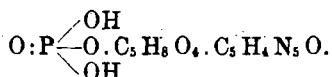


138. P. A. Levene und W. A. Jacobs: Über die Hefenucleinsäure. IV.

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

(Eingegangen am 23. März 1911.)

Frühere Arbeiten¹⁾ haben uns zu der Ansicht gebracht, daß das Molekül der Hefenucleinsäure aus 4 Nucleotiden zusammengesetzt ist. Als Nucleotide wurden Körper bezeichnet, die der Inosinsäure und Guanylsäure analog sind und etwa die der folgenden Formel entsprechende Zusammensetzung besitzen:



Die Gründe für diese Auffassung waren: 1. die Analogie der einfacheren Nucleinsäuren mit den komplizierteren in manchen Eigenschaften; 2. die Auffindung der Komplexe Adenosin, Guanosin und Cytidin bei der partiellen Hydrolyse der Hefenucleinsäure. Zur vollkommenen Begründung unserer Anschauung über die Konstitution der Hefenucleinsäure bedurfte es jedoch noch der Auffindung des Uracil-Komplexes und der einzelnen Nucleotide.

Die Isolierung solcher Nucleotide ist uns jetzt gelungen, und zwar konnten wir ein Gemisch der Pyrimidin-Nucleotide, das

Cytidin-Nucleotid: $\text{O}:\text{P} \begin{array}{l} \diagup \text{OH} \\ \diagdown \text{O} \cdot \text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4 \\ \diagup \text{OH} \end{array}$, und das Uridin-Nu-

cleotid: $\text{O}:\text{P} \begin{array}{l} \diagup \text{OH} \\ \diagdown \text{O} \cdot \text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5 \\ \diagup \text{OH} \end{array}$, darstellen. Aus dem letzteren ließ

sich der Uracilkomplex, das Uridin, gewinnen. Dieser Befund ist von großer Wichtigkeit als Beweis für die Anwesenheit der Substanz im Moleküle der Nucleinsäure. Früher war das Uridin nur aus Cytidin erhalten worden, und noch vor ganz kurzer Zeit hat Steudel mit großem Eifer die Annahme der sekundären Bildung des Uracils auch in der Hefenucleinsäure verteidigt. Es zeigte sich, daß das durch direkte Spaltung der Nucleotide erhaltene Uridin mit der Substanz, die aus dem Cytidin durch Behandeln mittels salpetriger Säure entsteht, identisch ist.

Die organischen Komplexe der Hefenucleinsäure sind also in zwei Klassen einzuteilen: Die der Purinbasen, welche glykosidartige Verbindungen darstellen, und die der Pyrimidinbasen, deren Konstitution noch nicht ganz aufgeklärt ist.

¹⁾ B. 42, 2703, 2474 [1909]; 43, 3150 [1910].

Experimenteller Teil.

Darstellung der Nucleotide.

Die Darstellung der Pyrimidinnucleotide beruht auf der größeren Resistenz dieser Komplexe gegen Mineralsäuren im Vergleich zu den Purinkomplexen. Während diese durch 2-stündiges Erhitzen mittels 2-prozentiger Schwefelsäure vollkommenen in Phosphorsäure, Ribose und Base gespalten werden, bleiben die Pyrimidinkomplexe bei dieser Behandlung größtenteils intakt. Ihre Gewinnung geschieht auf folgende Weise: Je 100 g der Nucleinsäure werden in einem Liter 2-proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler 2 Stdn. im Ölbad (125°) gekocht und die etwas abgekühlte Flüssigkeit mit reinem Silberoxyd im Überschuß versetzt. Dabei scheiden sich die Silbersalze der Purinbasen aus. Zur Vervollständigung der Fällung läßt man das Gemisch über Nacht stehen und entfernt die Purinsilbersalze durch Filtration. Das Filtrat neutralisiert man mit chemisch reiner Barytlösung, wodurch sich die Silbersalze der Nucleotide und Silberphosphat ausscheiden. Der Niederschlag wird in Schwefelsäure gelöst, mit Schwefelwasserstoff von Silber befreit, das Filtrat vom Silbersulfid mit Barytlösung genau auf Phenolphthalin neutralisiert, vom Bariumphosphat abfiltriert und bei vermindertem Druck fast zur Trockne eingedampft. Ein Teil der Salze geht dabei in eine in Wasser unlösliche Form über. Das Gemisch wird mittels Essigsäure in Lösung gebracht und die Lösung in absoluten Alkohol eingetragen, wobei sich die Bariumsalze der Nucleotide ausscheiden. Dieses Rohprodukt ist schon vollständig frei von Nucleinsäure oder von Purin enthaltenden Komplexen. Beim Arbeiten mit der Hefenucleinsäure läßt sich das leicht erkennen, da die Purinkomplexe eine starke Orcinreaktion geben und nach kurzer Hydrolyse mittels Mineralsäure Fehlingsche Lösung reduzieren. Dagegen geben die Bariumsalze der Nucleotide nur eine ganz schwache Orcinreaktion, und nach der Hydrolyse mit Mineralsäuren wird Fehlingsche Lösung auch nicht spurenweise reduziert, und Silbernitrat gibt keinen Niederschlag von Purinsalzen.

Zum völligen Nachweis der Abwesenheit von Purinbasen in den vorliegenden Nucleotiden wurde noch der folgende Versuch ausgeführt: 1 g der Substanz wurde in 75 ccm 2-proz. Schwefelsäure 4 Stdn. am Rückflußkühler gekocht, die Lösung auf 100 ccm verdünnt und ihr Stickstoffgehalt bestimmt. Er betrug 0.0452 g. Nun wurden 60 ccm dieser Lösung mit Silbersulfat versetzt, wobei sich kein merklicher Niederschlag bildete. Die Flüssigkeit wurde über Nacht im Kälteraum bei -1° stehen gelassen, filtriert, mit Salzsäure von Silber befreit, das Filtrat vom Chlorsilber auf 100 ccm gebracht und 20 ccm davon zur Stickstoffbestimmung verwendet. Der Stickstoffgehalt in diesen 100 ccm, die 60 ccm der ursprünglichen Lösung entsprachen, betrug 0.02695 g. Der totale Gehalt der ursprünglichen 100 ccm würde demnach nach dem Behandeln mit Silbersulfat 0.0449 g betragen. Die Lösung enthielt also keine Purine, und man war demnach berechtigt, die Substanzen als die Pyrimidin-nucleotide zu betrachten. Weitere Untersuchungen unterstützten diese Annahme.

Analyse der Substanz.

Die Reinigung der Substanz für die Analyse wurde auf folgende Weise ausgeführt. Die mit Alkohol und Äther getrockneten Bariumsalze wurden mit heißem Wasser im Mörser gut verrieben, der unlösliche Teil über Seide auf einer Nutsche abfiltriert, mit heißem Wasser, dann Alkohol von steigender Konzentration und endlich mit Äther gewaschen und die Operation mehrere Mal wiederholt. Zur Analyse wurde die Substanz im Toluolbad bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1190 g Sbst.: 0.1060 g CO_2 , 0.0272 g H_2O . — 0.1570 g Sbst. verbrauchten bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 7.8 ccm 0.1-n. Schwefelsäure. — 0.2150 g Sbst.: 0.0490 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$. — 0.113 g Sbst.: 0.0560 g Asche.

Für ein äquimolekulares Gemisch von Cytidin- und Uridin-nucleotiden ergibt sich:

Ber. C 23.54, H 2.56, N 7.62, P 6.75, $\text{Ba}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 48.90.

Gef. » 24.29, » 2.56, » 6.96, » 6.4, » 49.57.

Die Zahlen weichen bei Berücksichtigung der Eigenschaften der Substanz nicht weit von den theoretischen ab. Es wurde versucht, die Substanz noch weiter zu reinigen, aber ohne Erfolg. Vielmehr nahm der Stickstoffgehalt dabei ab, und man erhielt eine Substanz, die nur etwa 6.4% Stickstoff enthielt, während der Barium- und Phosphorgehalt unverändert blieb. Es schien, als wäre das Uracil-nucleotid weniger löslich im Vergleich zu dem Cytidin-komplex.

Um womöglich die Nucleotide in reinerem Zustande zu erhalten, haben wir versucht, sie in die Natriumsalze überzuführen. Zu diesem Zwecke wurde die Lösung der Bariumsalze mit etwas mehr als der berechneten Menge Natriumcarbonat versetzt, vom Bariumcarbonat abfiltriert und das Filtrat auf ein kleines Volumen bei vermindertem Druck eingedampft. Die Lösung wurde dann in Alkohol eingetragen, wobei sich ein heller harzartiger Niederschlag anschied. Wurde dieser mit ganz wenig Essigsäure versetzt und wieder in absoluten Alkohol eingetragen, so schied er sich in weißen Flocken aus. Der auf diese Weise erhaltene Niederschlag wurde mehrere Male mit Alkohol umgefällt, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und zur Analyse bei vermindertem Druck im Toluolbad über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1524 g Sbst.: 0.1610 g CO_2 , 0.426 g H_2O . — 0.1278 g Sbst. verbrauchten bei der Kjeldahl-Stickstoffbestimmung 8.2 ccm $\frac{7}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$.

0.2324 g Sbst.: 0.0646 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$. — 0.0964 g Sbst.: 0.0372 g Asche.

Gef. C 28.81, H 3.13, N 9.0, P 7.7, Asche 38.6.

Werden die Zahlen auf einen Aschengehalt von 36.19% berechnet, wie der Theorie entspricht, ergibt sich:

$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_{17}\text{P}_2\text{Na}_4$. Ber. C 29.39, H 3.12, N 9.52, P 8.59.

Gef. » 29.52, » 3.21, » 9.22, » 7.92.

Amidstickstoff-Bestimmung.

Um eine Orientierung über die Natur der Basen zu erhalten, haben wir eine Amidstickstoff-Bestimmung nach dem Verfahren von van Slyke ausgeführt

Hierzu wurde eine Lösung der Nucleotide bereitet, welche in 10 ccm 0.0249 g Stickstoff enthielt. Von dieser wurden 9.40 ccm $3\frac{1}{2}$ Stunden mit salpetriger Säure behandelt, wobei sich 7.95 ccm Stickstoff (22° , 758 mm) entwickelten. Der Betrag an Amidstickstoff in der ganzen Lösung war demnach 0.00473 g, oder $\frac{1}{5}$ des Gesamtstickstoffes. Diese Zahl entspricht einem äquimolekularen Verhältnis des Cytidin- und des Uridin-Komplexes in dem vorliegenden Gemenge.

Die gefundenen Zahlen weichen also nicht viel von den theoretischen ab. Zieht man aber die große Löslichkeit der Substanz in Betracht, und die Tatsache, daß man sie nur durch Fällen mit Alkohol aus wäßriger Lösung erhalten kann, so ist es nicht zu verwundern, daß es bis jetzt noch nicht gelungen ist, die Salze in reinerem Zustande zu erhalten. Außerdem darf man auch nicht erwarten, daß die Nucleotide sich immer in äquimolekularem Verhältnisse ausscheiden. Allerdings ist dieser Übelstand nicht von großer Wichtigkeit, da man über die Zusammensetzung der vorliegenden Substanzen durch die Untersuchung der Produkte der weiteren Hydrolyse Auskunft erhalten kann.

Hydrolyse mittels 10-proz. Schwefelsäure.

8.0 g der Bariumsalze wurden in Wasser gelöst, vom Barium mittels Schwefelsäure befreit und die Säure bis zu einem Gehalt von 10% zugegeben. Das Gesamtvolumen der Lösung betrug 100 ccm. Sie wurde in einem Einschmelzrohr vier Stunden auf 125° erhitzt, dann mit einer Lösung von chemisch reinem Bariumhydroxyd bis zur alkalischen Reaktion auf Phenolphthalein versetzt und vom Bariumsulfat und Phosphat abfiltriert. Der Überschuß von Baryt wurde quantitativ entfernt, die Flüssigkeit bei vermindertem Druck eingedampft und das Cytosin-Pikrat nach dem Verfahren des einen von uns dargestellt¹⁾. Die Ausbeute betrug 1.5 g. Das Pikrat hatte nach dem Umkrystallisieren aus Wasser den Schmp. 255° . Das Filtrat vom Pikrat wurde von Pikrinsäure befreit, mit Quecksilbersulfat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und aus dem Filtrate des Sulfids das freie Uracil gewonnen.

Zur Analyse wurde die Substanz im Toluolbad bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1692 g Subst. verbrauchten bei der Kieldahl-Stickstoffbestimmung 31.1 ccm 0.1-n. Schwefelsäure.

$C_4H_4N_2O_2$. Ber. N 25.00. Gef. N 25.08.

Hydrolyse mittels verdünntem Ammoniak.

Um aus den Nucleotiden des Pyrimidinkomplexes das Cytidin und Uridin zu erhalten, haben wir folgenden Weg eingeschlagen: Die Lösung der Bariumsalze wurde quantitativ von Barium befreit und die resultierende, stark sauer

¹⁾ Levene, H. **37**, 402 [1902].

reagierende Lösung zunächst mit wäßrigem Ammoniak neutralisiert und dann mit einem Überschuß von Ammoniak bis zu einem Gehalt von 3% versetzt. Die ammoniakalische Lösung wurde entweder im Einschmelzrohr bei 135° oder im Autoklaven im Ölbad bei 175° 3 1/2 Stunden erhitzt. Die Möglichkeit der Isolierung der Pyrimidinkomplexe beruht auf ihrer Löslichkeit in Alkohol. Das Produkt der Hydrolyse wurde bei vermindertem Druck bis zur Sirup-Konsistenz eingedampft und der Rückstand mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug wurde dann unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand wieder mit Alkohol extrahiert und eingedampft. Von diesem Punkte an wurde das Produkt bei den einzelnen Versuchen auf verschiedene Weise behandelt.

Es hatte sich in einer Untersuchung über die Konstitution des Cytidins, die gemeinschaftlich mit Dr. La Forge im Gange ist, herausgestellt, daß sich das salpetersaure Salz dieser Substanz wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser zur Isolierung der Base gut eignet. Diese Erfahrung wurde bei einem Versuche verwertet. Der Rückstand, welcher beim Eindampfen des alkoholischen Auszuges zurückblieb, wurde mit Salpetersäure bis zur sauren Reaktion auf Congo versetzt und die Lösung in einer Kältemischung aufbewahrt. Die Abscheidung des salpetersauren Salzes des Cytidins begann sofort und wurde durch Zusatz eines halben Volumens Alkohol zu Ende geführt.

Das salpetersaure Salz wurde nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser unter Zugabe von wenig Salpetersäure analysiert. Zur Identifizierung der Substanz wurde eine Stickstoff- und eine Amidstickstoff-Bestimmung nach dem Verfahren von van Slyke ausgeführt.

0.1086 g Sbst.: 17.5 ccm N (21.5°, 762 mm). — 0.1149 g Sbst.: 9.28 ccm N (19°, 758 mm) im Apparate von van Slyke.

$C_9H_{13}N_3O_5, HNO_3$. Ber. Gesamt-N 18.34, Amid-N 4.57.
Gef. » » 18.36, » » 4.61.

Das Filtrat vom salpetersauren Cytidin wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum-Exsiccator vom Alkohol befreit und der Rückstand nach Schotten-Baumann benzoiliert. Es wurde auf diese Weise das Dibenzoyl-uridin erhalten. Dieses wurde nach dem früher angegebenen Verfahren in das Uridin übergeführt und analysiert. Die Substanz wurde zur Analyse bei vermindertem Druck im Toluolbad über Phosphorpenoxyd getrocknet.

0.1008 g Sbst.: 10.0 ccm N (15°, 768 mm).

$C_9H_{13}N_3O_6$. Ber. N 11.48. Gef. N 11.79.

Bei diesem Experimente war die Möglichkeit einer sekundären Bildung des Uridins nicht ganz ausgeschlossen. Es wurde deswegen versucht, das Uridin auf einfacherem Wege zu gewinnen, was in zwei Versuchen gelang.

Die Hydrolyse wurde gerade wie bei dem ersten Versuche ausgeführt, der alkoholische Auszug von Alkohol befreit und mit Pikrinsäure behandelt. Aus der Lösung die bei vermindertem Druck auf ein ganz kleines Volumen eingedampft war, schied sich beim Stehen bei -1.0° Cytidinpikrat aus. Dieses wurde zur Reinigung aus Alkohol umkrystallisiert. Die Ausbeute aus 50.0 g der Bariumsalze der Nucleotide betrug 10.0 g. Nachdem die Mutterlauge vom Cytidinpikrat von Pikrinsäure mittels Schwefelsäure und Äther befreit und die Schwefelsäure quantitativ mit Barytlösung entfernt war, ließ sich aus dieser Lösung das Uridin auf folgende Weise gewinnen: Die Lösung wird mit basischem Bleiacetat behandelt. Es bildet sich ein Niederschlag; dieser wird entfernt. Im Filtrate bildet sich bei Zugabe von Barythydratlösung ein zweiter Niederschlag, welcher das Uridin enthält. Der Niederschlag wird vom Blei mittels Schwefelsäure und von dieser quantitativ mittels Barytlösung befreit. Die abfiltrierte klare Lösung wird bei vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand mit 95-prozentigem Alkohol aufgenommen und der alkoholische Auszug rasch auf dem Wasserbade eingedampft. Es ist ratsam, den Rückstand einige Male in Alkohol zu lösen und einzudampfen, um ihn möglichst vom Wasser zu befreien. Beim Impfen mit ganz wenig Uridin erstarrt der Rückstand dann zu einer krystallinischen Masse, welche sich leicht aus 95-prozentigem Alkohol umkrystallisieren läßt. Zur Analyse wurde die Substanz bei vermindertem Druck im Toluolbad über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1174 g Subst.: 12.0 ccm N (27° , 763 mm).

$C_9H_{13}N_2O_6$. Ber. N 11.48. Gef. N 11.72.

Zum Schluß war noch die Identität des natürlichen Uridins mit der Substanz nachzuweisen, welche aus Cytidin durch die Einwirkung salpetriger Säure entsteht. Die zwei Substanzen erwiesen sich als identisch auf Grund der Gleichheit der Schmelzpunkte ($164-165^{\circ}$) und des optischen Drehungsvermögens.

0.4265 g der aus dem Nucleotid dargestellte Substanz wurden in 4.5 ccm Wasser gelöst. Die Lösung hatte das Gesamtgewicht von 4.8920 g und besaß in 1-dm-Rohr bei 20° und bei Natriumlicht das Drehungsvermögen von $+0.55^{\circ}$. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = 6.36^{\circ} (\pm 0.2^{\circ}).$$

0.5006 g der aus Cytidin dargestellten Substanz wurden in 4.5 ccm Wasser gelöst. Die Lösung hatte das Gesamtgewicht von 5.4844 g und besaß in 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht das Drehungsvermögen von -0.60° . Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = 6.40^{\circ} (\pm 0.2^{\circ}).$$

Diese Resultate berechtigen zu der Annahme, daß das natürliche vorkommende und das aus Cytidin dargestellte Uridin identisch sind. Diese Tatsache ist von großer Wichtigkeit, weil die Aufklärung der Konstitution einer der beiden Substanzen auch für die andere maßgebend sein wird.