

## 50. Hellmut Bredereck, Hans Haas und Annelise Martini: Über methylierte Nucleoside und Purine und ihre pharmakologischen Wirkungen, II. Mitteil. : Methylierung von Nucleosiden durch Dimethylsulfat\*).

[Aus dem Institut für Organische Chemie u. Biochemie der Universität Jena und dem Institut für Organische Chemie und Organisch-chemische Technologie der Technischen Hochschule Stuttgart sowie den Pharmakologischen Instituten der Universitäten Leipzig und Bonn.]

(Eingegangen am 16. Januar 1948.)

Nucleoside wurden mittels Dimethylsulfats bei verschiedenem  $p_H$  methyliert. Dadurch war es erstmals möglich, die verschiedensten *N*-Methyl-Derivate der Nucleoside zu erhalten. Aus Adenosin wurden z. B. dargestellt bei  $p_H$  13—14: *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenosin, bei  $p_H$  8—10: 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenosin, bei  $p_H$  6—7: 1-Methyl-adenosin.

An freien und methylierten Purinen und Nucleosiden sowie deren Phosphorsäureestern wurden Diureseversuche sowie Blutdruckmessungen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluß der Stellung der Methylgruppen, der Einfluß von Kohlenhydrat sowie der Einfluß von Stellung und Zahl der Phosphorsäurereste untersucht. In allen untersuchten Reihen zeigte sich eine Parallele zwischen der harn-treibenden Wirkung und der auf den Blutdruck. Adenosin-triphosphorsäure besitzt neben der starken gefäßaktiven Wirkung gleichzeitig die gleiche diuretische Wirkung wie Theophyllin.

Methylierungen von Nucleosiden mit Dimethylsulfat wurden von uns im Anschluß an die Methylierung der Thymonucleinsäure durchgeführt<sup>1)</sup>. Erhalten wurde aus Adenosin bei  $p_H$  etwa 8.5 ein zweifach methyliertes Produkt, das nach Abspaltung des Zuckers 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenin lieferte. Guanosin gab nach Methylierung und Hydrolyse ein Dimethylguanin, dessen Konstitution noch offen gelassen wurde. Aus Cytidin wurde in analoger Weise 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin gewonnen. Levene<sup>2)</sup> erhielt aus Tetraacetyladenosin in Acetonlösung unter den üblichen Bedingungen in stark alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenosin-trimethyläther.

Da die bisherigen Versuche eine unterschiedliche Methylierung im Adeninring zeigten, haben wir Nucleoside sowie ihre Acetate bei verschiedenem  $p_H$  mit Dimethylsulfat methyliert. Die nachstehend beschriebenen Methylierungen der freien Nucleoside wurden in wäßriger Lösung durchgeführt. Die Abtrennung der methylierten Nucleoside von gleichzeitig entstandenem methylschwefelsaurem Natrium war infolge ähnlicher Löslichkeiten der beiden Stoffe nicht leicht; die Ausbeuten betragen daher nur 40—50%. Die erhaltenen Verbindungen waren meist bisher nicht bekannt.

Aus Adenosin wurden erhalten bei

- 1.)  $p_H$  stark alkalisch: *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenosin (I), daraus durch Hydrolyse *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenin,
- 2.)  $p_H$  8—10: 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenosin (II), daraus durch Hydrolyse 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenin,
- 3.)  $p_H$  6—7: 1-Methyl-adenosin (III), daraus durch Hydrolyse 1-Methyl-adenin,
- 4.)  $p_H$  etwa 7.5: ein Gemisch von 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl- und 1-Methyl-adenosin.

Aus Guanosin wurden erhalten bei

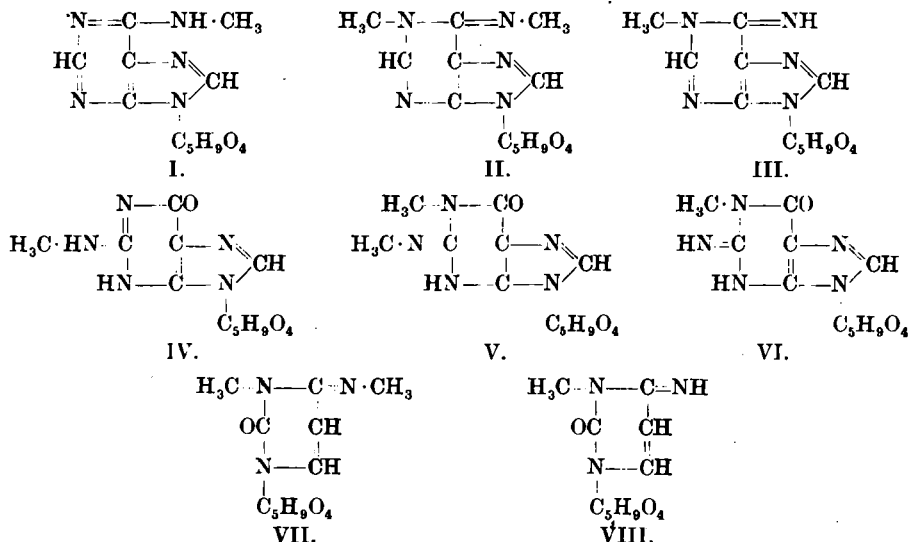
- 1.)  $p_H$  stark alkalisch: *N*<sup>2</sup>-Methyl-guanosin (IV), daraus durch Hydrolyse *N*<sup>2</sup>-Methyl-guanin,

\* ) Nucleinsäuren, XXIII. Mitteil.; XXII. Mitteil.; B. 80, 401 [1947].

<sup>1)</sup> H. Bredereck, G. Müller u. E. Berger, B. 73, 1058 [1940].

<sup>2)</sup> P. A. Levene u. R. S. Tipson, Journ. biol. Chem. 94, 809 [1932].

- 2.)  $p_H$  6–9: 1.*N*<sup>2</sup>-Dimethyl-guanosin (V), daraus durch Hydrolyse 1.*N*<sup>2</sup>-Dimethyl-guanin,  
 3.)  $p_H$  4: 1-Methyl-guanosin (VI), daraus durch Hydrolyse 1-Methyl-guanin.



In Auswertung des neuen Methylierungsverfahrens haben wir ferner Xanthosin der Methylierung bei  $p_H$  8–9 unterworfen und dabei 1.3-Dimethyl-xanthosin (= Theophyllinribosid) erhalten, das wir bereits durch Methylierung des Triacetyl-xanthosins mit Diazomethan erhalten hatten<sup>3</sup>). Von dem Dimethyl-xanthosin eroffen wir uns besondere pharmakologische Wirkungen (s. u.). Die Methylierung des Cytidins ergab bei  $p_H$  4 1-Methyl-cytidin (VIII), bei  $p_H$  8–10 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytidin (VII). In diesem Zusammenhang seien die Spaltungsversuche an der bei  $p_H$  8–8.5 methylierten Hefenucleinsäure (Tetra-nucleotid) ergänzt<sup>4</sup>). Isoliert hatten wir nach Abspaltung des Zuckers als Pikrate 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenin, 1.*N*<sup>2</sup>-Dimethyl-guanin und 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin. Als letztes noch ausstehendes Uracil-Derivat haben wir jetzt das 1-Methyl-uracil isoliert, das sich mit der in der Literatur bereits bekannten Verbindung als identisch erwies. Damit ist gleichzeitig ein einfacher Beweis für die 3-Stellung der Ribose am Pyrimidinring in den Pyrimidinnucleosiden erbracht.

Durch Variation des  $p_H$  ist es nunmehr möglich, die verschiedensten *N*-Methyl-Derivate der Nucleoside zu erhalten. Vom Adenosin konnten alle theoretisch möglichen *N*-Methyl-Verbindungen gewonnen werden.

Unseres Wissens sind  $p_H$ -abhängige Methylierungen an ein und derselben Verbindung bisher noch nicht durchgeführt worden. Wir haben sie inzwischen auf weitere Purine und andere Verbindungsklassen der organischen Chemie übertragen und berichten später darüber.

#### Pharmakologische Untersuchungen.

Durchgeführt wurden Diureseversuche an Ratten, sowie Blutdruckmessungen an der dekapierten Katze. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tafel zusammengestellt<sup>5</sup>).

<sup>3</sup>) B. 80, 401 [1947].

<sup>4</sup>) H. Bredereck u. E. Hoepfner, B. 75, 1086 [1942].

<sup>5</sup>) Die eingehende Wiedergabe der Ergebnisse findet sich in den beiden Arbeiten von Hans T. A. Haas, Naunyn Schmiedebergs Archiv 201, 589–610 [1943] u. 203, 146–150 [1944].

## Tafel.

Bei den Diureseversuchen betragen die ausgeschiedenen Harnmengen im Leerversuch nach Zugabe von 4 ccm dest. Wasser/100 g per os  $33.1 \pm 2.1$  ccm pro kg. In der gleichen Flüssigkeitsmenge wurden die Purinabkömmlinge (in mg/100 g) gelöst.

Substanz	Diureseversuche			Blutdruck kleinste Wirkdosis mg/kg
	Zahl der Versuche	Dosis mg/100 g	Harnmenge in ccm/kg	
Xanthin .....	15	2.5	$32.8 \pm 1.8$	10.0
	15	5	$31.7 \pm 2.2$	
	24	10	$27.6 \pm 2.3$	
1-Methyl-xanthin .....	30	5	$33.7 \pm 1.1$	5
3-Methyl-xanthin .....	24	5	$38.2 \pm 2.3$	1
	15	10	$36.3 \pm 4.9$	
7-Methyl-xanthin (= Heteroxanthin) ...	30	5	$40.8 \pm 1.7$	2.5
	15	10	$31.7 \pm 4.2$	
1.3-Dimethyl-xanthin (= Theophyllin) .	30	2.5	$43.6 \pm 2.9$	0.6
	45	5	$53.2 \pm 1.7$	
	30	10	$42.3 \pm 2.6$	
1.7-Dimethyl-xanthin (= Paraxanthin) .	45	5	$33.2 \pm 1.3$	8
	15	10	$33.7 \pm 1.6$	
3.7-Dimethyl-xanthin (= Theobromin) .	15	2.5	$37.8 \pm 1.4$	2.5
	30	5	$42.9 \pm 1.7$	
	15	10	$40.0 \pm 4.6$	
1.3.7-Trimethyl-xanthin (= Coffein)....	30	2.5	$31.5 \pm 3.5$	1.2
	30	5	$42.2 \pm 2.1$	
	15	10	$31.7 \pm 2.8$	
Xanthosin .....	15	2.5	$40.0 \pm 2.4$	2.5
	21	5	$40.9 \pm 1.9$	
	15	10	$24.2 \pm 4.3$	
1-Methyl-xanthosin .....	15	5	$32.8 \pm 1.0$	10.0
	30	10	$42.2 \pm 2.2$	
1.3-Dimethyl-xanthosin .....	30	2.5	$37.7 \pm 2.0$	2.5
	(= Theophyllinribosid)			
	45	5	$44.3 \pm 2.3$	
1.3-Dimethyl-xanthinglucosid .....	30	2.5	$39.3 \pm 1.2$	2.5
	(= Theophyllinglucosid)			
	45	5	$44.3 \pm 2.3$	
1.3-Dimethyl-xanthinglucosid .....	30	2.5	$36.1 \pm 4.9$	2.5
	(= Theophyllinglucosid)			
	45	5	$45.3 \pm 5.4$	
15	10	$30.2 \pm 1.6$		
	15	2.5	$48.2 \pm 2.2$	0.5
Xanthosin-phosphorsäure-(3) .....				
(= Xanthylsäure)				
24	5	$45.2 \pm 3.6$		
1.3-Dimethyl-xanthosin-phosphor- säure-(3)	30	2.5	$40.2 \pm 1.4$	0.5
	45	5	$44.8 \pm 1.2$	
1.3-Dimethyl-xanthylsäure, Na-Salz...	15	10	$35.6 \pm 1.7$	
Guanosin .....	21	5	$33.8 \pm 2.1$	2
	15	10	$46.7 \pm 3.7$	
1-Methyl-guanosin .....	30	5	$36.1 \pm 1.7$	4
	15	10	$31.2 \pm 1.0$	
N <sup>2</sup> -Methyl-guanosin-trimethyläther ...	15	5	$24.3 \pm 1.5$	8
	15	10	$27.1 \pm 3.1$	
Guanosin-phosphorsäure-(3) .....	15	2.5	$38.3 \pm 2.7$	1
	(= Guanylsäure)			
	30	5	$41.1 \pm 1.7$	
15	10	$36.6 \pm 2.5$		

Fortsetzung der Tafel auf Seite 309.

Substanz	Diureseversuche			Blutdruck kleinste Wirkdosis mg/kg	
	Zahl der Versuche	Dosis mg/100 g	Harnmenge in ccm/kg		
Adenosin .....	15	5	27.9 ± 1.7	0.05	
	15	10	26.8 ± 1.0		
N <sup>6</sup> -Methyl-adenosin-trimethyläther ...	15	5	30.5 ± 2.0	0.07	
	Adenosin-phosphorsäure-(3) .....	15	2.5		30.7 ± 1.6
		(= Hefeadenylsäure)	45		5
	15	10	27.7 ± 2.3		
Adenosin-phosphorsäure-(5) .....	15	5	30.9 ± 1.5	0.025	
	(= Muskeladenylsäure)	30	10		42.2 ± 2.6
Adenosin-triphosphorsäure .....	30	2.5	41.6 ± 2.0	0.004	
	(= Adenyl-pyrophosphorsäure)	45	5		53.4 ± 2.5
		15	10		32.4 ± 1.7
Inosin .....	21	5	34.3 ± 3.4	8	
	15	10	28.6 ± 2.7		
1-Methyl-inosin .....	15	5	20.6 ± 2.2	5	
	15	10	29.0 ± 1.0		

Vergleicht man zunächst Xanthin und die methylierten Xanthine auf ihre harntreibende und Blutdruck-Wirksamkeit, so zeigt sich, daß Xanthin keinen Einfluß auf die Harnausscheidung hat, größere Dosen vielmehr die Harnabsonderung deutlich hemmen. Der Blutdruck wird nur von relativ hohen Dosen beeinflusst. Es zeigt sich weiter, daß von den Monomethylxanthinen das 1-Methyl-xanthin keine, das 3- und 7-Methyl-xanthin eine deutliche Wirkung besitzt. Von den Dimethylxanthinen besitzt das 1,3-Dimethyl-xanthin (Theophyllin) nicht nur, wie bekannt, die stärkste diuretische Wirkung, sondern gleichzeitig auch die höchste Blutdruck-Wirksamkeit dieser Reihe. In beiden Wirkungen deutlich geringer ist das 3,7-Dimethyl-xanthin (Theobromin), während das 1,7-Dimethyl-xanthin (Paraxanthin) keine Wirkungen mehr auslöst. Berücksichtigt man, daß auch Coffein die bekannte diuretische und Blutdruck-Wirkung besitzt, so ergibt sich, daß für Diurese und Blutdruck vor allem die Methylgruppe in der 3-Stellung wesentlich ist. Der nur schwache diuretische Effekt des 3-Methyl-xanthins selbst läßt sich durch die gegenüber allen anderen Verbindungen bestehende schlechte Löslichkeit erklären. Auffallend ist die ungefähre Parallelität zwischen der harntreibenden und der Blutdruck-Wirkung.

Der Einfluß des Zuckers (*d*-Ribose bzw. *d*-Glucose) in den Puringlykosiden (einschl. Nucleosiden) bzw. deren Derivaten im Vergleich zu den entsprechenden freien Purinen ist nicht einheitlich. Betrachtet man die Xanthin-Verbindungen, so zeigen Xanthosin und 1-Methyl-xanthosin eine erhebliche Steigerung ihrer diuretischen Wirkung gegenüber dem unwirksamen Xanthin und 1-Methyl-xanthin, dagegen zeigen 1,3-Dimethyl-xanthosin (Theophyllinribosid) und, wie schon bekannt, Theophyllinglucosid eine Abschwächung gegenüber dem Theophyllin. Überraschend ist die starke Steigerung der diuretischen Wirkung in der Xanthosin-phosphorsäure-(3) (Xanthylsäure) gegenüber dem Xanthosin. Diese Wirkungssteigerung hat sich bei allen Puringlykosiden beim Übergang zu den Phosphorsäureestern gezeigt (s.u.). Die Hoffnung jedoch, beim Übergang vom Theophyllinribosid zur Theophyllinribosid-phosphorsäure-(3) zu einem Diuretikum zu gelangen, das möglicherweise Theophyllin übertrifft, hat sich nicht erfüllt. Wohl war der Phosphorsäureester dem Theophyllinribosid überlegen, reichte aber nicht an das Theophyllin selbst heran.

Adenosin und Inosin sowie die untersuchten Methylverbindungen einschließlich der des Guanosins zeigen keinerlei diuretische Wirkung, z.Tl. sogar deutlich eine hemmende Wirkung. Guanosin selbst besitzt eine relativ gute Wirkung auf die Diurese und den Blutdruck. Auch bei diesen Nucleosiden zeigt sich die Wirkungssteigerung beim Übergang zu den Phosphorsäureestern, wobei auch Unterschiede hinsichtlich der Stellung der Phosphorsäure bestehen. So zeigt Adenosin-phosphorsäure-(3) (Hefeadenylsäure) kaum eine Steigerung, bei der Adenosin-phosphorsäure-(5) (Muskeladenylsäure) wird sie schon

deutlich und erreicht ihr Maximum in der Adenosintriphosphorsäure, die die gleiche Wirksamkeit wie Theophyllin besitzt. In den Versuchen kommt die bekannte gefäßaktive Wirkung der Adenosinverbindungen klar zum Ausdruck. Dabei nimmt die Wirkung in der Reihenfolge Adenosin  $\rightarrow$  Muskeladenylsäure  $\rightarrow$  Adenosintriphosphorsäure zu. Da die Pyrophosphorsäure selbst bereits blutdrucksenkende Wirkungen besitzt, besteht die Möglichkeit, daß zumindest teilweise die Adenosintriphosphorsäure-Wirkung auf einer Abspaltung freier Pyrophosphorsäure beruht.

Für die Überlassung von Guanosin, Adenosin, Muskeladenylsäure und Adenosintriphosphorsäure danken wir der Firma Dr. Georg Henning, Berlin-Tempelhof.

### Beschreibung der Versuche.

Für die Methylierungen verwendeten wir einen Rundkolben mit 4 Öffnungen. Durch die mittlere Öffnung lief ein Rührer, 2 weitere trugen Tropftrichter, durch die Dimethylsulfat bzw. 33-proz. Natronlauge eintropften. Die 4. Öffnung diente zur Probeentnahme für die laufende  $p_H$ -Prüfung, die bei Zusatz geeigneter Indicatoren entfiel.

Die Technik der Methylierung und Aufarbeitung sei im folgenden für einen Ansatz von 5 g Nucleosid beschrieben: Die Substanz wird im Kolben in dem betreffenden Lösungsmittel gelöst und mit verd. Natronlauge bzw. verd. Schwefelsäure auf das vorgesehene  $p_H$  eingestellt. Dann wird unter Rühren Dimethylsulfat mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/2 Sek. zugetropft und gleichzeitig unter Einhaltung des  $p_H$  tropfenweise Alkali zugegeben. Die  $p_H$ -Prüfung erfolgt, falls ohne Indikator gearbeitet wird, mit Lyphan-Papier. Meist wird am Anfang nur wenig Alkali verbraucht, dann wird die Reaktion lebhafter, um gegen Ende wieder träge zu werden. Man rührt so lange und gibt solange Alkali zu, bis sich das  $p_H$  innerhalb 10 Min. nicht mehr ändert. Die eingehaltene Temperatur ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Bei der Methylierung entsteht gleichzeitig methylschwefelsaures Natrium. Die Methyl-nucleoside, die gleichzeitig am Zucker methyliert sind, lassen sich von diesem leicht durch Ausschütteln mit Chloroform abtrennen. Hingegen verläuft die Abtrennung der nur im Basenanteil methylierten Nucleoside schwierig; man geht in diesem Falle folgendermaßen vor: Nach beendeter Methylierung wird mit verd. Schwefelsäure bzw. Natronlauge neutralisiert und i. Vak. bei 30–40° zum Sirup eingeeengt. Man verreibt diesen mit etwa 30 ccm Methanol; das ausgefallene methylschwefelsaure Natrium wird abgesaugt und zunächst noch einmal mit 95-proz., dann mit absol. Methanol im Mörser verrieben. Die vereinigten Methanol-Filtrate werden i. Vak. eingeeengt. Während des Einengens u. U. noch ausfallendes methylschwefelsaures Natrium wird zwischendurch abgesaugt. Der verbliebene Sirup wird in 20 ccm Methanol gelöst und zur Abscheidung weiteren methylschwefelsauren Natriums im Eisschrank aufbewahrt. Nach dem Absaugen wird wieder eingeeengt, mit 15 ccm Methanol aufgenommen und im Eisschrank gekühlt. Man engt — wenn noch etwas auskristallisiert, nach dem Absaugen — auf die Hälfte ein und stellt nochmals in den Eisschrank. Auf diese Weise läßt sich alles methylschwefelsaure Natrium bis auf geringe Spuren abtrennen. Der nach dem letzten Einengen verbliebene Sirup wird dann in 10 ccm Methanol aufgenommen und in 200 ccm absol. Äther eingerührt. Der klebrige Niederschlag wird nochmals in Methanol gelöst und in Äther eingerührt. Die jetzt flockig ausfallende Substanz wird abgesaugt und im Exsiccator über Diphosphorperoxyd getrocknet. Die Schwefelprobe mit Nitroprussidnatrium gibt nur noch eine ganz schwache Rotfärbung.

### Methylierungen von Adenosin.

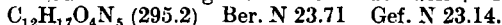
a) stark alkalisch: *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenosin. 3 g Adenosin werden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 24 ccm Dimethylsulfat und 40 ccm 33-proz. Natronlauge bei 55° unter kräftigem Rühren innerhalb 1/2 Stde. behandelt. Anschließend wird noch 1 Stde. bei 60° gerührt, mit verd. Schwefelsäure neutralisiert, eingeeengt und methylschwefelsaures Natrium, wie oben beschrieben, entfernt. Der verbliebene Sirup wird zur weiteren Reinigung in Methanol gelöst und bei 0° Chlorwasserstoff eingeleitet. Von wenig ausgefallenem Natriumchlorid wird abgesaugt und durch Zugabe von Äther *N*<sup>6</sup>-Methyl-adenosinhydrochlorid als flockiger Niederschlag gefällt. Dieser wird in 95-proz. Methanol gelöst (1 g/10 ccm) und 1 1/2 Stdn. Chlorwasserstoff durchgeleitet. Das sich gegen Ende des Einleitens abscheidende *N*<sup>6</sup>-Methyl-adeninhydrochlorid wird durch Lösen in Wasser und Zugabe von Pikrinsäure-Lösung in das Pikrat vom Schmp. 265° übergeführt.

$C_{12}H_{10}O_7N_8$  (378.1) Ber. N 29.63 Gef. N 29.91.

b)  $pH$  8–10: 1. $N^6$ -Dimethyl-adenosin und -adenin. Die Methylierung wurde entsprechend unseren früheren Angaben<sup>1)</sup> bei  $pH$  8.5 und 9.5 durchgeführt. Isoliert wurde in beiden Fällen nach der Hydrolyse 1. $N^6$ -Dimethyl-adenin-hydrochlorid, das als Pikrat (Schmp. 236<sup>o</sup>) identifiziert wurde.

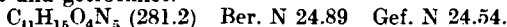
Die Isolierung des 1. $N^6$ -Dimethyl-adenosins wurde wie folgt durchgeführt: 5 g Adenosin, gelöst in 75 ccm Wasser, werden mit 17 ccm Dimethylsulfat und 20 ccm 33-proz. Natronlauge methyliert. Die mit verd. Schwefelsäure neutralisierte Lösung wird vom methylschwefelsauren Natrium befreit und durch Einrühren in Äther als klebrige Masse gefällt. Durch nochmaliges Aufnehmen in Methanol und Einrühren in Äther wird die Verbindung als flockiger Niederschlag isoliert; Ausb. 3.5 g. Zur weiteren Reinigung wird in 20 ccm Methanol gelöst und die bei Zugabe von 10 ccm Äther entstandene Trübung unter Zusatz von etwas Tierkohle abgesaugt; dann werden weitere 10 ccm Äther zugegeben. Das ausgefallene klebrige Produkt wird in Methanol gelöst und durch Einrühren in Äther flockig erhalten; Ausb. 2 g.

Zur Analyse wurde nochmals in der gleichen Weise aus Äther + Methanol umgefällt.



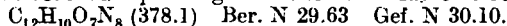
Die Hydrolyse entsprechend unseren früheren Angaben<sup>1)</sup> führte zum 1. $N^6$ -Dimethyl-adenin, das als Pikrat (Schmp. 236<sup>o</sup>) identifiziert wurde.

c)  $pH$  6: 1-Methyl-adenosin. 5 g Adenosin werden wie vorstehend beschrieben bei  $pH$  6 methyliert und nach Entfernung des methylschwefelsauren Natriums durch Einrühren in Äther das 1-Methyl-adenosin isoliert; Ausb. 3.8 g. Ein Teil des hygroscopischen Pulvers wird, wie unter b) beschrieben, aus Methanol durch fraktionierte Fällung mit Äther gereinigt und getrocknet.



Der andere Teil des hygroscopischen Pulvers wird mit Salzsäure in 95-proz. Methanol hydrolysiert. Das ausgefallene 1-Methyl-adenin-hydrochlorid wird abgesaugt und in wenig Wasser gelöst. Bei Zugabe von kaltgesättigter Pikrinsäure-Lösung fällt das Pikrat vom Schmp. 269<sup>o</sup> aus.

Mit allen bisher bekannten Methyladenin-pikraten, insbesondere auch mit dem  $N^6$ -Methyl-adenin-pikrat vom Schmp. 265<sup>o</sup> gibt das neue Pikrat eine Schmp.-Erniedrigung.



#### Methylierungen von Guanosin.

a)  $pH$  13–14:  $N^2$ -Methyl-guanosin und -guanin. 3 g Guanosin werden in 50 ccm Wasser gelöst und 24 ccm Dimethylsulfat und 40 ccm 33-proz. Natronlauge binnen  $\frac{1}{2}$  Stde. bei 55<sup>o</sup> unter Rühren eingetropt; dann wird noch 1–2 Stdn. bei 60<sup>o</sup> weitergerührt. Die mit verd. Schwefelsäure neutralisierte Lösung wird eingengt und, wie oben beschrieben, vom methylschwefelsauren Natrium befreit. Ohne das entstandene  $N^2$ -Methyl-guanosin zu isolieren wird der Sirup mit Chlorwasserstoff in 95-proz. Methanol hydrolysiert. Die beim Einleiten von Chlorwasserstoff zuerst ausfallende geringe Menge Natriumchlorid wird zwischendurch abgesaugt. Nach beendeter Hydrolyse wird durch Zugabe von wenig Äther das entstandene  $N^2$ -Methyl-guanin-hydrochlorid isoliert und das daraus hergestellte  $N^2$ -Methyl-guanin-pikrat vom Schmp. 288<sup>o</sup> durch den Misch-Schmelzpunkt identifiziert.

b)  $pH$  6–9: 1. $N^2$ -Dimethyl-guanosin und -guanin. 3 g Guanosin werden in 50 ccm Wasser gelöst und durch Eintropfen von 15 ccm Dimethylsulfat und etwa 18 ccm 33-proz. Natronlauge unter genauer Einhaltung des  $pH$  bei 35–40<sup>o</sup> Badtemperatur methyliert. Methylschwefelsaures Natrium wird, wie oben beschrieben, weitgehendst entfernt. Zur weiteren Reinigung wird der Sirup mit 7 ccm Alkohol verdünnt und bei 0<sup>o</sup> Chlorwasserstoff eingeleitet, bis nichts mehr ausfällt; von der ausgefallenen Verunreinigung wird abgesaugt. Nun gibt man zur Lösung etwa 50 ccm Äther, saugt das entstandene flockige 1. $N^2$ -Dimethyl-guanosin-hydrochlorid ab, löst dieses wieder in Alkohol und rührt es in Äther ein; Ausb. 1 g. Das hygroscopische Pulver wird über Diphosphor-pentoxyd bei 65<sup>o</sup>/<sub>2</sub> Torr getrocknet.



Die weitere Hydrolyse mit Chlorwasserstoff in 95-proz. Methanol ergab 1. $N^2$ -Dimethyl-guanin-hydrochlorid, aus dem das Pikrat vom Schmp. 214<sup>o</sup> dargestellt und durch den Misch-Schmelzpunkt identifiziert wurde.

c)  $pH$  4: 1-Methyl-guanosin. 5 g Guanosin werden in 50 ccm Wasser gelöst; mit verd. Schwefelsäure wird  $pH$  4 eingestellt und mit 15 ccm Dimethylsulfat und etwa 18 ccm 33-proz. Natronlauge unter Verwendung einiger Tropfen einer Lösung von alizarinsulfonsaurem Natrium als Indicator bei 35–40<sup>o</sup> methyliert. Nach Einengen der Lösung zum

Sirup und Zugabe von Methanol fällt der größte Teil des methylschwefelsauren Natriums aus und wird abgesaugt. Das Filtrat wird wieder eingengt und nochmals mit Methanol aufgenommen. Nach Animpfen fällt kristallines 1-Methyl-guanosin vom Schmp. 163° aus. Es wurde durch den Misch-Schmelzpunkt mit dem aus Triacetylguanidin durch Methylierung mit Diazomethan hergestellten 1-Methyl-guanosin<sup>3)</sup> identifiziert; Ausb. 2.5 g.

Die Hydrolyse wird auch hier mit Chlorwasserstoff in 95-proz. Methanol ausgeführt. Bei Zugabe von etwas Äther fällt 1-Methyl-guanin-hydrochlorid aus. Das daraus hergestellte 1-Methyl-guanin-pikrat vom Schmp. 267° wird durch den Misch-Schmelzpunkt identifiziert.

### 1.3-Dimethyl-xanthosin.

5 g Xanthosin werden in 70 ccm Wasser warm gelöst und mit 20 ccm Dimethylsulfat und etwa 22 ccm 33-proz. Natronlauge bei  $p_H$  8,5 und 35—40° methyliert. Nach Neutralisation mit verd. Schwefelsäure wird methylschwefelsaures Natrium, wie beschrieben, entfernt, der verbliebene Sirup in Methanol aufgenommen und durch Einrühren in Äther das Methylierungsprodukt in flockiger Form ausgefällt; Ausb. 3.5 g. Zur Reinigung wird zunächst mit 10 ccm Methanol + Äther (1:1) im Mörser rasch verrieben, die überstehende Flüssigkeit abgossen und der Rückstand mit Äther angerührt. Nach dem Absaugen wird nochmals in 20 ccm Methanol gelöst, der durch Zugabe von 5 ccm Äther ausfallende Niederschlag verworfen und weitere 10 ccm Äther zugegeben. Die entstandene Fällung wird zur Analyse verwendet;  $[\alpha]_D^{20}$ : +4.6 (in Wasser). Das mit Diazomethan hergestellte Dimethylxanthosin zeigt eine Drehung von  $[\alpha]_D^{20}$ : + 2.6°.

$C_{12}H_{16}O_6N_4$  (312.1) Ber. N 17.9  $CH_3$  9.6 Gef. N 16.9  $CH_3$  8.6.

Durch Hydrolyse, die analog der des mittels Diazomethans dargestellten Dimethylxanthosins<sup>3)</sup> ausgeführt wurde, wurde Theophyllin isoliert.

### Methylierungen von Cytidin.

a)  $p_H$  4: 1-Methyl-cytidin und 1-Methyl-cytosin-pikrat. 5 g Cytidinsulfat werden in 75 ccm Wasser gelöst, mit verd. Schwefelsäure wird  $p_H$  4 eingestellt und durch Eintropfen von 20 ccm Dimethylsulfat und etwa 22 ccm 33-proz. Natronlauge bei 35—40° methyliert. Dann wird genau neutralisiert und methylschwefelsaures Natrium weitgehendst entfernt. Ohne das entstandene 1-Methyl-cytidin zu isolieren, wird der Sirup nach dem früher<sup>1)</sup> beschriebenen Verfahren hydrolysiert, indem man in 20 ccm 25-proz. Schwefelsäure löst und 2 Stdn. im Bombenrohr auf 175—180° erhitzt. Vom kohligen Rückstand wird abfiltriert und das Filtrat mit heiß gesättigter Barytlauge von Schwefelsäure befreit. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand mehrmals mit Alkohol extrahiert, die Lösung eingengt und der mit Wasser gelöste Sirup mit kalt gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Das in rechteckigen Blättchen kristallisierende 1-Methyl-cytosin-pikrat hat den Schmp. 228°.

$C_{11}H_{10}O_6N_6$  (354.1) Ber. N 23.72 Gef. N 23.22.

b)  $p_H$  8—10: 1. *N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytidin und 1. *N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin-pikrat. 5 g Cytidinsulfat werden wie unter a) beschrieben bei  $p_H$  8—10 methyliert und wiederum ohne das entstandene 1. *N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytidin zu isolieren mit 25-proz. Schwefelsäure im Bombenrohr hydrolysiert. Die Lösung wird, wie oben beschrieben, aufgearbeitet, das 1. *N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin-pikrat vom Schmp. 218° isoliert und durch den Misch-Schmelzpunkt identifiziert.

### 1-Methyl-uracil (aus Nucleinsäure).

4 g Tetranucleotid<sup>6)</sup> (aus Hefenucleinsäure) werden mit 18 ccm 25-proz. Schwefelsäure durch 2-stdg. Erhitzen im Einschlußrohr auf 175—180° hydrolysiert. Nach Absaugen und Auswaschen des Rückstands mit heißem Wasser wird das Filtrat mit einem geringen Überschuß an Baryt versetzt, vom Bariumsulfat abgesaugt, auf 30 ccm eingengt, durch Zusatz von verd. Schwefelsäure barytfrei gemacht und nach dem Filtrieren zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Alkohol aufgenommen und die Lösung im Exsiccator langsam eingedunstet. Diese Behandlung wird mehrfach wiederholt; dabei scheiden sich Krystalle aus, die abgetrennt und auf Ton abgepreßt werden. Sie werden durch nochmaliges Lösen in Alkohol, Eindunstenlassen der Lösung, Abtrennen der Krystalle und Abpressen auf Ton gereinigt. Durch Schmelz- und Misch-Schmelzpunkt (174—175°) erweisen sie sich als identisch mit dem bereits bekannten 1-Methyl-uracil<sup>7)</sup>.

<sup>6)</sup> Das verwendete Präparat war gegenüber dem früher (vergl. Fußn. <sup>4)</sup>) beschriebenen durch Dialyse gereinigt.

<sup>7)</sup> T. B. Johnson u. F. W. Heyl, Amer. chem. Journ. 37, 633 [1907].