

## ROLF WITTMANN

Die Reaktion der Phosphorsäuren mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol, I

### Eine neue Synthese von Monofluorophosphorsäure-monoestern

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt\*)

(Eingegangen am 14. September 1962)

Die Umsetzung von Monoesterphosphorsäuren mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol (DNFB) in Gegenwart starker tertiärer Basen ergibt quantitativ die Monoester der Monofluorophosphorsäure<sup>1)</sup>. Unter anderem werden auch der Adenosyl-5'-, der Thymidyl-3'- und -5'- und der Uridyl-5'-ester der Monofluorophosphorsäure dargestellt. Adenosin-3'-phosphat ergibt dagegen quantitativ das cyclische 2',3'-Adenosinphosphat<sup>2)</sup>. Die Reaktion ist allgemein anwendbar.

Die Darstellung von Monoestern der Monofluorophosphorsäure (I) ist bislang nur auf zwei, zum Teil sehr schwierigen Wegen und mit wenigen Beispielen möglich. So spalten A. HOOD und W. LANGE<sup>3)</sup> Polyphosphorsäureester in Fluorwasserstoff bei  $-40^{\circ}$  und trennen durch Molekulardestillation die erhaltenen Produkte. Die Ausbeuten an I liegen zwischen 24 und 46 %. A. SIMON und C. STÖLZER<sup>4)</sup> gehen von den gemischten, fluorhaltigen Phosphorylhalogeniden aus und setzen mit äquimolaren Mengen Alkohol oder Aminen um. Auch diese Methode birgt Schwierigkeiten in der Aufarbeitung.

Die Ergebnisse der Anwendung aktiver Halogeno-Heterocyclen, wie z. B. des Cyanurchlorides<sup>5)</sup>, in Phosphorylierungsreaktionen führten dazu, auch die „aktivierten“ Halogeno-Aromaten, wie z. B. das Pikrylchlorid<sup>6)</sup> und das 2.4-Dinitrofluorbenzol, auf ihre Fähigkeit zur Phosphatübertragung zu untersuchen.

Mit der nachstehend beschriebenen Methode ist es nun möglich, beliebige Monoesterphosphorsäuren mittels DNFB in ihre Monofluoro-Derivate zu überführen. Die Reaktion ist äußerst schonend und verläuft bei Raumtemperatur quantitativ.

DNFB zeigt bei der Reaktion mit Monoesterphosphorsäuren je nach Art der zugesetzten Base zwei verschiedene Reaktionen.

So bildet sich in Gegenwart starker tertiärer Basen, wie z. B. Triäthylamin oder Tri-n-butylamin, quantitativ der Monoester der Monofluorophosphorsäure (I). Diese Umsetzung bei Raumtemperatur ist unter den gewählten Bedingungen bereits nach zwei Stunden nahezu beendet und liefert ausschließlich I. In Gegenwart von Pyridin

\*) Neue Adresse: Forschungslaboratorium der E. Merck AG, Darmstadt.

<sup>1)</sup> R. WITTMANN, Angew. Chem. 74, 214 [1962].

<sup>2)</sup> Teil II, in Vorbereitung, J. STOCKX, Bull. Soc. chim. Belgique 70, 125 [1961].

<sup>3)</sup> J. Amer. chem. Soc. 72, 4956 [1950].

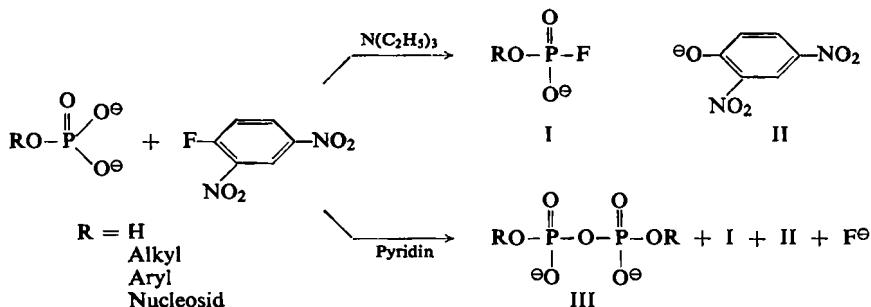
<sup>4)</sup> Naturwissenschaften 44, 314 [1957]; Chem. Ber. 93, 1323 [1960]; ebenda 93, 2578 [1960].

<sup>5)</sup> R. WITTMANN und F. CRAMER, Angew. Chem. 73, 220 [1961].

<sup>6)</sup> Unveröff. Versuche des Verfassers. Vorgetragen auf d. Südwestd. Chemie-Dozenten-Tagung am 25. 5. 1961 in München.

verlaufen die Reaktionen wesentlich langsamer und ergeben je nach der Menge an zugesetztem DNFB wechselnde Mengen an *symm.* Diesterpyrophosphat (III) und I.

Allgemein kann man formulieren:



Die Reaktion in Gegenwart starker tertärer Basen, ausgeführt bei Raumtemperatur in Acetonitril, ist so schonend, daß auch so empfindliche Moleküle wie die Nucleotide in die Fluorderivate übergeführt werden können. So wird aus Adenosin-5'-phosphorsäure der Monofluorophosphorsäure-5'-adenosylester, aus der Thymidin-3'- oder -5'-phosphorsäure der Monofluorophosphorsäure-3'- oder -5'-thymidylester ohne Zerstörung des Nucleosidesters gebildet. Lediglich die 3'-Ribonucleotide, wie z. B. das Adenosin-3'-phosphat, stellen eine Ausnahme dar, denn hier werden in fast quantitativer Ausbeute die 2'.3'-Cyclophosphate erhalten<sup>2)</sup>.

Eine Nebenreaktion des DNFB mit den Hydroxylgruppen der Ribose oder Aminogruppen des Purin- bzw. Pyrimidinringes ist nicht auszuschließen, dürfte jedoch nach den erhaltenen Ausbeuten und chromatographischen Befunden in den meisten Fällen von untergeordneter Bedeutung sein. Diese Nebenreaktionen werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Orthophosphorsäure ergibt mit DNFB und Triäthylamin ein Gemisch von Mono-fluoro- und Difluoro-phosphat. Die Reaktionen werden in wasserfreien Lösungsmitteln wie Acetonitril oder DMF durchgeführt, jedoch stört die Anwesenheit von etwas Wasser nicht. *Symm.* Diesterpyrophosphate (III) lassen sich in Gegenwart von Pyridin und einem Überschuß an DNFB ebenfalls zu I umsetzen, allerdings bei Raumtemperatur sehr langsam und unvollständig, während in Anwesenheit von starken tertären Basen überhaupt keine Reaktion zwischen III und DNFB erfolgt. Ebenso ließ sich bei der Umsetzung von III mit 40-proz. Fluorwasserstoffsäure und Triäthylamin oder von III mit 40-proz. Fluorwasserstoffsäure und Pyridin, ohne DNFB, keine Spaltung von III zu I beobachten.

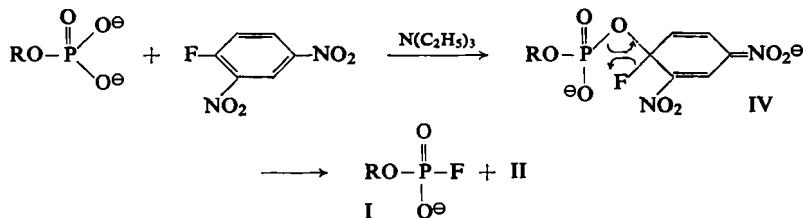
#### REAKTIONS-MECHANISMUS

Aus den Ergebnissen müssen je nach Art der zugesetzten Base zwei Reaktionswege gefordert werden.

##### A. Reaktion mit starken, tertären Basen

In Gegenwart von starken, tertären Basen wird aus der Tatsache, daß kein *symm.* Diesterpyrophosphat (III) gebildet wird, eine Zwischenstufe (IV) angenommen, die in einem intramolekularen 4-Zentrenmechanismus das Fluor an das Phosphoratom abgibt und gleichzeitig das Dinitrophenolat (II) abspaltet.

Selbst ein molarer Überschuß an Monoesterphosphat führt nicht zur Bildung von III, welche bei anderen Phosphorylierungsreaktionen nicht auszuschließen ist.



Die Möglichkeit dieses Reaktionsablaufes lässt sich aus den im folgenden beschriebenen spektroskopischen Befunden erklären. Andererseits ist die Bildung eines Dinitrophenylesters (VI) nach Abspaltung des Fluoridanions aus (IV) nicht auszuschließen, da ein Parallelversuch zeigte, daß ein mittels Dicyclohexylcarbodiimids (DCC) dargestellter Dinitrophenylester (VI) in Gegenwart von Monophenylphosphat und Fluoridanion in äquimolarem Verhältnis fast ausschließlich zu I und sehr wenig III reagierte. Die Beobachtung, daß Monoesterphosphorsäure und DNFB mit Triäthylamin bereits nach ca. 2 Stdn. völlig zu I durchreagiert hat, während VI in Gegenwart von Triäthylamin und Fluorwasserstoff noch nach mehreren Stdn. nachzuweisen ist, dürfte die Formulierung des cyclischen Mechanismus erhärten.

Ein intermediäres Auftreten von III, wie es z. B. bei Reaktionen mit Trichloracetonitril<sup>7)</sup> oder Enolphosphaten<sup>8)</sup> beobachtet wird, konnte ausgeschlossen werden, denn III reagiert in Gegenwart von Triäthylamin nicht mit DNFB.

Ebenso zeigt der mit DCC dargestellte Dinitrophenylester VI in Gegenwart von Triäthylamin nahezu keine Reaktion mit Monoesterphosphat zu III, so daß hierdurch eine intermediäre Bildung von III ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

2,4-Dinitro-chlorbenzol, bekanntermaßen wesentlich reaktionsträger, ergibt dagegen nach längerer Reaktionszeit mit Monoesterphosphorsäuren in Gegenwart von Triäthylamin etwas III. Diese Entstehung von III könnte nach dem Befund mit DNFB so erklärt werden, daß intermediär zuerst ein Monochlorophosphorsäuremonoester gebildet wird, welcher wesentlich instabiler sein muß und mit Monoesterphosphatanionen zu III weiterreagiert. Die Differenz der Bindungsenergien<sup>9)</sup> der P—F-Bindung mit 116 kcal/Mol und die der P—Cl-Bindung mit 80 kcal/Mol erklärt die Bildung dieser verschiedenen Endprodukte.

Die spektroskopischen Untersuchungen der Reaktion deuten auf eine gewisse Stabilität der Zwischenstufe IV hin. H. HÖRMANN und H. ENDRES<sup>10)</sup> finden bei 2,4-Dinitranilinderivaten für ähnliche chinolide Formen wie IV im sichtbaren Spektrum ein Maximum zwischen 340 und 380 mμ. Gibt man 1 Mol Monophenylphosphat, 1 Mol DNFB und 2 Mol Triäthylamin in Acetonitril zusammen und verfolgt die Reaktion spektroskopisch durch Entnahme von Proben zu verschiedenen Reaktionszeiten, so treten nach ca. 90 Min. (bei 3 Mol Base bereits nach 40–50 Min.) ein deut-

7) F. CRAMER und H. J. BALDAUF, Angew. Chem. 72, 627 [1960].

8) F. CRAMER und R. WITTMANN, Angew. Chem. 72, 628 [1960].

9) E. NEALE und L. T. D. WILLIAMS, J. chem. Soc. [London] 1955, 2485.

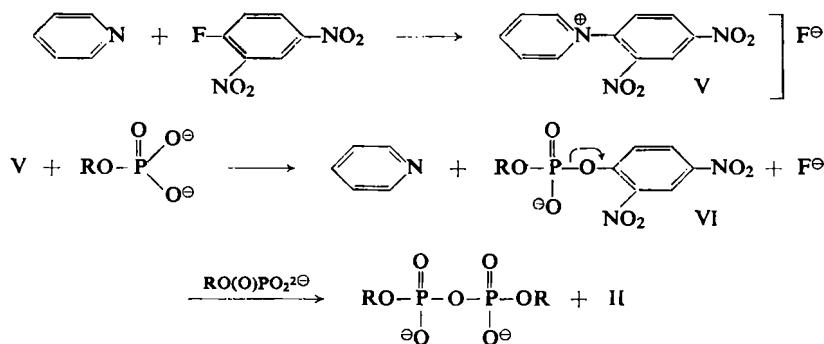
10) Z. Naturforsch. 10b, 150 [1955].

liches Maximum bei 364—368 m $\mu$  und ein schwächeres bei 412—417 m $\mu$  auf. Bei längerer Reaktionszeit nimmt nun das Maximum bei 364 m $\mu$  laufend ab, das bei 417 m $\mu$  entsprechend zu, um nach 4—5 Stdn. vollständig dem Spektrum des 2,4-Dinitro-phenols mit Triäthylamin in Acetonitril zu gleichen. Zeigt auch 1 Mol DNFB mit 1 Mol Triäthylamin in Acetonitril ebenfalls nach ca. 2 Stdn. ein sehr schwaches Maximum bei 368 m $\mu$ , so muß dennoch dasjenige im Reaktionsgemisch der Zwischenstufe IV zuzuordnen sein, da es dort wesentlich schneller und intensiver auftritt und während der Reaktion deutlich zu- und abnimmt. Versetzt man während der spektroskopischen Messung entnommene Proben mit konz. Ammoniak, so erhält man aus denjenigen mit dem deutlichsten Maximum bei 364 m $\mu$  die besten Ausbeuten an Monoesterphosphorsäureamid, welches nur aus einer aktiven Zwischenstufe entstanden sein kann, da I mit konz. Ammoniak erst nach ca. 48 Stdn. bei Raumtemperatur einen geringen Austausch des Fluors zum Amid ergibt.

Da der mittels DCC dargestellte Phosphorsäure-phenylester-[2,4-dinitro-phenylester] (VI) in Acetonitril mit Triäthylamin kein Maximum im Bereich von 360 bis 370 m $\mu$  zeigt, kann das gefundene Maximum von 364—368 m $\mu$  IV zugeordnet werden.

### B. Reaktion mit Pyridin

Bei Verwendung von Pyridin als Base muß nach den Versuchsergebnissen ein anderer Mechanismus ablaufen. Die Bildung von *symm.* Diesterpyrophosphaten (III) läßt sich nur dadurch erklären, daß in erster Stufe das Pyridin mit dem DNFB zu einem *N*-[2,4-Dinitro-phenyl]-pyridinium-fluorid-Komplex (V)<sup>11)</sup> reagiert, welcher dann mit dem Monoesterphosphatanion einen Dinitrophenylester (VI) liefert, dessen P—O—C-Bindung durch den Elektronensog der Nitrogruppen stark aktiviert und somit zur Phosphatübertragung geeignet ist.



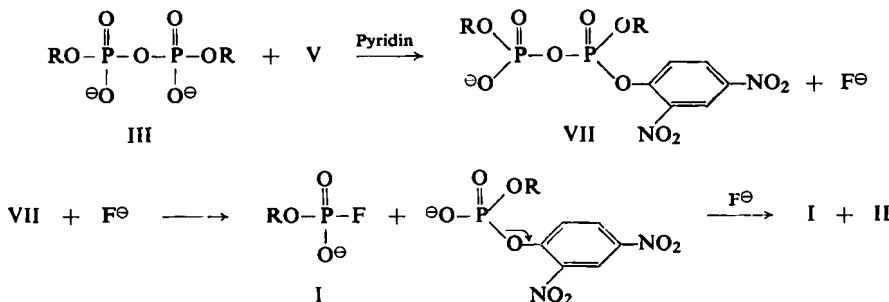
Diese Instabilität von VI konnte dadurch bestätigt werden, daß es gelang, VI unabhängig aus Monoesterphosphorsäure, DCC, 2,4-Dinitro-phenol und Pyridin darzustellen und zu untersuchen. So entsteht z. B. aus VI durch Angriff eines Phosphatanions in Gegenwart von Pyridin ein *symm.* Diesterpyrophosphat (III). In Gegen-

<sup>11)</sup> Im Falle des Pikrylchlorides<sup>6)</sup> wird mit Pyridin sehr leicht der *N*-[2,4,6-trinitro-phenyl]-pyridinium-chlorid Komplex gebildet. Nach unseren Untersuchungen reagiert dieser Komplex gut mit Phosphorsäuren und ist zur Phosphatübertragung geeignet.

wart äquimolarer Mengen an Monoesterphosphat und 40-proz. Fluorwasserstoffsäure in Pyridin entsteht aus VI sowohl I wie III in nahezu gleichem Verhältnis.

Der mögliche Einwand, III könnte auch aus I über eine Katalyse mittels Pyridins, wie sie G. DI SABATO und W. P. JENCKS<sup>12)</sup> bei Acylphosphaten fanden, gebildet werden, ließ sich durch Versuche widerlegen. I reagierte im Überschuß an Pyridin weder mit überschüss. Monoesterphosphat zu III noch mit überschüss. Methanol zum gemischten Methylester. Selbst nach tagelangem Erwärmen auf 50° war keine Reaktion festzustellen.

Setzt man jedoch zu Monoesterphosphorsäure und Pyridin einen Überschuß an DNFB zu, so erhält man infolge eines höheren Fluoridgehaltes neben III auch steigende Mengen von I. I kann in diesem Falle auch aus III entstehen. Wie der Versuch zeigt, reagiert III in Form des Pyridiniumsalzes in Gegenwart von Pyridin, jedoch nicht in Gegenwart starker tertiärer Basen, ebenfalls mit DNFB unter Bildung von I. Diese Reaktion verläuft, wie alle Reaktionen mit Pyridin, langsam und nicht quantitativ. Offensichtlich wird ein großer Teil des DNFB durch Pyridin in Nebenreaktionen verbraucht, feststellbar durch starke Verfärbung und Rückstände. III in Form des Pyridiniumsalzes zeigt im Parallelversuch ohne DNFB keine Spaltung mit Fluorwasserstoffsäure in Pyridin zu I. Da bei der Spaltung von III mit DNFB zu I in Pyridin kein Monoesterphosphat entsteht, kann der Mechanismus nur folgendermaßen formuliert werden.



III reagiert mit dem Pyridiniumkomplex V zu VII, einem Triester der Pyrophosphorsäure, der nach früheren Befunden<sup>13)</sup> unter Übertragung des Monoesterteiles aufspaltet, also im obigen Falle ein Mol I bildet. Das zweite Spaltstück, identisch mit VI, reagiert mit  $F^-$  dann ebenfalls weiter zu I, womit das Fehlen von Monoesterphosphat bei der Pyrophosphatspaltung erklärt ist.

#### EIGENSCHAFTEN DER MONOFLUOROPHOSPHORSÄURE-MONOESTER

Die dargestellten Monoester I zeigen im IR-Spektrum eine sehr starke P—F-Bande im Bereich von 805—844/cm, lediglich die der Nucleotidester ist schwächer.

Gegen Hydrolyse sind die Derivate von I recht stabil. Die Einwirkung von 2n NH<sub>3</sub>, 0.1n NaOH oder 0.1—0.5n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden 5 Stdn. lang bei 50° ohne nennenswerte Hydrolyse überstanden. Drastischere Bedingungen (wie 1n NaOH oder 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

<sup>12)</sup> J. Amer. chem. Soc. 83, 4393 [1961].

<sup>13)</sup> F. CRAMER und R. WITTMANN, Chem. Ber. 94, 322 [1961]; ebenda 94, 328 [1961].

spalten in 1 Stde. bei 50° nahezu quantitativ die P—F-Bindung, wobei jedoch auch die P—O—C-Bindung teilweise hydrolysiert wird. In konz. Ammoniak entsteht bei Raumtemperatur nach mehreren Tagen neben Hydrolyseprodukten als Hauptprodukt das Monoesterphosphorsäureamid. Die Hydrolyse des 5'-Adenosylesters mittels Bariumhydroxyds bei 95° ergibt in 30 Min. 78% Adenosin-5'-phosphat, 15% Adenosin-3'-phosphat und 6% Adenosin-3',5'-cyclophosphat.

Der enzymatische Abbau der Nucleosidester entspr. I mit Schlangengiftdiesterase und Milzdiesterase in Tris-Puffer bei pH 8.35 und 40° zeigt, daß die 5'-Nucleosidester durch Schlangengiftdiesterase glatt, durch Milzdiesterase erwartungsgemäß jedoch nicht gespalten werden. Der 3'-Thymidylester wird von Milzdiesterase ebenfalls glatt zu 3'-Thymidylsäure hydrolysiert.

Herrn Prof. Dr. F. CRAMER bin ich für sein Interesse und die großzügige Förderung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Monofluorophosphorsäure-monophenylester (Kaliumsalz)*: Zu einer Lösung von 3.48 g (20 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* und 4.55 g (45 mMol) Triäthylamin in 15 ccm Acetonitril wurden 4.65 g (25 mMol) *DNFB* gegeben und 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand in 50 ccm Wasser aufgenommen und zweimal mit je 50 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphasen wurden verworfen. Die Wasserphase wurde mit einem sauren Ionenaustauscher Amberlite IR 120 unter Eiskühlung versetzt, bis die Lösung farblos wurde. Das ausgefallene 2,4-Dinitro-phenol und der Ionenaustauscher wurden abfiltriert und mit Eiswasser (ca. 250 ccm) gut nachgewaschen. Das Filtrat wurde mehrmals mit je 10 ccm Äther ausgeschüttelt, die Ätherphasen verworfen. Nach Neutralisation der Wasserphase mit Kaliumcarbonat wurde i. Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit wenig Methanol/Aceton aufgenommen, filtriert und mit reichlich Äther gefällt. Diese Umfällung wurde dreimal wiederholt. Schmp. 214 bis 216°, Ausb. 3.92 g (91.5% d. Th.).

$\text{KC}_6\text{H}_5\text{FO}_3\text{P}$  (214.2) Ber. C 33.65 H 2.35 F 8.87 P 14.46  
Gef. C 33.72 H 2.45 F 8.71 P 14.53

1 a) *Cyclohexylammoniumsalz*: Die über das Kaliumsalz gereinigte Verbindung wurde über Amberlite IR 120 H<sup>+</sup> in die Säure übergeführt und mit Cyclohexylamin neutralisiert. Nach Einengen i. Vak. zur Trockne wurde der Rückstand aus Acetonitril umkristallisiert. Schmp. 148—149°.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{FO}_3\text{P}$  (275.3) Ber. C 52.36 H 6.96 F 6.90 N 5.09 P 11.25  
Gef. C 52.72 H 6.74 F 6.91 N 5.53 P 11.29

2. *Monofluorophosphorsäure-[p-chlor-phenylester] (Kaliumsalz)*: Zu einer Lösung von 4.16 g (20 mMol) *Phosphorsäure-[p-chlor-phenylester]* und 4.55 g (45 mMol) Triäthylamin in 15 ccm Acetonitril wurden 4.65 g (25 mMol) *DNFB* gegeben und analog 1.) aufgearbeitet. Schmp. 238—239°, Ausb. 4.64 g (93% d. Th.).

$\text{KC}_6\text{H}_4\text{ClFO}_3\text{P}$  (248.6) Ber. C 28.99 H 1.62 F 7.64 P 12.46  
Gef. C 29.30 H 1.54 F 7.97 P 12.45

2 a) *Cyclohexylammoniumsalz*: Analog 1a) aus dem Kaliumsalz dargestellt. Schmp. 138°.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{ClFO}_3\text{P}$  (309.7) Ber. C 46.54 H 5.86 F 6.14 N 4.52 P 10.00  
Gef. C 47.44 H 5.81 F 5.79 N 4.41 P 9.79

3. *Monofluorophosphorsäure-p-tolyester (Kaliumsalz)*: Aus 3.76 g (20 mMol) *Phosphorsäure-p-tolyester*, 4.55 g (45 mMol) Triäthylamin und 4.65 g (25 mMol) *DNFB* analog 1. dargestellt und aufgearbeitet. Schmp. 235–236°, Ausb. 3.66 g (83 % d. Th.).

$\text{KC}_7\text{H}_7\text{FO}_3\text{P}$  (228.2) Ber. C 36.84 H 3.09 F 8.33 P 13.57  
Gef. C 36.29 H 2.96 F 8.51 P 13.58

3a) *Cyclohexylammoniumsalz*: Analog 1a) aus dem Kaliumsalz dargestellt. Schmp. 109 bis 111°.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2 \cdot \text{C}_7\text{H}_8\text{FO}_3\text{P}$  (289.3) Ber. C 53.97 H 7.32 F 6.57 N 4.84 P 10.71  
Gef. C 54.24 H 7.31 F 5.93 N 5.00 P 10.43

4. *Monofluorophosphorsäure-methylester (Kaliumsalz)*: 3.10 g (10 mMol) *Phosphorsäure-monomethylester-bis-cyclohexylammoniumsalz* wurden über einen mit Pyridin neutralisierten Ionenaustauscher Amberlite IR 120 in das Pyridiniumsalz übergeführt, dieses sodann durch mehrmaliges Eindampfen i. Vak. mit überschüss. Triäthylamin in das Bis-triäthylammoniumsalz umgesetzt. Nach Zugabe von 1.01 g (10 mMol) Triäthylamin, 5 ccm Acetonitril und 2.33 g (12.5 mMol) *DNFB* rührte man 24 Stdn. bei Raumtemperatur und arbeitete auf wie unter 1. Zur Reinigung des Kaliumsalzes wird dieses mit 10 ccm Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (8:1:1) aufgenommen und mit 20 ccm Isopropylalkohol versetzt. Die schmierige Trübung wird mit Aktivkohle und durch Filtrieren entfernt. Nach Einengen i. Vak. und Aufnehmen mit Methanol kann das Kaliumsalz mit Aceton/Äther gefällt werden. Schmp. 166°, Ausb. 1.07 g (70 % d. Th.).

$\text{KCH}_3\text{FO}_3\text{P}$  (152.1) Ber. C 7.90 H 1.99 F 12.49 P 20.36  
Gef. C 7.99 H 2.06 F 12.68 P 20.27

5. *Monofluorophosphorsäure-5'-adenosylester (Ammoniumsalz)*: Zur Lösung von 1.74 g (5 mMol) *Adenosin-5'-phosphorsäure* und 3.7 g (20 mMol) Tri-n-butylamin in 10 ccm Dimethylformamid gab man 1.86 g (10 mMol) *DNFB* und rührte. Nach 24 Stdn. wurde mit 20 ccm Acetonitril/20 ccm Äther versetzt und mit 2 ccm Cyclohexylamin gefällt (Fällung I). Das Lösungsmittel dekantierte man, nahm nach Einengen i. Vak. mit 10 ccm Wasser auf, schüttelte mit Äther mehrmals aus und verwarf die Ätherphasen. Die mit der Cyclohexylaminfällung I vereinigte Wasserphase wurde unter Eiskühlung über einen sauren Austauscher Amberlite IR 120  $\text{H}^+$  gegeben, eventuell noch ausgefallenes 2,4-Dinitro-phenol abfiltriert und sofort mit Ammoniak neutralisiert. Nach Einengen i. Vak. zur Trockne wurde mit wenig Methanol aufgenommen und mit reichlich Aceton/Äther gefällt. Der Niederschlag wurde durch Lösen in warmem Äthanol und Fällen mit Acetonitril in der Kälte umkristallisiert. Schmp. 170°, Ausb. 1.38 g (75.5 % d. Th.)  $\lambda_{\max}$  258 m $\mu$  (pH 7).

$\text{NH}_3 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_6\text{P}$  (366.3) Ber. F 5.19 N 22.95 P 8.46 Gef. F 5.04 N 23.34 P 8.52

5a) *Cyclohexylammoniumsalz*: Das Cyclohexylammoniumsalz der Fällung I kann ebenfalls durch mehrfaches Umfällen mit Methanol/Äther rein erhalten werden. Schmp. 140°,  $\lambda_{\max}$  257 m $\mu$  (pH 7).

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_6\text{P}$  (448.4) Ber. C 42.86 H 5.84 F 4.24 N 18.74 P 6.91  
Gef. C 42.51 H 5.94 F 4.26 N 17.84 P 6.86

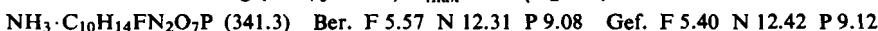
5b) *Hydrolyse des Ammoniumsalzes*: 0.018 g (0.05 mMol) des Ammoniumsalzes wurden mit 0.5 mMol Bariumoxyd in 2.5 ccm Wasser in einer PVC-Flasche 30 Min. auf 90° erhitzt. Nach Abkühlen gab man Amberlite IR 120  $\text{H}^+$ -Austauscher zu und neutralisierte das Filtrat mit Ammoniak. Danach wurde im Gemisch 80 % Ammoniumsulfat/18 % 1 m Natriumacetat/2 % Isopropylalkohol absteigend auf mit Ammoniumsulfat präpariertem Papier Ederol 202 chromatographisch getrennt; die Substanzen mit den  $R_F$ -Werten 0.15, 0.22 und 0.34 wurden

eluiert und erwiesen sich nach spektroskopischer Auswertung als Adenosin-3'-5'-cyclophosphat (6.3%), Adenosin-3'-phosphat (15.6%) und Adenosin-5'-phosphat) (78%).

6. *Monofluorophosphorsäure-3'-thymidylester (Ammoniumsalz)*: 0.120 g (0.3 mMol) Pyridiniumsalz der 3'-Thymidylsäure und 0.222 g (1.2 mMol) Tri-n-butylamin wurden, in 2 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 0.093 g (0.5 mMol) DNFB versetzt. Nach 48 Stdn. bei Raumtemperatur gab man 50 ccm Äther zu und schüttelte mit je 5 ccm Wasser viermal aus. Die vereinigten Wasserphasen wurden zuerst i. Wasserstrahl-, dann i. Hochvak. zum Sirup eingeengt, der Rückstand mit wenig Methanol aufgenommen und auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b im Gemisch B chromatographiert. Die Bänder mit  $R_F$  0.59 wurden ausgeschnitten und mit Methanol eluiert, die Eluate eingeengt und mit reichlich Äther gefällt, abzentrifugiert und getrocknet. Ausb. 0.084 g (82.3% d. Th.).  $\lambda_{\text{max}}$  267 m $\mu$  (pH 7).



7. *Monofluorophosphorsäure-5'-thymidylester (Ammoniumsalz)*: 0.196 g (0.5 mMol) 5'-Thymidylsäure (Diammoniumsalz; Dihydrat) wurden über einen sauren Austauscher Amberlite IR 120 in die freie Säure und durch Neutralisation mit Tri-n-butylamin in das Salz übergeführt. Dieses wurde, in 5 ccm Acetonitril gelöst, mit 0.186 g (1 mMol) DNFB und 0.278 g (1.5 mMol) Tri-n-butylamin versetzt. Nach 48 Stdn. bei Raumtemperatur arbeitete man analog 6. auf, trennte auf Schleicher & Schüll 2316 im Gemisch B und eluierte die Bänder mit  $R_F$  0.57. Ausb. 0.115 g (67.6% d. Th.).  $\lambda_{\text{max}}$  267 m $\mu$  (pH 7).



8. *Monofluorophosphorsäure-5'-uridylester (Ammoniumsalz)*: 0.370 g (1 mMol) 5'-Uridylsäure (Natriumsalz) wurden analog 7. in das Tri-n-butylammoniumsalz übergeführt, in 5 ccm Acetonitril aufgenommen und mit 0.372 g (2 mMol) DNFB und 0.556 g (3 mMol) Tri-n-butylamin versetzt. Nach 48 Stdn. bei Raumtemperatur wurde analog 6. aufgearbeitet.  $R_F$  0.38 im Gemisch B. Die getrocknete Substanz ist hygroskopisch und nimmt 2 H<sub>2</sub>O auf. Ausb. 0.213 g (62% d. Th.).  $\lambda_{\text{max}}$  261 m $\mu$  (pH 7).



9. *Symm. Diphenylpyrophosphat (Bis-cyclohexylammoniumsalz)*: 0.348 g (2 mMol) Phosphorsäure-monophenylester, 0.790 g (10 mMol) Pyridin und 0.372 g (2 mMol) DNFB wurden in 5 ccm Acetonitril gelöst und 10 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde mit 1 ccm Cyclohexylamin und 50 ccm Aceton gefällt, der Niederschlag abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Die Fällung ergab, aus wenig Wasser umkristallisiert, 0.2 g (38% d. Th.) *Symm. Diphenylpyrophosphat (Bis-cyclohexylammoniumsalz)*, identisch mit einer Probe nach l. c.<sup>13)</sup>. Aus dem Wasserfiltrat wurden mit Aceton 0.223 g (30% d. Th.) *Phosphorsäure-monophenylester-bis-cyclohexyl-ammoniumsalz*) gefällt. Die Aufarbeitung des ersten Acetonfiltrates, wie unter 1. beschrieben, ergab 0.110 g (26% d. Th.) *Monofluorophosphorsäure-phenylester (Kaliumsalz)*.

10. *Phosphorsäure-monophenylester-amid*: 0.174 g (1 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* und 0.252 g (2.5 mMol) Triäthylamin wurden in 5 ccm Acetonitril gelöst und 0.230 g (1.25 mMol) DNFB zugegeben. Nach 70 Min. Röhren bei Raumtemperatur wurde trockenes Ammoniakgas eingeleitet. Danach gab man 1 ccm Cyclohexylamin und 50 ccm Aceton zu, saugte die Fällung ab und wusch mit Aceton nahezu farblos. Der Niederschlag wurde mit wenig Methanol/etwas Aceton aufgenommen, der ungelöste *Phosphorsäure-monophenylester* abgesaugt und das Filtrat durch Äther gefällt. Umfallen mit Methanol/Äther erbrachte 0.114 g (42% d. Th.) *Cyclohexylammoniumsalz des Phosphorsäure-monophenylester-amids*, identisch mit einer Probe nach l. c.<sup>13)</sup>.

11. *Umsetzung von Orthophosphorsäure mit DNFB*: Zu einer Suspension von 0.098 g (1 mMol) wasserfreier *Orthophosphorsäure* und 0.404 g (4 mMol) Triäthylamin in 5 ccm

Acetonitril wurden 0.558 g (3 mMol) *DNFB* gegeben und bei Raumtemperatur 24 Stdn. geführt. Aufarbeitung wie unter 1. ergab 0.145 g eines Salzgemisches, nach der Chromatographie im Gemisch C vornehmlich aus 3 Substanzen bestehend:  $R_F$  0.22 (Monofluorophosphat),  $R_F$  0.46 (Fluorid) und  $R_F$  0.75 (wahrscheinlich ein Aminolyseprodukt der Difluorophosphorsäure). Dieses Salzgemisch wurde nicht getrennt.

12. *Phosphorsäure-phenylester-[2,4-dinitro-phenylester]*: Zur Lösung von 0.174 g (1 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* und 0.552 g (3 mMol) *2,4-Dinitro-phenol* in 2 ccm Pyridin und 5 ccm Acetonitril gab man 1.031 g (5 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* und schüttelte 24 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wurde mit 10 ccm Wasser aufgenommen und der ölige Rückstand mit 10 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde mit Eis gekühlt, mit 2 ccm 1*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und mehrmals ausgeäthert. Nach dem Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat wurde filtriert, mit Pyridin neutralisiert und der Äther i. Vak. abgezogen. Der *Phosphorsäure-phenylester-[2,4-dinitro-phenylester]* bildet ein blaßgelbes Öl, welches zu weiteren Untersuchungen wegen seiner Instabilität sofort umgesetzt werden mußte.

#### *Chromatographie*

Zur chromatographischen Charakterisierung der Substanzen dienten folgende Lösungsmittelgemische und Papiere.

Gemisch A: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (8:1:1)

B: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2)

C: n-Propylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (6:3:1)

D: Isopropylalkohol/1-proz. wäßr. Ammoniumsulfatlösung (2:1)

Für die Gemische A – C wurde das Papier Schleicher & Schüll 2043 b mgl. für das Gemisch D Binzer-Ederol 202, getränkt mit Ammoniumsulfat, benutzt.

Zur quantitativen Chromatographie der Nucleinsäurederivate wurde das Papier Schleicher & Schüll 2316 säuregewaschen verwendet. In allen Fällen wurde absteigend chromatographiert.

	A	B	C	D
Fluorid	0.20	0.38	0.43	0.49
2,4-Dinitro-phenol	0.62	0.74	0.81	0.81
I (R = Phenyl)	0.68	0.77	0.79	0.80
I (R = p-Chlorphenyl)	0.73	0.77	0.80	0.81
I (R = p-Tolyl)	0.72	0.78	0.82	0.83
I (R = Methyl)	0.52	0.62	0.65	0.67
Monofluorophosphorsäure	0.05	0.17	0.22	
I (R = 5'-Adenosyl)	0.24	0.44	0.51	0.61
I (R = 3'-Thymidyl)	0.44	0.62	0.60	0.77
I (R = 5'-Thymidyl)	0.37	0.55	0.55	0.75
I (R = 5'-Uridyl)	0.22	0.39	0.40	0.65
Adenosin-5'-phosphorsäure	0.00	0.11	0.19	0.34
Thymidin-3'-phosphorsäure	0.04	0.18	0.24	0.54
Thymidin-5'-phosphorsäure	0.03	0.15	0.21	0.53
Uridin-5'-phosphorsäure	0.00	0.09	0.14	0.38
Phosphorsäure-phenylester- [2,4-dinitro-phenylester]	0.74			