

Weitere Untersuchungen über das Cytosin.

Von

A. Kossel und H. Steudel. ¹⁾

I. Darstellung des Cytosins.

Zur Darstellung des Cytosins diente in den meisten Fällen die Flüssigkeit, welche sich bei der Zersetzung tierischer Organe mit verdünnter Schwefelsäure bei zweistündigem Erwärmen auf 150° ergeben hatte. Es ist aber nicht nötig, auf diese hohe Temperatur zu erhitzen, vielmehr konnten wir die reichliche Bildung des Cytosins auch beobachten, als wir 840 g frische Störtestikeln mit einer Mischung von 600 g konzentrierter Schwefelsäure und 1200 ccm Wasser 12 Stunden kochten. Wahrscheinlich würde eine geringere Konzentration an Säure ebenfalls ausreichen.

Diese Flüssigkeit wird zur Entfernung der Schwefelsäure und eines Teils der huminartigen Stoffe mit Baryt oder mit Kalk und nachträglich mit Baryt alkalisch gemacht, die alkalische Lösung zur Entfernung des Ammoniaks auf dem Wasserbade erhitzt, filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure schwach angesäuert und eingedampft.

Die eingeengte Flüssigkeit wird jetzt mit Quecksilbersulfat bei Gegenwart von 3—4% freier Schwefelsäure gefällt und bleibt nach Zusatz eines Überschusses des Fällungsmittels mehrere Tage stehen. Das Cytosin befindet sich dann nebst den Nucleinbasen und dem Histidin im Niederschlag.

Da die Fällung des Cytosins durch Quecksilbersulfat nur langsam und bei Zusatz eines Überschusses erfolgt, so em-

¹⁾ Siehe diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 177, 245 u. 377.

Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol. Chemie, XXXVIII.

pfeiht es sich, die Ausfällung in folgender Weise vorzunehmen. Man fügt zunächst so lange kleine Mengen der Quecksilbersulfatlösung hinzu, als noch die sofortige Entstehung eines Niederschlages zu beobachten ist; erfolgt in einer abfiltrierten Probe die Fällung auf weiteren Zusatz des Fällungsmittels erst nach einigen Sekunden, so saugt man den ganzen Niederschlag schnell durch eine Nutsche ab, versetzt das Filtrat mit einem ausreichenden Überschuß des Quecksilbersulfats und läßt es 2—3 Tage stehen. Es bildet sich dann ein zweiter Niederschlag, welcher das Cytosin enthält, während die übrigen durch Quecksilbersulfat fällbaren Stoffe sich im ersten Niederschlag befinden. Diese Fällungsmethode bewährte sich besonders gut bei der Untersuchung der Nucleinsäuren.

In allen Fällen wird der das Cytosin enthaltende Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt und die Flüssigkeit nach der Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird durch Baryt zerlegt, der Überschuß des Baryts aus dem Filtrate durch Kohlensäure entfernt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit siedendem Wasser aufgenommen. Man wird jetzt in vielen Fällen zur Ausfällung des Cytosins mit Vorteil nach dem Vorgange von F. Kutscher ¹⁾ das Silbernitrat in der für die Hexonbasen, Thymin usw. gebräuchlichen Weise anwenden. Man säuert die Flüssigkeit mit Salpetersäure an und fügt nun Silbernitratlösung hinzu, bis eine herausgenommene Probe mit Barytwasser eine braungelbe Fällung gibt. Beim Zusatz des Silbernitrats zu der sauren Lösung bildet sich ein Niederschlag, welcher die Nucleinbasen enthält. Dieser wird abfiltriert. Zu dem mit Baryt neutralisierten Filtrat setzt man jetzt langsam Barytwasser hinzu, so lange eine abfiltrierte Probe beim Überschichten mit ammoniakalischer Silberlösung noch eine Niederschlagsbildung erkennen läßt. Schon beim Neutralisieren mit Baryt ist ein Niederschlag entstanden, der sich auf weiteren Zusatz von Baryt vermehrt und der das Cytosin (eventuell

¹⁾ Sitzungsber. d. Gesellschaft f. d. Beförd. d. ges. Naturwissensch. in Marburg 1901, S. 94.

neben Histidin) enthält. Man filtriert diesen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser aus, zerlegt ihn mit Salzsäure und leitet durch die vom Chlorsilber abfiltrierte Lösung zur Entfernung der gelösten Spuren von Silber noch etwas Schwefelwasserstoff. Man dampft die Lösung zur Trockne ein, nimmt mit Wasser auf und fällt durch Zusatz von Platinchlorid das schwer lösliche Cytosinplatinchlorid heraus. Das Histidin, welches ein leichter lösliches Platindoppelsalz bildet, bleibt gelöst. Man kann die Trennung des Cytosins vom Histidin auch bewirken, indem man die Lösung der Chloride mit Ammoniak alkalisch macht. Das Cytosin, welches viel schwerer löslich ist, als das Histidin, krystallisiert dann aus seiner konzentrierten Lösung zum größten Teil heraus. Das freie Cytosin oder das Cytosinplatinchlorid werden durch Umkrystallisieren gereinigt. Das zuerst von A. Kossel und A. Neumann beschriebene ¹⁾ und von uns analysierte ²⁾ schwer lösliche Pikrat eignet sich weniger gut zur Reinigung. Oft enthält der Silberniederschlag auch noch Uracil, welches aus der Lösung der Chloride herauskrystallisiert oder als schwer lösliche Masse zurückbleibt, wenn man die eingedampfte Lösung des Chlorids mit Wasser aufnimmt.

II. Bildung des Cytosins aus der Hefenucleinsäure.

Die von uns nachgewiesene Verbreitung des Cytosins in tierischen Organen und die Entstehung aus den Nucleinstoffen legten den Gedanken nahe, daß das Cytosin ebenso wie das Thymin und Uracil zu denjenigen organischen Verbindungen gehört, welche in allen entwicklungsfähigen Zellen zu finden sind. Zur Prüfung dieser Voraussetzung versuchten wir den Nachweis des Cytosins auch in der Hefezelle zu führen.

Wir erhitzen 200 g Hefenuclein mit 800 ccm 16 volumprozentiger Schwefelsäure 2 Stunden auf 150° und fällten die Flüssigkeit mit Quecksilbersulfat, nachdem wir vorher mit Kalk und sodann mit Baryt die Schwefelsäure und einen

1) Berichte d. deutsch. chem. Ges., Bd. 27, S. 2215.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 378.

Teil der Huminstoffe entfernt hatten. Die Fällung wurde in oben beschriebener Weise fraktioniert ausgeführt, und der zweite Niederschlag auf Cytosin verarbeitet. Derselbe enthielt so wenig Beimengungen, daß eine Überführung in die Silberverbindungen nicht nötig war. Wir begnügten uns mit der Phosphorwolframsäurefällung und führten das Cytosin, welches aus diesem Niederschlag fast rein erhalten wurde, in das Platindoppelsalz über, dessen Analyse folgende Zahlen lieferte:

I.	0,1746 g Substanz lieferte 0,0528 g Pt, d. i. 30,94 %.	
II.	0,1874 „ „ gab 21,7 ccm Stickstoff bei 16° und 768 mm Barometerstand, d. i. 13,71 %.	
	Berechnet für $(C_4H_5N_3O)_2 PtCl_4 \cdot 2 HCl$:	Gefunden:
	Pt 30,84	30,94
	N 13,34	13,71.

Hierdurch ist die Entstehung des Cytosins aus den Nucleinstoffen der Hefe, welche durch F. Kutscher¹⁾ bereits wahrscheinlich gemacht war, sicher nachgewiesen.

III. Salze des Cytosins.

Von den Salzen des Cytosins haben wir bisher folgende untersucht:

1. *Cytosinpicrat* entspricht, wie wir in einer früheren Mitteilung nachgewiesen haben, der Formel $C_4H_5N_3O$, $C_6H_3N_3O_7$.

2. *Cytosinplatinchlorhydrat*. $(C_4H_5N_3O)_2 PtCl_4 \cdot 2 HCl$, in unseren früheren Mitteilungen beschrieben und von uns zum Nachweis des Cytosins benutzt.

3. *Cytosinnitrat*. Dasselbe läßt sich leicht in schön kristallisiertem Zustand darstellen und entspricht nach unserer Analyse der Formel $C_4H_5N_3O$, HNO_3 .

0,1660 g Nitrat gaben 46,2 ccm Stickstoff bei 16° und 760 mm Bar., d. i. 32,62 % N.

Berechnet für $C_4H_5N_3O$, HNO_3 :	Gefunden:
N 32,26	32,62.

4. *Cytosinsulfate*. Die Untersuchung der Sulfate führte zu dem auffallenden Ergebnis, daß das Cytosin neben einem leicht löslichen sauren Salz noch ein schwer lösliches basisches Sulfat bildet.

¹⁾ l. c.

Basisches Cytosinsulfat. Man erhält dieses Salz, wenn man zu einer Lösung der freien Base soviel Schwefelsäure hinzufügt, daß auf 1 Molekül Cytosin $\frac{1}{2}$ Äquivalent Schwefelsäure vorhanden ist. Es scheidet sich dann ein weißer in feinen Nadeln krystallisierter Niederschlag aus. Häufig beobachteten wir auch die Ausscheidung dieses Salzes, wenn wir schwefelsäurehaltige oder mit Schwefelsäure neutralisierte Lösungen des Cytosins einengten. Derartige Präparate ergaben bei der Analyse folgende Zahlen:

Präp. I. 0,1850 g Sulfat gab 0,0804 g BaSO₄, d. i. 18,28% H₂SO₄.
 Präp. II. 0,1396 > > > 0,0604 > BaSO₄, d. i. 18,20% H₂SO₄.

Ein drittes Präparat wurde dargestellt, indem wir zu einer Lösung, welche 0,4782 g Cytosin (wasserfrei berechnet) enthielt, 4,3 ccm N/2-Schwefelsäure hinzusetzten. Der sofort entstehende Niederschlag ergab folgende Analysenzahl.

Präp. III. 0,1508 g Substanz gab 0,0638 g BaSO₄, d. i. 17,80% H₂SO₄.
 Berechnet für (C₄H₅N₃O)₄ H₂SO₄: Gefunden:

	Präp. I	Präp. II	Präp. III
H ₂ SO ₄ 18,09	18,28	18,20	17,80.

Saures Cytosinsulfat. Wenn man eine Lösung der Cytosinsulfate nach dem Herauskristallisieren des basischen Sulfats weiter einengt, so krystallisiert ein Salz von der Formel (C₄H₅N₃O) H₂SO₄.

Die Analyse dieses leicht löslichen Sulfats führte zu folgenden Ergebnissen:

0,2104 g Substanz gaben 0,2367 g BaSO₄, d. i. 47,33% H₂SO₄.
 Berechnet für C₄H₅N₃O, H₂SO₄: Gefunden:
 H₂SO₄ 46,93 47,33.

Bei unseren früheren Versuchen, daß Cytosinsulfat zum Nachweis der Base zu verwenden, erhielten wir Mischungen der beiden Sulfate und infolgedessen schwankende Analysenzahlen. Wir haben deshalb die oben beschriebenen Salze, besonders das Platindoppelsalz, für diesen Zweck vorgezogen.

IV. Konstitution des Cytosins.

Für die folgenden Versuche dienten etwa 4 g Cytosin, welches wir größtenteils aus Thymus dargestellt hatten. Das

Präparat war durch Überführung in das leicht lösliche Chlorhydrat gereinigt und völlig frei von Uracil.

Bereits in unserer früheren Mitteilung haben wir die Angabe gemacht, daß das Cytosin durch salpetrige Säure in Uracil übergeführt wird. Unsere weiteren Versuche haben dieses Ergebnis bestätigt.

A. Einwirkung salpetriger Säure auf Cytosin.

Wir zersetzten 2 g krystallwasserhaltiges Cytosin, welches in Wasser unter Zusatz von Schwefelsäure gelöst war, bei Wasserbadtemperatur allmählich mit kleinen Mengen einer 3%igen Lösung von Natriumnitrit, solange noch ein Tropfen der Reaktionsflüssigkeit mit einer Pikrinsäurelösung (Esbachs Reagens) einen schnell entstehenden krystallinischen Niederschlag bildete. Hierzu war das 3 bis 4fache der berechneten Menge Natriumnitrit nötig. Die Flüssigkeit wurde sodann mit Ammoniak neutralisiert und mit Silbernitrat gefällt, wobei diejenige schwache Alkaleszenz hergestellt wurde, bei welcher die Menge des Niederschlags die größte war. Der Niederschlag wurde abfiltriert, ausgewaschen, durch Salzsäure zersetzt und die vom Chlorsilber abfiltrierte Flüssigkeit eingedampft. Eine Probe des eingedampften Rückstandes gab sehr deutliche Alloxanreaktion (Murexidreaktion): Rotfärbung mit Ammoniak, Blauviolett färbung mit Natron. Der Verdampfungsrückstand wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert und der Filtrerrückstand mit Wasser ausgewaschen. Dieser Rückstand betrug 0,2 g und besaß die Eigenschaften des Uracils. Er gab die charakteristische Fällung mit Silbernitrat und Ammoniak, die sich im Überschuß des Ammoniaks leicht löst, war in Wasser und in verdünnter Salzsäure schwer löslich, gab keine Fällung mit Phosphorwolframsäure und enthielt keine Chlorwasserstoffsäure.

Die Analyse der aus Wasser umkrystallisierten Substanz ergab folgendes:

0,1056 g Substanz gaben 22,7 ccm Stickstoff bei 17° und 768 mm Bar.,
d. i. 25,35 % N.

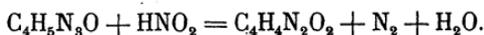
Berechnet für Uracil $C_4H_4N_2O_2$:

N 25,05

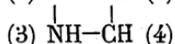
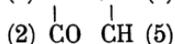
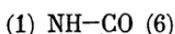
Gefunden:

25,35

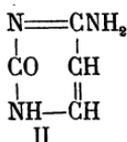
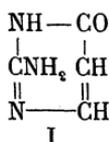
Durch diesen Versuch ist die Konstitution des Cytosins im wesentlichen festgestellt. Das Cytosin ist in Uracil überzuführen durch dieselbe Reaktion, durch welche Strecker das Guanin in Xanthin und A. Kossel das Adenin in Hypoxanthin überführte.



Da die Konstitution des Uracils folgende ist



so wird man auch das Cytosin als eine Pyrimidinverbindung betrachten müssen, welche entweder an dem mit 2 oder an dem mit 6 bezeichneten Kohlenstoffatom eine Amidogruppe trägt. Man kann hiernach folgende Konstitutionsformeln für das Cytosin aufstellen: ¹⁾



Zwischen beiden Formeln läßt sich durch einen Oxydationsversuch eine Entscheidung treffen. In der Formel I ist die Gruppierung der Kohlenstoff- und Stickstoffatome eine ähnliche wie im Guanin, man muß also hier ebenso wie bei der Oxydation des Guanins die Bildung von Guanidin erwarten, während nach Formel II Harnstoff oder ein Derivat des Harnstoffs entstehen müßte.

B. Oxydation des Cytosins.

Zur Oxydation des Cytosins benutzten wir das Baryumpermanganat, welches schon von Steudel ²⁾ mit gutem Erfolg bei der Konstitutionsbestimmung des Thymins, von Kutscher ³⁾ bei der Oxydation des Arginins und von Zickgraf ⁴⁾ bei der des Lysins angewandt war.

1) Wir sehen bei unseren Erörterungen von einigen für die Auffassung der Konstitution bis jetzt noch wenig wichtigen Möglichkeiten, z. B. der Hydroxylformel, ab.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 241.

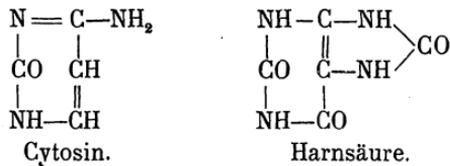
3) Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 278.

4) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35, S. 3401.

1,9 g krystallwasserhaltiges Cytosin wurde in 100 ccm Wasser gelöst, auf etwa 40° erwärmt und allmählich mit einer Lösung von 7,8 g Baryumpermanganat in Wasser versetzt. Die Temperatur blieb hierbei auf der gleichen Höhe. Die Permanganatlösung wurde bis gegen Ende des Versuchs ziemlich schnell, zuletzt langsam entfärbt. Die Reaktion war zuletzt sehr schwach alkalisch, Ammoniakentwicklung war nicht zu bemerken. Die Untersuchung der Reaktionsflüssigkeit ergab, daß sich eine reichliche Menge Oxalsäure gebildet hatte, jedoch war kein Guanidin nachweisbar. Auch die ziemlich weit eingeeengte neutralisierte Lösung gab die charakteristische Fällung mit Natriumpikrat nicht. Hingegen ließ sich aus der zur Trockne eingedampften Masse durch Alkohol eine Substanz extrahieren, welche beim Verdunsten des Alkohols herauskrystallisierte. Diese Substanz war kein Harnstoff, denn sie ergab nicht das charakteristische Nitrat, war auch in Wasser und Alkohol schwerer löslich als Harnstoff. Auch nachdem wir aus dem in Alkohol unlöslichen Rest die Oxalsäure entfernt hatten, konnten wir durch Alkohol keine deutlich nachweisbare Spur von Harnstoff ausziehen.

Das durch Alkohol gelöste Oxydationsprodukt erwies sich als Biuret. Die wässrige Lösung der Krystalle gab mit Natronlauge und wenig Kupfersulfat schon in der Kälte eine kräftige Rotfärbung, auch stimmten die Löslichkeitsverhältnisse — soweit dies ohne Löslichkeitsbestimmungen zu ermitteln ist — mit denen des Biurets überein. Völlig überzeugende Resultate lieferte die Untersuchung der Krystalle. Das Biuret krystallisiert häufig in Form vierseitiger Blättchen, welche unter dem Mikroskop von zwei Kanten begrenzt sind, welche miteinander Winkel von ungefähr 64 und 116° bilden. Bei der Untersuchung im polarisierten Licht findet man, daß die Auslöschungsrichtung mit einer dieser Kanten, welche gewöhnlich die längere ist, einen Winkel von 62 resp. 28° bildet. Diese Merkmale fanden wir gut geeignet zur Erkennung des Biurets; sie zeigten sich in gleicher Weise bei dem aus Cytosin entstandenen Oxydationsprodukt. Auch bei der Untersuchung des Schmelzpunktes erwies sich unser Produkt als identisch mit Biuret;

Stellt man die Formel des Cytosins denen der Purinverbindungen und besonders der Harnsäure gegenüber, so ergeben sich sehr bemerkenswerte Beziehungen zwischen beiden.



Man ersieht, daß eine Bildung von Harnsäure aus Cytosin erfolgen kann durch Oxydation und Anlagerung von CONH. Beide Vorgänge sind im Tierkörper bekannt. Eine Anlagerung von Cyansäure findet bekanntlich statt nach Einführung verschiedener Amidosäuren, z. B. der Sulfanilsäure, des Taurins u. a.

Das Cytosin kann also als eine Vorstufe der Harnsäure und der Purinverbindungen überhaupt betrachtet werden. Andererseits erhebt sich die Frage, ob Cytosin und Uracil nicht als Abbauprodukte der Purinderivate aufzufassen sind. Man könnte sogar die Frage aufwerfen, ob das Uracil und Cytosin nicht zum Teil aus einer Zersetzung präformierter Purinverbindungen unter der Einwirkung der zur Hydrolyse verwandten Säuren entstehen könne. Diese letztere Möglichkeit ist jedoch auszuschließen. Wir haben Guanin derselben Einwirkung der Schwefelsäure bei 150° unterworfen, welche wir bei der Zersetzung der Gewebe benutzten, und dies Reaktionsprodukt auf Uracil und Cytosin untersucht, jedoch vergeblich.

Sollte es wirklich gelingen, eine Bildung von Cytosin bei der physiologischen Zersetzung der Purinderivate festzustellen, so wäre damit selbstverständlich über die Rolle dieser Base bei den synthetischen Vorgängen nichts entschieden.

Die durch die deskriptive Chemie der tierischen Gewebe festgestellten Tatsachen müssen in gleicher Weise wie die Ergebnisse der anatomischen Forschung den Ausgangspunkt für die physiologische Betrachtung bilden. Inmitten des Gewirrs vieldeutiger Versuche über die Entstehung der Harnsäure erscheinen die Ergebnisse der chemischen Forschungen: unsere Kenntnisse über die Verbreitung der Purinderivate, über ihre Entstehung bei der Hydrolyse der Kernsubstanzen und unsere

Anschaungen über ihre Konstitution wie ein unerschütterlicher Grundstein. Ebenso werden auch die neugewonnenen Kenntnisse über das Vorkommen und die physiologischen Beziehungen des einfachen Pyrimidinringes im Thymin, Uracil und Cytosin eine sichere Basis bilden, auf der sich die Lehre von der Entstehung des erweiterten Pyrimidinringes der Nucleinbasen und der Harnsäure aufbauen kann.
