

ROLF WITTMANN

## Pikrylchlorid, ein neues Mittel zur Phosphatübertragung

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

(Eingegangen am 8. März 1963)

Pikrylchlorid (I) ermöglicht die Synthesen von Mono- und Diestern der Phosphorsäure, sowie von *symm.* Diestern der Pyrophosphorsäure in guten Ausbeuten<sup>1)</sup>. Als Basen werden sowohl Pyridin wie auch stark basische tertiäre Amine verwendet. An Stelle von I können mit gleichem Erfolg das *N*-[2.4.6-Trinitro-phenyl]-pyridiniumchlorido oder -pikrat eingesetzt werden. Nucleotide werden auf diesem Wege zu Nucleotidestern, 2'.3'-Cyclophosphaten und Oligonucleotiden umgesetzt.

Auf dem Gebiete der präparativen Nucleinsäurechemie besteht bis heute noch immer ein Bedarf an guten Kondensationsmitteln. Nachdem wir aktive Halogen-Heterocyclen, wie z. B. Cyanurchlorid<sup>2)</sup>, auf ihre Eignung in Phosphorylierungsreaktionen geprüft hatten, wurde nun das Pikrylchlorid untersucht, dessen Halogenatom bekanntlich genauso leicht ausgetauscht werden kann wie dasjenige des Cyanurchlorides. Die Versuche haben bewiesen, daß I ein sehr gutes Kondensationsmittel für die Nucleotidchemie ist, denn es reagiert bei Raumtemperatur in Gegenwart von Pyridin und anderen starken tertiären Basen rasch mit Phosphorsäuren, wobei diese anschließend auf ein nucleophiles Agens, wie z. B. Alkoholat oder Acylat, übertragen werden. Ein großer Vorteil dürfte hierbei wohl sein, daß keine Niederschläge, wie z. B. der Harnstoff bei der Carbodiimidreaktion, auftreten, die Reaktionslösungen somit homogen bleiben.

So werden z. B. aus 2 Moll. Monoesterphosphorsäuren und 1 Mol. I in Gegenwart von Pyridin in 1 Stde. bei Raumtemperatur quantitativ die *symm.* Diester der Pyrophosphorsäure gebildet.

Setzt man Monoesterphosphorsäuren mit I in Gegenwart von Pyridin und einem Überschuß an Alkohol bei Raumtemperatur um, so ist bereits nach 30 Min. kein Monoesterphosphat mehr nachzuweisen, sondern nur das Endprodukt, der gemischte Diester der Phosphorsäure. Orthophosphorsäure reagiert in Gegenwart von I, Pyridin und einem Überschuß an Alkohol quantitativ zu den entsprechenden Diesterphosphaten. Auch in Anwesenheit von starken tertiären Basen ist es sehr schwierig, die Reaktion auf der Stufe der Monoesterphosphorsäure anzuhalten; man erhält daneben immer Diesterphosphate. Als weitere Nebenprodukte entstehen unterschiedliche Mengen an Monoesterpyrophosphaten, ebenso durch Reaktionen von Pyrophosphorsäure mit Alkoholen und I neben etwas *symm.* Diesterpyrophosphat erhältlich.

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

1) R. WITTMANN, Vorgetragen auf d. Südwestd. Chemie-Dozenten-Tagung am 25. 5. 1961 in München; Angew. Chem. 73, 549 [1961].

2) R. WITTMANN und F. CRAMER, Angew. Chem. 73, 220 [1961].

Adenosin bildet mit Orthophosphorsäure, Triäthylamin und I in Acetonitril/DMF ein Gemisch mehrerer Substanzen, in welchem chromatographisch neben Adenosinmono- und diphosphat zahlreiche Oligomere nachgewiesen werden konnten. Adenosin-3'-phosphorsäure bildet mit I in DMF und Pyridin quantitativ das 2'.3'-Cyclophosphat<sup>3)</sup>. Nach längerem Stehenlassen bei Raumtemperatur können in dieser Reaktionslösung ebenfalls eine Reihe von Oligomeren nachgewiesen werden. Bei analoger Umsetzung von Thymidin-3'-phosphorsäure ließen sich neben dem Hauptprodukt 3'.5'-Cyclophosphat ebenso Oligothymidylsäuren nachweisen. Über eine gezielte Synthese der Internucleotidbindung in 76-proz. Ausbeute wurde bereits kurz berichtet<sup>4)</sup>. Adenosin-5'-phosphorsäure reagiert in der Hauptsache zu *P*<sup>1</sup>,*P*<sup>2</sup>-Di-5'-adenosyl-pyrophosphat, welches über eine Pyrophosphataktivierung<sup>5)</sup> zu Oligonucleotiden weiterreagiert. Die genaue Auftrennung der Polymerengemische steht noch aus.

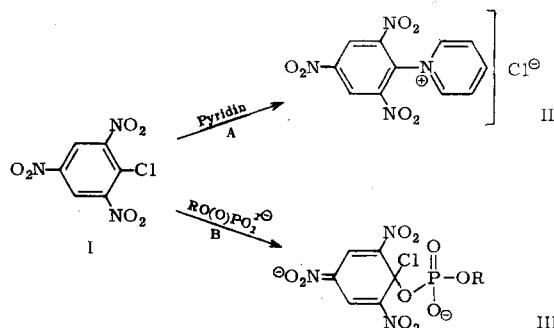
Bei allen diesen Versuchen stellte sich deutlich heraus, daß ohne Basen überhaupt keine Reaktion stattfindet. Bei Anwesenheit starker tertiärer Amine muß jedoch stets Pyridin zugegen sein, um eine glatte Reaktion zu erzielen. Dieser Befund führte dazu, auch das *N*-[2.4.6-Trinitro-phenyl]-pyridiniumchlorid<sup>6)</sup> (II) und das entsprechende -pikrat<sup>7)</sup> auf ihre Fähigkeiten zur Phosphatübertragung zu untersuchen: Diese Verbindungen können ganz analog zu I verwendet werden.

2.4.6-Trinitro-phenyläther, wie z. B. Äthylpikryläther, geben mit Phosphorsäuren und Basen nur ganz schwache Reaktion zu den Diestern.

Nebenreaktionen von I mit Alkoholen zu den entsprechenden Pikryläthern sind bei den aliphatischen Alkoholen nicht zu vermeiden, bei den Nucleotiden treten diese jedoch offensichtlich infolge sterischer Hinderung nur in untergeordnetem Maße auf.

#### REAKTIONS-MECHANISMUS

Als einleitenden Schritt kann man folgende zwei Möglichkeiten diskutieren:



Nach Weg A sollte zuerst das Pyridin mit I zum Komplex II reagieren, der ja ebenfalls als sehr reaktiv befunden wurde. Dies setzt voraus, daß das Pyridin nucleophiler

3) J. STOCKX, Bull. Soc. chim. Belgique 70, 595 [1961].

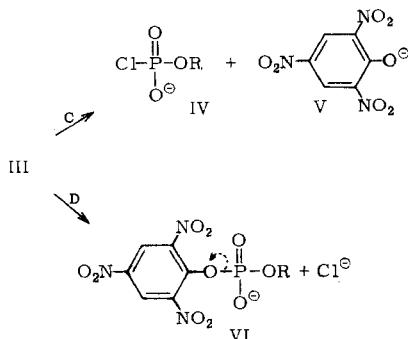
4) F. CRAMER, R. WITTMANN, K. DANEK und G. WEIMANN, Angew. Chem. 75, 92 [1963].

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

6) M. BUSCH und W. KÖGEL, J. prakt. Chem. 84, 507 [1911].

7) F. W. HODGES, J. chem. Soc. [London] 1926, 2417.

ist als das Monoesterphosphatanion. Nach der Nucleophilitätsskala<sup>8)</sup> ist Pyridin ( $n = 3.6$ ) jedoch weniger nucleophil als das Phosphatdianion  $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $n = 3.8$ ), das dem Monoesterphosphatanion vergleichbar sein dürfte. Somit kommt auch Weg B in Frage, zuerst zu einem Produkt III analog der Formulierung von J. MEISENHEIMER<sup>9)</sup> führend, dem nun seinerseits wiederum zwei Möglichkeiten zur Weiterreaktion offen stehen:



Unter Wanderung des Chloratoms zum Phosphor in einem intramolekularen 4-Zentrenmechanismus nach Weg C würde ein Phosphorsäuremonohalogenid IV gebildet, welches ein starkes Phosphorylierungsmittel sein müßte. Weg C wäre somit ein analoger Fall zu der Reaktion der Phosphorsäuren mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol<sup>10)</sup>, welche bekanntlich zu den Monoester-fluorophosphaten führt. Im vorliegenden Falle spricht die Tatsache, daß Pikryläther nur sehr schlecht reagieren, jedoch gegen den Weg C. Ebenso läßt die bereits angeführte Reaktionsfreudigkeit des Komplexes II, wie auch des entsprechenden Pikrates (II, 2,4,6-Trinitrophenolat statt  $\text{Cl}^-$ ), den Schluß zu, daß die Umsetzung über Weg D zum gemischten 2,4,6-Trinitrophenylester VI abläuft.

VI muß durch den starken Elektronensog der drei Nitrogruppen eine sehr labilierte P—O—C-Bindung besitzen, die, wie eingezeichnet, aufspaltet und somit einen nucleophilen Angriff am Phosphor ermöglicht. VI kann als das gemischte Säure-anhydrid der Pikrinsäure ( $pK 0.38$ ) und der Monoesterphosphorsäure ( $pK_1 1.5$ ) aufgefaßt werden. Allgemein spalten gemischte Anhydride so auf, daß stets das Anion der stärkeren Säure, in unserem Falle das Pikrat, infolge seiner größeren Resonanz-stabilisierung ausgestoßen und somit der zweite Teil des Moleküls, die schwächere Säure, auf nucleophile Agentien übertragen wird<sup>11)</sup>.

Das Zwischenprodukt VI erfüllt demnach alle Forderungen, die an eine phosphorylierende Zwischenstufe gestellt werden müssen. Leider konnte VI bisher noch nicht isoliert oder spektrographisch nachgewiesen werden.

Herrn Prof. Dr. F. CRAMER bin ich für die gebotene Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

<sup>8)</sup> J. HINE, Reaktivität und Mechanismus in der organischen Chemie, S. 140, Verlag G. Thieme, Stuttgart 1960.

<sup>9)</sup> Liebigs Ann. Chem. 323, 205 [1902].

<sup>10)</sup> R. WITTMANN, Angew. Chem. 74, 214 [1962]; Chem. Ber. 96, 771 [1963].

<sup>11)</sup> F. CRAMER und R. WITTMANN, Chem. Ber. 94, 322 und 328 [1961].

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *P<sub>1</sub>.P<sub>2</sub>-Diphenyl-pyrophosphat (Bis-cyclohexylammoniumsalz)*: 0.348 g (2 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* und 0.247 g (1 mMol) I wurden in 10 ccm Acetonitril und 2 ccm Pyridin gelöst und 3 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 2 ccm Cyclohexylamin und 50 ccm Äther zugegeben, die Fällung abgesaugt, mit Äther und Aceton nahezu farblos gewaschen und aus Wasser unter Zusatz von wenig Pyridin umkristallisiert. Schmp. 258°, Ausb. 0.427 g (80.9 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

1 a. Analoger Ansatz, jedoch mit 0.778 g (1.5 mMol) *N-[2.4.6-Trinitro-phenyl]-pyridinium-pikrat* anstelle von I. Ausb. 0.455 g (86.2 % d. Th.).

2. *P<sub>1</sub>.P<sub>2</sub>-Bis-[p-chlor-phenyl]-pyrophosphat (Bis-cyclohexylammoniumsalz)*: 0.416 g (2 mMol) *Phosphorsäure-[p-chlor-phenylester]* und 0.371 g (1.5 mMol) I wurden analog 1. umgesetzt und aufgearbeitet. Schmp. 270°, Ausb. 0.507 g (85.1 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

3. *P<sub>1</sub>.P<sub>2</sub>-Di-p-tolyl-pyrophosphat (Bis-cyclohexylammoniumsalz)*: 0.376 g (2 mMol) *Phosphorsäure-p-tolyester* und 0.371 g (1.5 mMol) I wurden analog 1. umgesetzt und aufgearbeitet. Schmp. 270°, Ausb. 0.445 g (80 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

4. *Phosphorsäure-phenylester-methylester (Cyclohexylammoniumsalz)*: Der Lösung von 0.174 g (1 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* ließ man in 5 ccm *Methanol* und 2 ccm Pyridin bei Raumtemperatur eine Lösung von 0.371 g (1.5 mMol) I in 5 ccm Acetonitril zutropfen. Nach 1 Stde. wurde alles Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, mit 20 ccm Wasser aufgenommen, mit 20 ccm Äther ausgeschüttelt und nach Zugabe von 2 ccm *Triäthylamin* die Wasserphase erneut i. Vak. zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde mit reichlich Aceton und wenig Äther aufgenommen und vom ungelösten *Triäthylamin-hydrochlorid* (ca. 74 % d. Th.) abfiltriert. Das Filtrat wurde nach Zugabe von 2 ccm Cyclohexylamin i. Vak. zur Trockene gebracht und der Rückstand aus Acetonitril umkristallisiert. Schmp. 152–153°, Ausb. 0.249 g (86.8 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

5. *Phosphorsäure-phenylester-benzylester (Cyclohexylammoniumsalz)*: Ansatz analog 4., jedoch mit 5 ccm *Benzylalkohol*. Nach einer Stde. bei Raumtemperatur wurde mit 2 ccm *Triäthylamin* sowie 50 ccm Äther versetzt und mit 5 mal 10 ccm Wasser ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde verworfen und die Wasserphase analog 4. aufgearbeitet. Schmp. 147–149°, Ausb. 0.287 g (79.6 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

6. *Phosphorsäure-[adenosyl-5'-ester]-methylester (Ammoniumsalz)*: 0.174 g (0.5 mMol) *Adenosin-5'-phosphorsäure* wurden mit 0.185 g (1 mMol) *Tri-n-butylamin* in 5 ccm *Methanol* und 2 ccm Pyridin gelöst, sodann eine Lösung von 0.741 g (3 mMol) I in 5 ccm Acetonitril zugesetzt. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wurde mit 50 ccm Wasser und 2 ccm verd. Ammoniak versetzt und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde i. Vak. bei 35° zur Trockene gebracht, mit wenig Methanol aufgenommen und auf Whatman 3 MM-Papier im Gemisch Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (7:1:2) absteigend chromatographiert. Die breiten Bänder mit *R<sub>F</sub>* 0.40 wurden mit Methanol eluiert, das Eluat etwas eingeengt und mit Aceton gefällt. Ausb. 0.166 g (84 % d. Th.) Monohydrat, identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>11</sup>.

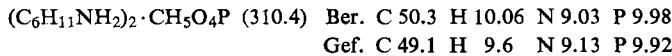
7. *Adenosin-2'.3'-cyclophosphat (Calciumsalz)*: Der Lösung von 0.175 g (0.25 mMol) *Adenosin-3'-phosphorsäure (Tri-n-octylammoniumsalz)* in 2 ccm Pyridin und 2 ccm Acetonitril ließ man eine Lösung von 0.310 g (1.25 mMol) I in 2 ccm Acetonitril zutropfen, zog sodann das Lösungsmittel i. Vak. ab, nahm den Rückstand mit wenig verd. Ammoniak auf und schüttelte mehrmals mit Äther aus. Die Wasserphase wurde i. Vak. zur Trockene gebracht, mit wenig

Methanol aufgenommen und auf Whatman 3 MM-Papier im obigen Gemisch chromatographiert. Nach Eluieren der Bänder mit  $R_F$  0.47–0.49 mit Methanol wurde eingeengt und mit einer Lösung von Calciumchlorid in Äthanol gefällt. Ausb. 0.06 g (69 % d. Th.), identisch mit einer Probe nach 1. c.<sup>12)</sup>.

7a. *Polymerisation von Adenosin-3'-phosphorsäure:* Läßt man obigen Ansatz 7. mehrere Tage bei Raumtemperatur stehen, so erscheinen im Chromatogramm (Laufmittel tert. Amylalkohol/Ämeisensäure/Wasser 3:2:1) Flecken von Oligoadenylsäuren mit den  $R_F$ -Werten 0.0 ( $n > 5$ ), 0.02 ( $n = 5$ ), 0.06 ( $n = 4$ ), 0.10 ( $n = 3$ ), 0.14, 0.16 ( $n = 2$ ), 0.28, 0.37 ( $n = 1$ ) und 0.49 (2'.3'-Cyclophosphat). Die Polymerisationsgrade  $n$  und  $R_F$ -Werte wurden 1. c.<sup>12)</sup> entnommen.

8. *Umsetzung von Adenosin mit Orthophosphorsäure:* 0.196 g (2 mMol) *Orthophosphorsäure* (wasserfrei) und 0.606 g (6 mMol) *Triäthylamin* wurden in 10 ccm Acetonitril gerührt und hierzu eine Lösung von 0.494 g (2 mMol) I und 0.267 g (1 mMol) *Adenosin* in 10 ccm DMF gegeben. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur wurden weitere 2.47 g (10 mMol) I und 2 ccm Pyridin zugesetzt. Nach 5 Stdn. bei 50° schied sich ein dicker kristalliner Niederschlag aus, welcher abgesaugt und mit Äther nachgewaschen wurde. Im Chromatogramm Isopropylalkohol/1-proz. währ. Ammoniumsulfatlösung (2:1) auf Ederol-Papier 202, getr. mit Ammoniumsulfat, konnten stark absorbierende Zonen  $R_F$  0.0–0.08–0.12 (*Oligoadenylsäuren*), 0.16 (*Adenosin-diphosphat*), 0.22 (*Di-5'-adenosyl-pyrophosphat*), 0.30 (*Adenosin-5'-phosphorsäure*) und 0.65 (2'.3'-Cyclophosphat) nachgewiesen werden.

9. *Phosphorsäure-monomethylester (Bis-cyclohexylammoniumsalz):* Der Lösung von 0.196 g (2 mMol) *Orthophosphorsäure* (wasserfrei) in 5 ccm *Methanol*, 0.404 g (4 mMol) *Triäthylamin* und 2 ccm *Pyridin* ließ man eine Lösung von 0.628 g (2.5 mMol) I in 5 ccm Acetonitril zutropfen. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wurde mit einigen Tropfen konz. Ammoniak gefällt, abgesaugt und mit Acetonitril sowie Aceton farblos gewaschen. Der Niederschlag wurde mit Methanol ausgekocht und die Filtrate zweimal mit *Cyclohexylamin* i. Vak. zur Trockene gebracht, mit wenig Methanol aufgenommen, filtriert und mit Aceton gefällt. Ausb. 0.242 g (39 % d. Th.).



<sup>12)</sup> A. M. MICHELSON, J. chem. Soc. [London] 1959, 1371.