

glas gegeben. Zu solchen Ansätzen wurde Kaliumcyanid, jeweils in 1 ccm Wasser gelöst, in absteigenden Mengen zugesetzt:

Zugabe von Kaliumcyanid in mg	0.1	0.05	0.001	0.0005
Violett-färbung nach Minuten.....	1	2	3—4	4—5.

Im letztgenannten Falle war die Lösung nach 10 Min. tief violett, die Kontroll-Lösung ohne Cyanid hatte sich nur schmutziggelb gefärbt. Es lassen sich also 0.5 γ Kaliumcyanid, das sind etwa 0.2 γ Cyan-Ionen, bequem und spezifisch nachweisen. CN^- konnte nicht ersetzt werden durch Cl^- , Br^- , J^- , OCN^- , SCN^- , S^{2-} , NO_2^- , NO_3^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ oder $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

b) Glyoxal-Nachweis: Da Glyoxal in Natriumcarbonat-Lösung ziemlich schnell zerstört wird, gibt man es zuletzt zu. 1.4 mg o-Phthalaldehyd in 1 ccm Dioxan, 3 ccm 2n Na_2CO_3 und 0.5 mg Kaliumcyanid in 1 ccm Wasser wurden gemischt. Nach Zugabe von 3 mg Glyoxal-Natriumhydrogensulfit-Verbindung (entsprechend 0.6 mg Glyoxal) trat in wenigen Sekunden Violett-färbung ein. Die Hälfte dieser Menge gab noch eine deutliche blaßviolette Färbung.

c) o-Phthalaldehyd-Nachweis: 30 mg Glyoxal-Natriumhydrogensulfit-Verbindung, 3 ccm 2n Na_2CO_3 und 5 mg Kaliumcyanid in 1 ccm Wasser wurden zusammengegeben. Noch mit 0.7 mg o-Phthalaldehyd in 1 ccm Dioxan trat nach 2 Min. eine deutliche violette Färbung auf.

60. Hellmut Bredereck*): Über methylierte Nucleoside und Purine und ihre pharmakologischen Wirkungen, I. Mitteil.: Methylierung von Nucleosiden durch Diazomethan**).

(Mitbearbeitet von Annelise Martini.)

[Aus dem Institut für Organische Chemie u. Biochemie an der Universität Jena.]

(Eingegangen am 3. März 1947.)

Bei der Methylierung von acetylierten Nucleosiden mit Diazomethan in ätherisch-methylalkoholischer Lösung werden nur die in Nachbarschaft von CO-Gruppen stehenden NH-Gruppen methyliert; gleichzeitig erfolgt die Abspaltung der Acetylgruppen. Die Isolierung des 1.3-Dimethyl-xanthosins liefert einen zusätzlichen Beweis dafür, daß als Haftstelle der Ribose am Purinring die Stellung 1 und 3 ausscheidet.

Durch fermentative Spaltung der Hefenucleinsäure, ebenso durch Spaltung mittels Pyridins sind die entsprechenden Nucleoside heute bequem zugänglich¹⁾. In Anbetracht der besonderen pharmakologischen Eigenschaften methylierter Purine haben wir jetzt die Nucleoside nach verschiedenen Verfahren methyliert. Dabei haben wir außer den methylierten Nucleosiden nach Abspaltung des Zuckerrestes einige neue methylierte Purine erhalten. Bei den Methylierungen haben sich einige Besonderheiten ergeben, die über die hier beschriebenen speziellen Methylierungen hinaus eine allgemeinere Bedeutung besitzen, worüber in späteren Arbeiten berichtet werden soll. Die pharmakologischen Untersuchungen (s. spätere Mitteil.) betreffen Diuresc- und Blutdruck-Versuche mit Purinen, Nucleosiden und Nucleotiden.

In der vorliegenden Mitteilung werden zunächst Methylierungen mit Diazomethan beschrieben.

*) Z. Zt. Heidenheim a. d. Brenz.

**) Nucleinsäuren, XXII. Mitteil.; XXI. Mitteil.: B. 75; 1086 [1942].

¹⁾ H. Bredereck, A. Martini u. F. Richter, B. 74, 694 [1941].

P. A. Levene²⁾ glaubte aus Xanthosin durch Behandeln mit Diazomethan 1.3-Dimethyl-xanthosin erhalten zu haben. Später konnte J. M. Gulland³⁾ jedoch zeigen, daß es sich dabei um ein Gemisch von methylierten Xanthinen und Methylribosid handelte.

Da sich die freien Nucleoside in den für die Diazomethan-Methylierung in Frage kommenden Lösungsmitteln nicht lösen, haben wir die im Zuckeranteil acetylierten Nucleoside verwendet. Dazu wurden Triacetyladenosin und Triacetyl-xanthosin neu hergestellt. Triacetylguanosin und Triacetyl-inosin wurden nach neuen Verfahren mit besserer Ausbeute als bisher erhalten. Über die Konstitution des Tetraacetyladenosins⁴⁾, dessen vierte Acetylgruppe an der NH_2 -Gruppe des Adenins sitzt, können auf Grund der Methylierungen mit Dimethylsulfat nähere Angaben gemacht werden, vorüber später berichtet werden soll.

Zur Methylierung wurden die Acetylverbindungen in einem Aceton-Methanol-Gemisch gelöst und mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt. Dabei nahmen wir an, daß sich zunächst die methylierten Acetylnucleoside bilden würden. Statt dessen aber erhielten wir unter gleichzeitiger Methylierung und Abspaltung der Acetylgruppen unmittelbar die methylierten Nucleoside. Aus Triacetylguanosin erhielten wir 1-Methyl-guanosin (I), das krystallin aus dem Methylierungsansatz ausfiel. Seine Hydrolyse ergab das 1-Methyl-guanin, seine Desaminierung 1-Methyl-xanthosin (II), dessen Hydrolyse wiederum 1-Methyl-xanthin lieferte. Aus der Überführung in 1-Methyl-xanthin folgt die Konstitution des 1-Methyl-guanosins. Aus Triacetyl-xanthosin gewannen wir 1.3-Dimethyl-xanthosin (III), daraus durch Hydrolyse Theophyllin. Triacetyl-inosin ergab 1-Methyl-inosin (IV), seine Hydrolyse 1-Methyl-hypoxanthin. Aus dem auf anderem Wege dargestellten N^2 -Methyl-guanosin-trimethyläther entstand 1. N^2 -Dimethyl-guanosin-trimethyläther (V), dessen Hydrolyse zum 1. N^2 -Dimethyl-guanin führte. Die Konstitution ergibt sich aus den Erfahrungen der vorher genannten Methylierungen. Das aus dem gewonnenen Dimethyl-guanin dargestellte Pikrat erwies sich als identisch mit dem eines Dimethyl-guanins, das wir früher durch Methylierung von Guanosin mit Dimethylsulfat bei pH 8.5 und anschließende Hydrolyse gewonnen hatten⁵⁾. Eine Methylierung von Adenosin gelang nicht; es wurde unverändertes Adenosin zurückgewonnen.

Aus den vorstehenden Versuchen ergibt sich, daß durch Diazomethan nur die NH -Gruppen in Nachbarschaft von CO -Gruppen methyliert werden. Bemerkenswert und für uns zunächst überraschend war die gleichzeitig mit der Methylierung stattfindende Abspaltung der Acetylgruppen am Zucker. Entacetylierungen mittels Diazomethans sind indessen schon mehrfach beobachtet

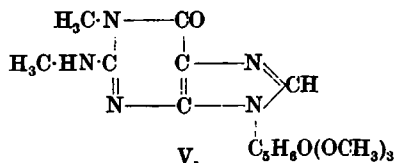
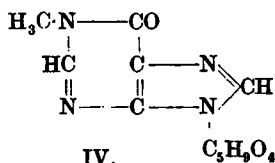
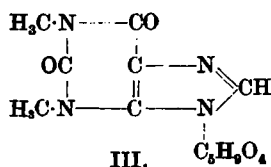
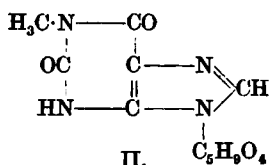
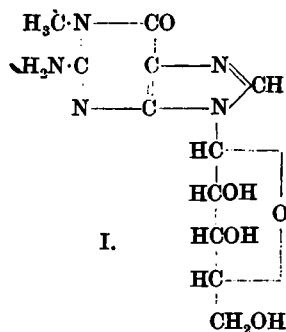
²⁾ P. A. Levene u. H. Sobotka, Journ. biol. Chem. **55**, 437 [1923]; **65**, 463 [1925].

³⁾ J. M. Gulland, E. R. Holiday u. T. F. Macrae, Journ. chem. Soc. London **1935**, 1639.

⁴⁾ P. A. Levene u. R. S. Tipson, Journ. biol. Chem. **94**, 809 [1932].

⁵⁾ H. Bredereck, G. Müller u. E. Berger, B. **73**, 1058 [1940].

worden⁶). Wir haben inzwischen diese Reaktion an zahlreichen Acetyl- und Benzoyl-Verbindungen durchgeführt und Einblick in den Reaktionsmechanismus gewonnen, worüber wir später berichten werden.



Die vorliegende Untersuchung liefert auch einen Beitrag zur Frage nach der Haftstelle des Riboserestes am Purinkern in den Purinnucleosiden. Levene²) glaubte durch die Isolierung des 1.3-Dimethyl-xanthosins als Haftstelle die Stellung 1 und 3 ausschließen zu können. Da aber bei seinen Untersuchungen nicht diese Verbindung vorlag³) (s. oben), kann erst jetzt auf Grund der Isolierung des 1-Methyl-guanosins und des 1.3-Dimethyl-xanthosins die 1- und 3-Stellung als Haftstelle des Riboserestes ausgeschlossen werden, sodaß für diesen nur noch die Stellung 7 oder 9 in Frage kommt. Durch Vergleich der Absorptionsspektren der Purinnucleoside einerseits und der 7- bzw. 9-Methyl-purine andererseits konnte von Gulland⁷) auf Grund der größeren Übereinstimmung der Spektren als Haftstelle die 9-Stellung bewiesen werden.

Beschreibung der Versuche.

Triacetylguanosen: 5 g Guanosen werden unter Feuchtigkeitsausschluß mit 50 ccm Essigsäureanhydrid und 60 ccm Pyridin auf dem Wasserbad bis zur Lösung erhitzt. Beim Erkalten scheidet sich nach Animpfen Triacetylguanosen krystallin aus; Ausb. 6.5 g. Die Substanz wird aus absol. Alkohol umkrystallisiert (5 g aus 150 ccm).

Außer den von H. Steudel⁸) beschriebenen Nadeln vom Schmp. 226°, die bevorzugt aus Chloroform krystallisieren, wurde eine zweite Krystallform, Blättchen vom Schmp. 232°, gefunden, die aus Alkohol krystallisieren. In Alkohol gehen die Nadeln langsam in Blättchen über.

$$[\alpha]_D^{20}: -0.13^\circ \times 3.95/0.022 \times 1 \times 0.8 = -28.4^\circ (\text{Alkohol});$$

$$\text{nach Steudel: } [\alpha]_D^{16}: -2.3^\circ \times 2.40094/1 \times 0.8003 \times 0.2992 = -23.06^\circ (\text{Alkohol}).$$

⁶) J. Herzig, B. 89, 268, 1157 [1906]; B. 59, 221 [1926]; E. Fischer B. 47, 2497 [1914]; 51, 320 [1918]; H. Biltz, B. 64, 1164 [1931].

⁷) Journ. chem. Soc. London 1934, 1639; 1936, 765; 1938, 692.

⁸) Ztschr. physiol. Chem. 120, 127 [1922].

Triacetyladenosin: 5 g Adenosin (wasserfrei) werden mit 50 cem Essigsäureanhydrid und 70 cem Pyridin bis zur Lösung bei Zimmertemperatur (2 Stdn.) oder im Brutschrank bei 37° (1 Stde.) aufbewahrt. Darauf wird bei 50°/2 Torr eingedampft, der verbliebene Sirup 2 mal mit Alkohol aufgenommen und jeweils wieder eingedampft. Beim Lösen in 30 cem Alkohol kristallisiert nach Animpfen das Triacetyladenosin aus; Ausb. 5.2 g. Aus absol. Alkohol Schmp. 174°.

$C_{16}H_{19}O_7N_5$ (393.2) Ber. N 17.8 $COCH_3$ 32.9 Gef. N 18.1 $COCH_3$ 32.8
 $[\alpha]_D^{20}$: $-0.56^\circ \times 3.625/0.0478 \times 1 \times 1.53 = -27.9$ (Chloroform).

Tetraacetyladenosin: Die von Levene⁴⁾ angegebene Arbeitsweise wurde wie folgt abgeändert: 5 g Adenosin (wasserfrei) werden in einem Gemisch von 65 cem Essigsäureanhydrid und 1 g wasserfreiem Natriumacetat bis zur Lösung erhitzt, sodann in 650 cem Wasser eingerührt. Nach mehrstündigem Stehenlassen wird mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformlösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand 2 mal mit absol. Alkohol aufgenommen. Nach Eindampfen wird der Sirup zunächst im Exsiccator, dann bei 56°/2 Torr getrocknet; Ausb. 5 g.

$C_{18}H_{21}O_8N_5$ (435.2) Ber. N 16.1 $COCH_3$ 39.5 Gef. N 16.2 $COCH_3$ 39.4.

Triacetylinosin: 5 g Inosin werden mit 50 cem Essigsäureanhydrid und 60 cem Pyridin unter häufigem Umschütteln bis zur Lösung bei 37° (Brutschrank) aufbewahrt, danach bei 50°/2 Torr zur Trockne verdampft. Der kristalline Rückstand wird mit absol. Alkohol aufgenommen und nach Stehenlassen im Eisschrank abgesaugt; Ausb. 0.6 g. Aus absol. Alkohol Schmp. 241° (Haiser⁵⁾: 236°).

$[\alpha]_D^{20}$: $-0.41^\circ \times 1.8/0.0131 \times 1 \times 1.53 = -36.5^\circ$ (Chloroform)
 (Levene u. Tipson¹⁰⁾: $[\alpha]_D^{20}$: -38.3°).

Triacetyl-xanthosin: 5 g Xanthosin werden mit 50 cem Essigsäureanhydrid und 70 cem Pyridin bis zur Lösung bei 37° (Brutschrank) aufbewahrt. Nach Einengen bei 50°/2 Torr wird der Rückstand mit absol. Alkohol + Chloroform aufgenommen und in Äther eingerührt. Zur Reinigung wird nochmals in der gleichen Weise umgefällt; Ausb. 6–7 g.

$C_{16}H_{19}O_9N_4$ (410.2) Ber. N 13.7 $COCH_3$ 31.5 Gef. N 13.5 $COCH_3$ 31.3.
 $[\alpha]_D^{20}$: $-0.68^\circ \times 2.68/0.0216 \times 1 \times 1.53 = -53.5^\circ$ (Chloroform).

1-Methyl-triacetylguanosin: 3 g 1-Methyl-guanosin werden mit je 30 cem Essigsäureanhydrid und Pyridin 2 Stdn. bei 37° aufbewahrt, sodann bei 50°/2 Torr eingedampft, der Sirup mit Alkohol aufgenommen und in Äther eingerührt. Zur Analyse wird nochmals in der gleichen Weise umgefällt.

$C_{17}H_{21}O_8N_5$ (423.2) Ber. $COCH_3$ 30.7 Gef. $COCH_3$ 30.6.

1-Methyl-guanosin: 2 g Triacetylguanosin werden in 60 cem Methanol und 10 cem Aceton warm gelöst und vorsichtig erkalten gelassen, so daß es nicht wieder auskristallisiert. Eine äther. Diazomethanolösung aus 10 g Nitrosomethylharnstoff wird anteilweise zugegeben. Schon nach Zugabe der Hälfte der Lösung beginnt die kristalline Abscheidung des 1-Methyl-guanosins, die durch Zugabe von 70 cem trockenem Äther vervollständigt wird. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wird abgesaugt; Ausb. 1.1 g, 1 g werden aus 30 cem Methanol, das einige Tropfen Wasser enthält, umkristallisiert; Schmp. 163°.

$C_{11}H_{15}O_5N_5$ (297.1) Ber. N 23.6 CH_3 5.1. Gef. N 23.5 CH_3 5.1.

Durch Zugabe kalt gesättigter Pikrinsäurelösung zu einer wäßr. Lösung des 1-Methyl-guanosins entsteht das Pikrat; aus Wasser Schmp. 179°.

$C_{11}H_{15}O_8N_5 \cdot C_6H_5O_7N_3$ (526.2) Ber. N 21.3. Gef. N 21.3.

Hydrolyse: Erhitzt man 1-Methyl-guanosin mit 4-proz. Salzsäure 2 Stdn. auf 85°, so fällt beim Neutralisieren mit Bariumcarbonat 1-Methyl-guanin aus. Es wird durch

⁵⁾ F. Haiser u. F. Wenzel, Monatsh. Chem., 29, 157 [1908].

¹⁰⁾ Journ. biol. Chem. 111, 313 [1936].

Lösen in Salzsäure und Neutralisieren mit Natronlauge umkrystallisiert. Feine Nadelchen.

$C_6H_7ON_5$ (165.1) Ber. N 42.4 Gef. N 41.5.

Bringt man 1-Methyl-guanin mit wenig Salzsäure gerade in Lösung und gibt Pikrinsäurelösung hinzu, so erhält man 1-Methyl-guanin-pikrat. Aus Wasser Schmp. 267°.

$C_6H_7ON_5 \cdot C_6H_3O_7N_3$ (394.1) Ber. N 28.4 Gef. N 28.4.

1-Methyl-xanthosin: 3 g 1-Methyl-guanosin werden in 150 ccm Wasser auf 70° erwärmt, mit 6.3 g Bariumnitrit versetzt, auf 25° abgekühlt und 4.5 ccm Eiseessig zugegeben. Die Lösung wird 3 Tage lose verschlossen im Dunkeln aufbewahrt, sodann alle Barium-Ionen mit verd. Schwefelsäure entfernt, so daß die Lösung Ba^{++} - und SO_4^{--} -frei ist, und zum dünnen Sirup eingeengt. Dieser wird 2mal mit absol. Alkohol aufgenommen und schließlich in Äther eingerührt. Das abgeschiedene klebrige Produkt wird nochmals in Methanol gelöst und in Äther eingerührt. Der flockige Niederschlag wird abgesaugt; Ausb. 1.5 g.

$C_{11}H_{14}O_6N_4$ (298.1) Ber. N 18.7 CH_3 5.0. Gef. N 17.5 CH_3 4.9.

Hydrolyse: Nach Hydrolyse mit 20-proz. Salzsäure und Einengen der Lösung fällt 1-Methyl-xanthin aus.

$C_9H_6O_2N_4$ (166.1) Ber. N 33.8 CH_3 9.0 Gef. N 34.2 CH_3 8.5.

1.3-Dimethyl-xanthosin: 2 g Triacetyl-xanthosin werden in 10 ccm Aceton und 60 ccm Methanol gelöst und mit einer äther. Diazomethanolösung aus 10 g Nitrosomethylharnstoff methyliert. Sobald das Diazomethan verbraucht ist, wird zur Trockne verdampft, der Rückstand 2 mal mit Methanol aufgenommen, von einer u. U. auftretenden Trübung abfiltriert und in Äther eingerührt. Der Niederschlag wird nochmals mit Diazomethan aus 5 g Nitrosomethylharnstoff methyliert; Ausb. 1 g.

$C_{12}H_{16}O_6N_4$ (312.1) Ber. N 17.9 CH_3 9.6. Gef. N 17.0 CH_3 9.1.

Hydrolyse¹¹⁾: 0.7 g 1.3-Dimethyl-xanthosin werden mit 50 ccm 20-proz. Salzsäure gekocht, bis kein Furfurol mehr abdestilliert (etwa 2½ Stdn.). Dann wird mit Tierkohle erwärmt, filtriert und zur Trockne eingeengt. Die zurückgebliebenen Krystalle, auf Ton abgepreßt und aus Wasser umkrystallisiert, zeigen keine Schmelzpunktserniedrigung mit Theophyllin; Schmp. 264°.

1-Methyl-inosin: 3 g Triacetyl-inosin werden in 15 ccm Aceton und 90 ccm Methanol gelöst und mit einer äther. Diazomethanolösung aus 15 g Nitrosomethylharnstoff methyliert. Die Lösung wird zur Trockne eingeengt, 2 mal mit Methanol aufgenommen und durch Einrühren in Äther gefällt. Zur Analyse wird nochmals aus Methanol + Äther umgefällt; Ausb. 1.6 g.

$C_{11}H_{14}O_5N_4$ (282.1) Ber. N 19.8 CH_3 5.3 Gef. N 18.9 CH_3 5.6.

Hydrolyse: 1 g 1-Methyl-inosin werden in 50 ccm 3-proz. Schwefelsäure 1 Stde. gekocht, die Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd entfernt, mit Tierkohle aufgehellt und eingeengt. Beim weiteren Einengen im Exsiccator krystallisiert 1-Methyl-hypoxanthin aus. Aus Wasser Nadeln vom Schmp. 305—307°.

$C_6H_6ON_4$ (150.1) Ber. N 37.3 Gef. N 36.7.

1.N²-Dimethyl-guanosin-trimethyläther: N²-Methyl-guanosin-trimethyläther, erhalten aus 6 g Triacetyl-guanosin durch Methylierung mit Dimethylsulfat (siehe spätere Mitteil.) werden in 10 ccm Aceton und 60 ccm Methanol gelöst und mit einer äther. Diazomethanolösung aus 10 g Nitrosomethylharnstoff methyliert. Nach Einengen wird noch 2 mal mit absol. Alkohol aufgenommen und der nach dem Abdampfen des Alkohols erhaltene Sirup getrocknet.

2 g des erhaltenen 1.N²-Dimethyl-guanosin-trimethyläthers werden in 20 ccm 95-proz. Methanol gelöst und 1½ Stde. Chlorwasserstoff eingeleitet. Nach Einengen auf das halbe Volumen und Stehenlassen über Nacht im Eisschrank krystallisiert 1.N²-Dimethyl-guanin-hydrochlorid aus. Ausb. 0.8 g; Schmp. 275°. Der Misch-Schmelzpunkt mit dem früher von uns⁵⁾ hergestellten Dimethylguanin-hydrochlorid zeigte keine Erniedrigung. Ebenso erwies sich das daraus hergestellte Pikrat als identisch mit dem früher⁵⁾ erhaltenen Dimethylguanin-pikrat.

¹¹⁾ J. M. Gulland, Journ. chem. Soc. London 1934, 1643.