

**488. P. A. Levene und F. B. La Forge:
Über die Tritico-nucleinsäure.**

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

(Eingegangen am 2. August 1910.)

Alle Nucleinsäuren können nach den Resultaten der neuesten Untersuchungen in zwei Formen auftreten: 1. Säuren, welche eine Base enthalten, die mit *d*-Ribose-phosphorsäure in glykosidähnlicher Bindung vereinigt ist und so das Molekül der Nucleinsäure bildet, 2. kompliziertere Säuren. Diese unterscheiden sich wieder je nach der Herkunft in tierische und pflanzliche. Von den pflanzlichen Nucleinsäuren sind bisher nur zwei bekannt geworden, die Hefenucleinsäure, von Altman¹⁾ gefunden, und die Triticonucleinsäure (aus Weizenembryo), von Osborne und Harris²⁾ entdeckt. Die elementare Zusammensetzung und die Spaltungsprodukte der Triticonucleinsäure sind von Osborne und Harris, sowie von Osborne und Heyl³⁾ sorgfältig studiert worden. Levene⁴⁾ hat nun das Verfahren zur Reinigung der Hefenucleinsäure verbessert und dabei eine Säure erhalten, die in der elementaren Zusammensetzung der Substanz von Osborne und Harris sehr nahestand. Auch erhielt man bei der Hydrolyse dieser Nucleinsäure dieselben Ausbeuten an den einzelnen Komponenten, wie bei der Triticonucleinsäure. Auf Grund dieser Befunde hat Levene die Vermutung ausgesprochen, daß die beiden Nucleinsäuren pflanzlicher Herkunft identisch seien. Seitdem haben Levene und Jacobs⁵⁾ bis zu gewissem Grade die Verbindungsform der einzelnen Komponenten im Hefenucleinsäure-Molekül durch die Auffindung der Nucleoside Guanosin und Adenosin, sowie von Cytidin bei der partiellen Hydrolyse aufgeklärt. Um über die Verwandtschaft der beiden Nucleinsäuren eine Entscheidung zu treffen, war es wichtig, die Darstellung derselben Komplexe auch bei der partiellen Hydrolyse der Triticonucleinsäure durchzuführen. In der Tat ist das auch gelungen, und damit ist die Identität der beiden Substanzen wahrscheinlich gemacht.

Die Natur der Pentose in der Triticonucleinsäure als *d*-Ribose ist dadurch sichergestellt.

¹⁾ Altman, Arch. f. Anatomie u. Physiol. 1889, 529.

²⁾ Osborne und Harris, Ztschr. f. physiol. Chem. 36, 85 [1902].

³⁾ Osborne und Heyl, Amer. Journ. of Physiol. 21, 157 [1908].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. 17, 120 [1909].

⁵⁾ Diese Berichte 42, 2474, 2703 [1909].

Experimenteller Teil.

Triticonucleinsäure stellten wir unter geringer Abänderung der Vorschrift von Osborne und Harris¹⁾ dar.

23 kg Mehl aus Weizenembryonen wurden mit 200 l Wasser gut durchgerührt, das Extrakt durch ein Tuch geseiht und 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Die trübe Flüssigkeit wurde dann vom Absatz abgossen und nach Zugabe von 1 l 40-proz. Salzsäure mit einer Lösung von 30 g Pepsin versetzt. Nach 36-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wurde die Flüssigkeit vom ungelösten Nuclein abgossen und dieses mit etwa 50 l 0.2-prozentiger Salzsäure aufgeschlämmt und noch einmal 24 Stunden mit Pepsin der Verdauung unterworfen.

Nach dem Auswaschen wurde das Nuclein in ca. 30 l Wasser aufgeschlämmt und soviel Kalilauge zugegeben, bis fast vollständige Lösung eintrat und die Flüssigkeit alkalisch reagierte. Dann wurde mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung das Eiweiß ausgefällt. Das Filtrat lieferte bei Zugabe von Salzsäure einen flockigen Niederschlag, der sich bald zu einer festen Masse zusammenballte. Die so erhaltene rohe Nucleinsäure wurde in einem kleinen Überschuß von Kalilauge gelöst, nach dem Filtrieren mit Essigsäure angesäuert und durch Eingießen in das 10-fache Volumen Alkohol gefällt.

Nach dem Absetzen wurde der verdünnte Alkohol vom Niederschlag abgossen und dieser unter starkem Alkohol 24 Stunden stehen gelassen. Dann wurde er abfiltriert und mehrmals mit absolutem Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Die Ausbeute betrug 325 g.

Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in wenig Ammoniakwasser gelöst und in einen großen Überschuß (für 100 g 10 l) von Eisessig gegossen. Nach dem Absetzen wurde auf der Nutsche filtriert und mit Alkohol und Äther gewaschen.

Ein Produkt, das 3-mal so behandelt worden war, hatte die folgende Zusammensetzung:

0.2258 g Sbst.: 0.3010 g CO₂, 0.0928 g H₂O. — 0.1912 g Sbst.: 23.45 ccm ⁿ/₁₀-NH₃ (Kjeldahl). — 0.1865 g Sbst.: 22.65 ccm ⁿ/₁₀-NH₃. — 0.5130 g Sbst.: 3 ccm ⁿ/₁₀-NH₃²⁾. — 0.3829 g Sbst.: 2.25 ccm ⁿ/₁₀-NH₃. — 0.4881 g Sbst.: 0.1392 g Mg₂P₂O₇. — 0.4140 g Sbst.: 0.1212 g Mg₂P₂O₇.

Gef. C 36.35, H 4.56, N 17.18, NH₃ 0.82, P 7.94.

Die kleine Abweichung dieser analytischen Zahlen von denen, die Osborne und Harris für Triticonucleinsäure und Levene für Hefenucleinsäure fanden, kann durch Verunreinigung mit Ammoniumacetat verursacht gewesen sein. Es wurde auf weitere Reinigung verzichtet, da die Hauptaufgabe dieser Arbeit die Darstellung der Produkte der partiellen Hydrolyse war.

¹⁾ Ztschr. f. physiol. Chem. **35**, 85 [1902].

²⁾ NH₃ wurde so bestimmt, daß man die Substanz in KOH löste und das NH₃ durch einen Luftstrom in eine abgemessene Menge ⁿ/₁₀-H₂SO₄ trieb.

Die Substanz war optisch-aktiv und drehte nach rechts. Sie besaß alle Eigenschaften der Hefenucleinsäure.

50 g Nucleinsäure, in 250 ccm 2-prozentigem Ammoniak gelöst, wurden $3\frac{1}{2}$ Stunden im Autoklaven auf 160° erhitzt. Nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank war fast alles Guanosin gallertartig ausgeschieden. Nach dem Abfiltrieren wurde das Rohprodukt in 500 ccm heißem Wasser gelöst und mit überschüssigem Bleiessig versetzt. Der entstandene braune Niederschlag wurde dann heiß abfiltriert und aus dem Filtrat durch Ammoniak die Bleiverbindung ausgefällt. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen wurde diese in 500 ccm Wasser aufgeschlemmt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus dem Filtrat vom Bleisulfid erhielten wir ca. 1 g Guanosin. Um die mit dem Bleisulfid zurückbleibende Hauptmenge zu gewinnen, haben wir den Bleiniederschlag mit 10-prozentiger Essigsäure ausgekocht und nach dem weiteren Einleiten von Schwefelwasserstoff auf der Nutsche heiß filtriert. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen konzentriert, wobei der Rest des Produktes beim Abkühlen auskrystallisierte. Gesamte Ausbeute 3.7 g.

0.1714 g lufttrockne Sbst. verloren im Vakuum über P_2O_5 bei 115° 0.0189 g H_2O .

$(C_{10}H_{13}O_5N_3)_2H_2SO_4$. Ber. H_2O 11.28. Gef. H_2O 11.03.

0.1525 g wasserfreie Sbst: 0.2358 g CO_2 , 0.0644 g H_2O .

$C_{10}H_{13}O_5N_3$. Ber. C 42.40, H 4.59.

Gef. \rightarrow 42.18, \rightarrow 4.69.

0.1497 g wasserfreie Sbst. in 5 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5.1951 g. Drehte im 1-dm-Rohr mit Natriumlicht 1.74° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -60.4^\circ (\pm 0.3^\circ).$$

Adenosin. Das Filtrat vom Roh-Guanosin wurde nach dem Auskochen mit Bariumcarbonat stark eingeeengt und, da sich kein Guanosin mehr ausschied, mit einer wäßrigen Lösung von ca. 4 g Pikrinsäure versetzt.

Das ausgeschiedene Adenosin-pikrat wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 5.47 g.

Das Pikrat wurde in heißem Wasser gelöst, noch heiß mit Toluol ausgeschüttelt, bald nach dem Abkühlen mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgezogen. Die von Pikrinsäure befreite Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, die Lösung auf ein ganz kleines Volumen im Vakuum eingedampft und dann im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure weiter konzentriert, wobei bald die Krystallisation des freien Adenosins

anfang. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser erhielt man ein fast farbloses Produkt.

0.1976 g lufttrockne Sbst. verloren bei 115° im Vakuum über P_2O_5 0.0182 g H_2O .

$C_{10}H_{13}O_4N_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$. Ber. H_2O 9.10. Gef. H_2O 9.21.

0.1273 g wasserfreie Sbst.: 0.2088 g CO_2 , 0.0532 g H_2O .

Ber. C 44.94, H 4.87.

Gef. » 44.75, » 4.64.

0.1794 g wasserfreie Sbst. in 5 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5.2362 g. Drehte im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht 2.23° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -65.1^\circ (\pm 0.2^\circ).$$

Cytidin. Das Filtrat vom Adenosin pikrat enthält neben anderem das Pikrat des Cytidins. Um letzteres zu gewinnen, haben wir die auf 1 l verdünnte Lösung zur Zerstörung der anderen Komplexe nach Zugabe von 20 g Schwefelsäure zwei Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Pikrinsäure mit Äther ausgeschüttelt und zur Entfernung der Purinbasen mit einem Überschuß einer Mercurisulfatlösung 12 Stunden stehen gelassen. Die vom Purinquecksilber abfiltrierte Lösung wurde mittels Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch Bariumcarbonat von Schwefelsäure befreit und dann mit einer wäßrigen Lösung von ca. 3 g Pikrinsäure bis auf ca. 15 ccm im Vakuum eingedampft. Das Pikrat löbte sich als nicht deutlich krystallinisches Pulver aus der heißen Lösung aus. Es wurde aus ca. 10 Teilen Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 2.8 g.

Das Pikrat wurde in das Sulfat übergeführt und als solches analysiert. Um das Sulfat zu gewinnen, haben wir die Pikrinsäure genau wie beim Adenosin entfernt. Nach der Behandlung mit Bariumcarbonat wurde die Lösung mit etwas Tierkohle geschüttelt und auf 5—7 ccm im Vakuum konzentriert, dann wurden etwa 50 ccm Alkohol zugegeben und mit Schwefelsäure angesäuert, bis die Lösung sauer auf Kongo reagierte, wobei die Krystallisation des Sulfats alsbald anfang.

Für die Analyse wurde die Substanz über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0.1465 g Sbst.: 0.0589 g $BaSO_4$. — 0.1260 g Sbst.: 0.1717 g CO_2 , 0.0561 g H_2O .

$(C_9H_{13}O_5N_3)_2H_2SO_4$. Ber. C 36.98, H 4.79, S 5.48.

Gef. » 37.15, » 4.94, » 5.51.