

Synthese von 1-(*n*-Alkyl)thioharnstoffen, 6-(*n*-Alkyl)thiouracilen und radioaktiven 6-Nonyl-2-thiouracilen, I

Edmund Bäuerlein ^{*)**)} und Reinhold Kiehl¹⁾

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Naturstoff-Chemie,
Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg

Eingegangen am 2. August 1977

Die Synthese von längerkettigen 1-(*n*-Alkyl)thioharnstoffen **5** und 6-(*n*-Alkyl)thiouracilen **8**, die als nucleophile Abfangreagentien für Sulfenylkationen (RS⁺) in lipophilen Membranen einsetzbar sind²⁾, wird beschrieben. Eine Mikrosynthese für [¹⁴C]- und [³⁵S]-6-Nonyl-2-thiouracil ist analog entwickelt worden.

Synthesis of 1-(*n*-Alkyl)thiureas, 6-(*n*-Alkyl)thiouracils and Radioactive 6-Nonyl-2-thiouracils, I

The synthesis of the long-chain 1-(*n*-alkyl)thiureas **5** and 6-(*n*-alkyl)thiouracils **8**, useful as nucleophilic trapping agents for sulfonyl cations (RS⁺) in lipophilic membranes²⁾, is described. A method for the synthesis of [¹⁴C]- and [³⁵S]-6-(nonyl)-2-thiouracil on a microscale has also been developed.

Thioharnstoff, Thiouracil und auch 6-Propyl(thiouracil) wurden als Abfangreagentien für die Sulfenylkationen (RS⁺) des Lactoglobulins angegeben, welche durch Umsetzung einer isolierten Thiolgruppe mit KI₃ in lipophiler Umgebung des Proteins entsteht³⁾. In Modellreaktionen zur oxidativen Phosphorylierung wurde anorganisches Phosphat durch Oxidation von Thiolen aktiviert und mit Adenosinphosphat zum Adenosintriphosphat umgesetzt⁴⁾. Das gemischte Anhydrid aus Sulfensäure und Phosphorsäure, RSOPO₃H₂, wurde als „aktives Phosphat“ in biochemischem Sinne vorgeschlagen⁵⁾. Da die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat in der inneren Mitochondrienmembran stattfindet, wurden Abfangsreagentien wachsender Lipophilie eingesetzt²⁾, um das hypothetische Intermediat abzufangen. Über die Synthese dieser Abfangreagentien wird im folgenden berichtet.

^{*)} Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

^{**)} Meinem verehrten Lehrer Professor *Theodor Wieland* zu seinem 65. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ R. Kiehl, Teil der Diplomarbeit Univ. Heidelberg 1975, und Doktorarbeit Univ. Heidelberg 1977.

²⁾ E. Bäuerlein und R. Kiehl, FEBS Lett. **61**, 68 (1976).

³⁾ L. W. Cunningham, Biochemistry, **11**, 1629 (1964).

⁴⁾ E. Bäuerlein, in Glutathione (L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller und A. Wendel), 1. Aufl., S. 44 ff., Thieme, Stuttgart 1974

⁵⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Angew. Chem. **80**, 915 (1968); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **7**, 893 (1968).

gewonnen. Die Ausgangsverbindungen **10** sind aus Acetessigsäure-ethylester und den entsprechenden Acylchloriden in Gegenwart von Magnesiummethylat synthetisiert worden^{9a,b}).

Als Vergleichssubstanz für das biochemisch besonders aktive 6-Nonyl-2-thiouracil²⁾ (**8b**) wurde das 6-Nonyluracil **9** durch analoge Kondensation von **7b** mit Harnstoff hergestellt.

Mikrosynthese von 6-Nonyl-2-[¹⁴C]thiouracil (¹⁴C-**8b**) und 6-Nonyl-2-[³⁵S]thiouracil (³⁵S-**8b**)

Es wurden Mikrosynthesen für C- und S-markiertes 6-Nonyl-2-thiouracil (**8b**) aus **7b** und [¹⁴C]Thioharnstoff bzw. [³⁵S]Thioharnstoff entwickelt. Sie ergaben Substanzen mit der spezifischen Aktivität 2–10 mCi/mmol.

Wir danken Herrn *D. Griebel* für die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. — Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Gerät Bruker WP 80 (TMS als innerer Standard) hergestellt. — Die Gaschromatogramme wurden mit einem Gerät Perkin-Elmer F 21 mit Fluorsiliconsäule (3 m) und Flammenionisationsdetektor bei 100–180°C aufgenommen. — Die Radioaktivität wurde mit einem Spektrometer Packard Tricarb 2420 und einem Dünnschichtscanner Berthold LB 2723 gemessen. — Zur Dünnschichtchromatographie (DC) dienten Kieselgel F₂₅₄ (0.25 mm oder 1 mm) der Fa. Merck und CHCl₃/MeOH/H₂O/konz. NH₃ (130:70:8:0.5), für die Detektion Grotes Reagenz¹⁰⁾ oder FCNP-Reagenz¹⁰⁾.

Ausgangssubstanzen: *tert*-Butylisocyanat stammte von der Fa. Bayer, Pentylamin, Heptylamin und Nonylamin von der Fa. Fluka, Capronsäurechlorid, Caprylsäurechlorid und Caprinsäurechlorid von der Fa. Merck-Schuchhardt; [³⁵S]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 26.3 mCi/mmol) und [¹⁴C]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 56 mCi/mmol) stammten von der Fa. NEN Chemicals.

tert-Butylisothiocyanat (**1**): Nach Lit.⁶⁾ werden 82 g (1.08 mol) NH₄NCS und 30 g ZnCl₂ in 300 ml H₂O mit 83 g (0.9 mol) *tert*-Butylchlorid 96 h geschüttelt. Die gelbliche obere Schicht wird mehrmals mit H₂O gewaschen und über CaCl₂ getrocknet. Danach werden darin 15 g wasserfreies ZnCl₂ durch Schütteln gelöst. Man läßt 160 h stehen, trennt die oberste der drei entstandenen Schichten (nur zwei sind in Lit.⁶⁾ beschrieben) ab, wäscht sie mehrmals mit H₂O und trocknet sie mit CaCl₂. Ausb. 44 g (45.5%) **1** (Lit.⁶⁾: 94%; *n*_D²⁵ = 1.4780.

1-Alkyl-3-tert-butyl(thioharnstoffe) **3a–c**: Analog Lit.⁶⁾ werden 90 mmol **1** in 45 ml Petrolether zur Lösung von 90 mmol Alkylamin **2a–c** in 45 ml Petrolether bei 0°C unter Rühren getropft. Es wird 2.5 h bei 20°C weitergeführt. — Bei der Umsetzung von **2a** kristallisiert **3a** aus; es wird abgesaugt, mit Petrolether gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Bei den Ansätzen mit **2b** und **c** muß dagegen das Lösungsmittel abdestilliert werden um **3b** bzw. **c** als Öle zu isolieren. Rohausbeuten 14 g (88%) *1-tert*-Butyl-3-pentyl(thioharnstoff) (**3a**) mit Schmp. 63–64°C; 17 g (93%) *1-tert*-Butyl-3-heptyl(thioharnstoff) (**3b**) als Öl; 21 g (90%) *1-tert*-Butyl-3-nonyl(thioharnstoff) (**3c**) als Öl.

9) ^{9a}) Organicum, 14. Aufl., S. 526, 529, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1975. — ^{9b}) *F. L. Breusch* und *H. Keskin*, Univ. Fen. Fac. Mecm. Seri A, **11**, 24 (1946) [Chem. Abstr. **40**, 54007 (1946)].

10) *Fa. E. Merck*: Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Nr. 243 und 244, Darmstadt 1970.

1-tert-Butyl-3-nonylharnstoff (4c): Dargestellt analog **3** durch Umsetzung von *tert*-Butylisocyanat mit Nonylamin (**2c**). Rohausbeute 12 g (90%) Öl.

1-Alkyl(thioharnstoffe) 5a–c und 1-Nonylharnstoff (6c). — *Allgemeine Vorschrift*: Analog Lit.⁶⁾ werden 80 mmol 1-Alkyl-3-*tert*-butyl(thioharnstoff) **3a–c** oder 1-*tert*-Butyl-3-nonylharnstoff (**4**) — die Rohprodukte (s. oben) sind genügend rein — in 70 ml konz. Salzsäure 30 min unter Rückfluß gekocht. Dann wird *tert*-Butylchlorid bei 64–95°C abdestilliert. Der Ansatz wird mit konz. Ammoniak neutralisiert, die entstandene Suspension gekühlt, der Niederschlag abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Das Produkt wird mit wasserfreiem Aceton extrahiert und im gleichen Lösungsmittel umkristallisiert.

1-Pentyl(thioharnstoff) (5a): Ausb. 10.1 g (86%); Schmp. 65°C. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 7.56 (s, breites Signal; 1H), 6.66 (s, sehr breites Signal; 2H), 3.30 (s, breites Signal; 2H), 1.1–1.65 (m; 6H), 0.90 (t; 3H).

C₆H₁₄N₂S (146.3) Ber. C 49.30 H 9.65 N 19.17 Gef. C 49.26 H 9.84 N 19.14

1-Heptyl(thioharnstoff) (5b): Ausb. 13.1 g (94%); Schmp. 86°C. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 7.52 (s, breites Signal; 1H), 6.82 (s, breites Signal; 2H), 3.30 (s, breites Signal; 2H), 1.1–1.7 (m; 10H), 0.88 (t; 3H).

C₈H₁₈N₂S (174.3) Ber. C 55.15 H 10.40 N 16.09 Gef. C 54.77 H 10.63 N 15.91

1-Nonyl(thioharnstoff) (5c): Ausb. 15.7 g (97%); Schmp. 96–97°C. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 7.52 (s, breites Signal; 1H), 6.82 (s, breites Signal; 2H), 3.31 (s, breites Signal; 2H), 1.15–1.65 (m; 14H), 0.88 (t; 3H).

1-Nonylharnstoff (6): Ausb. 14.1 g (94.5%); Schmp. 106°C. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 5.86 (s, breites Signal; 1H), 5.32 (s, breites Signal; 2H), 2.94 breites Signal; 2H), 1.05–1.55 (m; 14H), 0.88 (t; 3H).

C₁₀H₂₂N₂O (186.4) Ber. C 64.50 H 11.81 N 15.05 Gef. C 64.29 H 11.94 N 15.00

In den ¹H-NMR-Spektren der Substanzen **5a–c** und **6** sind die NH- und NH₂-Protonen (erste beide δ-Werte) mit D₂O austauschbar.

2-Acetyl-2-acylessigsäure-ethylester 10a und b: Darstellung nach Lit.^{9a)} aus Acetessigsäure-ethylester und Caproyl- oder Caprinoylchlorid. Rohausbeute an 2-Acetyl-2-caproylessigsäure-ethylester^{9b)} (**10a**) 92%, an 2-Acetyl-2-caprinoylessigsäure-ethylester^{9b)} (**10b**) 92%.

Acylessigsäure-ethylester 7. — *Allgemeine Vorschrift*: Darstellung durch Hunsdiecker-Reaktion nach Lit.^{9a)} aus **10a** oder **10b**. Das Rohprodukt wird über eine 30 cm lange Vigreux-Kolonnen destilliert.

Caproylessigsäure-ethylester^{9b)} (7a): Ausb. 51%; Sdp. 119–133°C/2–3 Torr (Lit.^{9b)}: 125–133°C/5 Torr), nach Gaschromatographie 86proz. rein, *n*_D²⁰ = 1.4397.

Caprinoylessigsäure-ethylester^{9b)} (7b): Ausb. 43%; Sdp. 107–135°C/0.4–1.0 Torr (Lit.^{8b)}: 138–145°C/1 Torr), nach Gaschromatographie 85proz. rein.

C₁₄H₂₆O₃ (242.4) Ber. C 69.38 H 10.81 Gef. C 69.64 H 10.64

6-Alkyl-2-thiouracile 8a, b und 6-Nonyluracil (9). — *Allgemeine Vorschrift*: Analog Lit.⁸⁾ werden 0.1 mol Natrium in 50 ml wasserfreiem Ethanol gelöst; nach Zugabe von 0.05 mol **7a** oder **b** und 0.07 mol Thioharnstoff oder Harnstoff wird unter Rückfluß erhitzt, bis nach ca. 10 min nahezu alles gelöst ist und sich ein Niederschlag gebildet hat. Man läßt 6.5 h abkühlen und ca. 12 h bei Raumtemp. stehen. Bei 40–50°C wird das Lösungsmittel i. Vak. fast ganz abdestilliert, der Rückstand mit 50 ml H₂O sowie 7 ml konz. Salzsäure versetzt und

die Lösung mit Eisessig auf pH 4 gebracht. Das Produkt wird abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

6-Heptyl-2-thiouracil (8a): Ausb. 9.7 g (99%); Schmp. 146–149°C. — $^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 12.18$ (s, breites Signal; 2H), 5.66 (s; 1H), 2.37 (m; 2H), 1.15–1.75 (m; 10H), 0.9 (t; 3H).

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ (226.4) Ber. C 58.30 H 7.94 N 12.38 Gef. C 58.59 H 8.06 N 12.19

6-Nonyl-2-thiouracil (8b): Ausb. 10.3 g (95%); Schmp. 135–138°C. — $^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 12.18$ (s, breites Signal; 2H), 5.66 (s; 1H), 2.37 (m; 2H), 1.15–1.75 (m; 14H), 0.89 (t; 3H).

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS}$ (254.5) Ber. C 61.30 H 8.64 N 11.00 Gef. C 61.60 H 8.78 N 11.13

6-Nonyluracil (9): Ausb. 2.5 g (26.5%); Schmp. 161°C. — $^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 10.28$ (s, breites Signal; 2H), 5.29 (s; 1H), 2.28 (m; 2H), 1.1–1.7 (m; 14H), 0.88 (t; 3H).

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (238.5) Ber. C 65.50 H 9.23 N 11.73 Gef. C 65.58 H 9.33 N 11.86

In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Substanzen 8a, b und 9 sind die NH-Protonen (erster δ -Wert) mit D_2O austauschbar.

Mikrosynthese von 6-Nonyl-2-[^{14}C]thiouracil (^{14}C -8b): Die Lösung von 2.8 mg [^{14}C]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 56 mCi/mmol) in 4 ml Ethanol wird mit 35.2 mg unmarkiertem Thioharnstoff versetzt und im N_2 -Strom bei 70°C langsam eingedampft, wobei man 38 mg (0.5 mmol) [^{14}C]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 4 mCi/mmol) erhält. Unter Rühren mit einem Magnetkern werden 200 μl (ca. 0.7 mmol) 7b sowie 500 μl 4.6proz. ethanolsche Natriumethylat-Lösung (1 mmol) zupipettiert. Beim anschließenden 6.5stdg. Rühren unter Rückfluß bildet sich langsam ein Niederschlag. Nach ca. 12stdg. Stehenlassen bei 20°C wird i. Vak. bei 50°C eingedampft. Es wird abgekühlt, der Rückstand nach Zugabe von 1.5 ml H_2O , 70 μl konz. Salzsäure und 20 μl Eisessig 10 min bei 20°C gerührt, abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und 24 h im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausb. 124.8 mg (98%); Schmp. 138–139°C. — UV (Ethanol): λ_{max} 275, 215 nm. — Bei der DC an Kieselgel F_{254} mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{konz. NH}_3$ (130:70:8:0.5) erhält man mit Grotes Reagenz¹⁰⁾ nur einen Fleck. Jedoch zeigt die Analyse auf radioaktive Produkte mit dem Dünnschichtscanner, daß das Produkt zu 25% verunreinigt ist. — Durch zweifache präparative DC (wie oben) wird aus 60 mg Rohprodukt, das, in 5 ml Ethanol und 1 ml Aceton gelöst, aufgetragen wird, nach Eluieren mit Ethanol reines Produkt erhalten. Ausb. 16 mg (26%); spezifische Aktivität 1.9 mCi/mmol.

Mikrosynthese von 6-Nonyl-2-[^{35}S]thiouracil (^{35}S -8b): 28.6 mg [^{35}S]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 26.3 mCi/mmol), in 2 ml in Aceton gelöst, werden zu 9.4 mg Thioharnstoff gegeben. Im N_2 -Strom bei 40°C langsam eingedampft, wobei man 38 mg (0.5 mmol) [^{35}S]Thioharnstoff (spezifische Aktivität 19.8 mCi/mmol) erhält. Die eigentliche Synthese mit 7b verläuft dann analog der voranstehend beschriebenen. Ausb. 116.2 mg (92%); Schmp. 138–139°C. — UV (Ethanol): $\lambda_{\text{max}} = 275, 215$ nm. — Die DC an Kieselgel F_{254} mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{konz. NH}_3$ (130:70:8:0.5) und die Analyse auf radioaktive Produkte mit dem Dünnschichtscanner zeigen, daß das erhaltene Produkt rein ist; spezifische Aktivität 10.3 mCi/mmol).

[131/77]