

ÜBER DIE METHYLIERUNG VON INOSIN MIT DIMETHYLSULFAT UND
DIAZOMETHAN +)

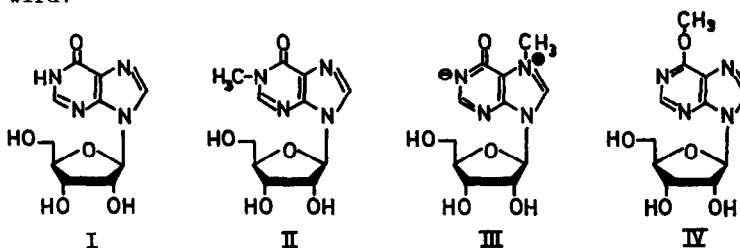
K. H. SCHEIT und A. HOLY ++)

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin,

Chemische Abteilung, Göttingen +++)

(Received 27 June 1966)

Durch Untersuchungen von MILES ¹⁾ und ROBINS ²⁾ war bekannt, daß bei der Methylierung von Inosin (I) N¹-Methylinosin (II), N⁷-Methylinosin (III) und 9-(β-D-Ribofuransyl)-6-methoxypurin (IV) entstehen können. Reaktion von I mit Diazomethan führt zu den Methylderivaten II, III und IV, während durch Dimethylsulfat bevorzugt III gebildet wird.



Da wir die Methylierung von s-RNA in wässriger Lösung studieren wollten, und Inosin ein Bestandteil von s-RNA ist,

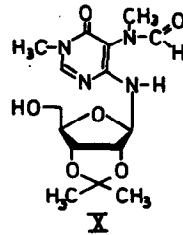
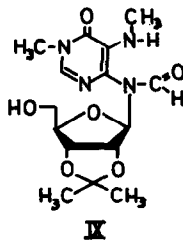
- +) Eine ausführliche Darstellung dieser Untersuchung ist in Vorbereitung
- ++) Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslovakischen Akademie der Wissenschaften, Prag (CSSR)
- +++) Anfragen können an diese Adresse gerichtet werden.

untersuchten wir die Methylierung von Inosin und 2',3'-O-Isopropylideninosin (V) mit Diazomethan sowie Dimethylsulfat in wässriger Lösung.

Die Methylierung von V mit 100 Äquiv. Diazomethan in einem Gemisch von Wasser (pH 7):Dioxan = 2:1 führte zu den erwarteten Verbindungen 2',3'-O-Isopropyliden-N¹-methylinosin (66,5 %, VI); 2',3'-O-Isopropyliden-N⁷-methylinosin (VII, 18,5 %) und 9-(β-D-2',3'-O-isopropyliden-ribofuranosyl)-6-methoxypurin (VIII, 13 %). Das Reaktionsgemisch wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silicagel (PF₂₅₄, Merck AG, Deutschland) getrennt. Obwohl VI dünnschichtchromatographisch einheitlich war, zeigte das UV-Spektrum und das NMR-Spektrum, daß eine unbekannte Substanz als Verunreinigung vorhanden war. Durch Methylierung von V mit der äquivalenten Menge Diazomethan in Methanol konnte reines VI isoliert werden. Wurde diese Verbindung in Wasser (pH 7) mit Diazomethan behandelt, so konnte im UV-Spektrum ein Ansteigen des Verhältnisses $\frac{A_{260 \text{ m}\mu}}{A_{250 \text{ m}\mu}}$ beobachtet werden. Das ließ sich nur durch das Entstehen einer neuen Substanz mit einem λ_{max} bei 260-270 m μ erklären. Die Methylierung von Inosin mit 30 Äquiv. Diazomethan bei 0°C in Wasser (pH 7) führte zur Bildung von II, III, IV und einer unbekannt Substanz (UV-Spektrum pH 7 und pH 12, λ_{max} 264 m μ , λ_{min} 242 m μ), die durch Dünnschichtchromatographie in Chloroform:Methanol = 9:1 von II abgetrennt werden konnte. Bei der Methylierung von V durch 10 Äquiv. Dimethylsulfat in Dioxan:Wasser = 2:1 unter pH Kontrolle

(pH 7-8) entstand in quantitativer Reaktion ein Produkt (IX), das nach Einengen der Reaktionslösung durch Extraktion mit Aceton isoliert wurde [Fp 213-15° C aus Methanol; UV-Spektrum pH 7 und pH 12 λ_{\max} 265 m μ (ϵ_{265} 6.95.10³), λ_{\min} 242 m μ , Massenspektrum: 354 m/e, beständiges Zwischenprodukt 165 m/e; C₁₅H₂₂N₄O₆ MG 354,37. gef.: C 50.67 % H 6.49 % N 15.64 % ber.: C 50.84 % H 6.26 % N 15.81 %].

Das Verhalten von IX bei Papierelektrophorese (pH 7) und Dünnschichtchromatographie zeigte, daß die Substanz kein quartäres N-Atom besaß. Das UV-Spektrum von IX deutete auf ein Pyrimidinderivat hin, das nur durch Öffnen des Imidazolringes entstanden sein konnte. Wir konnten feststellen, daß 2',3'-O-Isopropyliden-N⁷-Methylinosin schon bei pH 7 eine Aufspaltung des Imidazolringes zu einem substituierten Pyrimidin erleidet (UV-Spektrum pH 7 λ_{\max} 261 m μ , λ_{\min} 239 m μ). Bei pH 9 war diese Hydrolyse bereits nach einer Stunde quantitativ. Eine ähnliche Reaktion bei N⁷-Methylguanosin war bereits berichtet worden ³⁾. Wir glauben, daß bei der Methylierung von I und II in wässriger Lösung (pH 7) eben diese Ringaufspaltung erfolgte. Für die entstandene Verbindung IX schlagen wir folgende Struktur vor:



NMR-Spektrum von IX in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: chemische Verschiebung in τ (ppm) mit Tetramethyleilan als innerem Standard; Gerät Varian A 100 H^1 4.10; $\text{H}^{2'}$ + $\text{H}^{3'}$ 5.27; $\text{H}^{4'}$ 5.92; $\text{H}^{5'}$ 6.48; $\text{H}^{2'}$ 1.72; N-H 2.54; Formylproton 2.17; Isopropylidenrest 8.54, 8.71; $\text{N}^7\text{-CH}_3$ 7.13; $\text{N}^3\text{-CH}_3$ 6.62;

Das N-H-Proton wurde durch D_2O ausgetauscht, wobei das ursprüngliche Signal verschwand. Behandelt man IX mit 5 %iger Essigsäure bei Raumtemperatur, so entsteht eine neue Substanz (X) [Fp $205\text{-}6^\circ\text{C}$ aus Methanol; UV-Spektrum pH 7 und pH 12 λ_{max} 265 $\text{m}\mu$ (ϵ_{265} $9.42 \cdot 10^3$); λ_{min} 242 $\text{m}\mu$], welche nach Analyse und Massenspektrum mit IX völlig identisch erschien. Das NMR-Spektrum von X in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ wich nur in wenigen Punkten entscheidend von IX ab: das N-H-Proton bei 2.54 τ war verschwunden, dafür erschien ein N-H-Proton bei 4.02 τ . Das Formylproton gab jetzt ein Signal bei 2.07 τ . Die Protonen $\text{N}^7\text{-CH}_3$ erfuhren ebenfalls eine geringe Verschiebung nach niedrigeren Feldstärken auf 7.05 τ . Wir glauben, daß der Formylrest unter saurer Katalyse von N^8 über einen cyclischen Übergangszustand nach N^7 gewandert war und X die oben angegebene Struktur hat.

Einen Hinweis für die Stellung des Formylrestes in IX und X ergab sich aus dem Vergleich der NMR-Spektren der beiden Verbindungen. Das NMR-Spektrum von X zeigte eine geringe, aber signifikante Verschiebung der $\text{N}^7\text{-CH}_3$ Protonen nach niederen Feldstärken, die durch eine Formylierung der Methylamino-Gruppe erklärt werden könnte. In die gleiche Richtung weist die Verschiebung des Formylprotons

nach niederen Feldstärken. Die ORD-Spektren von X und IX gaben keine Anhaltspunkte dafür, daß es sich bei X um ein Anomeres von IX handelte.

Die Hydrolyse von X und IX mit 2 n HCl bei 100° C führte unter Cyclisierung bei gleichzeitiger Abspaltung des Zuckerrestes zu N¹, N⁷-Dimethylhypoxanthin. Kürzlich berichteten MICHELSON und POCHON ⁴⁾ über die Darstellung von N¹,N⁷-Dimethylinosin durch Methylierung von Inosin mit Dimethylsulfat in einem Gemisch von Wasser Tri-n-Butylamin. Die angewandten Reaktionsbedingungen und das UV-Spektrum der isolierten Substanz lassen jedoch vermuten, daß es sich hier ebenfalls um ein Pyrimidinderivat analog IX oder X handelte. Die Methylierung von Inosin mit Diazomethan oder Dimethylsulfat bei pH 7 führt sehr wahrscheinlich, je nach Bedingungen in verschiedenem Ausmaß, immer zur Bildung dieses N³-Methyl-5-methylamino-6-formamidopyrimidin-4-on-Derivates ⁵⁾.

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel HF₂₅₄ (Merck AG, Deutschland); Lösungsmittel: Chloroform - Methanol = 9:1; R_F-Werte in Klammern V (0.28) VI (0.46) VII (0.0) VIII (0.95) IX (0.54) X (0.38)

Wir danken Herrn Prof. F. Cramer für wohlwollende Unterstützung, Fräulein Ch. Beckers für fleißige Mitarbeit.

LITERATUR

- 1) H. T. Miles J. org. Chem. 26, 4761 (1961)
- 2) J. W. Jones, R. K. Robins J. Amer. Chem. Soc. 85, 193 (1963)
- 3) J. A. Haynes, C. B. Reese, Lord Todd
J. chem. Soc. 1962, 5281
- 4) A. M. Michelson, F. Pochon
Biochim. biophysica Acta 114, 469 (1966)
- 5) Die Resultate einer Untersuchung der Methylierung von Uridyl (3'-5')-inosin werden demnächst veröffentlicht.