薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
95 (5) 493—498 (1975)

UDC 547.291'233.04 : 547.857.057

ホルムアミドの反応 (第2報¹⁾) プリン環の一工程合成^{2,3)}

山田 裕, 岡本敏彦

東京大学薬学部⁴⁾Formamide Reactions. II.¹⁾ A One-Step Synthesis of
Purine Ring from Formamide^{2,3)}

HIROSHI YAMADA and TOSHIHIKO OKAMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo⁴⁾

(Received December 13, 1973)

Purine was synthesized by heating formamide at 170—200° without any other reagent. The maximum yield was 71% calculated from consumed formamide and 20.5% calculated from formamide used. 8-Formylamino-7,8-dihydro-9H-purine was isolated as an intermediate of purine formation and its reaction mechanism was proposed.

核酸塩基の基本骨格の一つであるプリン環は天然には、キノコ的一种 *Agaricus (Clitocybe) nebularis* BATSCH⁵⁾ から、また *Streptomyces Yokosukaensis*⁶⁾ から単離された Nebularine の塩基成分として存在することが知られている。

またプリン環合成の試みは古くから行なわれ、その主なものは、a) 4,5-diaminopyrimidine を無水義酸と CO₂ ガス気流中加熱閉環させる方法⁷⁾ b) tris-(formylamino)methane と phthalimidacetonitrile を加熱反応させる方法⁸⁾ c) aminoacetonitrile とホルムアミドの加熱反応⁹⁾ d) ホルムアミドと glycine あるいは glycine amide を POCl₃ の存在下、封管中で加熱反応させる方法¹⁰⁾ などであるが、これらの合成法は一般に低収率、使用原料の入手、精製などに難点があった。

著者は 4-pyridylcarbinol と HCONH₂ の反応で imidazole 置換 pyridine の生成することを報告した。¹⁾ 3-Pyridylcarbinol と HCONH₂ からは、これに対応する化合物は得られず、原料の 3-pyridylcarbinol に由来しない微量の生成物としてプリンが生成することを見出した。そこで Table I に示されるような各種条件下でのホルムアミドの加熱反応をおこない、プリンが極めて容易に、かつ前記 a)—d) のいずれの方法よりも収率よく得ることを見出した。

反応操作は、反応容器に空気冷却管を付け、ホルムアミドを 160° ないし 200° に加熱しておこなうが、Table I の実験例 No. 2 に見られるように 160° 以下の温度においては封管中の反応でもプリンの生成は認められなかった。

反応の進行にしたがってアンモニアガスおよび水が生成するが、この場合、特に脱水剤などの添加は収率に対し、より良い効果を与えるとは認め難い (Exp. 5 および 6)。殊に過剰の酸の添加は HCONH₂ の消費は多い

1) 第1報：山田 裕, 岡本敏彦, 薬誌, 95, 487 (1975)。

2) 岡本敏彦, 山田 裕, “日本薬学会第92年会講演要旨集,” 大阪, 1972年4月, p. 19。

3) H. Yamada, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 20, 623 (1972)。

4) Location: 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan。

5) N. Löfgren, B. Luning, H. Hedström, *Acta. Chem. Scand.*, 8, 670 (1954)。6) G. Nakamura, *J. Antibiotics, Ser., A*, 14, 94 (1961)。7) O. Isay, *Chem. Ber.*, 39, 251 (1906)。8) H. Brederbeck, F. Effenberger, G. Rainer, *Angew. Chem.*, 73, 63 (1961)。9) H. Brederbeck, F. Effenberger, G. Rainer, H.P. Schosser, *Ann.*, 659, 133 (1962)。

10) 森田 桂, 小林 栄, 島津 浩, 落合道彦, “第2回復素環の化学討論会講演要旨集,” 長崎, 1969年11月, p. 87。

TABLE I. Examples of Synthesis of Purine from Formamide

Expt. No.	Condition			Recovered HCONH ₂ (%)	Yield of purine	
	Reaction time (hr.)	Reaction temp. (°C)	Other component		a) (%)	b) (%)
1	10	160	—	100	—	—
2 ^{c)}	10	150—160	—	100	—	—
3 ^{c)}	29	180—200	—	71	49	14.4
4	28	170—190	—	71	71	20.5
5	5	185	conc. H ₂ SO ₄ ^{d)}	81	34	6.5
6	8	180—190	molecular sieve (4A)	54	14.1	6.5

a) Yield calculated from formamide consumed in the reaction.

b) Yield from formamide used as starting material.

c) The reaction was carried out in sealed tube.

d) mole ratio HCONH₂: H₂SO₄=1: 0.05

にもかかわらず、それに伴うプリンの生成増加は見られなかった。さらに高い温度での反応を行なうと、種々の副反応が起るのかまたは構造未確認生成物が増加するなど、好ましくない影響を与える。また、減圧下 (120—180 mmHg), 160° 以下の温度で反応を行なったが、プリンの生成は認められず、また 180° 以上の温度で長時間、生成水を減圧留去しつつ反応した場合にもプリンは生成しない。本来ホルムアミドは、加熱によって CO, CO₂, NH₃, H₂O, HCN, H₂, HCOOH などを生成することが知られているが、この場合、ホルムアミドの加熱によって生成する HCN, H₂O, HCOOH および NH₃ などの分解生成物がプリン環生成に不可欠のものであると考えられる。

この合成法では、ホルムアミドを 170—190° に加熱 (必要に応じ攪拌), 反応後、未反応のホルムアミドを減圧留去 (油浴温度は 130° 以下), 残渣を熱メタノールで抽出, 加熱還流の後, 不溶物を濾去し, 活性炭を使用して脱色, アセトンで再結晶すると融点 218° のプリンを得。赤外吸収 (IR) スペクトルにより標品と同定した。

反応中間体の捕捉と反応機構

ホルムアミドを 170—180° に加熱すると 1—2 時間で反応液は紫外線で蛍光を発するようになり、また薄層クロマト (Al₂O₃) で反応を追うことにより数種の spot が観察された。そこで、これらをアルミナカラムクロマトを用いての分離を試みたが、分離の過程で変化し、その構造を確定することは出来なかった。

しかし、ホルムアミドを 160—180° で 30 時間加熱攪拌ののち、AcOEt で抽出, Na₂SO₄ 乾燥, AcOEt を留去, ホルムアミドを留去して残渣をアセトンで再結し、プリンを得、この再結液より 198—214° (アセトンより再結晶) の幅広い分解点を有する化合物を微量捕捉した。本物質は、IR スペクトル (Fig. 1) において 1680—1700 cm⁻¹ に幅広い amide の吸収を有し、他はプリンの IR 吸収に多少類似する。

また本物質は非常に不安定な化合物で、メタノールと加熱還流し、あるいは数ヶ月間室温で放置すると容易にプリンに変化する。

分析値は C₅H₇ON₅ に一致し、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル (DMF-d₇) では τ 値 2.70 付近に水素 2 個分の >N-H プロトンに相当する幅広いシグナルが見られるが、これは D₂O 添加で消失する。また τ 値 1.90 に水

Fig. 1. IR Spectrum of 10 (KBr)

素 1 個分に相当する CHO プロトンのシグナルが doublet として、τ 値 0.90, 1.11, 1.35 にそれぞれ水素 1 個分の 3 本の ring proton のシグナルが存在し、これらの事実とマス (MS) スペクトル (M⁺ 165) の結果から本物質は Chart 1 の 10 に示される新規化合物 8-formyl-amino-7,8-dihydro-9H-purine であると見なされる。

前記, b), c), d) などの各種のプリン環合成法においては, これまで 4,5-diaminopyrimidine が, それらのプリン合成法における反応中間体であろうと予想されていたが, 単離されたことはなく, これらの合成法を含めて本物質がプリン合成の反応中間体として捕捉された最初の例であると考えられる。

本物質の MS スペクトルでは, $M^+ 165$ からホルムアミドの脱離した ($M^+ - 45$), $120\ m/e$ (purine) の fragment ion peak を示し, さらにこの物質が加熱によつて容易にプリンとホルムアミドを生成することもその構造を支持している。

本反応において, ホルムアミドという単一の化合物を唯一の出発物質とするのであるから, 反応機構の解明にあたっては,

- 1) 2ヶ所の炭素-炭素結合の形成
- 2) 1個の脱アミノ化反応
- 3) 還元反応
- 4) Pyrimidine 環と Imidazole 環の形成 (およびその何れが先に形成されるか)

以上の事柄がもっとも合理的に説明されなければならない。

本反応の機構は Chart 1 に示されるが, 反応中間体として捕捉された 8-formylamino-7,8-dihydro-9H-purine の構造は, この反応機構の解明に重要な手がかりを与えるものである。

反応は先づ, 式 (1) に示されるように, ホルムアミドの加熱により 2 分子間求核付加-脱水縮合反応によつてホルムアミドの二量体である formylformamidine (1) を生成する。

またホルムアミドは加熱により分解し H_2O と $H-CN$ を生成する。さらに [式 (3)] によって生成するアンモ

Chart 1. Proposed Reaction Mechanism of Eormamide yielding Purine

ニヤにより反応液は強アルカリ性を示す (pH 9—10). そのため, 生成したシアン化水素は反応系外へ気体として散逸するよりも, むしろ大部分は反応液にイオン化して存在し, ただちに反応に関与するものと考えられる. その際, 反応温度がきわめて高い場合には主反応に関与せず直ちに重合体を形成し, プリン生成の収率低下の原因となるものと思われる.

このようにして生成した H-CN は 1 の末端 aldehyde の carbonyl に対して付加し, 最初の C-C bond が形成され 2 となる. さらに 2 にもう一分子の H-CN が付加し 3 を形成, 二個所の炭素-炭素結合が作られ, 3 の末端の nitrile と amino 基の分子内求核付加により diimino 体 (4) を形成 (六員環形成) する. この diimino 体に, 生成したギ酸が付加し 5 となり, 5 のアミノ基とホルムアミドの carbonyl の間に閉環反応が起こり 6 を経て五員環を形成して 7 となる. 7 の hydroxy 基はホルムアミドにより formyl 化され 8 となり, 8 の 8 位の formyl 基とホルムアミドの間に求核置換反応と, それに続く 9 の脱炭酸とギ酸の脱離による還元によって前述した反応中間体 (10) が生成するものと考えられる. 化合物 (10) は容易に 8 位の formylamino 基が脱離することによりプリン環を形成する.

この反応系において化合物 10 がプリンの反応中間体として捕捉されたことにより, この反応においては, H-CN と NH_3 によるアデニン合成の反応系におけるように, imidazole 誘導体が先に生成するという可能性はすべて否定されるものと思われる.

次に一般的に従来のプリン環合成の際の反応中間体として推定されている diaminopyrimidine がこの反応系に存在するか否かを検討した.

4,5-Diaminopyrimidine は融点 200—201° の比較的安定な化合物で, これが反応系にもし存在するとすればカラムクロマト或いは薄層クロマトグラフィーにより検出されるはずであるが, 前述の通り, アルミナを用いたカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー (Al_2O_3) のいずれを用いても単離あるいは検出されなかった. もしこの物質を経由して反応が進行するとすれば, 前述の化合物 (10) は 4,5-diaminopyrimidine とホルムアミドの反応により生成したことが考えられる. そこで著者は 4,5-diaminopyrimidine および同様の機構で閉環すると考えられる *o*-phenylenediamine とのホルムアミドの閉環反応をおこない化合物 (10) あるいは, これに対応する化合物が生成するか否かを検討した.

[A] 4,5-Diaminopyrimidine とホルムアミドの反応¹¹⁾

Robins らは 4,5-diaminopyrimidine と過剰のホルムアミドの混合物をホルムアミドの沸点近くの高温で 15 分間, 加熱することによりプリンを得ているが, この反応ではこのような高い温度は必ずしも必要ではない. ここでは 130—145° の油浴中で 2 時間加熱反応し, 99.7% の収率でプリンを得ることができた. いまもしこの反応で化合物 (10) が生成すると仮定するならば, プリン生成の前にはこの反応系には (10) が反応中間体として存在しなければならないと思われる. しかし反応中, 経時 sampling しつつアルミナ薄層クロマトグラフィーにより反応の進行を観察したが, プリンの生成のみが認められ, 化合物 (10) に対応する spot は勿論, その他の生成物の spot は一切認められず, NH_3 を発生しつつ約 2 時間で反応は完結した.

Chart 2. Reaction of Diaminopyrimidine with Formamide

11) R.K. Robins, K.J. Dille, C.H. Willits, B.E. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 263 (1953).

ホルムアミドを使用する閉環反応は一般には、前記のような高い温度条件で行なわれているが、このような低い温度でも反応は定量的に進行する。

また、このような低い温度条件下における hydroxy 基を有する化合物とホルムアミドとの求核置換反応は、例えば xanthidrol とホルムアミドを 140° に加熱することにより N-xanthylformamide が得られることが報告されている。¹²⁾

以上のように 4,5-diaminopyrimidine とホルムアミドの反応においては、Chart 2 の (2-1)→(2-2) 過程を経て化合物 (10) を与えることが予想されたが、(10) は得られなかったことから、この反応は単なるアンモニアおよび水の脱離による閉環反応であると考えられる。

[B] *o*-Phenylenediamine とホルムアミドの加熱反応

o-Phenylenediamine とホルムアミドの 1:3 のモル比混合物を [A] の場合におけると同様に 150—160° の油浴中 2 時間加熱反応して反応の進行を検索したが、原料および反応の最終成績体である benzimidazole の他、一切の生成物は認められなかった。

[A], [B] の実験の結果、このような diamine 化合物とホルムアミドの閉環反応は単なるアンモニアおよび水の脱離による閉環反応であると考えられる。

また、[A] の場合に、160—180° あるいはそれ以上の高い温度条件で反応をおこなった場合は、ホルムアミドのみに由来する化合物 (10) が生成し、そこに得られた結果は、この実験の目的である $\text{>C} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ のような hydroxy 基を有する化合物とホルムアミドの求核置換反応とは無関係である。

この実験の結果、Chart 1 の 7 のような aromatize されていない中間体化合物では必ずしも脱水が優先されず、formyl 化されるが、Chart 2 の (2-1) のような芳香族ジアミノ体からの中間ヒドロキシ体は aromatize され易いため脱水が先行し、formyl 化される可能性が少ないと考えられる。したがって 4,5-diaminopyrimidine あるいは *o*-phenylenediamine とホルムアミドとの閉環反応では中間体として (2-2) や 10 の化合物は生成しないということを示唆している。

これらのことから、ホルムアミドだけを加熱してプリンを合成するこの反応では、4,5-di-aminopyrimidine を経由するものではないことは確実と考えられる。

更に、プリンおよび過剰のホルムアミドの混合物を 120—160° の油浴中 27 時間加熱した場合、原料を回収しただけであった。これは反応中間体 (10) は、プリンが生成した後でそれにホルムアミドが付加したものではないことを示す。したがって Chart 1 において化合物 (10) からホルムアミドが脱離してプリンを生成する反応は非可逆反応であるといえる。

工業的に一酸化炭素とアンモニアのような無機化合物をその合成原料とするホルムアミドを、他の如何なる合成試薬も反応の partner として使用することなく、単に常圧下加熱するだけという最も primitive な方法で核酸塩基の基本骨格の一つであるプリンが高収率で得られることは、原田¹³⁾ によつておこなわれたホルムアミドの加熱反応によるアミノ酸類の生成反応と共にきわめて興味深い反応であると考えられる。

実 験 の 部¹⁴⁾

1) プリン合成 ホルムアミド 45 g を 50 cm 以上の空気冷却管を付けた 100—200 ml の反応容器に入れ 170—190° (平均温度 185°) の油浴中 28 時間加熱攪拌。反応中、冷却管下部に HCOONH_4 の結晶の付着を見るが、時折りこれは反応系に戻す。¹⁵⁾ 反応後、未反応のホルムアミドを減圧留去 (油浴温度 130°) 回収する (32.1 g, 反復使用可能)。黒色の残渣に MeOH を加え加熱還流の後、不溶物を濾去。濾液より MeOH を留去し 4.93 g のプリン粗塩基を得。アセトンに溶解し活性炭を使用して脱色、アセトンにて再結晶。mp 218°。Anal.

12) H. Brederick, R. Gompper, D. Bitzer, *Chem. Ber.*, **92**, 1139 (1959).

13) K. Harada, *Nature.*, **214**, 479 (1967).

14) 融点は未補正、各スペクトルは次の機器により測定した。IR: 日本分光工業 DS-402 型, NMR: 日本電子 JNM-PS-100 (Me_4Si 内部基準, τ 値で表示, 略号: DMF=dimethylformamide-*d*₇). UV: HITACHI Recording Spectrophotometer Model EPS-3T. Mass: 日本電子 JMS-01SG-2 型。

15) この操作を行わない場合はプリンの収率は低下する。またこの操作の省略のためには反応をオートクレーブ中に行なうなどの配慮が必要である。

Calcd. $C_5H_4N_4$: C, 49.99; H, 3.36; N, 46.65. Found: C, 50.43; H, 3.40; N, 46.66. IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 1618, 1403, 1278, 909.

2) **8-Formylamino-7,8-dihydro-9H-purine (10) の分離** ホルムアミド 135 g を 1) の場合と同様に 160—180° の油浴中 30 時間加熱攪拌の後、冷後、AcOEt により抽出。Na₂SO₄ で乾燥、AcOEt 留去後、HCONH₂ を減圧留去した残渣の内 6.54 g のアセトン可溶部を活性炭により脱色、アセトン溶液から初めに析出するプリンを濾去、濾液より 59 mg の分解点 188—189°—212° の結晶を得。注意深くアセトンより再結.¹⁶⁾ mp 198—214° (decomp.). IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 1680—1700, 1618, 1588, 1403, 1278, 1225. Anal. Calcd. $C_6H_7ON_5$: C, 43.63; H, 4.27; N, 42.41. Found. C, 43.76; H, 4.17; N, 41.93. Mass Spectrum m/e : 165 (M^+), 120 ($M^+ - 45$), 93 ($M^+ - 72$), 66 ($M^+ - 99$). UV $\lambda_{\max}^{EtOH}$ $m\mu$ (ϵ): 265 (6600). NMR (DMF- d_7) τ : 0.90 (1H, singlet, ring proton H_6), 1.11 (1H, singlet, ring proton H_2), 1.35 (1H, singlet, ring proton H_8), 1.90 (1H, doublet, $J=12$ cps, CHO), 2.70 (2H, broad, ring $>N-H$ proton, D₂O 処理で消失), 0.9—1.35 (1H, amide NH).

3) **8-Formylamino-7,8-dihydro-9H-purine (10) の加熱反応** 10 16 mg を MeOH 5 ml と共に加熱還流 30 min の後、MeOH 留去、アセトン洗浄後乾燥。11 mg のプリンの結晶を得。IR により標品と同定。収率 94.5%.

謝辞 本研究にあたり、元素分析および各種スペクトルを測定された本学中央分析室の諸氏に感謝致します。

16) 実験 1) の場合のように後処理において MeOH を加えて加熱還流すると直ちにプリンに変化するので特に注意を要す。