

Dann würden die in Kap. 5 beschriebenen Versuche zu ganz anderen Erfolgen führen. Auf derart günstige Fälle wird man aber nur stoßen, wenn der experimentierende Chemiker sich bei Trenn- und Analysenproblemen gelegentlich daran erinnert, daß die Thermodiffusion ein wirksames Hilfsmittel für ihn sein kann.

Wir möchten die Arbeit nicht schließen, ohne Hrn. Prof. Butenandt (Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie) für zahlreiche Ratschläge und sein Interesse an unseren Versuchen herzlich zu danken. Die Versuche des Kap. 5 wurden auf seinen Vorschlag und in Zusammenarbeit mit seinem Institut ausgeführt. Auch die instruktiven Trennungen von Benzol-Thiophen und Alkohol-Wasser wurden von ihm angeregt. Mit ganz besonderem Dank möchten wir auch hier noch einmal die unermüdete Mitarbeit von Hrn. Dr. L. W. Masch (Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie) an den langwierigen Untersuchungen des Kap. 5 hervorheben. Auch die Verdienste von Hrn. Mechaniker W. Borchardt bei der Konstruktion der Apparate seien dankbar genannt.

44. Hellmut Bredereck, Eva Berger und Johanna Ehrenberg: Zur Synthese von Nucleotiden (Muskeladenylsäure, Cytidylsäure) (Nucleinsäuren, XV. Mitteil.*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 20. Februar 1940.)

Nachdem die Nucleotide in ihrer Konstitution aufgeklärt waren, haben wir Versuche zu ihrer synthetischen Darstellung unternommen. Dabei kamen zunächst nur Partialsynthesen, ausgehend von den Nucleosiden, in Frage.

Wir haben bereits vor einigen Jahren¹⁾ versucht, durch direkte Phosphorylierung von Adenosin in Pyridin mit Phosphoroxchlorid zur Muskeladenylsäure (= Adenosin-5-phosphorsäure) (IV) zu kommen. Maßgebend für den damaligen Versuch war, daß man vom 5-Hydroxyl des Adenosins gegenüber den anderen OH-Gruppen eine erhöhte Reaktionsfähigkeit erwarten durfte. Es wurde auch in sehr guter Ausbeute ein Phosphorylierungsprodukt erhalten, das jedoch ein Gemisch verschiedener Phosphorsäureester darstellte, wobei wir in einem Versuch auch Muskeladenylsäure als Acridinsalz nachweisen konnten. Nach der gleichen Methode hat später Jachimowicz²⁾ die Synthese der Muskeladenylsäure versucht. Dabei gelang es ihm, in kleinster Menge Adenylsäure zu isolieren.

Wir haben früher erstmals die Darstellung des Trityladenosins beschrieben³⁾. Nachdem die einwandfreie Synthese der Muskeladenylsäure durch direkte Phosphorylierung von Adenosin fehlgeschlagen war, haben wir auf dem Wege Trityladenosin (I) → Diacetyl-trityl-adenosin⁴⁾ (II) → Di-

*) XIV. Mitteil.: B. **72**, 1429 [1939].

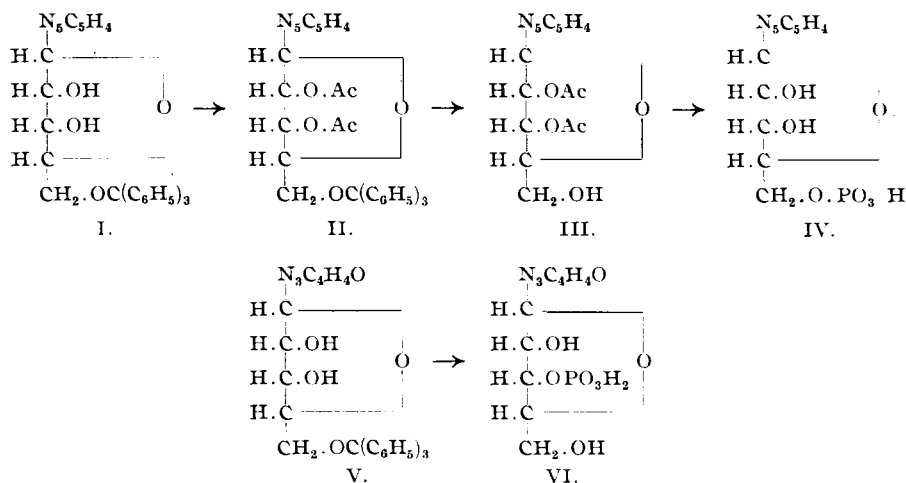
¹⁾ H. Bredereck u. G. Caro, Dtsch. Reichs-Pat. 653258 (4. 12. 1936).

²⁾ Biochem. Ztschr. **292**, 356 [1937].

³⁾ H. Bredereck, Ztschr. physiol. Chem. **223**, 61 [1934].

⁴⁾ Die nur amorph erhaltene Verbindung enthält gleichzeitig noch Triacetyl-trityl-adenosin, wobei die dritte Acetylgruppe an der NH₂-Gruppe sitzt. Dafür spricht die Acetylbestimmung: Ber. 14.5 % für die Diacetylverb. 20.3 % für die Triacetylverb. Gef. 16.2 %.

acetyl-adenosin (III) eine Substanz erhalten, die nur das 5-Hydroxyl, daneben aber auch noch die NH_2 -Gruppe unbesetzt enthält. Mehrfache Phosphorylierungsversuche in Pyridin mit Phosphoroxchlorid und anschließende Abspaltung der Acetylgruppen haben nur in einem einzigen Fall zur Isolierung einer sehr kleinen Menge Adenylsäure (IV) geführt.



Mit Rücksicht auf diesen unbefriedigenden Verlauf haben wir von einer Veröffentlichung abgesehen. Levene und Tipson⁵⁾ haben dann im Zusammenhang mit anderen Versuchen die vorstehend beschriebene Synthese veröffentlicht. Aus ihren Versuchen geht hervor, daß das Ergebnis ebenfalls sehr unbefriedigend war. Sie erhielten in unreinem Zustand ein Bariumsalz. Im Anschluß an eine Arbeit von Zeile⁶⁾, der bei Versuchen zur Synthese der Kreatinphosphorsäure Diphenyl-phosphorsäurechlorid verwendet hat, haben wir Diacetyladenosin in Pyridin mit dieser Verbindung umgesetzt. Nach alkalischer Abspaltung von Acetyl- und Phenolresten — Muskeladenylsäure ist gegen Alkali verhältnismäßig beständig — sowie saurer Hydrolyse zur Abspaltung von an der NH_2 -Gruppe eingetretener Phosphorsäure gelang es uns in allen Versuchen, allerdings auch nur in sehr kleiner Menge, kryst. Adenylsäure zu erhalten. Somit bietet kein synthetisches Verfahren eine praktische Darstellungsmethode für Muskeladenylsäure. Man wird daher auf die fermentative Phosphorylierungsmethode von Ostern⁷⁾ zurückgreifen müssen.

Die Synthese von natürlichen Nucleotiden mit der Phosphorsäure am C-Atom 3 schien anfangs sehr große Schwierigkeiten zu bieten. Wir haben vom Guanosin eine Reihe von Derivaten hergestellt, mit dem Ziel, ein Derivat mit freiem Hydroxyl am C-Atom 3 zu erhalten. Dieses Ziel ist bisher noch nicht erreicht worden. Hingegen ist uns auf sehr einfache Weise die Synthese der natürlich als Bestandteil der Hefe- und Pankreasnucleinsäure vor-

⁵⁾ Journ. biol. Chem. **121**, 131 [1937].

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **256**, 131 [1938].

⁷⁾ Ostern, Baranowski u. Terszakowě, Ztschr. physiol. Chem. **251**, 258 [1938].

kommenden Cytidylsäure gelungen. Wir setzten das früher von uns bereits dargestellte Tritylcytidin³⁾ (V) — zu seiner Darstellung gingen wir jetzt vom Cytidinnitrat, das bei der Darstellung der Nucleoside leicht zu gewinnen ist, aus — in Pyridin mit Diphenylphosphorsäurechlorid um. Ohne Isolierung von Zwischenprodukten wurden die Phenolreste mit Alkali abgespalten, während der Tritylrest nach der Reinigung über das Bleisalz schon durch das saure Milieu der synthetischen Säure abgespalten wurde. Die Cytidylsäure (VI) wurde als Brucinsalz isoliert und durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Drehung und Löslichkeit (unlöslich in Pyridin!) identifiziert. Berücksichtigt man, daß man auch hier eine gleichzeitige Phosphorylierung an der NH₂-Gruppe erwarten darf, vielleicht auch am Hydroxyl des C-Atoms 2, daß weiter durch die Reinigung über das Bleisalz Substanz verloren geht, so ist die Ausbeute nicht unbefriedigend. Die Synthese weiterer Nucleotide auf dem vorgenannten Weg ist in Angriff genommen.

Über die Phosphorylierung von Nucleosiden mit Diphenylphosphorsäurechlorid haben wir erstmals auf der Tagung der Nordwestdeutschen Chemiedozenten am 4. August 1939 in Rostock berichtet⁸⁾. Im Dezemberheft der „Berichte“ haben Brigl und Müller⁹⁾ ohne Kenntnis unserer Versuche gleichfalls die Verwendung von Diphenylphosphorsäurechlorid zur Synthese von Kohlenhydrat-phosphorsäuren beschrieben, wobei sie die Phenolreste katalytisch abspalten. Ob wir unter diesen Umständen die von uns gleichfalls begonnenen Phosphorylierungen an reinen Kohlenhydraten — es handelt sich um andere Verbindungen als die von Brigl und Müller beschriebenen — fortsetzen werden, mag vorläufig dahingestellt bleiben.

Für die Unterstützung unserer Untersuchungen danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Beschreibung der Versuche.

Trityladenosin.

Die von uns erstmals beschriebene Darstellung des Trityladenosins³⁾ wurde durch Erwärmen von Adenosin und Tritylchlorid in Pyridin durchgeführt. Levene und Tipson⁵⁾ konnten später durch 7-täg. Stehenlassen der Lösung bei Raumtemperatur eine etwas höhere Ausbeute erzielen. Wir beschreiben jetzt eine Methode, die es durch Änderung der Konzentrationen erlaubt, in kurzer Zeit bei guter Ausbeute zum Ziel zu kommen:

25 g bei 136° und 2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknetes reines Adenosin werden zusammen mit 27 g reinem Tritylchlorid in 300 ccm trockenem Pyridin 3 Stdn. unter Feuchtigkeitsausschluß auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlen und Animpfen scheidet sich beim Stehenlassen über Nacht bei 0° ein dicker Krystallbrei ab. Er wird abgesaugt bzw. abzentrifugiert und aus absol. Alkohol (u. U. auch Pyridin/Alkohol) umkrystallisiert. Durch nochmaliges Umkrystallisieren aus Pyridin/Alkohol wird die Substanz vollkommen rein erhalten. Durch Einrühren des Filtrates nach Absaugen des oben genannten Krystallbreis in Wasser und Aufarbeiten, wie früher beschrieben, gelingt es, nochmals eine kleine Menge Trityladenosin zu erhalten. Die Ausbeuten schwanken zwischen 15—26.2 g. $[\alpha]_D^{20}$: —17.6° (Pyridin)¹⁰⁾ (nach Umkrystallisieren).

⁸⁾ Referat: *Angew. Chem.* **52**, 576 [1939].

⁹⁾ *B.* **72**, 2121 [1939].

¹⁰⁾ Die früher von uns angegebene Drehung war mit der einer anderen Substanz verwechselt worden.

Acetylierung des Trityl-adenosins.

Die Darstellung entspricht im wesentlichen der von Levene und Tipson⁵⁾ beschriebenen und sei daher nur kurz angegeben:

26 g Trityl-adenosin (getrocknet), gelöst in 200 ccm Pyridin und 100 ccm Essigsäureanhydrid, werden 16 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, sodann in 3 l Eiswasser eingerührt. Der flockige Niederschlag wird abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen, und 2-mal gereinigt durch Lösen in Alkohol, Entfärben mit Tierkohle und Einrühren der Lösung in Wasser. Getrocknet im Exsiccator über Phosphorpentoxyd beträgt die Ausbeute 25 g.

4.635 mg Sbst.: 11.210 mg CO₂, 2.170 mg H₂O. — 3.818 mg Sbst.: 0.369 ccm N₂ (27°, 751 mm). — 4.710 mg Sbst.: 1.773 ccm 0.01-*n* NaOH.

Ber. C 66.22, H 5.04, N 11.04, COCH₃ 20.3 (Triacetyl-Verbindung).

„ 65.78, „ 5.06, „ 11.80, „ 14.5 (Diacetyl-Verbindung).

Gef. „ 65.95, „ 5.24, „ 10.86, „ 16.2.

Diacetyl-adenosin⁵⁾.

25 g Acetyl-trityl-adenosin werden in 125 ccm 80-proz. Essigsäure 8 Min. am Rückflußkühler gekocht. Das beim Erkalten ausgeschiedene Triphenylcarbinol (9.5 g) wird abgesaugt und das Filtrat unter vermindertem Druck bei etwa 30° auf etwa 25 ccm eingeengt. Die Lösung wird in 50 ccm Eiswasser eingerührt, der Niederschlag (Ausgangsmaterial, Adenin, Triphenylcarbinol) abgesaugt und das Filtrat mehrfach mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird mit Natriumbicarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vak. eingedampft. Der getrocknete Sirup wird in der Wärme in 25 ccm Aceton gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt. Ausb. 8—10 g. Zur Reinigung wird noch 2-mal aus Aceton umkrystallisiert. Schmp. 180—181°.

Phosphorylierung von Diacetyl-adenosin mit Diphenylphosphorsäurechlorid.

4 g Diacetyl-adenosin in 40 ccm trockenem Pyridin werden unter Eis/Kochsalz-Kühlung langsam und unter Schütteln mit einer gleichfalls abgekühlten Lösung von 1 g frisch destilliertem Diphenylphosphorsäurechlorid in 15 ccm trockenem Pyridin langsam versetzt. Das klare Reaktionsgemisch bleibt 2 Stdn. in der Kältemischung, sodann 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen und wird darauf nach Versetzen mit 50 ccm Wasser und einer Lösung von 2.4 g NaOH in wenig Wasser 30 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit Wasser auf 250 ccm verdünnt und mit 25-proz. Bleiacetatlösung das Bleisalz gefällt, das nach Absaugen und Auswaschen wie üblich mit H₂S zerlegt wird. Überschüssiger H₂S wird durch Einleiten von CO₂ aus der Lösung vertrieben, die Lösung stark eingeengt und in Aceton eingerührt. Der Niederschlag (1 g) wird in 20 ccm *n*-HCl 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt, sodann abgespaltene Phosphorsäure mit Barytwasser gefällt, abgesaugt und das Filtrat auf 200 ccm verdünnt. Aus dieser Lösung wird wieder das Bleisalz gefällt, das mit H₂S zerlegt wird. Das Filtrat des Bleisulfids wird auf wenige ccm eingeengt und dann, über mehrere Tage sich erstreckend, allmählich Aceton zugegeben.

Dabei scheidet sich ein krystallines Produkt ab, das auf Grund des Schmelzpunktes (197—198°) und Mischschmelzpunktes (197—199°) mit Muskeladenylsäure identisch ist. Ausb. 0.02 g.

Tritylcytidin.

Die frühere Darstellung³⁾ des Tritylcytidins geschah ausgehend von Cytidin. Im folgenden ist ein etwas größerer Ansatz, ausgehend von Cytidinnitrat, beschrieben:

5 g Cytidinnitrat und 5 g Tritylchlorid werden in 50 ccm trockenem Pyridin 2 Stdn. auf dem Wasserbad unter Feuchtigkeitsausschluß erwärmt. Die Lösung wird sodann in $\frac{1}{2}$ l Eiswasser eingerührt und der z. Tl. krystalline Niederschlag nach mehrstündigem Stehenlassen abgesaugt. Er wird umkrystallisiert durch Lösen in 25 ccm Pyridin in der Wärme, Aufhellen mit Tierkohle und Versetzen mit 160 ccm Alkohol. Ausb. 5 g.

Phosphorylierung von Tritylcytidin.

4.3 g Tritylcytidin, gelöst in 40 ccm trockenem Pyridin, werden unter Feuchtigkeitsausschluß in einer Kältemischung langsam mit einer gleichfalls gekühlten Lösung von 2.6 ccm frisch destilliertem Diphenylphosphorsäurechlorid in 15 ccm trockenem Pyridin versetzt. Nach 2-stdg. Stehenlassen in der Kältemischung und anschließend 1-stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur werden 50 ccm Wasser, dann 2.4 g NaOH, in wenig Wasser gelöst, zugegeben und $\frac{1}{2}$ Stde. auf dem Wasserbad unter öfterem Umschütteln erwärmt. Beim Verdünnen mit etwa 1 l Wasser entsteht ein gallertartiger Niederschlag, der abgesaugt wird. Er besteht aus nicht umgesetztem Tritylcytidin (2.3 g). Im Filtrat wird mit 25-proz. neutraler Bleiacetatlösung das Bleisalz gefällt, das abgesaugt und gut ausgewaschen wird, am besten durch Zerreiben mit Wasser in einem Mörser. Das Bleisalz wird in Wasser (etwa 200 ccm) aufgeschlämmt, mit H_2S zerlegt, sodann zur Entfernung von H_2S Kohlendioxyd durchgeleitet und dann vom Bleisulfid abgesaugt. (Durch Auskochen des Bleisulfids mit Alkohol und Verdampfen der Lösung verbleibt als Rückstand Triphenylcarbinol.) Das Filtrat wird im Vak. auf wenige ccm eingedampft und mit einer kalt gesättigten methylalkohol. Brucinlösung neutralisiert. Von u. U. vorhandenen Flocken wird sofort abfiltriert. Beim Reiben mit dem Glasstab beginnt die Krystallisation. Ausb. 0.5 g. Es wird noch 2-mal aus 50-proz. Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt (bzw. Zersetzungspunkt) mit cytidylsaurem Brucin 175—190°. Wie cytidylsaures Brucin ist auch das synthetische Produkt in Pyridin unlöslich. Zur Drehung in 35-proz. Alkohol wurde die lufttrockene Substanz verwendet:

$$1) [\alpha]_D^{20} \left(\frac{-0.085 \times 3.276}{0.0220 \times 1 \times 0.94} \right) : -13.5^\circ$$

$$2) [\alpha]_D^{20} \left(\frac{-0.080 \times 3.146}{0.0175 \times 1 \times 0.94} \right) : -15.3^\circ$$

Cytidylsaures Brucin: $[\alpha]_D^{20} : -15.6^\circ$.