salzsäure fällt aus dem Gemisch ein gelbrothes Product, das aus Ammoniak mit Essigsäure umgefällt wird. Die geringe, davon zur Verfügung stehende Menge giebt bei der Stickstoff-Bestimmung ein Resultat, das auf Diazobenzolsulfosäure-xanthin stimmt.

0.0300 g Subst.: 6.5 ccm N ( $14\frac{3}{4}^{\circ}$ , 759 mm).

Die bei der Umfällung hinterbleibende Mutterlauge wird stark ammoniakalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Der dunkelrothe, gallertige Silberniederschlag liefert bei der Analyse einen Kohlen-säure-Werth<sup>1)</sup>, der abermals auf Diazobenzolsulfosäure-xanthin passt.

<sup>1)</sup> Der Werth für Wasser ist etwas zu hoch, was vielleicht darauf beruht, dass die gelatinösen Silberniederschläge sich bei 100° schwer vollkommen trocknen lassen.

0.1725 g Sbst.: 0.0855 g Ag, 0.1260 g CO<sub>2</sub>, 0.0392 g H<sub>2</sub>O. — Auf Ag-freie Sbst. umgerechnet: 0.0878 g Sbst.: 0.1260 g CO<sub>2</sub>, 0.0464 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>N<sub>6</sub>S. Ber. C 39.28, N 25.07.

Gef. » 39.13, » 25.37 %).

Die Thatsache, dass die Nucleinsäuren mit Diazokörpern nicht reagiren, gestattet — abgesehen von der Annahme etwaiger Hindernisse unbekannter Art — nur zwei Deutungen. Entweder sind die Purinbasen in den Nucleinsäuren nicht ganz fertig vorgebildet<sup>2)</sup>, sondern gewinnen erst im Momente ihrer Abspaltung die typische Structur. Oder aber die Purinbasen sind in der Weise gebunden, dass der Imidwasserstoff bei 7 durch den Rest des Nucleinsäuremoleküls ersetzt ist; das Ausbleiben der Diazokörperreaction hätte dann bei den Nucleinsäuren eine ähnliche Ursache, wie beim Caffeïn und Theobromin. Angesichts der Leichtigkeit, mit der die Purinbasen aus den Nucleinsäuren schon beim blossen Erwärmen mit Wasser austreten, muss von den beiden genannten Möglichkeiten entschieden die zweite als die wahrscheinlichere bezeichnet werden.

Dafür, dass die Purinbasen thatsächlich durch Vermittelung eines Stickstoffatoms an den Rest der Nucleinsäure, und zwar speciell an deren Phosphor gebunden sind, spricht auch noch ein anderer Umstand, auf den schon Osborne und Harris<sup>3)</sup> in dieser Beziehung hingewiesen haben: nämlich der Umstand, dass siedende Natronlauge — im Gegensatze zu kochendem Wasser und zu Säuren — die Purinbasen der Nucleinsäuren nur sehr schwer abzuspalten vermag<sup>4)</sup>. Dies erinnert durchaus an das Verhalten gewisser organischer Phosphorsäureamide gegen hydrolysirende Agentien. So ist nach einer Angabe von Stokes, die Osborne und Harris citiren, »in der Amidophenylphosphorsäure der Amidstickstoff gegen Säuren sehr unbeständig, gegen Alkalien sehr resistent.« Ich möchte hinzufügen,

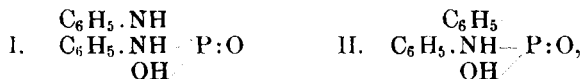
<sup>1)</sup> Die an dieser Stelle mitgetheilten Analysen hat Hr. E. Singewald freundlichst für mich ausgeführt.

<sup>2)</sup> Man könnte sich z. B. vorstellen, dass der Imidazolring keine Amidinbindung aufweist, oder vielleicht überhaupt noch nicht geschlossen ist.

<sup>3)</sup> Zeitschrift für physiolog. Chem. 36, 85.

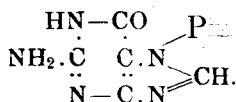
<sup>4)</sup> Wie unempfindlich die Nucleinsäuren gegen Alkali sind, geht u. a. daraus hervor, dass man bei der Nucleinsäure-Darstellung nach Neumann auf die Ausgangsmaterialien ohne Schaden eine siedende Lösung von 1.65 pCt. Natronlauge + 10 pCt. Natriumacetat eine halbe Stunde lang einwirken lässt; dehnt man die Kochdauer auf zwei Stunden aus, so erhält man allerdings ein etwas verändertes (depolymerisirtes?) Product, von einer Abspaltung der Purinbasen ist aber auch dann noch nichts zu bemerken.

dass nach den Befunden von Michaelis und seinen Schülern<sup>1)</sup> auch die Dianilidophosphorsäure (I) und die Anilidophenylphosphinsäure (II)



beim Kochen mit Alkali unverändert bleiben, während sie durch siedendes Wasser und leichter noch durch Säuren zu Anilin und Phosphorsäure resp. Phenylphosphinsäure verseift werden.

Höchstwahrscheinlich besteht also — nach Analogie der Phosphorsäureamide — in den Nucleinsäuren eine directe Bindung zwischen Phosphor und Purinbasenstickstoff, und zwar muss es — wegen der Unfähigkeit der Nucleinsäuren, mit Diazokörpern zu reagiren, — das *N*-Atom 7 der Purinbasen sein, das mit dem Phosphor des Nucleinsäuremoleküls verknüpft ist. Es würde sich hiernach z. B. die Bindung des Guanins in den Nucleinsäuren durch folgendes Schema darstellen lassen:



Neapel, Januar 1904. .

**107. F. v. Lepel: Beziehungen zwischen Flammenbogen, Temperatur und Ausbeute an Stickoxyden aus der Luft bei elektrischen Entladungen.**

(Eingegangen am 1. Februar 1904.)

Bei den Versuchen über die Oxydation des Stickstoffes sah ich mich veranlasst, auf Grund der Arbeiten der HHrn. Muthmann und Hofer (diese Berichte **36**, 438 [1903]) den Eigentümlichkeiten des Flammenbogens zwischen zwei verschiedenartigen Elektroden näher zu treten. Der Bogen war 25 mm lang, die Anode ein Kupferdraht von 1 mm Stärke, die Kathode ein Stück Retortenkohle. Bei 11—12 Amp. und 60 Volt des primären Stromes liess sich Folgendes beobachten:

Die Erscheinungen, wie sie die HHrn. Muthmann und Hofer beschrieben, sind leicht wahrzunehmen. Auffallend war in diesem

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. **229**, 339 und **293**, 193.