

Eine Methode zur Darstellung des Cytosins.

Von
Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)
Der Redaktion zugegangen am 11. April 1903.)

Bereits im Juni 1901 ist von mir eine zuverlässige Methode zur Darstellung des Cytosins in den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesamten Naturwissenschaften zu Marburg veröffentlicht worden. Ich gebe zunächst die damals erfolgte Publikation wieder. Dieselbe lautet:

Sonderabdruck aus den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesamten Naturwissenschaften zu Marburg, Nr. 7, Juni 1901:

Herr Fr. Kutscher hielt sodann seinen angekündigten Vortrag über: Eine Methode zur Darstellung des Cytosins.

Als ein Hauptbestandteil des Zellkerns wurde von Miescher ein komplizierter, phosphorhaltiger Eiweißkörper erkannt und isoliert, den Miescher¹⁾ Nuclein nannte. Es gelang zuerst Altmann, denselben in seine beiden Komponenten in die prosthetische Gruppe, von Altmann²⁾ als Nucleinsäure bezeichnet, sowie natives Eiweiß zu zerlegen. Nachdem dann weiter hauptsächlich Kossel und seine Schüler unter den Spaltungsprodukten der Nucleinsäure eine Reihe von Körpern nachwiesen, die der Harnsäure außerordentlich nahe stehen, nämlich Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin, wandte sich

1) Die histochemischen und physiol. Arbeiten von Fr. Miescher.

2) Archiv für Anatomie und Physiologie, physiol. Abt., Jahrgang 1889, S. 524.

das Interesse hauptsächlich der prosthetischen Gruppe des Nucleins, der Nucleinsäure, zu.

Der Gedanke, in dem Nuclein resp. der Nucleinsäure des Körpers die Muttersubstanz der normalerweise im Harn der Warmblüter als Stoffwechselprodukt abgeschiedenen Harnsäure und Purinbasen zu suchen, lag nahe, und die Mehrzahl der Arbeiten, welche sich mit der Nucleinsäure befaßten, suchte durch Stoffwechselversuche das Verhältnis zu klären, in dem das Körpernuclein zu der im Harn erscheinenden Harnsäure steht. Dagegen beschränkten sich die Arbeiten, die darauf ausgingen, den bekannten, wohl charakterisierten Spaltungsprodukten der Nucleinsäure, es waren die Phosphorsäure und die Nucleinbasen, weitere hinzuzufügen, lange Zeit nur auf eine von Kossel in Gemeinschaft mit A. Neumann ¹⁾ bekanntgegebene Veröffentlichung. In ihrer Arbeit ließen Kossel und Neumann auf die Nucleinsäure verschiedene Spaltungsmittel unter wechselnden Bedingungen einwirken. Dabei erwies es sich schließlich am vorteilhaftesten, wenn sie die Nucleinsäure mit 30%iger Schwefelsäure unter einem Druck von 4 Atmosphären zersetzten. Sie zerstörten auf diese Weise die Nucleinbasen und schufen für die Isolierung der übrigen Spaltungsprodukte der Nucleinsäure einfachere Bedingungen. Mit dieser Methode erhielten sie dann Ammoniak, eine neue Base (Cytosin), weiter Thymin (Methyldioxyrimidin), Ameisensäure, Lävulinsäure und Phosphorsäure.

Es ist mir nun gelungen, ein Verfahren auszuarbeiten, das gestattet, das Cytosin leicht und glatt zu isolieren und die Spaltungsprodukte der Nucleinsäure weiter aufzuteilen, als das bisher möglich war.

Die Nucleinsäure (Thymusnucleinsäure) wurde von mir ebenfalls durch 30%ige Schwefelsäure unter Druck zersetzt und die Spaltungsprodukte darauf durch Fällung mit Phosphorwolframsäure nach dem Vorgange von Kossel und Neumann ²⁾ in

¹⁾ Berichte der deutschen chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 2215.

²⁾ l. c.

zwei große Fraktionen geteilt. Ich will mit Fraktion I die Phosphorwolframsfällung bezeichnen. Diese wurde durch Baryt zersetzt. Darauf wurde die Flüssigkeit, welche die durch den Baryt freigemachten Körper enthalten mußte, mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit starker Silbernitratlösung versetzt. Die reichlich entstehende Fällung, ich will diese als Fällung I bezeichnen, enthielt nur Huminsubstanzen. Das Filtrat von Fällung I wurde weiter mit Silbernitratlösung versetzt, bis eine Probe davon in gesättigtem Barytwasser neben weißen, organischen Silberverbindungen braunes Silberoxyd fallen ließ. Darauf wurde das Ganze mit Baryt gesättigt. Die dadurch bewirkte Fällung will ich als Fällung II bezeichnen. Eine Probe des Filtrats von Fällung II erwies sich bei der Probe frei von Substanzen, die durch Phosphorwolframsäure sich abscheiden ließen. Es war also der gesamte Rest der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Körper quantitativ in Fällung II eingetreten. Nach Zersetzung durch Schwefelwasserstoff ließ Fällung II glatt das Cytosin auskrystallisieren. Demselben war in Spuren beigemischt ein basischer Körper, der durch Pikrinsäure von der letzten Krystallfraktion des Cytosins ohne Schwierigkeit abgetrennt werden konnte. Auf Grund vorstehender Versuche läßt sich zur Zeit sagen, daß aus der Thymusnucleinsäure bei der von Kossel und Neumann gewählten Spaltungsmethode an basischen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen der Hauptsache nach nur Cytosin entsteht. Auch aus zersetzter Hefenucleinsäure — mir standen Mutterlauge zur Verfügung, aus denen das für Hefenucleinsäure charakteristische Uracil (Dioxypyrimidin) durch Krystallisation abgetrennt war — konnte ich durch Pikrinsäure eine Base abscheiden, die mit dem Cytosin aus Thymusnucleinsäure identisch zu sein scheint.

Aus der zweiten großen Fraktion, welche die Summe der durch Phosphorwolframsäure nicht abscheidbaren Spaltungsprodukte der Nucleinsäure enthielt, entfernte ich die Schwefelsäure sowie Phosphorwolframsäure durch Baryt, ätherte sie aus und konzentrierte die ausgeätherte Flüssigkeit. Dabei schied sich bis auf Spuren das Thymin ab. Die Mutterlauge

vom Thymin wurde darauf von mir mit Silbernitrat und Baryt gefällt.¹⁾ Nachdem die Silberfällung durch Schwefelwasserstoff zersetzt worden war, ließ sich aus ihr leicht eine gut krystallisierende Substanz darstellen. Dieselbe war durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar, also kein Cytosin, aber auch kein Thymin, da sie sich nicht sublimieren ließ. Sie muß daher ein neues bisher unbekanntes Spaltungsprodukt der Thymusnucleinsäure sein. Aus 30 g Thymusnucleinsäure vermochte ich von dieser Substanz ca. 0,5 g zu gewinnen. Über dieselbe werde ich weiter arbeiten, sobald ich mir größere Mengen von Thymusnucleinsäure verschafft haben werde.

Zur Entdeckung der im vorstehenden geschilderten Methode verhalf mir ein günstiger Zufall. Von Herrn Dr. Steudel waren mir bei seiner Übersiedelung nach Heidelberg beträchtliche Mengen eines Sirups geschenkt, der die Mutterlaugen von Thymin darstellte. Das Thymin war von Steudel zu seinen Arbeiten über die Konstitution des genannten Körpers aus Heringstetikeln dargestellt worden, die nach den Angaben von Kossel und Neumann mit Schwefelsäure unter Druck gespalten waren.

Das Thymin war darauf aus den Zersetzungsflüssigkeiten nach Entfernung der Schwefelsäure und der in schwach salpetersaurer Lösung durch Silbernitrat fällbaren Substanzen, durch Silbernitrat und überschüssiges Barytwasser, niedergeschlagen worden. Die Silberfällung war durch Schwefelwasserstoff zersetzt und das Thymin durch Krystallisation abgeschieden.

Die Mutterlaugen hiervon, die hauptsächlich Arginin hätten enthalten müssen, stellten das Geschenk von Steudel an mich dar.

Als ich dieselben nach einigen Wochen besichtigte, hatten sich aus ihnen harte, ziemlich schwer lösliche Krystalle ab-

1) Nachträgliche Bemerkung. Das Filtrat dieser Silberfällung enthält die Lävulinsäure. Das lävulinsäure Silber, das an sich schwer löslich ist, wird durch überschüssiges Barytwasser völlig zersetzt. Daher findet man die Lävulinsäure schließlich im Filtrat obiger Silberfällung. Sie läßt sich daraus durch geeignete Maßnahmen ebenfalls als Silberverbindung gewinnen.

gesetzt. Dieselben ließen sich nicht ohne Schwierigkeit von der dickflüssigen Mutterlauge absaugen. Ich hielt sie zunächst für Thymin, bei näherer Untersuchung ergab sich aber, daß sie durch Phosphorwolframsäure fällbar waren und reichliche Mengen Salpetersäure enthielten. Wegen ihrer Schwerlöslichkeit sprach ich sie darauf für inaktives, neutrales Argininnitrat an. Sie lieferten aber im Gegensatz zum Argininnitrat mit Natriumpikrat ein sehr schwer lösliches Pikrat. Darauf stellte ich die freie Base dar, indem ich das salpetersaure Salz in möglichst wenig siedendem Wasser löste und die siedende Flüssigkeit mit Ammoniak stark übersättigte. Beim Erkalten schied sich die freie Base namentlich nach Zugabe von Alkohol bis auf geringe Reste aus der Flüssigkeit in weißen, glänzenden Blättern ab. Sie besaß alle Eigenschaften, die von Kossel und Neumann ¹⁾ als charakteristisch für das Cytosin angegeben waren, und ich sprach sie daher für diese Base an. Da mir, wie geschildert, die Gewinnung des Materials, aus dem das salpetersaure Cytosin krystallisierte, bekannt war, so lag klar auf der Hand, daß das Cytosin wie das Thymin und Uracil durch Silbernitrat und Barytwasser in Form einer in überschüssigem Barytwasser unlöslichen Silberverbindung gewonnen werden kann. Damit war die Methode für die Darstellung des Cytosins gegeben. Ich probte dann die Zuverlässigkeit der Methode an Thymusnucleinsäure. Auch aus der Thymusnucleinsäure konnte ich nun planmäßig den gleichen Körper gewinnen, den ich vorher zufällig isoliert hatte.

Das Cytosin, das ich aus dem geschenkten Material sowie nachträglich aus der Thymusnucleinsäure isolierte, gab ich an Steudel und nahm Abstand, weiter darüber zu arbeiten. Aus diesem Grunde habe ich auch keine ausführlichen Analysen gemacht. Nur eine Platinbestimmung im Platindoppelsalz und eine Stickstoffbestimmung im Pikrat habe ich damals ausgeführt. 0.1074 g Platinsalz gaben 0.0329 g

Platin = 30,64 % Pt. — 0,147 g Pikrat gaben bei 740 mm Ba. und 15° C. an Stickstoff 32,4 ccm = 25,25 % N. ¹⁾

Nachdem nunmehr von Kossel und Steudel ²⁾ die Konstitution des Cytosins vollkommen geklärt ist, glaube ich meine früher publizierte Methode über Isolierung des Cytosins noch einmal auch in dieser allgemein bekannten Zeitschrift veröffentlichen zu sollen und möchte daran einige weitere Ausführungen knüpfen.

Die Methode ist natürlich, einmal im Prinzip festgestellt, einer Modifikation fähig. Man kann, sobald es sich um die Isolierung des Cytosins aus ziemlich reiner Nucleinsäure handelt, auch folgendermaßen vorgehen. Nachdem die Nucleinsäure nach Kossel und Neumann mit Schwefelsäure unter Druck gespalten und die Schwefelsäure durch Baryt entfernt, das Ammoniak ausgetrieben ist, fällt man bei schwach salpetersaurer Reaktion der Flüssigkeit mit Silbernitrat eine Fraktion I, die hauptsächlich aus Huminsubstanzen besteht und verworfen werden kann. Das Filtrat von Fraktion I wird nach Zugabe genügender Silbernitratmengen mit Baryt gesättigt. Die jetzt entstehende Silberfällung (Fällung II), die hauptsächlich Cytosin, Thymin und Uracil enthält, kann durch Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Schwefelsäure zersetzt und nach Entfernung des Schwefelsilbers mit Phosphorwolframsäure ausgefällt werden. In die Phosphorwolframfällung kann nach meinen Feststellungen in der Hauptsache nur Cytosin und wenig Huminsubstanz gehen. Aus der Phosphorwolframfällung läßt sich dann nach deren Zersetzung durch Baryt die freie Base gewinnen. Das Filtrat von Fällung II enthält die Lävulinsäure.

Weiter waren mir von Steudel geringe Mengen sirupöser Massen hinterlassen, die von Hefenucleinsäure stammten. Sie waren in ganz ähnlicher Weise gewonnen, wie jene aus den Heringstestikeln restierenden, die zur Darstellung des Cytosins

¹⁾ Diese Zahlen haben natürlich erst durch die neuen Arbeiten von Kossel und Steudel, durch die die Formel des Cytosins festgelegt worden ist, Wert erhalten. Sie zeigen jetzt, daß ich in der Tat recht reines Material in Händen gehabt haben muß.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, Heft 2 und 4.

geführt hatten. Aus ihnen krystallisierte ebenfalls das salpetersaure Salz einer Base. In meinem Vortrag äußerte ich mich dahin, daß wahrscheinlich ein Körper vorläge, der mit dem Cytosin aus Thymusnucleinsäure identisch sei. Ich hatte nur geringe Mengen der fraglichen Base erhalten. Nachdem ich sie in ihr schwer lösliches Pikrat übergeführt hatte, erhielt ich einige Dezigramm des Pikrates. Mir fiel allerdings schon bei der Darstellung des Pikrates auf, daß seine Nadeln weit kürzer und plumper waren, als jene des Cytosinpikrates aus Thymusnucleinsäure. Deshalb habe ich mich in meinem Vortrag bezüglich der Identität des Cytosins aus Thymus- und Hefenucleinsäure nicht bestimmt ausgesprochen.

Bald nach dem Vortrage habe ich Analysen des Pikrates vorgenommen. Ich habe zwei untereinander gut stimmende Stickstoffbestimmungen mit demselben ausgeführt.

I. 0,1412 g Substanz gaben bei 744 mm Bar. u. 15° C. an Stickstoff 34,0 ccm = 27,73 %.

II. 0,1492 g Substanz gaben bei 746 mm Bar. u. 14° C. an Stickstoff 36,0 ccm = 28,05 %.

Dieselben zeigen, daß diese Substanz nicht mit dem von Kossel und Steudel analysierten Cytosin, dessen Formel dank den Arbeiten dieser beiden Forscher sicher bestimmt ist, identisch sein kann. Wahrscheinlich liegt hier ein Körper vor, der sich durch eine Amidogruppe von dem durch Kossel und Steudel analysierten Cytosin unterscheidet.

Für	Für	
$C_4H_5ON_3 \cdot C_6H_3O_7N_3$	$C_4H_6ON_4 \cdot C_6H_3O_7N_3$	
ber.: N = 24,75 %	ber.: N = 27,61 %	gef.: N = 27,73 %, HN = 28,05 %

Um meine Ansicht vollkommen zu erhärten, wäre allerdings noch eine C- und H-Bestimmung notwendig. Ich habe dafür Material, bin aber noch einige Zeit verhindert, sie auszuführen. Doch bleibt auch schon jetzt für mich kaum ein Zweifel daran übrig. Es besteht wahrscheinlich zwischen dem aus Hefe erhaltenen Körper und dem Thymuscytosin eine ähnliche Analogie, wie zwischen dem Thymin und Uracil. Wie sich Thymin und Uracil nur durch eine Methylgruppe, so würde der neue Körper und das Thymuscytosin sich nur durch eine Amido-

gruppe unterscheiden. Es wäre demnach meine Substanz als ein Diaminoxypyrimidin anzusprechen. Daß die Methode für die Isolierung des Cytosins (Aminoxypyrimidin) auch für den von mir in der Hefe aufgefundenen Körper (Diaminoxypyrimidin) gültig ist, brauche ich wohl nicht besonders hervorzuheben.

Zum Schluß möchte ich noch eine Reaktion des Cytosins bekannt geben, die von Kossel und Neumann nicht publiziert worden ist, mir aber recht charakteristisch für das Cytosin zu sein scheint. Mischt man nicht zu verdünnte Lösungen von Cytosin mit einigen Tropfen konzentrierter neutraler Silbernitratlösung, dann beginnt nach einiger Zeit die Ausscheidung einer in schönen Nadeln krystallisierenden, ziemlich schwer in kaltem Wasser löslichen Doppelverbindung. Dieselbe hat in ihrem Aussehen große Ähnlichkeit mit dem Kreatininsilbernitrat, das man bekanntlich in ganz gleicher Weise erzeugen kann.

Vorstehende Arbeit habe ich zum Teil mit Geldmitteln ausgeführt, die mir von der Berliner Akademie der Wissenschaften für wissenschaftliche Untersuchungen über Nucleinsäure zur Verfügung gestellt waren. Die von mir gebrauchte Thymusnucleinsäure war mir durch Vermittlung des Herrn Geheimrat v. Behring durch die Höchster Farbwerke geliefert worden. Herrn Geheimrat v. Behring und den Höchster Farbwerken spreche ich für die mir erwiesene Freundlichkeit meinen besten Dank aus.