

159.5). — Die 2. Fraktion wurde gleichfalls nochmals fraktioniert: a) 75—125⁰ (insbesondere 100—125⁰), 38.5 g; b) 125—190⁰ (insbesondere um 175⁰), 11 g. Die Fraktion a besteht in der Hauptsache aus Octenen neben wenig Octanen (Jodrhodanzahl 209.7); auch die Fraktion b ist überwiegend ungesättigt (Jodrhodanzahl 146.0). — Die Fraktion 3 zeigt bei nochmaliger Destillation eine bei Sdp.₄ 101—104⁰ einheitlich übergehende Fraktion (Tetrameres des Iso-butylens, worauf auch die Analysen stimmen).

Isohexen: 102 g Isohexen und 9.5 g BeCl₂ werden 4 Stdn. im Auto-klaven bei 200⁰ (etwa 20 Atm.) erhitzt. Ausbeute nach Reinigen und Trocknen: 88 g. Destillation: 1. Frakt. 22—57⁰, 3.0 g (3.4%); 2. Frakt. 57—66⁰, 17.2 g (19.6%); 3. Frakt. 66—74⁰, 6.8 g (7.7%); 4. Frakt. 74—188⁰, 31.4 g (35.7%); 5. Frakt. 70—195⁰/13 mm, 24.3 g (27.6%); 6. Frakt. 195—295⁰/13 mm, 4.8 g (5.5%); Rest 0.5 g (0.5%).

Die Fraktion 2 besteht zu etwa 50% aus Ausgangsmaterial, der andere Teil besteht aus hydrierten Produkten.

Crackversuche.

Anthracen bzw. Phenanthren und BeCl₂.

Ein Gemisch von 200 g gereinigtem Anthracen und 35 g BeCl₂ wird in einer Retorte 1 Tag im Sandbad von 300⁰ erhitzt. Bei der anschließenden Destillation gehen 23 g einer grün-braunen Flüssigkeit über, die nochmals fraktioniert wird. 1. Frakt. 80—180⁰, 0.6 g; 2. Frakt. 180—320⁰, 20 g. Bei der nochmaligen Destillation der Fraktion 2 geht 1 Tl. bei 200—220⁰ über. Bei der Nitrierung wird Dinitrotetralin erhalten. Zur Dehydrierung werden 20 g der Fraktion 2 mit 10 g Schwefel 4 Tage bei 200—240⁰ behandelt. Bei der Destillation gehen bis 300⁰ 5 g über, woraus nach Umkrystallisieren aus 75-proz. Alkohol und Aufarbeiten der Mutterlauge 4 g Naphthalin gewonnen werden. Über weitere von uns durchgeführte Versuche soll später nach Charakterisierung der Spaltprodukte berichtet werden.

Bei einem analogen Versuch mit Phenanthren werden 31 g Rohprodukt erhalten.

235. Hellmut Bredereck und Gerhard Müller: Zur fermentativen Aufspaltung der Hefe- und Thymonucleinsäure (Nucleinsäuren, XIV. Mitteil. *).

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

(Eingegangen am 14. Juni 1939.)

Vor einiger Zeit konnten wir zeigen, daß nichts gegen die Annahme spricht, daß Hefe- und Thymonucleinsäure von ein und derselben „sauren“ Polynucleotidase (p_H 4.9) gespalten werden¹⁾. In der vorliegenden Untersuchung wird nunmehr über die fermentative Spaltung der beiden Polynucleotide im alkalischen Milieu berichtet.

Klein²⁾ hatte festgestellt, daß ein Fermentpräparat aus der Darmschleimhaut des Kalbes bei p_H 9 Hefenucleinsäure wesentlich langsamer als Thymonucleinsäure dephosphoryliert. Die Abspaltung von Phosphorsäure aus den Nucleotiden durch das Ferment „Nucleotidase“ setzt voraus, daß

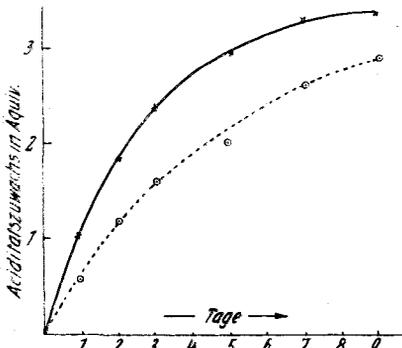
*) XIII. Mitteil.: B. 72, 121 [1939].

1) Bredereck, Caro u. Richter, B. 71, 2389 [1933].

2) Ztschr. physiol. Chem. 218, 164 [1933].

zunächst eine Aufspaltung des Polynucleotids in seine Nucleotide eintritt. Dabei nimmt Klein²⁾ an, daß die Thymonucleinsäure durch die im Fermentpräparat vorhandene Polynucleotidase — von ihm „Thymonucleinase“ genannt — in die Nucleotide gespalten wird, während die Hefenucleinsäure nicht durch dieses Ferment, sondern durch das alkalische Milieu von p_H 9 aufgespalten wird. Er nimmt also an, daß in der Darmschleimhaut eine spezifisch auf Thymonucleinsäure eingestellte Polynucleotidase vorliegt, die nur diese, aber nicht Hefenucleinsäure zu spalten vermag. Levene und Dillon³⁾ fanden mit einem Aceton-Trockenpräparat aus Darmfistelsaft (Hund) bei p_H 8.7 eine etwas stärkere Phosphorsäure-Abspaltung aus Hefenucleinsäure als aus Thymonucleinsäure. In einer späteren Arbeit fand Klein⁴⁾ wiederum mit einem Darmschleimhautpräparat etwa die gleiche Dephosphorylierung für Hefe- und Thymonucleinsäure. Ob in diesem Fall eine Spaltung der Hefenucleinsäure durch eine Polynucleotidase erfolgt, läßt er offen.

Um die gestellte Frage beantworten zu können, war es notwendig, die Polynucleotidase-Wirkung, d. h. die Aufspaltung in die Nucleotide bestimmen



Spaltung der Hefe- und Thymonucleinsäure durch die Polynucleotidase

— Hefenucleinsäure
 - - - Thymonucleinsäure

zu können. In früheren Arbeiten hatten wir zur Bestimmung die Messung des Aciditätszuwachses herangezogen. Um bei Spaltungen im alkalischen Milieu diese Arbeitsweise durchführen zu können, haben wir ohne Puffer gearbeitet, vielmehr um das schwach alkalische Milieu zu halten, in bestimmten Zeitabständen wieder gegen Phenolphthalein neutralisiert. Bei dieser Arbeitsweise lag das p_H der Spaltungsansätze zwischen 7.5—8.3, d. h. ein klein wenig tiefer als bei früheren Versuchen. Dabei konnten wir in Kontrollversuchen ohne Ferment kaum eine durch das alkalische Milieu verursachte Aufspaltung der Hefenucleinsäure beobachten. Wir möchten hier nebenbei bemerken, daß wir bei stärker alkalischem Milieu z. B. p_H 9 Unterschiede in der Eigenaufspaltung bei verschiedenen Hefenucleinsäurepräparaten feststellen konnten. Wir halten es für möglich, daß dieses Verhalten durch eine verschiedene Molekülgröße der einzelnen Präparate begründet ist.

Unsere Versuche ergaben, daß Hefenucleinsäure ebenso wie Thymonucleinsäure durch eine in der Darmschleimhaut des Kalbes vorkommende Polynucleotidase gespalten wird. Die Spaltung der Hefenucleinsäure verläuft etwas schneller als die der Thymonucleinsäure (s. Kurven). Es ist durchaus möglich, wenn auch nicht bewiesen, daß Hefe- und Thymonucleinsäure von ein und derselben Polynucleotidase gespalten werden. Sicher ist es nicht richtig, auf Grund der verschiedenen Spaltungsgeschwindigkeit ohne weiteres auf Vorliegen von 2 Polynucleotidasen zu schließen. Die weitere Phosphor-

³⁾ Journ. biol. Chem. 88, 753 [1930].

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 231, 104 [1935].

säure-Abspaltung aus den zunächst entstandenen Nucleotiden durch die „Nucleotidase“ verlief erwartungsgemäß, d. h. sie blieb stets ein wenig hinter der Aufspaltung in die Nucleotide zurück.

Für Unterstützung der vorliegenden Arbeit sind wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Substrate: Die verwendete Hefenucleinsäure (Boehringer, Mannheim-Waldhof) wurde einmal über das Bleisalz gereinigt. Die Thymonucleinsäure wurde aus Rindermilz dargestellt und nach einer früher angegebenen Methode gereinigt⁵⁾. Beide Säuren wurden bei 75°/2 mm zur Konstanz getrocknet.

Ferment: Die Dünndarmfermentlösung wurde nach den Angaben von Klein⁶⁾ hergestellt (ohne Zusatz von Natronlauge).

Versuchs-anordnung: Es wurde jeweils $\frac{1}{1000}$ Mol Nucleinsäure eingewogen. Die Säure wurde in etwa 50 ccm Wasser aufgeschlämmt und mit *n*-NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Sodann wurden 40 ccm gegen

Spaltung der Hefenucleinsäure.

Gesamt- auer d. paltung u Tagen	Bestim- mung nach Tagen	verbr. ccm <i>n</i> ₁ -NaOH Ansatz Nr.				noch vor- handene Menge des ursprüng- lichen An- satzes in %	Zuwachs in Äquiv.		mg P pro 5 ccm Probe Ansatz Nr.			Menge des pro Probe entnomme- nen ursprüng- lichen Sub- stratanteils in %	P- Absp. in % d. Th.
		1	2	5	1— (2 + 5)		je- weiliger Zuwachs	Gesamt- Zuwachs	1	5	(1-5)		
2	1	0.82	0.01	0.03	0.78	95.1	0.83	1.86	4.050	0.235	3.815	4.89	62.9
3	1	0.54	0.00	0.03	0.51	90.2	0.57	2.43	4.140	0.240	3.900	4.86	64.7
5	2	0.48	0.01	0.00	0.47	85.3	0.55	2.98	4.790	0.247	4.543	4.83	75.9
7	2	0.32	0.00	0.03	0.29	80.4	0.36	3.34	5.090	0.247	4.843	4.81	81.2
9	2	0.03	0.00	0.00	0.03	75.8	0.04	3.38	5.080	0.246	4.834	4.79	81.4

Spaltung der Thymonucleinsäure.

		Ansatz Nr.				100.0			Ansatz Nr.			4.93	
		3	4	5	3— (4 + 5)				3	5	3—5		
2	1	0.63	0.00	0.03	0.60	95.1	0.63	1.21	2.100	0.235	1.865	4.89	30.7
3	1	0.40	0.03	0.03	0.37	90.2	0.41	1.62	2.745	0.240	2.505	4.86	41.6
5	2	0.33	0.00	0.00	0.33	85.3	0.39	2.01	3.310	0.247	3.063	4.83	51.1
7	2	0.51	0.03	0.03	0.45	80.4	0.56	2.57	3.705	0.247	3.458	4.81	57.8
9	2	0.22	0.00	0.00	0.22	75.8	0.29	2.86	3.835	0.246	3.589	4.79	60.4

Phenolphthalein neutralisierte Fermentlösung, die vorher mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt war, zugegeben. Alle Ansätze wurden auf 100 ccm aufgefüllt. In den aus der Tafel ersichtlichen Zeitabständen wurde die Lösung stets wieder gegen Phenolphthalein neutralisiert. Unterschiede in der zur Neutralisation erforderlichen ccm-Anzahl Natronlauge wurden durch Zugabe von Wasser ausgeglichen. In den angeführten Zeitabständen wurden zur P-Bestimmung im Anschluß an die Neutralisation jeweils 5 ccm entnommen.

⁵⁾ Bredereck u. Caro, Ztschr. physiol. Chem. **253**, 179 [1938]; Bredereck u. Müller, B. **72**, 118 [1939].

⁶⁾ Klein, Ztschr. physiol. Chem. **207**, 125 [1932].

Die sich daraus ergebende Änderung der Konzentration der Lösungen muß aus der Menge der zugegebenen und entnommenen Flüssigkeit jeweils berechnet werden. Versuchstemperatur 37°.

Die für die P-Bestimmung entnommene Probe wurde im Zentrifugenglas mit 5 ccm Magnesiamixtur und mit konz. Ammoniak im Überschuß versetzt. Nach etwa 2 Stdn. wurde der Niederschlag abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand 3-mal mit verd. Ammoniak (1 Tl. konz. Ammoniak und 3 Tle. Wasser), sodann 1-mal mit 75-proz. NH₃-haltigem Alkohol (1 l 75-proz. Alkohol + 10 ccm konz. Ammoniak) ausgewaschen. Der Niederschlag wurde dann im Vakuumexsiccator getrocknet, darauf mit 10 ccm 10-proz. Trichloressigsäurelösung aufgenommen und vom ungelöst gebliebenen Eiweiß abfiltriert. Das Filtrat wurde zur P-Bestimmung nach Theorell⁷⁾ verwendet.

Ansätze:

- 1) 1.302 g Hefenucleinsäure, 40 ccm Fermentlösung.
- 2) 1.303 g Hefenucleinsäure (Kontrollversuch ohne Ferment).
- 3) 1.251 g Thyminucleinsäure, 40 ccm Fermentlösung.
- 4) 1.251 g Thyminucleinsäure (Kontrollversuch ohne Ferment).
- 5) 40 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch ohne Substrat).

236. Ernst Thielepape und Alfred Fulde: Neue Synthese der Chininsäure (Chinolin-Reihe, IV. Mitteil. *).

(Aus Maltsch, Schlesien, eingegangen am 8. Juni 1939.)

Der eine von uns hat kürzlich über eine neue Synthese der Cinchoninsäure¹⁾ berichtet und den Aufbau analoger und homologer Chinolin-4-carbonsäuren angekündigt. Die heutige Mitteilung befaßt sich mit der entsprechenden Synthese der Chininsäure (V).

Die Chininsäure (6-Methoxy-chinolin-carbonsäure-(4)) wurde 1881 von Zd. H. Skraup²⁾ als wesentliches Produkt der Oxydation von Chinin (auch Chinidin) entdeckt. Die aus dem Abbau der Chininsäure zuerst erschlossene Struktur wurde 1912 von A. Pictet und R. R. Misner³⁾ durch Synthese aus *p*-Anisidin, Brenztraubenester und Formaldehyd (als sog. Methylal CH₂(OCH₃)₂ angewendet) bestätigt. Eine weitere Synthese führten gleichzeitig A. Kaufmann und H. Peyer⁴⁾ durch, welche vom *p*-Methoxy-chinolin ausgingen. Das Reaktionsschema wurde früher mit Formeln er-

⁷⁾ Biochem. Ztschr. **230**, 1 [1931]; **232**, 485 [1931].

*) Als III. Mitteil. gilt die Arbeit zur Reindarstellung von Lepidin (4-Methylchinolin) aus 2-Hydrazino-lepidin: E. Thielepape, B. **55**, 136 [1922].

¹⁾ E. Thielepape, B. **71**, 387 [1938]; vergl. Dtsch. Reichs-Pat. 416769 u. 670582, ferner Anmeldung T 48651 IVc/12p.

²⁾ Monatsh. Chem. **2**, 592 [1881]; vergl. Meyer-Jacobson, „Lehrbuch der organ. Chemie“, Bd. II, Teil 3, 1. u. 2. Aufl., S. 993 [1920].

³⁾ B. **45**, 1800 [1912]. Ausb. nur 3.3 % d. Th. Chininsäure-äthylester. Auch beim Ersatz des Methylals durch Orthoameisensäure-äthylester entstand Chininsäure „nur in praktisch belanglosem Maße“: J. Halberkann, B. **54**, 3091 [1921].

⁴⁾ B. **45**, 1805 [1912]; A. Kaufmann, B. **51**, 116, 122 [1918]; vergl. J. Halberkann (a. a. O.) 3079 u. 3090.