

80: P. A. Levene und F. B. La Forge: Über die Hefenucleinsäure. V. Die Struktur der Pyrimidin-Nucleoside.

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

(Eingegangen am 19. Februar 1912.)

In einer früheren Mitteilung haben Levene und Jacobs¹⁾ die Ansicht ausgesprochen, daß die organischen Komplexe der Hefenucleinsäure in zwei Klassen einzuteilen sind: die der Purinbasen und die der Pyrimidinbasen. Die ersteren besaßen alle Eigenschaften der Glykoside; über die Struktur der anderen konnte bisher eine Vermutung nicht ausgesprochen werden.

Die Pyrimidinkomplexe unterschieden sich von den anderen in Folgendem: 1) in großer Resistenz gegen die hydrolysierende Wirkung von verdünnten Mineralsäuren. Darin unterscheiden sich diese Körper nicht nur von den Purinnucleosiden, sondern auch von allen bekannten Glykosiden. Auf dieser Eigenschaft beruht die Darstellungsmethode der Substanzen. Wurde zur Hydrolyse konzentrierte Mineralsäure verwandt, so erhielt man die Pyrimidinbasen, während der Rest des Moleküles durch Zerstörung ganz verloren ging. 2) Bei der Behandlung mit Orcin geben die Pyrimidinkomplexe eine ganz unbedeutende Färbung. 3) Bei der Destillation mittels Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1.06 ließ sich aus den Pyrimidinkomplexen nur eine unbedeutende Menge Furfurol abdestillieren, während einer Zeit, welche zur Bildung von Furfurol aus den Purinnucleosiden ausreichte, und 4) erwiesen sich die Pyrimidinsubstanzen widerstandsfähig gegen die Enzyme, welche die Purinnucleoside mit Leichtigkeit spalteten²⁾.

Ein weiterer Widerspruch gegen die Annahme der glykosidartigen Natur der Pyrimidinkomplexe lag darin, daß aus dem Cytidin nur ein Tribenzoylderivat sich bildete, während aus einem Pentosid des Cytidins ein Tetraderivat entstehen sollte.

Da alle Bemühungen, das Cytidin oder das Uridin in ihre Komponenten zu spalten, versagten, wurde versucht, solche Derivate des stickstofffreien Teiles der Substanz zu gewinnen, welche die Aufklärung ihrer Natur möglich machten. Als erstes Orientierungsexperiment wurde der Versuch gemacht, die Substanzen einer lang dauernden Destillation mittelst Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1.06 zu unterwerfen. Es zeigte sich dabei, daß die Entwicklung von Furfurol eine ganz träge und langdauernde war, so daß sie erst nach

¹⁾ B. 44, 1027 [1911].

²⁾ Levene und Medigreceanu, Journal of Biological Chemistry 9, 389 [1911].

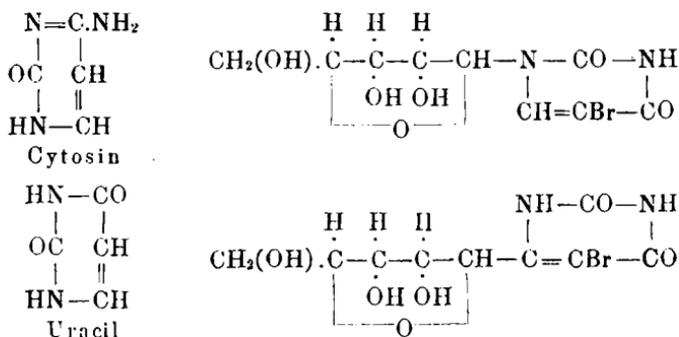
36 Stunden beendet war. Dabei entwickelte sich das Furfurol in einer Quantität, die auf ein äquimolekulares Verhältnis von Ribose und Base im Pyrimidin-Komplex deutete.

Auf diesen Befund hin wurde versucht, die Hydrolyse der Substanzen unter solchen Bedingungen auszuführen, welche die vollständige Zerstörung der Pentose verhinderten. Es sollte deswegen die Hydrolyse mittels Bromwasserstoffsäure in Gegenwart von Brom ausgeführt werden, in der Hoffnung, daß dabei die entstandene Pentosensäure vor weiterer Zersetzung geschützt sein würde. Das Verfahren wurde bereits von Neuberg mit Erfolg bei der Spaltung der Glucuronsäure-Verbindungen angewandt. In der Tat erhielten wir bei diesen Experimenten 5-Brom-uridin und *d*-Ribonsäure, welche in Form ihres Cadmiumsalzes und ihres Lactons identifiziert wurde.

Auf diese Weise wurde bewiesen, daß die Pyrimidinkomplexe aus Pyrimidin und Ribose zusammengesetzt sind. Die Elementaranalyse sprach für eine anhydridartige Verbindung. Vieles sprach aber auch dagegen, wie schon früher erwähnt wurde. Darum war es nötig, weitere Tatsachen zu finden, um die Aufklärung der Bindungsart der beiden Substanzen zu ermöglichen. Zunächst war es wichtig, darüber Klarheit zu verschaffen, ob die Doppelbindung in Stellung 4—5 noch im Komplexe vorhanden war. Behrend und seine Mitarbeiter haben bewiesen, daß bei der Einwirkung von Brom auf Pyrimidine die 4-Oxy-5-brom-dihydro-Derivate erhalten werden. Diese Substanzen haben die wichtige Eigenschaft, mit Phenylhydrazin charakteristische Derivate zu bilden und Fehlingsche Lösung beim Kochen zu reduzieren. Es erwies sich nun, daß Uridin bei der Behandlung mit Brom sich gerade wie Uracil verhielt. Wird eine wäßrige Lösung von Uridin oder Cytidin mit Brom bis zum Bestehenbleiben der gelben Farbe versetzt und der Überschuß von Brom durch Kochen entfernt, so reduziert die Lösung beim Kochen Fehlingsche Lösung; beim Erhitzen mit Phenylhydrazin bildet diese Lösung einen krystallinischen Niederschlag, der eine konstante Zusammensetzung und einen konstanten Schmelzpunkt besitzt. Beim Eindampfen des ursprünglichen Reaktionsproduktes gelangt man zum 5-Brom-uridin. Dadurch ist bewiesen, daß in dem Komplex die Doppelbindung noch intakt war.

Auch durch das Verhalten gegen konzentrierte Salpetersäure wurde dieselbe Tatsache bewiesen. Auch hier zeigte sich die eigentümliche Widerstandskraft dieser Komplexe gegen oxydierende und hydrolysierende Mittel. Wurde das Uridin mit konzentrierter Salpetersäure auf dem Wasserbade zu einem Syrup eingedampft, so er-

hielt man dabei eine Verbindung, die nach ihrer Zusammensetzung eine anhydridartige Verbindung von 2 Molekülen einer Nitro-uridin-carbonsäure war. Diese Substanz ließ sich leicht in ihre Äthyl- oder Butylester überführen. Durch Hydrolyse der Substanz ließ sich Nitro-uracil darstellen, welches identisch war mit der Substanz, die Behrend bei der Behandlung von Uracil mit Salpetersäure erhielt. Ein Versuch, das Nitro-uridin in Amino-uridin durch Reduktion mit Salzsäure und Zinn überzuführen, gelang nicht, da die Substanz sich dabei unter Bildung von Isobarbitursäure spaltete. Aus diesem Versuche konnte man schließen, daß die Doppelbindung in Uracil intakt war und auch, daß die Bindung der beiden Komponenten verhältnismäßig widerstandsfähig ist. Es blieb jedoch unklar, auf welche Weise und in welcher Stellung die Bindung von Ribose und Uracil stattfand. Wenn man aber die Strukturformeln von Uracil und von Cytosin in Betracht zieht und auch die Tatsache berücksichtigt, daß Cytidin leicht in Uridin und weiter, daß Uridin leicht in 5-Bromuridin und in 5-Nitrouridincarbonsäure übergeführt werden kann, so gelangt man zu der Überzeugung, daß die Bindung nur in den Stellungen 3 oder 4 eingetreten sein kann:



Um Klarheit in dieser Frage zu bekommen, wurde versucht, Alkylderivate des Uridins oder des Cytidins darzustellen. Alle Bemühungen aber, aus den Alkali-, Blei- oder Silbersalzen dieser Substanzen Methyl- oder Äthylderivate darzustellen, mißlang. Ein Teil der Substanz wurde unverändert wiedergefunden, der andere ging unter Zersetzung verloren. Wir konnten deswegen über diesen Punkt zu keiner sicheren Ansicht gelangen.

Nun war es aber möglich, das Uridin und das Cytidin leicht zu Dihydroverbindungen zu reduzieren, und dabei kam die merkwürdige Tatsache zum Vorschein, daß das Dihydro-uridin und das Dihydro-cytidin ihre Widerstandsfähigkeit gegen die hydroly-

sierende Wirkung von verdünnten Mineralsäuren verloren hatten. Diese Substanzen ließen sich leicht in *d*-Ribose und in die Dihydro-Basen zerlegen. Die Ribose konnte alsdann in das Phenyl-*osazon* übergeführt und als solches identifiziert werden. Man kann also mit einem gewissen Maße von Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Widerstandskraft der ursprünglichen Pyrimidinkomplexe darauf beruht, daß die glycosidartige Bindung zwischen der Ribose und der Base in Stellung 5 sich befindet, und daß es die Nachbarschaft der Doppelbindung ist, welche der Substanz ihre Widerstandskraft verleiht. Unzweideutige Beweise für diese Ansicht fehlen allerdings noch. Es ist auch erwähnenswert, daß die Dihydroverbindungen ähnlich den Purinnucleosiden linksdrehend sind, während die ursprünglichen Pyrimidinkomplexe nach rechts drehen.

Es soll hier auch angeführt werden, daß zur Ausführung dieser Arbeit große Quantitäten von Uridin nötig waren, und daß das alte Verfahren zur Darstellung der erforderlichen Mengen viel zu umständlich war. Es gelang uns, die Substanz mit großer Leichtigkeit zu erhalten, indem wir den Zucker in sein Glucosid überführten, und dadurch seine Fällbarkeit durch Blei und Baryt oder durch Blei und Ammoniak verhinderten¹⁾, während die Basen ihre Fällbarkeit diesen Reagenzien gegenüber bewahrten. Auf diese Weise gelangten wir auch zur Trennung des Uridins von der bei der Spaltung von Nucleinsäure sich bildenden Ribose, die große Schwierigkeiten bei der Isolierung des Uridins und des Cytidins bereitete.

Auch die Isolierung des Cytidins wurde durch die Beobachtung erleichtert, daß das Nitrat wegen seiner schweren Löslichkeit in Wasser sich gut zur Isolierung der Substanz eignet.

Auch gelang es uns jetzt, das freie Cytidin krystallisiert zu erhalten und seine Eigenschaften festzustellen. Wegen der großen Löslichkeit der Substanz in Wasser wurde sie bis jetzt nur in Form ihrer Salze und des Tribenzoylderivats erhalten.

Experimenteller Teil.

Isolierung des Cytidins als Nitrat.

200 g Hefenucleinsäure werden in der üblichen Weise hydrolysiert und auf Guanosin und Adenosin verarbeitet. Das Filtrat

¹⁾ Die Überführung des Zuckers in sein Glucosid wurde ausgeführt nach dem Verfahren, das Jacobs in diesem Laboratorium als sehr günstig für die allgemeine Darstellung von Glucosiden erprobt hat. Es besteht darin, daß der Zucker in Alkohol gelöst, die Lösung, mit Salzsäure gesättigt und dann der Überschuß der Säure mit Bleicarbonat entfernt wird.

vom Adenosinphosphat wird von Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Äther und von Schwefelsäure durch Bariumcarbonat befreit und im Vakuum auf ca. 75 ccm eingedampft. Es werden dann ca. 10 ccm Salpetersäure und darauf ca. 75 ccm Alkohol zugegeben. In wenigen Minuten ist die Lösung zu einem dicken Brei von Krystallen erstarrt. Nach dem Abfiltrieren, Waschen mit 50-prozentigem Alkohol und Trocknen wiegt das fast ganz reine Produkt 15—17 g. Für die Analyse wurde es einmal aus Wasser umkrystallisiert. Schmp. 197° (unkorr.).

Die Analyse des Nitrats ergab die folgenden Zahlen:

0.1086 g Subst.: 17.5 ccm N (21.5°, 762 mm)¹⁾.

$C_9H_{13}N_3O_5, HNO_3$. Ber. N 18.34. Gef. N 18.36.

Cytidin. Die freie Base wurde nur unter folgenden Bedingungen krystallisiert erhalten. Ein Teil Cytidinsulfat, das dreimal aus Wasser umkrystallisiert worden war, wurde in wenig Wasser gelöst und mit der genau berechneten Menge Bariumhydroxyd, das ebenfalls durch wiederholtes Umkrystallisieren gereinigt war, versetzt. Die Lösung wurde durch ein gehärtetes Filter filtriert und in einer Glasschale bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum über Calciumchlorid zur Trockne verdunstet. Die farblose, glasige Masse wurde dann in heißem, absolutem Alkohol gelöst; aus dieser Lösung krystallisierte die freie Base beim Reiben mit einem Glasstab. Die Krystalle, die nunmehr in absolutem Alkohol ziemlich schwer löslich waren, wurden aus 90-prozentigem Alkohol umgelöst. Der Körper krystallisiert daraus in langen Nadeln, die bei 220° sintern und bei 230° sich zersetzen.

0.1366 g Subst.: 21.2 ccm N (21°, 761 mm).

$C_9H_{13}N_3O_5$. Ber. N 17.28. Gef. N 17.57.

0.3501 g Subst. (in 3.5 ccm Wasser, Gesamtgewicht der Lösung 3.8331 g) drehten im 1-dm-Rohr bei 21° und Natriumlicht 2.71° ($\pm 0.03^\circ$) nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{21} = +29.63^\circ$ ($\pm 0.3^\circ$).

Furfurol-Destillation des Cytidinsulfats. 0.6150 g Substanz wurden mit Salzsäure vom spez. Gewicht 1.06 destilliert. Die Salzsäure ließ man von Zeit zu Zeit aus einem Tropftrichter zufließen. Das Destillat wurde alle zwei Stunden mit essigsäurem Anilin auf Anwesenheit von Furfurol geprüft. Die Destillation wurde über Nacht unterbrochen und am folgenden Tage fortgesetzt. Nach 36 Stunden gab das Destillat keine Rotfärbung mit essigsäurem Anilin mehr, worauf die Destillation beendet wurde. Das Furfurol wurde als

¹⁾ Der Stickstoff wurde hier, wie bei den nachfolgenden Bestimmungen, über Wasser gemessen.

Phloroglucid niedergeschlagen und gewogen. Seine Menge betrug 0.2642 g. Da die Ausbeute, welche Ribose an Furfurol liefert, noch nicht bekannt ist, wurde die Substanz auf Arabinose berechnet; sie entsprach 0.3037 g, während die Theorie für Ribose 0.3146 verlangt.

Gewinnung des Uridins.

Für die Darstellung dieses Körpers kann man entweder ebenfalls von dem Filtrat vom Adenosinphosphat, wie beim Cystidin ausgehen oder wenn man Zeit und Reagenzien sparen will, unter Opferung des Adenosins, das zum Sirup eingedampfte Filtrat von Guanosin verwenden.

Das Filtrat von Guanosin, das man bei der Hydrolyse aus 200 g Hefenucleinsäure erhält, wird in einer Schale auf dem Dampfbad auf ca. 75 ccm eingedampft und der dunkle Sirup mit Hilfe von ca. 50 ccm heißem Wasser in einen 2-l-Fraktionierkolben gespült. Es werden darauf 1½ l absoluten Alkohols zugegeben und die Lösung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt.

Während des Einleitens läßt man die Temperatur ruhig steigen, bis der Alkohol beinahe zu sieden anfängt, kühlt dann ab und fährt mit dem Einleiten fort, bis die Lösung gesättigt ist.

Hierdurch wird erstens Spaltung der Puringlucoside und teilweise Ausscheidung der Purine als Chlorhydrate, sowie eine teilweise Ausscheidung des Cytidins als salzsaures Salz erreicht; zweitens verwandelt sich auch der freie Zucker in das Äthylglucosid. Ohne von dem ausgeschiedenen Material abzufiltrieren, wird etwa ⅓ der alkoholischen Salzsäure im Vakuum abdestilliert und dann nach Zugabe des gleichen Volumens Alkohol auf der Nutsche filtriert und mit Alkohol gut gewaschen. Das Filtrat hat jetzt ein Volumen von 3½ l. Es wird nun unter Rühren Bleizucker, der in 95-proz. Alkohol heiß gelöst ist, zugegeben, bis die Lösung nicht mehr sauer auf Congo reagiert, und dann noch ca. 100 g im Überschuß. Es ist ca. 1 kg Bleizucker erforderlich, das man in 1½ l Alkohol heiß löst. Der Bleizucker bewirkt Ausscheidung der Phosphorsäure sowie der Hauptmenge der Salzsäure. Nach dem Filtrieren und Waschen des Niederschlages mit Alkohol wird das Filtrat auf ca. 1 l im Vakuum eingeengt, auf 3 l mit Wasser verdünnt und so viel aufgeschlämmtes Silberoxyd zugegeben, bis die Lösung eine positive Reaktion auf Silber zeigt. Nach einigem Stehen wird von dem schmutzigen Niederschlag abfiltriert und das Filtrat von Blei und Silber durch Schwefelwasserstoff befreit. Das Silberoxyd bewirkt die Entfernung der noch vorhandenen Purine und der Salzsäure und wahrscheinlich auch noch anderer Verunreinigungen. Noch bevor man von den Sulfiden abfiltriert, gibt man so viel Bleizuckerlösung zu, bis der Überschuß an Schwefelwasserstoff abgesättigt ist. Nach dem Filtrieren und Waschen wird mit 350 ccm einer bei Zimmertemperatur gesättigten (ca. 40-proz.) Lösung von Bleizucker versetzt und die Lösung, die jetzt ein Volumen von ca. 6 l hat, mit einer heißen, konzentrierten Lösung von Bariumhydroxyd versetzt, bis die Fällung vollständig ist. (Der Niederschlag, der sich bei der

ersten Zugabe von Barythydrat bildet, löst sich wieder auf.) Ein Überschuß von Barythydrat ist streng zu vermeiden. Der sehr voluminöse weiße Niederschlag wird auf der Nutsche abfiltriert, gut gewaschen und in einer starken Flasche mit verdünnter Schwefelsäure in der üblichen Weise zerlegt. Ohne zu filtrieren, wird der Überschuß der Schwefelsäure durch Zugabe von wenig Bleicarbonat neutralisiert und dann nach dem Filtrieren der Überschuß von Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Lösung im Vakuum zum dicken Sirup konzentriert. Dieser wird in ca. 150 ccm Alkohol warm aufgenommen und ohne weiteres in einer Schale auf dem Wasserbade auf ca. 60 ccm eingengt. Manchmal fängt schon während des Eindampfens, jedenfalls beim Reiben mit einem Glasstab, die Krystallisation des Uridins an, und nach wenigen Minuten ist der Inhalt der Schale zu einem Kuchen erstarrt. Nach einigem Stehen im Eisschrank wird die Krystallmasse mit wenig Alkohol angerieben und abfiltriert.

Ausbeute bis 20 g, normalerweise ca. 16 g.

Das so gewonnene Produkt ist fast ganz rein. Zur völligen Reinigung wird es in ca. 8 Teilen 90-proz. Alkohol gelöst, mit wenig Tierkohle versetzt und heiß filtriert. Aus der auf die Hälfte eingedampften Lösung krystallisiert das Uridin in rein weißen, großen Krystallen. Ausbeute an chemisch reiner Substanz (Schmp. 165°) 14—18 g. Hat man das Filtrat vom Adenosin-pikrat verwendet, so beträgt die Ausbeute nur ca. 10 g.

0.1501 g Sbst.: 0.2444 g CO₂, 0.0688 g H₂O.

C₉H₁₂O₆N₂. Ber. C 44.27, H 4.98.

Gef. » 44.35, » 5.08.

Aus dem Filtrat vom rohen Uridin kann man noch 2—3 g Cytidin als Nitrat gewinnen.

Molekulargewichtsbestimmung. 0.3628 g Sbst. in 25 ccm Wasser bewirkten eine Erniedrigung des Gefrierpunktes um 0.11°.

Ber. M 244. Gef. M 250.

Hydrolyse mittels Brom und Bromwasserstoffsäure.

15 g Cytidinnitrat wurden mit 250 ccm 10-prozentigem Bromwasserstoff und 20 g Brom 7 Stunden am Rückflußkühler gekocht und die Lösung dann in Vakuum eingedampft. Gegen Ende der Destillation findet eine Entwicklung von Brom statt, sowie Ausscheidung eines krystallisierten Körpers. Der Inhalt des Kolbens wird mit ca. 30 ccm Wasser aufgenommen und der Krystallisation überlassen. Die Menge des schwer löslichen Körpers betrug 2.5 g. Er wurde aus Wasser umkrystallisiert. Schmp. 293° (unkorr.). Er ist der Analyse und den Eigenschaften nach das 5-Brom-uracil¹⁾.

¹⁾ Am. 29, 486.

0.1568 g Sbst.: 0.1538 g AgBr. — 0.1514 g Sbst.: 0.0240 g H₂O, 0.1406 g CO₂. — 0.1220 g Sbst.: 15.6 ccm N (27°, 765 mm).

C₄H₃N₂O₂Br. Ber. C 25.13, H 1.57, N 14.65, Br 41.88.
Gef. » 25.30, • 1.76, • 14.20, » 41.74.

Das Filtrat von Bromuracil wurde etwas verdünnt, mit einem Überschuß von reinem Silberoxyd behandelt, nach einigem Stehen filtriert und das Filtrat durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit. Nachdem man den Schwefelwasserstoff durch Kochen vertrieben hatte, wurde in der üblichen Weise mit reiner Bleizuckerlösung und Barythydrat gefällt und der Bleiniederschlag mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt. Der Überschuß der Schwefelsäure wurde mit wenig Bleicarbonat entfernt und in das Filtrat Schwefelwasserstoff eingeleitet. Nach dem Eindampfen auf ca. 50 ccm wurde alsdann so lange mit Cadmiumcarbonat gekocht, bis die Lösung nicht mehr sauer reagierte, nach dem Filtrieren wurde sodann auf dem Wasserbade auf ca. 8 ccm eingedampft. Nach dem Abkühlen wurde mit einem Kryställchen von ribonsaurem Cadmium geimpft und stehen gelassen. Nach einigen Tagen ist der Inhalt der Schale zu einem festen Kuchen erstarrt. Die rohe Substanz wurde mit wenig 50-prozentigem Alkohol angerieben und auf der Nutsche filtriert. Ihre Menge betrug 1.55 g.

Zur Analyse wurde aus ca. 2 ccm Wasser umkrystallisiert.

0.2132 g Sbst.: 0.1008 g CdSO₄.

(C₅H₉O₆)₂Cd. Ber. Cd 25.34. Gef. Cd 25.41.

0.1545 g Substanz in 1.54 ccm ⁿ/₁-H₂SO₄, Gesamtgewicht der Lösung 1.72 g, drehten im 0.5-dm-Rohr 0.25° nach rechts¹⁾. Mithin $[\alpha]_{20}^D = + 8.42^\circ$.

Das Lacton der *d*-Ribonsäure wurde durch Zerlegung des Cadmiumsalzes durch Schwefelwasserstoff erhalten; es zeigte, aus Essigester umkrystallisiert, den Schmp. 72—78°²⁾.

Phenylhydrazid. Dieses Derivat wurde genau nach Fischer und Piloty³⁾ dargestellt. Aus 50-prozentigem Alkohol umkrystallisiert, zeigte es den unscharfen Schmp. 162° und zersetzte sich bei ca. 180° unter Gasentwicklung.

0.1560 g Sbst.: 15.6 ccm N (25°, 764 mm).

C₁₁H₁₆N₂O₅. Ber. N 10.94. Gef. N 11.27.

Bromierung des Uridins.

2 g Uridin werden so lange mit Bromwasser versetzt, bis die rote Farbe eben nicht augenblicklich verschwindet; dann wird die Lö-

¹⁾ Die Lösung dreht zunächst nach links und kommt erst nach einigem Stehen zu einer konstanten Rechtsdrehung.

²⁾ B. 24, 4214 [1891].

³⁾ Ibid.

sung zum Sirup im Vakuum eingedampft. Dieser wird in absolutem Alkohol aufgenommen und in einer Schale auf dem Wasserbad unter Rühren mit einem Glasstab eingedampft, bis der Körper krystallinisch erstarrt. Nach dem Anreiben mit absolutem Alkohol und Trocknen wog das Produkt 2 g. Aus 5 Tln. 95-proz. Alkohol umgelöst, zersetzt sich der Körper bei 181—184° (unkorr.). Die gleiche Verbindung entsteht, wenn man eine konzentrierte Lösung von Uridin mit einem Überschuß von Brom behandelt und nach längerem Stehen mit Alkohol kocht.

Das Brom-uridin zeigt fast alle Eigenschaften des Uridins. Es reduziert Fehlingsche Lösung erst nach Behandlung mit Brom, auch gibt es eine gleich schwache Orcinreaktion. Das Brom läßt sich nur unter Zersetzung der Verbindung durch längeres Kochen mit starker Lauge abspalten.

0.1288 g Subst.: 0.1568 g CO₂, 0.0420 g H₂O. — 0.1685 g Subst.: 0.0976 g AgBr. — 0.1541 g Subst.: 11.4 ccm N (20°, 765 mm).

C₉H₁₁N₂BrO₆. Ber. C 33.43, H 3.41, Br 24.76, N 8.66.

Gef. » 33.20, » 3.62, » 24.67, » 8.48.

0.6028 g Substanz in 6 ccm Wasser, Gesamtgewicht der Lösung 6.6054 g, drehen bei 21° und Natriumlicht -1.40° ($\pm 0.02^{\circ}$). Mithin

$[\alpha]_{D}^{21} = -15.38^{\circ}$ ($\pm 0.02^{\circ}$).

Oxy-uridin.

Als Zwischenprodukt bei der Darstellung des Brom-uridins entsteht ohne Zweifel das dem 4-Oxy-5-brom-dihydro-uracil analoge Derivat des Uridins, denn beim Kochen einer Lösung von Uridin, die man, wie beim Bromuracil, mit Brom behandelt hat, mit Bleioxyd wird das Brom quantitativ abgespalten.

2 g Uridin werden mit Bromwasser behandelt, bis die Farbe eben bestehen bleibt, dann wird die Lösung 1 Std. mit Bleioxyd gekocht. Die Flüssigkeit wurde, ohne zu filtrieren, auf 20 ccm eingedampft, nach dem Abkühlen mit ca. 2 Volumen Alkohol versetzt und nach einigem Stehen filtriert. Das Blei wurde durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Lösung, die noch sauer auf Congo reagierte, zum Sirup eingedampft und im Exsiccator stehen gelassen. Es krystallisierte langsam ein Körper aus, der nach 2—3 Tagen von der anhaftenden Mutterlauge durch Streichen auf Ton befreit wurde. Die Krystalle wurden mit Alkohol angerührt und nach dem Filtrieren aus demselben Lösungsmittel umkrystallisiert. Schmp. 222—223° (unkorr.). Die Verbindung ist der Analyse nach Oxy-uridin.

0.1205 g Subst.: 0.1822 g CO₂, 0.0533 g H₂O.

C₉H₁₂N₂O₇. Ber. C 41.53, H 4.61.

Gef. » 41.23, » 4.91.

Phenylhydrazid. 1 g Uridin wurde bis zur bleibenden roten Farbe mit Bromwasser behandelt und nach dem Wegkochen des kleinen Überschusses des Broms mit 4 g Natriumacetat und 7 g Phenylhydrazin in Essigsäure versetzt. Beim Erhitzen auf dem Wasserbade fing bald die Ausscheidung der in ziegelroten Blättchen krystallisierenden Phenylhydrazin-Verbindung an. Nach 1½-stündigem Erhitzen wurde noch ca. 12 Stdn. bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen und dann, nach dem Abfiltrieren, mit 50 ccm Alkohol aufgekocht. Es findet zunächst völlige Auflösung statt und gleich darauf Auskrystallisieren des Körpers in langen, citronengelben Nadeln, die nunmehr in Alkohol sehr schwer löslich sind. Der Körper schmolz bei 209° (unkorr.). Ausbeute 0.5 g.

Ihm kommt die empirische Formel $C_{15}H_{20}N_4O_3$ zu.

0.1215 g Sbst.: 0.2387 g CO_2 , 0.0640 g H_2O . — 0.1319 g Sbst.: 0.2579 g CO_2 , 0.0716 g H_2O . — 0.1232 g Sbst.: 17.7 ccm N (21°, 770 mm).

Ber. C 53.60, H 5.95, N 16.66.

Gef. » 53.61, 53.47, » 5.88, 5.96, » 16.49.

Da die Verbindung für die Aufklärung der Konstitution des Uridins ohne Belang erschien, wurde sie nicht weiter untersucht.

Oxydation des Uridins mittels Salpetersäure.

5 g Uridin wurden in einer Glasschale mit 20 ccm Salpetersäure (1 Tl. konzentrierte Salpetersäure + 1 Tl. Wasser) auf dem Wasserbade zum Sirup konzentriert. Beim Reiben erstarrt dieser sofort zu einem harten Kuchen. Er wurde nach dem Abkühlen mit 75-prozentigem Alkohol angerieben und filtriert. Nach dem Umkrystallisieren aus 3—4 Tln. Wasser zeigt die Verbindung das Aussehen kurzer, dicker Prismen, die sich oberhalb 200°, ohne vorher zu schmelzen, zersetzen.

Die Analyse der Säure sowie die ihrer Ester zeigt, daß zwei Moleküle des Oxydationsproduktes anhydridartig zusammengetreten sind.

0.1388 g Sbst. neutralisierten 8.7 ccm $\frac{1}{10}$ -Alkali (Phenolphthalein), (berechnet 9.3 ccm.) — 0.1594 g Sbst. verloren bei 100° im Vakuum 0.0097 g H_2O . — 0.1496 g wasserfr. Sbst.: 0.1994 g CO_2 , 0.0418 g H_2O . — 0.1531 g wasserfr. Sbst.: 0.2039 g CO_2 , 0.0420 g H_2O . — 0.1460 g wasserfr. Sbst.: 18.0 ccm N (22°, 768 mm).

$C_{18}H_{16}N_6O_{17} + 2H_2O$. Ber. H_2O 5.76. Gef. H_2O 6.08.

$C_{18}H_{16}N_6O_{17}$. Ber. C 36.49, H 2.72, N 14.19.

Gef. » 36.34, 36.30, » 3.10, 3.05, » 14.10.

Ein Molekül Säure neutralisiert 4 Moleküle Alkali, wie durch Titration und Darstellung des Silbersalzes festgestellt wurde.

Das Silbersalz der Nitro-uridin-carbonsäure entsteht bei Zugabe von Silbernitratlösung zu der Lösung des Alkalisalzes der Säure. Es ist amorph und wurde deshalb nur gewaschen und bei 100° im Vakuum getrocknet.

0.2484 g Sbst.: 0.1041 g Ag.

$C_{18}H_{19}N_6O_{17}Ag$. Ber. Ag 42.3. Gef. Ag 41.9.

Äthylester und *n*-Butylester der Nitro-uridin-carbonsäure. Ein Teil Uridin wird mit Salpetersäure auf dem Wasserbade eingedampft, die entstandene Nitrosäure fein gepulvert und mit 10 Tln. äthylalkoholischer Salzsäure 15 Minuten über freier Flamme gekocht. Es findet Auflösung der Säure statt, und bald darauf krystallisiert schon in der Hitze der Ester aus, indem die Flüssigkeit sich breiartig mit feinen Nadeln erfüllt. Nach einigem Stehen im Eisschrank werden die Krystalle abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Die Ausbeute ist der Menge des angewandten Uridins gleich. Für die Analyse wurde einmal aus Alkohol umgelöst. Wie die Säure selbst, besitzt der Ester keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich oberhalb 200°.

0.1290 g Sbst.: 0.1925 g CO_2 , 0.0484 g H_2O . — 0.1979 g Sbst.: 22.0 ccm N (21°, 765 mm).

$C_{27}H_{24}N_6O_{17}$. Ber. C 40.99, H 3.72, N 13.04.

Gef. » 40.73, » 4.17, » 12.63.

Der *n*-Butylester wird auf ganz analoge Weisa wie der Äthylester dargestellt. Aus Alkohol umkrystallisiert, zeigte er den Schmp. 190—192°, nachdem er von 185° an zu sintern begonnen hatte.

0.1230 g Sbst.: 0.2089 g CO_2 , 0.0560 g H_2O .

$C_{26}H_{32}N_6O_{17}$. Ber. C 44.57, H 4.57.

Gef. » 44.45, » 4.86.

5-Nitro-uracil aus Nitro-uridin-carbonsäure.

2 g Säure wurden 3 Stunden im Rohr mit 20 ccm 20-prozentiger Schwefelsäure auf 130—135° erhitzt. Der Inhalt des Rohres hatte sich dabei unter Ausscheidung von Zersetzungsprodukten dunkel gefärbt. Er wurde verdünnt, mit Tierkohle ausgekocht und nach dem Filtrieren mit Quecksilbersulfat-Lösung gefällt. Der entstandene flockige Niederschlag wurde gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Durch Eindampfen auf dem Wasserbade wurde unreines Nitro-uracil erhalten. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser wurde es getrocknet und analysiert. Ausbeute nur 0.2 g. Die Verbindung stimmte in ihren Eigenschaften mit dem von Behrend¹⁾ dargestellten Präparat vollständig überein.

0.1201 g Sbst.: 26.9 ccm N (19°, 770 mm).

$C_4H_3N_3O_4$. Ber. N 26.75. Gef. N 26.02.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Verbindung mit Guanidin dargestellt, die man durch Zusammenbringen der wäßrigen Lösungen von Nitro-uracil mit Guanidin-carbonat erhält. Auch diese Verbindung besaß ganz die von Behrend angegebenen Eigenschaften²⁾.

¹⁾ A. 240, 5.

²⁾ A. 240, 18.

0.0990 g Sbst.: 30.5 ccm N (20°, 774 mm).

$C_5H_8N_6O_4$. Ber. N 35.90. Gef. N 35.73.

Isobarbitursäure¹⁾. 3 g Nitro-uridin-carbonsäure wurden mit 40 ccm 20-proz. Chlorwasserstoffsäure und 12 g Zinn versetzt. Nachdem die Reaktion sich gemäßigt hatte, wurde 1 Stunde gekocht und, nach Zusatz von ca. 100 ccm Wasser, durch Schwefelwasserstoff entzint. Das Filtrat vom Zinnsulfid lieferte beim Eindampfen auf ein kleines Volumen 1.1 g Isobarbitursäure.

0.1471 g Sbst.: 27.1 ccm N (18°, 772 mm).

$C_4H_4N_2O_3$. Ber. N 21.87. Gef. N 21.46.

Es gelang nicht, das zweite Spaltungsprodukt zu fassen.

Reduktion des Uridins zu Dihydro-uridin.

4 g Uridin wurden im Apparat von Paal unter Zugabe von 0.2 g kolloidalem Palladium reduziert. Die Reduktion geht sehr langsam vor sich und ist erst nach 30—35 Stunden beendet. Die Reaktionsgeschwindigkeit scheint von der Menge des Palladiums abhängig zu sein. Nachdem das Palladium durch Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure gefällt war, wurde davon abfiltriert und die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup konzentriert. Dieser wurde in absolutem Alkohol heiß gelöst und von einer geringen Menge, aus dem Palladiumpräparat herstammenden Eiweiß abfiltriert. Das Reduktionsprodukt hinterbleibt nach dem Verdunsten des Alkohols als farbloser Sirup, der nicht zum Krystallisieren gebracht werden konnte.

Ein quantitativer Versuch ergab folgendes Resultat:

0.5595 g Uridin verbrauchten 57.2 ccm H_2 (20°, 761 mm); ber. für H_2 57.5 ccm.

Eine wäßrige Lösung des Dihydro-uridins reduziert Fehlingsche Lösung gar nicht, ebenso wenig nach Behandlung mit Bromwasser. Dieses wird auch nicht entfärbt.

Sie gibt eine sehr starke Orcinreaktion, ähnlich wie die Puringlucoside, und nach der Hydrolyse kräftige Reduktion der Fehlingschen Lösung.

Eine wäßrige Lösung, deren Gehalt an Dihydrouridin aus dem Stickstoffgehalt zu 0.8056 g bestimmt war, in 20 ccm Wasser, Gesamtgewicht der Lösung 21 g, drehten in 2-dm-Rohr bei Natriumlicht 3.00° nach rechts. $[\alpha]_D = +39.1^\circ$.

4 ccm der obigen Lösung wurden für eine Kjeldahl-Stickstoffbestimmung benutzt. Sie erforderte zur Neutralisation 13.0 ccm $\%_{10}$ -Schwefelsäure.

¹⁾ A. 229, 39.

Hydrolyse des Dihydro-uridins mittels verdünnter Schwefelsäure.

Eine Lösung von Dihydrouridin, das bei der Reduktion von 4 g Uridin entstanden war, wurde 1½ Stunden lang in 100 ccm 3-prozentiger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Schwefelsäure wurde dann mit Bariumcarbonat gefällt und die Lösung in Vakuum auf 20 ccm eingedampft. Eine geringe Menge Barium wurde durch einige Tropfen verdünnter Schwefelsäure gefällt, und dann kochend heiß abfiltriert. Beim Abkühlen in Eiswasser, krystallisierten 1.4 g Dihydro-uracil aus, das zur Analyse einmal aus Wasser umkrystallisiert wurde. Es zeigte den Schmp. 274°, wie für Dihydro-uracil angegeben ist¹⁾.

0.1146 g Sbst.: 0.1790 g CO₂, 0.0570 g H₂O.

C₄H₆N₂O₂. Ber. C 42.10, H 5.26.

Gef. » 42.58, » 5.51.

Das Filtrat vom Dihydrouracil wurde mit 100 ccm Wasser verdünnt und mit 1 g Natriumacetat und 3 g Phenylhydrazin in Essigsäure versetzt. Beim Erhitzen auf dem Wasserbade begann bald die Ausscheidung des Osazons, dessen Menge nach 3 Stunden 1,6 g betrug.

Nach dem Umlösen aus pyridinhaltigem Wasser schmolz das Osazon bei 163—164°. Es drehte in 10-prozentiger pyridin-alkoholischer Lösung in 0.5-dm-Rohr bei Natriumlicht 42° (± 0.5°) nach links: α_D = — 84°²⁾.

0.1745 g Sbst.: 26.0 ccm N (22°, 760 mm).

C₁₇H₂₀N₄O₃. Ber. N 17.07. Gef. N 16.85.

81. W. Borsche: Über die Reduktion einiger mehrfach ungesättigter Säuren nach der Methode von Paal.

[Aus dem Allgemeinen Chemischen Institut der Universität Göttingen.]

(Eingegangen am 26. Februar 1912.)

Schon vor einigen Monaten erlaubte ich mir, in anderem Zusammenhange kurz darauf hinzuweisen³⁾, daß ich bei der Weiterführung meiner Versuche über das beste Verfahren zur Darstellung der δ-Phenyl-valeriansäure [I],



Cinnameryl-acrylsäure und einige andere, zu ihr in naher Beziehung stehende, mehrfach ungesättigte Säuren nach der Methode von

¹⁾ M. 17, 172; B. 34, 3759 [1901].

²⁾ B. 42, 1200 [1909].

³⁾ B. 44, 2943 [1911].