

Karl Heinz Scheit

## Die Synthese der 5'-Diphosphate von 5-Methyl-uridin, 5-Hydroxymethyl-uridin und 3.5-Dimethyl-uridin\*)

Aus der Chemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen

(Eingegangen am 18. Juni 1966)

Ausgehend von 2'.3'-*O*-Isopropyliden-uridin wurden 5-Hydroxymethyl-, 5-Methyl- und 3.5-Dimethyl-2'.3'-*O*-isopropyliden-uridin in guten Ausbeuten dargestellt. Die geschützten Nucleoside wurden durch 2-Cyan-äthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) phosphoryliert. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurden durch Reaktion der Nucleotide mit [2-Cyan-äthyl]- $\alpha$ -pyridyl-phosphat die entsprechenden Nucleosid-5'-diphosphate erhalten.

DNS und RNS enthalten neben Adenin, Cytosin, Uracil und Guanin sowie deren *N*-Methylderivate auch 5-alkylsubstituierte Pyrimidine: 5-Methyl-uracil (Thymin), 5-Hydroxymethyl-uracil, 5-Methyl-cytosin, 5-Hydroxymethyl-cytosin. Wir waren daran interessiert, Polyribonucleotide mit 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl- und 3.5-Dimethyl-uracil darzustellen, um den Einfluß der Hydroxymethyl- oder Methylsubstituenten der Pyrimidine auf die Eigenschaften dieser Polynucleotide zu untersuchen. In dieser Arbeit wird zunächst über die Synthese der 5'-Diphosphate von 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl- und 3.5-Dimethyl-uridin berichtet.

Die Phosphorylierung von 5-Methyl-, sowie 3.5-Dimethyl-uridin zu 5-Methyl-uridin-5'-phosphat<sup>1, 2)</sup>, 5-Methyl-uridin-5'-diphosphat<sup>1, 2)</sup>, 3.5-Dimethyl-uridin-5'-phosphat<sup>2)</sup> und 3.5-Dimethyl-uridin-5'-diphosphat<sup>2)</sup> wurde bereits beschrieben. Das erforderliche 5-Methyl-uridin wurde durch Kondensation eines geschützten Ribofuranosylhalogenids mit Thymin dargestellt<sup>3)</sup>. Wir versuchten diese im allgemeinen wenig angenehme Synthese zu umgehen. Cline et al.<sup>4)</sup> beobachteten, daß Uracil unter saurer, noch besser basischer Katalyse mit Paraformaldehyd 5-Hydroxymethyl-uracil bildet. Uridin reagierte nur in Gegenwart von Säure mit Paraformaldehyd. Aus der Reaktionsmischung ließ sich durch Anionenaustauscherchromatographie 5-Hydroxymethyl-uridin in geringer Ausbeute isolieren.

Wir fanden, daß aus 2'.3'-*O*-Isopropyliden-uridin (**1**) und Paraformaldehyd in 0.5*n* KOH als Lösungsmittel bei 50° in 85-proz. Ausbeute das 5-Hydroxymethyl-derivat **2** entstand<sup>5)</sup>. Uridin reagierte unter Basenkatalyse nicht mit Paraformaldehyd. Saure Hydrolyse des Isopropylidenrestes durch 50-proz. Essigsäure bei 100° führte zu 5-Hydroxymethyl-uridin, das im Hinblick auf UV-Spektren und Schmelzpunkt mit dem in der Literatur beschriebenen Produkt identisch war. Im NMR-Spektrum von **2**

\*) Vorgetragen auf der westdeutschen Chemiedozententagung in Würzburg, 25.—29. 5. 1966.

1) B. E. Griffin, A. Rich und A. Todd, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 1123 (1958).

2) W. Szer, M. Swierkowski und D. Shugar, Acta biochim. polon. **10**, 87 (1963).

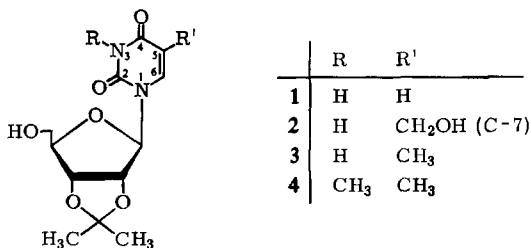
3) J. J. Fox, N. Yung, J. Davoll und G. Brown, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2117 (1956).

4) R. E. Cline, R. M. Fink und K. Fink, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2521 (1959).

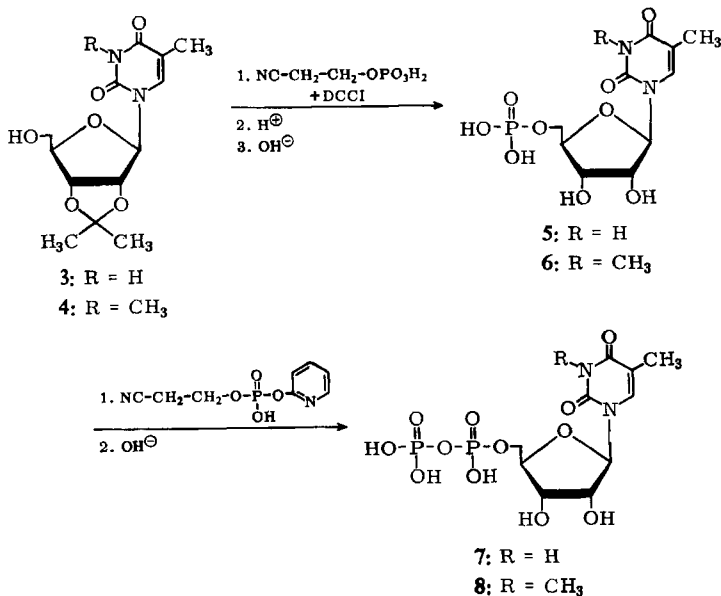
5) K. H. Scheit, Tetrahedron Letters [London] **1965**, 1031.

fehlte das Signal des Protons an C-5 in **1**. Die Substitution war also am Pyrimidinkern in 5-Stellung erfolgt. **2** ließ sich in Eisessig mit Platin(IV)-oxid als Katalysator in 85-proz. Ausb. zu 5-Methyl-2',3'-*O*-isopropyliden-uridin (**3**) hydrieren. Eine Hydrierung der 5,6-Doppelbindung wurde nicht beobachtet.

Mit Diazomethan wurde **3** bei 0° quantitativ in das Dimethylderivat **4** übergeführt. Die Stellung der zweiten Methylgruppe in **4** konnte eindeutig aus den UV-Spektren bei pH 7 und pH 12 abgeleitet werden.

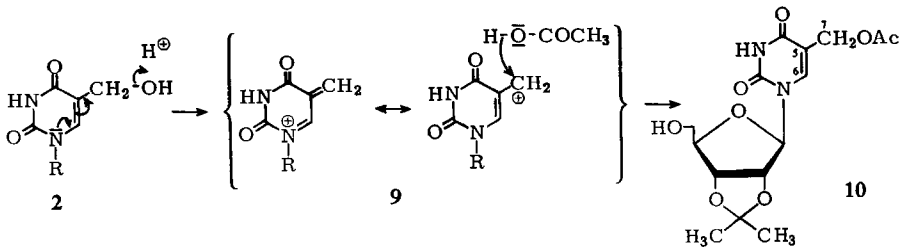


Die Phosphorylierung der geschützten Nucleoside **3** und **4** gelang ohne Schwierigkeiten mit 2-Cyan-äthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) in Ausbeuten von 60 bzw. 67%. Die Reaktion der erhaltenen Nucleotide mit [2-Cyan-äthyl]- $\alpha$ -pyridyl-phosphat<sup>6)</sup> führte nach alkalischer Abspaltung der 2-Cyan-äthylgruppe zu den 5'-Diphosphaten **7** und **8**. Es ist interessant, daß **4** bei pH 13 stabil ist, während 3-Methyl-uridin unter diesen Bedingungen eine Aufspaltung des Pyrimidinringes erleidet. **7** und **8** wurden durch Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose mit Ausbeuten von 50% rein isoliert.



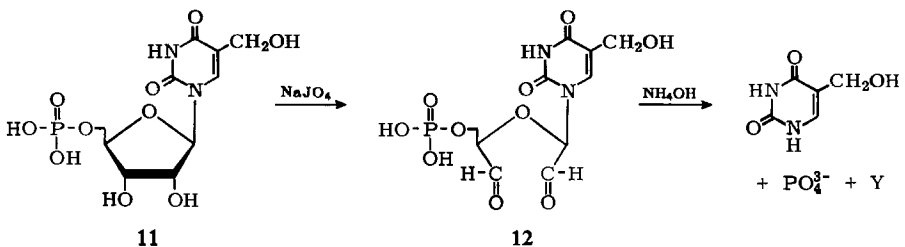
<sup>6)</sup> K. H. Scheit und W. Kampe, Chem. Ber. 98, 1045 (1965).

Um **2** phosphorylieren zu können, mußte die 5-Hydroxymethylgruppe selektiv geschützt werden. Die Unterschiede in der Nucleophilie der 5'-OH- und 5-OH-Gruppe sind nicht groß genug, um eine spezifische Reaktion mit Tritylchlorid oder Dihydropyran zu ermöglichen. Dagegen besitzt **2** die Möglichkeit, in Gegenwart starker Säuren das mesomeriestabilisierte Carbonium-Ion **9** (vgl. auch l. c.<sup>4)</sup>) zu bilden, das mit schwachen Säuren zu dem entsprechenden 5-Hydroxymethylester reagieren kann. Wurde eine Lösung von **2** in Eisessig bei Anwesenheit katalytischer Mengen Trifluoressigsäure eine halbe Stunde auf 50° erwärmt, so konnte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel das 5-Hydroxymethylacetat **10** in 50-proz. Ausbeute isoliert werden.



2',3'-O-Isopropyliden-uridin wurde unter den gleichen Bedingungen nicht acetyliert. Die Stellung der Acetylgruppe in **10** konnte eindeutig durch das NMR-Spektrum festgelegt werden. Die Signale der Protonen an C-7 und C-6 zeigten im Vergleich zu **2** eine starke chemische Verschiebung zu niedrigeren Feldstärken, während die Signal-lage der Protonen an C-5' konstant blieb.

**10** wurde durch 2-Cyan-äthylphosphat und DCCI phosphoryliert. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde 5-Hydroxymethyl-uridin-5'-phosphat (**11**) in 50-proz. Ausbeute isoliert. Der Nachweis, daß in **11** die 5'-OH-Gruppe phosphoryliert worden war, gelang durch oxydativen Abbau mit Natriumperjodat zum Dialdehyd **12**. Mit verdünntem Ammoniak wurde die Nucleobase abgespalten, die durch UV-Spektren und Papierchromatographie einwandfrei als 5-Hydroxymethyl-uracil identifiziert wurde. Das Zucker-Fragment und dessen Folgeprodukte wurden nicht näher untersucht.



5-Hydroxymethyl-uridin-5'-diphosphat wurde aus **11** durch Reaktion mit [2-Cyan-äthyl]- $\alpha$ -pyridyl-phosphat mit 45% Ausbeute (bez. auf **11**) erhalten.

Die dargestellten Nucleosid-5'-diphosphate **7**, **8** und 5-Hydroxymethyl-uridin-5'-diphosphat wurden durch Anionenaustauscherchromatographie, Papierelektrophorese

sowie Phosphatbestimmung charakterisiert und durch Polynucleotid-Phosphorylase aus *Acetobacter vinelandii* zu Polynucleotiden polymerisiert, worüber gesondert berichtet wird.

Prof. Dr. F. Cramer sei für die wohlwollende Unterstützung, Fräulein Ch. Beckers für fleißige Mitarbeit gedankt.

### Beschreibung der Versuche

UV-Spektren wurden mit den Geräten Zeiss PMQ II und Cary 14 aufgenommen. Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Fa. Reichert, Österreich) bestimmt und sind nicht korrigiert. Für die Säulenchromatographie wurde ein LKB-Fraktionssammler mit Uvicord UV-Analysator benutzt. Das Abdestillieren von Lösungsmitteln erfolgte im Rotationsverdampfer.

*Phosphoranalysen:* Nach der Methode von P. S. Chen und Mitarbb.<sup>7)</sup>

*Papierchromatographie:* Lösungsmittel: Isopropylalkohol/NH<sub>4</sub>OH(konz.)/H<sub>2</sub>O 7:1:2 (A), Isopropylalkohol/NH<sub>4</sub>OH(konz.)/H<sub>2</sub>O = 6:3:1 (B); Papier: Schleicher und Schüll 2043 b (gewaschen).

*Dünnschichtchromatographie:* Lösungsmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (C). Adsorbens: Kieselgel HF<sub>254</sub> (Merck). Für präparative Zwecke wurde Kieselgel PF<sub>254</sub> (Merck) benutzt. Die in diesen Fällen verwendeten Lösungsmittel sind jeweils in den Versuchsbeschreibungen angegeben.

*Papierelektrophorese:* In 0.05 m Ammoniumformiat (pH 3.5) an Whatman 3MM-Papier bei 17 Volt/cm.

2'.3'-O-Isopropyliden-uridin (1) war ein Produkt der Firma Zellstoff Waldhof (Mannheim). [2-Cyan-äthyl]- $\alpha$ -pyridyl-phosphat erhielten wir nach l. c.<sup>8)</sup>

5-Hydroxymethyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin (2): 10 mMol (2.84 g) 2'.3'-O-Isopropyliden-uridin (1) wurden in 20 ccm 0.5 n KOH mit 0.5 g Paraformaldehyd versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stdn. bei 50° gehalten, danach vorsichtig mit Ionenaustauscher Merck I (H<sup>+</sup>) neutralisiert und abfiltriert. Man wusch den Ionenaustauscher gründlich mit Methanol engte die vereinigten Filtrate zur Trockne ein und chromatographierte den Rückstand auf Silicagelplatten mit Chloroform/Methanol (95:5) so oft, bis die Substanzen sauber getrennt waren. Das Produkt wurde vom Silicagel mit Chloroform/Methanol (1:1) eluiert und das Eluat eingengt. Der Rückstand kristallisierte nach Anreiben mit wenig Wasser, Ausb. 2.66 g (85 %); Schmp. 171–172° (aus Wasser).

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{\max}$  263 m $\mu$  ( $\epsilon = 10200$ ),  $\lambda_{\min}$  232 ( $\epsilon = 3050$ ).

C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (314.0) Ber. C 49.86 H 5.77 N 8.92 Gef. C 50.06 H 6.15 N 8.52

5-Hydroxymethyl-uridin: Die Isopropylidengruppe konnte durch 2stdg. Kochen mit 50-proz. Essigsäure abgespalten werden. Nach Abdampfen der Essigsäure wurde der Rückstand aus Methanol/Äther umkristallisiert; Schmp. 167° (Lit.<sup>4)</sup>: 167–168°).

5-Methyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin (3): 10 mMol (3.14 g) 2 wurden in 110 ccm Eisessig in Gegenwart von 500 mg Platin(IV)-oxid bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Wasserstoff-Aufnahme wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat eingengt, der kristalline Rückstand in 2 n NH<sub>4</sub>OH gelöst und abermals eingengt. Nach präparativer Dünnschicht-

<sup>7)</sup> P. S. Chen, T. Y. Toribara und H. Warner, Analytic. Chem. **28**, 1756 (1956).

<sup>8)</sup> W. Kampe, Chem. Ber. **98**, 1031 (1965).

chromatographie an Silicagel mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (95:5) wurde die Substanz vom Silicagel mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) eluiert, das Eluat eingengt und der zurückbleibende Sirup durch Anreiben zur Kristallisation gebracht: 2.53 g (85%).

UV: in Methanol:  $\lambda_{\text{max}}$  266 m $\mu$  ( $\epsilon = 9570$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  235 ( $\epsilon = 2810$ ); in Wasser, pH 12:  $\lambda_{\text{max}}$  266,  $\lambda_{\text{min}}$  245 m $\mu$ ; in Wasser, pH 1:  $\lambda_{\text{max}}$  266,  $\lambda_{\text{min}}$  238 m $\mu$ ; in Wasser, pH 7:  $\lambda_{\text{max}}$  266 (9600),  $\lambda_{\text{min}}$  235 m $\mu$ .

*5-Methyl-uridin*: Nach 2stdg. Kochen mit 50-proz. *Essigsäure* und Abdampfen der *Essigsäure*; aus Methanol/Äther Schmp. 183° (Lit.<sup>3,4</sup>): 182–183°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$  (298.3) Ber. C 52.30 H 6.04 N 9.38 Gef. C 52.11 H 6.17 N 9.42

*3,5-Dimethyl-2'-3'-O-isopropyliden-uridin* (4): Zu 1 mMol (298 mg) **3** in 5 ccm Methanol wurden bei 0° 10 mMol *Diazomethan* in Äther gegeben. Nach beendeter Reaktion wurde zur Trockne eingengt und **4** wie oben durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silicagel mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (15:5) abgetrennt. Ausb. 268 mg (85%) kristallisierte Substanz.

UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon = 9280$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  235 ( $\epsilon = 3300$ );  $\lambda_{\text{max}}$  267 m $\mu$ , pH 7 und pH 12 (Wasser).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$  (321.3) Ber. C 52.16 H 6.57 N 8.69 Gef. C 52.06 H 6.80 N 8.45

*5-Methyl-uridin-5'-phosphat* (5): 1 mMol *Pyridinium-[2-cyan-äthylphosphat]* und 0.3 mMol (90 mg) *5-Methyl-2'-3'-O-isopropyliden-uridin* (**3**) wurden durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin bei 0.1 Torr wasserfrei gemacht. Man löste den gummiartigen Rückstand in 3 ccm Pyridin, gab 10 mMol (2.06 g) *Dicyclohexylcarbodiimid* zu, schüttelte zwei Tage bei Raumtemperatur und engte bei 0.1 Torr zur Trockne ein. Der Rückstand wurde gründlich mit Petroläther/Äther (1:1) extrahiert, das restliche Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende amorphe Pulver mit 10 ccm Dioxan/Wasser (1:1) aufgenommen. Vom ungelösten Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, das Filtrat eingengt und der Rückstand auf Silicagelplatten chromatographiert. Mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1) entfernte man das nicht phosphorylierte Nucleosid, trennte dann den 2-Cyan-äthylester von **5** mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (7:3) ab und eluierte diesen vom Silicagel mit Methanol. Das Eluat wurde eingengt, der Rest mit 10 ccm 50-proz. *Essigsäure* aufgenommen und 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde darauf zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 5 ccm 2*n* NaOH (Wasser/Methanol 1:1) 30 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt, die alkalische Lösung über 10 ccm Merck-I-Ionenaustauscher ( $\text{H}^\oplus$ ) in einer kleinen Säule filtriert und der Ionenaustauscher gründlich gewaschen, das Filtrat mit Triäthylamin neutralisiert und zur Trockne eingengt. Den Rückstand löste man in 5 ccm Methanol, gab 0.5 mMol (70 mg) *NaClO<sub>4</sub>* in wenig Methanol zu und fällte das *Dinatriumsalz des Nucleotides* mit Aceton/Äther (1:1). Der Niederschlag wurde nach einiger Zeit abzentrifugiert, zuerst mit Aceton/Äther (1:1), dann mit Äther gewaschen und i. Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet; Ausb. 70.5 mg (60%, bez. auf eingesetztes Nucleosid), chromatographisch und elektrophoretisch reines, farbloses, amorphes Pulver.

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{\text{max}}$  267,  $\lambda_{\text{min}}$  237 m $\mu$ .

$\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (418.2) Mol.-Gew. Gef. 410 (UV-spektroskop.)

P : 5-Methyl-uridin = 1.05:1

*3,5-Dimethyl-uridin-5'-phosphat* (6): Darstellung analog **5**, ausgehend von 3.8 mMol (1.19 g) **4**, 11.4 mMol *Pyridinium-[2-cyan-äthylphosphat]* und 32.5 mMol (6.7 g) *DCCI*. Das Nucleotid **6** enthielt zum Teil **5**, das durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose (3.5 × 45 cm) mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3 l Wasser im Mischgefäß, 3 l 0.15 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß) abgetrennt

wurde. Ausb. 1.02 g *Dinatriumsalz des Nucleotids* (67%, bez. auf **4**) nach Trocknen über  $P_2O_5$ .

$Na_2C_{11}H_{15}N_2O_9P \cdot 2H_2O$  (431.2) Ber. P 7.2 Gef. P 6.9

Mol.-Gew. 425 (UV-spektroskop.)

P : 3.5-Dimethyl-uridin = 0.95 : 1.0

UV (Wasser, pH 7 und 12):  $\lambda_{max}$  267,  $\lambda_{min}$  237 m $\mu$ .

*5-Methyl-uridin-5'-diphosphat* (**7**): 0.1 mMol (42 mg) *Dinatriumsalz von 5* wurde in wenig Wasser über eine Pyridin-Merck-I-Ionenaustauschersäule (10  $\times$  1 cm) filtriert. Die Säule wurde mit 50 ccm Pyridin/Wasser (1 : 1) gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden nach Zugabe von 3 ccm *Triäthylamin* zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin bei 35°/0.1 Torr wasserfrei gemacht. Zu dem sirupösen *Triäthylammoniumsalz* wurden 0.4 mMol (130 mg) *Cyclohexylammonium-(2-cyan-äthyl)- $\alpha$ -pyridyl-phosphat*] gegeben und die Mischung in 1 ccm Pyridin gelöst. Nach 4 Tagen wurde die Reaktionslösung mit 3 ccm 2 *n*  $NH_4OH$  versetzt, zur Trockene eingeeengt, der Sirup bei 0° in 3 ccm 2 *n*  $NaOH$  gelöst, die Lösung 30 Min. bei 0° gehalten, anschließend mit 3 ccm Wasser verdünnt und mit Merck-I-Ionenaustauscher ( $H^{\oplus}$ -Form) neutralisiert. Bei Erreichen des Neutralpunktes wurde sofort mit 2 *n*  $NH_4OH$  alkalisch gemacht, vom Ionenaustauscher abfiltriert und dieser gründlich mit Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden auf ein kleines Volumen eingeeengt, auf eine DEAE-Cellulosesäule (3.5  $\times$  50 cm, Hydrogencarbonatform) aufgegeben, die Säule mit Wasser gewaschen, bis die UV-Absorption des Filtrats bei 267 m $\mu$  vernachlässigbar war. Dann erfolgte Elution mit einem linearen Gradienten an *Triäthylammoniumhydrogencarbonat* (2 l 0.30 *m* [( $C_2H_5$ )<sub>3</sub> $NH$ ]HCO<sub>3</sub> im Vorratsgefäß, 3 l Wasser im Mischgefäß). Die 15-ccm-Fractionen, welche **7** enthielten, wurden vereingt und bei 15°/0.5 Torr zur Trockne eingedampft. Ausb. 485 OD (Optical Density)-Einheiten (267 m $\mu$ ) = 0.05 mMol (50%).

Verhältnis 5-Methyl-uridin : P = 1 : 2.08.

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{max}$  267,  $\lambda_{min}$  239 m $\mu$ .

Das *Triäthylammoniumsalz* wurde in Methanol mit 0.1 mMol (14 mg) *Natriumperchlorat* versetzt und das *Dinatriumsalz von 7* mit Aceton/Äther (1 : 1) ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch gewaschen und über  $P_2O_5$  getrocknet, amorphes Pulver.

$Na_2C_{10}H_{14}N_2O_{12} \cdot 5H_2O$  (490.3) Mol.-Gew. Gef. 480 (UV-spektroskop.)

Die Substanz war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

*3.5-Dimethyl-uridin-5'-diphosphat* (**8**): Die Darstellung von **8** erfolgte aus 0.1 mMol **6**, *Monotriäthylammoniumsalz*, und 0.4 mMol (130 mg) [*2-Cyan-äthyl*]- $\alpha$ -*pyridyl-phosphat*, *Cyclohexylammoniumsalz*, nach der für **7** angegebenen Vorschrift. Ausb. 500 OD (Optical Density)-Einheiten (267 m $\mu$ ) *Triäthylammoniumsalz* = 0.051 mMol (51%).

3.5-Dimethyl-uridin : P = 1 : 2.05.

UV (Wasser, pH 7 und 12):  $\lambda_{max}$  267,  $\lambda_{min}$  239 m $\mu$ .

Die Substanz war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

*5-Acetoxyethyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin* (**10**): 1.59 mMol (0.5 g) *5-Hydroxymethyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin* (**2**) wurden in 20 ccm Eisessig, 1 ccm 1.2-Dimethoxy-propan und 0.1 ccm *Trifluoressigsäure* gelöst. Die Reaktionslösung wurde 30 Min. unter Feuchtigkeitsausschluß bei 50° gehalten. Danach wurde bei 0.1 Torr zur Trockne eingeeengt und der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silicagel mit  $CHCl_3/CH_3OH$  (97 : 3) getrennt. Neben Ausgangsmaterial und Nebenprodukten wurden 270 mg (54%) **10** in

Form eines farblosen, gummiartigen Rückstandes isoliert. Die Substanz konnte durch Anreiben mit Wasser zur Kristallisation gebracht werden. Schmp. (aus Wasser) 92–93°. Massenspektrum: Molekülion  $m/e$  356; Base +1  $m/e$  184.

$C_{15}H_{20}N_2O_8$  (356.3) Ber. C 50.55 H 5.66 N 7.89 Gef. C 50.91 H 5.80 N 8.12

*5-Hydroxymethyl-uridin-5'-phosphat* (**11**): Darstellung analog **5**, ausgehend von 1 mMol (356 mg) **10**, 4 mMol *Pyridinium-[2-cyan-äthylphosphat]* und 40 mMol (8.24 g) *DCCI*. Ausb. 217 mg (50%, bez. auf eingesetztes Nucleosid), chromatographisch und elektro-phoretisch reines, farbloses, amorphes Pulver.

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{max}$  264,  $\lambda_{min}$  234  $m\mu$ .

$Na_2C_{10}H_{13}N_2O_{11}P \cdot 2H_2O$  (434.2) Mol.-Gew. Gef. 440 (UV-spektroskop.)

P: 5-Hydroxymethyl-uridin = 1 : 1

*5-Hydroxymethyl-uridin-5'-diphosphat* erhielten wir aus 0.1 mMol **11**, *Monotriäthylammoniumsalz*, und 0.4 mMol (130 mg) *[2-Cyan-äthyl]- $\alpha$ -pyridyl-phosphat*, *Cyclohexylammoniumsalz*, nach der für **7** angegebenen Vorschrift. Ausb. 450 OD-Einheiten (264  $m\mu$ ) *Triäthylammoniumsalz* = 0.045 mMol (45%). Die Substanz war chromatographisch und elektro-phoretisch einheitlich.

5-Hydroxymethyl-uridin : P = 1 : 2.20.

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{max}$  264,  $\lambda_{min}$  232  $m\mu$ .

*Oxydativer Abbau von 11*: 1.4  $\mu$ Mol **11** wurden in 0.4 ccm Wasser (pH 7) mit 0.02 ccm 0.1 *m NaJO<sub>4</sub>*-Lösung versetzt. Nach 5 Stdn. wurden 0.2 ccm  $NH_4OH$ (konz.) zugegeben. Man ließ 8 Tage bei Raumtemperatur stehen, engte dann auf ein kleineres Volumen ein und chromatographierte quantitativ in Lösungsmittel A. Die Reaktionslösung enthielt nur eine UV-aktive Substanz mit  $R_F$  0.36. Durch Vergleich mit 5-Hydroxymethyl-uracil ( $R_F$  0.37) und Uracil ( $R_F$  0.42) sowie anhand der UV-Spektren konnte die Verbindung als *5-Hydroxymethyl-uracil* identifiziert werden.

UV (Wasser, pH 7):  $\lambda_{max}$  261,  $\lambda_{min}$  235  $m\mu$ ; pH 12:  $\lambda_{max}$  284,  $\lambda_{min}$  247  $m\mu$ .

Tab. 1. Papierchromatographie und Papierelektrophorese

|  | $R_F$ -Wert in Lösungsmittel |      | Elektro-phorese *) |
|--|------------------------------|------|--------------------|
|  | B                            | C    |                    |
| 2'.3'- <i>O</i> -Isopropyliden-uridin ( <b>1</b> )                   |                              | 0.46 |                    |
| 5-Hydroxymethyl-2'.3'- <i>O</i> -isopropyliden-uridin ( <b>2</b> )   |                              | 0.33 |                    |
| 5-Methyl-2'.3'- <i>O</i> -isopropyliden-uridin ( <b>3</b> )          |                              | 0.50 |                    |
| 5-Acetoxy-methyl-2'.3'- <i>O</i> -isopropyliden-uridin ( <b>10</b> ) |                              | 0.60 |                    |
| Uridin-5'-phosphat   | 0.25                         |      | 1.0                |
| Uridin-5'-diphosphat   |                              |      | 1.50               |
| 5-Methyl-uridin-5'-phosphat ( <b>5</b> )                             | 0.27                         |      | 1.0                |
| 5-Methyl-uridin-5'-diphosphat ( <b>7</b> )                           |                              |      | 1.48               |
| 5-Hydroxymethyl-uridin-5'-phosphat ( <b>11</b> )                     | 0.23                         |      | 0.92               |
| 5-Hydroxymethyl-uridin-5'-diphosphat                                 |                              |      | 1.43               |
| 3.5-Dimethyl-uridin-5'-phosphat ( <b>6</b> )                         | 0.46                         |      | 1.08               |
| 3.5-Dimethyl-uridin-5'-diphosphat ( <b>8</b> )                       |                              |      | 1.43               |
| 3.5-Dimethyl-2'.3'- <i>O</i> -isopropyliden-uridin ( <b>4</b> )      |                              |      | 0.76               |

\*) Die Beweglichkeit von Uridin-5'-phosphat im elektrischen Feld wurde gleich eins gesetzt.

Tab. 2. NMR-Signale von 5-Hydroxymethyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin (**2**) und 5-Acetoxy-methyl-2'.3'-O-isopropyliden-uridin (**10**). Werte in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan (innerer Standard) = 10 ppm; Lösungsmittel (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; Gerät Perkin Elmer

| Verbindung | Protonen an |          |             |           |      | C-6  |
|------------|-------------|----------|-------------|-----------|------|------|
|            | C-1'        | C-7 (2H) | C-2' + C-3' | C-5' (2H) | C-4' |      |
| <b>2</b>   | 4.05        | 5.78     | 5.10        | 6.35      | 5.85 | 2.19 |
| <b>10</b>  | 4.05        | 5.21     | 5.09        | 6.35      | 5.83 | 1.89 |

[265/66]