

Stunde am Wasserbade erhitzt. Die Lösung wurde mit etwas Tierkohle versetzt und heiß filtriert. Beim Abkühlen schied sich das Osazon in reichlicher Menge in charakteristischer Form aus. Es wurde abgesaugt und mehrmals aus heißem, pyridinhaltigem Wasser umgelöst. Die Substanz zeigte dann denselben Schmelzpunkt und dasselbe Drehungsvermögen wie das *d*-Ribose-Derivat. Im Capillarrohr rasch erhitzt, schmolz es gegen 163—164° (korr.).

0.0684 g des Osazons wurden in 5 ccm Pyridin-Alkohol-Gemisch aufgelöst. Im 0.5-dm-Rohr bei Natriumlicht drehte die Lösung 0.32° nach links. Wenn dieser Wert für 0.2 g Substanz in 10 ccm gelöst und im 1-dm-Rohr umgerechnet wird, beträgt er —0.94°. Dieser Wert stimmt ganz gut mit dem beim reinen Ribosazon erhaltenen überein<sup>1)</sup>.

0.1206 g Sbst.: 17.4 ccm N (21°, 762 mm).

$C_{17}H_{20}N_4O_3$ . Ber. N 17.08. Gef. N 17.19.

Da das Xylosazon in den Löslichkeitsverhältnissen sehr dem Ribose-Derivat ähnelt, ist es vollständig ausgeschlossen, daß während der Darstellung oder des Umlösens das Xylosazon, wenn es vorhanden war, entfernt wurde.

#### 487. P. A. Levene und W. A. Jacobs: Über die Hefe-Nucleinsäure. III.

[Aus dem Rockefeller-Institute for Medical Research, New York.]

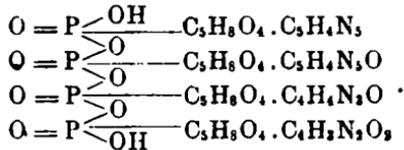
(Eingegangen am 2. August 1910.)

Unsere Auffassung über die Konstitution der Hefe-Nucleinsäure beruht auf folgenden Tatsachen: Bei der Hydrolyse der Substanz mittels Mineralsäuren wurden die folgenden Bestandteile erhalten: Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, *d*-Ribose und Phosphorsäure. Bei der Hydrolyse mit schwach alkalischen Lösungen erhielt man Produkte der intermediären Spaltung, die von Phosphorsäure frei waren und die Eigenschaften der Glykoside besaßen. Auch bei der Hydrolyse mittels ganz verdünnter Mineralsäuren ließen sich unter bestimmten Bedingungen Komplexe partieller Hydrolyse gewinnen, die alle phosphorhaltig waren und entweder nur eine Base im Molekül enthielten oder ganz basenfrei waren. Die Zahlen der Elementaranalyse stimmten am besten auf die Formel:  $C_{28}H_{49}O_{20}N_{13}P_4$ . Diese Tatsachen und die Betrachtungen<sup>2)</sup>, die an einer anderen Stelle dargelegt

<sup>1)</sup> Vergl. Fußnote 3 auf S. 3149.

<sup>2)</sup> Biochem. Ztschr. 17, 120 [1909]; diese Berichte 42, 2703, 2474 [1909].

waren, führten zu der vorläufigen Auffassung über die Zusammensetzung des Moleküls der Hefe-Nucleinsäure in Form der folgenden schematischen Darstellung<sup>1)</sup>:



Der Teil dieses Formelbildes, welcher die Bindung der Purinbasen im Molekül veranschaulicht, ließ sich durch die Auffindung zweier Pentoside des Adenosins und des Guanosins bestätigen.

Nun aber sind Tatsachen bekannt, die mit der Annahme der Identität der Bindungsform der Pyrimidinbasen und der der Purine nicht ganz im Einklang stehen. Bei der Destillation der Nucleinsäure mit Salzsäure vom spez. Gewicht 1.06 ließ sich eine Menge Furfurolphloroglucid gewinnen, die einem Gehalt von etwa 25 % an *d*-Ribose entsprach. Diese Zahl deutet auf Anwesenheit von nur zwei Molekülen der Pentose in dem Nucleinsäure-Molekül. Sollten auch die Pyrimidine in pentoseartiger Form gebunden sein, so würden vier Moleküle Pentose vorhanden sein müssen, und es müßten dann 48 % Pentose im Molekül der Nucleinsäure anwesend sein. Ferner lassen sich die Purine der Nucleinsäure aus dem Molekül schon durch ganz kurzes Erhitzen mittels verdünnter Mineralsäuren in Freiheit setzen, während zur Darstellung der Pyrimidinbasen ein tieferes Eingreifen nötig ist. Außerdem sind noch von anderen Seiten Bedenken über die Anwesenheit von Pyrimidinbasen im Molekül der Nucleinsäure ausgesprochen worden. So neigen sich Burian<sup>2)</sup> und Schmiedeberg<sup>3)</sup> der Annahme zu, daß das Cytosin sekundär aus den Purinbasen entsteht, und Steudel<sup>4)</sup> ist der Ansicht, daß auch in der Hefe-Nucleinsäure das Uracil primär nicht existiert.

Es ist klar, daß die folgenden Fragen weiterer Aufklärung bedürftig waren: 1. Ist das Cytosin, welches bei der Hydrolyse der Nucleinsäure vorkommt, durch die Zersetzung der Purinbasen entstanden? 2. Wenn nicht, in welcher Form ist es dann im Molekül der

<sup>1)</sup> Mit der Lösung der Frage über die genaue Natur der Bindung der einzelnen Nucleotide im Molekül der Nucleinsäure sind wir jetzt beschäftigt.

<sup>2)</sup> Ergebnisse der Physiol., 3. Jahrg., I. Abt. 98 [1904]; Ztschr. f. physiol. Chem. 51, 438 [1907].

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 57, 309 [1907].

<sup>4)</sup> Abderhaldens Arbeitsmethoden 2, 595 [1910].

Hefe-Nucleinsäure gebunden? 3. Ist auch das Uracil im Molekül der Hefe-Nucleinsäure primär vorhanden?

In vorliegender Untersuchung wird bewiesen, daß das Cytosin nicht aus Purinbasen bei der Spaltung der Nucleinsäure entsteht, und weiter, daß das Cytosin nicht in Form eines Pentosids im Molekül der Nucleinsäure gebunden ist. Es ist uns nämlich gelungen, eine Substanz zu gewinnen, deren Zusammensetzung am besten mit der theoretischen Formel  $C_9H_{13}O_2N_3$  übereinstimmt. Die freie Substanz ist zwar nicht in krystallinischer Form erhalten worden, wohl aber ihre Derivate, wie das Sulfat, Chlorhydrat, Pikrat und das Benzoylderivat. Weiter ließ sich die Substanz in das entsprechende Uracilderivat  $C_9H_{13}O_2N_3$  überführen, welches sich krystallisieren ließ. Bequemlichkeits halber schlagen wir für die zwei Substanzen die Namen Cytidin und Uridin vor.

Nach der elementaren Zusammensetzung ist die neue Substanz den Nucleosiden ganz analog, sie zeigt aber sehr beträchtliche Unterschiede in den chemischen und physikalischen Eigenschaften. Wie bekannt, läßt sich die Base in den Nucleosiden mit großer Leichtigkeit bei kurz dauerndem Erhitzen mit sehr verdünnter Mineralsäure abspalten; bei dem Cytidin aber wird das Cytosin nur durch Anwendung von größerer Konzentration der Säure oder beim Erhitzen unter höherem Druck abgespalten. Bei der Spaltung der Nucleoside entsteht außer der Base eine Pentose, *d*-Ribose, während bei der Spaltung des Cytidins keine Pentose, überhaupt kein Zucker, auch keine Lävulinsäure erhalten werden konnte.

Jedoch gibt die Substanz eine ganz schwache, aber nie fehlende Orcinprobe. Die Intensität der Probe kann bei Anwendung einer konzentrierten Lösung des Cytidins mit der Intensität einer Pentoselösung verglichen werden, die nur Spuren des Zuckers enthält.

Alle Nucleoside besitzen eine ganz beträchtliche Linksdrehung, während das Cytidin nur eine geringe Rechtsdrehung zeigt. Aus dem Inosin erhielten Haiser und Wenzel ein krystallinisches Triacetylderivat. Wäre das Cytidin auch ein Pentosid, so sollte man daraus ein Tetraacetylderivat darstellen können. Es war aber unmöglich, eine krystallinische Acetylverbindung daraus zu gewinnen. Das Benzoylderivat krystallisierte leicht aus Alkohol, es enthielt drei Benzoylgruppen, von denen die eine in Bindung mit der Aminogruppe des Cytosins stand. In das Tribenzoylderivat konnten weitere Acetylgruppen nicht eingeführt werden.

Das Cytidin wie auch das Uridin reagieren neutral, auch nach einstündigem Erhitzen mit einer  $\frac{1}{10}$ -Lauge. Sie enthalten also keine Säurelactone im Molekül.

Die genaue Konstitution der Substanzen ist noch nicht aufgeklärt. Da aber die Gewinnung des Cytidins mit großer Mühe verbunden ist, wird man mit der Lösung der Frage einige Zeit warten müssen. Es muß aber erwähnt werden, daß das Verhalten der Pyrimidinbasen im Cytidin und Uridin ganz ähnlich dem Verhalten der Basen in den Nucleinsäuren ist; und weiter, daß die Auffindung dieser Substanz das Resultat der Destillation der Nucleinsäure mit Salzsäure leicht erklärlich macht. Ist nämlich die Menge der Pentose im Nucleinsäure-Molekül nur den Purinbasen äquivalent, so läßt sich ihr Gehalt im Molekül zu 25 % berechnen. Diese Zahl ließ sich in der Tat bei der Furfurol-Destillation mittels Salzsäure erhalten.

Die Auffindung des Cytidins gibt auch Auskunft über die dritte der im Beginn dieser Mitteilung aufgestellten Fragen, nämlich über die primäre Natur des Uracils im Molekül der Hefe-Nucleinsäure. Darüber kann man aus dem Verhältnis des Stickstoffs in Form von primären Aminogruppen zu dem Totalstickstoff im Molekül der Nucleinsäure einen Schluß ziehen. van Slyke gelang es nämlich im hiesigen Laboratorium, das Verfahren der Aminstickstoff-Bestimmung so zu verbessern, daß die Bestimmung mit absoluter Genauigkeit sich ausführen läßt. Nun berechnet sich das Verhältnis des Aminstickstoffs zum Totalstickstoff zu 3 : 15 im Falle, daß die Nucleinsäure die vier Basen enthält, und 3 : 13, wenn nur die drei Basen Adenin, Guanin und Cytosin vorhanden wären. In der Tat gelang es, das Verhältnis zu 3 : 15 zu bestimmen. Außerdem gelang es, bei 5-stündiger Hydrolyse der Mutterlauge von Cytidin mit 5-proz. Schwefelsäure Uracil zu gewinnen. Die Isolierung des Uridins aus den Produkten der Hydrolyse ist wegen der größeren Löslichkeit der Substanz und der Schwierigkeit, irgend welche charakteristische Verbindung zu gewinnen, noch nicht gelungen. Wir hoffen aber, alle Schwierigkeiten überwinden zu können.

Ehe zur Mitteilung des experimentellen Teiles übergegangen wird, sollen noch einige Tatsachen über die Nucleoside erwähnt werden. Es gelang nämlich, das Adenosin in Inosin überzuführen und das Guanosin in Xanthosin. Damit ist ein weiterer Beweis dafür geliefert, daß das Nucleosid der Inosinsäure und der Hefe-Nucleinsäure eine identische Bindungsform besitzen, und auch ein weiterer Beweis dafür, daß die Pentose in der Inosinsäure und in der Hefe-Nucleinsäure identisch sind.

#### Experimenteller Teil.

Methode zur Gewinnung der Nucleoside und des Cytidins.

Das ältere, mit Erfolg angewandte Verfahren zur Gewinnung der Nucleoside erwies sich als ungenügend bei der Isolierung der Pyri-

midinkomplexe. Zu ihrer Gewinnung müssen die folgenden Bedingungen eingehalten werden. Erstens muß die Phosphorsäure-Abspaltung möglichst vollständig sein, zweitens muß man die Einführung von anorganischen Reagenzien in das Reaktionsgemisch möglichst vermeiden. Nach längeren Versuchen erwies sich das folgende Verfahren als das brauchbarste.

100 g Nucleinsäure werden in einer Lösung von 80.0 ccm wäßrigem Ammoniak in 420.0 ccm Wasser aufgelöst. Die Lösung wird dann im Autoklaven bei 175—180°  $3\frac{1}{2}$  Stunden erhitzt. Die Dauer und die Temperatur der Erhitzung müssen ganz genau eingehalten werden, damit Schwierigkeiten bei der Darstellung der Nucleoside und des Cytidins vermieden werden. Beim Abkühlen erstarrt das Reaktionsgemisch zu einer scheinbar homogenen Gallerte. Nach dem Umrühren läßt sich aber das Roh-Guanosin ganz leicht abfiltrieren. Das Filtrat wird dann von Ammoniak, Phosphorsäure und phosphorsäurehaltigen Substanzen möglichst befreit. Um das zu erreichen, verdünnt man das Filtrat mit heißem Wasser und versetzt so lange mit heißer konzentrierter Barytlösung, als noch ein Niederschlag von phosphorsaurem Barium entsteht. Das Filtrat von diesem wird im Vakuum bis zur Trockne eingedampft, in wenig heißem Wasser gelöst und vom Baryt möglichst quantitativ befreit. Sollte die Lösung noch alkalisch reagieren, so wird sie mit Schwefelsäure neutralisiert oder ganz schwach sauer gemacht. Sie wird dann mit Pikrinsäure so lange versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht; dieser besteht aus rohem Adenosin-Pikrat. Da dabei eine ganz erhebliche Menge von Pikrinsäurelösung angewandt werden muß, so wird die ursprüngliche Lösung beträchtlich verdünnt. Das Filtrat von Adenosinpikrat enthält noch einen Teil dieser Substanz in Lösung. Will man Verluste an Adenosin möglichst vermeiden, so engt man das Filtrat bei vermindertem Druck bis auf etwa 400—500 ccm ein und läßt das Adenosinpikrat sich abscheiden. Dabei kann aber ein Teil des Cytidin-Pikrats mitgefällt werden. Kommt es nur darauf an, möglichst gute Ausbeute an Cytidin zu erhalten, so tut man besser daran, das Filtrat vom ersten Pikrinsäure-Niederschlag sogleich auf Cytidin zu verarbeiten. Das Verfahren zum Trennen der Pyrimidinkomplexe von den Nucleosiden gründet sich auf die leichtere Zersetzlichkeit der letzteren mittels verdünnter Mineralsäuren. Das Filtrat von Adenosinpikrat wird mit 2-proz. Schwefelsäure  $1\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler erhitzt und das abgekühlte Reaktionsprodukt von der Pikrinsäure befreit. Die frei gemachten Purinbasen werden mit Quecksilbersulfatlösung entfernt. Das Filtrat wird von Quecksilber und von Schwefelsäure befreit, bei vermindertem Druck bis zu einem ganz kleinen Volumen eingedampft und mit Pikrinsäure versetzt, bis die Lösung opaleszierend geworden ist. Diese Lösung wird dann wieder zu einem ganz kleinen Volumen bei vermindertem Druck eingedampft. Es scheidet sich dabei das Cytidin-pikrat aus. Zur Reinigung wird es in wenig heißem Alkohol gelöst und umkrystallisiert. Schmp. 185—187° (unkorr.).

Im Toluol-Vakuumexsiccator getrocknet, hatte die Substanz die folgende Zusammensetzung:

0.1284 g Sbst.: 0.1796 g CO<sub>2</sub>, 0.0538 g H<sub>2</sub>O. — 0.1206 g Sbst.: 19.2 ccm N (24°, 764 mm).

C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> · C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(OH). Ber. C 38.14, H 3.40, N 17.79.  
Gef. » 38.15, » 3.81, » 18.81.

Alle Versuche, die freie Substanz in kristallinischer Form zu erhalten, waren vergeblich. Es wurde dann versucht, das Pikrat in das Sulfat überzuführen, welches in schön kristallinischer Form erhalten wurde, und aus dem Sulfat die freie Substanz zu erhalten, aber auch das gelang nicht. Zur Darstellung des Sulfats wurde das Pikrat von Pikrinsäure mittels Schwefelsäure und Äther befreit, dann die Schwefelsäure mit Barytwasser entfornt, bei vermindertem Druck bis zu ganz kleinem Volumen eingedampft und wieder mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure versetzt. Es scheidet sich dabei das Sulfat beim Stehen der Lösung in Form von langen, prismatischen Nadeln aus. Um die Ausscheidung des Sulfats zu beschleunigen, gibt man zu der Sulfatlösung Alkohol bis zur beginnenden Opalescenz. Das Sulfat kristallisierte ohne Krystallwasser und besaß den Schmp. 233°. Mit Orcin und Salzsäure erhitzt, gibt die Substanz eine ganz schwache, aber nie fehlende Violettfärbung. Die Zusammensetzung der Substanz war:

0.1196 g Sbst.: 0.1666 g CO<sub>2</sub>, 0.0526 g H<sub>2</sub>O. — 0.1214 g Sbst.: 15.2 ccm N (26°, 767 mm). — 0.1012 g Sbst.: 0.416 g BaSO<sub>4</sub>.

(C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ber. C 37.00, H 4.80, N 14.24, S 5.48.  
Gef. » 37.23, » 4.90, » 14.35, » 5.65.

Das optische Drehungsvermögen der Substanz war das folgende: 0.4444 g der Substanz wurden in 4.0 ccm 1-proz. Schwefelsäure gelöst. Gesamtgewicht 4.4434 g, im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht drehte die Lösung +3.43°. Nach einer halben Stunde war die Drehung bei +3.30° konstant. Mithin ohne Berücksichtigung des spez. Gewichts

$$[\alpha]_D^{30} = +29.7^\circ.$$

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens der freien Base wurden 1.5119 g der Substanz in berechneter Menge von <sup>2</sup>/<sub>10</sub>-Barythydratlösung aufgelöst und filtriert. Im 0.865-dm-Rohr bei Natriumlicht drehte die Lösung 0.58°. Mithin ohne Rücksicht auf das spez. Gewicht

$$[\alpha]_D^{20} = +19.14^\circ.$$

Das Chlorhydrat wurde aus dem Pikrat auf analoge Weise wie das Sulfat dargestellt. Schmp. 218° (unkorr.) Es gab die folgenden analytischen Werte.

0.1175 g Sbst. (in Wasser gelöst und nach Volhard titriert): 0.01562 g Cl.

(C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>)HCl. Ber. Cl. 12.88. Gef. Cl 12.06.

Um nun nähere Auskunft über die Eigenschaften der Stickstoff- und Sauerstoffatome im Molekül zu erhalten, haben wir die Einwirkung von salpetriger Säure, von Essigsäureanhydrid und von verdünnten Alkalien untersucht.

Mit salpetriger Säure wurde das Experiment in dem von Dr. D. D. van Slyke in diesem Laboratorium konstruierten Apparate (vgl. S. 3170) ausgeführt. In einem Vorversuch haben wir uns davon überzeugt, daß nach dem Verfahren von van Slyke auch Aminopurine und Aminopyrimidine quantitativ den Stickstoff der primären Aminogruppe abspalten.

Zum Versuche wurden 0.1720 g Substanz genommen. Die Einwirkung der salpetrigen Säure wurde 2 Stunden lang fortgesetzt. Nach dieser Zeit war eine weitere Entwicklung von Stickstoff nicht mehr bemerkbar. Es entwickelten sich 14.2 ccm N bei 24° und 760 mm, von welchen die Hälfte aus dem Cytidin stammte.

$C_5H_9O_4 \cdot C_4H_4ON_3$  Amino-N. Ber. 0.00792. Gef. 0.00783.

Daraus läßt sich schließen, daß im Molekül des Cytidins nur eine primäre Aminogruppe vorhanden ist.

Der Versuch, ein krystallinisches Acetylderivat zu erhalten, welches aus Inosin so leicht darstellbar ist, mißlang. Zwecks Benzoylierung wurde das Sulfat nach Schotten-Baumann mit Benzoylchlorid behandelt. Das auf diese Weise erhaltene Derivat ist unlöslich in Wasser, mäßig leicht löslich in heißem und wenig löslich in kaltem Alkohol. Es kann daher auf diese Weise umkrystallisiert werden. Da die Substanz in Benzol leicht löslich ist, kann man sie auch aus der Benzollösung mit Alkohol fällen. Unter beiden Bedingungen scheidet sich die Substanz in langen primatischen Nadeln vom Schmp. 205° (unkorr.) aus. Mit salpetriger Säure nach dem Verfahren von van Slyke behandelt, entwickelte die Substanz keinen Stickstoff.

Eine Stickstoffbestimmung gab die folgenden Zahlen:

0.1180 g Sbst.: 7.6 ccm N (über 50-proz. Kalilauge) (22°, 754 mm).

$C_9H_{10}O_5N_3(C_6H_5CO)_2$ . Ber. N 7.57. Gef. 7.47.

Zur Bestimmung der Benzoylzahl wurden 0.1120 g Substanz in 25 ccm Natriummethylat eine Stunde am Rückflußkühler erhitzt. 25 ccm Methylat entsprachen 111.5 ccm  $\frac{1}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach dem Erhitzen wurden zum Neutralisieren der Lösung 105.6 ccm  $\frac{1}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht, die Benzoesäure neutralisierte also 5.9 ccm  $\frac{1}{10}$ -NaOH. Die Theorie für ein Tribenzoylderivat verlangt 6.06 ccm.

Es wurde nun ein Versuch gemacht, das Benzoylderivat mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat zu acetylieren. Die Substanz löst sich leicht in heißem Anhydrid, scheidet sich aber beim Abdampfen der Lösung fast quantitativ aus. Der Acetylierungsversuch wurde mit dem Niederschlag wiederholt. Die so erhaltene Substanz wurde aus Benzol und Alkohol umkrystallisiert.

Die Stickstoffbestimmung gab die folgenden Zahlen:

0.1010 g Sbst.: 6.6 ccm N (über 50-proz. KOH) (25°, 763 mm).

$C_9H_{10}O_5N_3(C_6H_5CO)_3$ . Ber. N 7.57. Gef. N 7.53.

Für die Bestimmung der Säurezahl wurden 0.1540 g Sbst. mit Natriummethylat erhitzt. Die abgepaltenen Säuren neutralisierten 8.68 ccm  $\frac{1}{10}$ -NaOH.

Die Theorie für das Tribenzoylderivat verlangt 8.35 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH. Die Substanz ist also durch Behandeln mit Acetanhydrid unverändert geblieben.

Um das Verhalten des Cytidins gegen verdünnte Alkalien zu prüfen, wurden 0.1530 g der Substanz in 20.0 ccm  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge aufgelöst und etwa 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Die Lösung wurde dann mit  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure zurücktitriert. Gebraucht wurden 20 ccm zum Neutralisieren. Die Substanz enthielt also keine lactonartige Bindung.

#### Hydrolyse des Cytidins.

5.0 g Sulfat wurden in 150.0 ccm 10-proz. Schwefelsäure gelöst und im Einschmelzrohr 4 Stunden in einem Ölbad von 125° erhitzt. Die resultierende Flüssigkeit enthielt nur Spuren von Melanin und war ziemlich hell geblieben. Sie reduzierte Fehlingsche Lösung auch nach dem Erhitzen nicht. Die Flüssigkeit wurde mit gereinigtem Äther ausgezogen. Der ätherische Auszug wurde auf Lävulinsäure und andere Fettsäuren untersucht. Es ließ sich zwar aus dem Rückstande dieses Auszuges eine kleine Quantität eines Silbersalzes gewinnen, aber beim Umkrystallisieren blieben nur Spuren davon übrig.

Die mit Äther ausgezogene Flüssigkeit wurde mit Barytlösung von Schwefelsäure quantitativ befreit, bei vermindertem Druck einge-dampft und nach dem Verfahren des einen von uns zur Gewinnung des Cytosins<sup>1)</sup> mit Pikrinsäure behandelt. Es bildete sich ein Pikrat vom Aussehen des Cytosin-pikrats, welches nicht umkrystallisiert einen Gehalt von 24.47% Stickstoff aufwies, während Cytosin-pikrat 24.71% Stickstoff verlangt. Die Ausbeute an diesem Pikrat betrug 1.5 g. Beim weiteren Eindampfen der Mutterlauge schied sich wiederum ein Niederschlag vom Aussehen des Cytosin-pikrates aus. Die Ausbeute betrug diesmal 2.5 g. Der erste und der letzte Niederschlag wurden vereinigt, umkrystallisiert und zur Analyse gebracht.

0.1162 g Sbst. (im Toluolbad bei vermindertem Druck über  $P_2O_5$  getrocknet): 0.1496 g  $CO_2$ , 0.0288 g  $H_2O$ .

$C_8H_5ON_3 \cdot C_6H_3(NO_2)_3(OH)$ . Ber. C 35.29, H 2.35.

Gef. » 35.20, » 2.75.

Schmp. 275° (korr.). Es lag also Cytosin-pikrat vor. Es war aber auch klar, daß die Hydrolyse nicht einfach unter Bildung von Cytosin und dem basenfreien Rest verlief, sondern daß dabei noch tiefer eingreifende Reaktionen stattfanden. Um einen Einblick in den quantitativen Verlauf der Reaktion zu gewinnen, haben wir einen zweiten Versuch

<sup>1)</sup> Levene, Ztschr. f. physiol. Chem. 37, 402 [1902].

angestellt, bei welchem die Ammoniakbildung und das optische Drehungsvermögen der Lösung nach der Hydrolyse bestimmt wurden.

1.5043 g des Sulfates wurden in 50 ccm 5-proz. Schwefelsäure aufgelöst und in einem zugeschmolzenen Rohr 4 Stunden im Ölbad von 125° erhitzt. Die Flüssigkeit wurde mit Tierkohle entfärbt und auf ein Volumen von 100 ccm gebracht; Drehungsvermögen im 1-dm-Rohr 0.18°. Dadurch wurde erwiesen, daß der basenfreie Rest bei der Hydrolyse nicht vollkommen zerstört war. Das Cytosin erlitt aber auch eine teilweise Zersetzung, da 15.8% des Gesamtstickstoffs der Flüssigkeit in Form von Ammoniak vorhanden waren. Die Ammoniakbestimmung wurde nach dem Verfahren von Folin-Schäffer ausgeführt (Luft-Durchblasen nach Zugabe eines Überschusses von Kaliumcarbonat).

Dieser Befund steht in gewissem Widerspruch mit den Resultaten, die Osborne<sup>1)</sup> und Heyl bei der Hydrolyse der Triticonucleinsäure erhielten. Diese Autoren konnten dabei keine Ammoniakbildung beobachten und haben wichtige Schlüsse über die Konstitution der Nucleinsäure daraus gezogen. Das Fehlen des Ammoniaks bei der Hydrolyse der Nucleinsäure könnte vielleicht durch eine Kondensation des Ammoniaks mit der Pentose oder deren Abbauprodukten unter Melaninbildung erklärt werden. Die Ansichten von Osborne und Heyl über die Zusammensetzung der Nucleinsäure ständen dann mit den unserigen ganz im Einklang. Es wurde nun daran gedacht, daß die sekundären Reaktionen vielleicht vermieden werden könnten, wenn die Hydrolyse ohne Zuhilfenahme von Säuren ausgeführt würde. Zu diesem Zweck wurden 1.4720 g Sulfat mit der berechneten Menge  $\frac{1}{10}$ -Barythydratlösung von Schwefelsäure befreit, auf ein Volumen von 10 ccm eingengt und im zugeschmolzenen Rohre 10 Stunden im Ölbad von 160° erhitzt. Die resultierende Flüssigkeit hatte dasselbe Drehungsvermögen wie bei obigem Versuche. Sie enthielt hier 24.35% des Gesamtstickstoffs in Form von Ammoniak, und aus ihr ließ sich leicht das Cytosin pikrat darstellen.

Weitere Untersuchungen über die genaue Konstitution des Cytidins müssen verschoben werden, bis größere Quantitäten der Substanz zur Verfügung stehen.

#### Uridin.

Da das Cytidin und dessen Derivate in Wasser spielend leicht löslich sind, während das Uracil viel schwerer löslich ist als das Cytosin, wurde daran gedacht, die Arbeit über die Konstitution des Cytidins dadurch zu erleichtern, daß man die Substanz zuerst in den Uracilkomplex des Uridins überführte. Es wurde auch für wünschenswert gehalten, die Eigenschaften des synthetischen Uridins kennen zu

<sup>1)</sup> Osborne und Heyl, Journ. of Physiol. 21, 157 [1908].

lernen, um die eventuelle Isolierung aus den Spaltungsprodukten der Nucleinsäure zu erleichtern. Da wir uns davon überzeugt hatten, daß bei der Aminstickstoff-Bestimmung nach dem Verfahren von van Slyke die Abspaltung der Amingruppe quantitativ verläuft, wurde versucht, auch die Überführung des Cytidins in Uridin unter Beobachtung derselben Bedingungen auszuführen.

Zu diesem Zwecke wurden 20.0 g des Cytidinpicrates mittels Schwefelsäure und Äther von Pikrinsäure befreit, die Lösung von Schwefelsäure quantitativ befreit, bei vermindertem Druck auf ein Volumen von 70 ccm gebracht, in die Lösung 30 g Kaliumnitrit eingetragen und zu der Lösung 25 ccm Eisessig zugegeben. Es beginnt sofort eine lebhafte Entwicklung von Stickstoff. Nach 5 Stunden war die Reaktion vollständig beendet. Die Lösung wurde wieder etwas verdünnt, mit 50-proz. Kalilauge zuerst neutralisiert und dann mit derselben Lösung bis zu einem Gehalt von 10% der Lauge gebracht. Diese Lösung wurde hierauf mit Benzoylchlorid benzoiliert. Das erhaltene Benzoylderivat erwies sich als unlöslich in Wasser, als leicht löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln und ließ sich nicht in gut krystallinischer Form erhalten; es wurde deshalb verseift mit der Absicht, die freie Substanz zu erhalten. Zu diesem Zwecke wurde das Benzoylderivat in 140.0 ccm Alkohol gelöst, zu der alkoholischen Lösung eine Lösung von 36.0 g Barythydrat in 800 ccm Wasser zugegeben und das Gemisch 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde dann mit Schwefelsäure vom Baryt und vom größten Teile der Benzoesäure befreit; die noch in Lösung gebliebene Benzoesäure wurde mit Äther ausgezogen. Obwohl das ursprüngliche Benzoylderivat mehrere Male mit Wasser gewaschen war, enthielt es doch noch Spuren von Natriumchlorid, zu dessen Entfernung das Reaktionsprodukt nach dem Ausziehen mit Äther mit Silbersulfat behandelt wurde. Das Filtrat vom Silberchlorid wird vom überschüssigen Silber und dann von der Schwefelsäure mittels Barytwasser befreit. Auch nach allen diesen Behandlungen enthielt die Lösung außer dem Uridin noch kleine Mengen von Verunreinigungen; um diese zu entfernen, fällten wir das Uridin mittels Bleizuckerlösung und Barythydratlösung. Der Niederschlag wurde dann vom Blei mit einem Überschuß von Schwefelsäure und von dieser quantitativ mit Barytlösung befreit. Die auf diese Weise erhaltene Lösung wurde bei vermindertem Druck bis zu einem ganz kleinen Volumen eingedampft, in einer Schale in den Vakuum-Exsiccator gebracht und bis zur Konsistenz eines Sirups eingengt. Der sirupartige Rückstand wird dann mit absolutem Alkohol gut umgerührt, bis die Substanz auskrystallisiert. Aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, scheidet sich das Uridin in langen primatischen Nadeln aus. Schmp. 165° (unkorr.).

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum-Exsiccator über Phosphor-pentoxyd bei der Temperatur des siedenden Toluols getrocknet. Die Analyse ergab die folgenden Zahlen:

0.1308 g Sbst.: 0.2128 g CO<sub>2</sub>, 0.0632 g H<sub>2</sub>O. — 0.1248 g Sbst.: 12.8 ccm N (über 50-proz. KOH) (23°, 755 mm).

$C_9H_{12}O_6N_2$ . Ber. C 44.16, H 4.99, N 11.44.  
Gef. » 44.36, » 5.36, » 11.79.

Die Lösung der Substanz in Wasser reagierte neutral und blieb so auch nach dem Erhitzen mit verdünnter Natronlauge. Sie ist optisch-aktiv und zeigt merkbare Multirotation. Die spezifische Drehung nimmt mit zunehmender Konzentration der Lösung ab.

0.3978 g der Substanz, in 4.0 ccm Wasser gelöst, gaben ein Gesamtgewicht von 4.3798 g. Das Drehungsvermögen war im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht  $+0.50^\circ$ . Mithin ohne Berücksichtigung des spez. Gewichtes:

$$[\alpha]_D^{30} = +5.15^\circ.$$

Ein krystallinisches Acetylderivat herzustellen, gelang auch hier nicht ganz gut. Zwar schieden sich einige lange prismatische Nadeln aus, aber nur nach sehr langem Stehen und in viel eingetrockneter Mutterlauge eingebettet. Es wäre möglich, bei Anwendung von viel mehr Substanz das Acetylderivat krystallinisch zu erhalten, aber gegenwärtig muß darauf verzichtet werden. Wir begnügten uns vorläufig mit der Bestimmung der Acetylzahl. Zu diesem Zwecke wurden 0.2120 g des Uridins mit Acetanhydrid und geschmolzenem Natriumacetat acetyliert. Das Reaktionsprodukt wurde bei vermindertem Druck bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, in absolutem Alkohol aufgelöst, die Lösung mit  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge alkalisch auf Phenolphthalein gemacht, bald darauf mit  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure neutralisiert, wieder mit 50 ccm  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge verdünnt und eine Stunde am Rückflußkühler zur Verseifung erhitzt. Zur Neutralisation gebraucht 28.5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure; durch die Essigsäure wurden also 21.5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge neutralisiert. Die Acetylzahl für ein Diacetylderivat verlangt 17.37 ccm und für ein Triacetylderivat 26.06. Es wurde versucht, die Verseifung nach weiterer Zugabe von 25 ccm  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge für zwei Stunden zu wiederholen; hierbei wurde aber keine Essigsäure mehr abgespalten. Man ist also berechtigt anzunehmen, daß nur zwei Acetylgruppen in das Molekül des Uridins einführbar sind.

#### Aminstickstoff-Bestimmung in der Nucleinsäure.

Ehe zur Isolierung des Uracilkomplexes aus den Spaltungsprodukten der Nucleinsäure übergegangen wurde, mußte man die Überzeugung haben, daß die Substanz wirklich im Molekül vorkommt. Da Uracil keine Aminogruppe enthält und die anderen drei Basen je eine Aminogruppe im Molekül enthalten, so könnte man aus dem Verhältnis von Aminostickstoff zum Gesamtstickstoff über die An- oder Abwesenheit von Uracil urteilen. Bei der Anwesenheit des Uracils würde das Verhältnis 3 : 15, bei Abwesenheit 3 : 13 sein.

Zum Versuche wurden etwa 3.0 g der durch Eisessig gereinigten Nucleinsäure in etwa 26 ccm Wasser, welches eine genügende Menge Alkali enthielt, aufgelöst. 10.0 ccm dieser Lösung wurden im Apparate von van Slyke für fünf Stunden der Einwirkung der salpetrigen Säure überlassen. Die Reaktion war

dann vollkommen beendet. Es entwickelten sich 66.2 ccm Stickstoff. 3.0 ccm derselben Lösung wurden zur Gesamtstickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl benutzt. Zum Neutralisieren verbraucht 35.85 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure. Daraus läßt sich der Gesamtstickstoff der 10 ccm zu 0.1673 g berechnen. Für das Verhältnis 3:15 war die Entwicklung von 67.0 ccm Stickstoff, und für das Verhältnis 3:13 77.3 ccm Stickstoff zu erwarten. Die gefundene Zahl berechtigt also zur Annahme, daß Uracil im Molekül der Nucleinsäure präformiert vorhanden ist.

Von dem Auftreten des Uridins bei der partiellen Hydrolyse der Nucleinsäure haben wir uns noch dadurch überzeugt, daß wir aus der Mutterlauge des Cytidinpikrates nach vierstündiger Hydrolyse mittels 5-proz. Schwefelsäure das Uracil isolierten. Die Mutterlauge von Cytidinpikrat wurde von Pikrinsäure befreit und mit Mercuriacetatlösung gefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff behandelt, zum Filtrate vom Mercurisulfid Schwefelsäure bis zu einem Gehalte von 5% zugegeben und dann fünf Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Darauf wurde das Reaktionsprodukt von Schwefelsäure befreit und das Uracil mit Silbernitrat und Barytlösung gefällt. Aus dem Silberniederschlag ließ sich das Uracil auf übliche Weise darstellen. Die freie Substanz, im Toluolbad bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet, gab bei der Analyse die folgenden Zahlen:

0.1426 g Sbst.: 30.0 ccm N über 50-proz. KOH (21.6°, 768 mm).

$C_4H_4O_2N_2$ . Ber. N 25.05. Gef. N 25.12.

#### Verwandlung des Adenosins in Inosin.

5 g Adenosinpicrat wurden in einer Lösung von 10 g  $NaNO_2$  in 30 ccm Wasser heiß gelöst. Beim Abkühlen schied sich pikrinsaures Natrium aus. Ohne zu filtrieren, wurde die Lösung mit 10 ccm Eisessig versetzt und umgerührt. Es trat sofort eine lebhaft Stickstoff-Entwicklung ein; in etwa 5 Minuten war die Reaktion beendet. Nach einigen Stunden wurde die Mischung in Eis gestellt und mit verdünnter Schwefelsäure solange versetzt, bis sie auf Kongopapier schwach sauer reagierte. Die Lösung wurde dann mit mehreren Volumen absoluten Alkohols versetzt und nach einigem Stehen in einer Gefrier Mischung abgesaugt. Das Filtrat wurde mit einigen Tropfen Ammoniak neutralisiert und zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wurde nochmals mit wenig Alkohol versetzt und wieder eingedampft. Er wurde dann mit Essigsäureanhydrid übergossen und einige Minuten gekocht. Der Überschuß von Anhydrid wurde abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform ausgekocht. Nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank wurde von anorganischen Salzen abfiltriert und das Chloroform abgedunstet. Alle diese Operationen haben wir bei möglichst neutraler Reaktion vorgenommen, um Hydro-

lyse des Ribosids zu vermeiden. Auf diese Weise wurde das entstandene Inosin in ein Acetylderivat übergeführt. Ohne dies zu isolieren, kochte man den Rückstand mit einem Überschuß einer verdünnten Barytlösung eine halbe Stunde. Das Barium wurde mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gefällt; dann haben wir, um kleine Mengen aus dem Chloroform entstandener Salzsäure zu entfernen, mit wenig Silbersulfat versetzt. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, der Überschuß des letzteren vertrieben und das Filtrat mit reinem Bleiesig genau gefällt. Das Filtrat wurde mittels Blei und Ammoniak gefällt.

Auf diese Weise wurde das Inosin von allen Verunreinigungen befreit. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff gründlich zerlegt und das wasserklare Filtrat eingengt. Das Inosin blieb als krystallinische Masse zurück. Es wurde aus 80-proz. Alkohol umkrystallisiert. Die Substanz war wasserfrei und glich im ganzen Aussehen dem aus Carnin dargestellten Inosin. Zur Analyse wurde sie über Schwefelsäure getrocknet.

0.1457 g Sbst.: 27 ccm N (20°, 757 mm).

$C_{10}H_{17}O_5N_4$ . Ber. N 20.89. Gef. N 21.12.

Die Substanz wurde gleichzeitig mit dem Inosin aus Carnin auf den Schmelzpunkt geprüft. Im Capillarrohr rasch erhitzt, schmolzen sie zusammen bei 218° (korr.). Die optische Bestimmung wurde in alkalischer Lösung gemacht, weil die Substanz nur in warmem Wasser genügend löslich ist und beim Abkühlen sich rasch abscheidet.

0.3544 g Sbst. wurden in 1.4 ccm *n*-NaOH und 2.2 ccm H<sub>2</sub>O gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 3.962 g. Drehte im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht bei 20° 6.48° nach links. Ohne Berücksichtigung des spez. Gewichts ist  $[\alpha]_D^{20} = 72.45^\circ (\pm 0.2^\circ)$ . Inosin aus Carnin wurde auf dieselbe Weise optisch geprüft. 0.5022 g Sbst. wurden in 2 ccm *n*-NaOH und 3 ccm H<sub>2</sub>O gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5.5155 g. Drehte im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht und bei 20° 6.64° nach links. Mithin

$[\alpha]_D^{20} = 72.92^\circ (\pm 0.2^\circ)$ .

Die optische Untersuchung in alkalischer Lösung muß möglichst rasch ausgeführt werden, weil nach einigem Stehen sich das Natriumsalz des Inosins in schön ausgebildeten, öfters zentimeterlangen Prismen auszuscheiden anfängt. Diese Verbindung gehört zu den schönsten Verbindungen der Nucleoside und kann, da bei den anderen auf dieselbe Weise kein Auskrystallisieren beobachtet wurde, wohl zur Charakterisierung des Inosins dienen. Analysiert wurde es nicht. Aus beiden Inosinen wurde dieses Salz erhalten. Es kann also kein Zweifel über die Identität dieser Substanzen vorliegen. Man muß demnach annehmen, daß, weil bei der Desamidierung nur die Aminogruppe in Reaktion eintritt, die Bindungsstelle der Ribose im Adenosin die gleiche ist wie beim Inosin.

## Verwandlung des Guanosins in Xanthosin.

10 g Guanosin wurden mit einer Lösung von 25 g  $\text{NaNO}_2$  in 75 ccm Wasser aufgeköcht. Das Guanosin schied sich beim Abkühlen wieder als eine Gallerte aus, die mit einem Glasstab zerteilt wurde. Es wurden nun 25 ccm Eisessig zugegeben und tüchtig durchgeschüttelt, bis alles Guanosin in Lösung gegangen war und die heftige Stickstoff-Entwicklung aufgehört hatte, was nach etwa 5 Minuten der Fall war. Die Lösung wurde nun mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und abgekühlt. Beim Reiben fängt alsbald die Krystallisation des Xanthosins an, das sich als gelbes, krystallinisches Pulver rasch am Boden des Gefäßes absetzt. Nach 24 Stunden wurde es abfiltriert. Die Ausbeute betrug 6 g. Durch Umkrystallisieren unter Anwendung von Tierkohle kann man es nicht von den gelben Beimengungen befreien. Zu diesem Zwecke wurde es in heißem Wasser gelöst, noch heiß mit ein paar Tropfen Bleizucker versetzt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dem Aufkochen wurde das Schwefelblei abfiltriert, und beim Erkalten schied sich das Xanthosin in farblosen, glänzenden, öfters zentimeterlangen Prismen ab. Es ist das schönste der Nucleoside. Im Capillarrohr rasch erhitzt, verkohlt es bei hoher Temperatur, ohne zu schmelzen. In kaltem Wasser ist es nur wenig löslich, leicht aber beim Erhitzen. In heißem, verdünntem Alkohol ist es auch löslich und krystallisiert beim Abkühlen beim längeren Stehen langsam in harten Warzen ohne Krystallwasser. Für die Analyse wurde es an der Luft bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

0.2026 g Sbst. wurden über  $\text{P}_2\text{O}_5$  im Vakuum bei  $110^\circ$  erhitzt: 0.0230 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

0.1191 » » » » » » » » » » 0.0131 » »

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ . Ber.  $\text{H}_2\text{O}$  11.25. Gef.  $\text{H}_2\text{O}$  11.35, 11.00.

0.1060 g Sbst. (wasserfrei): 17.7 ccm N über 50-proz. KOH ( $22^\circ$ , 772 mm).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_4$ . Ber. N 19.72. Gef. N 19.63.

Die Substanz zeigt alle die allgemeinen Reaktionen der Nucleoside. Mit Orcin und Salzsäure gibt sie sehr stark die Pentosen-Reaktion. Von Mineralsäuren wird sie leicht hydrolysiert und reduziert dann Fehlingsche Lösung. Nach der Hydrolyse wurde Xanthin leicht erhalten.

0.1404 g Sbst. (über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bei  $110^\circ$  getrocknet): 45.6 ccm N ( $22^\circ$ , 761 mm)

$\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_4$ . Ber. N 36.84. Gef. N 36.65.

Für die optische Bestimmung wurde das Xanthosin in Alkali gelöst.

0.4471 g Sbst. (krystallwasserhaltig) in 3.1 ccm 0.5-n-NaOH und 1.5 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5.2517 g. Spez. Gewicht 1.039. Drehte im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht und bei  $30^\circ$   $4.53^\circ$  nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{30} = -51.21^\circ.$$