

## 48. Inosin-N(1)-oxid-Nucleotide als Komplexbildner

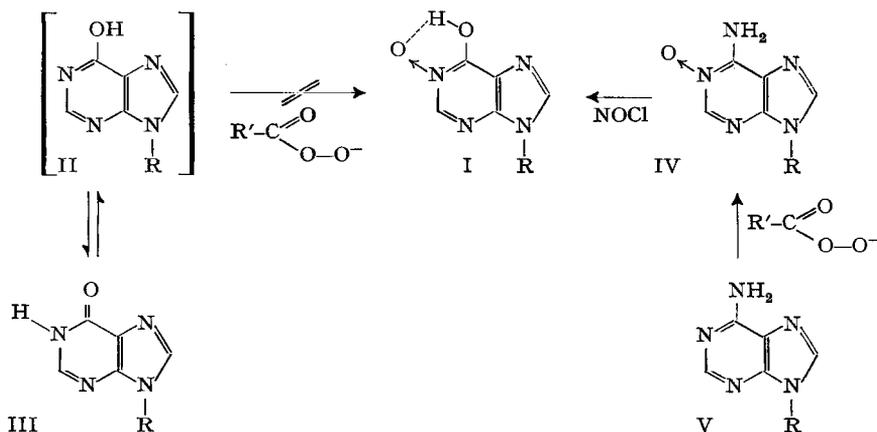
### I. Darstellung von Inosin-N(1)-oxid und dessen 5'-Monophosphat aus Adenosin-N(1)-oxid und dessen 5'-Monophosphat durch Desaminierung mit Nitrosylchlorid

von H. Sigel und H. Brintzinger

(16. I. 65)

Für vergleichende Untersuchungen über Koordinationsisomeren in Metallkomplexen natürlicher und synthetischer Nucleotide [1] benötigen wir auch Inosin-N(1)-oxid-Nucleotide (I). Diese wurden durch direkte N-Oxydierung der entsprechenden Inosin-Derivate bis heute nicht dargestellt; möglicherweise liegt im Tautomerengleichgewicht  $II \rightleftharpoons III$  (vgl. z. B. [2]) kein als Voraussetzung der Oxydation  $II \rightarrow I$  hinreichender Anteil der Iminolform II vor (vgl. auch [3]): Hypoxanthin-N(1)-oxid beispielsweise konnte bis heute nur durch direkte Cyclisierung, z. B. von 4-Aminoimidazol-5-hydroxamsäure mit *o*-Ameisensäure-äthylester, dargestellt werden [4]. Es schien daher gegeben, eine Darstellung von Inosin-N(1)-oxid-Nucleotiden (I) durch Desaminierung der leicht erhältlichen Adenosin-N(1)-oxid-Nucleotide (IV) zu versuchen.

Die übliche Diazotierung und Desaminierung in saurer Lösung erfordert bei Adenin-Derivaten ein mehrstündiges Behandeln mit Nitrit und Essigsäure [5]. Schonendere Reaktionsbedingungen versuchten wir nun - da ja bei der Diazotierung die Reaktion des Nitrosyl-Ions mit der unprotonierten Base erfolgt - durch Diazotierung in nicht-saurem Milieu zu erzielen. Tatsächlich liess sich mit Nitrosylchlorid in Dimethylformamid bei ca.  $-10^\circ$  in einigen Minuten eine praktisch quantitative Desaminierung durchführen. Ein Diazoniumsalz liess sich auch unter diesen Bedingungen nicht



fassen; einer *o*-Diazo-oxid-artigen Stabilisierung des Diazoniumsalzes durch die *o*-N-Oxid-Gruppe, wie sie beispielsweise im Diazoniumsalz des 2-Aminopyridin-N(1)-oxids auftritt [6], steht offenbar die grosse Elektronendefizienz des Purinring-Systems entgegen. Die Hydroxylgruppe der Inosin-N(1)-oxid-Derivate ist mit  $pK_a = 5,4$  saurer als das zweite Proton der Phosphatestergruppe ( $pK'_a = 6,3$ )<sup>1)</sup>, deshalb lässt sich Inosin-N(1)-oxid-5'-monophosphat nur als Mononatriumsalz kristallisieren.

In gleicher Weise wie Adenosin-N(1)-oxid-Nucleotide lassen sich auch Nucleotide des Adenosins selbst desaminieren; die Reaktion verläuft hier merklich langsamer als bei den N-Oxiden; beim Adenosin-5'-triphosphat werden unter den genannten Reaktionsbedingungen nur ca. 10% unter Phosphatabspaltung zersetzt.

Die beschriebene Methode scheint mithin allgemein zur schonenden Desaminierung von Nucleotiden – wie z. B. auch von Adenosin-N(1)-oxid-5'-triphosphat – geeignet zu sein.

### Experimenteller Teil

1. *Adenosin-N(1)-oxid-5'-monophosphat (AMP-N(1)-oxid*<sup>2)</sup>): AMP-N(1)-oxid stellten wir ähnlich wie STEVENS, SMITH & BROWN [7], CRAMER, RANDEKATH & SCHÄFER [8] und KLENOW & FREDERIKSEN [9]<sup>3)</sup> her. Hierbei erwies es sich als günstig, das AMP-N(1)-oxid durch mehrmaliges fraktioniertes Ausfällen (pH 8,5) mit Methanol-Aceton (Wasser:Methanol:Aceton = 10:25:50–75) weitgehend von der Phtalsäure zu befreien. Die endgültige Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf einer Anionenaustauschersäule ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Gradient). Das Ammoniumsalz wurde mit einer Kationenaustauschersäule in das Dinatriumsalz übergeführt und als solches ausgefällt.

Durch mehrtägiges Trocknen im Hochvakuum erhält man Na<sub>2</sub>-AMP-N(1)-oxid mit 1 Mol. Kristallwasser; dieses stark hygroskopische Salz geht in ein besser zu handhabendes Präparat durch Stehenlassen im Exsikkator über gesättigter NaCl-Lösung über; man erhält ein Salz mit 7 Mol. Kristallwasser.

Elementaranalyse für Na<sub>2</sub>-AMP-N(1)-oxid, 1 H<sub>2</sub>O:

C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub> N <sub>5</sub> PNa <sub>2</sub>	Ber. C 28,25	H 3,32	N 16,47	P 7,28%	M.-Gew. 425,2
	Gef. „ 28,44	„ 3,69	„ 16,27	„ 7,13%	„ 427,5 <sup>4)</sup>

Elementaranalyse für Na<sub>2</sub>-AMP-N(1)-oxid, 7 H<sub>2</sub>O:

C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub> N <sub>5</sub> PNa <sub>2</sub>	Ber. C 22,52	H 4,91	N 13,12	P 5,81%	M.-Gew. 533,3
	Gef. „ 22,69	„ 4,71	„ 13,19	„ 5,94%	„ 533 ± 8 <sup>4)</sup>

2. *Inosin-N(1)-oxid*: Einer in Eis/Kochsalz gekühlten Suspension von 500 mg (1,76 mMol) Adenosin-N(1)-oxid<sup>3)</sup> in 10 ml Dimethylformamid wurden drei Pipettenspitzen (ca. 0,5 ml) Nitrosylchlorid (hergestellt nach [10]) und nach 15 Min. noch eine weitere zugefügt. Es ist Gasentwicklung zu beobachten solange noch Festkörper suspendiert ist; nach 15–20 Min. ist eine klare Lösung entstanden. Während 80 Min. liessen wir dann die Lösung sich langsam auf Raumtemperatur erwärmen, kühlten sie wieder in Eis/NaCl ab, fügten 10 ml H<sub>2</sub>O zu und neutralisierten die Lösung mit festem KHCO<sub>3</sub>. Diese Mischung wurde auf eine Anionenaustauschersäule (Amberlite: IRA-400, XE-67 – 35 cm lang, 2,7 cm  $\varnothing$  – Carbonatform) gegeben und die Säule mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis im Waschwasser keine UV.-Absorption mehr festzustellen war. Jetzt wurde mit 2 l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, deren Konzentration linear von 0 bis 4 M anstieg, eluiert (Tropfgeschw. 25 Tr./Min.) und das Eluat in Fraktionen von 18 ml aufgefangen. Die Fraktionen, deren Lösungen im UV. ein Maximum bei 226 nm – die UV.-Absorptionsspektren<sup>5)</sup> von Inosin-N(1)-oxid bei verschiedenen

<sup>1)</sup> Die Bestimmung dieser Aciditätskonstanten zusammen mit den komplexchemischen Untersuchungen dieser beiden Verbindungen wird demnächst veröffentlicht.

<sup>2)</sup> AMP = Adenosin-5'-monophosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; IMP = Inosin-5'-monophosphat; ITP = Inosin-5'-triphosphat.

<sup>3)</sup> Reagenzien: Fa. FLUKA AG, Buchs.

<sup>4)</sup> Bestimmt durch acidimetrische Titration.

<sup>5)</sup> Aufgenommen auf einem BECKMAN-DB-Spektrophotometer.

pH zeigt Fig. 1 – aufwiesen, wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bei 40°/15 Torr auf 30 ml eingengt. Diese Lösung wurde mit stark saurem Kationenaustauscher (MERCK III) neutralisiert, wobei gleichzeitig restliches  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  entfernt wurde; anschliessend wurde sie noch über eine kleine Säule mit demselben Austauscher in die H-Form gebracht. Die nun neutral reagierende Lösung wurde im Rotationsverdampfer (40°/15 Torr) bis fast zur Trockne eingengt, mit Methanol/Aceton versetzt und der weisse, flockige Niederschlag isoliert und im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 137,7 mg (27,5%). IR.-Spektrum<sup>6)</sup>: Fig. 3.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_4$  Ber. C 42,25 H 4,26 O 33,78 N 19,71%  
 Gef. „ 41,97 „ 4,41 „ 33,86 „ 19,07% (0,9% Asche)

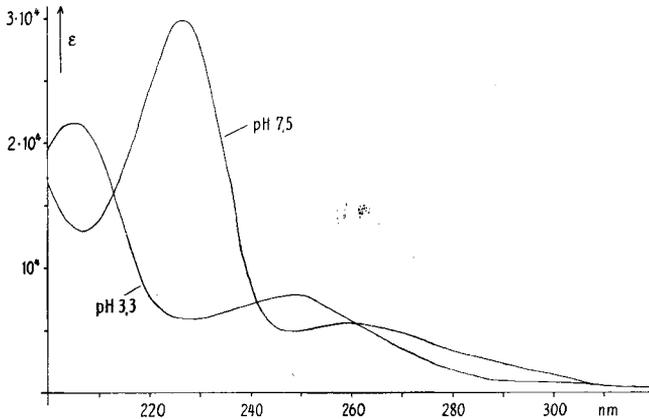


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren einer Lösung von Inosin-N(1)-oxid bei pH 3,3 und 7,5 (1 cm Quarzküvetten)

3. Inosin-N(1)-oxid-5'-monophosphat (IMP-N(1)-oxid<sup>2)</sup>): 500 mg (0,94 mMol) AMP-N(1)-oxid wurden wie unter 2 beschrieben zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen des Eluats bei 226 nm und pH 7 (Proben der Fraktionen + Phosphatpuffer) ist in Figur 2 dargestellt. Hieraus berechnet sich mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{226/\text{pH } 7} = (2,98 \pm 0,08) \cdot 10^4$ ) die Ausbeute zu 0,907 mMol (96,5%).

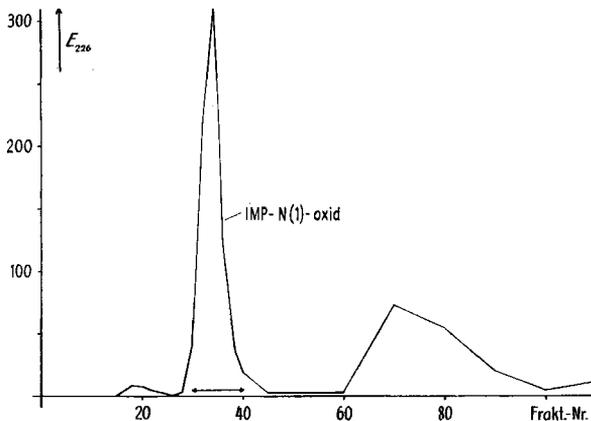


Fig. 2. Anionenaustauscher-Chromatographie des IMP-N(1)-oxid-Reaktionsgemisches: Extinktion der einzelnen Fraktionen (pH 7,0) bei 226 nm

<sup>6)</sup> Aufgenommen auf einem BECKMAN-IR8-Spektrophotometer.

Nachdem die Substanz über Kationenaustauscher in die H-Form gebracht worden war, wurde sofort ein pH von 4,0 eingestellt und das Mononatriumsalz ( $-\text{HPO}_3\text{Na}$ ) mit Methanol/Aceton gefällt. Ausbeute: 351,5 mg (90,5%). Das zur Analyse im Hochvakuum getrocknete Salz enthielt noch 1,5 Mol.  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_{10,5}\text{N}_4\text{PNa}$	Ber. C 29,09	H 3,66	N 13,56	P 7,50%
	Gef. „ 29,43	„ 4,14	„ 13,24	„ 7,29%

Die Substanz ist stark hygroskopisch; bei 3 stdg. Aufbewahren an der Luft entsteht ein weniger hygroskopisches Salz mit 2 Mol.  $\text{H}_2\text{O}$ , das besser zu handhaben ist.

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_{11}\text{N}_4\text{PNa}$	Ber. C 28,45	H 3,82	N 13,27	P 7,34%
	Gef. „ 28,85	„ 4,24	„ 13,07	„ 7,18%

Die UV.-Absorptionsspektren von IMP-N(1)-oxid gleichen denjenigen von Inosin-N(1)-oxid (vgl. Fig. 1). IR.-Spektrum<sup>6)</sup>: Fig. 3.

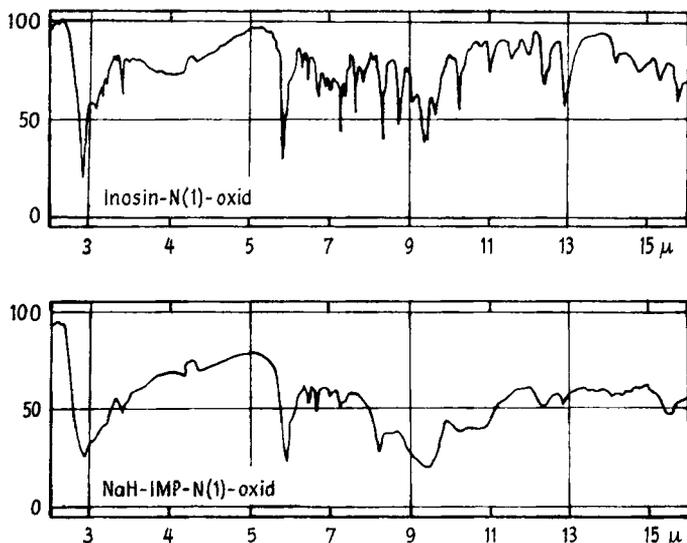


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektren von Inosin-N(1)-oxid und NaH-IMP-N(1)-oxid (je ca. 0,6 mg Substanz in 300 mg KBr)

4. *Weitere Desaminierungen:* Adenosin, AMP und ATP<sup>2)</sup> lassen sich mit Nitrosylchlorid in Dimethylformamid in der beschriebenen Weise, wenn auch langsamer, in Inosin, IMP bzw. ITP<sup>2)</sup> überführen; es vergehen ungefähr 90 Min. (anstatt 15–20), bis sich die Suspension geklärt hat. Die Produkte wurden nicht isoliert, sondern nur durch Vergleich der UV.-Absorptionsspektren mit den bekannten UV.-Spektren der Hypoxanthin-Derivate identifiziert ( $\lambda_{\text{max}} = 248 \text{ nm}$ ). Im Falle der Reaktion  $\text{ATP} \rightarrow \text{ITP}$  ergab eine Phosphatbestimmung [11] nach der Reaktion, dass ATP bzw. ITP bei der Reaktion zu ungefähr 10% hydrolysiert, der Triphosphatrest also noch zu 90% vorhanden war.

Herrn Prof. Dr. H. ERLÉNMEYER danken wir für Anregungen zu dieser Arbeit. Dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT (Dres. H. GYSEL und W. PADOWETZ) verdanken wir die Ausführung der Elementaranalysen. Fr. KARIN RADICKE hat bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit mit dankenswerter Zuverlässigkeit mitgewirkt. – Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG sei auch an dieser Stelle für die Unterstützung unserer Arbeiten gedankt.

## SUMMARY

The hitherto unknown compounds inosine N(1)-oxide and inosine N(1)-oxide 5'-monophosphate have been synthesized by deamination of adenosine N(1)-oxide and its monophosphate with nitrosyl chloride in dimethylformamide. This method is also useful for deamination of adenosine, adenosine 5'-monophosphate and adenosine 5'-triphosphate.

Institut für Anorganische Chemie  
der Universität Basel

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. W. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER & H. ERLIENMEYER, *Helv.* **47**, 992 (1964); H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **47**, 1701 (1964).  
 [2] S. F. MASON, in «Ciba Foundation Symposium: The Chemistry and Biology of Purines», I. & A. Churchill Ltd., London 1957, S. 60.  
 [3] F. CRAMER & H. SEIDEL, *Biochim. biophysica Acta* **72**, 157 (1963).  
 [4] E. C. TAYLOR, T. S. OSDENE, E. RICHTER & O. VOGL, in «Ciba Foundation Symposium: The Chemistry and Biology of Purines», I. & A. Churchill Ltd., London 1957, S. 20.  
 [5] S. P. COLOWICK & N. O. KAPLAN, «Methods in Enzymology III», Academic Press Inc., New York 1957, S. 873 ff.  
 [6] A. R. KATRITZKY, *J. chem. Soc.* **1957**, 191.  
 [7] M. A. STEVENS, H. W. SMITH & G. B. BROWN, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1734 (1959).  
 [8] F. CRAMER, K. RANDEATH & E. A. SCHÄFER, *Z. Naturforsch.* **18b**, 163 (1963); *Biochim. biophysica Acta* **72**, 150 (1963).  
 [9] H. KLENOW & S. FREDERIKSEN, *Biochim. biophysica Acta* **52**, 384 (1961).  
 [10] J. R. MORTON & H. W. WILCOX, *Inorg. Syntheses* **4**, 48 (1953); G. BRAUER, «Handbuch der präparativen anorganischen Chemie», Ferdinand Enke Verl., Stuttgart 1954, S. 387.  
 [11] A. A. HIRATA & D. APPLEMAN, *Analyt. Chemistry* **31**, 2097 (1959).

## 49. Zur Kenntnis der Hexaalkylbenzole

## 5. Mitteilung

## Über die Struktur der Dienaddukte des Hexaäthylidencyclohexans

von H. Hopff und G. Kormany

(19. I. 65)

Hexaäthylidencyclohexan lagert trotz seinen 3 konjugierten Doppelbindungen überraschenderweise nur 2 Mol. von Philodienen an, wie in einer früheren Mitteilung [1] gezeigt wurde. Für die Struktur des Adduktes mit Maleinsäureanhydrid kommen die

