

## Reaktionen mit Dimethylcarbonat. 5 [1] Methylierung der Pyrimidin-Basen der Nucleinsäuren

Reactions with Dimethyl Carbonate. 5 [1]  
Methylation of the Pyrimidine Bases  
of Nucleic Acids

Helmut Jansen in de Wal, Manfred Lissel\*

Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld,  
Universitätsstraße 25, D-4800 Bielefeld 1

Z. Naturforsch. **44b**, 863–865 (1989);  
eingegangen am 14. November 1988 1. März 1989

Dimethyl Carbonate, Methylations,  
Pyrimidine Bases of Nucleic Acids

The methylation of the pyrimidine bases of nucleic acids by dimethyl carbonate is described compared to dimethyl sulphate. The reaction needs higher temperature, a base and the help of 18-crown-6 and DMF as cosolvent.

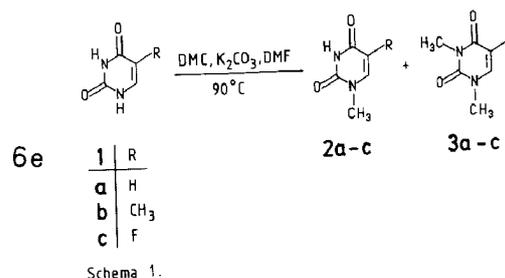
Im Rahmen eines Forschungsprojektes untersuchen wir die Methylierungseigenschaften von Dimethylcarbonat [2] und haben über die Methylierung von Mercaptanen und Phenolen [3], Imidazolen [4] und Aminen [5] berichtet. In den beschriebenen Reaktionen ist Dimethylcarbonat eine Alternative zum hochgiftigen Gefahrstoff Dimethylsulfat [6]. Daß die Verwendung von Dimethylcarbonat als Ersatz für Dimethylsulfat sinnvoll sein kann, zeigt die Gegenüberstellung der toxikologischen Daten [7] für die akute Wirkung. Für Dimethylcarbonat ist LD<sub>50</sub> (Ratte) für die orale Gabe 12800 mg/kg, für Dimethylsulfat 440 mg/kg [8]. Die kanzerogene, mutagene und teratogene Wirkung des Dimethylsulfats erfordern seine Einstufung als krebserzeugenden Gefahrstoff, dessen Verwendung zu vermeiden ist [6]. Über Dimethylcarbonat ist keine Literatur publiziert, die auf diese Gefahren hinweist; da es sich um ein Methylierungsmittel handelt, sind diese *a priori* aber denkbar.

Vor diesem Hintergrund haben wir die Reaktion der Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren mit Dimethylcarbonat untersucht und gefunden, daß bei vergleichbarer Ausbeute und Aufarbeitung höhere Temperatur und längere Reaktionszeit erforderlich sind.

## Methylierungen

Uracil (**1a**), Thymin (**1b**), 5-Fluor-uracil (**1c**)

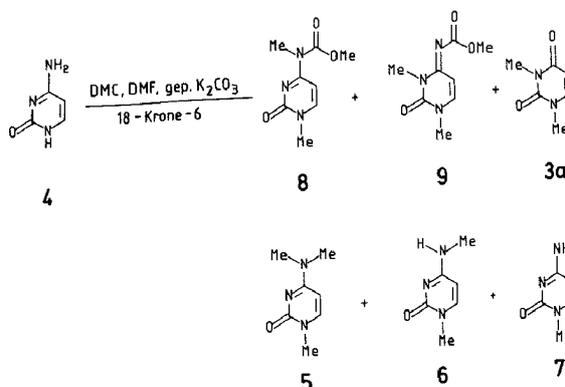
Unter den Standardbedingungen (Dimethylcarbonat, Kaliumcarbonat, 18-Krone-6, DMF, 15 h, 90 °C) reagiert Dimethylcarbonat bei 90 °C mit Uracil zu 74% 1,3-Dimethyluracil (**3a**) und mit Thymin zu 79% 1,3-Dimethylthymin (**3b**), 5-Fluor-uracil liefert 25% (**3c**).



Mono-N- oder O-Methylierung wird in Gegenwart von 18-Krone-6 nicht beobachtet. Ohne Zusatz von Dimethylformamid als Cosolvens können nur geringere Ausbeuten erreicht werden. Die Reaktion ohne Zusatz von 18-Krone-6 führt unter sonst gleichen Bedingungen zu nur 21% **3a** bzw. 20% **3b**, daneben werden 5% **2a** bzw. 1% **2b** erhalten. Nach Absenkung der Reaktionstemperatur auf 40 °C wird keine Methylierung beobachtet. Dimethylsulfat reagiert mit **1a** bei 100 °C unter Bildung von 94% **3a** [9].

## Cytosin 4

Unter den Standardbedingungen ergibt die Reaktion von Cytosin mit Dimethylcarbonat ein Gemisch aus sechs Substanzen. Bei einer Reaktionstemperatur unter 90 °C oder in Abwesenheit von Kaliumcarbonat findet keine Reaktion statt.



\* Sonderdruckanforderungen an Dr. M. Lissel.

Hauptreaktion ist die Methylierung unter Bildung von **5** (12%), **6** (30%), **7** (12%). Daneben wurden **8** (29%), **9** (10%) und **3a** (5%) isoliert.

Die Reaktion mit Dimethylcarbonat bietet einen einfachen Zugang zu den aminomethylierten Cytosinderivaten, die mit anderen Methylierungsmitteln in einstufiger Reaktion nicht erhalten werden [10]. Die Umsetzung von Cytosin mit Dimethylsulfat liefert bei 100 °C nach 1 h bzw. bei 37 °C nach 20 h ein Gemisch, aus dem chromatographisch 25% 1-Methylcytosin (**7**) und 5% 1,3-Dimethylcytosin isoliert wurden [11].

### Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi bestimmt und sind nicht korrigiert. Siedepunkte bzw. Sublimationspunkte beziehen sich auf die Luftbadtemperatur einer Kugelrohrdestillationsanlage. – <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät Bruker AM 300 aufgenommen. – Die UV-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer 34 der Fa. Beckman aufgenommen. Die Elementaranalyse erfolgte mit dem Gerät 240 der Fa. Perkin Elmer. – Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte auf mit Kieselgel 60 der Fa. Merck beschichteten Platten, die mit Methylenchlorid/Methanol (9,5/0,5) entwickelt wurden. Für die Mitteldruckchromatographie wurden Lobar®-Fertigsäulen der Fa. Merck, beschickt mit Lichroprep Si 60, verwendet; ferner mit Kieselgel 60 der Fa. Merck beschickte 50×4-cm-Säulen der Fa. Büchi.

#### Allgemeine Vorschrift für die Methylierung mit Dimethylcarbonat

5 mmol der Pyrimidinbase werden mit 2,0 g (15 mmol) gepulvertem Kaliumcarbonat, 24,6 mg (0,1 mmol) 18-Krone-6, 5 ml (5,3 g; 60 mmol) Dimethylcarbonat und 5 ml Dimethylformamid versetzt und 15 h bei 90 °C gerührt. Zum Aufarbeiten wird mit Chloroform versetzt, dann abgesaugt. Der Rückstand wird mehrmals mit Chloroform und Methanol gewaschen und ergibt nach Neutralisation unumgesetztes Edukt. Die organische Phase wird eingeeengt und ergibt das Methylierungsprodukt.

#### Uracil (**1a**)

Nach der allgemeinen Vorschrift werden 560 mg Uracil (**1a**) umgesetzt. Aus der organischen Phase kristallisieren 520 mg 1,3-Dimethyluracil (**3a**) (Ausb. 74%), Schmp. 120–122 °C (Lit. [9] Schmp. 124 °C); Sublp.<sub>0,1</sub> 100–110 °C.

Nach der allgemeinen Vorschrift, jedoch ohne Zusatz von 18-Krone-6, werden, neben unumgesetztem Edukt, 21% (**3a**) und 31 mg 1-Methyluracil (**1a**) (Ausb. 5%) erhalten. Schmp. 234 °C (Lit. [12] Schmp. 232–234 °C).

#### Thymin (**1b**)

Nach der allgemeinen Vorschrift werden 630 mg Thymin (**1b**) umgesetzt. In der organischen Phase kristallisieren 547 mg 1,3-Dimethylthymin (**3b**) (Ausb. 79%), Schmp. 152–155 °C (Lit. [13] Schmp. 154 °C).

Nach der allgemeinen Vorschrift, jedoch ohne Zusatz von 18-Krone-6, werden, neben unumgesetztem Edukt, 20% **3b** und 7 mg 1-Methylthymin (**1b**) (Ausb. 1%) erhalten. Schmp. 287 °C (Lit. [14] Schmp. 282 °C).

#### 5-Fluor-uracil (**1c**)

Nach der allgemeinen Vorschrift werden 650 mg (5 mmol) **1c** umgesetzt. Neben 70% unumgesetztem **1c** wird 1,3-Dimethyl-5-fluoruracil (**3c**) (Ausb. 25%) isoliert. Schmp. 128 °C (Lit. [13] Schmp. 130 °C).

#### Cytosin (**4**)

Nach der allgemeinen Vorschrift werden 1 g (9 mmol) **4** mit 3 g (22,5 mmol) gepulvertem Kaliumcarbonat, 24,5 mg (0,1 mmol) 18-Krone-6, 10 ml (10,6 g; 120 mmol) Dimethylcarbonat und 2 ml Dimethylformamid versetzt und 10 h bei 90 °C gerührt. Aus der organischen Phase werden 970 mg gelbes Öl erhalten. Durch Mitteldruckchromatographie werden isoliert:

1. Fraktion: 280 mg 1,7-Dimethyl-7-carbomethoxycytosin (**8**) (Ausb. 29%), Schmp. 114 °C.

$C_8H_{11}N_3O_4$  (197,19)

Ber. C 48,73 H 5,62 N 21,31,

Gef. C 48,87 H 5,52 N 20,98.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,42 (s; 3H; N<sup>1</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,47 (s; 3H; N<sup>7</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,79 (s; 3H; O-CH<sub>3</sub>), 6,69 (d, J = 8 Hz; 1H; C<sup>5</sup>-H), 7,04 (d, J = 8 Hz; 1H; C<sup>6</sup>-H).

UV (0,1N HCl): max 303, 247 nm; min 270, 231 nm.

(H<sub>2</sub>O): max 276 nm; min 247 nm.

(0,1N NaOH): max 274; min 251 nm.

2. Fraktion: 47 mg 1,3-Dimethyluracil (**3a**) (Ausb. 5%), Schmp. 120 °C.

3. Fraktion: 93 mg 1,3-Dimethyl-7-carbomethoxycytosin (**9**) (Ausb. 10%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,45 (s; 3H; N<sup>1</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,50 (s; 3H; N<sup>3</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,84 (s; 3H; O-CH<sub>3</sub>), 7,31

(d,  $J = 7,5$  Hz; 1H; C<sup>5</sup>-H), 7,45 (d,  $J = 7,5$  Hz; 1H; C<sup>6</sup>-H).

UV (0,1N HCl): max 309, 237 nm; min 264, 225 nm.  
(H<sub>2</sub>O): max 299, 243 nm; min 260, 237 nm.  
(0,1N NaOH): max 299, 243 nm; min 259 nm.

4. Fraktion: 115 mg 1,7,7-Trimethyl-cytosin (**5**) (Ausb. 12%), Schmp. 176–179 °C (Lit. [10] Schmp. 179 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):  $\delta = 2,84$  (s; 6H; N<sup>7</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,11 (s; 3H; N<sup>1</sup>-CH<sub>3</sub>), 5,84 (d,  $J = 7,5$  Hz; 1H; C<sup>5</sup>-H), 7,29 (d,  $J = 7,5$  Hz; 1H; C<sup>6</sup>-H).

5. Fraktion: 298 mg 1,7-Dimethyl-cytosin (**6**) (Ausb. 30%), Schmp. 179 °C (Lit. [10] Schmp. 179 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):  $\delta = 2,63$  (s; 3H; N<sup>7</sup>-CH<sub>3</sub>), 3,10 (s; 3H; N<sup>1</sup>-CH<sub>3</sub>), 5,64 (d,  $J = 7,2$  Hz; 1H; C<sup>5</sup>-H), 7,18 (d,  $J = 7,2$  Hz; 1H; C<sup>6</sup>-H).

6. Fraktion: 120 mg 1-Methyl-cytosin (**7**) (Ausb. 12%), Schmp. 265 °C (Lit. [15] Schmp. 265–270 °C).

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung der Arbeiten.

- 
- [1] Teil 4: M. Lissel und A. R. Rohani-Dezfuli, Chem.-Ztg. **111**, 83 (1987).  
[2] Review mit 7 Zitaten: U. Romano und F. Rivetti, Chim. Oggi **1984** (9), 37.  
[3] M. Lissel, St. Schmidt und B. Neumann, Synthesis **1986**, 382.  
[4] M. Lissel, Liebigs Ann. Chem. **1987**, 77.  
[5] M. Lissel, A. R. Rohani-Dezfuli und G. Vogt, J. Chem. Res., eingereicht.  
[6] Verordnung über gefährliche Stoffe (Gefahrstoffverordnung – GefStoffV), Bundesgesetzblatt Teil I, Nr. 47, S. 1470 vom 5. Sept. 1986.  
[7] Eine ausführliche Diskussion s. [4].  
[8] H. Druckrey, R. Preussmann, N. Nashed und S. Ivanovich, Z. Krebsforsch. **68**, 103 (1966).  
[9] D. Davidson und O. Baudisch, J. Am. Chem. Soc. **48**, 2379 (1926).  
[10] G. W. Kenner, C. B. Reese und A. R. Todd, J. Chem. Soc. **1955**, 855.  
[11] P. Brookes und P. D. Lawley, J. Chem. Soc. **1962**, 1348.  
[12] R. C. Weast (Hrsg.), „Handbook of Chemistry and Physics“, 64. Aufl. 1983–1984, CRC-Press, Boca Raton.  
[13] M. Hedayatullah, J. Heterocyclic Chem. **18**, 339 (1981).  
[14] K. Yamauchi und T. Tanabe, J. Org. Chem. **41**, 3691 (1976).  
[15] T. T. Sakai, A. L. Polotti und D. V. Santi, J. Heterocycl. Chem. **5**, 849 (1986).