終わりにのぞみ本研究に対して種々御便宜を与えられたグレラン製薬株式会社 柳沢昭社長ならびに高木修研究部長に深謝する。また元素分析を担当された当教室小林礼子嬢および東北大学薬学科 分析センターの方々に感謝する。

東北大学医学部薬学科, グレラン製薬研究部

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
87 (3) 270 ~ 274 (1967)

UDC 612.398.145

44. 藤本康夫, 成瀬正織: ヌクレオチドの合成 (第3報^{*1}) オキソ塩化リン
によるリボヌクレオシドの選択的リン酸化反応^{*2}

Yasuo Fujimoto and Masao Naruse: Synthesis of Nucleotides. III.^{*1}
Selective Phosphorylation of Ribonucleoside with
Phosphorus Oxychloride.^{*2}

(Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.^{*3})

Phosphorus oxychloride employed as an efficient phosphorylating agent in the synthesis of nucleotides was found to be an excellent catalyst for the conversion of ribonucleosides to their 2',3'-O-isopropylidene derivatives. 2',3'-O-Isopropylidene was obtained in a high yield. This fact has led to the establishment of a novel, single-step conversion of ribonucleosides to 5'-ribonucleotides in a high yield using phosphorus oxychloride, acetone, and pyridine, without isolation of the 2',3'-O-isopropylidene derivatives.

(Received June 6, 1966)

第2報において, 2-cyanoethylphosphate (2-CEP) を触媒としてヌクレオシドの 2'-OH と 3'-OH のイソプロピリデン化を行なった後, 2-CEP をリン酸化剤として再活用してリン酸化を行ない, リボヌクレオシドより 5'-モノヌクレオチドを合成する方法を報告したが, 2-CEP にかわりオキソ塩化リンを使用して同じような手法 (Chart 1) でリボヌクレオシドより 5'-モノヌクレオチドを合成したのでその結果について報告する.^{*4}

イソプロピリデン化反応 オキソ塩化リンはリン酸化剤として, またクロル化剤として知られているが, アセトンの存在下オキソ塩化リンがこれら諸反応に優先してイソプロピリデン化反応の触媒作用を示すかどうかについて調べた。イノシン, グアノシンに代表されるプリンヌクレオシドを室温でアセトンと反応させると収率よくイソプロピリデンイノシン (Ip-IR), イソプロピリデングアノシン (Ip-GR) が得られた。一方アセトンを添加しないで, アセトニトリル中, オキソ塩化リンとプリンヌクレオシド [I] を反応させ, その結果をペーパークロマトグラフィーにより調べると, R_f 値が 3'-リン酸エステルによく一致するスポットが認められた。このスポットに有機リンの存在が認められたが, シッフの反応が陰性であった。この成績体 [V] は, アセトンを添加することにより対応するイソプロピリデン体 [II] に転換した。イノシン, グアノシンをピリジン存在下でリン酸化すると種々のリン酸化成績体得られるが, これにアセトンを添加しても対応するイソプロピリデン体は得られなかった (Chart 2)。

さらに adenosine-3'-phosphate, および guanosine-3'-phosphate をオキソ塩化リンの存在下, アセトンと反応

^{*1} 第2報: 本誌, 86, 192 (1966)。

^{*2} 日本薬学会第 84 年年会で発表。(1964 年 4 月)

^{*3} 3-6-6 Asahimachi, Machida-shi, Tokyo.

^{*4} 著者等が日本薬学会第 84 年年会で発表したのち, 同様な試みが発表された。森等¹⁾ はイノシンのイソプロピリデン化とリン酸化をオキソ塩化リンに少量の水を加えて行なっている。また吉川等²⁾ はアセトン以外のカルボニル化合物とリボヌクレオシドとの反応をオキソ塩化リンを使用して検討している。

1) 森, 吉川, 高瀬, 加藤, 竹西, 日本農芸化学会, 昭和 39 年度大会 (1964 年 7 月 21 日)。

2) 吉川, 森, 草塩, 加藤, 竹西, 日本農芸化学会, 昭和 39 年度大会 (1964 年 7 月 21 日)。

Chart 1. Single-step Synthesis of 5'-Ribonucleotide from Ribonucleoside with Phosphorus Oxychloride

Chart 2. Reaction of Ribonucleosides with Acetone in the Presence of Phosphorus Oxychloride

させてもイソプロピリデン化反応は起こらず原料回収に終わった (Chart 3). したがって、成績体 [V] は、オキソ塩化リンとヌクレオシドとの1種のアダクトと考えられる. このようにイソプロピリデン化反応は、リン酸化反応、およびクロル化反応に優先することがわかった.

また今まで述べたイソプロピリデン化のメカニズムとして、オキソ塩化リンの触媒作用によるものとして Chart 4 に示したように考えている.

つぎにイノシン、グアノシンについて種々の溶媒を使用して、イソプロピリデン化反応を調べた. その結果を Table I に示す.

Table I からわかるように MeOH , ethylcellosolve などのアルコール系の溶媒が特に優れていた. もちろん、アセトン溶媒として兼用させても高収率でイソプロピリデン化は起こる. また脱水剤である 2,2-dimethoxypropane (DMP) を併用すると、イノシン、グアノシンの残存は認められなくなる. DMP のみを使用してもイソ

Chart 3. Reaction of Ribonucleoside-3'-phosphates with Acetone in the Presence of Phosphorus Oxychloride

Chart 4. Mechanism of Isopropylidenation of Ribonucleosides by Catalysis of Phosphorus Oxychloride

TABLE I. Isopropylidenation of Inosine and Guanosine in Several Solvents

a) Inosine (IR)

Solv.	IR (mg.)	POCl ₃ (mg.)	Acetone (ml.)	Yield (%)		
				IR	IpIR	5'IMP
—	133.6	766.8	4	8.2	76.0	16.3
DMP	133.6	766.8	3	0	87.1	12.1
MeOH	133.6	766.8	3	3.6	91.5	3.2
E. C.	133.6	766.8	3	3.5	82.8	14.8
MeCN	133.6	766.8	3	2.5	85.7	10.2
Dioxane	133.6	766.8	3	6.1	86.7	7.7
E. O. F.	133.6	766.8	3	5.4	87.5	4.7
THF	133.6	766.8	3	7.7	84.2	9.4
DMP	133.6	766.8	—	0	88.1	0.5

b) Guanosine (GR)

Solv.	GR (mg.)	POCl ₃ (mg.)	Acetone (ml.)	Yield (%)		
				GR	IpGR	5'GMP
—	141.6	766.8	4	5.9	89.6	5.9
E. C.	141.6	766.8	3	0	92.9	7.0
MeCN	141.6	766.8	3	3.6	92.6	3.7
Dioxane	141.6	766.8	3	3.8	93.8	2.4
THF	141.6	766.8	3	4.2	93.1	2.9

E. C.: ethylcellosolve

E. O. F.: ethylorthoformate

THF: tetrahydrofuran

プロピリデン化は起こるが、反応速度が遅く、着色が著しい。

リン酸化反応 Table I の結果からわかるようにイソプロピリデン化において1部リン酸化反応も起こることが認められた。イソプロピリデン化が終わったのちピリジンを滴下してリン酸化反応を行なった。リン酸化反応を行なうときにピリジンの滴下速度が速いと2つの副生物の生成が認められた。この反応生成物を脱イソプロピリデン化したのちペーパークロマトグラフィーで調べると、イノシンのリン酸化を例にとると5'-IMPのほかR_f値がそれよりも低い2つの成績体の副生が認められ、これらの副生物は0.4 N-LiOHで加水分解すると5'-IMPとなった。反応温度は-15, 0, 15°Cにて行なったが収率に大きな差はなかった。Table IIにその結果

TABLE II. Effect of the Reaction Temperature on Phosphorylation of Ribonucleosides

	Reaction temperature (°C)		
	15	0	-15
Inosine	91.0%	90.7%	89.9%
Guanosine	92.1	89.3	90.3

を示す。

オキシン塩化リンを用いても 2-CEP と同様にヌクレオシドより one step にて、5'-ヌクレオチドを合成することができた。

実験の部

分析方法 (ペーパークロマトグラフィー) 試料は東洋汙紙 No. 51A を使用して上昇法で展開した。展開溶媒系は、A : EtOH-H₂O (7 : 3), B : iso-PrOH-H₂O-conc. NH₄OH (70 : 25 : 5), C : BuOH-AcOH-H₂O (5 : 2 : 3), D : iso-PrOH-H₂O (7 : 3), および E : Isobutyric acid -AcOH-1N-NH₄OH (10 : 1 : 5) を用いた。紫外線検出器でペーパーを透視してクロマトグラムを検出した。Rf 値は Table III に示す。

TABLE III. Paper Chromatography of Nucleoside Derivatives

Compound	Rf values in solvent systems			
	A	B	C	D
Uridine	0.53	0.47	0.55	0.63
2',3'-O-Isopropylidene uridine	0.67	0.70	0.79	0.82
Adenosine	0.47	0.57	0.60	0.58
2',3'-O-Isopropylidene adenosine	0.59	0.75	0.80	0.78
Guanosine		0.37	0.46	0.49
2',3'-O-Isopropylidene guanosine		0.68	0.78	0.75
Inosine	0.49	0.50	0.46	0.52
2',3'-O-Isopropylidene inosine	0.62	0.70	0.77	0.78

汙紙上の UV 吸収部位を切り取り、熱水抽出を行ない、その抽出液の UV 吸収スペクトルを測定し、その比較により定量した。

2',3'-O-Isopropylidene nucleosides の合成 一般方法 ヌクレオシド (15 mmole) を acetone 120 ml. に懸濁し、POCl₃ 23.0 g. (150 mmole) をゆっくりと滴下した。その間温度が 25°C を越えないように注意した。滴下してから 20~60 min. 同温度で反応した。54 g. の Na₂CO₃ を 150 ml. の H₂O に溶かし、さらに水 145 g. を加えた液に反応液をゆっくりと注入した。6N-HCl で pH 7.0 に調整し、生じた ppt は汙別した。ppt は氷水 60 ml. で洗い、汙液と洗液を合せて減圧濃縮乾固した。残渣を acetone 200 ml. を使用してソックスレー抽出器により 8 hr. 抽出した (グアノシンの場合は EtOH 100 ml. を使用した)。抽出液を濃縮乾固すると 2',3'-O-isopropylidene nucleosides が得られた。これを熱水より 1~3 回再結晶した。

- イノシン 4.00 g. より 2',3'-O-isopropylidene inosine 3.80 g. (83%) を得た。m.p. 267~268°.
- グアノシン 4.25 g. より 2',3'-O-isopropylidene guanosine 4.05 g. (84%) を得た。m.p. 292°. (decomp.)
- アデノシン 4.00 g. より 2',3'-O-isopropylidene adenosine 3.57 g. (78%) を得た。m.p. 217~218°.
- ウリジン 3.66 g. より 2',3'-O-isopropylidene uridine 3.13 g. (74%) を得た。m.p. 163~164°.

種々の溶媒におけるイノシン、グアノシンのイソプロピリデン化反応 (Table I 参照) a) イノシンでの反応 acetone 3 ml. にイノシン 133.6 mg. (0.5 mmole) を懸濁し、これに Table I に示した溶媒 1 ml. を加え、つぎに攪拌しながら POCl₃ 766.8 mg. (5 mmole) をゆっくりと温度が 25°C を越えないように注意しながら加えた。1 hr. 後、反応液を氷冷した 1N-NaOH に注入し、さらに水を加えて全量を 25 ml. とした。その 10 μl. を東洋汙紙 No. 51A にスポットし、溶媒 C にて展開し、イノシン、2',3'-O-isopropylidene inosine を定量した。別に同じ方法で反応せしめた反応液を氷水で全量を 25 ml. とし (発熱するから注意する)、1 hr. 後、溶媒 E で展開し、同様に分析して 5'-IMP を定量した。

b) グアノシンでの反応 グアノシン 141.6 mg. (0.5 mmole) を acetone 3 ml. に懸濁し、これに Table I に示した溶媒 1 ml. を加え、攪拌しながら POCl₃ 766.8 mg. (5 mmole) をゆっくりと滴下した (この間反応温度が

25°C を越えないように注意した。) エチルセロソルフ, ジオキサン, テトラヒドロフランを使用したときは 30 min. 後, その他の場合は 1 hr. 後にイノシンの場合と同様の後処理と分析を行なって, グアノシン, 2',3'-O-isopropylideneguanosine, 5'-GMP を定量して Table II の結果を得た.

Single-step phosphorylation アセトン 2 ml. に MeCN 5 ml. を加え, 均一な溶液としたのち, これにイノシン 133.6 mg. またはグアノシン 141.6 mg. を懸濁せしめ, POCl₃ 766.8 mg. をゆっくり加え, さらに 1 hr. 攪拌を続けてイソプロピリデン化を行なった. 続いて無水ピリジン 2 ml. をゆっくりと加えたのち, (反応温度を 15, 0, -15°C に保った.) さらに 3 hr. 反応させた. 反応液を氷水中に注ぎさらに水にて全量を 25 ml. とし 1 夜放置した. この処理液 10 ml. を東洋汙紙 No. 51A にスポットし溶媒 E で展開し, 前記の分析方法で 5'-IMP, 5'-GMP を定量して Table II の結果を得た.

3'-AMP と acetone との反応 3'-AMP 347 mg. をアセトン 15 ml. に懸濁し, POCl₃ 1.53 g. を加えて室温で 3 hr. 攪拌した. 3'-AMP は少しずつ溶けていったが, 完全には溶けなかった. 反応液の 1 部を Na₂CO₃ 溶液で分解し, ペーパークロマトグラフィーで分析したが原料回収に終わった.

終わりに臨み本研究の発表を許可された協和醸酵工業株式会社社長 加藤弁三郎博士ならびに東京研究所長 木下祝郎博士に深謝致します. また実験に協力された佐藤百合子さんに感謝致します.

協和醸酵工業株式会社東京研究所

薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
87 (3) 274 ~ 279 (1967)

UDC 547.854.07

45. 高見沢 映, 平井健太郎, 石原(畠)町子, 石破暉之, 高瀬 晃, 炭本信三郎:

ピリミジン誘導体および関連化合物の研究 (第43報^{*1}) O,S-Bis-(ethoxycarbonyl)thiamine^{*2} の 1 新全合成法

Akira Takamizawa, Kentaro Hirai, Machiko Ishihara (*née* Hata), Teruyuki

Ishiba, Akira Takase, and Shinzaburo Sumimoto: Studies on

Pyrimidine Derivatives and Related Compounds. XLIII.^{*1}

A New Total Synthesis of O,S-Bis(ethoxy-carbonyl)thiamine.^{*2}

(Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.^{*3})

A very convenient route to obtain DCET (III) *via* B₁ acetal was presented. 3-Acetyl-3-chloropropanol (VI) was converted into O-tetrahydropyranyl acetal (VII) and condensed with dithiocarbamic acid (IX) to give thiazolidinethione acetal (X) readily. Dehydration of X by SOCl₂-pyridine gave SB₁ acetal (XV) in a high yield. Oxidative desulfurization of XV in AcOH solution in the presence of AcONa afforded B₁ acetal (XIV), which was easily separated as thiocyanate. XIV reacted with ClCOOC₂H₅ in NaOH solution to give CET acetal (XVII) in a high yield, and DCET was readily obtained from XVII by the action of phosgene with subsequent treatment with ethanol.

This method is considered to be very convenient in producing DCET industrially, because each step progresses by simple operation and in a high yield.

(Received June 6, 1966)

著者等¹⁾はさきにアルカリ水溶液中 thiamine (I) にクロル炭酸エチルを作用させると S-ethoxycarbonyl-thiamine^{*4} (II) が得られ, 2 モルのクロル炭酸エチルを直接作用させると O,S-bis(ethoxycarbonyl)thiamine^{*2}

*1 第 42 報: ビタミン投稿中.

*2 略称 DCET.

*3 Sagisu, Fukushima-ku, Osaka.

*4 略称 CET.

1) A. Takamizawa, K. Hirai: Chem. Pharm. Bull., **10**, 1102 (1962); A. Takamizawa, K. Hirai, Y. Hamashima: *Ibid.*, **10**, 1107 (1962).