

dampfen des Filtrats und Verreiben des Rückstandes mit Wasser gewonnene Substanz erweist sich identisch mit dem schon bekannten Tetracetyl-6-jodhydrin der Glucose⁵⁾.

1.2.3.6-Tetracetyl-glucose-4-jodhydrin.

1 g 1.2.3.6-Tetracetyl-4-mesyl-glucose wird mit 5 g wasserfreiem Jodnatrium in 22 ccm absol. Aceton 70—72 Stdn. im Einschlußrohr auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten wird die ziemlich stark gefärbte Lösung von dem ausgeschiedenen Salzgemisch abesaugt. Der Niederschlag ist nach gründlichem Auswaschen mit Aceton (zur Entfernung von Jodnatrium) die theoretisch erforderliche Menge von Natrium-methansulfonat. Das Filtrat wird auf ein kleines Volumen eingedampft, bis sich beim Erkalten (farbige) Salzausscheidungen zeigen. Durch Zugabe von Wasser fällt man das Tetracetyl-4-jodhydrin in Form von weißen Nadeln aus. 3-maliges Umkrystallisieren aus wenig gewöhnlichem Alkohol ergibt eine schwefelfreie Substanz, die nach Sintern von etwa 190° an bei 199—200° unter Braunfärbung schmilzt. Ausb. etwa 0.5 g (46% d. Th.).

3.801 mg Sbst.: 1.927 mg AgJ.

$C_{14}H_{19}O_9J$ (458.0). Ber. J 27.7. Gef. J 27.4.

$[\alpha]_D^{20}$: $+1.28^\circ \times 1.0557 / 0.0266 \times 1 \times 0.981 = +51.8^\circ$ (Pyridin).

116. Hellmut Bredereck und Gerd Richter: Nucleinsäuren, VII. Mitteil.¹⁾: Zur Darstellung der Pyrimidin-Nucleotide.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 11. März 1938.)

Die Pyrimidin-Nucleotide Cytidylsäure und Uridylsäure sind bisher nur auf sehr umständlichem Wege aus Hefenucleinsäure zugänglich gewesen.

Zu ihrer Darstellung wird Hefenucleinsäure von Levene²⁾ mit 2-proz. Schwefelsäure, von Thannhauser³⁾ mit Pikrinsäure gespalten. Dabei wird die Glykosidbindung der beiden Purin-Nucleotide Guanylsäure und Adenylsäure gesprengt, während die Pyrimidin-Nucleotide unangegriffen bleiben. Nach, insbesondere bei dem Leveneschen Verfahren, komplizierter Aufarbeitung werden die Brucinsalze der Pyrimidin-Nucleotide gewonnen, die dann durch neunmaliges Umkrystallisieren aus 35-proz. Alkohol getrennt werden. Das schwerer lösliche uridylsaure Brucin krystallisiert aus, während das leichter lösliche cytidylsaure Brucin aus den Mutterlaugen gewonnen wird. Die Brucinsalze werden schließlich auf dem Wege über die Ammonium- und Bleisalze in die freien Säuren übergeführt.

⁵⁾ Helferich u. Collatz, B. **61**, 1640 [1928].

¹⁾ VI. Mitteil.: B. **71**, 408 [1938].

²⁾ Levene u. Jacobs, B. **44**, 1027 [1911].

³⁾ Thannhauser u. Dorf Müller, Ztschr. physiol. Chem. **104**, 65 [1919].

Levene⁴⁾ beschreibt noch ein weiteres Verfahren, das die gleichzeitige Herstellung aller 4 Nucleotide ermöglicht. Dazu wird Hefenucleinsäure im Autoklaven mit Ammoniak gespalten und nach Abtrennung der Guanylsäure die Uridyl-, Cytidyl- und Adenylsäure durch 9-maliges fraktioniertes Umkrystallisieren ihrer Brucinsalze getrennt. Wir haben diese letztere Methode mehrfach angewendet, erreichten jedoch nur schwer eine einwandfreie Trennung, insbesondere der Cytidyl- und Adenylsäure.

Durch Auffinden von Löslichkeitsunterschieden zwischen Uridyl- und Cytidylsäure sind wir jetzt zu einer einfachen Methode der Trennung dieser beiden Säuren gelangt. Aus konzentrierter wäßriger Lösung wird Cytidylsäure mit Pyridin gefällt, während die Uridylsäure in Lösung bleibt. Die gefällte Cytidylsäure wird über das Bleisalz gereinigt und in guter Ausbeute krystallin erhalten. Durch zweimaliges Reinigen der Uridylsäure über das Bleisalz erhält man ein Präparat, das zwar nicht durchweg krystallisiert ist, jedoch bereits eine gute Drehung zeigt. Die schwere Krystallisierbarkeit der Uridylsäure ist bekannt. Daher arbeitete man auch nach den bisherigen Methoden schon so, daß man das Ammoniumsalz isolierte und dann noch zweimal über das Bleisalz reinigte. Will man daher nach dem neuen Verfahren die Uridylsäure vollkommen rein bekommen, so stellt man aus der Uridylsäure-Lösung zunächst das Brucinsalz her und daraus dann über das Ammonium- und Bleisalz die freie Säure.

Wir haben diese neue Trennungsmethode bei der schwefelsauren Hydrolyse der Hefenucleinsäure angewandt, die wir darüber hinaus noch wesentlich vereinfacht haben, u. a. durch Weglassen der Silberoxydfällung. Ebenso gut muß sie sich auch bei der Pikrinsäure-Spaltung durchführen lassen.

Für Bereitstellung von Mitteln danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Der Firma C. F. Boehringer, Mannheim-Waldhof, sind wir für Überlassung der Hefenucleinsäure zu großem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung der Pyrimidin-Nucleotide.

100 g Hefenucleinsäure (Boehringer) werden in 1 l 2-proz. Schwefelsäure im Ölbad von 105—110° 2 Stdn. erwärmt. Nach Erkalten wird die braune Lösung 3.8-proz. an Schwefelsäure gemacht, und nach Stehenlassen über Nacht bei 0° das auskrystallisierte Guaninsulfat abgesaugt. Ausb. 10—12 g. Sodann wird die Schwefelsäure mit der berechneten Menge Barytwasser quantitativ aus der Lösung entfernt. Ein Überschuß an Barytwasser ist zu vermeiden. Nach Schütteln mit wenig Tierkohle — man vermeidet damit allzu starkes Schäumen — wird die Lösung im Vak. bei etwa 50° auf etwa 160 ccm eingeeengt. Beim Stehenlassen bei 0° fällt u. U. noch etwas Guanin aus. Das Filtrat engt man vollkommen ein und läßt zu dem zurückbleibenden Sirup bei Eiskühlung unter Rühren 700 ccm Pyridin tropfen. Die Cytidylsäure setzt sich als amorpher klebriger Niederschlag ab. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und im Vak. auf etwa 80 ccm eingeeengt. Bei nochmaliger Zugabe von Pyridin fällt noch eine kleine Menge Cytidylsäure aus.

⁴⁾ Journ. biol. Chem. **33**, 425 [1918]; **40**, 415 [1919].

Die ausgefällte Cytidylsäure wird einige Male mit Pyridin gewaschen, sodann in 200 ccm Wasser gelöst und mit 25-proz. Bleiacetatlösung gefällt. Das Bleisalz wird in 250 ccm Wasser aufgeschlämmt, mit Essigsäure angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat wird mit wenig Tierkohle geschüttelt und im Vak. bei 40° auf 25 ccm eingengt. Diese Flüssigkeitsmenge wird erwärmt und mit soviel warmem Alkohol versetzt, daß eine Trübung bestehen bleibt. Beim Stehenlassen krystallisiert — u. U. nach Animpfen — die Cytidylsäure aus. Ausb. 6.5 g. Zum Umkrystallisieren wird die Substanz in 100 ccm Wasser heiß gelöst, von wenig Ungelöstem abfiltriert und mit 240 ccm heißem Alkohol versetzt. Beim Erkalten krystallisiert die Cytidylsäure aus. Ausb. 5.6 g. Schmp. 230°. $[\alpha]_D^{20}$: +49.1°. Nach Levene $[\alpha]_D$: +48.5°.

Die Pyridinlösung wird auf etwa 40 ccm eingengt, mit Wasser wieder auf 150 ccm verdünnt und so lange mit Alkohol versetzt, bis bei weiterer Zugabe nur noch eine geringe Trübung auftritt. Der Niederschlag, der in der Hauptsache noch aus wenig Cytidylsäure besteht, wird abgesaugt und das Filtrat zur Trockne verdampft.

Will man die reine krystallisierte Uridylsäure herstellen, so nimmt man den Rückstand in 250 ccm Wasser auf und stellt durch Zugabe von alkoholischer Brucinlösung das Brucinsalz her, das man dann nach der Vorschrift von Levene über das Ammonium- und Bleisalz in die freie Säure überführt.

Eine fast reine, jedoch nicht durchweg krystallisierte Uridylsäure erhält man auf folgende Weise: Der Rückstand wird in 250 ccm Wasser aufgenommen und durch Zugabe von 25-proz. Bleiacetatlösung das Bleisalz hergestellt, das wie üblich mit Schwefelwasserstoff zerlegt wird. Das Filtrat wird noch ein zweites Mal über das Bleisalz gereinigt. Die Lösung wird sodann im Vak. bei 50° auf etwa 10 ccm eingengt, dann weiter in einem Krystallisierschälchen im Exsiccator zum Sirup. Durch Zugabe von 10 ccm absol. Alkohol wird die Uridylsäure ausgefällt und unter öfterem Reiben noch einen Tag im Exsiccator aufbewahrt. Einige Kubikzentimeter Alkohol werden zugegeben und abgesaugt. Dann wird nochmals mit wenig heißem Alkohol verrieben, abgesaugt und getrocknet. Ausb. 4 g. $[\alpha]_D^{20}$: +11.1° (in Wasser). Nach Levene: $[\alpha]_D$: +9.5°.

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Diammoniumsalz dargestellt: 0.5 g Uridylsäure werden in 5 ccm Wasser gelöst und bis zu schwach alkalischer Reaktion mit Ammoniak versetzt. Die Lösung läßt man im Vak.-Exsiccator über Chlorcalcium eindunsten, nimmt den Rückstand in einer möglichst kleinen Menge Wasser (0.5—1.0 ccm) auf und versetzt die warme Lösung bis zur schwachen Trübung mit Methylalkohol. Beim Stehenlassen scheidet sich das Diammoniumsalz der Uridylsäure ab, das nochmals aus Wasser/Methylalkohol umkrystallisiert wird. $[\alpha]_D^{20}$: +21.9°. Nach Levene⁵⁾: $[\alpha]_D^{20}$: +21.0°.

⁵⁾ Journ. biol. Chem. 40, 396 [1919].