

127. Verbesserte Isolierungsmethode der Desoxyribonucleoside

von **O. Schindler**.

(26. II. 49.)

Die Nucleoside aus Thymonucleinsäure sind neben einigen herzwirksamen Glykosiden die einzigen bisher in der Natur aufgefundenen Glykoside von 2-Desoxyzuckern. Die auch bei O-Glykosiden von 2-Desosen beobachtete Empfindlichkeit gegen Säuren¹⁾ bereitet dem Abbau der Thymonucleinsäure zur Nucleosid-Stufe Schwierigkeiten; ausserdem sind die Derivate der 2-Desoxyribose gegenüber den Ribosiden aus Hefenucleinsäure schwerer zu kristallisieren. Es seien daher einige Ergebnisse zur Verbesserung der Isolierung der vier Desoxyribonucleoside aus Thymus beschrieben.

Die Thymonucleinsäure wurde aus mit Aceton vorextrahiertem Bries nach den Angaben von *Feulgen*²⁾ gewonnen. Die Hydrolyse geschah nach der Methode von *Klein*³⁾ mit Nucleotidase aus Kälberdarm. Bei der Ausfällung der anorganischen Salze aus der Fermentierungsflüssigkeit hielten wir uns an die Vorschrift von *Klein*⁴⁾, wobei Mg^{++} als $Mg(OH)_2$, SO_4^{--} und CO_3^{--} als entsprechende Bariumsalze und der Überschuss an Ba^{++} als $BaCO_3$ ausgefällt wurden. Die so vorgereinigte Lösung, die neben Na^+ die gesuchten Nucleoside und andere nicht definierte Hydrolysenprodukte der Nucleinsäure enthielt, lieferte beim Einengen im Vakuum eine Gallerte. Die Aufteilung der darin enthaltenen Bestandteile liess sich auf folgendem Wege durchführen: Die Gallerte wurde mit 80-proz. Alkohol verrieben und filtriert. Während der Filtrerrückstand zur Hauptsache aus Guanin-desoxyribosid bestand, enthielt das Filtrat die übrigen Nucleoside. Da die Reinigung des Guanin-desoxyribosides über das Bleisalz⁵⁾ sich wegen seiner leichten Adsorbierbarkeit an Bleisulfid als sehr verlustreich erwies, wählten wir für die Gewinnung dieses Nucleosides ein Extraktionsverfahren. Durch Verteilung zwischen Wasser und einem Chloroform-Alkohol-Gemisch (2:1)⁶⁾ liess sich Guanin-desoxyribosid in die organische Schicht überführen und so dem Gemisch der Begleitstoffe entziehen und anschliessend kristallisieren. Die Ausbeute an

¹⁾ *W. A. Jacobs* und *N. M. Bigelow*, *J. Biol. Chem.* **96**, 647 (1932); *P. A. Levene* und *R. S. Tipson*, *ibid.* **109**, 623 (1935).

²⁾ *R. Feulgen*, *Z. physiol. Ch.* **238**, 105 (1936).

³⁾ *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **207**, 125 (1932).

⁴⁾ *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **255**, 82 (1938); *Th. G. Brady*, *Biochem. J.* **35**, 855 (1941).

⁵⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, *J. Biol. Chem.* **81**, 711 (1929).

⁶⁾ *A. Stoll*, *J. Renz* und *W. Kreis*, *Helv.* **20**, 1484 (1937), haben dies Gemisch mit Erfolg zum Ausschütteln stark wasserlöslicher Glykoside benutzt.

diesem Nucleosid war so 2,5mal höher als bei der Bleisalz-Methode. Aus dem eingeeengten Filtrat der Gallerte schied sich Hypoxanthin-desoxyribosid¹⁾ aus. Die in der Mutterlauge der Hypoxanthin-desoxyribosid-Fraktion verbliebenen Thymin- und Cytosin-desoxyriboside liessen sich durch chromatographische Reinigung an Al_2O_3 leicht von Begleitstoffen abtrennen. Diese beiden Nucleoside waren in den zuerst abgelösten Fraktionen enthalten. Diese gaben aus Methanol-Äther leicht Thymidin, während das Cytosin-desoxyribosid aus den Thymin-Mutterlaugen als Pikrat abgeschieden und aus diesem nach bekannter Methode²⁾ gewonnen werden konnte. Aus den schwerer eluierbaren Anteilen des Chromatogramms liessen sich in kleiner Menge zwei weitere Stoffe vom Smp. 260^0 bzw. 265^0 erhalten, die aber, da sie mit Orcin-Salzsäure³⁾ keine Pentosen-Reaktion gaben, nicht weiter untersucht wurden.

Die physikalischen Konstanten der so isolierten Nucleoside waren z. T. von den in der Literatur beschriebenen etwas verschieden. Da Guanin-desoxyribosid keinen Schmelzpunkt besitzt, sondern sich unter allmählicher Bräunung zersetzt, kann die spez. Drehung allein zur Charakterisierung dieser Verbindung dienen. *Levene* und *London*⁴⁾ bestimmten diese zu $[\alpha]_D = -37^0$, während wir den Wert $[\alpha]_D^{19} = -47^0$ (in n. NaOH) fanden. Hypoxanthin-desoxyribosid wird ohne Schmelzpunkt beschrieben⁵⁾. Bei der Bestimmung auf dem *Kofler*-Block konnte aber beobachtet werden, dass die Verbindung bei $218-220^0$ schmilzt, um aber unmittelbar nach dem Schmelzen zu erstarren, ohne erneut zu schmelzen. Das über das Pikrat erhaltene und aus dem sirupösen Rückstand der eingedampften wässrigen Lösung krystallisierte Cytosin-desoxyribosid wird in der Literatur mit einem Schmelzpunkt von 193^0 beschrieben. Demgegenüber fanden wir für dieses Desoxy-ribosid, das analog über das aus 80-proz. Alkohol umkrystallisierten Pikrat dargestellt war, nach Krystallisation aus Methanol-Äther den Smp. 223^0 ; $[\alpha]_D^{19} = +82^0$ (in n. NaOH).

In folgender Tabelle sind die physikalischen Konstanten der hier beschriebenen vier Nucleoside und als Vergleich die bisherigen Literatur-Werte zusammengestellt.

Auffallenderweise gaben nur die Desoxyriboside, die sich von Purinderivaten ableiten, eine positive violette *Keller-Kiliani*-Reak-

¹⁾ Wir unterliessen es, die Desaminierung von Adenin-desoxyribosid mit *Siberionen*⁶⁾ zu hemmen.

²⁾ *F. Bielschowsky* und *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **207**, 202 (1932).

³⁾ *B. Tollens*, *A.* **260**, 395 (1890), in der Ausführungsform von *H. G. Abbaum* und *W. W. Umbreit*, *J. Biol. Chem.* **167**, 369 (1947).

⁴⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, *J. Biol. Chem.* **81**, 711 (1929); **83**, 793 (1929).

⁵⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, *J. Biol. Chem.* **83**, 793 (1929); *F. Bielschowsky* und *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **207**, 202 (1932).

⁶⁾ *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **224**, 244 (1934).

tion¹⁾, während diese mit den Pyrimidinderivaten negativ ausfiel. Dies scheint auf der schwereren Spaltbarkeit der Pyrimidin-nucleoside zu beruhen, da diese auch bei der Orcin-Salzsäure-Reaktion erst nach 30 Sekunden im siedenden Wasserbad eine Blaufärbung zeigten, zum Unterschied von den Purinnucleosiden, die sofort eine violette Färbung gaben. Die *Dische*-Reaktion²⁾ verlief bei allen vier Nucleosiden positiv.

Desoxyribosid von	Smp.		[α] _D (in n. NaOH)	
	Literatur	eigener Wert	Literatur	eigener Wert
Guanin . . .	ohne Smp. ³⁾	ohne Smp.	- 37,5 ^{0 3)}	- 47,7 ⁰
Hypoxanthin .	sintern 202 ⁰ kein Smp. ⁴⁾	219 ⁰	- 21 ^{0 5)}	- 22,9 ⁰
Thymin . . .	185 ^{0 5)}	187 ⁰	+ 32,5 ^{0 5)}	+ 32,8 ⁰
Cytosin . . .	193 ^{0 5)}	214 ⁰		+ 82,4 ⁰

Ich bin Herrn Prof. *T. Reichstein* für das freundliche Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat und der *Haco-Gesellschaft, Gmüligen*, für die Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

(Die Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze $\pm 2^{\circ}$).

Fermentative Hydrolyse der Thymonucleinsäure.

100 g b-Thymonucleinsaures Natrium⁶⁾ mit einem Phosphorgehalt von 6,6% wurden in 1 l Wasser gelöst und mit 20-proz. Ammoniak bis zu eben beginnender Rötung von Phenolphthalein versetzt; dann wurden zugesetzt: 1250 cm³ Ammoniak-Ammoniumsulfat-Puffer 1-m. (p_H 8,8), 1250 cm³ 0,1-m. MgSO₄-Lösung und die Fermentlösung. Letztere war nach *Klein*⁷⁾ durch Ausfällen der Nucleotidase von 700 g Glycerinextrakt aus ca. 500 g Kälberdarmmucosa bei p_H 4,3 und Lösen des auszentrifugierten Niederschlages in sehr verdünntem Ammoniak erhalten worden. Nach 44-stündigem Fermentieren bei 38⁰ wurde vom ausgeschiedenen MgNH₄PO₄ abgenutscht und das Filtrat im Vakuum bei 45⁰ Badtemperatur auf 800 cm³ eingengt. Nach 15-stündigem Stehen bei 0⁰ war die Lösung zu einer Gallerte erstarrt. Sie wurde mit ca. 100 cm³ eiskaltem 80-proz. Alkohol verrieben und war dann leichter filtrierbar. Die abgenutschte Fällung wurde mit kaltem Alkohol gut gewaschen (weitere Aufarbeitung des Filtrerrückstandes siehe unten).

¹⁾ *C. C. Keller*, Ber. Dtsch. Pharm. Ges. **5**, 277 (1895); *H. Kiliani*, Arch. Pharm. **234**, 273 (1896); **251**, 576 (1913), in der Ausführungsform von *J. von Euw* und *T. Reichstein*, Helv. **31**, 883 (1948).

²⁾ *Z. Dische*, Bioch. Z. **189**, 77 (1927); vgl. auch *J. von Euw* und *T. Reichstein*, Helv. **31**, 883 (1948).

³⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, J. Biol. Chem. **81**, 711 (1929).

⁴⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, J. Biol. Chem. **83**, 793 (1929); *F. Bielschowsky* und *W. Klein*, Z. physiol. Ch. **207**, 202 (1932).

⁵⁾ *P. A. Levene* und *E. S. London*, J. Biol. Chem. **83**, 793 (1929).

⁶⁾ *R. Feulgen*, Z. physiol. Ch. **238**, 105 (1936).

⁷⁾ *W. Klein*, Z. physiol. Ch. **207**, 125 (1932).

Die eingengten Filtrate wurden mit der warm bereiteten Lösung von 400 g Ba(OH)₂, 8 H₂O in ca. 6 l Wasser versetzt. Vom Niederschlag wurde abgenutscht und dieser so lange mit warmem Wasser nachgewaschen, bis die Filtrate beim Erwärmen mit Orcin-Salzsäure nur noch schwache Färbung gaben. Nach dem Eindampfen der Filtrate im Vakuum auf 2 l wurde der Überschuss an Ba⁺⁺ durch Einleiten von CO₂ ausgefällt. Das BaCO₃ wurde abgenutscht und die klaren Filtrate auf 150 cm³ eingedampft. Bei 0° wurde hierauf durch tropfenweisen Zusatz von 2-n. Schwefelsäure das p_H auf 5,2 gebracht und nach Zusatz von 310 cm³ Alkohol 16 Stunden bei 0° aufbewahrt. Es fiel dabei eine weitere Menge der schon aus der wässrigen Lösung erhaltenen Gallerte aus, die wie oben abgetrennt wurde (weitere Verarbeitung siehe unten). Weiteres Einengen im Vakuum auf ca. 100 cm³ und Zusatz von Alkohol bis zur beginnenden Trübung leiteten die Krystallisation von Hypoxanthin-desoxyribosid ein, dessen Abscheidung durch Stehen bei 0° vervollständigt wurde. Der abfiltrierte und mit 70-proz. Alkohol gewaschene Niederschlag wog 5,8 g.

Die Mutterlauge wurde im Vakuum vollkommen eingedampft und der sirupöse Rückstand 2mal mit 70 cm³ n-Propanol¹⁾ bei 60° ausgezogen. Die in Alkohol schwer löslichen Anteile gaben bei der Krystallisation aus Wasser weitere 400 mg rohes Hypoxanthin-desoxyribosid.

Die Propanollösung hinterliess nach dem Eindampfen im Vakuum 37,8 g Rückstand. Dieser wurde in 2 Portionen wie folgt an der 10fachen Menge Aluminiumoxyd chromatographiert:

20,2 g wurden mit 500 cm³ Chloroform warm ausgezogen, wobei nur ein Teil der Substanz in Lösung ging und durch die mit Chloroform bereitete Säule filtriert. Als Eluierungsmittel dienten je 500 cm³ der in nachfolgender Tabelle angeführten Lösungsmittel, die jeweils vor dem Aufgiessen auf die Säule zur Lösung der noch ungelösten Teile der Substanz benützt wurden.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Rückstand der eingedampften Eluate
1—2	Chloroform	Spuren
3	Chloroform-Methanol 1:1	7,3 g
4	„	7,9 g
5—7	„	1,15 g
8	Methanol	0,43 g
9—13	„	0,95 g
14	Methanol-Wasser 1:1	1,5 g
15	Wasser	1,4 g

Fraktion 3 gab aus Methanol-Äther 1,7 g Thymin vom Smp. 179—182°. Aus den Mutterlaugen wurde der Äther abdestilliert und anschliessend so lange eine gesättigte, wässrige Pikrinsäure-Lösung zugesetzt, bis kein Cytosin-desoxyribosid-Pikrat mehr ausfiel. Die erhaltenen feinen Nadeln wurden abgenutscht und aus 80-proz. Alkohol umkrystallisiert. Smp. 210—212° (unter Zersetzung), Ausbeute 880 mg. Die Mutterlaugen des Pikrates wurden auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach Entfernung der Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Äther und Eindampfen der wässrigen Phase resultierten 2,4 g eines Sirups, der aus Methanol-Äther noch 400 mg rohes Thymin lieferte.

Fraktion 4 gab aus Methanol-Äther nur 40 mg Hypoxanthin-desoxyribosid und kein Thymin. Aus den Mutterlaugen liessen sich durch Fällen mit Pikrinsäure 1,4 g Cytosin-desoxyribosid-Pikrat gewinnen.

Fraktion 14 gab aus Methanol-Wasser 60 mg nadelförmige Krystalle, die aus Wasser-Aceton umkrystallisiert den Smp. 260—262° zeigten. Die Orcin-Salzsäure-Reaktion war negativ, weshalb das Produkt nicht näher untersucht wurde.

¹⁾ H. Lehmann-Echternacht, Z. physiol. Ch. **269**, 201 (1941).

Fraktion 15 lieferte aus Äthanol-Wasser 50 mg farblose Nadeln, die nach dem Umkrystallisieren aus den gleichen Lösungsmitteln bei 265° unter Bräunung schmolzen. Sie gaben wie das Krystallisat aus Fraktion 14 eine negative Orcin-Salzsäure-Reaktion, doch zeigte die Mischprobe mit diesem eine deutliche Schmelzpunktserniedrigung.

Reinigung des Guanin-desoxyribosides.

Der feuchte, gallertige Filtrückstand der zu Beginn der Aufarbeitung der Fermentierung aus der von anorganischen Salzen befreiten Lösung, vor der Abscheidung des Hypoxanthin-desoxyribosides erhaltenen Gallerte wurde in 100 cm³ Wasser aufgenommen und im Vakuum bei 40° vom Alkohol befreit. Die Lösung wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt, das aber nur Spuren Substanz aufnahm. Dann wurde 15mal mit je 100 cm³ Chloroform-Alkohol-Gemisch (2:1 Vol.) ausgeschüttelt. Die der Reihe nach mit wenig Wasser gewaschenen und über Natriumsulfat getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen 6,7 g. Letztere wurden in ca. 60 cm³ heissem Wasser gelöst und zur Klärung durch etwas Talk filtriert. Beim Abkühlen krystallisierten 1,9 g Guanin-desoxyribosid aus. Durch Einengen der Mutterlaugen wurden noch weitere 0,35 g erhalten (total 2,25 g).

Die Substanz krystallisierte mit einem Mol Krystallwasser.

Aus 100 g Thymonucleinsaurem Natrium wurden somit nach diesem Verfahren 2,25 g Guanin-desoxyribosid erhalten. Bei der Aufarbeitung der Gallerte aus 25 g thymonucleinsaurem Natrium über das Bleisalz betrug die Ausbeute 215 mg¹⁾.

Zur Bestimmung der Drehung wurde die Substanz 75 Minuten bei 90° im Hochvakuum getrocknet; $[\alpha]_D^{19} = -47,7^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,86$ in n. NaOH).

8,679 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = -0,41^\circ \pm 0,02^\circ$

Zur Analyse wurde eine aus Wasser umkrystallisierte Probe 2 Stunden bei 50° im Hochvakuum getrocknet.

4,087 mg Subst. gaben 6,380 mg CO₂ und 2,082 mg H₂O

C₁₀H₁₃N₅O₄, H₂O (285,24) Ber. C 42,10 H 5,30% Gef. C 42,49 H 5,70%

Reinigung des Hypoxanthin-desoxyribosides.

5,8 g Rohprodukt wurden aus Wasser 3mal umkrystallisiert (Ausbeute an reinem Hypoxanthin-desoxyribosid 4,8 g). Die Substanz schmolz bei 218°–220°, erstarrte nach dem Schmelzen und zersetzte sich bei weiterem Erhitzen ohne zu schmelzen; $[\alpha]_D^{19} = -22,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,174$ in n.-NaOH).

11,853 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = -0,27^\circ \pm 0,02^\circ$

Zur Analyse wurde eine aus Wasser umkrystallisierte Probe 4 Stunden im Hochvakuum bei 100° über P₂O₅ getrocknet.

3,907 mg Subst. gaben 6,840 mg CO₂ und 1,757 mg H₂O

1,880 mg Subst. gaben 0,365 cm³ N₂ (20°/742 mm)

C₁₀H₁₂O₄N₄ Ber. C 47,61 H 4,79 N 22,22%
(252,20) Gef. ,, 47,78 ,, 5,03 ,, 22,11%

Reinigung des Thymin-desoxyribosides (Thymidin).

Das aus Fraktion 3 der Chromatographie durch Krystallisation aus Methanol-Äther erhaltene Thymidin wurde dreimal aus Methanol-Äther umkrystallisiert, wobei der Smp. auf 187° stieg; $[\alpha]_D^{16} = +32,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,04$ in n. NaOH).

10,401 mg Subst. zu 1,00293 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{16} = +0,34^\circ \pm 0,02^\circ$

¹⁾ Nach Abschluss der hier beschriebenen Versuche konnten wir beobachten, dass sich auch Cytosin-desoxyribosid und besonders leicht Thymidin mit Chloroform-Alkohol (2:1 Vol.) ausschütteln lassen, während Hypoxanthin-desoxyribosid nur sehr schwer in die organische Lösungsmittelschicht überzuführen ist.

Isolierung des Cytosin-desoxyribosides.

860 mg des aus den Fraktionen 3 und 4 der Chromatographie erhaltenen Cytosin-desoxyribosid-Pikrates wurden in 200 cm³ Wasser durch Erwärmen gelöst, rasch auf ca. 30° abgekühlt und bei dieser Temperatur mit 1 cm³ 2-n. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung reagierte dann deutlich kongosauer. Sie wurde zur Entfernung der Pikrinsäure mit Äther extrahiert und die Äther-Lösung mit wenig Wasser gewaschen. Aus den wässrigen Anteilen wurde SO₄' mit Bariumhydroxydlösung ausgefällt und nach Abtrennung des BaSO₄ der Überschuss an Ba⁺⁺ mit CO₂ gefällt. Die vom BaCO₃ abfiltrierte, neutrale Lösung wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (430 mg) wurde in Methanol aufgenommen und durch Äther-Zusatz bis zur beginnenden Trübung die Krystallisation eingeleitet. Das erhaltene Krystallinat wurde aus Methanol-Äther umkrystallisiert, wobei der Smp. bis auf 213—215° stieg; $[\alpha]_D^{19} = +82,4^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,31$ in n. NaOH).

13,223 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = +1,08^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Zur Analyse wurde 6 Stunden bei 100° im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet.

4,458 mg Subst. gaben 7,800 mg CO₂ und 2,400 mg H₂O

2,544 mg Subst. gaben 0,417 cm³ N₂ (24°, 749 mm)

C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	Ber. C 47,57	H 5,77	N 18,49%
(227,19)	Gef. ,, 47,75	„ 6,02	.. 18,35%

Die Mikroanalysen wurden in der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es werden Vereinfachungen in der Isolierungsmethode der Desoxyribonucleoside aus den Produkten der fermentativen Hydrolyse von Thymonucleinsäure mit Kälberdarm-Nucleotidase beschrieben. Die physikalischen Konstanten der isolierten Nucleoside waren z. T. von den in der Literatur beschriebenen verschieden.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

128. N,N'-Dialkyl-pyrazolone

von J. Büchi, R. Ursprung und G. Lauener.

(8. III. 49.)

Seit der Entdeckung der Pyrazolone durch Knorr¹⁾ sind zahlreiche Verbindungen in dieser Körperklasse dargestellt worden. Einige von ihnen, wie das Antipyrin, das Pyramidon und das dazu isostere 4-Isopropylantipyrin, haben grosse Bedeutung als Arzneimittel erlangt²⁾. Die bisher durchgeführten Untersuchungen erlauben interessante Einblicke in die Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und analgetischer Wirkung in dieser Klasse. Pyrazolone, die

¹⁾ Knorr, B. 16, 2597 (1883); B. 17, 549 (1884).

²⁾ Für Einzelheiten verweisen wir auf die Dissertation „Synthesen in der Pyrazolonreihe“ von R. Ursprung, E.T.H. (1948).