

Wolfgang Kampe

Darstellung und Reaktionen von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen

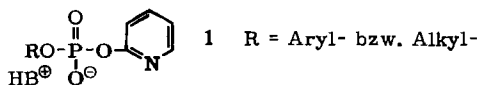
(Eingegangen am 4. August 1965)

■

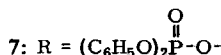
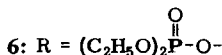
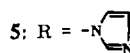
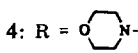
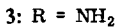
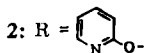
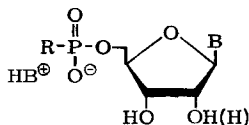
Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester (2) werden durch Veresterung von Nucleosid-5'-phosphorsäuren und α -Pyridon mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid in guten Ausbeuten erhalten. Durch Umsetzung von 2 mit Zuckerphosphorsäuren und Orthophosphorsäure unter milden Bedingungen entstehen Nucleotid-Coenzyme bzw. Nucleosid-5'-pyrophosphorsäuren ebenfalls in guten Ausbeuten. Die Reaktivitäten von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern und den entsprechenden Morpholiden werden auf Grund von Hydrolysedaten qualitativ miteinander verglichen.

■

In zwei vorangegangenen Arbeiten²⁾ wurde durch Untersuchungen über Darstellung und Reaktionen von einfachen Phosphorsäure- α -pyridylestern (1) deren Fähigkeit zur Übertragung des Phosphorsäurerestes unter milden Bedingungen nachgewiesen.



Nunmehr berichten wir über einige Ergebnisse zur Darstellung der interessanteren Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester (2) und über ihre Verwendung zur Synthese von Nucleotid-Coenzymen. (B = Verschiedene Nucleobasen.)



Andere Nucleotidderivate, deren Phosphorsäurerest in ähnlicher Weise aktiviert ist und somit in Gegenwart einer zweiten Phosphorsäure die Knüpfung einer Pyrophosphorsäure-Bindung, das heißt die Darstellung von Nucleotid-Coenzymen, Nucleosid-diphosphorsäuren

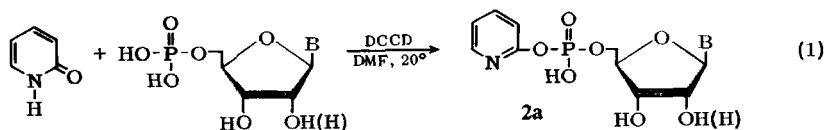
¹⁾ VII. Mitteil. „Reaktive Ester heterocyclischer Alkohole“; VI. Mitteil.: *K.-H. Scheit* und *W. Kampe*, Chem. Ber. **98**, 1045 (1965).

²⁾ 2a) *W. Kampe*, Chem. Ber. **98**, 1031 (1965); 2b) *W. Kampe*, ebenda **98**, 1038 (1965).

usw. ermöglicht, sind die Amide³⁾ **3**, die Morpholide⁴⁾ **4**, die Imidazole⁵⁾ **5** sowie die Triester **6**⁶⁾ und **7**⁷⁾. Unter diesen wurden besonders die Morpholide von mehreren Autoren zur Darstellung zahlreicher Nucleotid-Coenzyme verwendet; neuerdings gelang *Moffatt*⁸⁾ eine ergiebige Synthese von Nucleosid-5'-triphosphorsäuren aus den entsprechenden Morpholiden und anorganischer Pyrophosphorsäure.

A. Darstellung von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern

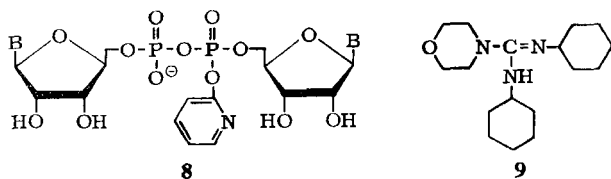
Als Methode der Wahl zur Darstellung von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern hat sich die Veresterung von Nucleosid-5'-phosphorsäure und α -Pyridon mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) gemäß Gl. (1) erwiesen.



B = Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin

Als Lösungsmittel ist besonders Dimethylformamid (DMF) geeignet. Schon nach 2–4stdg. Reaktion bei Raumtemperatur können die Ansätze aufgearbeitet werden. Die Reaktionen verlaufen im allgemeinen zwar quantitativ (eine Ausnahme bildet die Cytidin-5'-phosphorsäure, bei der die Umsetzung auch nach 12–15 Stdn. nur zu 85–90% abließ), jedoch konnte beim Aufarbeiten eine geringfügige Hydrolyse von **2a** niemals vermieden werden. Außerdem bildet sich mitunter, allerdings nur in Spuren, ein Nebenprodukt, das bei Papierchromatographie im Laufmittel I zwischen Nucleosid-5'-phosphorsäure und Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester läuft.

Dieses Nebenprodukt wurde nicht genauer untersucht, doch dürfte ihm auf Grund seines Verhaltens bei der Anionenaustauscherchromatographie (es wird bei ungefähr derselben Salzkonzentration eluiert wie die Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester, ist also ein Mono-Anion) und in Analogie zu den Befunden von *Moffatt* und *Khorana*⁴⁾ die Konstitution **8** zukommen.



Aus den genannten Gründen muß der Aufarbeitung eine säulenchromatographische Reinigung folgen, am einfachsten und schnellsten durch Anionenaustauscherchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat. So gelang in Ausbeuten von 80–85% die Isolierung

³⁾ V. M. Clark, G. W. Kirby und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1497.

⁴⁾ J. G. Moffatt und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **83**, 649 (1961).

⁵⁾ F. Cramer und H. Neunhoeffer, Chem. Ber. **95**, 1664 (1962).

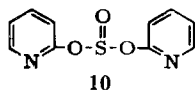
⁶⁾ F. Cramer und R. Wittmann, Chem. Ber. **94**, 328 (1961).

⁷⁾ A. M. Michelson, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **91**, 1 (1964).

⁸⁾ J. G. Moffatt, Canad. J. Chem. **42**, 599 (1964).

von **2a** in Form der Salze des Guanidinderivates **9** (Morpholin-carbonsäure-(4)-[*N,N'*-dicyclohexyl-amidin]); die Salze dieser Base sind in Pyridin sehr gut löslich⁴⁾, was für die weitere Reaktion von Bedeutung ist; s. auch Abschnitt B.

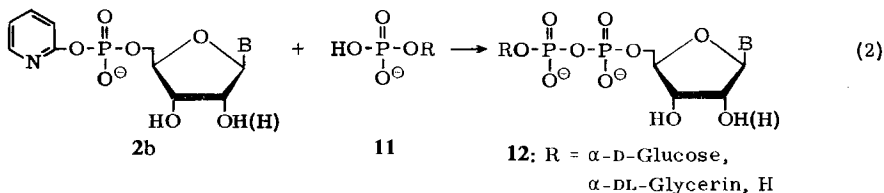
Versuche, **2a** durch Umsetzung von Di- α -pyridylcarbonat und den Bis-triäthylammoniumsalzen von Nucleosid-5'-phosphorsäuren darzustellen, blieben im wesentlichen erfolglos, da meistens kein quantitativer Reaktionsablauf zu erreichen war. Wurde erwärmt, um die Reaktion zu beschleunigen, so entstanden mehrere, zum Teil fluoreszierende Nebenprodukte. Dagegen erhält man mit Di- α -pyridylsulfid (**10**), einem außerordentlich reaktiven Ester, und



den Bis-triäthylammoniumsalzen von Nucleosid-5'-phosphorsäuren (Ausnahme: Guanosin-5'-phosphorsäure) schon nach 2–3 Stdn. bei Raumtemperatur in DMF fast quantitativ **2a**. Es ist aber bis jetzt trotz säulenchromatographischer Reinigung nicht gelungen, **2a** völlig von dem bei der Aufarbeitung entstehenden Sulfid zu befreien. Diese beiden Methoden zur Darstellung von **2a** wurden daher nicht in den Versuchsteil aufgenommen.

B. Reaktionen von **2** mit Phosphorsäuren. Synthese von Nucleotid-Coenzymen

Während bei der Darstellung der einfachen, unsymmetrisch substituierten Pyrophosphorsäure-diaryl- bzw. -alkylester (s. V. Mittel. 2^{b)}) die zweite Komponente in Form freier Phosphorsäure-monoester eingesetzt wird, ist dies bei Reaktionen von **2** mit Zuckerphosphorsäuren (α -D-Glucose-1-phosphorsäure, α -DL-Glycerin-phosphorsäure) nicht mehr möglich, da diese als freie Säuren in Pyridin unlöslich sind. Diese Zuckerphosphorsäuren, wie auch Orthophosphorsäure und anorganische Pyrophosphorsäure, müssen daher als in Pyridin gut lösliche Mono-tri-*n*-butylammoniumsalze verwendet werden. Die Folge sind beträchtlich verlängerte Reaktionszeiten (3–5 Tage, Raumtemperatur; 2–3 Tage, 25°).

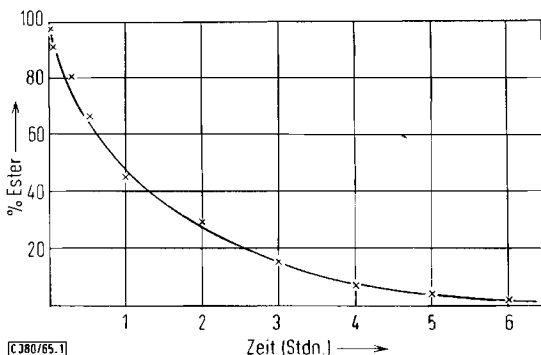


Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester und **11** (Gl. 2) werden im allgemeinen im Verhältnis 1:3 in Pyridin unter absolutem Feuchtigkeitsausschluß umgesetzt. Die Produkte werden durch Anionenaustauscherchromatographie gereinigt und die Ausbeuten (60–80%) UV-spektroskopisch bestimmt; s. Tab. 3. Als Lösungsmittel für die Reaktion (2) kommt allein Pyridin in Frage. In anderen Lösungsmitteln, wie DMF oder Dimethylsulfoxyd, verlaufen die Umsetzungen nur sehr langsam. Daher blieben Versuche, die in Pyridin nicht sehr stabilen⁹⁾ Nucleosid-5'-triphosphorsäuren darzustellen, erfolglos; sie entstehen dabei nur in geringen Ausbeuten.

⁹⁾ N. E. Wehrli, D. L. M. Verheyden und J. G. Moffatt, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1254 (1964).

C. Saure Hydrolyse

Um schließlich einen Anhaltspunkt für den Vergleich der Reaktivitäten von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern (**2**) und den entsprechenden Morpholiden **4** zu erhalten, haben wir die Hydrolysegeschwindigkeit des Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylesters in $n/10$ HCl bei 20° gemessen.



Hydrolyse von Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester

Die Halbwertszeit liegt danach bei etwa 50 Min., während der Zerfallskurve des Morpholids⁵⁾ ($n/10$ H₂SO₄, Raumtemperatur) eine Halbwertszeit von 5–6 Min. zu entnehmen ist. Die Reaktivitäten bei der Hydrolyse verhalten sich also wie 1:10. Diese Relationen gelten aber nicht mehr für Umsetzungen der beiden Verbindungen mit Trialkylammoniumorthophosphat bzw. den entsprechenden Salzen von Zuckerphosphaten in Pyridin, denn auch für die Morpholide werden Reaktionszeiten von 3–5 Tagen (Raumtemperatur) angegeben. Die Erklärung für diese Diskrepanz ist vielleicht darin zu suchen, daß bei der protonenkatalysierten Hydrolyse naturgemäß die unterschiedlichen Basizitäten, d. h. die Protonierbarkeiten der Stickstoffatome von Morpholin und Hydroxypyridin eine Rolle spielen, während die Umsetzungen von **2** bzw. **4** mit Phosphorsäure-Anionen in Pyridin wahrscheinlich als nucleophile Reaktionen, bei denen die Protonenkatalyse keine Rolle spielt, aufzufassen sind.

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Cramer für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit, Fräulein H. Stöters für überaus fleißige und geschickte Durchführung der Experimente.

Beschreibung der Versuche

A. Allgemeine Methoden

1. *Dünnschichtchromatographie*: Die Bildung der Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester wurde dünnschichtchromatographisch auf Celluloseplatten verfolgt. Platten: 10 × 20 cm, Cellulose: MN 300 Macherey, Nagel u. Co., Laufmittel: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2). Entwicklungsdauer: 1–2 Std. Dabei hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Platten vor dem Auftragen der Probelösungen mit dem gleichen Laufmittel (7:1:2) vorzuentwickeln, um Verunreinigungen aus der Schicht herauszuwaschen. Dadurch wird die Trennwirkung erhöht und die Schwanzbildung vermindert.

2. *Papierchromatographie*: Aufarbeitung und Reinheit der dargestellten Verbindungen wurden papierchromatographisch geprüft. Alle Chromatogramme (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b gewaschen) wurden absteigend in folgenden Laufmitteln entwickelt: I, Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2); II, Äthanol/1*m* Ammoniumacetat pH 7.5 (5:2). R_F -Werte s. Tab. 1.

Tab. 1. R_F -Werte für die Papierchromatographie von Nucleosid-5'-phosphorsäuren und Derivaten

	Laufmittel	
	I	II
Adenosin-5'-phosphorsäure	0.11	0.15
Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.48	0.54
Adenosin-5'-pyrophosphorsäure	—	0.07
<i>P</i> -Adenosin-5'- <i>P'</i> - α -D-glucose-1-pyrophosphorsäure	—	0.20
Guanosin-5'-phosphorsäure	0.06	0.065
Guanosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.34	0.41
<i>P</i> -Guanosin-5'- <i>P'</i> - α -D-glucose-1-pyrophosphorsäure	—	0.11
Uridin-5'-phosphorsäure	0.09	0.14
Uridin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.42	0.59
Uridin-5'-pyrophosphorsäure	—	0.07
<i>P</i> -Uridin-5'- <i>P'</i> - α -D-glucose-1-pyrophosphorsäure	—	0.21
Cytidin-5'-phosphorsäure	0.11	0.13
Cytidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.49	0.52
Cytidin-5'-pyrophosphorsäure	—	0.07
<i>P</i> -Cytidin-5'- <i>P'</i> -DL-glycerin-1-pyrophosphorsäure	—	0.23
Thymidin-5'-phosphorsäure	0.18	0.20
Thymidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.58	0.65
<i>P</i> -Thymidin-5'- <i>P'</i> - α -D-glucose-1-pyrophosphorsäure	—	0.23
α -Pyridon	0.72	0.77

3. *Analysen*: Die Bestimmung des Gesamtphosphors der Nucleotid-Coenzyme erfolgte nach der Methode von *King*¹⁰⁾, Glucose wurde nach *Park* und *Johnson*¹¹⁾ bestimmt. Diese Analysen wurden mit den bei der säulenchromatographischen Reinigung der Reaktionsansätze anfallenden reinen Produktfraktionen ausgeführt, nachdem vorher neutralisiert und der Gehalt UV-spektroskopisch ermittelt worden war. Auf eine Isolierung wurde verzichtet, da fast alle der hier dargestellten Nucleotid-Coenzyme bereits von anderen Autoren synthetisch erhalten und charakterisiert worden waren. Lediglich für *P*-Adenosin-5'-*P'*- α -D-glucose-1-pyrophosphorsäure lagen unseres Wissens bisher noch keine genauen Werte vor. Diese wurde daher isoliert und entsprechend analysiert.

4. *Lösungsmittel und sonstige Ausgangsmaterialien*: Pyridin wurde destilliert und über Calciumhydrid aufbewahrt. Dimethylformamid, das bei der Darstellung der Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester als Lösungsmittel diente, destillierte man vorher über P_2O_5 . Es wurde jedoch nicht über Calciumhydrid aufbewahrt, da sich mit der Zeit möglicherweise Dimethylamin bildet, welches als starke Base die Veresterung mit Hilfe von DCCD stört, unter Umständen sogar verhindert.

10) *E. J. King*, *Biochem. J.* **26**, 292 (1932).

11) *J. T. Park* und *M. J. Johnson*, *J. biol. Chemistry* **181**, 149 (1949).

Die Nucleosid-5'-phosphorsäuren stammten von der Firma Zellstoff Waldhof, Mannheim, α -D-Glucose-1-phosphorsäure von der Firma Boehringer, Mannheim-Waldhof, DL-Glycerin-1-phosphorsäure von der Firma SIGMA, Chemical Company, und α -Pyridon von der Firma Chemische Fabrik Weyl, Mannheim-Waldhof. Letzteres wurde durch Umkristallisieren aus Acetonitril gereinigt. Das Einengen der Lösungsmittel erfolgte im Rotationsverdampfer i. Vak.

B. Darstellung von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern

Allgemeine Vorschrift: Zu ca. 1 mMol (das genaue Quantum wurde jeweils UV-spektroskopisch bestimmt) gefriergetrockneter *Nucleosid-5'-phosphorsäure* wurden nacheinander 8 bis 10 ccm absol. Dimethylformamid, 950 mg (10.0 mMol) α -Pyridon und 1.03 g (5 mMol) DCCD gegeben. Wenn sich nicht alles löste, wie bei Adenosin- und Cytidin-5'-phosphorsäure, wurde geschüttelt. Schon nach wenigen Minuten begann die Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff. Nach 2–4 Stdn. bei Raumtemperatur war dünnschichtchromatographisch meistens kein oder nur wenig Ausgangsmaterial nachzuweisen. Nun wurde mit 0.4 ccm Triäthylamin versetzt und das Lösungsmittel i. Vak. (0.1 Torr, 25–30°) entfernt. Den öligen Rückstand nahm man mit je 15 ccm Wasser und Chloroform, denen etwas Triäthylamin zugesetzt war, auf. Die Chloroformphase enthielt überschüss. DCCD und α -Pyridon, die Wasserphase Produkt und noch etwas α -Pyridon. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit der gleichen Menge Chloroform ausgeschüttelt, anschließend vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, gut nachgewaschen und i. Vak. auf 10–15 ccm eingengt. Diese Lösung, die außer dem gewünschten Produkt noch etwas α -Pyridon und während der Aufarbeitung entstandenes Ausgangsmaterial sowie Spuren von 8 enthielt, wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2.5 × 90 cm; Hydrogencarbonatform) gegeben. Die Säule wurde zunächst mit Wasser gewaschen, bis die UV-Absorption des Waschwassers bei 253 m μ vernachlässigbar war. (Noch vorhandenes α -Pyridon kam nach etwa 1–1.5 Säulenvolumina.) Dann eluierte man mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (pH 7.5), Vorratsgefäß: 2.5 l 0.20 m [(C₂H₅)₃NH]HCO₃; Mischgefäß: 2.5 l Wasser.

Die Tropfgeschwindigkeit variierte je nach Ansatz zwischen 1.0 und 1.5 ccm/Min., Fraktionswechsel nach je 15 Min. Die Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester wurden mit etwa 0.05–0.08 m Salzlösung eluiert, Guanosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester mit ca. 0.08–0.10 m Salzlösung. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und i. Vak. (12 Torr, 25–30°) eingengt. Um Spuren Triäthylammoniumhydrogencarbonat zu entfernen, setzte man mehrmals einige ccm Methanol zu und engte i. Vak. ein, zuletzt mit einer Ölpumpe. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet, mit 3–4 ccm Methanol aufgenommen und ca. 1 mMol Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidin] zugegeben. Zur Entfernung von Triäthylamin wurde erneut eingengt, dann mit 3 ccm Methanol aufgenommen und das Produkt durch Eintropfen in 150–200 ccm trockenen Äther gefällt. Die Fällung wurde zentrifugiert, mit Äther gewaschen, noch ätherfeucht in einen Exsikkator gebracht und durch vorsichtiges Evakuieren vom Äther befreit. Der Thymidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester wurde als Ammoniumsalz gefällt, da sein Salz mit Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidin] in Äther etwas löslich zu sein scheint. Die Verbindungen sind farblose, nichtkristalline Substanzen und, im Kühlen aufbewahrt sowie vor sauren Agenzien geschützt, wahrscheinlich unbegrenzt haltbar. Nach dieser Vorschrift wurden die in Tab. 2 aufgeführten Verbindungen erhalten.

Reinigung von Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylestern durch Adsorptionschromatographie: Hierbei wurden Ansätze mit 2–3 mMol Nucleosid-5'-phosphorsäure nach der Reaktion mit entsprechenden Mengen DCCD und α -Pyridon in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und anschließend auf eine Cellulose-Säule (4.3 × 120 cm), die vorher mit dem Elutions-

mittel (Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser 7:1:2) äquilibriert worden war, gegeben. Dann eluierte man mit einer Tropfgeschwindigkeit von 0.25–0.35 ccm/Min. Ausb. 70–80%. Wegen des großen Zeitaufwandes wurde diese Reinigungsmethode wieder aufgegeben.

Tab. 2. Dargestellte Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester

R (mMol)	% Ausb. (mg)	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse				λ_{\max}^* $\mu\mu$ (ϵ)
			C	H	N	P	
5'-Adenosin (1.0)	82.0 (601)	$C_{17}H_{32}N_3O_3C_{15}H_{16}N_6O_7P \cdot H_2O$ (735.7)	Ber. 52.25 Gef. 53.07	6.85 6.60	17.12 17.01	4.22 4.16	259 (17 300)
5'-Cytidin (0.9)	85.0 (540)	$C_{17}H_{32}N_3O_3C_{14}H_{16}N_4O_8P \cdot H_2O$ (711.7)	Ber. 52.35 Gef. 52.20	7.09 7.10	13.79 13.53	4.36 4.25	265 (11 200)
5'-Guanosin (1.0)	83.0 (622)	$C_{17}H_{32}N_3O_3C_{15}H_{16}N_6O_8P \cdot H_2O$ (751.7)	Ber. 51.10 Gef. 51.10	6.71 6.90	16.75 16.56	4.13 4.07	255 (14 900)
5'-Uridin (1.0)	77.5 (552)	$C_{17}H_{32}N_3O_3C_{14}H_{15}N_3O_9P \cdot H_2O$ (712.7)	Ber. 52.25 Gef. 51.90	6.94 7.00	11.82 11.94	4.35 4.34	261 (12 700)
5'-Thymidin (1.0)	81.0 (340)	$NH_4[C_{15}H_{17}N_3O_8P]$ (416.3)	Ber. 43.30 Gef. 43.27	5.09 5.18	13.45 12.70	7.44 7.38	263 (11 100)

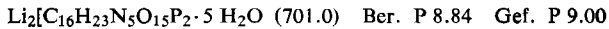
*) λ_{\max} und ϵ -Werte wurden bei pH 7 bestimmt.

C. Reaktionen der Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester mit Zuckerphosphorsäuren

Allgemeine Vorschrift: Die *Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidinium]-Salze der Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester* (ca. 0.3 mMol) wurden durch dreimaliges Abdestillieren von je 5 ccm absol. Pyridin bei 25–30°/0.1 Torr im Rotationsverdampfer wasserfrei gemacht. Dabei wurde jedesmal mit trockener Luft belüftet. Gleichzeitig führte man das *Kalium-* bzw. *Natriumsalz der Zuckerphosphorsäure* (1.0 mMol) mit Hilfe eines sauren Ionenaustauschers (Merck I, Pyridinium-Form; Säule: 1 \times 6 cm; Waschflüssigkeit: 50–60 ccm Wasser) in das Pyridiniumsalz über. Die wäbr. Lösung wurde i. Vak. bei höchstens 20–25° eingengt, mit 185 mg (1.0 mMol) *Tri-n-butylamin* versetzt und nun ebenfalls durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin i. Vak. entwässert. Diesen Vorgang wiederholte man so lange, bis der Kolbeninhalt schaumig zu werden begann (3–4 mal). Die sorgfältige Entfernung von Feuchtigkeit trägt wesentlich zum Gelingen der Reaktion bei. Schließlich wurde der Rückstand mit 3–4 ccm absol. Pyridin aufgenommen und unter Feuchtigkeitsausschluß zum Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester-Salz gegeben. Der Kolben wurde gut verschlossen bei 20–25° aufbewahrt. Nach 3–5 Tagen war im Papierchromatogramm (Laufmittel II) im allgemeinen kein oder nur wenig Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester nachzuweisen. Das Pyridin wurde i. Vak. (0.1 Torr, 25°) entfernt und der Rückstand mit je 10 ccm Wasser, dem die der Summe der organischen Basen entsprechende Menge Natriumacetat zugesetzt worden war, und Äther aufgenommen. Die Wasserphase wurde 2–3 mal ausgeäthert, auf eine Anionenaustauschersäule gebracht und chromatographiert.

Beispiel: *P-Adenosin-5'-P'- α -D-Glucose-1-pyrophosphorsäure:* 221 mg (0.3 mMol) *Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester* (*Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidinium]-Salz*) und 445 mg *α -D-Glucose-1-phosphorsäure* (*Mono-tri-n-butylammoniumsalz*) wurden in 3.5 ccm absol. Pyridin drei Tage bei 25° gehalten. Nach der Aufarbeitung wurde durch Anionenaustauscherchromatographie gereinigt (Säule: 1.5 \times 9.0 cm, Anionenaustauscher:

Dowex-1 X 2, 200—400 mesh, Chloridform). Zunächst eluierte man mit Wasser das während der Reaktion gebildete α -Pyridon, dann mit 0.0075 *m* HCl α -D-Glucose-1-phosphorsäure, Adenosin-5'-phosphorsäure und eventuell vorhandene P^1, P^2 -Diadenosin-5'-pyrophosphorsäure. Schließlich erhielt man durch Elution mit 0.025 *m* LiCl in 0.01 *m* HCl (Tropfgeschwindigkeit ca. 1—1.5 ccm/Min.) das Produkt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und mit Lithiumhydroxyd sorgfältig neutralisiert. Die spektroskopische Bestimmung ergab 3020 OD-Einheiten = 0.20 mMol (67%). Dann wurde auf ungefähr 2 ccm eingengt (12 Torr, 20—25°). Bei Zugabe von 25 ccm Methanol und 120 ccm Aceton fiel ein flockiger Niederschlag, der zentrifugiert, zweimal mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch gewaschen und anschließend i. Hochvak. über P_2O_5 getrocknet wurde. Ausb. 122 mg (61%).



Verhältnis Adenin : P : Glucose = 1.00 : 2.04 : 1.02.

Ähnlich wurden die in Tab. 3 verzeichneten Produkte erhalten. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte im wesentlichen nach Angaben von *Michelson*⁷⁾.

Tab. 3. Darstellung von Nucleotid-Coenzymen

R	mg	(mMol)	R'	(mMol)	Zeit (Tage)	Temp.	Ausb. an Pyrophosphorsäuren		Verhältnis
							OD-Einh.	%	Base:P:Zucker
5'-Cytidin	356	(0.5)	α -DL-Glycerin	1.5	3.5	25°	3570	78.5	1.00:1.03
5'-Uridin	213	(0.3)	1- α -D-Glucose	1.0	3	25°	1780	60.0	1.00:1.98:0.99
5'-Guanosin	225	(0.3)	1- α -D-Glucose	1.0	5	20°	2980	72.5	1.00:1.98:0.97
5'-Thymidin	130	(0.3)	1- α -D-Glucose	1.0	3	25°	1710	60.0	1.00:1.90:0.99

* B = Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidin], bei R = 5'-Thymidin NH₃.

** B = Tri-n-butylamin.

D. Darstellung von Nucleosid-5'-pyrophosphorsäuren

Beispiel: Cytidin-5'-pyrophosphorsäure: 365 mg (0.5 mMol) *Cytidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester (Morpholin-carbonsäure-(4)-[N,N'-dicyclohexyl-amidinium]-Salz)* sowie 566 mg (2.0 mMol) *Mono-tri-n-butylammoniumphosphat* wurden, wie unter C. beschrieben, wasserfrei gemacht, unter Feuchtigkeitsausschluß vereinigt und nach 4tägigem Belassen bei Raumtemp. in gleicher Weise aufgearbeitet. Die wäßr. Lösung (ca. 20 ccm), die neben dem Produkt nur wenig Ausgangsmaterial und Cytidin-5'-phosphorsäure enthielt, gab man auf eine DEAE-Säule (2.4 \times 60 cm, Hydrogencarbonatform). Die Säule wurde zunächst mit Wasser gewaschen, bis die Absorption bei 253 m μ vernachlässigbar war, dann schloß sich eine Gradientenelution mit Triäthylammoniumhydrogencarbonat (pH 7.5) an. Vorratsgefäß: 2 l 0.3 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat, Mischgefäß: 2 l 0.05 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat. Tropfgeschwindigkeit: 1.1 ccm/Min. *Cytidin-5'-pyrophosphorsäure* wurde bei einer Salzkonzentration von 0.16—0.175 *m* eluiert. Ausb. 3730 OD-Einheiten = 0.41 mMol (82%).

Uridin-5'-pyrophosphorsäure und *Adenosin-5'-pyrophosphorsäure* wurden auf prinzipiell gleiche Art und Weise erhalten. Ausb. 60—65%.

Alle so dargestellten Nucleosid-5'-pyrophosphorsäuren waren chromatographisch rein und identisch mit authent. Proben.

E. Saure Hydrolyse von Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester

Ca. 5–6 mg Substanz wurden in 1.0 ccm n_{10} HCl gelöst und im Thermostaten bei 20° gehalten. In gewissen Zeitabständen wurden Proben (keine definierten, sondern jeweils nur ungefähre Mengen) entnommen und sofort mit Ammoniak alkalisiert; ein Teil dieser ammoniakal. Lösung wurde auf Papier aufgetragen und im Laufmittel I entwickelt. Die Hydrolyse verlief eindeutig; außer der zu erwartenden *Adenosin-5'-phosphorsäure* entstand kein weiteres Produkt. Die Flecke des Hydrolyseprodukts und des eventuell noch vorhandenen Ausgangsmaterials wurden auf dem Papierchromatogramm im UV-Licht lokalisiert, ausgeschnitten und mit je 5 ccm Wasser eluiert. Mit den gemessenen Extinktionen und den bekannten ϵ -Werten wurden die in beiden Flecken vorhandenen Nucleotidmengen (in μ Mol) berechnet, addiert und aus der Summe der prozentuale Anteil des Ausgangsmaterials ermittelt.

[380/65]