

## Kinetik der Schutzgruppenabspaltung bei Derivaten des 2'-Desoxycytidin-5'-phosphats

Hartmut Seliger\* und Hans-Helmut Görtz

Sektion Polymere der Universität Ulm,  
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

Eingegangen am 17. Februar 1978

---

Die Abspaltungsgeschwindigkeit aliphatischer Basenschutzgruppen bei Derivaten des 2'-Desoxycytidin-5'-monophosphats wird bei verschiedenen pH-Werten UV-spektroskopisch gemessen. Verzweigte, raumerfüllende Schutzgruppen zeigen erhöhte Stabilität. Propionyl wird überraschenderweise schneller entfernt als Acetyl.

### Hydrolysis Kinetics of Protective Groups on Derivatives of 2'-Deoxycytidine-5'-monophosphate

The hydrolysis kinetics of aliphatic base protecting groups on derivatives of 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate are measured at various pH values by means of UV spectroscopy. Branched and bulky protective groups exhibit enhanced stability. Unexpectedly, the propionyl group is released faster than acetyl.

---

Die Stabilität der Schutzgruppen spielt bei der Synthese von Oligonucleotiden eine wichtige Rolle. Bisherige Untersuchungen beschränken sich mit wenigen Ausnahmen<sup>1)</sup> auf qualitative oder halbquantitative Verfahren<sup>2-7)</sup>. Die Abspaltung der Basenschutzgruppen läßt sich jedoch sehr einfach mittels UV-Spektroskopie verfolgen, wie am Beispiel von 2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat gezeigt wird.

Die UV-Spektren sämtlicher untersuchter Derivate von 2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat bei pH 6.9 sind einander sehr ähnlich, mit einem langwelligen Maximum bei 297 nm und einem kürzerwelligen bei ca. 245 nm. Sie unterscheiden sich charakteristisch vom Spektrum des ungeschützten Nucleotids (vgl. Tab. 1).

Bei pH-Werten größer als 12 tritt eine drastische Änderung des Spektrums ein mit einer Verschiebung der Maxima nach längeren Wellen (langwelliges Maximum bei 302 nm, Schulter bei 280 nm). Das Auftreten von isosbestischen Punkten deutet auf das Vorliegen eines Gleichgewichts, des Deprotonierungsgleichgewichts an der Amidgruppe, hin (s. Abb. 1).

---

<sup>1)</sup> W. Regel, E. Stengele und H. Seliger, Chem. Ber. **107**, 611 (1974).

<sup>2)</sup> H. G. Khorana, A. F. Turner und J. P. Vizolyi, J. Am. Chem. Soc. **83**, 686 (1961).

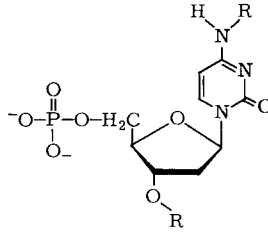
<sup>3)</sup> R. K. Ralph und H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. **83**, 2926 (1961).

<sup>4)</sup> M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg und H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. **84**, 430 (1962).

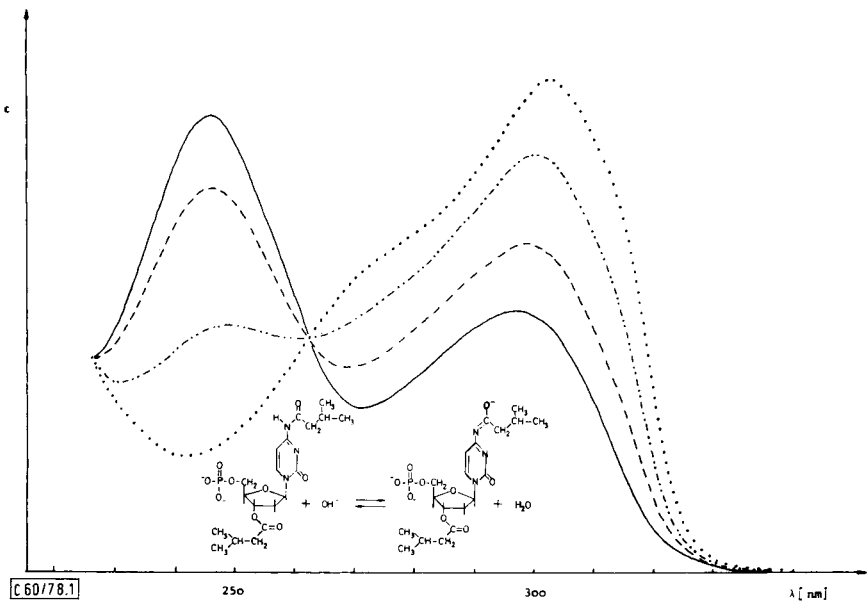
<sup>5)</sup> H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch und H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. **85**, 3821 (1963).

<sup>6)</sup> F. Cramer, H. P. Bär, H. J. Rhaese, W. Sängler, K. H. Scheit, G. Schneider und J. Tennigkeit, Tetrahedron Lett. **1963**, 1039.

<sup>7)</sup> H. Büchi und H. G. Khorana, J. Mol. Biol. **72**, 251 (1972).

Tab. 1. UV-Daten (0.02 M Phosphatpuffer pH 6.9) und Amid-pK<sub>s</sub>-Werte von *N*,3'-*O*-Diacyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat


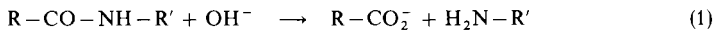
R	$\lambda_{\max} 1$ (nm)	$\lambda_{\min} 1$ (nm)	$\lambda_{\max} 2$ (nm)	$\lambda_{\min} 2$ (nm)	$\frac{\epsilon_{300}}{\epsilon_{250}}$	pK <sub>s</sub>
H	271	249	—	—	0.01	—
Acetyl	297	270	245	226	0.61	—
Propionyl	297	271	246	227	0.56	—
Isobutyryl	296	272	246	226	0.56	12.33 ± 0.21
n-Butyryl	296	272	247	226	0.53	12.49 ± 0.13
Isovaleryl	297	271	246	226	0.49	12.54 ± 0.20
Pivaloyl	297	272	246	226	0.51	12.55 ± 0.11
2-Methylbutyryl	297	271	246	226	0.59	12.33 ± 0.19
3,3-Dimethylbutyryl	297	273	248	228	0.54	12.59 ± 0.14
2-Ethylbutyryl	297	275	242	224	0.38	12.33 ± 0.14


 Abb. 1. UV-Spektrum von *N*,3'-*O*-Diisovaleryl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat bei pH 11 (—), pH 12 (---), pH 12.6 (- · - ·) und pH 14 (·····)

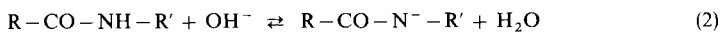
Aus den bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen UV-Spektren läßt sich der  $pK_a$ -Wert der jeweiligen Amidgruppe bestimmen (s. Tab. 1). Bei den Acetyl- und Propionyl-Derivaten konnte diese Bestimmung wegen zu rascher Hydrolyse der Verbindungen nicht mit hinreichender Genauigkeit vorgenommen werden.

Für das Hydrolyseverhalten der basengeschützten Nucleotide waren unter Berücksichtigung des Deprotonierungsgleichgewichtes an der Amidgruppe folgende Zusammenhänge zu erwarten:

Hydrolysiert wird die Amidgruppe nur in ihrer protonierten Form.



Diese Reaktion ist irreversibel. Ihr vorgelagert ist das pH-abhängige Gleichgewicht (2).



Bei pH-Werten unterhalb des  $pK_a$ -Wertes der Amidgruppe liegt praktisch das gesamte Amid protoniert vor, und es ist ein Geschwindigkeitsgesetz der Form (3) zu erwarten.

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot [R-CO-NH-R'] \cdot [OH^-] \quad \text{bzw.} \quad -\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c \cdot [OH^-] \quad (3)$$

( $c$  = Gesamtkonzentration an geschütztem Nucleotid)

In diesem Fall handelt es sich also um eine Reaktion zweiter Ordnung. Bei pH-Werten oberhalb des  $pK_a$ -Wertes der Amidgruppe ist die Konzentration der protonierten Spezies  $R-CO-NH-R'$  abhängig von der Einstellung des Protonierungsgleichgewichtes (2). Dieses Gleichgewicht hängt mit der Säurekonstanten  $K_a$  über die Beziehung (4) zusammen.

$$K_a = \frac{[R-CO-N^--R'] \cdot [H_3O^+]}{[R-CO-NH-R']} = \frac{[R-CO-N^--R']}{[R-CO-NH-R'] \cdot [OH^-]} \cdot K_w \quad (4)$$

Für die Konzentration an  $R-CO-NH-R'$  ergibt sich (5).

$$[R-CO-NH-R'] = \frac{K_w}{K_a} \cdot \frac{[R-CO-N^--R']}{[OH^-]} \quad (5)$$

Zusammen mit (3) erhält man hieraus als Ausdruck für das Geschwindigkeitsgesetz Gleichung (6).

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot \frac{K_w}{K_a} \cdot [R-CO-N^--R'] \quad \text{bzw.} \quad -\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c \quad (6)$$

( $c$  = Gesamtkonzentration an geschütztem Nucleotid)

Bei pH-Werten oberhalb des  $pK_a$ -Wertes der Amidgruppe sollte die Reaktion demnach erster Ordnung und unabhängig von der Hydroxyl-Ionen-Konzentration sein.

Zur experimentellen Prüfung dieser Annahmen wurde die Hydrolysekinetik aller Verbindungen bei pH-Werten unterhalb und oberhalb des jeweiligen  $pK_a$ -Wertes gemessen. Als Meßgröße diente die Extinktionsabnahme bei 302 nm, da bei dieser Wellenlänge das ungeschützte Nucleotid nicht absorbiert. Bei allen Messungen lag die Konzentration an Nucleotid in der Größenordnung von  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l gegenüber einer Hydroxyl-

Tab. 2. Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung  $k_{p1}$  bei der alkalischen Schutzgruppenabspaltung von  $N_3-O$ -Diacyl-2'-desoxyeytidin-5'-monophosphat ( $\text{min}^{-1}$ )

pH	Acetyl	Propionyl	Isobutyryl	Butyryl	Isovaleryl	2-Methylbutyryl	Pivaloyl	3,3-Dimethylbutyryl	2-Ethylbutyryl
11.3	$5.93 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.04$ )	—	—	—	$1.01 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.17$ )	—	$1.23 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.08$ )	—	—
11.4	—	$9.34 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.22$ )	$5.78 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.16$ )	$5.84 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.27$ )	—	—	—	—	—
11.6	—	—	—	—	$2.67 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.22$ )	$2.44 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.42$ )	$2.73 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.18$ )	$8.82 \cdot 10^{-4}$ ( $\pm 0.33$ )	$5.39 \cdot 10^{-4}$ ( $\pm 1.29$ )
11.7	$1.69 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.05$ )	$1.93 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.04$ )	$1.53 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.22$ )	$1.06 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.03$ )	$3.62 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.15$ )	$2.98 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.15$ )	$3.68 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.20$ )	$1.23 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.11$ )	$5.93 \cdot 10^{-4}$ ( $\pm 0.14$ )
11.9	$2.53 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.05$ )	$3.35 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.08$ )	$1.69 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.06$ )	$1.52 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.08$ )	—	$5.66 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.20$ )	—	$2.38 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.07$ )	$1.12 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.11$ )
12.0	$3.11 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.08$ )	$3.87 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.01$ )	$2.95 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.09$ )	$2.42 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.09$ )	$7.14 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.77$ )	$6.17 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.09$ )	$9.24 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.36$ )	$3.60 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.14$ )	$1.23 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.10$ )
13.0	$1.04 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.03$ )	$1.31 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.03$ )	$8.71 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.19$ )	$9.20 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.22$ )	$2.58 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.06$ )	$2.48 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.04$ )	$3.48 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.07$ )	$1.82 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.06$ )	$2.77 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.12$ )
13.3	$1.07 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.13$ )	$1.37 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.04$ )	$9.72 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.96$ )	$1.08 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.05$ )	$3.39 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.14$ )	$2.95 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.04$ )	$3.17 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.20$ )	$1.87 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.02$ )	$2.70 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.13$ )
14.0	$1.12 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.02$ )	$1.47 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.03$ )	$1.31 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.07$ )	$1.31 \cdot 10^{-1}$ ( $\pm 0.04$ )	$3.00 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.05$ )	$2.97 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.05$ )	$3.36 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.26$ )	$1.84 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.01$ )	$2.86 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.13$ )

Ionen-Konzentration von  $5 \cdot 10^{-3}$  bis 1 mol/l, so daß in jedem Fall ein Geschwindigkeitsgesetz (pseudo-)erster Ordnung zu erwarten war. Diese Annahme wurde durch die Messungen bestätigt.

Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung  $k_{\psi_1}$  stellen, wie aus Tab. 2 hervorgeht, eine Funktion der Hydroxyl-Ionen-Konzentration dar.

Durch Auftragen des Logarithmus dieser Konstanten gegen den pH-Wert läßt sich eine Aussage über die Ordnung der Reaktion bezüglich der Hydroxyl-Ionen-Konzentration machen (s. Abb. 2).

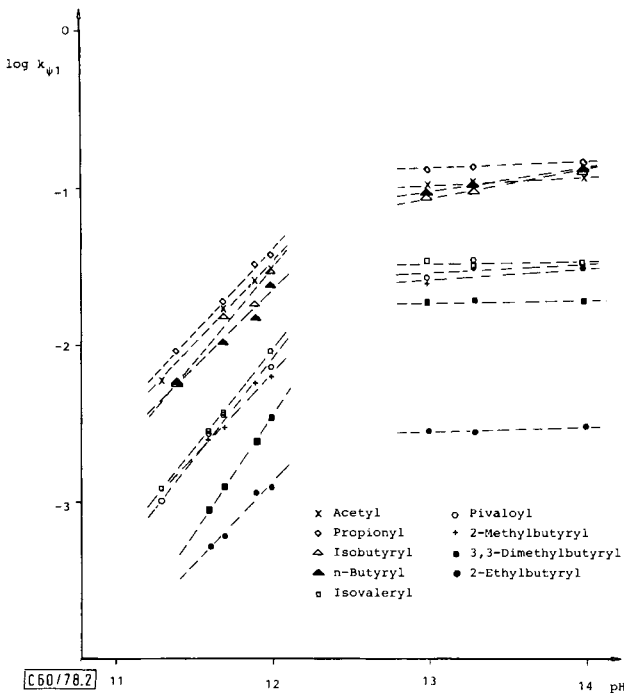


Abb. 2. Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\psi_1}$  vom pH-Wert bei der alkalischen Schutzgruppenabspaltung an *N*,3'-*O*-Diacyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat

Für die beiden pH-Bereiche pH 11–12 und pH 13–14 wurden in der logarithmischen Auftragung von  $k_{\psi_1}$  gegen den pH-Wert jeweils die Ausgleichsgeraden berechnet und deren Steigungen, die den Zahlenwert der Reaktionsordnung bezüglich der Hydroxyl-Ionen-Konzentration darstellen, ermittelt. Die erhaltenen Werte bestätigen die getroffenen Annahmen. Wie Tab. 3 zeigt, ist die Reaktion oberhalb des  $pK_a$ -Wertes, also im pH-Bereich 13–14, in allen Fällen annähernd nullter Ordnung, während die Reaktionsordnung im Bereich von pH 11–12, also unterhalb des  $pK_a$ -Wertes, in den meisten Fällen nahe dem Wert eins liegt. Worauf die recht starke Abweichung im Falle des 3,3-Dimethylbutyryl-Derivates zurückzuführen ist (Steigung 1.509), ist noch offen.

Tab. 3. Steigung der Ausgleichsgeraden aus Abb. 2 und Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung  $k_2$  bei der alkalischen Schutzgruppenabspaltung an  $N_3'$ - $O$ -Diacyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat im pH-Bereich 11–12

Schutzgruppe	Steigung bei pH 11–12	Steigung bei pH 13–14	$k_2$ [ $l \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$ ]
Acetyl	1.033	0.035	$3.15 \pm 0.17$
Propionyl	1.057	0.050	$3.66 \pm 0.34$
Isobutyryl	1.180	0.178	$2.77 \pm 0.41$
n-Butyryl	0.970	0.147	$2.19 \pm 0.23$
Isovaleryl	1.216	0.040	$0.627 \pm 0.151$
Pivaloyl	1.252	-0.007	$0.739 \pm 0.133$
2-Methylbutyryl	1.080	0.065	$0.632 \pm 0.050$
3,3-Dimethylbutyryl	1.509	0.002	$0.281 \pm 0.062$
2-Ethylbutyryl	1.040	0.018	$0.129 \pm 0.008$

Ein Vergleich der Stabilitäten der verschiedenen Schutzgruppen (vgl. Abb. 2 und  $k_2$  in Tab. 3) läßt vermuten, daß in erster Linie sterische Abschirmungseffekte für die großen Stabilitätsunterschiede verantwortlich zu machen sind.

Diese sind besonders ausgeprägt bei voluminösen Seitengruppen (*tert*-Butyl-Gruppe) als auch insbesondere bei solchen Acylresten, bei denen eine Rückfaltung der Kette in Richtung der Amid-Carbonylgruppe möglich ist (Kettenlänge mindestens vier C-Atome). Das letztere Kriterium ist wohl für die hohe Stabilität der 2-Ethylbutyryl-Schutzgruppe verantwortlich, da eine Rückfaltung in diesem Fall eine Abschirmung der Amidgruppe von zwei Seiten erlaubt. Ein interessantes Phänomen, das noch keine befriedigende Erklärung gefunden hat, ist die Tatsache, daß sich die Propionyl- und nicht die Acetyl-Gruppe als labilste Schutzgruppe erwies. Die in der Literatur<sup>2)</sup> für die Acetyl-Gruppe angegebenen Halbwertszeiten bei verschiedenen pH-Werten konnten nicht bestätigt werden.

Die hier gewonnenen kinetischen Daten erlauben, für spezielle Synthesezwecke aliphatische Schutzgruppen gezielt nach ihrer Stabilität auszuwählen und stellen somit auch für die präparative Arbeit eine wertvolle Hilfe dar.

## Experimenteller Teil

2'-Desoxycytidin-5'-monophosphorsäure war ein Produkt der Fa. Pharma Waldhof, Düsseldorf. Acetanhydrid, Isobuttersäureanhydrid und Isovaleriansäureanhydrid wurden von E. Merck, Darmstadt, Propionsäureanhydrid, n-Buttersäureanhydrid, 2-Methylbuttersäure und 2-Ethylbuttersäure von Fa. Fluka, Neu-Ulm, Pivalinsäureanhydrid und 3,3-Dimethylbuttersäure von Riedel-de Haën, Seelze, bezogen.

NMR-Spektren: Spektrometer R 32 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen (90 MHz, Standard Tetramethylsilan). – UV-Spektren: Spektrograph DMR 21 der Fa. Zeiss, Oberkochen. Die *kinetischen Messungen* wurden an einem Spektralphotometer PMQ III der Fa. Zeiss, Oberkochen, bei 22 °C durchgeführt. Es wurde jeweils eine Quarzküvette mit 1 ml einer Natriumhydroxidlösung der entsprechenden Konzentration gefüllt und bei 302 nm auf Null abgeglichen. Dann wurden 5  $\mu$ l einer Nucleotidstammllösung (pH 7.0) zugegeben, deren Konzentration so gewählt war, daß nach der Zugabe die Extinktion bei 302 nm zur Zeit  $t = 0$  ungefähr den Wert eins annahm. In regelmäßigen Zeitabständen wurde anschließend die Extinktion abgelesen. – Schmelzpunkte: Fisher-Johns Schmelz-

punktsapparat. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Dünnschichtfolien der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel, benutzt.

*N,3'-O-Diacetyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäure, Ammoniumsalz*: Die Lösung von 100 mg 2'-Desoxycytidin-5'-monophosphorsäure (0.30 mmol) in einer Mischung von 10 ml Wasser und 2 ml Pyridin wurde lyophilisiert. Das so erhaltene Pyridiniumsalz wurde in 5 ml absol. Pyridin suspendiert, mit 1.5 ml Acetanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Danach wurde unter Kühlung das überschüssige Anhydrid durch Zugabe von 20 ml Wasser zersetzt und weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde mehrmals mit Wasser bei 30°C i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser aufgenommen, auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50 Ammoniumform, 2 × 15 cm) gegeben und mit 150 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde auf ca. 1 ml eingengt und zur Reinigung einer gelochromatographischen Trennung unterworfen (Bio-Gel P-2-Säule, 2 × 100 cm, Elution mit 100 ml Wasser). Aus dem Eluat wurde das Produkt in nahezu quantitativer Ausb. durch Lyophilisierung gewonnen.

Nach dem gleichen Verfahren wurden in jeweils über 90proz. Ausb. *N,3'-O-Dipropionyl-, N,3'-O-Diisobutyryl- und N,3'-O-Dibutyryl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäure* als Ammoniumsalze gewonnen.

*N,3'-O-Diisovaleryl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäure, Ammoniumsalz*: Die oben gegebene Vorschrift für das Acetyl-Derivat wurde dahingehend modifiziert, daß die Reaktion bei 50°C durchgeführt und die Reaktionszeit auf 3 Tage verlängert wurde. Analog einer Literaturangabe für die Darstellung von *N,3'-O-Diisobutyryl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat*<sup>7)</sup> wurde die Reaktion mit 20 ml Methanol unter Kühlung abgebrochen, i. Vak. eingedampft, anschließend 20 ml 20proz. Pyridin zugeben und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben angegeben. Ausb. 95%.

Tab. 4.  $R_F$ -Werte in der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel, Schmelzpunkte und Elementaranalysen der *N,3'-O-Diacetyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäuren*, Ammoniumsalze

-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäure, Ammoniumsalz	$R_F$ -Wert	$R_F$ -Wert	Schmelzpunkt (°C, uncorr.)	Elementaranalyse
	Laufmittel A	Laufmittel B		
ungeschützt	0.31	0.01	—	—
<i>N,3'-O-Diacetyl-</i>	0.46	0.11	157 (Zers.)	$[\text{NH}_4]\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_9\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (426.3) Ber. C 36.63 H 5.44 N 13.14 Gef. C 36.40 H 5.31 N 12.93
<i>N,3'-O-Dipropionyl-</i>	0.50	0.21	> 300	<sup>a)</sup>
<i>N,3'-O-Diisobutyryl-</i>	0.66	0.27	153 (Zers.)	$[\text{NH}_4]\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (482.4) Ber. C 42.32 H 6.48 N 11.61 Gef. C 42.52 H 6.40 N 10.49
<i>N,3'-O-Dibutyryl-</i>	0.70	0.36	240 (Zers.)	<sup>a)</sup>
<i>N,3'-O-Diisovaleryl-</i>	0.75	0.46	184 (Zers.)	<sup>a)</sup>
<i>N,3'-O-Dipivaloyl-</i>	0.72	0.45	170 (Zers.)	<sup>a)</sup>
<i>N,3'-O-Bis(2-methylbutyryl)-</i>	0.73	0.46	146 (Zers.)	$[\text{NH}_4]\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (510.5) Ber. C 44.70 H 6.91 N 10.98 Gef. C 43.75 H 6.64 N 10.30
<i>N,3'-O-Bis(3,3-dimethylbutyryl)-</i>	0.77	0.50	162 (Zers.)	<sup>a)</sup>
<i>N,3'-O-Bis(2-ethylbutyryl)-</i>	0.79	0.50	155 (Zers.)	<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Die gefundenen Werte lagen um mehrere Prozente unter den berechneten. Erklärung siehe Text.

Nach dem gleichen Verfahren, lediglich mit noch weiter verlängerten Reaktionszeiten (jeweils in Klammern angegeben), erfolgte mit jeweils über 90% Ausb. die Darstellung von

*N*,3'-*O*-Dipivaloyl- (4 Tage), *N*,3'-*O*-Bis(2-methylbutyryl)- (4 Tage), *N*,3'-*O*-Bis(3,3-dimethylbutyryl)- (6 Tage) und *N*,3'-*O*-Bis(2-ethylbutyryl)-2'-desoxycytidin-5'-monophosphorsäure (7 Tage), jeweils als Ammoniumsalz.

Die so erhaltenen Produkte waren dünnschichtchromatographisch einheitlich ( $R_F$ -Werte s. Tab. 4). Laufmittel: Isopropylalkohol/Wasser (3 : 1, v/v) (Laufmittel A) und Chloroform/Methanol (2 : 1, v/v) (Laufmittel B). Die Elementaranalysen (s. Tab. 4) lieferten, von drei Ausnahmen abgesehen, in allen Fällen erheblich zu niedrige Werte, was vermutlich auf unvollständige Verbrennung zurückzuführen ist. Schwierigkeiten bei der Verbrennungsanalyse von geschützten Nucleotiden sind aus der Literatur bekannt<sup>8,9)</sup>.

Die folgenden Anhydride wurden durch Umsetzung der entsprechenden Carbonsäuren mit Thionylchlorid in Diethylether unter Zusatz von Pyridin nach *Gerrard* und *Thrush*<sup>10)</sup> hergestellt.

*2-Methylbuttersäureanhydrid*: Sdp. 106°C/20 Torr,  $n_D^{20}$  1.4197. — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.95 (t,  $J$  = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.16 (d,  $J$  = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.62 (m, CH<sub>2</sub>), 2.43 (m,  $J$  = 6.8 Hz, CH).

C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub> (186.2) Ber. C 64.49 H 9.74 Gef. C 64.28 H 9.79

*3,3-Dimethylbuttersäureanhydrid*: Sdp. 125°C/20 Torr,  $n_D^{20}$  1.4197. — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.07 (s, CH<sub>3</sub>), 2.29 (s, CH<sub>2</sub>).

C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> (214.3) Ber. C 67.25 H 10.35 Gef. C 66.99 H 10.63

*2-Ethylbuttersäureanhydrid*: Sdp. 128°C/20 Torr,  $n_D^{20}$  1.4246. — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.94 (t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.63 (m, CH<sub>2</sub>), 2.29 (m,  $J$  = 6.8 Hz, CH).

C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> (214.3) Ber. C 67.25 H 10.35 Gef. C 67.16 H 10.64

<sup>8)</sup> *W. J. Wechter*, *J. Org. Chem.* **34**, 244 (1969).

<sup>9)</sup> *W. Wierenga* und *J. A. Woltersom*, *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides* **4**, 189 (1977).

<sup>10)</sup> *W. Gerrard* und *A. M. Thrush*, *J. Chem. Soc. A* **1952**, 741.