

Pyrimidinderivate aus Purinbasen.

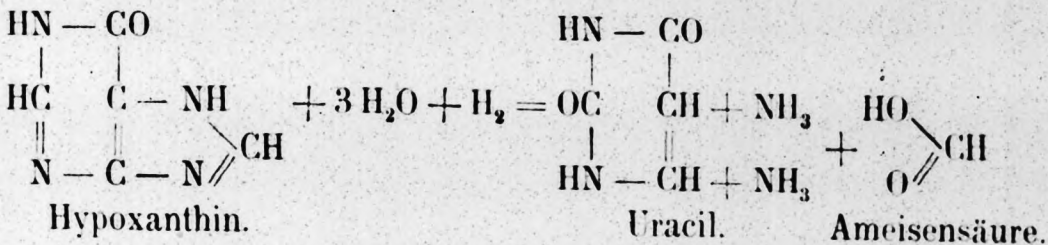
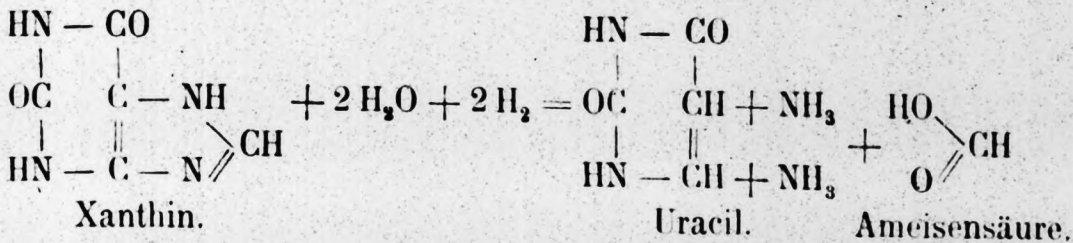
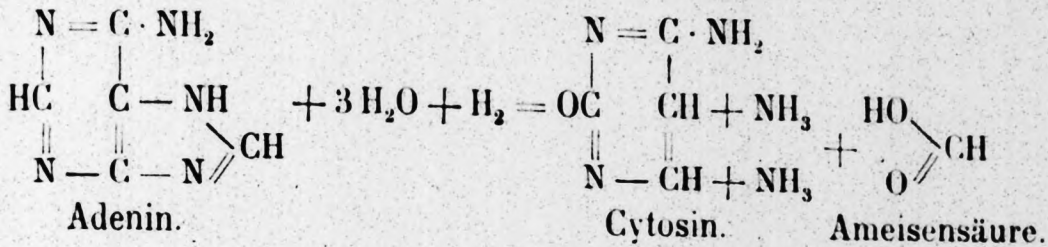
Von

Richard Burian.

(Der Redaktion zugegangen am 28. März 1907.)

Zur Darstellung der Pyrimidinderivate aus den Nucleinsäuren bedient man sich meist sehr eingreifender Prozeduren: man erhitzt das Ausgangsmaterial zwei Stunden lang mit 25- bis 30%iger Schwefelsäure im Autoklaven auf 150° oder kocht es 12 Stunden lang mit 30- bis 50%iger Schwefelsäure und dergleichen mehr. Hierbei spielen sich allerlei sekundäre Zersetzungen ab, speziell werden die Kohlehydratgruppen unter Bildung von Lävulinsäure und von Huminstoffen zerstört und die Purinbasen mehr oder minder vollständig aufgespalten. Es erscheint deshalb die Frage berechtigt, ob die Pyrimidinderivate, die aus den Nucleinsäuren durch jene Prozeduren gewonnen werden, nicht vielleicht von der Zersetzung der Purinbasen herkommen. Für das Thymin, als 5-Methyluracil, ist dies allerdings von vornherein wenig wahrscheinlich, da in den Purinbasen das C-Atom 5 des Pyrimidinringes nicht mit einer CH₃-, sondern mit einer NH-Gruppe verbunden ist. Anders liegen die Verhältnisse aber beim Cytosin und beim Uracil. Diese Pyrimidinderivate könnten, wie ich in den «Ergebnissen der Physiologie» (Jahrgang III, Bd. 1, S. 98, 1904) ausführlich besprochen habe, recht wohl durch gleichzeitige Hydrolyse und Reduktion aus Adenin resp. Xanthin oder Hypoxanthin entstehen. Die für einen solchen Vorgang erforderlichen reduzierenden Substanzen könnten in den Kohlehydratgruppen der Nucleinsäuren gegeben sein: erfahrungsgemäß vermögen ja die beim Erhitzen von Kohlehydraten mit starker Schwefelsäure resultierenden Zersetzungsflüssigkeiten kräftige Reduktionswir-

kungen auszuüben.¹⁾ Zur Veranschaulichung des hypothetischen Vorganges stellte ich die folgenden Gleichungen auf.

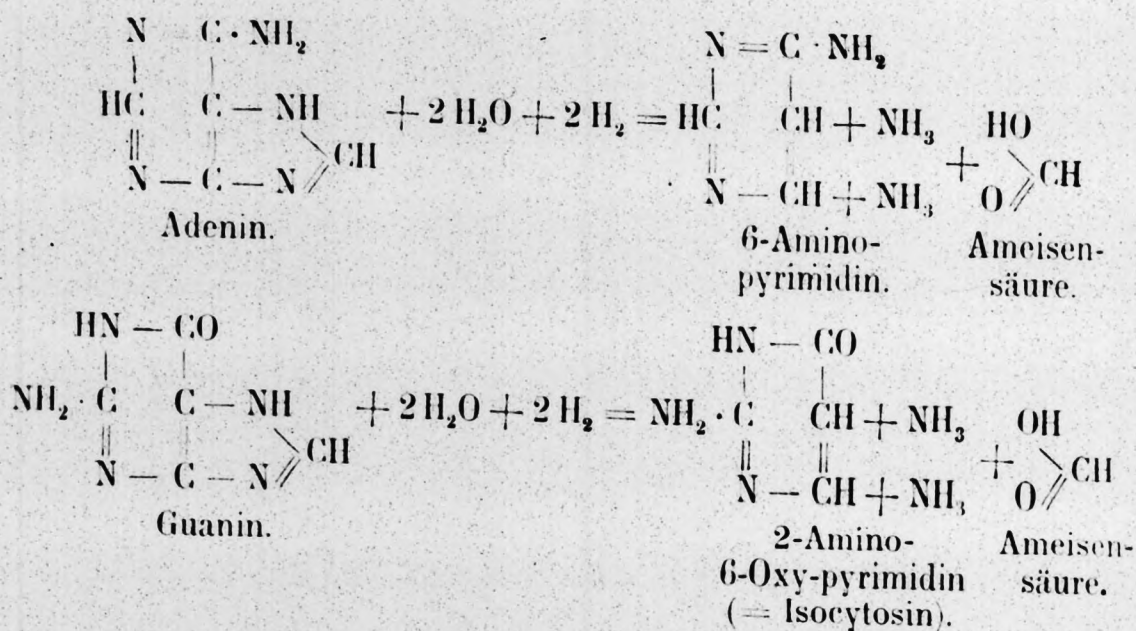


In der Tat konnte ich bereits an der obengenannten Stelle (S. 100) im Sinne einer vorläufigen Notiz mitteilen, daß man beim Erhitzen gleicher Gewichtsteile von Guanin und Traubenzucker mit 30%iger Schwefelsäure ein Produkt erhält, das alle Merkmale eines Pyrimidinderivates aufweist.

Ich habe diese Reaktion seither weiter verfolgt und bin zu dem Resultate gelangt, daß bei mehrstündigem Kochen von Adenin- resp. Guanin-Kohlehydratgemengen mit 30- bis 40%iger Schwefelsäure unter weitgehender Zersetzung der angewandten Purinbasen faktisch Pyrimidinderivate entstehen, die mit dem Cytosin die allergrößte Ähnlichkeit besitzen. Mit dem letzteren identisch sind diese Pyrimidinderivate indessen nicht, vielmehr dürfte, nach der Zusammensetzung und dem Verhalten der fraglichen Substanzen zu schließen, die aus dem Adenin sich

¹⁾ Dies ergibt sich z. B. daraus, daß man nach Asbóth (Chem. Zentralbl., 1886, S. 161) bei der N-Bestimmung mittels des Kjeldahl-Verfahrens den Stickstoff der Nitro- und Cyangruppen organischer Verbindungen durch Zusatz von Zucker quantitativ in Ammoniak überführen kann.

bildende Verbindung als 6-Aminopyrimidin, das aus dem Guanin hervorgehende Produkt als 2-Amino-6-oxypyrimidin — Isocytosin von Wheeler und Johnson¹⁾ — anzusprechen sein. Ob man Pentosen, Hexosen, Disaccharide oder Polysaccharide als reduzierenden Zusatz verwendet, ist, wie Versuche mit Arabinose, Traubenzucker, Rohrzucker, Stärke und Cellulose lehrten, für das Endergebnis ganz irrelevant. Die Reaktionsgleichungen, durch welche sich die Entstehung der obengenannten Pyrimidinderivate aus den betreffenden Purinbasen veranschaulichen läßt, sind folgende:



Neben den cytosinähnlichen Pyrimidinderivaten bilden sich bei der Aufspaltung des Adenins resp. des Guanins durch das «Zucker-Schwefelsäuregemisch» kleine Quantitäten uracilartiger Verbindungen. Bei der Zersetzung von Guanin handelt es sich allem Anscheine nach um Uracil selbst; seine Entstehung erklärt sich ohne weiteres durch die beim Kochen mit Schwefelsäure stattfindende geringgradige Desamidierung des Isocytosins, die von Wheeler und Johnson²⁾ zuerst beobachtet wurde. Das bei der Zersetzung von Adenin auftretende uracilartige Produkt ist vielleicht 6-Oxypyrimidin, das durch Desamidierung eines Teiles des 6-Aminopyrimidins entstanden ist. Zur genaueren Charakterisierung waren die Mengen der uracilartigen Körper, die mir zur Verfügung standen, nicht hinreichend.

¹⁾ Americ. Chem. Journ., Bd. XXIX, S. 492.

²⁾ l. c. S. 497.

Weit größere Mengen von uracilähnlichen Produkten bilden sich beim Erhitzen von Xanthin und Hypoxanthin mit Zucker und Schwefelsäure; doch erhält man auch aus diesen Ausgangsmaterialien daneben Pyrimidinderivate, die — gleich dem Cytosin und abweichend vom Uracil — mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag liefern. Eine nähere Untersuchung der aus den Oxypurinen hervorgehenden Pyrimidinkörper habe ich nicht durchgeführt.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, möchte ich hervorheben, daß sich meine im folgenden ausführlicher beschriebenen Experimente von einem ähnlichen Versuche, den Levene und Mandel¹⁾ kürzlich zu anderen Zwecken unternommen haben, hinsichtlich der Versuchsbedingungen gänzlich unterscheiden. Jene Autoren erwärmten Guanin mit Gulose und nur 10% iger Schwefelsäure unter Kupfersulfatzusatz im Wasserbade. Hierbei blieb ein großer Teil des Guanins unverändert (Ausscheidung als Sulfat), daneben bildete sich eine eigentümliche Stickstoff, Schwefelsäure und Kupferoxydul enthaltende organische Substanz, hingegen entstanden keine Pyrimidinderivate. Diese letzteren treten eben nur bei Anwendung beträchtlich höher konzentrierter Säure auf, auch dürfte die Gegenwart des die Kohlehydratzersetzungsprodukte oxydierenden Kupfersulfates für die Pyrimidinbildung wenig günstig sein. Bei genauer Einhaltung der unten beschriebenen Bedingungen gelangt man mit größter Leichtigkeit von den Purinbasen zu den entsprechenden Pyrimidinstoffen.

Experimentelle Belege.

Zur Abscheidung der Pyrimidinderivate aus den Purinbasenzersetzungsflüssigkeiten wurde in allen Fällen das nachfolgende Verfahren angewendet. Die von den ungelösten Huminstoffen abfiltrierte, meist tiefdunkel gefärbte Lösung wurde zunächst durch einen großen Überschuß stark ammoniakalischer Silbernitratlösung vollständig von den Resten der Purinbasen befreit und das silberhaltige Filtrat sodann unter Kühlung vorsichtig mit Salpetersäure neutralisiert: im Momente der erreichten Neutralisation bildet sich plötzlich ein neuer Silberniederschlag. Der Sicherheit halber setzt man noch etwas mit ein wenig Ammoniak «neutralisierte» Silberlösung hinzu. Nunmehr wird der Silberniederschlag (nach sehr sorgfältigem Auswaschen) bei Gegenwart von etwas Schwefelsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 5.

mit H_2S zerlegt¹⁾ und die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung — nach Behandlung mit Tierkohle und starkem Einengen — mit Phosphorwolframsäure versetzt. Die hierbei entstehende reichliche Fällung enthält den cytosinähnlichen, das Filtrat den uracilartigen Körper. Die erstere wurde in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt. Zu dem Filtrat dagegen wurde nach Entfernung der Phosphorwolframsäure neuerdings «neutralisierte» Silberlösung hinzugefügt und der hierdurch erzeugte geringfügige Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

Adeninversuche.²⁾

Versuch 6 des Protokolles. 6 g synthetischen Adenins + 6 g Traubenzucker + 300 ccm Schwefelsäure von 40 Gewichtsprozent, 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Verarbeitung der Zersetzungsflüssigkeit wie oben angegeben. Aus dem Phosphorwolframniederschlag werden 0,35 g eines etwas gelb gefärbten Produktes gewonnen, das in kleinen langgezogenen Blättchen mit unregelmäßigen Flächen krystallisiert. Das Produkt gibt die Weidelsche Alloxanreaktion nur schwach und (in saurer Lösung) mit Jodwismutjodkalium nicht den für das Cytosin charakteristischen roten Niederschlag; mit «neutralisierter» Silberlösung liefert es eine Fällung, die im Ammoniaküberschuß sofort wieder in Lösung geht. Zur endgültigen Reinigung wird die wässrige Lösung der Basis mit alkoholischer Pikrinsäurelösung fraktioniert gefällt. Die erste Fraktion, die etwas bräunlich gefärbt ist, wird weggeworfen; die übrigen drei Fraktionen, welche ganz gleichmäßig krystallisiert und hellgelb gefärbt sind, werden vereinigt und

¹⁾ In einigen Fällen wurde der Silberniederschlag vorerst unter Harnstoffzusatz in kalter Salpetersäure gelöst und durch vorsichtige Neutralisation mit Ammoniak wieder abgeschieden. Diese Umfällung erwies sich jedoch als überflüssig und wurde deshalb in der Mehrzahl der Versuche unterlassen.

²⁾ Das synthetische Adenin, das für die in diesem Abschnitte beschriebenen Versuche Verwendung fand, war mir von der Firma C. F. Boehringer u. Söhne in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden.

aus wenig Wasser umkrystallisiert. Das auf solche Weise hergestellte Pikrat (Ausbeute 0,7 g) bildet hellgelbe Nadeln; sein Schmelzpunkt variiert sehr stark, je nach der Geschwindigkeit des Erhitzens: bei mittlerer Geschwindigkeit beginnt es bei 215° zu erweichen und schmilzt unter Zersetzung bei 235—240°.

Analyse des Pikrates.

0,2428 g Substanz: 0,3278 g CO₂, 0,0514 g H₂O.

0,1729 » » : 40,4 ccm N über 40° iger Kalilauge (b = 745 mm, t = 22 1/4° C.).

Berechnet für		Gefunden:
Cytosin-pikrat	Aminopyrimidin-pikrat	
C ₄ H ₅ N ₃ O · C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ :	C ₄ H ₅ N ₃ · C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ :	
C = 35,27%	37,04%	36,82%
H = 2,35%	2,47%	2,35%
N = 24,70%	25,92%	26,23%

Daß hier nicht Cytosin vorliegt, ergibt sich einerseits aus den Eigenschaften der freien Basis (undeutliche Alloxan-, fehlende Jodwismutjodkaliumreaktion), andererseits aus dem Schmelzpunkt und der Zusammensetzung des Pikrates. Nach der letzteren zu urteilen, handelt es sich um ein Aminopyrimidin: angesichts der Entstehungsweise der Substanz kann aber wohl nur das bisher noch nicht beschriebene 6-Aminopyrimidin in Frage kommen.

Versuch 7 des Protokolles. 5 g synthetischen Adenins + 10 g Rohrzucker + 145 ccm Schwefelsäure von 40 Gewichtsprozent, 12 Stunden lang gekocht. Das aus dem Phosphorwolframniederschlag gewonnene Produkt wird in stark verdünnter Salzsäure gelöst und durch Zusatz weniger Tropfen konzentrierter Platinchloridlösung in das Chloroplatinat übergeführt, das nach dem Einengen der Flüssigkeit beim Erkalten in schön glasglänzenden gelben Schüppchen auskrystallisiert.

0,2357 g bei 100° getrockneter Substanz: 0,0775 g Pt.

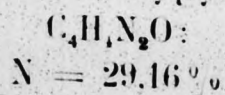
Berechnet für		Gefunden:
Cytosinchloroplatinat	Aminopyrimidinchloroplatinat	
(C ₄ H ₅ N ₃ O) ₂ · H ₂ PtCl ₆ :	(C ₄ H ₅ N ₃) ₂ · H ₂ PtCl ₆ :	
Pt = 30,85%	32,55%	32,88%

Auch hier stimmt das Analysenergebnis auf das Aminopyrimidinderivat.

Die in den verschiedenen Adeninversuchen (4,6 und 7 des Protokolls) aus den Phosphorwolframfiltraten gewonnenen Silberniederschläge (vgl. oben S. 442) wurden vereinigt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Bei sehr starkem Einengen der Zerlegungsflüssigkeit schieden sich 0,15 g eines etwas gelblich gefärbten Produktes ab, das aus ganz wenig Wasser umkrystallisiert wurde. Die undeutlich krystallisierte Verbindung gab die Alloxanreaktion nur schwach.

0,1130 g bei 100° getrockneter Substanz: 30,1 ccm N über 40° wiger Kalilauge (b = 752,5 mm, t = 20° C.).

Berechnet für Oxy pyrimidin



Gefunden:

29,67%

Das Resultat der N-Bestimmung läßt vermuten, daß hier durch Desamidierung von 6-Aminopyrimidin entstandenes 6-Oxy pyrimidin vorliegen dürfte.

Guaninversuche.

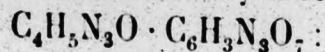
Versuch 3 des Protokoll. 3 g Guanin + 4,5 g Traubenzucker + 60 ccm Wasser + 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Das aus dem Phosphorwolframniederschlag erhaltene Produkt, das in Nadeln krystallisiert, gibt starke Weidelsche Alloxanreaktion und (in schwach schwefelsaurer Lösung) mit Jodwismutjodkalium den typischen ziegelroten Niederschlag. Zur Reinigung wird es in der oben bei Versuch 6 angegebenen Weise in das Pikrat übergeführt. Das letztere besteht aus hellgelben Nadeln, die (rasch erhitzt) bei ca. 265° unter Zersetzung schmelzen.

Analyse des Pikrates.

0,1900 g Substanz: 0,2458 g CO₂, 0,0451 g H₂O.

Berechnet für

Cytosin- oder Isocytosin-pikrat



C = 35,29%

H = 2,35%

Gefunden:

35,28%

2,63%

Versuch 8 des Protokolls. 5 g Guanin + 10 g Rohrzucker + 145 ccm Schwefelsäure von 40 Gewichtsprozent,

12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Aus dem Phosphorwolframniederschlag werden 0,3 g des in Nadeln krystallisierenden Pyrimidinderivates gewonnen. Ein Teil der Substanz wird direkt zur Analyse verwendet.

0,0984 g lufttrockener Substanz verlieren bei 100° nur 0,0014 g an Gewicht! 0,0970 g Substanz: 0,1525 g CO₂, 0,0401 g H₂O.

Berechnet für Cytosin oder Isocytosin Gefunden:



$$\text{C} = 43,24\%$$

$$42,87\%$$

$$\text{H} = 4,50\%$$

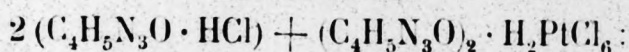
$$4,59\%$$

Der Rest der Substanz wird in verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung nach Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Platinchloridlösung eingeengt. Beim Erkalten krystallisieren prachtvolle Drusen aus, die aus ca. 4 mm langen hellgelben Nadeln bestehen. Die Pt- und Cl-Bestimmung lehrt, daß das Produkt eine Doppelverbindung des Chlorhydrates und des Chloroplatinates ist.

0,1305 g Substanz: 0,0281 g Pt. — 0,1402 g Substanz: 0,1729 g AgCl.

Berechnet für

Gefunden:



$$\text{Pt} = 21,03\%$$

$$21,49\%$$

$$\text{Cl} = 30,63\%$$

$$30,51\%$$

Nach all diesen Befunden kann die aus dem Guanin durch die Einwirkung des «Zuckerschwefelsäuregemisches» entstehende Pyrimidinbase nicht Cytosin sein, denn sie krystallisiert in Nadeln und ohne Krystallwasser, und der Schmelzpunkt ihres Pikrates weicht von jenem des Cytosinpikrates nicht unerheblich ab. Dagegen stimmen die gewonnenen Ergebnisse durchaus auf das von Wheeler und Johnson synthetisch dargestellte Cytosinisomere, das 2-Amino-6-oxypyrimidin oder Isocytosin. Die eigentümliche Chlorhydrat-Chloroplatinat-Doppelverbindung ist allerdings für das Isocytosin bisher noch nicht beschrieben worden.

Aus den bei verschiedenen Guaninversuchen (3,5 und 8 des Protokolles) erhaltenen Phosphorwolframfiltraten wurden in der oben beschriebenen Weise ca. 0,2 g einer in mikroskopischen Nadelrosetten krystallisierenden Substanz gewonnen, die starke Alloxanreaktion gab.

0,1738 g Substanz: 0,2741 g CO₂, 0,0641 g H₂O.

Berechnet für Uracil

Gefunden:

C₄H₄N₂O₂:

C = 42,85%

43,01%

H = 3,57%

4,00%

Es kann wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß es sich hier um Uracil handelt, das durch Desamidierung eines kleinen Teiles des Isocytosins entstanden ist.

Ein quantitativ durchgeführtes Experiment (Versuch 1 des Protokolles) sollte lehren, ob die Purinbasen bei der Einwirkung des «Zuckerschwefelsäuregemisches» lediglich die zur Bildung der Pyrimidinderivate führende Aufspaltung oder aber daneben auch noch anderweitige Zersetzungen erleiden. Genau 2 g Guanin wurden mit 2 g stickstoff- und aschefreien Filtrierpapiere und 120 ccm Schwefelsäure von 25 Gewichtsprozent im Einschlußrohr zwei Stunden lang auf 150—160° erhitzt. Die mit feinsten schwarzen Partikeln reichlich durchsetzte Zersetzungsflüssigkeit wurde durch Nachwaschen des Rohres auf ein Volumen von 162 ccm gebracht. Hiervon wurden 15 ccm zur Bestimmung des unzersetzt gebliebenen Guanins nach der Methode von Burian und W. Hall¹⁾ verwendet: es wurden gefunden 0,0189 g Guanin-N, entsprechend 0,04084 g Guanin; somit waren in der gesamten Zersetzungsflüssigkeit 0,4411 g unzersetzten Guanins enthalten. Es waren mit anderen Worten

1,5589 g

Guanin der Zersetzung anheimgefallen. Auf der anderen Seite wurden aus 110 ccm der Zersetzungsflüssigkeit nach dem früher beschriebenen Verfahren unter strenger Beobachtung aller quantitativen Kautelen 0,1170 g Isocytosin gewonnen; für das Gesamtvolumen der Zersetzungsflüssigkeit macht das 0,1723 g. Dies Isocytosinquantum entspricht aber einer zersetzten Guaninmenge von bloß

0,2343 g!

Es wurde demnach nur etwa der 7. Teil des zerstörten Guanins als Isocytosin wiedergefunden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 366.

Die Gegenprobe auf die Richtigkeit dieses Ergebnisses bilden die Resultate der Bestimmung des Ammoniak- und Humin-N in der Zersetzungsflüssigkeit. Bei der Bildung von 0,1723 g Isocytosin aus 0,2343 g Guanin müßten durch die Aufspaltung des im Guanin enthaltenen Imidazolringes (vgl. die Reaktionsgleichung auf S. 440) 0,0528 g Ammoniak entstehen. Tatsächlich waren aber 0,3876 g Ammoniak in der Lösung anwesend — das bedeutet einen Ammoniaküberschuß von 0,3348 g entsprechend 0,2752 g N. Außerdem enthielt die Zersetzungsflüssigkeit 0,3143 g Humin-N. Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß der N des zerstörten, aber nicht als Isocytosin wiedergefundenen Guanins (1,3246 g entsprechend 0,614 g N) vollständig in Form von Ammoniak- und Humin-N zugegen war:

Überschüssiger Ammoniak-N	}	in der Zersetzungsflüssigkeit	0,2752 g
Humin-N	}		0,3143 g
		Summe:	0,5895 g

N des nicht als Isocytosin wiedergefundenen zerstörten

Guanins: **0,6140 g**

Zur Bestimmung des Humin-N und des Ammoniaks wurde folgendermaßen verfahren: Behufs möglichst gleichmäßiger Verteilung der Huminpartikel wurde die gesamte Zersetzungsflüssigkeit zunächst gut durchgeschüttelt. Dann wurden rasch 15 ccm derselben abgemessen und quantitativ durch N-freies Papier filtriert: in den auf dem Filter zurückbleibenden unlöslichen Huminsubstanzen wurde der N nach Kjeldahl bestimmt; das nur mehr schwach bräunlich gefärbte Filtrat wurde mit Magnesia usta destilliert und die vorgelegte Säure nach beendigter Destillation und vor der Titration ausgekocht. ¹⁾ Die unlöslichen Huminstoffe enthielten 0,0291 g N, für das Gesamtvoiumen der Zersetzungsflüssigkeit berechnen sich also 0,3143 g Humin-N. Die Ammoniakmenge betrug in den 15 ccm Probestflüssigkeit 0,0358 g, das gibt für das Gesamtquantum der Lösung 0,3876 g.

Auf welchem Wege erfolgt die durch das «Zuckerschwefelsäure-Gemisch» bewirkte Zerstörung jenes weit überwiegenden Anteiles der Purinbasen, der nicht in Form von Pyrimidin-derivaten in der Zersetzungsflüssigkeit wiedererscheint? Erleidet dieser Anteil irgend eine ganz andersartige Aufspaltung,

¹⁾ Vgl. F. Müller, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 286.

oder wird zwar auch er zunächst in das betreffende Pyrimidin-derivat verwandelt, dies letztere aber sodann unter der Einwirkung des «Zuckerschwefelsäure-Gemisches» seinerseits weiter zersetzt? Wahrscheinlich ist beides der Fall. Daß wenigstens bei sehr energischer Einwirkung jenes Gemisches die Pyrimidinderivate selbst gleichfalls zerstört werden, geht daraus hervor, daß sich mit Hilfe der v. Asbóthschen Modifikation des Kjeldahl-Verfahrens — Erhitzen mit Traubenzucker und konzentrierter Schwefelsäure¹⁾ — der Gesamt-N der Pyrimidinderivate leicht als Ammoniak bestimmen läßt.

Das in dem soeben beschriebenen Versuch 1 gewonnene Isocytosin wurde unter Zusatz von 0,5 g reinsten Traubenzuckers dem Kjeldahl-Verfahren (zum Schlusse Behandlung mit Permanganat) unterworfen.

0.1170 g bei 100° getrockneter Substanz: 31,85 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für Isocytosin



$$\text{N} = 37,83\%$$

Gefunden:

38,11%

Diskussion der Frage nach der Bedeutung des bei der Nucleinsäure-spaltung auftretenden Cytosins.

Die Tatsache, daß das Adenin und das Guanin beim Kochen mit Kohlehydraten und starker Schwefelsäure unter teilweiser Umwandlung in Pyrimidinderivate in sehr erheblichem Umfange zerstört werden, besitzt nach mehreren Richtungen hin Interesse. Zunächst eröffnet sie uns das Verständnis für die von Burian und W. Hall²⁾ gegebene empirische Regel: man habe bei der Bestimmung der Purinbasen in Nucleinsäuren resp. in Organen stark verdünnte Schwefelsäure (von $\frac{1}{2}$ —1 Volumprozent) zur Hydrolyse anzuwenden, weil bei Benützung höher konzentrierter Säure Verluste eintreten, die z. B. schon bei Verwendung 10%iger Schwefelsäure recht fühlbar werden. Die Ursache dieser Verluste war bisher unbekannt, denn die Purinbasen an und für sich bleiben selbst beim Erhitzen mit 30—40%iger Schwefelsäure auf 150° unverän-

¹⁾ Vgl. die Anm. 1 auf S. 439.

²⁾ l. c. S. 337.

dert.¹⁾ Durch die im Vorhergehenden besprochenen Resultate wird der Sachverhalt jetzt vollkommen aufgeklärt: sowohl die Nucleinsäuren als auch die Organe enthalten ja reichlich Kohlehydrate, so daß bei der Einwirkung von Säure, deren Konzentration zu einer ausgiebigen Zersetzung der Kohlehydrate genügt, stets auch eine mehr oder minder umfangreiche Zerstörung der Purinbasen zustande kommen muß.

Die wichtige Frage, ob das bei der Zersetzung der Nucleinsäuren auftretende Cytosin ein primäres oder ein von den Purinbasen abstammendes sekundäres Spaltungsprodukt darstellt, wird durch die mitgeteilten Beobachtungen gleichfalls von einer neuen Seite her beleuchtet. Man erhält zwar aus der Nucleinsäure nicht, wie aus dem Adenin und Guanin, Aminopyrimidin und Isocytosin, sondern regelmäßig Cytosin, ja, die beiden erstgenannten Pyrimidinderivate sind bisher nicht einmal als Beimengung neben dem Cytosin, dem sie ihrem ganzen Verhalten nach hartnäckig anhaften müßten, gefunden worden. Auf der anderen Seite erscheint es aber geradezu als unabweisliches Postulat, daß die oben beschriebene oder doch eine ganz ähnliche Zersetzung des Adenins und Guanins auch beim Erhitzen der Nucleinsäure mit 30—40%iger Schwefelsäure vor sich gehen muß: denn schon kurze Zeit nach dem Beginne des Erhitzens ist es ja ein Gemenge von Adenin, Guanin und abgespaltenen Kohlehydratkomplexen, auf welches die Schwefelsäure einwirkt. Sollen wir annehmen, daß das bei der Behandlung der Nucleinsäure mit 30—40%iger Schwefelsäure auftretende Cytosin ein primäres Abbauprodukt ist, und daß die Zersetzungsprodukte des Adenins und des Guanins, die sich notwendigerweise dabei ebenfalls bilden müßten, nur bisher dem Nachweise entgangen sind? Oder liegen die Bedingungen beim Erhitzen der Nucleinsäure mit starker Schwefelsäure vielleicht derartig, daß hier die reduktive Aufspaltung des Adenins und des Guanins statt zur Bildung von 6-Aminopyrimidin und Isocytosin zur Entstehung von Cytosin führt? Diese Alternative läßt sich vorläufig noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

¹⁾ Vgl. Kossel und Steudel, Diese Zeitschrift. Bd. XXXVIII, S. 58.

Die Menge der durch die Einwirkung des «Zuckerschwefelsäuregemisches» aus dem Guanin und Adenin hervorgehenden Pyrimidin-derivate ist keineswegs so gering, daß sich ein Übersehen der letzteren bei der Untersuchung der Nucleinsäurespaltungsprodukte ohne weiteres verstehen ließe. Aus 5 g Adenin bekam ich im Maximum (Versuch 6) 0.5 g Aminopyrimidin, d. i. ungefähr die Hälfte des aus der entsprechenden Nucleinsäuremenge (23 g) erhältlichen Cytosinquantums!¹⁾

Geben meine Versuche nun aber auch noch keine endgültige Antwort auf die Frage der Bedeutung des bei der Nucleinsäurezersetzung auftretenden Cytosins, so wird doch bei der Diskussion dieser Frage von nun ab stets die Tatsache berücksichtigt werden müssen, daß Adenin und Guanin unter Bedingungen, die denjenigen der Nucleinsäurespaltung möglichst getreu nachgebildet sind, cytosinähnliche Zersetzungsprodukte liefern. Diese Tatsache verdient umsomehr Berücksichtigung, als für die herrschende Ansicht, nach welcher das Cytosin ein primäres Spaltungsprodukt der Nucleinsäure sein soll, bisher meist nur Wahrscheinlichkeitsgründe vorgebracht worden sind, die einer ernstlichen Kritik kaum standzuhalten vermögen. So bildet z. B. der Umstand, daß sich aus der angeblich purinkörperfreien Thyminsäure Cytosin gewinnen läßt, wie ich schon in den «Ergebnissen der Physiologie» (Jahrg. III, Bd. 11, S. 99, 1904) hervorgehoben habe, deshalb keinen sicheren Beweis gegen die Herkunft des Cytosins aus den Purinbasen, weil die Thyminsäure, nach ihrer Zusammensetzung (Verhältnis N:P) und nach Befunden von Schmiedeberg²⁾ zu urteilen, in Wirklichkeit noch purinkörperhaltig sein dürfte. Ebensowenig Beweiskraft scheint mir der Tatsache zuzukommen, daß sich bei der Autolyse nucleinsäurehaltiger Organe Uracil bildet.³⁾ Es

¹⁾ Nach Steudel (Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165 u. Bd. XLIII, S. 402) beträgt der Stickstoff des aus der Thymusnucleinsäure abspaltbaren Cytosins ca. 12% des Gesamtstickstoffes. Hieraus berechnet sich, daß aus 23 g Nucleinsäure — diese Nucleinsäuremenge enthält nach den Bestimmungen von Schmiedeberg, Bang und anderen 5 g Aminopurine — ungefähr 1.13 g Cytosin hervorgehen würden.

²⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. XLIII, S. 82.

³⁾ Vgl. Levene, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 527; Reh, Hofmeisters Beiträge, Bd. III, S. 569; Jones, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35; Levene, Americ. Journ. of Physiol., Bd. XI, S. 437.

ist zwar zweifellos richtig, daß dies Uracil die Stelle des Cytosins vertritt, das man bei der Zersetzung des frischen Materiales mit starker Säure erhält: wäre die Autolyse ein Vorgang, bei welchem sich niemals sehr tiefgreifende Zersetzungen der primären Abbauprodukte abspielen, so müßte man deshalb aus dem Auftreten des Uracils bei der Autolyse schließen, daß dessen Muttersubstanz, das Cytosin, unmöglich von einer reduktiven Aufspaltung der Purinbasen herkommen könne. Die Voraussetzung dieses Schlusses ist indessen durchaus un begründet. Wir wissen heute, daß sich bei der Autolyse an den primären Abbauprodukten manchmal ausgiebige Reduktionsprozesse (Umwandlung von Kohlehydraten in Fettsäuren!), allerhand Abspaltungen, kurz eine Reihe zum Teil sehr eingreifender sekundärer Veränderungen vollziehen. Ist es da wirklich erlaubt, anzunehmen, daß bei der Autolyse keine reduktive Aufspaltung der Purinbasen stattfinden könne? Noch viel weniger Bedeutung für unsere Frage besitzt, wie ich gleichfalls schon in den «Ergebnissen der Physiologie» ausgeführt habe, das von Kossel und Steudel¹⁾ als Beweismittel herangezogene Versuchsergebnis, daß Guanin bei mehrstündigem Erhitzen mit starker Schwefelsäure auf 150° kein Cytosin liefert. Kossel und Steudel haben übersehen, daß eine Bildung von Cytosin aus Purinbasen ohne Mitwirkung reduzierender Agenzien gar nicht denkbar ist. Bei Gegenwart von Kohlehydraten — also von jenen reduzierenden Substanzen, die bei der Nucleinsäurespaltung in erheblicher Menge in Aktion treten können —, erhält man aber aus dem Guanin durch Erhitzen mit starker Schwefelsäure sofort ein dem Cytosin äußerst ähnliches (wenngleich nicht mit ihm identisches) Pyrimidin-derivat.

In neuester Zeit hat sich besonders Steudel²⁾ bemüht, nachzuweisen, daß das Cytosin der Nucleinsäure nicht von den Purinbasen derselben abstammt. Zu diesem Zwecke zer-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 58.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165; Bd. XLIII, S. 402, Bd. XLVI, S. 332.

setzte er das Kupfersalz der Thymusnucleinsäure a (Neumann nach vier verschiedenen Methoden, bei denen eine verschieden weitgehende Zerstörung der Purinbasen erzielt wird; in jedem Falle wurde dann der Purinbasen- und der Cytosin-gehalt der Zersetzungsflüssigkeit bestimmt. Die hierbei gewonnenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

		I.	II.	III.	IV.
		Kochen mit Jodwasserstoff + Phosphor	Kochen mit 50%iger Schwefelsäure	Kochen mit 25%iger Salzsäure + SnCl ₂	Erhitzen mit 25%iger Schwefelsäure auf 150°
Guanin-N	in Pro- zenten des Gesamt- N	3,61	10,07	3,15	0
Adenin-N		13,45	16,39	4,76	0
Xanthin-N		6,74	0	0	0
Hypoxanthin-N		5,20	0	0	0
Summe — Total- Purinbasen-N		29,00	26,46	7,91	0
Cytosin-N		11,45	11,47	10,15	7,9

Die Cytosinausbeute zeigt sich also in jenen Fällen, in denen die Purinbasenmenge besonders stark herabgesetzt ist (III und IV der Tabelle), durchaus nicht entsprechend vergrößert, sondern sogar eher vermindert. Steudel glaubt hieraus schließen zu sollen, daß die bei der Säurebehandlung der Nucleinsäure stattfindende Purinbasenzerstörung mit der Cytosinbildung nichts zu tun habe. «Man müßte jetzt schon zu ganz gekünstelten Erklärungsversuchen greifen,» so schreibt er, «wollte man noch länger behaupten, daß die Pyrimidinderivate, die man bei Säurespaltung findet, weiter nichts wie Zersetzungsprodukte der Purinbasen seien.» Mir will es indessen scheinen, als brauchte man keineswegs zu gekünstelten Erklärungsversuchen zu greifen, um Steudels Resultate mit der Annahme, daß das Cytosin von den Purinbasen abstammt, in Einklang zu bringen. Wie die Salmonucleinsäure nach den Bestimmungen von Schmiedeberg, so

enthält auch die Thymusnucleinsäure nach Bangs¹⁾ sorgfältigen Analysen pro Molekül (auf die einfache Formel bezogen) 2 Aminopurinmoleküle. Bang gewann aus der Thymusnucleinsäure 22% eines Purinbasengemenges, das zu $\frac{1}{3}$ aus Guanin und zu $\frac{2}{3}$ aus Adenin bestand: da ein derartiges Gemenge 50,0% N besitzt, so ergibt sich, daß von den 15,40% N der Nucleinsäure²⁾ 11,0% den Purinbasen angehören, oder mit anderen Worten, daß der Purinbasen-N in der Thymusnucleinsäure **71,42%** des Gesamt-N ausmacht. Die Theorie verlangt — vorausgesetzt, daß das einfache Molekül der Nucleinsäure (mit 14 N-Atomen)³⁾ zwei Aminopurinmoleküle (mit 10 N-Atomen) enthält — **71,43%**. Zu einem ziemlich ähnlichen Resultat ist übrigens neuerdings⁴⁾ auch Steudel selbst gelangt: er findet jetzt, daß von dem Gesamt-N der Nucleinsäure des Heringsspermas (und gleiches gilt auch für die Thymusnucleinsäure) **67,37%** auf die Purinbasen⁵⁾ kommen. Vergleicht man auch selbst nur mit diesem letzteren, niedrigeren Werte die Prozentzahlen, die Steudel in seinen oben besprochenen Experimenten für den Purinbasen-N erhielt, so erkennt man sogleich, daß nicht bloß in den sub III und IV, sondern auch in den sub I und II der vorhergehenden Tabelle registrierten Versuchen eine sehr umfangreiche Zerstörung der Purinbasen stattgefunden hat. Recht klar kommt diese Tatsache in der auf der nächsten Seite folgenden Zusammenstellung zum Ausdruck. Nach den dort angeführten Zahlen läßt sich Steudels Resultat in den nachstehenden Satz zusammenfassen: Die Menge des beim Erhitzen von Nucleinsäure mit starken Säuren entstehenden Cytosins weist nur geringe Unterschiede auf, gleichviel ob von dem in der Nuclein-

¹⁾ Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. IV, S. 331.

²⁾ Vgl. mein Essay «Chem. d. Spermatozoen I» in Ergebn. d. Physiologie, Jahrgang III, Bd. XLVIII.

³⁾ Für die Annahme von Steudel (Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 406), daß dem Nucleinsäuremolekül nicht 14, sondern 15 N-Atome zukommen, liegen, wie weiter unten noch besprochen werden wird, keine genügenden analytischen Anhaltspunkte vor.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 406.

⁵⁾ 28,95% auf Guanin-N und 38,42% auf Adenin-N.

säure enthaltenen Purinbasenquantum bei der Säurebehandlung ca. 60% oder 90—100% der Zerstörung anheimgefallen sind. In solch richtiggestellter Form besagt aber das Ergebnis der Steudelschen Versuche nichts oder doch sehr wenig gegen die Möglichkeit der Herkunft des Cytosins aus den zersetzten Purinbasen! Diese Möglichkeit würde nur dann ausgeschlossen erscheinen, wenn sich auch bei vollkommenem Erhaltenbleiben oder höchstens ganz geringfügiger Zerstörung der Purinbasen eine nennenswerte Cytosinmenge aus der Nucleinsäure gewinnen ließe.

		I.	II.	III.	IV.
In den Versuchen gefundener	} Totalpurinbasen-N in % des Gesamt-N	29,00	26,46	7,91	0
		67,37	67,37	67,37	67,37
Im Ausgangsmaterial vorhandener	} des Gesamt-N . . .	38,37	40,91	59,46	67,37
		56,95	60,72	88,25	100,0
Zerstörter Purinbasen-N in %	} des ursprünglichen Totalpurinbasen-N				

Eine wirklich ernst zu nehmende experimentelle Begründung für die Ansicht, daß das Cytosin in der Nucleinsäure vorgebildet enthalten sei, ist erst in allerjüngster Zeit von Steudel¹⁾ erbracht worden. Steudel oxydierte Nucleinsäure (aus Heringsmilch) mit Salpetersäure in der Kälte: aus dem Reaktionsgemisch ließ sich eine Krystallfraktion abscheiden, die 23,11% N enthielt, was auf ein Gemenge von ca. $\frac{7}{10}$ Thymin und $\frac{3}{10}$ Uracil stimmen würde.²⁾ In der Tat konnte Steudel bei der mikroskopischen Untersuchung der Krystallfraktion neben den charakteristischen Thyminkrystallen «deutlich die zu kreisrunden Scheiben konzentrisch zusammengesetzten Nadeln des Uracils» erkennen. Dies Uracil wird man — in Anbetracht des Umstandes, daß im Reaktionsgemische bedeutende Mengen von salpetriger Säure zugegen waren, durch deren Einwirkung bekanntlich aus Cytosin

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XLVIII. S. 425.

²⁾ Thymin besitzt 22,3% N, Uracil 25,0% N.

Uracil gebildet wird — wohl zweifellos als umgewandeltes Cytosin anzusehen haben. Da nun einerseits bei der Einwirkung der kalten Salpetersäure auf die Nucleinsäure die Purinbasen der letzteren so gut wie vollständig als Nitrate auskrystallisieren (Steudel), andererseits a priori höchst unwahrscheinlich ist, daß bei dieser Reaktion eine reduktive Aufspaltung der Purinbasen erfolgt: so wird man, falls sich Steudels Beobachtung fernerhin bestätigen sollte, allerdings annehmen müssen, daß das Cytosin ein primäres, nicht von den Purinbasen abzuleitendes Spaltungsprodukt der Nucleinsäure darstellt. Dann stehen wir aber wieder vor der ungelösten Frage, warum beim Erhitzen der Nucleinsäure mit starker Schwefelsäure nicht neben dem Cytosin auch die in dieser Mitteilung beschriebenen Zersetzungsprodukte des Guanins und Adenins auftreten!

Nach all dem dürfte es sich wohl empfehlen, in der Frage nach der Bedeutung des aus der Nucleinsäure darstellbaren Cytosins noch eine abwartende Haltung einzunehmen — zumal Steudels Angabe über die Bildung von Uracil bei der Salpetersäurebehandlung der Nucleinsäure sich bisher bloß auf die N-Bestimmung in einem Gemenge und auf den mikroskopischen Augenschein stützt. Die große Sicherheit, mit der Steudel¹⁾ das Cytosin als primären Bestandteil der Nucleinsäure bezeichnet, scheint mir verfrüht zu sein. Steudel geht sogar so weit, die quantitative Aussage zu machen, daß das Molekül der Nucleinsäure, auf die einfache Formel bezogen, 1 Molekül Cytosin enthalte, obzwar er bei der Schwefelsäurezersetzung von nucleinsaurem Kupfer nur 4,26% und nicht, wie das von ihm angenommene Verhältnis verlangen würde, 7,86% Cytosin gewann! Seiner Auffassung entsprechend, verändert Steudel auch die Formel der Nucleinsäure, welche nach ihm nicht $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{26}$, sondern $C_{40}H_{56}N_{15}P_4O_{26}$ lauten soll. Diese Änderung erscheint allerdings nötig, wenn man annimmt, daß das Nucleinsäuremolekül 2 Aminopurinmoleküle (10 N) und je 1 Molekül Thymin (2 N) und Cytosin (3 N) in

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 406.

sich schließt; sichere analytische Belege für die Richtigkeit der neuen Formel liegen aber bisher nicht vor. Bei seinen äußerst exakten Analysen reiner Salmonucleinsäurepräparate fand Miescher¹⁾ mittels der volumetrischen Methode 15,77% N; die alte Formel fordert 15,40%, die neue 16,31% N; und Steudel selbst²⁾ erhielt bei der Analyse des thymonucleinsäuren Kupfers, für welches die alte Formel 14,10%, die neue 14,92% N verlangt, — 14,37%, 14,47% und 14,48% N (freilich mittels des Kjeldahl-Verfahrens). Die von Steudel vorgeschlagene Änderung der Nucleinsäureformel beruht also nicht so sehr auf den Ergebnissen der Nucleinsäureanalyse als vielmehr auf einem Postulate, das aus dem N-Gehalte und dem mikroskopischen Aussehen eines Krystallgemenges abgeleitet ist.

Wir können die vorstehende Diskussion dahin resümieren, daß es zur Zeit unentschieden ist, ob die Nucleinsäure eine präformierte Cytosin-Gruppe enthält. Für diese Möglichkeit spricht die — der völligen Sicherstellung allerdings noch bedürftige — Beobachtung des Auftretens von Uracil bei der Salpetersäurebehandlung der Nucleinsäure; gegen sie der Befund, daß unter der Einwirkung des «Zuckerschwefelsäuregemisches» aus Adenin und Guanin cytosinähnliche Pyrimidinderivate hervorgehen.

Ich möchte zum Schlusse betonen, daß ich meine Versuche über die Zersetzung der Purinbasen durch das «Zuckerschwefelsäuregemisch» keineswegs für abschließende halte. Wenn ich trotzdem meine Resultate der Öffentlichkeit übergebe, so geschieht es deshalb, weil ich gegenwärtig nicht in der Lage bin, diese rein chemischen Untersuchungen fortzusetzen, und die Hoffnung hege, die hier beschriebene Reaktion werde nunmehr von anderer Seite eingehender studiert werden.

¹⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. XXXVII.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 335.