

Hydrochlorid: a) Eindampfen einer Lösung der Verbindung VII in überschüss. 0.1*n*HCl auf dem Wasserbad, Trocknen im Vak.-Exsiccator über Kaliumhydroxyd und darauf bei 100° über Diphosphorpentoxyd ergab ein Salz, das in Wasser, Methanol und Äthanol leicht löslich ist; das Salz ist etwas hygroskopisch.

$C_5H_{12}N_6 \cdot HCl$ (189.7) Ber. N 21.24 Gef. N 20.77

b) 0.2 g der Verbindung VII wurden in 10 cm Benzol gelöst und trockener Chlorwasserstoff eingeleitet. Das Hydrochlorid fiel als voluminöser Niederschlag aus. Nach dem Trocknen i. Vak. wurde ein sehr hygroskopisches Hydrochlorid erhalten; Schmp. 195° (Zers.).

$C_5H_{12}N_6 \cdot 2HCl$ (226.2) Ber. Cl 31.14 Gef. Cl 30.86, 31.08

128. Friedrich Weygand und Otto Alfred Großkinsky: Zur Synthese von Guanin-[8-¹⁴C]

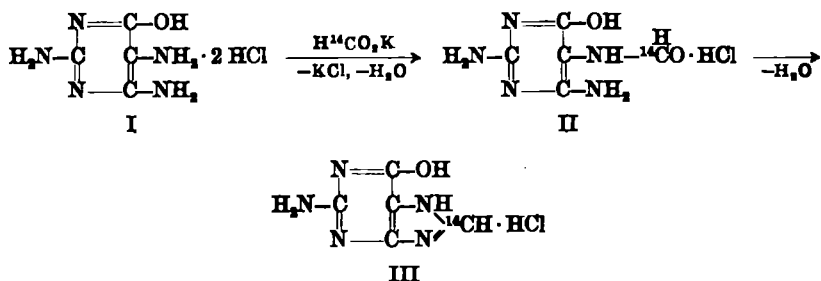
[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 27. Juni 1951)

Ausgehend von $Ba^{14}CO_3$ wurde Guanin-[8-¹⁴C] in 70–75-proz. Ausbeute, bezogen auf $Ba^{14}CO_3$, dargestellt. Die Ausbeute an Aktivität ist nur unwesentlich geringer.

Der Ringschluß von 4.6-Diamino-5-formamido-[¹³C]-pyrimidin-sulfat in Formamid als Lösungsmittel zu Adenin-[8-¹³C] erfolgt mit etwa 75-proz. Austausch von ¹³C gegen ¹²C¹⁾. Bei Verwendung von Formyl-morpholin als Lösungsmittel wird bei der gleichen Synthese nur etwa ein 20-proz. Austausch beobachtet²⁾. Wird aber Formyl-morpholin als Lösungsmittel beim Ringschluß von 6-Oxy-2.4-diamino-5-formamido-[¹⁴C]-pyrimidin zu Guanin-[8-¹⁴C] verwendet, so beträgt der Austausch von ¹⁴C gegen ¹²C etwa 50%³⁾.

Wir haben versucht, bei der nach folgendem Reaktionsschema verlaufenden Guaninsynthese:



die Austauschmöglichkeit zwischen ¹⁴C und ¹²C auszuschalten und damit die Ausbeute an Aktivität zu verbessern. Zu diesem Zweck vermieden wir die Verwendung einer Formylverbindung als Lösungsmittel beim Imidazol-

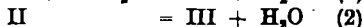
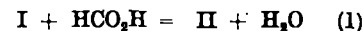
¹⁾ L. F. Cavalieri u. J. B. Brown, Journ. Amer. chem. Soc. 71, 2246 [1949].

²⁾ V. M. Clark u. H. M. Kalekar, Journ. chem. Soc. London 1950, 1029.

³⁾ M. E. Balis, G. B. Brown, G. B. Elion, G. H. Hitchings u. H. Vanderwerff, Journ. biol. Chem. 188, 217 [1951].

ringschluß, wodurch die zum Austausch führende Umacylierung von II vor dem Ringschluß wegfiel.

Auch unter dem Gesichtspunkt, daß das Formamid-Derivat als Lösungsmittel die Gleichgewichte



durch H₂O-Verbrauch zur eigenen Hydrolyse bzw. durch Erhöhung der Ameisensäurekonzentration in die gewünschte Richtung verschieben würde, ist seine Verwendung nicht berechtigt. Greift nämlich das Lösungsmittel überhaupt in das Gleichgewicht ein, so wird zwar die Ausbeute an Reaktionsprodukt größer, aber die Ausbeute an Aktivität, auf die es hier ankommt, wird kleiner. Dies sei am folgenden schematischen Beispiel gezeigt:

Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion

$$\text{W} + {}^{14}\text{X} = {}^{14}\text{Y} + \text{Z} \text{ sei } 1, \text{ also: } \frac{[\text{W}] \cdot [{}^{14}\text{X}]}{[{}^{14}\text{Y}] \cdot [\text{Z}]} = 1.$$

Geht man von $[\text{W}] = 1$ und $[{}^{14}\text{X}] = 1$ aus, so erhält man nach Einstellung des Gleichgewichts: $[{}^{14}\text{Y}] = 0.5$.

Die Ausbeute an dem gewünschten Produkt Y beträgt 50%, die Ausbeute an Aktivität ebenfalls.

Geht man aber von $[\text{W}] = 1$ aus und erhöht $[\text{X}]$ durch Zugabe von inaktivem Material auf $[{}^{12,14}\text{X}] = 2$, so gilt jetzt:

$$\frac{[\text{W}] \cdot [{}^{12,14}\text{X}]}{[{}^{12,14}\text{Y}] \cdot [\text{Z}]} = \frac{[{}^1/3] \cdot [{}^4/3]}{[{}^2/3] \cdot [{}^2/3]} = 1.$$

Die Ausbeute an Y beträgt 66.7%, aber die Ausbeute an Aktivität ist auf 33.3% gefallen, denn Y enthält ja zur Hälfte ¹²Y und ¹⁴Y (unter der vereinfachenden, praktisch zutreffenden Annahme, daß ¹²X und ¹⁴X bzw. ¹²Y und ¹⁴Y gleiches chemisches Potential besitzen).

Da bei der Ringschlußtemperatur (165–170°) das nach (2) entstehende Wasser beim Arbeiten im offenen Gefäß sofort aus der Reaktionsmischung abdestilliert, wird allein dadurch das Gleichgewicht (2) völlig auf die Seite der Guanin-Bildung verlagert. Die H₂O-Konzentration ist bei der Ringschlußtemperatur so gering, daß eine Hydrolyse von II nach (1) praktisch keine Rolle spielt. Aus diesen Überlegungen heraus und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß in dem Gleichgewicht



die Säureamid-Bildung im allgemeinen stark bevorzugt ist, haben wir als Lösungsmittel Glykol benutzt. Dadurch konnte bei der Schließung des Imidazolrings kein Austausch von ¹⁴C gegen ¹²C stattfinden.

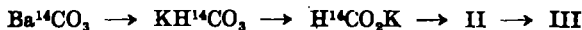
Die Ausbeute an Guanin-[8-¹⁴C] betrug 70–75%, bezogen auf das Ausgangsmaterial Ba¹⁴CO₃. Der nicht in Guanin umgesetzte ¹⁴C wurde z. Tl. als Ba¹⁴CO₃ und im abdestillierten Glykol zurückerhalten.

Bei der Synthese wurde Wert darauf gelegt, die stets mit Verlusten verknüpfte Isolierung von Zwischenstufen zu vermeiden und mit möglichst einfachen apparativen Hilfsmitteln auszukommen. Auf Steigerung der Ausbeute

an Aktivität durch Zusatz von inaktivem Material zu Mutterlaugen, die noch aktives Material enthielten, wurde verzichtet.

Es darf angenommen werden, daß der eingeschlagene Weg ebenso vorteilhaft zur Gewinnung von Adenin-[8-¹⁴C] dienen kann.

Die Synthese verlief über die folgenden Stufen:



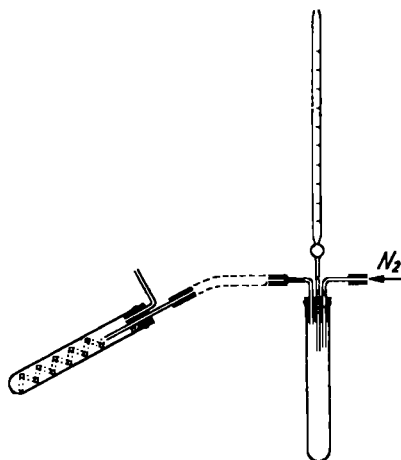
Beschreibung der Versuche

1.) $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$: 197.4 mg $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (1 mMol), enthaltend 1 Millicurie, wurden nach Melville⁴⁾ in $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ überführt, allerdings unter Verwendung von 85-proz. Orthophosphorsäure zum Freimachen des $^{14}\text{CO}_2$ ⁵⁾. Außerdem wurde abweichend von Melville $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$, anstatt $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ hergestellt, da das erstgenannte nach unseren Erfahrungen bei der Hydrierung eine etwas bessere Formiat- Ausbeute liefert. Für die Absorption des $^{14}\text{CO}_2$ in der Kaliumhydroxyd-Lösung wurden 3 Tage benötigt, am letzten Tage wurde die das Absorptionsgefäß enthaltende Falle mit Eis gekühlt. In Übereinstimmung mit vorhandenen Gleichgewichtsmessungen⁶⁾ für die Reaktionspartner CO_2 , $\text{KHCO}_3 \cdot \text{aq.}$, $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot \text{aq.}$ und $\text{KOH} \cdot \text{aq.}$ wurden bei 1.12 mMol KOH (1.31 ccm 0.853*n* KOH) im Absorptionsgefäß 97–98% des $^{14}\text{CO}_2$ absorbiert. Das überschüss. Kaliumhydroxyd wurde unter den bei Melville geschilderten Vorsichtsmaßnahmen im Absorptionsgefäß mit 0.2*n* H_2SO_4 gegen Phenolphthalein (schwach rosa) zurücktitriert. Das nicht absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ wurde in $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ übergeführt.

2.) $\text{H}^{14}\text{CO}_2\text{K}$: Die Hydrierung des $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ mit Pd-Schwarz⁷⁾ bei 120 at und 70° erfolgte nach den Angaben von Melville für die Hydrierung von NaHCO_3 in einem 50 ccm-Nickelaufkochen, dem das erwähnte Absorptionsgefäß als Glaseinsatz diente. Die Ausbeute an Formiat wurde mit einem zu diesem Zweck entwickelten Gerät gasvolumetrisch bestimmt (s. Anhang). Dazu waren nur etwa 0.1 mg Ameisensäure nötig. Ausb. an $\text{H}^{14}\text{CO}_2\text{K}$ 90–95%.

Die vom Pd-Schwarz abfiltrierte Lösung wurde zur Bestimmung des nicht in Reaktion getretenen $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ in einer geschlossenen Apparatur (Abbild. 1) mit $n/_{10}$ HCl unter Erwärmen auf 50–60° auf pH 5 titriert.

Spuren von freiwerdendem $^{14}\text{CO}_2$ wurden dabei mit N_2 in eine mit Natronlauge beschickte Waschflasche hoher Wirksamkeit übergetrieben, in die auch schon das bei der Darstellung von $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ nicht absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ eingeleitet worden war. Dabei ergab sich die Formiat-Ausbeute, wenn auch ungenauer als nach der gasvolumetrischen Bestimmung. Die Waschflasche bestand aus einem schräggestellten Reagensglas, in das ein spiralig gebogenes Einleitungsrohr, dessen Spiralen an der Wand anlagen, bis zum Boden eingeführt war. Durch diese Anordnung wurde bei sehr kleinem Überdruck, was für den Schritt 1 vorteilhaft war, durch die lange Verweilzeit der Gasblasen in der Absorptionslösung sehr



Abbild. 1. Apparatur z. Bestimmung des nicht in Reakt. getretenen $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ nach d. Hydrierung mit Pd

⁴⁾ D. B. Melville, J. R. Rachele u. E. B. Keller, Journ. biol. Chem. **169**, 419 [1947].

⁵⁾ F. Kögl, J. Halberstadt u. T. J. Barendregt, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **68**, 387 [1949]. ⁶⁾ A. Sieverts u. A. Fritzsche, Ztschr. anorgan. Chem. **138**, 11 [1924].

⁷⁾ J. Tausz u. N. v. Putnok, B. **52**, 1573 [1919].

gute Absorption erzielt. Die Formiat-Lösung wurde gerade alkalisch gemacht und die in ihr von Operation 1 vorhandenen SO_4^{2-} -Ionen, die bei der späteren Guanin-Bildung stören würden, durch Zufügung der ber. Menge Bariumchlorid-Lösung beseitigt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Bariumsulfats wurde die Lösung (etwa 10 ccm) in einem Reagensglas mit verstärktem Boden im siedenden Wasserbad mit Heißluft auf etwa 0.4 ccm eingengt.

3.) Guanin-[8-¹⁴C]: Zu der so erhaltenen Formiat-Lösung wurden 232 mg (1 mM) 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin-2HCl·H₂O feingepulvert und 2 ccm Glykol zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht kräftig bei Zimmertemperatur geführt, dann im Abzug unter Fortsetzung des Rührens $\frac{3}{4}$ Stde. auf 70° gehalten und anschließend im Laufe von $\frac{1}{2}$ Stde. die Badtemperatur auf 200° gesteigert. Dabei destillierte aus dem Reagensglas Wasser zusammen mit etwas Ameisensäure ab, und es entstand vorübergehend eine nahezu klare orangefarbene Lösung. Die Badtemperatur wurde 2 Stdn. auf 200° gehalten, wobei nach und nach unter Abdestillieren von weiterem Wasser ein gelbbraunes Reaktionsprodukt ausfiel.

Die Reaktionsmischung wurde mit Glykol aus dem Reagensglas in einen Claisenkolben gespült und das Glykol i. Vak. abdestilliert, bis der hellbraune Rückstand im Kolben trocken war. Dieser Rückstand wurde mit 20–30 ccm heißem Wasser in ein Becherglas gespült, aufgeköcht, mit einigen Tropfen konz. Ammoniak-Lösung ammoniakalisch gemacht und eingekocht, bis die Lösung neutral reagierte. Nach eintägig. Stehenlassen im Eisschrank wurde die rohe Guaninbase abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Aus dem Filtrat wurden nach Einengen noch einige mg Guanin gewonnen. Das so erhaltene rohe Guanin war nach dem Trocknen im Exsiccator hellbraun und wog 120–130 mg. Es hatte einen durch quantitative Chromatographie ermittelten Reinheitsgrad von 90–95%; es wurden also 75–80% Guanin-[8-¹⁴C] gebildet.

Zur Reinigung wurde das rohe Guanin in 50 ccm 2*N*-HCl heiß gelöst, wobei rotbraune Flocken ungelöst blieben. Nach ein- bis zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur hatte sich die rotbraune Verunreinigung abgesetzt und die Lösung war schwach gelblich. Es wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. auf das halbe Volumen eingengt. Nach Stehenlassen wurde eine weitere kleine Menge brauner Verunreinigung abfiltriert. Dann wurde die Lösung über Schwefelsäure und Kaliumhydroxyd i. Vak. zur Trockne eingedunstet. Das Guanin-hydrochlorid kristallisierte dabei in weißen, teilweise verzweigten Nadeln aus, denen aber noch etwas gelbbraune Verunreinigung anhaftete. Nach Entfernung aller überschüss. Salzsäure i. Hochvak. wurden in einem charakteristischen Versuch mit ¹⁴C 166 mg Guanin-[8-¹⁴C]·HCl·1 $\frac{1}{2}$ H₂O erhalten. Dieses Produkt zeigte im Beckman-Spektrophotometer das reine Guaninspektrum, jedoch bewies die quantitative Auswertung der Messung eine geringfügige Verunreinigung durch nicht purinartige Substanzen. Das Produkt konnte jedoch ohne weitere Reinigung für mikrobiologische Untersuchungen verwendet werden.

Wird größere Reinheit gefordert, so ist das auf dem geschilderten Weg erhaltene Guanin-hydrochlorid in halbkonz. Ammoniak-Lösung heiß zu lösen. Nach Verköchen des Ammoniaks fällt das Guanin als freie Base aus. Nach eintägigem Stehenlassen im Eisschrank wird das schwach gelbliche Produkt abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen. Man erhält so 106–114 mg (70–75%) spektralreines Guanin-[8-¹⁴C]. Da sich bei den Schritten 1 und 2 ein geringer Austausch mit dem CO₂ der Luft nicht vermeiden läßt, dürfte die Ausbeute an ¹⁴C 1–2% niedriger liegen.

Anhang: Die Mikrobestimmung von Ameisensäure

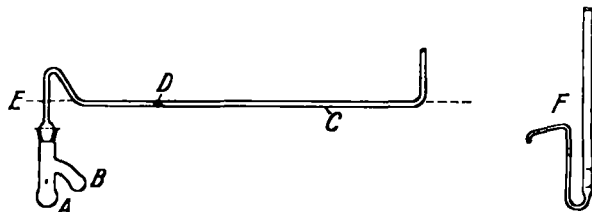
Ameisensäure wird durch Essigsäureanhydrid und katalytische Mengen Schwefelsäure rasch unter Kohlenoxyd-Entwicklung zerlegt⁵⁾.

Zur Bestimmung der Ameisensäure wurde das in Abbild. 2 abgebildete Gerät und ein Wasserbadthermostat verwendet.

Das Volumen der zu bestimmenden (im vorliegenden Fall der bei der Hydrierung ausgefallenen) Formiat-Lösung wurde gemessen, dann mit einer Blutzuckerpipette 0.02 ccm

⁵⁾ V. Hottenroth, Chem.-Ztg. 38, 598 [1914].

(etwa 0.003 mMol Ameisensäure) in A hineinpipettiert und 0.5 ccm Essigsäureanhydrid zugesetzt. Nach 1 stdg. Stehenlassen und kurzem Erwärmen auf 50–60° zur Anstreibung letzter Kohlendioxyd-Reste kamen in das Nebengefäß B 0.3 ccm einer Mischung von 2 ccm Essigsäure + 5 ccm Essigsäureanhydrid + 1 ccm konz. Schwefelsäure. Das Gerät wurde jetzt bis zur Linie E in einen Wasserbadthermostat gehängt und der Abstand des



Abbild. 2. Apparatur zur Bestimmung von Ameisensäure

Quecksilber-Fadens D in der Capillare C von einer Nullmarke gemessen. Dann wurde das Gerät aus dem Thermostat genommen, die Flüssigkeiten in A und B wurden in A vereinigt und A über einer Mikroflamme auf 50–60° erhitzt. Die Kohlenoxyd-Entwicklung in A wurde durch Klopfen gegen A gefördert. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis der Quecksilber-Faden beim Einbringen des Gerätes in das Temperaturbad seine Stellung nicht mehr veränderte. Aus der Verschiebung des Quecksilber-Fadens ergab sich nach Abzug eines bei der Mischung der Komponenten entstandenen Volumeneffektes das Volumen des freigewordenen Kohlenoxyds und damit die vorgelegte Menge Ameisensäure. Der Volumeneffekt war vorher in einem Blindversuch mit 0.02 ccm reinem Wasser anstatt der Formiat-Lösung und außerdem mit einer Formiat-Lösung bekannten Gehaltes ermittelt worden.

Die verwendete Capillare hatte den Radius 0.513 mm. Bei der Badtemperatur von 24.5° und 760 Torr ergab sich eine Verschiebung l des Quecksilber-Fadens pro 10⁻³ mMol Ameisensäure:

$$l = \frac{22.4 \cdot \frac{297.6}{273.1}}{0.263 \cdot 3.14} = 29.5 \text{ mm}^3$$

Es seien die Ergebnisse von 2 Versuchen mit Lösungen wiedergegeben, die neben Formiat eine geringe Menge Hydrogencarbonat enthielten:

Vorgelegtes HCO ₂ Na		Gef.	
mg	mMol	mMol	%
0.2000	0.00294	0.00290	98.3
0.1504	0.002213	0.00219	98.7

^{*)} Der Zähler dieser Gleichung gibt das aus 1.10⁻³ Millimol HCO₂H erhaltene Vol. 22.4 cmm CO bei 273.1° K u. 760 Torr, umger. auf die Versuchstemp. von 24.5° (273.1 + 24.5 = 297.6° K) an, der Nenner den Querschnitt der Capillare (r² · π), woraus sich die Länge ergibt, um die der Hg-Faden verschoben wird.