

# Die Jodierung von Purinnucleosiden

Von

**Dorothea Nowotny\*** und **David Lipkin**

Aus dem Chemischen Institut der Washington University,  
St. Louis (Mo.), USA\*\*

(Eingegangen am 7. November 1964)

Die Jodierung von Guanosin, 2'-Deoxyguanosin und Xanthosin wurde untersucht. Es wurde gefunden, daß N-Jodsuccinimid in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel in Gegenwart katalytischer Mengen *n*-Butylidisulfid als Jodierungsmittel wirkt. Guanosin und Xanthosin geben gute Ausbeuten der 8-Jodverbindungen. Obgleich gewisse Schwierigkeiten in der Jodierung von 2'-Deoxyguanosin nicht erklärt werden konnten, ist es möglich, 8-Jod-2'-deoxyguanosin in relativ guter Ausbeute zu erhalten.

The iodination of guanosine, 2'-deoxyguanosine and xanthosine has been studied. It was found that N-iodosuccinimide in dimethyl sulfoxide, containing *n*-butyl disulfide in catalytic amounts, acts as an iodinating agent. Guanosin and xanthosine are readily converted to the 8-iodo compounds. Although certain difficulties in the iodination of 2'-deoxyguanosine could not be explained, it is possible to prepare 8-iododeoxyguanosine in fair yield.

Vom biochemischen Standpunkt sind halogenierte Purine, Pyrimidine, Nucleoside und Nucleotide von großer Bedeutung<sup>1</sup>. Es wurde deshalb angenommen, daß Methoden zur direkten Jodierung der heterocyclischen Basen in Nucleosiden und Nucleotiden von beachtlichem Interesse sein würden. Da diese Moleküle sehr empfindlich gegen drastische Reaktionsbedingungen sind, wurde nach einer milden Methode für die Einführung des Jods in den Kern gesucht.

\* Herrn Prof. Dr. *Friedrich Kuffner* zum 60. Geburtstag gewidmet.

\*\* Diese Arbeit wurde mit Hilfe von „Research Grants“ der „National Science Foundation“ (NSF-G-12451) und des „National Cancer Institute, Public Health Service“ (CA 03870) durchgeführt.

<sup>1</sup> *R. E. Holmes* and *R. K. Robins*, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 1242 (1964).

Obwohl eine Vielfalt von Verbindungen (z. B. JCl, JBr, JCN, J<sub>2</sub>) als Reagentien für die Jodierung von Purinnucleosiden untersucht wurde, stellte sich N-Jodsuccinimid als universellstes Reagens heraus. Es wurde am besten in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel und mit *n*-Butyldisulfid als Katalysator angewendet. Auch andere verwandte Schwefelverbindungen (sowie elementarer Schwefel) erwiesen sich als mehr oder weniger wirkungsvolle Katalysatoren. Unter denselben Bedingungen findet jedoch keine Jodierung statt, wenn N-Äthylacetamid an Stelle von Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel verwendet wird.

Ein 0,05—0,1molares Verhältnis von Disulfid zum Nucleosid lieferte die besten Resultate; größere Mengen führten zu unaufgeklärten Nebenprodukten. Reaktionszeiten von mindestens 17 Stunden bei Zimmertemperatur waren erforderlich, um eine gute Umwandlung von Guanodin und Xanthosin in die 8-Jodderivate zu bewirken. Höhere Reaktions Temperaturen führten zu teilweiser Zersetzung des heterocyclischen Kerns. Im Gegensatz zu Guanodin wurde 2'-Deoxyguanodin in allen untersuchten Fällen nur unvollständig jodiert. Die besten Reaktionsbedingungen lieferten nur eine Ausbeute von ungefähr 40%, einen vergleichbaren Betrag nicht umgesetztes Deoxyguanodin sowie Zersetzungsprodukte. Es ist interessant zu erwähnen, daß eine maximale Ausbeute von 8-Jod-2'-deoxyguanodin nur erhalten wurde, wenn das als Lösungsmittel verwendete Dimethylsulfoxid ungefähr 10% Wasser enthielt.

Eine Erklärung für die relativ geringe Ausbeute mag in der Tatsache liegen, daß Succinimid selbst sich als schwacher Inhibitor für die disulfidkatalysierte Jodierung mittels N-Jodsuccinimid erwies. Dieser Unterschied im Verhalten von Guanodinribosid und Deoxyribosid ist gegenwärtig nicht verständlich, weil die entsprechenden Cytosin- und Uracilnucleoside keinen Unterschied im Jodierungsverhalten ihrer Riboside und Deoxyriboside zeigen.

Es wurde gefunden, daß eine säurekatalysierte Jodierung des Guaninrestes im Guanodin und Deoxyguanodin mittels N-Jodsuccinimid als Jodierungsmittel, im Gegensatz zur disulfidkatalysierten, sowohl in Dimethylsulfoxid als auch N-Äthylacetamid als Lösungsmittel ausgeführt werden kann. Die säurekatalysierte Reaktion mittels Bortrifluorid-Ätherat (2 Mole per Mol Nucleosid) als Lewis-Säure erfordert kein *n*-Butyldisulfid in der Reaktionsmischung.

Jodmonochlorid kann ebenfalls für die Jodierung von Guanodin und sein Deoxyanalogon verwendet werden, jedoch nur in Gegenwart einer Lewis-Säure, wie z. B. Bortrifluorid-Ätherat. In diesem Falle verläuft die Reaktion recht gut in N-Äthylacetamid als Lösungsmittel, jedoch nicht in Dimethylsulfoxid.

Verschiedene Reagentien (z. B. KOH, Ag<sub>2</sub>O, PbO, TiOH) wurden versucht, um eine Umwandlung des 8-Jodguanodins und 8-Jodxanthodins

in die entsprechenden 8-Hydroxyderivate zu bewirken. Keiner dieser Versuche war erfolgreich. Die 8-Jodderivate werden jedoch überraschend leicht zu den ursprünglichen Nucleosiden reduziert. Eine quantitative Reduktion findet statt, wenn Schwefelwasserstoff durch eine wäßrige Lösung der Jodverbindungen bei Zimmertemperatur für 1—2 Stunden geblasen wird.

Des weiteren führt Deaminierung von 8-Jodguanosin mittels salpetriger Säure unter normalen Bedingungen in guter Ausbeute zu 8-Jodxanthosin. Die Deaminierung von 8-Jodguanosin zu 8-Jodxanthosin ist nur quantitativ, wenn sie in absolutem Dimethylsulfoxid ausgeführt und ein großer Überschuß von Lithiumnitrit und Eisessig verwendet wird.

Für den Eintritt des Jods am C-8 im Purinring gibt es eine Anzahl von Beweisen. Erstens die Spaltung von Jodguanosin und Jodxanthosin mittels 60proz. Fluorwasserstoffsäure\* in Ribose und Basen, deren Eigenschaften (Ultraviolett-Spektrum, Papierchromatographie und Papier-electrophorese) mit denen übereinstimmen, die von Jodguanin bzw. Jodxanthin zu erwarten sind. Zweitens die UV-Spektren: Brom- und Jodnucleoside absorbieren bei höheren Wellenlängen und haben größere Extinktionskoeffizienten beim Maximum als die ursprünglichen Verbindungen<sup>1, 2</sup>. Drittens führt Deaminierung von Jodguanosin mittels salpetriger Säure zu Jodxanthosin. Viertens: Brom- und Jodguanosin sowie Joddeoxyguanosin weisen nicht die charakteristische Fluoreszenz auf, welche Guaninnucleoside und -nucleotide nach Einwirkung von Salzsäuredämpfen am Papier zeigen<sup>3</sup>. Schließlich ist die NMR-Absorption, welche dem C<sub>8</sub>-Proton im Guanosin entspricht, im Spektrum des 8-Jodguanosins abwesend. Papierelectrophorese in Bisulfitpuffer (pH 5,5) zeigte, daß keine der Zuckerhydroxylgruppen während der Jodierung zu Carbonylgruppen oxidiert wurden.

Es ist interessant, einige theoretische Betrachtungen über den Mechanismus der beschriebenen Jodierungsreaktionen anzustellen. Die säurekatalysierten Reaktionen, entweder mit Jodmonochlorid oder N-Jodsuccinimid, verlaufen vermutlich über einen ionischen Mechanismus mit J<sup>+</sup> als elektrophilem angreifenden Teil. Der Mechanismus der disulfidkatalysierten Jodierung ist wahrscheinlich viel komplexer. Es wird vermutet, daß *n*-Butylsulfenyljodid als Zwischenprodukt das eigentliche Jodierungsmittel ist.

\* Die Bedingungen für den Fluorwasserstoffsäureabbau wurden in unveröffentlichten Untersuchungen von *D. Lipkin* und *J. W. Abrell* über den Abbau der Phosphorsäureester mittels HF vorgeschlagen.

<sup>2</sup> *David Lipkin, Frank B. Howard, Dorothea Nowotny and Mitsuji Sano*, *J. Biol. Chem.* **238**, 2249 (1963).

<sup>3</sup> *R. Markham, K. Paech and M. V. Tracey*, „Modern Methods of Plant Analysis“, Springer-Verlag, Berlin, 1955, Vol. IV, p. 288.

### Experimenteller Teil

Über die Jodierung von Guanosin wurde in einer früheren Arbeit berichtet<sup>2</sup>. Sie lieferte mit 70% Ausbeute ein Produkt, dessen Eigenschaften der 8-Jodverbindung entsprechen. Experimentelle Daten für die Synthese und physikalische Eigenschaften sind in dieser Arbeit angegeben.

*Jodierung von Xanthosin:* Eine Lösung von 1,0 g (3,5 mMol) Xanthosin, 8 g (35 mMol) N-Jodsuccinimid und 60  $\mu$ l (0,31 mMol) *n*-Butyldisulfid in 10 ml absol. Dimethylsulfoxid (*DMSO*) wurde 17 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen, das Rohprodukt durch Zufügen von 200 ml kaltem  $\text{CHCl}_3$  ausgefällt und die Mischung einige Stdn. bei  $-20^\circ\text{C}$  belassen. Das Rohprodukt (1,2 g) wurde durch Umfällen aus *DMSO-CHCl}\_3* gereinigt. Des weiteren wurde das so erhaltene vorgereinigte Material erst aus Methanol, dann aus Wasser umkristallisiert. Die weißen, nadelartigen Kristalle wurden an der Luft getrocknet. Ausb. 1,0 g, d. i. 70% d. Th.

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{JN}_4\text{O}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . Ber. C 26,94, H 3,36, J 28,47, N 12,55.  
Gef. C 27,07, H 3,12, J 28,27, N 12,49.

Jodxanthosin hat eine optische Drehung von  $[\alpha]_D = -40,0^\circ$  ( $c = 2$ , in *DMSO*); für Xanthosin ist  $[\alpha]_D = -79,4^\circ$  ( $c = 2$ , in *DMSO*).

UV-Spektrum:

pH 2,  $\lambda_{\text{max}1} = 244 \mu$  ( $\epsilon = 14860$ ),  $\lambda_{\text{max}2} = 267 \mu$  ( $\epsilon = 12300$ ) und  
 $\lambda_{\text{min}1} = 220 \mu$  ( $\epsilon = 6040$ ),  $\lambda_{\text{min}2} = 257 \mu$  ( $\epsilon = 11780$ );  
pH 7,  $\lambda_{\text{max}} = 258 \mu$  ( $\epsilon = 15950$ ),  $\lambda_{\text{min}} = 228 \mu$  ( $\epsilon = 4300$ );  
pH 12,  $\lambda_{\text{max}} = 258 \mu$  ( $\epsilon = 15880$ ),  $\lambda_{\text{min}} = 228 \mu$  ( $\epsilon = 4710$ ).

60proz. Fluorwasserstoffsäure baut Jodxanthosin (Zimmertemp., 1 Stde.) zu Ribose und einer Base ab, deren physikalische Eigenschaften mit jenen übereinstimmen, die von Jodxanthin zu erwarten wären.

Für Jodxanthin wurde in 0,1*n*-HCl  $\lambda_{\text{max}} = 278 \mu$  und  $\lambda_{\text{min}} = 245 \mu$  gefunden.

In 0,1*n*-NaOH ist  $\lambda_{\text{max}} = 288 \mu$  und  $\lambda_{\text{min}} = 261 \mu$ .

Durch  $\text{H}_2\text{S}$  wird Jodxanthosin in Xanthosin umgewandelt. Absteigende Papierchromatographie und Papierelektrophorese waren ausgezeichnete Hilfsmittel für die Reinheitskontrolle der Produkte. Diesbezügliche Daten sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

*Jodierung von Deoxyguanosin:* Zu einer Lösung von 1,0 g (3,7 mMol) Deoxyguanosin und 8,4 g (37 mMol) N-Jodsuccinimid in 10 ml *DMSO* wurden 50  $\mu$ l (0,26 mMol) *n*-Butyldisulfid und 1 ml Wasser zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 17 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Weitere Zusätze von je 25  $\mu$ l (0,13 mMol) *n*-Butyldisulfid wurden nach 17 und weiteren 8 Stdn. gemacht. Nach weiteren 8—10 Stdn. wurde die Reaktionsmischung mit 100 ml Wasser verdünnt und mit 100 ml-Portionen  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt, bis die wäßrige Lösung nur mehr eine schwach gelbe Färbung aufwies. Die wäßrige Phase wurde mit wäßriger *n*-Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung neutralisiert und über aktiver, neutraler Tierkohle (Darco G 60) gereinigt. Die Tierkohle wurde mit HCl vorbehandelt und mit  $\text{NH}_3$  bis zur Neutralreaktion gewaschen. Eine gläserne Kolonne (4 cm Durchmesser) wurde zu einer Höhe von 12 cm mit der auf die angegebene Art vorbehandelten Aktivkohle gepackt und mit 500 ml einer 1proz. (Vol.) äthanol. Lösung von Octanol-(2) behandelt (wodurch die Aktivkohle etwas reaktiviert wird), gefolgt von 100 ml Wasser, um

die Kolonne alkoholfrei zu erhalten. Daraufhin wurde die wäßrige Lösung auf die Kolonne aufgetragen und mit 100 ml Wasser durchgewaschen, um jeden weiteren Überschuß an N-Jodsuccinimid zu entfernen. Um Zersetzung auf der Kolonne zu vermeiden, war eine große Durchflußgeschwindigkeit erforderlich. Deshalb wurde Wasserstrahlvacuum angewendet und die Kolonne auf 60°C erwärmt.

Die folgenden Fraktionen wurden aufgefangen:

Fraktions- Nummer	Vol., ml	Verdünnung (ml in 3 ml H <sub>2</sub> O)	Opti- sche Dichte	$\lambda_{\max}$ , m $\mu$	mg
1	200 40% <i>n</i> -prop.	0,05	1,5	254	350
2	100 40% <i>n</i> -prop.	0,10	1,0	260	65
3	350 75% <i>n</i> -prop.	0,10	1,5	260	320
4	100 75% <i>n</i> -prop.	0,10	0,6	260	30

Fraktion 1 enthielt reines Ausgangsmaterial, Fraktion 2 war eine Mischung von Deoxyguanosin und jodierter Substanz, 3 und 4 wurden vereinigt, konzentriert und das Konzentrat über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Der Feststoff wurde aus heißem Wasser umkristallisiert und die erhaltenen weißen, nadelartigen Kristalle an der Luft getrocknet. Ausb. 300 mg, d. i. 20% d. Th.

$C_{10}H_{12}JN_5O_4$ . Ber. C 30,53, H 3,05. Gef. C 30,40, H 3,25.

Für 8-Joddeoxyguanosin wurde bei pH 7 ein  $\lambda_{\max} = 260$  m $\mu$  gefunden. Papierchromatographische und papierelektrophoretische Daten sind in Tab. 1 angegeben.

Tabelle 1

Papierchromatographie (absteigend, Whatman 1 MM Papier) wurde in *n*-Butanol—Wasser—Ameisensäure, 76:10:14 (Vol) ausgeführt. Die  $R_F$ -Werte (bez. auf Guanodin) lagen bei:

Verbindung	$R_F$ - Wert
Guanosin .....	1,00
Xanthosin .....	1,22
8-Jodxanthosin .....	2,14
Xanthin .....	2,06
8-Jodxanthin .....	3,95
2'-Deoxyguanosin .....	1,72
8-Jod-2'-deoxyguanosin .....	3,40

Papierelektrophorese (Whatman 3 MM Papier) lieferte in Boratpuffer (0,05 M, pH 9,2) folgende  $M_r$ -Werte (bez. auf Guanosin):

Verbindung	$M_r$ -Wert
Guanosin .....	1,00
Xanthosin .....	1,56
8-Jodxanthosin .....	1,40
Xanthin .....	1,23
8-Jodxanthin .....	0,83
2'-Deoxyguanosin .....	0,32
8-Jod-2'-deoxyguanosin .....	0,40