

Eckard Wittenburg, Gerhard Etzold und Peter Langen

## Thymin-nucleoside der 2-Desoxy-D-xylopyranose

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Rostock und dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch (Eingegangen am 7. August 1967)

1-Chlor-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-D-xylopyranose (**2**) reagiert sowohl mit 2,4-Bis-*O*-trimethylsilyl-thymin (**1**) in Gegenwart von  $\text{AgClO}_4$  oder  $\text{HgO}/\text{HgBr}_2$  als auch mit Monoquecksilberthymin (**3**) in Dimethylformamid zu einem Gemisch acetylierter Nucleoside, aus dem nach Entacetylierung durch Säulenchromatographie 1-[2-Desoxy- $\alpha$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\alpha$ -**6**) und sein  $\beta$ -Anomer ( $\beta$ -**6**) isoliert werden können.

Vor wenigen Jahren berichteten Langen und Etzold<sup>1)</sup> über eine starke, kompetitive Hemmung der Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase (EC 2.4.2.3) durch 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymin. Die Thymin-nucleoside verschiedener anderer Glykopyranosen erwiesen sich dagegen als unwirksam: 1- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-thymin<sup>1)</sup>, 1-L-Arabopyranosyl-thymin<sup>1)</sup>, die beiden anomeren 1-[2-Desoxy-D-ribopyranosyl]-thymine<sup>2)</sup>, 1-[3-Desoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosyl]-thymin<sup>3)</sup>, 1-[2-Desoxy-D-allopyranosyl]-thymin<sup>4)</sup> und 1-Digitoxosyl-thymin<sup>4)</sup>. 1-D-Xylopyranosyl-thymin besitzt eine schwache Hemmwirkung<sup>1)</sup>, die durch die Einführung einer 2'-Desoxy-Gruppe, bei der 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymin resultiert, stark erhöht wird<sup>5)</sup>. Über die Synthese der anomeren 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymine soll im folgenden berichtet werden.

Die zur Darstellung eingesetzte 1-Chlor-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-D-xylopyranose (**2**) erhielten wir durch Anlagerung von Chlorwasserstoff an 3,4-Di-*O*-acetyl-D-xylal in Benzol bei 0°. Das Auftreten verschiedener Reaktionsprodukte bei der Nucleosidkondensation läßt jedoch darauf schließen, daß diese Reaktion kein einheitliches **2** ergibt. Der rohe Halogenzucker **2** wurde trotzdem ohne weitere Reinigung auf zwei verschiedenen Wegen zu den Nucleosid-Derivaten  $\alpha/\beta$ -**5** umgesetzt:

*Methode A:* Reaktion mit 2,4-Bis-*O*-trimethylsilyl-thymin (**1**)<sup>6-8)</sup> in Gegenwart verschiedener Katalysatoren<sup>6,9)</sup>.

1) P. Langen und G. Etzold, *Biochem. Z.* **339**, 190 (1963).

2) G. Etzold und P. Langen, *Naturwissenschaften* **53**, 178 (1966).

3) E. Wittenburg, *Z. Chem.* **7**, 13 (1967).

4) M. Zimmerman, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **16**, 600 (1964).

5) G. Etzold, B. Preußel und P. Langen, 3. Jahrestagung der Biochemischen Gesellschaft der DDR, Suhl 1966, Vorabdruckband S. 56, und Symposium über Chemische Modifizierung von Nucleinsäuren und ihren Komponenten, Moskau 1967, Kurzreferat, im Druck.

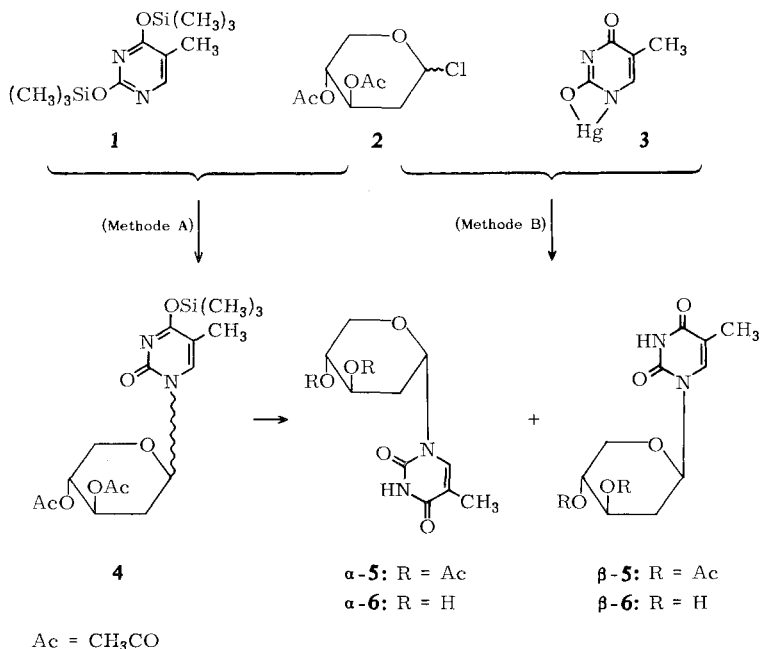
6) E. Wittenburg, *Z. Chem.* **4**, 303 (1964).

7) E. Wittenburg, *Chem. Ber.* **99**, 2380 (1966).

8) T. Nishimura und I. Iwai, *Chem. pharmac. Bull. [Tokyo]* **12**, 352 (1964), *C. A.* **60**, 15967 (1964).

9) E. Wittenburg, Habilitationsschrift, Univ. Rostock 1966.

*Methode B:* Kondensation mit Monoquecksilberthymin (**3**)<sup>10)</sup> in Dimethylformamid.



### A. Nucleosidsynthese mit Silyl-thymin **1**

Bei der systematischen Untersuchung der Reaktion von Halogenzuckern mit verschiedenen Silyl-pyrimidinen hatten sich zwei Varianten als besonders günstig und schonend erwiesen<sup>6,9)</sup>: Umsetzung in Benzol bei Raumtemperatur in Gegenwart von Silberperchlorat (Methode A1) oder bei 50–100° in Gegenwart von HgO/HgBr<sub>2</sub> (Methode A2).

Die Umsetzung von **1** mit **2** ergibt nach beiden Methoden in exothermer Reaktion zunächst das Anomerengemisch des blockierten Nucleosids **4**, das bereits beim Aufarbeiten (Zugabe von wenig Äthanol und Ausschütteln mit Chloroform/Wasser) zu dem rohen Gemisch der acylierten Nucleoside  $\alpha$ -**5**/ $\beta$ -**5** hydrolysiert. Dieses Gemisch zeigt keine Neigung zur Kristallisation und wird daher ohne weitere Reinigung mit Natriummethylat in Methanol entacetyliert. In dem erhaltenen Rohprodukt lassen sich papier- und dünnschichtchromatographisch vier verschiedene Substanzen nachweisen. Freies Thymin, freier Zucker und *O*-Glykoside werden dagegen nicht gefunden. Durch Säulenchromatographie an Cellulose kann das Gemisch in 3 Fraktionen zerlegt werden. Die zweite und dritte Fraktion enthält 1-[2-Desoxy- $\alpha$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\alpha$ -**6**) bzw. 1-[2-Desoxy- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\beta$ -**6**), die nach Umkristallisieren in reiner Form vorliegen. Aus der ersten Fraktion wird ein weiteres, nicht näher untersuchtes nucleosidähnliches Substanzgemisch in amorpher Form isoliert, das nicht kristallisiert.

<sup>10)</sup> M. Hoffer, Chem. Ber. **93**, 2777 (1960).

## B. Synthese nach dem Quecksilberverfahren

Für die Synthese von Pyrimidin-*N*-1-nucleosiden mit den relativ empfindlichen 2-Desoxy-halogenosen haben sich sowohl in der furanoiden<sup>11)</sup> als auch in der pyranoiden Reihe, hier speziell für die Darstellung von verschiedenen Pyrimidin-nucleosiden der 2-Desoxy-D-glucopyranose<sup>12)</sup> sowie von Thymin-nucleosiden der 2-Desoxy-D-<sup>2,13)</sup> und 2-Desoxy-L-ribopyranose<sup>13)</sup>, Quecksilberpyrimidine mit einem Quecksilber/Pyrimidin-Verhältnis von 1:1 bewährt. Für die Kondensation mit **2** schien deshalb Monoquecksilberthymin (**3**) besonders geeignet. Bei der Umsetzung in Dimethylformamid bei Raumtemperatur bildet sich in exothermer Reaktion ein Gemisch acetylgeschützter Nucleoside, das ohne vorherige Auftrennung mit ammoniakgesättigtem Methanol entacetyliert wird. Nach dem Dünnschichtchromatogramm enthält das Rohprodukt 4 UV-absorbierende Substanzen, die in ihren  $R_F$ -Werten und Mengenverhältnissen mit den Komponenten des nach Methode A erhaltenen Nucleosidgemisches übereinstimmen. Zur Abtrennung von nicht umgesetzten Zuckerbestandteilen und zur Vortrennung der Nucleoside wird das Gemisch zunächst an Celite chromatographiert. Aus der ersten UV-absorbierenden Hauptfraktion läßt sich wie bei Methode A ein nicht näher untersuchtes Gemisch zweier (kristalliner) Produkte mit Nucleosideigenschaften isolieren. Die zweite Hauptfraktion enthält die beiden anomeren 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymine ( $\alpha$ -**6**/ $\beta$ -**6**), die sich durch erneute Verteilungschromatographie an Cellulose voneinander trennen und in reiner Form gewinnen lassen.

Wegen des Fehlens einer 2-Acyloxy-Gruppe im Zuckermolekül war bei beiden Methoden das Auftreten der anomeren 2'-Desoxy-D-xylopyranosyl-thymine ( $\alpha$ -**6** und  $\beta$ -**6**) zu erwarten (*Tipson-Baker-Regel*<sup>14,15)</sup>). Die Gesamtausbeute an reinem  $\alpha$ -**6** und  $\beta$ -**6** beträgt bei der Silylestermethode etwa 25% (bez. auf eingesetztes Thymin), nach dem Quecksilberverfahren ca. 15%<sup>16)</sup>; das  $\alpha$ / $\beta$ -Verhältnis beträgt bei Methode A 1 und B etwa 1, bei Methode A 2 dagegen 1.5.

Die bei allen 3 Synthesemethoden (A 1, A 2, B) entstandenen beiden nicht identifizierten nucleosidähnlichen Verbindungen überwiegen mengenmäßig im Vergleich zu **6** und sind den größeren  $R_F$ -Werten zufolge weniger polar als  $\alpha$ -**6** und  $\beta$ -**6**. Das Gemisch besitzt das für Thymin-*N*-1-nucleoside charakteristische UV-Spektrum, ist rechtsdrehend und im Gegensatz zu  $\alpha$ / $\beta$ -**6** gegen Perjodat beständig. Da eine nachträgliche Umwandlung von  $\alpha$ -**6** und  $\beta$ -**6** unter den angewandten Synthesebedingungen wenig wahrscheinlich ist, beruht die Entstehung jener Verbindungen vermutlich auf einer partiellen Umwandlung des Diacetyl-xylals oder des Halogenzuckers **2** zu einem anderen, ebenfalls kupplungsfähigen Zucker-Derivat vor oder auch bei der Nucleosidkondensation.

<sup>11)</sup> Vgl. *T. L. V. Ulbricht* und *G. T. Rogers*, *J. chem. Soc. [London]* **1965**, 6125, 6130, und dort aufgeführte Literatur.

<sup>12)</sup> *G. Etzold* und *P. Langen*, *Chem. Ber.* **98**, 1988 (1965).

<sup>13)</sup> *G. Etzold*, *R. Hintsche* und *P. Langen*, *Chem. Ber.* **101**, 226 (1968).

<sup>14)</sup> *R. S. Tipson*, *J. biol. Chemistry* **130**, 55 (1939).

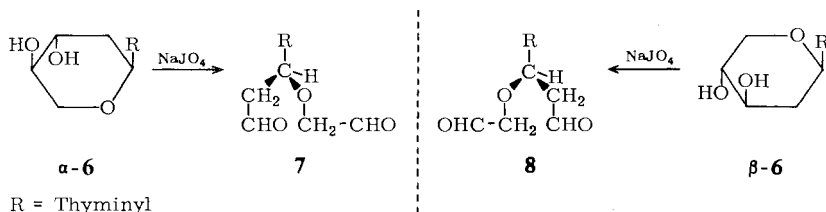
<sup>15)</sup> *B. R. Baker*, *J. P. Joseph*, *R. E. Schaub* und *J. H. Williams*, *J. org. Chemistry* **19**, 1786 (1954); *B. R. Baker* in *E. W. Westenhalm* und *C. M. O'Connor*, *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of the Purines*, S. 120, Verlag Churchill, London 1957.

<sup>16)</sup> Bezogen auf **2** beträgt die Ausbeute nach Methode B 5–7.5%, da hierbei Pyrimidin/Halogenzucker im Molverhältnis 1:2 bzw. 1:3 eingesetzt werden; bei Methode A ist dieses Molverhältnis 1:1.

## Strukturaufklärung

Die Struktur von  $\alpha$ -6 und  $\beta$ -6 ergibt sich aus den UV-Spektren, dem Perjodatverbrauch und dem Vergleich der spezifischen Drehungen der Perjodat-Abbauprodukte mit denen, die bei der Perjodatoxydation der strukturell gesicherten anomeren Thymin-2'-desoxy-ribopyranoside<sup>9,13)</sup> erhalten wurden.

Wie aus früheren Versuchen<sup>3,6,7,9)</sup> hervorgeht, wird Thymin über seinen Silylester **1** leicht partiell an N-1 alkyliert oder glykosidiert; auch bei der Quecksilber-Methode werden vorwiegend N-1-Glykoside erhalten<sup>17)</sup>. Die UV-Spektren im neutralen und alkalischen pH-Bereich zeigen, daß auch in  $\alpha$ -6 und  $\beta$ -6 der Zuckerrest über N-1 an den Pyrimidinring gebunden ist. In Übereinstimmung mit der Theorie verbrauchen  $\alpha$ -6 und  $\beta$ -6 je ein Mol *Perjodat*; Ameisensäure wird nicht gebildet. Die entstehenden Dialdehyde **7** und **8** sind Spiegelbildisomere, da sie nur noch ein gemeinsames Asymmetriezentrum besitzen. Die gleichen Dialdehyde entstehen auch bei der Oxydation der anomeren 1-[2-Desoxy-D-ribopyranosyl]-thymine<sup>9,13)</sup>, so daß man die Konfiguration an C-1' bereits auf Grund der spezifischen Drehung nach der Perjodatoxydation zuordnen kann.



Die absolute Konfiguration an C-1' der 1-[2-Desoxy-D-ribopyranosyl]-thymine hingegen konnte aus den NMR-Spektren<sup>9)</sup> und der optischen Rotationsdispersion<sup>2, 9)</sup> abgeleitet und durch die Überführbarkeit nur eines der beiden entsprechenden anomeren 3'.4'-Di-O-mesyl-Derivate<sup>2,13)</sup> bzw. 3'.4'-O-Carbonate in ein O2,3'-Cyclonucleosid eindeutig bewiesen werden<sup>18)</sup>. Diese Reaktion ist aus sterischen Gründen nur bei  $\beta$ -Konfiguration möglich.

Bei der *optischen Rotationsdispersion* zeigt  $\alpha$ -6 einen negativen,  $\beta$ -6 einen positiven Cotton-Effekt (s. Tab. 1). Mit Ausnahme von  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-thymin<sup>19)</sup> verhalten sich alle bisher untersuchten anomeren Pyrimidin-nucleoside analog<sup>19-21)</sup>.

Die beiden anomeren 2'-Desoxy-D-xylopyranosyl-thymine gehorchen ebenso wie die 2'-Desoxy-D-ribopyranosyl-thymine<sup>2,9,13)</sup> nicht den Hudsonschen Isorotationsregeln. Die  $\beta$ -Form ist in beiden Fällen die stärker rechtsdrehende Verbindung.

Bei der papier-, dünn- und säulenchromatographischen Trennung zeigen die beiden Paare jedoch Unterschiede. Während in allen zur Trennung geeigneten Lösungsmittelgemischen  $\alpha$ -6 schneller wandert als  $\beta$ -6 (s. Tab. 2), hat 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribopyranosyl-thymin einen größeren  $R_F$ -Wert als die  $\alpha$ -Verbindung<sup>9,13)</sup>.

17) J. J. Fox und I. Wempfen, *Advances Carbohydrate Chem.* **14**, 283 (1959).

18) G. Etzold, R. Hintsche und P. Langen, 21<sup>st</sup> International Congress of Pure and Applied Chemistry, Prag 1967, Abstracts of Papers, N-29.

19) D. Frič, J. Šmejkal und J. Farkaš, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 75.

20) T. L. V. Ulbricht, J. P. Jennings, P. M. Scopes und W. Klyne, *Tetrahedron Letters* [London] **1964**, 695.

21) T. L. V. Ulbricht, T. R. Emerson und R. J. Swan, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **19**, 643 (1965).

Tab. 1. ORD-Meßergebnisse

Verbindung	$\lambda_1^{a)}$ (nm)	$[\Phi]_1$	$\lambda_2^{a)}$ (nm)	$[\Phi]_2$	$a^{b)}$
$\alpha$ -6	295	-1650	267	+1400	-31
$\beta$ -6	287	+1020	260	-1750	+28

<sup>a)</sup> Index 1 bezieht sich auf den ersten, Index 2 auf den zweiten Extremwert.

<sup>b)</sup>  $a$  = Molekularamplitude.

Mit Borsäure-Spray nach *Pöhm* und *Weiser*<sup>22)</sup> gibt weder  $\alpha$ -6 noch  $\beta$ -6 auf Papier eine Farbreaktion, während von den anomerer 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thyminen die  $\alpha$ -Form spezifisch eine Rotfärbung zeigt<sup>12)</sup>.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Paulsen, Hamburg, sei für die Durchführung der ORD-Messungen besonders herzlich gedankt.

## Beschreibung der Versuche

Sämtliche Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach *Boëtius* bestimmt und sind korrigiert. Die *spezifischen Drehungen* wurden visuell mit dem Kreispolariometer bestimmt.

Die *papierchromatographischen* Untersuchungen wurden mit dem Papier von Schleicher & Schüll 2043 bmgI nach der Keilstreifenmethode<sup>23)</sup> durchgeführt. Die erhaltenen *R<sub>F</sub>*-Werte sind Tab. 2 zu entnehmen. Zur *Dünnschichtchromatographie* wurde Cellulosepulver MN 300<sup>24)</sup> oder Kieselgel HF<sub>254</sub> (E. Merck, Darmstadt), aktiviert bei 110°, verwendet. Die Lage der Flecke ermittelten wir mit Hilfe der UV-Analysenlampe HNU 6<sup>25)</sup> durch Vorschalten des Filters UG 5<sup>26)</sup>.

Die Prüfung auf freie Zucker wurde mit Anilinchthalat durchgeführt. Zur Prüfung auf *O*-Glykoside nach *Miles*<sup>27)</sup> wurde eine kleine Probe des rohen acetylierten Nucleosidgemisches mit halbkonz. Salzsäure 16 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. *O*-Glykoside werden unter diesen Bedingungen quantitativ in Thymin und Zucker gespalten (Nachweis durch Papierchromatographie); *N*-Glykoside sind jedoch in der *N*-glykosidischen Bindung beständig und ergeben die entacetylierten Nucleoside.

### Lösungsmittel zur Chromatographie

A = Isobutanol/Wasser (86 : 14); B = Butanol/Wasser (86 : 14); C = Essigsäure-äthylester, gesättigt mit 3proz. Essigsäure; D = Butanol/Wasser (86 : 14) + 5% konz. Ammoniak; E = Isopropylalkohol/Wasser/konz. Ammoniak (16 : 4 : 1); F = Isobutanol/Wasser/konz. Ammoniak (85 : 13 : 2); G = Essigsäure-äthylester/Isopropylalkohol/Wasser (2n : 1 : n, n = 1 bis 10); H = Butanon/Isopropylalkohol/konz. Ammoniak (5 : 1 : 1).

### Säulenchromatographie

Cellulosepulver Schleicher & Schüll 123 wurde mit Isobutanol/Wasser (86 : 14) in der üblichen Weise<sup>28)</sup> in eine Säule von 4 cm Durchmesser eingeschlämmt. Die Substanzen eluiert man mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch unter leichtem Überdruck. Es wurden

<sup>22)</sup> *M. Pöhm* und *R. Weiser*, *Naturwissenschaften* **24**, 582 (1956).

<sup>23)</sup> *W. Matthias*, *Naturwissenschaften* **41**, 17 (1954); **43**, 353 (1956).

<sup>24)</sup> Hersteller: Firma Macherey, Nagel & Co., Düren, Westf.

<sup>25)</sup> Hersteller: VEB Berliner Glühlampenwerk.

<sup>26)</sup> Hersteller: VEB Jenaer Glaswerke Schott & Gen.

<sup>27)</sup> *T. Miles*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2565 (1957).

<sup>28)</sup> *R. L. Whistler* und *J. N. BeMiller* in *R. L. Whistler* und *M. L. Wolfrom*, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, S. 47, Academic Press, New York 1962.

Tab. 2.  $R_F$ -Werte<sup>a)</sup> bei der papierchromatographischen Untersuchung

Verbindung	Lösungsmittelsystem					
	A	B	C	D	E	F
Thymin	60	52	45	42	—	49
$\alpha$ -6	56	51	25	45	64	47
$\beta$ -6	44	41	25	34	54	36

<sup>a)</sup> Die  $R_F$ -Werte sind mit 100 multipliziert.

Fractionen zu 10 ccm aufgefangen und entweder durch Tüpfeln auf Filterpapier und anschließendes Bestrahlen mit der UV-Analysenlampe HNU 6 oder durch kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 254 nm mit dem Uvicord (LKB-Produkte, Stockholm) auf Nucleosidgehalt geprüft. Die Untersuchung der UV-aktiven Fractionen auf Einheitlichkeit erfolgte papier- und dünn-schichtchromatographisch.

#### Spektren

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer DU 4700 bzw. DK-2 gemessen. Zur Messung der optischen Rotationsdispersion wurde das Gerät Cary 60 verwendet. Konzentration der Lösungen: 0.05 mg/cm. Alle Messungen erfolgten bei ca. 20°.

#### Perjodatoxydation

Zur jodometrischen Bestimmung des Perjodatverbrauchs wurde die in der Literatur<sup>29)</sup> beschriebene Methodik verwendet. Nach Zusatz von 3proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Zugabe von 10proz. NaJ-Lösung erfolgte die Titration des freigesetzten Jods mit 0.1 n As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Da die jodometr. Bestimmung des Perjodatverbrauchs von pyranoiden 2'-Desoxy-nucleosiden durch Reaktion des freigesetzten Jods mit dem entstandenen Nucleosid-dialdehyd gestört sein kann<sup>13, 29)</sup>, wurde die Abnahme der Perjodatkonzentration auch nach der an anderer Stelle beschriebenen Methodik<sup>13)</sup> UV-spektroskopisch verfolgt.

Zur Bestimmung der spezifischen Drehung des bei der Oxydation gebildeten Dialdehyds wurden 25 mg Substanz in einen 5-ccm-Meßkolben eingewogen und mit 0.25 n NaJO<sub>4</sub> bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach 20 Stdn. wird die Drehung gemessen und auf die theoretisch zu erwartende Aldehydmenge umgerechnet.

*1-[2-Desoxy- $\alpha$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\alpha$ -6) und 1-[2-Desoxy- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\beta$ -6)*

#### Methoden A1

Eine Lösung von 2 g (10 mMol) 3,4-Di-O-acetyl-D-xylal<sup>30)</sup> in 10 ccm absol. Benzol wird bei 0° mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt und 1 Stde. verschlossen aufbewahrt. Dann wird i. Vak. bei 30° eingengt, der Rückstand 3 mal mit 5 ccm absol. Benzol versetzt und erneut eingengt. Die erhaltene rohe Halogenose 2 wird schließlich in 5–10 ccm absol. Benzol gelöst.

Zu einer Lösung von 2.70 g (10 mMol) 2,4-Bis-O-trimethylsilyl-thymin (1)<sup>6-8)</sup> in 5 ccm absol. Benzol gibt man die zuvor beschriebene Lösung des Halogenzuckers 2. Unter Umschütteln, Eiskühlung und strengem Feuchtigkeitsausschluß versetzt man dann mit einer Lösung von 2.07 g (10 mMol) Silberperchlorat in Benzol (das Perchlorat war durch azeotrope Destillation mit Benzol getrocknet). Unter Erwärmung fällt sofort AgCl aus. Man läßt bei Raumtemp. im Dunkeln 15 Min. stehen, gibt zu der dunkelgefärbten Lösung 2 ccm Äthanol und reichlich (100–150 ccm) Chloroform, filtriert vom Unlöslichen ab und extrahiert die Chloroform-

<sup>29)</sup> A. J. Cleaver, A. B. Foster, E. J. Hedgley und W. G. Overend, J. chem. Soc. [London] 1959, 2578.

<sup>30)</sup> F. Weygand in l. c. 28), S. 184.

lösung nacheinander mit Wasser, gesätt.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser (je 30 ccm). Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird i. Vak. zu einem klaren Sirup eingengt, der in wenig (10 ccm) absol. Benzol gelöst und unter kräftigem Schütteln in einem Guß mit 100 ccm Petroläther ( $30-50^\circ$ ) versetzt wird. Das ausgeschiedene amorphe Pulver wird abfiltriert und getrocknet. Ausb. an rohem acetyliertem Nucleosid (**5**): 2.70 g (80%).

1.35 g werden zur Entacetylierung in 15 ccm absol. Methanol gelöst und mit 4 ccm *In NaOCH<sub>3</sub>* 16 Std. bei Raumtemp. aufbewahrt. Man versetzt mit der gleichen Menge Wasser, neutralisiert mit Kationenaustauscher KPS 200 ( $\text{H}^\ominus$ -Form), filtriert, erhitzt mit Aktivkohle und engt i. Vak. ein. Der sirupöse Rückstand (0.91 g) enthält nach dem Papierchromatogramm 3–4 UV-absorbierende Substanzen. *O*-Glykosid, freies Thymin und freier Zucker können nicht nachgewiesen werden.

Zur Trennung und Reinigung löst man das Gemisch in wenig Lösungsmittel A und chromatographiert an 300 g Cellulose, wie für die Säulenchromatographie beschrieben. Die Fraktionen 65–79 werden vereinigt und i. Vak. eingengt. Man nimmt den sirupösen Rückstand in Äthanol auf, behandelt mit Aktivkohle, engt erneut ein und erhält als erstarrten Schaum 292 mg eines nicht näher identifizierten Gemisches nucleosidartiger Verbindungen,  $R_F$  (A): 0.78 (stark) und 0.87 (schwach). Die Fraktionen 81–91 werden ebenfalls vereinigt und i. Vak. eingedampft. Der farblose Schaum (235 mg) wird in Äthanol mit Aktivkohle erhitzt, das Filtrat eingedampft und aus sehr wenig Isopropylalkohol unter Zusatz von etwas Äther kristallisiert. Nach Umkristallisation aus Isopropanol/Äther gewinnt man 143 mg (12%, bez. auf **1**) reines  $\alpha$ -6.

Die Fraktionen 92–96 bestehen aus dem Gemisch von  $\alpha$ , $\beta$ -Verbindung. Die Fraktionen 97–120 ergeben nach Eindampfen 225 mg farbloses Kristallpulver, aus dem durch Umkristallisieren aus wenig Isopropylalkohol 157 mg (13%, bez. auf **1**) reines  $\beta$ -6 gewonnen werden.

#### Methode A2

2.70 g (10 mMol) **1** und 5 ccm absol. Benzol werden mit einer frisch hergestellten Lösung des *Halogenzuckers 2* (s. o.) in absol. Benzol versetzt. Dazu gibt man unter Feuchtigkeitsschluss eine durch azeotrope Destillation getrocknete Suspension von 2.0 g gelbem *Quecksilberoxid* und 2.0 g  $\text{HgBr}_2$  in Benzol, läßt 16 Std. unter gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemp. stehen und erhitzt noch 5 Std. bei  $80-100^\circ$  unter Rückfluß. Nach Zusatz von wenig Äthanol (2 ccm) und reichlich Chloroform (150 ccm) wird von den unlöslichen Salzen abfiltriert. Die farblose Lösung wird nacheinander mit wäßrigen Lösungen von NaCl, KJ (5proz.) sowie  $\text{NaHCO}_3$  (gesätt.) und anschließend mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Verdampfen der Lösungsmittel i. Vak. wird der farblose Sirup in 10 ccm absol. Benzol aufgenommen und mit Petroläther ( $30-50^\circ$ ) das rohe acetylierte Nucleosid als amorphes Pulver (2.85 g, 88%) gefällt. Es enthält wie das nach Methode A1 dargestellte Produkt vier verschiedene nucleosidartige Substanzen, jedoch kein freies Thymin; auch freier Zucker und *O*-Glykoside sind nicht nachweisbar.

1.35 g werden, wie bei Methode A1 beschrieben, entacetyliert, aufgearbeitet und säulenchromatographisch getrennt. Man gewinnt 380 mg unbekanntes Nucleosidgemisch, 255 mg rohes  $\alpha$ -6, das nach Umkristallisieren 169 mg (15%, bez. auf **1**) analysenreines  $\alpha$ -6 ergibt, und 156 mg rohes  $\beta$ -6, das zu 117 mg (10%, bez. auf **1**) reinem  $\beta$ -6 umkristallisiert wird.

#### Methode B

6 g (30 mMol) *3,4-Di-O-acetyl-D-xylal*<sup>30)</sup> werden mit trockenem *Chlorwasserstoff*, wie bei Methode A1 beschrieben, zur Halogenose **2** umgesetzt und in 10 ccm absol. Benzol aufgenommen. Eine Suspension von 3.2 g (10 mMol) *Monoquecksilberthymin (3)*<sup>10)</sup> in 35 ccm Dimethylformamid und 10 ccm Toluol wird durch Abdestillieren des Toluols bei Normaldruck unter Rühren azeotrop entwässert und nach dem Erkalten *auf einmal* mit der *Halogenose*-Lösung

versetzt. Unter Selbsterwärmung bildet sich rasch eine fast klare Lösung, die 2 Stdn. unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt und dann filtriert wird. Nach Verdünnung mit 70 ccm Chloroform und Extraktion der Quecksilber-Ionen mit 160 ccm 15proz. KJ-Lösung wird die organische Phase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das rohe Nucleosidgemisch wird zur Entacetylierung mit 40 ccm *ammoniak*-gesättigtem Methanol über Nacht bei Raumtemp. verschlossen aufbewahrt und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Das zurückbleibende Öl wird mit 5 ccm unterer Phase von Lösungsmittelsystem G ( $n = 10$ ) aufgenommen und mit 10 g Celite 535<sup>31)</sup> gleichmäßig verrieben. Das Gemisch wird auf eine Chromatographiesäule (Durchmesser 4.3 cm) aufgestampft, die nach früher beschriebener Methodik<sup>12)</sup> mit 500 g Celite 535 und 150 ccm unterer Phase von G gepackt wurde. Eluiert wird nacheinander mit der oberen Phase von G in den Mischungsverhältnissen  $n = 10$  (500ccm),  $n = 5$  (500ccm),  $n = 3$  (500ccm) und  $n = 1.5$ .

Die vereinigten Fraktionen 18–55 (20ccm/Fraktion) hinterlassen beim Einengen ein nicht identifiziertes kristallines Nucleosidgemisch (ca.  $\frac{2}{3}$  der UV-absorbierenden Gesamtmenge): auf Kieselgel  $R_F$  (H) 0.38 und 0.43 (gleich stark).

Der Rückstand der i. Vak. eingeeengten Fraktionen 80–95 ( $\alpha/\beta$ -6) wird, wie unter Säulenchromatographie beschrieben, an 600 g Cellulosepulver in die Anomeren aufgetrennt. Der Eindampfrückstand der Cellulosesäule-Fraktionen 166–177 ( $\alpha$ -6), der nach dem Abtreiben von Lösungsmittelresten mit etwas absol. Äthanol und nach Zugabe von wenig Aceton beim Anreiben kristallisiert, liefert nach Umkristallisieren aus Aceton 170 mg (7%, bez. auf 3) reines  $\alpha$ -6. Aus den Fraktionen 181–187 lassen sich nach analoger Aufarbeitung und Umkristallisation aus Isopropylalkohol 190 mg (8%, bez. auf 3) reines  $\beta$ -6 gewinnen.

*1-[2-Desoxy- $\alpha$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\alpha$ -6)*: Farblose Kristalle aus Aceton oder Isopropylalkohol/Äther, Schmp. 226–229°, Misch-Schmp. mit  $\beta$ -6 200–208°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-20.3^\circ$  ( $c = 2.18$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). UV ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm ( $\epsilon = 9600$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  233 (2400),  $\epsilon_{260} = 9100$ ,  $E_{280}/E_{260} = 0.62$ ; in 0.1 *n* NaOH:  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm ( $\epsilon = 7400$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  245 (4800),  $E_{280}/E_{260} = 0.71$ .

Perjodatoxydation: 1.0–1.2 Mol Perjodatverbrauch, keine Bildung von Ameisensäure (nach 24 Stdn.); Dialdehyd 7:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-68^\circ$  ( $c$  von  $\alpha$ -6 0.52, 0.25 *m*  $\text{NaJO}_4$ ).

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel:  $R_F$  (H) 0.33; auf Cellulose:  $R_F$  (A) 0.63; Papierchromatographie s. Tab. 2. ORD-Spektrum s. Tab. 1.

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$  (242.2) Ber. C 49.58 H 5.82 N 11.56 Gef. C 49.43 H 6.03 N 11.42

*1-[2-Desoxy- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-thymin ( $\beta$ -6)*: Aus Isopropylalkohol farblose Kristalle vom Schmp. 234–236°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-8.9^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). UV ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm ( $\epsilon = 9900$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  233 (2500),  $\epsilon_{260} = 9400$ ,  $E_{280}/E_{260} = 0.57$ ; in 0.1 *n* NaOH:  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm ( $\epsilon = 7500$ ),  $\lambda_{\text{min}}$  245 (5100),  $E_{280}/E_{260} = 0.59$ .

Perjodatoxydation: 1.14 Mol Perjodatverbrauch, keine Bildung von Ameisensäure (nach 16 Stdn.); Dialdehyd 8:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+71^\circ$  ( $c$  von  $\beta$ -6 0.49, 0.25 *m*  $\text{NaJO}_4$ ).

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel:  $R_F$  (H) 0.25; auf Cellulose:  $R_F$  (A) 0.52. Papierchromatographie s. Tab. 2; ORD-Spektrum s. Tab. 1.

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$  (242.2) Ber. C 49.58 H 5.82 N 11.56 Gef. C 49.57 H 6.12 N 11.33

*Nucleosidgemisch unbekannter Konstitution* (1. Fraktion der Säulentrennungen)

Perjodatoxydation: 0.23 Mol Verbrauch, keine Bildung von Ameisensäure (nach 24 Stdn.).

UV ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  266.5,  $\lambda_{\text{min}}$  235 nm,  $E_{280}/E_{260} = 0.63$ ; in 0.1 *n* NaOH:  $\lambda_{\text{max}}$  266.5,  $\lambda_{\text{min}}$  245 nm,  $E_{280}/E_{260} = 0.68$ .

<sup>31)</sup> Hersteller: Johns-Manville Corporation.