

wittel (Filter oder fluoreszenzlöschende Substanz) klare, gut auswertbare Spektren lieferten. Im alkalischen Gebiet mißlang diese Filtration, da, wie schon J. T. Edsall²⁾ beobachtete, eine Braunfärbung eintrat. Eine Ultrafiltration mußte wegen der Unbeständigkeit der Filter gegenüber Lauge ausscheiden. Ebenfalls erfolglos war eine Filtration über feingepulvertes Glykokoll. Zum Ziel führte schließlich eine langsame Filtration durch einen engporigen Porzellanfiltertiegel A2. Die so erhaltenen Lösungen gaben bei Filteraufnahmen mit den Quecksilberlinien k, bzw. e brauchbare Spektren. Besonderes Augenmerk mußte auf die Entfernung kleinster Luftbläschen gerichtet werden, die einfach und sicher durch längeres Evakuieren der Lösung im Aufnahmegefäß unter gelegentlichem Klopfen erreicht wurde.

Die pH -Messungen wurden mit einem Jonometer ausgeführt. Die über dessen Meßbereich 1—13 hinausgehenden Werte wurden auf Grund der angewandten Säure geschätzt.

Die Eiweißhydrolysate wurden aus Gelatine und einem käuflichen Pepton nach E. Fischer mit Salzsäure bzw. Schwefelsäure erhalten. Zunächst wurden sie durch mehrmaliges Aufkochen mit Tierkohle entfärbt. Alle bei den Glykokoll-Lösungen wirksamen Filtrationsmethoden ergaben keine verwertbaren Lösungen. Bei den Versuchen mit Ultrafiltern versagten auch noch alle Filter einschließlich der „Ultrafeinfilter fein“³⁾. Erst die Verwendung der „Ultrafilter feinst“ führte zu der gewünschten Klarheit der Lösungen. Die noch vorhandene Fluoreszenz konnte nach den Angaben von N. Wright und W. C. Lee⁴⁾ durch Zusatz von Kaliumjodid als Fluoreszenzlöcher soweit herabgedrückt werden, daß sich saubere und brauchbare Spektren ergaben. Mit gleicher Wirksamkeit konnte auch Kaliumrhodanid als Fluoreszenzlöcher angewandt werden, das bei einer auszuführenden quantitativen Analyse den Vorteil besitzt, daß dessen Linien gleich als Bezugsschwärzungen zu verwenden sind.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die großzügige apparative Unterstützung dieser Arbeit.

168. Hellmut Bredereck, Gerhard Müller und Eva Berger:
Zur Konstitution der Thymonucleinsäure: Die Verknüpfungsstellen
zwischen den Basen und Desoxyribose. (Nucleinsäuren, XVI. Mitteil.*)).

Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.
(Eingegangen am 10. September 1940.)

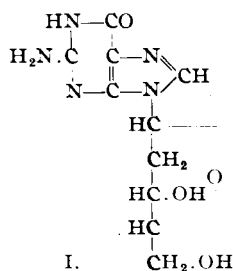
Zur weiteren Klärung der Konstitution der Thymonucleinsäure war die Frage nach der Verknüpfungsstelle zwischen den einzelnen Basen und dem jeweiligen Desoxyribose-Rest zu beantworten. Von Gulland und Story¹⁾ war durch Messung der Absorptionsspektren festgestellt worden, daß die Purinbasen Guanin und Adenin in Stellung 9 mit der Desoxyribose verknüpft sind. Die entsprechenden Nucleoside, Guanin-desoxyribosid und Adenin-desoxyribosid, besitzen daher die Konstitution I und II.

Unbewiesen ist in diesen Verbindungen die Furanosestruktur der Desoxyribose. Da aber für die entsprechenden Nucleoside mit d-Ribose als Kohlenhydratkomponente und auch für Thymidin (= Thymin-desoxyribosid) die Furanosestruktur bewiesen ist, wird man auch für alle anderen Desoxyribo-nucleoside die gleiche Ringstruktur annehmen dürfen. Zur

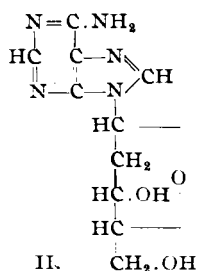
²⁾ Die Bezeichnungsweise entspricht den Angaben der Membranfilter A.-G., Göttingen.

*) XV. Mitteil.: B. **73**, 269 [1940].

¹⁾ Journ. chem. Soc. London **1938**, 259, 692.



I. Guanin-desoxyribosid.



II. Adenin-desoxyribosid.

Klärung der Frage nach der Verknüpfungsstelle zwischen den Basen, insbesondere den Pyrimidinbasen und Desoxyribose, haben wir die Methode der Methylierung der Thymonucleinsäure und anschließender Spaltung des Methylierungsproduktes herangezogen.

Methylierungen von Polynucleotiden sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Von Case und Hill²⁾ ist lediglich versucht worden, Hefenucleinsäure mittels Diazomethans zu methylieren. Die Versuche führten jedoch zu keinem Ergebnis. Wir haben jetzt die Methylierung von Thymonucleinsäure mit Dimethylsulfat und Alkali in der Weise durchgeführt, daß wir bei Zimmertemperatur getrennt Dimethylsulfat und Alkali zutropfen ließen. Durch laufende p_{H} -Kontrolle wurde darauf geachtet, daß das p_{H} während der Methylierung in der Regel zwischen 8 und 9 lag, niemals über 10 hinausging. Das bei unserer Aufarbeitung erhaltene Methylierungsprodukt bestand in der Hauptsache aus dem Natriumsalz der methylierten Thymonucleinsäure neben etwas freier Säure. Nach einmaliger Methylierung konnten 7 *N*-Methyl und 2 *O*-Methyl festgestellt werden. Eine nochmalige Methylierung ergab keine Erhöhung des *N*-Methylgehaltes, andererseits wurde jetzt ein etwas höherer *O*-Methyl-Gehalt gefunden. Für die *N*- und *O*-Methyl-Bestimmung wurde eine Halbmikromethode ausgearbeitet, die sich an die Mikromethode von Pregl-Lieb³⁾ anlehnte. Wenn auch bei der Größe des Moleküls die Methylgruppen-Bestimmung eine gewisse Unsicherheit bietet, so konnte doch sichergestellt werden, daß der *N*-Methylgehalt bei weiterer Methylierung nicht mehr ansteigt. Zur Isolierung der methylierten Basen und somit Feststellung der Verknüpfungsart zwischen Basen und Zucker haben wir daher das einmal methylierte Produkt verwendet.

Zunächst galt es sicherzustellen, daß dem Methylierungsprodukt noch die Tetranucleotidstruktur der ursprünglichen Thymonucleinsäure zugrunde liegt. Wir haben früher⁴⁾ bereits die Einheitlichkeit und damit den tetranucleotidähnlichen Aufbau der Thyminsäure durch Verfolgung des Aciditätszuwachses bei der fermentativen Spaltung sichergestellt. Auch im Falle der methylierten Thymonucleinsäure haben wir mit Süßmandel-Präparaten bei p_{H} 4.9 eine fermentative Spaltung durchgeführt und dabei einen Aciditätszuwachs von etwa 4 Äquivalenten gefunden. Die methylierte Thymonucleinsäure stellt somit eine 4-basische Säure dar. Es mag auffallen, daß demgegenüber die Thymonucleinsäure⁵⁾ selbst und ebenso die Thyminsäure⁴⁾

²⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **52**, 1536 [1930].

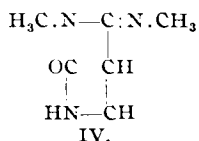
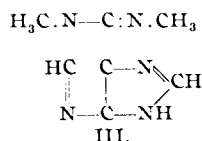
³⁾ Pregl-Roth, „Die quantitative organische Mikroanalyse“, 4. Aufl., S. 229.

⁴⁾ XII. Mitteil.: B. **72**, 115 [1939].

⁵⁾ XIII. Mitteil.: B. **72**, 121 [1939].

eine 5-basische Säure ist. Wir glauben aber, daß in der methylierten Thymonucleinsäure die eine sekundäre Gruppe der Phosphorsäure als Methylester vorliegt, der dann bei der Fermentspaltung mitverseift wird. Auf jeden Fall liegt in der methylierten Thymonucleinsäure noch die Tetranucleotidstruktur vor.

Wir haben zunächst versucht, durch Spaltung des Methylierungsproduktes mit Chlorwasserstoff methylierte Purinbasen zu erhalten. Es gelang uns, ein Dimethyladenin als Pikrat zu erhalten. Da dieses Dimethyladenin-pikrat in der Literatur nicht bekannt war, haben wir es auf folgende Weise identifiziert: Wir unterwarfen Adenosin unter den gleichen Bedingungen wie Thymonucleinsäure der Methylierung, spalteten das Methylierungsprodukt mit Chlorwasserstoff und erhielten das gleiche Dimethyladenin-pikrat wie aus methylierter Thymonucleinsäure. Da die Struktur des Adenosins als die eines Adenin-ribofuranosids mit Verknüpfung in Stellung 9 bekannt ist, folgt, daß auch in der Thymonucleinsäure bzw. im Adenin-desoxyribosid Adenin in der gleichen Stellung mit der Desoxyribose verknüpft ist. Die Methylierung ist an den freien *N*-Wasserstoffatomen erfolgt. Das Pikrat ist demnach als das des 1.*N*⁶-Dimethyl-adenins (III) anzusprechen. Aus der methylierten Thymonucleinsäure konnten wir kein methyliertes Guanin isolieren, hingegen gelang es uns, durch Methylierung von Guanosin und anschließende Spaltung ein Dimethylguanin in Form seines kristallisierten Chlorhydrats und Pikrats zu gewinnen. Welche der möglichen tautomeren Formeln dem Dimethylguanin zukommt, ist nicht bewiesen.



Zwecks Isolierung methylierter Pyrimidine haben wir die methylierte Thymonucleinsäure einer schwefelsauren Hydrolyse unterworfen. Es gelang, zunächst das Pikrat einer Base zu erhalten, das sich auf Grund der Analyse als bisher nicht bekanntes Dimethylcytosin-pikrat erwies. Wir haben nunmehr Cytidin, dessen Struktur bekannt ist, der gleichen Methylierung und anschließenden Spaltung unterworfen und dabei das gleiche Dimethylcytosin-pikrat erhalten. Da im Cytidin die Verknüpfung zwischen Cytosin und Ribose in Stellung 3 erfolgt ist, muß auch in der Thymonucleinsäure bzw. im Cytosin-desoxyribosid die Verknüpfung zwischen Cytosin und Desoxyribose in der gleichen Stellung erfolgen. Das neue Dimethylcytosin-pikrat ist daher das Pikrat des 1.*N*⁶-Dimethyl-cytosins (IV). Außer diesem Pikrat konnten wir aus der methylierten Thymonucleinsäure noch eine Base isolieren, die auf Grund der Analyse und des Schmelzpunktes als 1-Methylthymin anzusprechen ist, das bereits von Johnson und Clapp⁶⁾ beschrieben worden ist. Die Isolierung dieser Verbindung beweist, daß in der Thymonucleinsäure bzw. im Thymidin, Thymin mit der Desoxyribose in Stellung 3 verknüpft ist. Die Stellung 3 ist somit ganz allgemein die Verknüpfungsstelle sowohl in den Ribo- als auch in den Desoxyribo-pyrimidinnucleosiden.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchung danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

⁶⁾ Journ. biol. Chem. **5**, 49 [1908].

Beschreibung der Versuche.

Methylierung der Thymonucleinsäure.

Die Methylierung wurde in einem 1 l Normalschliff-Dreihalskolben durchgeführt, der seitlich mit 2 graduierten Tropftrichern versehen war, während durch den mittleren Schliff ein Rührer führte. Der Kolben befand sich in einem Wasserbad. Zur Kontrolle des p_{H} -Wertes wurde in Abständen von 10—15 Min. eine Probe der Reaktionsflüssigkeit mit p_{H} -Papier (Lyphan) geprüft.

26 g aus Milz dargestellte rohe Thymonucleinsäure wurden in 300 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Neutralisation mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus in Lösung gebracht. Sodann wurden noch 30 ccm 2-n. Natronlauge zugegeben und die dunkelbraune trübe Lösung erwärmt, bis sich das kolloidale Eisenhydroxyd flockig abschied. Nach dem Erkalten wurde vom Ausgeflockten abzentrifugiert und die Lösung mit Eisessig gegen Lackmus wieder neutralisiert. Zur Methylierung wurden in der oben beschriebenen Apparatur bei einer Wasserbadtemperatur von 30—35° unter Rühren 80 ccm Dimethylsulfat und etwa 100 ccm 32-proz. Natronlauge zugetropft, und zwar das Dimethylsulfat mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 Tropfen pro Sek. (die Gesamtmenge war dann in etwa 2 Stdn. zugegeben). Die Zutropfgeschwindigkeit der Natronlauge wurde so reguliert, daß die Reaktionslösung dauernd einen p_{H} -Wert 8—9, höchstens bis 10 zeigte. Zu diesem Zwecke gab man zunächst alle 4—5 Sek. einen Tropfen Natronlauge zu, während man im weiteren Verlauf bei verringerter Reaktionsgeschwindigkeit die Zutropfgeschwindigkeit herabsetzen mußte. In diesem Stadium kann man die Wasserbadtemperatur auf 45° erhöhen.

Der Kolbeninhalt wurde anschließend im Vak. bei 30—40° auf 180 ccm eingeengt, mit Eisessig auf p_{H} 4 gebracht und unter Rühren mit 1600 ccm Alkohol versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und die zähe klebrige Fällung durch Verreiben mit absol. Alkohol/Aceton (1:1) im Mörser in absaugbare Form gebracht. Auf der Nutsche wurde der Rückstand noch mehrmals mit Aceton, anschließend mit Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Ausb. 16—18 g eines hellbraunen staubartigen Pulvers. Zur Reinigung wurde das Produkt nochmals in 80 ccm Wasser gelöst, mit Eisessig auf p_{H} 4 angesäuert und mit 600 ccm Alkohol gefällt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der ersten Fällung.

An analytischen Bestimmungen wurden P-, Na-, (O- und N-)CH₃-Bestimmungen und Titrationen durchgeführt:

Na-Bestimmung: Die zur Konstanz getrocknete Einwaage wurde im Bombenrohr mit 5 ccm roter, rauchender Salpetersäure (*d* 1.52) 7—8 Stdn. erhitzt, uns zwar zunächst auf 110°, während der letzten 3 Stdn. auf 240°. Aus der mit Wasser aus dem Bombenrohr gespülten Lösung wurde die Phosphorsäure mit Magnesiamischung entfernt, das Magnesium mit Schaffgottscher Lösung abgeschieden, die Ammonsalze in der Platinschale abgeraucht, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, vom Unlöslichen abfiltriert, mit Schwefelsäure abgeraucht und nach Zusatz von etwas festem Ammoncarbonat zur Gewichtskonstanz schwach geglüht.

1.0800 (I.), 0.7586 g (II.) Sbst.: 0.1518, 0.1227 g Na₂SO₄.

Gef. Na 4.54, 5.22% = 2.86, 3.29 Äquiv.

Mit denselben Proben I und II wurden die Titrationen durchgeführt. Das Methylierungsprodukt wurde in Wasser gelöst und mit n_{10} -NaOH gegen Phenolphthalein titriert.

0.6163 (I.), 2.0915 (II.) g Sbst.: 2.50, 3.10 ccm n_{10} -NaOH = 0.59, 0.22 Äquiv.

Addiert man die durch Na-Bestimmung und Titration gefundenen Werte, so findet man für Probe I eine Acidität von 3.45 Äquiv., für Probe II von 3.51 Äquiv.

P-Bestimmung: Zur Bestimmung des Gesamtposphors wurde die Substanz im Bombenrohr mit 1.5 ccm roter rauchender Salpetersäure durch 6-stdg. Erhitzen aufgeschlossen. Die aus dem Bombenrohr gespülte Lösung wurde auf 1 l verdünnt und zur spektrophotometrischen P-Bestimmung 2 ccm entnommen.

0.2121, 0.2121 g Sbst.: $\frac{1}{500}$, $\frac{1}{500}$ enth. 36.15, 35.85 γ .

Ber. (für einen Gehalt von 3 Na) P 8.56. Gef. P 8.51, 8.45.

Verschiedene, getrennt voneinander dargestellte Methylierungsprodukte ergaben folgende OCH_3 bzw. NCH_3 -Werte⁷⁾:

OCH_3 1.90, 2.12, 2.30, NCH_3 7.01, 7.34, 7.23.

Die Analysen sprechen für einen Gehalt von 2 OCH_3 - und 7 NCH_3 -Gruppen. Ein 2-mal methyliertes Produkt ergab folgende Werte:

OCH_3 2.98, 2.78, NCH_3 7.04, 7.15.

Fermentspaltung der methylierten Thymonucleinsäure.

Die zur Spaltung verwendete methylierte Thymonucleinsäure wurde bei 75°/2 mm über Phosphorpentoxyd zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Bereitung der Fermentlösung wurden 2 g „Emulsin“ (β -Glucosidase-wert 1) in 100 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank filtriert.

Ansatz: 2.1209 g methylierte Thymonucleinsäure, gelöst in 20 ccm Wasser, werden mit n_{10} -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert (verbr. 7.58 ccm); es werden zugegeben 25 ccm Fermentlösung und 40 ccm Acetatpuffer, sodann mit Wasser auf insgesamt 100 ccm aufgefüllt.

Kontrollansätze:

- a) ohne Ferment: 0.6183 g methylierte Thymonucleinsäure in 6 ccm Wasser, mit 2.50 ccm n_{10} -NaOH neutralisiert, dazu 12 ccm Acetatpuffer u. Wasser auf 30 ccm.
- b) ohne Substrat: 25 ccm Fermentlösung und 40 ccm Acetatpuffer, aufgefüllt mit Wasser auf 100 ccm.

Unmittelbar nach Fertigstellung der Ansätze wurde eine Probe von 10 ccm entnommen und gegen Phenolphthalein titriert. Die Ansätze wurden, mit einigen Tropfen Toluol versetzt, verschlossen bei 37° aufbewahrt. In den aus der Tafel ersichtlichen Zeitabständen wurden zur Titration jeweils 10 ccm aus jedem Ansatz entnommen.

Nach 6 Tagen wurden zu den Ansätzen, die durch die Probeentnahmen auf 50 ccm abgenommen hatten, erneut 12.5 ccm Emulsinlösung, 20 ccm Acetatpuffer und 17.5 ccm Wasser (zum Kontrollansatz ohne Ferment 3 ccm Puffer und 13 ccm Wasser) zugegeben. Die Substratkonzentration betrug nunmehr die Hälfte der ursprünglichen. Nach weiteren 8 Tagen wurden nochmals 20 ccm Fermentlösung, 20 ccm Acetatpuffer und 10 ccm Wasser zugegeben, so daß die Substratkonzentration nunmehr ein Viertel der ursprünglichen betrug. Jedesmal nach erneuter Fermentzugabe wurden die Titrationswerte neu bestimmt.

⁷⁾ Näheres über die Methylgruppen-Bestimmung s. Dissertat. G. Müller, Leipzig 1940 [D 15].

Die Titrationswerte der Kontrollansätze blieben während der Dauer des Versuches praktisch konstant. Sie sind daher nicht in die Tafel aufgenommen.

Spaltungsdauer in Tagen	Verbrauch von n_{10} -NaOH	Zuwachs in Äquiv.	Gesamtzuwachs in Äquiv.
0	2.40		
1	3.72	0.92	0.92
2	4.20	0.33	1.25
3	4.44	0.14	1.39
5	4.78	0.26	1.65
Fermentzugabe			
5	3.86		
6	4.02	0.22	1.87
8	4.39	0.51	2.38
10	4.47	0.11	2.49
13	4.57	0.14	2.63
Fermentzugabe			
13	3.64		
14	3.87	0.64	3.27
16	3.99	0.36	3.63
19	4.05	0.17	3.80
23	4.08	0.08	3.88

Gewinnung der methylierten Basen durch Hydrolyse der methylierten Thymonucleinsäure.

a) Dimethyladenin: 3 g durch Umfällen gereinigte methylierte Thymonucleinsäure wurden in 30 ccm 95-proz. Methylalkohol aufgeschlämmt und 2 Stdn. trockner Chlorwasserstoff (die letzte halbe Stde. unter Eiskühlung) durchgeleitet. Die abgeschiedene Substanz, die mit Kochsalz verunreinigt war, wurde abgesaugt, mit kaltem, HCl-gesättigtem 95-proz. Methylalkohol gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Ausb. etwa 0.5 g. 0.2 g wurden in 1 ccm Wasser gelöst, mit 2.6 ccm kalt gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt und filtriert. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wurde das ausgeschiedene Pikrat abgesaugt und nochmals aus 2 ccm Wasser umkrystallisiert. Hellgelbe, zu Büscheln vereinigte feine Nadeln. Schmp. 235°.

4.805 mg Subst.: 6.960 mg CO₂, 1.310 mg H₂O. — 3.407 mg Subst.: 0.848 ccm N₂ (25°, 758 mm).

C₁₃H₁₂O₇N₈ (392.2). Ber. C 39.78, H 3.08, N 28.58.

Gef. „ 39.51, „ 3.05, „ 28.43.

Aus der Mutterlauge ließen sich nach erneuter Zugabe von Pikrinsäurelösung noch kleinere Mengen Dimethyladenin-pikrat gewinnen. Das Pikrat eines Guaninderivates konnte nicht erhalten werden.

b) Dimethylcytosin: 9 g durch Umfällen gereinigte methylierte Thymonucleinsäure wurden in 36 ccm 25-proz. Schwefelsäure gelöst und im Bombenrohr 2 Stdn. auf 175—180° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde von den kohligen Rückständen abgesaugt, diese auf der Nutsche mehrfach mit siedendem Wasser ausgewaschen und das Gesamtfiltrat durch Zugabe

von heißgesättigter Barytlösung im Überschuß von Schwefelsäure und Phosphorsäure befreit. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit heißem Wasser ausgewaschen und das Gesamtfiltrat im Vak. auf 70 ccm eingeeengt. Aus der eingeeengten Lösung wurde der Überschuß an Barium mit Schwefelsäure entfernt. Zu dem hellgelbbraunen Filtrat wurden 120 ccm kalt gesättigte Pikrinsäurelösung zugegeben. Es entstand ein voluminöser, amorpher Niederschlag, der verworfen wurde (Harzprodukte?). Das Filtrat wurde im Vak. weiter eingeeengt, wobei sich an der Wandung weitere schwarzbraune Harzprodukte abschieden. Das Einengen wurde fortgesetzt, bis die ersten hellgelben Krystalldrusen erschienen (bei etwa 50 ccm). Unter schwachem Erwärmen wurde die klare Lösung von den Harzprodukten abgossen und auf dem Wasserbad (nicht siedend, kleine Flamme!) auf 15 ccm eingeeengt. Dabei erfolgte eine reichliche Abscheidung von gelben, zu kugligen Aggregaten vereinigten Krystallen. Nach Stehenlassen im Eisschrank wurden diese abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet. Ausb. 1 g. Zur Reinigung wurde das Pikrat aus 25 ccm Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Das reine Pikrat schied sich in langen goldgelben Nadeln aus. Schmp. 222°.

4.682 mg Sbst.: 6.770 mg CO₂, 1.440 mg H₂O. — 4.276 mg Sbst.: 0.862 ccm N₂ (23°, 754 mm).

C₁₂H₁₂O₆N₆ (368.1). Ber. C 39.12, H 3.28, N 22.82.

Gef. „ 39.44, „ 3.44, „ 23.07.

c) Methylthymin: Die nach dem Absaugen des rohen Dimethylcytosinpicrats verbliebene Mutterlauge wurde bei 40° im Vak. soweit wie möglich eingeeengt, wobei reichliche Krystallabscheidung erfolgte. Die Krystalle wurden abgesaugt, dann mehrfach mit insgesamt 30 ccm kaltem Alkohol im Mörser verrieben, bis sie farblos waren. Der Rückstand bestand aus Natriumsulfat. Die alkoholischen Auszüge wurden in einer Krystallisierschale zur Trockne verdampft. Zur Befreiung von anhaftenden harzigen Begleitstoffen wurden die Krystalle auf einem Tonteller abgepreßt, sodann aus Wasser in Gegenwart von Tierkohle umkrystallisiert. Derbe Prismen. Schmp. 210°. Schmp. für 1-Methyl-thymin⁶⁾ 202—205°, für 3-Methyl-thymin⁶⁾ 280—282° bzw. 284°.

4.148 mg Sbst.: 7.810 mg CO₂, 2.120 mg H₂O. — 4.304 mg Sbst.: 0.742 ccm N₂ (23°, 754 mm).

C₆H₈O₂N₂ (140.1). Ber. C 51.40, H 5.76, N 20.00.

Gef. „ 51.36, „ 5.72, „ 19.72.

Methylierung von Nucleosiden und anschließende Hydrolyse.

a) Methylierung von Guanosin, Dimethylguanin: 4 g Guanosin wurden in 40 ccm Wasser aufgeschlämmt und die Suspension durch Zugabe von verd. Natronlauge auf p_H 8.5 gebracht. Die Methylierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Thymonucleinsäure innerhalb von 2 Stdn. durch allmähliche Zugabe von 14 ccm Dimethylsulfat und 20 ccm 32-proz. Natronlauge, wobei das Guanosin in Lösung ging. Nach Beendigung der Methylierung wurde die Lösung mit 2-n. Schwefelsäure neutralisiert und im Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde 2-mal mit je 20 ccm absol. Alkohol extrahiert und die vereinigten Auszüge eingedampft. Der Rückstand wurde nunmehr 3-mal mit je 20 ccm 96-proz. Alkohol extrahiert und die Auszüge wieder eingeeengt. Der verbliebene Sirup wurde schließlich

noch 3-mal mit je 10 ccm Alkohol extrahiert und die vereinigten Auszüge eingedampft. Der Rückstand wurde mit 15 ccm Alkohol aufgenommen. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wurde vom abgeschiedenen methylschwefelsauren Natrium abgesaugt und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der verbliebene Sirup (0.7 g) wurde in 10 ccm 95-proz. Methylalkohol gelöst und $1\frac{1}{2}$ Stdn. Chlorwasserstoff durchgeleitet. Nach Beendigung wurde die Lösung im Vak. eingeeengt; dabei schieden sich Krystalle ab. Diese wurden abgesaugt und aus 95-proz. Alkohol umkrystallisiert. Schmp. 275°.

2.971 mg Subst.: 0.843 ccm N_2 (21°, 744 mm).

$C_7H_9ON_5$, HCl (215.5) Dimethylguanin-chlorhydrat. Ber. N 32.57. Gef. N 32.25.

Aus dem Chlorhydrat wurde durch Versetzen mit kalt gesättigter Pikrinsäurelösung das Pikrat erhalten. Es wurde aus Wasser umkrystallisiert. Schmp. 214°.

3.543 mg Subst.: 0.853 ccm N_2 (22°, 740 mm).

$C_{13}H_{12}O_8N_8$ (408.1) Dimethylguanin-pikrat. Ber. N 27.45. Gef. N 27.13.

b) Methylierung von Adenosin: Dimethyladenin: Die Methylierung von Adenosin (4 g) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim Guanosin. Nach Beendigung der Methylierung wurde die Lösung mit verd. Schwefelsäure neutralisiert und im Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde 3-mal mit absol. Alkohol extrahiert und die Auszüge eingedampft. Der krystalline Rückstand wurde aus 95-proz. Alkohol umkrystallisiert, das ausgeschiedene methylschwefelsaure Natrium wurde abgetrennt und die Mutterlauge zum Sirup eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 ccm 95-proz. Methylalkohol aufgenommen und $1\frac{1}{2}$ Stdn. Chlorwasserstoff eingeleitet. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit HCl-gesättigtem Methylalkohol ausgewaschen. Eine wäßrige Lösung des Chlorhydrats wurde mit kalt gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Das abgeschiedene Pikrat wurde aus Wasser umkrystallisiert. Schmp. 236°. Der Mischschmelzpunkt mit Dimethyladenin-pikrat aus der methylierten Thymonucleinsäure ergab keine Erniedrigung.

c) Methylierung von Cytidin: Dimethylcytosin: 2 g Cytidin-nitrat wurden in 120 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von 32-proz. Natronlauge auf p_H 8.8 gebracht. Die Methylierung erfolgte ebenso wie beim Guanosin und Adenosin innerhalb von 2 Stdn. mit 10 ccm 32-proz. Natronlauge und 7.5 ccm Dimethylsulfat. Sodann wurde mit verd. Schwefelsäure neutralisiert und im Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit 10 ccm 25-proz. Schwefelsäure aufgenommen und 2 Stdn. im Bombenrohr auf 175–180° erhitzt. Nach Erkalten wurde mit Wasser verdünnt, von kohligen Rückständen abfiltriert und mit heißem Wasser gut ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit heiß gesättigter Barytlösung bis zur neutralen Reaktion gegen Lackmus versetzt. Der Bariumsulfatniederschlag wurde abgesaugt, mit heißem Wasser ausgewaschen, das Filtrat im Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand 3-mal mit kaltem und 2-mal mit heißem Alkohol (je 20 ccm) extrahiert. Die Auszüge wurden eingeeengt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit kalt gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Das ausgeschiedene Pikrat wurde aus Wasser umkrystallisiert. Schmp. 218°. Der Mischschmelzpunkt mit dem aus der methylierten Thymonucleinsäure erhaltenen Dimethylcytosin-pikrat ergab keine Erniedrigung.