

Intramolekulare Katalyse des Pyrimidin-Systems bei der Hydrolyse von (Pyrimidinylthio)carbonsäureamiden

Manfred Kröger^{*)}, Frank Seela und Friedrich Cramer*

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,
Hermann-Rein-Straße 3, D-3400 Göttingen, West-Germany

Eingegangen am 8. März 1976

Bei der Umsetzung von 2-Thiocytosin (3) mit Jodacetamid in Wasser wird die Carbonsäure 5, in alkoholischer Lösung der Ester 6 bzw. 7 gebildet. Die Darstellung des Amids 4 gelingt nur in alkalischer Lösung. Nach Alkylierung von 3 mit 3-Jodpropionamid (12) anstelle von Jodacetamid verlangsamt sich die Hydrolyse deutlich. Die Amidhydrolyse wird vollständig unterdrückt, wenn 2-Thiocytosin an N-1 alkyliert ist. Die kinetische Analyse der pH-abhängigen Amidhydrolyse führt zu einem Mechanismus-Vorschlag für die intramolekulare Katalyse unter Beteiligung des Pyrimidinsystems.

Intramolecular Catalysis of Hydrolysis of (Pyrimidinylthio)carboxamides by Pyrimidine Ring-Systems

On treatment of 2-thiocytosine (3) with iodoacetamide, in water the formation of the carboxylic acid 5 and in alcoholic solution the formation of ester 6 or 7 respectively was observed. The amide 4 could only be prepared in alkaline medium. After alkylation of 3 with 3-iodopropionamide (12) instead of iodoacetamide a marked reduction in the rate of hydrolysis is observed. The amide hydrolysis is completely prevented, if the N-1-nitrogen of 3 is alkylated. Kinetic analysis of the pH-dependent amide hydrolysis suggests a mechanism for intramolecular catalysis by pyrimidine ring-systems.

Bei der Umsetzung von 2-Thiocytidin (1) mit Chloracetamid entsteht 4-Amino-2-(carbamoylmethylthio)-1-(β -D-ribofuranosyl)pyrimidinium-chlorid (2)¹⁾. Das entsprechende Produkt entsteht auch bei der Umsetzung von 2-Thiocytidin enthaltender transfer-Ribonucleinsäure mit Jodacetamid²⁾.

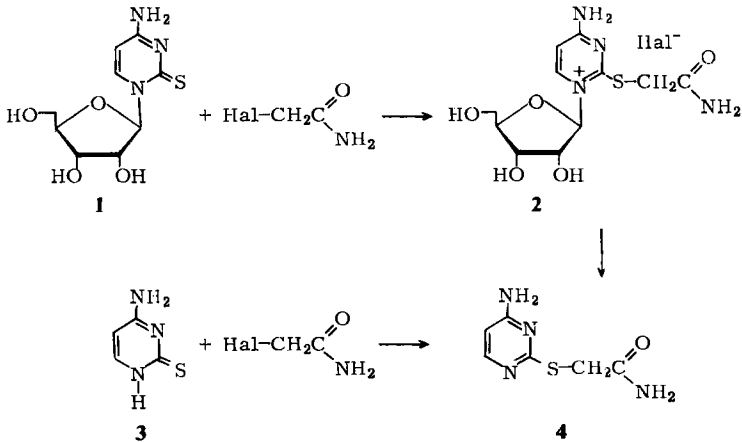
Kationische Produkte der Konstitution 2 unterliegen der pH-abhängigen Hydrolyse am glycosidischen Zentrum³⁾. Zur kinetischen Analyse dieser auch biochemisch interessanten Reaktion sollte zu Vergleichszwecken aus 2-Thiocytosin (3) durch Alkylierung mit Jodacetamid (4-Amino-2-pyrimidinylthio)acetamid (4) direkt hergestellt werden.

^{*)} Teile dieser Arbeit sind Inhalt der Diplomarbeit von M. Kröger, Univ. Hamburg 1974.

¹⁾ M. Kröger, M. Sprinzi und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. 1976, 1395.

²⁾ M. Sprinzi, E. Krämer und D. Stehlik, Eur. J. Biochem. 49, 595 (1974).

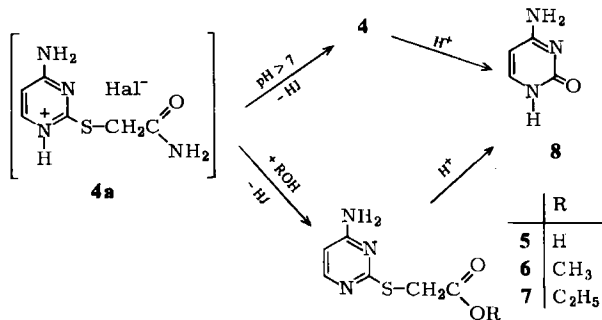
³⁾ T. Ueda und H. Ohtsuka, Chem. Pharm. Bull. 21, 1530 (1973); M. Kröger und F. Cramer, Chem. Ber., im Druck.



Reaktion von 2-Thiocytosin mit Jodacetamid

Wird 2-Thiocytosin (3) in wäßriger Lösung⁴⁾ mit Jodacetamid behandelt, so entsteht – wie die Elementaranalyse und das NMR-Spektrum zeigen – nicht das Amid 4, sondern ein neues jodhaltiges Reaktionsprodukt. Da sein UV-Spektrum identisch mit dem von 4-Amino-2-(methylthio)pyrimidin⁵⁾ war, mußte eine Alkylierung am Thion stattgefunden haben. Da das jodhaltige Reaktionsprodukt schwierig zu reinigen war und keine stöchiometrischen Mengen Jod enthielt, wurde die Reaktion nicht in Wasser sondern in Äthanol/Wasser (95:5) und in absol. Methanol ausgeführt. Dadurch sollte ermöglicht werden, das Amid 4 als Hydrojodid 4a zu isolieren.

Die nach Aufarbeitung der Ansätze isolierten gelblichen kristallinen Reaktionsprodukte zeigen jedoch in der Elementaranalyse zu hohe C- und zu niedrige N-Werte. Die NMR-Spektren (Tab. 1) lassen durch Signale bei $\delta = 3.68$ (s, –CH₃) bzw. 4.15 und 1.20 ppm (q und t, CH₂CH₃) die Bildung der Ester 6 und 7 vermuten. Dies wurde durch das Massenspektrum des Äthanol-Produktes mit M^+ *m/e* 212 und durch den Vergleich der UV-Spektren mit dem des 4-Amino-2-(methylthio)pyrimidins⁵⁾ (Tab. 2, Abb. 1) dahin-



⁴⁾ G. H. Hitchings, G. B. Elion, E. V. A. Falco und P. B. Russel, J. Biol. Chem. 177, 357 (1949).

⁵⁾ D. J. Brown und T. Teitel, Aust. J. Chem. 18, 559 (1965).

gehend bestätigt, daß es sich bei dem Methanol-Produkt um den Methylester 6 und bei dem Äthanol-Produkt um den Äthylester 7 handelt.

Tab. 1. NMR-Daten der 4-Amino-2-(alkylthio)pyrimidine 4, 5, 6, 7, 11 und 13
Chemische Verschiebung δ in ppm ($[D_6]$ DMSO)

	-CONH ₂	-NH ₂	6-H	5-H	$J_{5,6}$	aliph. -CH
4	7.53, 7.20	s 7.07	d 8.03	d 6.15	6 Hz	s 3.75 (2H)
5		s 7.07	d 8.03	d 6.27	6 Hz	s 3.93 (2H)
6		s 7.03	d 7.98	d 6.23	6 Hz	s 3.96 (2H), s 3.68 (3H)
7		s 7.00	d 7.96	d 6.22	6 Hz	s 3.94 (2H), q 4.15 (2H) t 1.20 (3H)
11	7.63, 7.36	s 8.80	d 8.21	d 6.57	7 Hz	s 4.02 (2H), s 3.76 (3H)
13	7.32, 6.81	s 6.88	d 7.89	d 6.13	6 Hz	t 3.18 (2H), t 2.47 (2H) $J = 7$ Hz

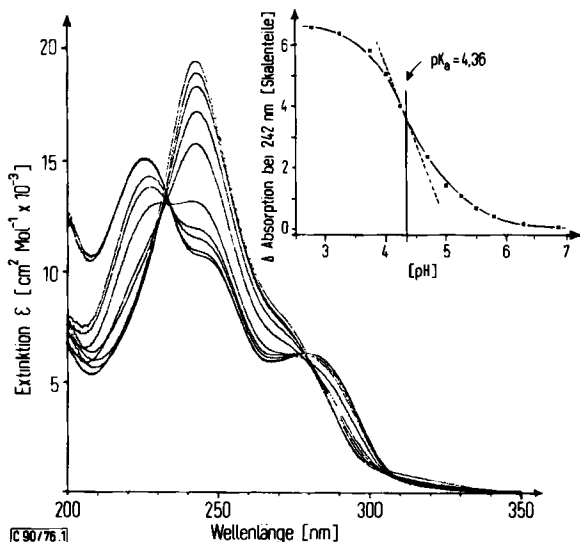


Abb. 1. UV-Spektrum des Amids 13 im Bereich pH 2.8 bis 6.8 und Bestimmung des pK_a -Wertes durch Vergleich der Absorptionen bei 242 nm

Da sich in alkoholischer Lösung nicht wie erwartet das Amid 4, sondern in ungewöhnlicher Reaktion die Ester 6 und 7 gebildet hatten, wurde vermutet, daß bei der Umsetzung von 3 mit Jodacetamid in wäßriger Lösung die Säure 5 entstanden sein könnte. In der Dünnschichtelektrophorese wanderte dieses Reaktionsprodukt tatsächlich als Anion. Die Reinigung gelang daraufhin glatt durch Lösen der jodhaltigen Substanz in NaHCO_3 -Lösung und Zusatz von Essigsäure bis pH 5.5. Elementaranalyse, UV-, Massen- und NMR-Spektren standen in Einklang mit der Konstitution 5⁴⁾.

Tab. 2. Vergleich der UV-spektroskopischen und chromatographischen Daten der 4-Amino-2-(alkylthio)pyrimidine

	pK_a	Spezies ^{a)}	λ_{max} [nm]	$\epsilon_{max} \times 10^{-3}$	pH	DE: $R_{F(5)}$ pH 6,5	DC: R_F Kieselgel
4	3.90	0	224.5; sh 245; 285 241	19.1; sh 9.4; 5.7 24.1	12 und 5.5 1.5	0.34 (-)	0.77
5	5.50	0	225; sh 250; 285 241	17.4; sh 8.8; 5.4 25.7	12 2.0	1.0 (+)	0.43
6	3.90	0	223; sh 244; 285 241	22.8; sh 10.3; 6.1 27.0	11 und 5.5 2.0	0.71 (-)	0.89
7	3.90	0	222; sh 245; 283.5 240	25.5; sh 10.7; 6.4 31.2	11 und 5.5 2.0	0.54 (-)	0.91
2-(Methylthio)cytosin ^{d)}	4.91	0	224; sh 250; 285 241	20.4; sh 10.0; 6.15 28.2	7.8 0.2	0.22 (-)	
11		+	238	32.3	5.3	0.56 (-)	0.03
4-Amino-1-methyl-2-(methylthio)pyrimidinum-jodid ^{e)}	12.5	+	242	28.2	7.0	0.44 (-)	0.03
13 ^{f)}	4.36	0	224.5; sh 246; 279 240	16.1; sh 11.7; 7.6 19.3	5.3 2.0	0.34 (-)	0.71

a) + = Kation, 0 = neutrale Spezies.

b) Wanderungstrecke relativ zu 5 = $R_{(5)}$.

c) Lösungsmittel: Chloroform/Methanol (1:1).

d) UV-Daten entnommen aus Ref. 9).

e) UV-Daten entnommen aus Ref. 10).

f) Vgl. Abb. 1.

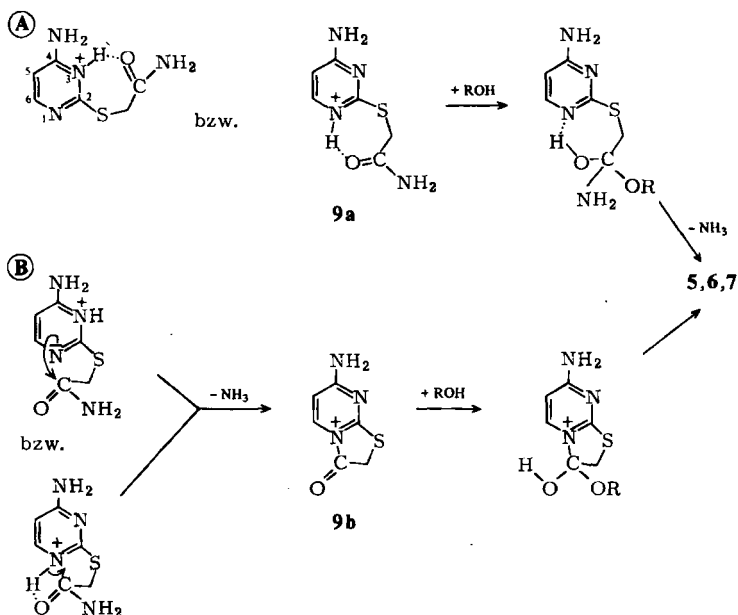
Die Isolierung von **5** bzw. **6** und **7** zeigt, daß der Alkylierungsschritt eindeutig abläuft, daß aber das Alkylierungsprodukt **4a** unter den gewählten Bedingungen mit den Lösungsmittelmolekülen weiterreagiert.

Führt man die Reaktion statt in Wasser in schwach alkalisch gepufferter Lösung (2% NaHCO_3) durch, so wird keine Hydrolyse des Säureamids beobachtet⁶⁾ und in 71.6% Ausbeute kann **4** isoliert werden, eindeutig charakterisiert durch Elementaranalyse, Massen-, UV- und NMR-Spektren.

Die stark beschleunigte Solvolyse der Säureamidgruppierung in alkoholischer bzw. in ungepufferter wäßriger Lösung wird offenbar durch die Katalyse des Pyrimidin-Restes hervorgerufen, da die Säureamidgruppierung von Jodacetamid unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert. Da weiterhin die Reaktion im alkalischen Medium verhindert werden kann, liegt die Vermutung nahe, daß nur der protonierte Pyrimidin-Rest katalytisch wirksam ist.

Reaktionsmechanismus der intramolekularen Katalyse⁷⁾

In Anlehnung an die von *Bruice* und *Sturtevant*⁸⁾ am γ -(4-Imidazolyl)buttersäureamid und von *Kirk* und *Cohen*⁹⁾ für Benzimidazol-Derivate entwickelten Vorstellungen über



⁶⁾ Die Alkylierung des 6-Methyl-Derivates des 2-Thiocytosins verläuft in methanolischer NaOCH_3 -Lösung ebenfalls ohne Solvolyse. *H. Voigt, D. Heydenhauß, F. Hofmann* und *G. Jaenecke*, *Z. Chem.* **14**, 436 (1974).

⁷⁾ *A. J. Kirby* und *A. R. Fersht* in *Progress in Bioorganic Chemistry*, Vol. 1, ed. *E. T. Kaiser* und *F. J. Kézdy*, p. 64, Wiley Interscience, New York 1974.

⁸⁾ *Th. C. Bruice* und *J. M. Sturtevant*, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 2860 (1959); *Th. C. Bruice* und *S. Benkovic*, *Frontiers in Chemistry, Bioorganic Mechanisms*, Vol. 1, pp. 125–131, W. A. Benjamin, Inc., New York 1966.

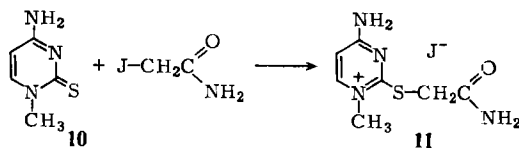
⁹⁾ *K. L. Kirk* und *L. A. Cohen*, *J. Org. Chem.* **34**, 390 (1969).

deren intramolekulare Katalyse stehen bei der Bildung von **5**, **6** oder **7** zwei Reaktionsmechanismen zur Diskussion:

(A) Das Proton an N-1 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Amidcarbonyl **9a**. Dadurch wird der Carbonylkohlenstoff durch Nucleophile, z. B. Wasser oder Alkohol, leichter angreifbar. Dem Ablauf dieses Mechanismus auch über ein Proton an N-3 stehen keine sterischen Gründe entgegen.

(B) Die Reaktion läuft über die fünfgliedrige Zwischenstufe **9b** unter nucleophiler Beteiligung von N-1 ab. Dabei befindet sich das Proton entweder an N-3, das Elektronenpaar an N-1 ist frei, oder das Proton befindet sich zwischen N-1 und dem Carbonylsauerstoff und erleichtert damit den nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares von N-1. Beide Möglichkeiten führen zu **9b**, das vom Lösungsmittel nucleophil geöffnet wird.

Wir versuchten für diese bisher unbekannte intramolekulare Katalyse des Pyrimidin-Systems zwischen den Mechanismen (A) und (B) zu unterscheiden. Die ausschließliche Alkylierung von 2-alkylthio- und 2-alkylamino-substituierten 4-Aminopyrimidinen¹⁰⁾ an N-1 läßt vermuten, daß die Katalyse über die Protonierung an N-1 und nicht über N-3 verläuft. Der angenäherte aromatische Zustand des N-1-alkylierten Heterocyclus konnte für das strukturanaloge 4-Amino-1-methyl-2-(methylthio)pyrimidiniumchlorid¹⁰⁾ durch Röntgenstrukturanalyse belegt werden¹¹⁾. Um zu beweisen, daß die geforderte intramolekulare Katalyse am Amid **4** über die Protonierung an N-1 verläuft, wurde das N-1-Methyl-Derivat von **3** – das 1-Methyl-2-thiocytosin (**10**)¹²⁾ – unter den gleichen Bedingungen, wie sie zur Bildung von **5**, **6** und **7** führten, alkyliert. Das Reaktionsprodukt genügte nach Elementaranalyse der Summenformel C₇H₁₁N₄OS. Sein NMR-Spektrum zeigt Signale für die Amidprotonen an und das UV-Spektrum besitzt die gleichen Absorptionsmaxima wie 4-Amino-1-methyl-2-(methylthio)pyrimidinium-jodid¹⁰⁾ (vgl. Tab. 2). Offenbar ist also hier das Amid auch nach der Alkylierung erhalten geblieben, und es hat sich in 84proz. Ausbeute 4-Amino-2-(carbamoylmethylthio)-1-methylpyrimidinium-jodid (**11**) gebildet¹³⁾.



Wenn der Mechanismus (B) gültig ist, sollte die Einführung einer zusätzlichen Methylengruppe die Bildung eines Sechsrings als Zwischenstufe ermöglichen und dadurch die Solvolyse im Vergleich zu **9b** zusätzlich begünstigen. Deshalb wurde aus 2-Thiocytosin (**3**) mit 3-Jodpropionamid (**12**)¹⁴⁾ in Na-Methanolat⁶⁾ 3-(4-Amino-2-pyrimidinylthio)-propionamid (**13**) dargestellt.

¹⁰⁾ D. J. Brown und N. W. Jacobsen, J. Chem. Soc. 1962, 3172.

¹¹⁾ J. K. Datta Gupta, M. Kröger und W. Saenger, Chem. Ber., im Druck.

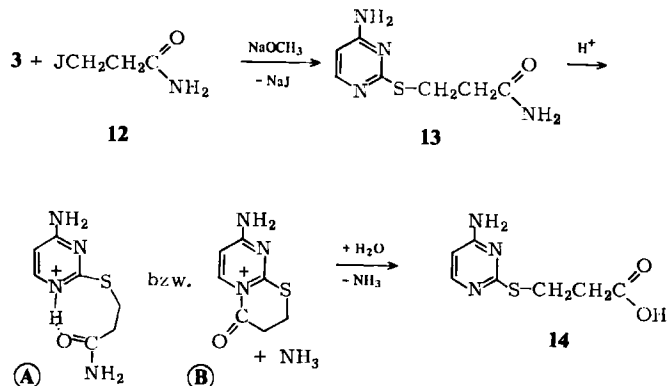
¹²⁾ T. Ueda, Y. Iida, K. Ikeda und Y. Mizuno, Chem. Pharm. Bull. 16, 1788 (1968); T. Ueda und H. Ohtsuka, ebenda 21, 1451 (1973).

¹³⁾ Man darf also auch davon ausgehen, daß die Anwesenheit der Ribose als Substituent an N-1²⁾ eine Amidhydrolyse ebenfalls verhindert.

¹⁴⁾ W. A. Jacobs und M. Heidelberger, J. Biol. Chem. 21, 145 (1915).

Bei dem Versuch der präparativen Darstellung der Säure **14** fiel jedoch auf, daß die Hydrolyse des Amids **13** weit schwieriger als bei **4** erfolgt. Aus diesem Grunde erscheint ein Mechanismus über den Weg (B) unwahrscheinlich. Hingegen kann die langsamere Solvolyse mit dem Mechanismus (A) durch Bildung des ungünstigeren Achtrings im Zwischenzustand erklärt werden.

Um diesen Sachverhalt quantitativ zu fassen, führten wir die Amidhydrolysen von **4** und **13** bei verschiedenen pH-Werten zeitabhängig durch¹⁵⁾.



Kinetische Untersuchungen zur Amidhydrolyse von **4** und **13**

Die Hydrolyse von **4** bzw. **13** wird bei pH 3, 4, 5 und 6 in Natriumcitratpuffer, bei pH 7 und 8 in Natriumphosphatpuffer¹⁶⁾ durchgeführt. Zu verschiedenen Zeiten wurden aliquote Proben aus dem Reaktionsansatz gezogen und dünnschichtelektrophoretisch aufgetrennt (Elektrophoretische Mobilität: R_E von **14** relativ zu **5** = 0,95 (+) bei pH 6,5).

Die Elektropherogramme konnten mit Hilfe eines Densitometers aufgrund der Fluoreszenz-Löschung der benutzten Kieselgel-Dünnschichtplatten (Anregungswellenlänge 254 nm) ausgewertet und das Verhältnis der Mengen aus nicht hydrolysiertem Amid bzw. gebildeter Säure quantitativ bestimmt werden.

Tab. 3. Vergleich der 50%-Umsatzzeiten der Hydrolyse des Amids **4** (Raumtemperatur) und des Amids **13** (60°C)

	50%-Umsatzzeit		Verhältnis
	4	13	13:4
pH 3	1.2 h	31.0 h	25.8
pH 4	2.1 h	54.2 h	25.8
pH 5	4.7 h	100.5 h	21.4
pH 6	48.0 h	— *)	—
pH 7	173 h	— *)	—

*) Wegen zu geringer Hydrolysegeschwindigkeit nicht bestimmbar.

¹⁵⁾ Bei niedrigen pH-Werten wird eine Störung durch Bildung von Cytosin (**8**) beobachtet^{*)}.

¹⁶⁾ CRC Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology, ed. H. A. Sober, pp. J 195–198, The Chemical Rubber Company, Cleveland, USA 1968.

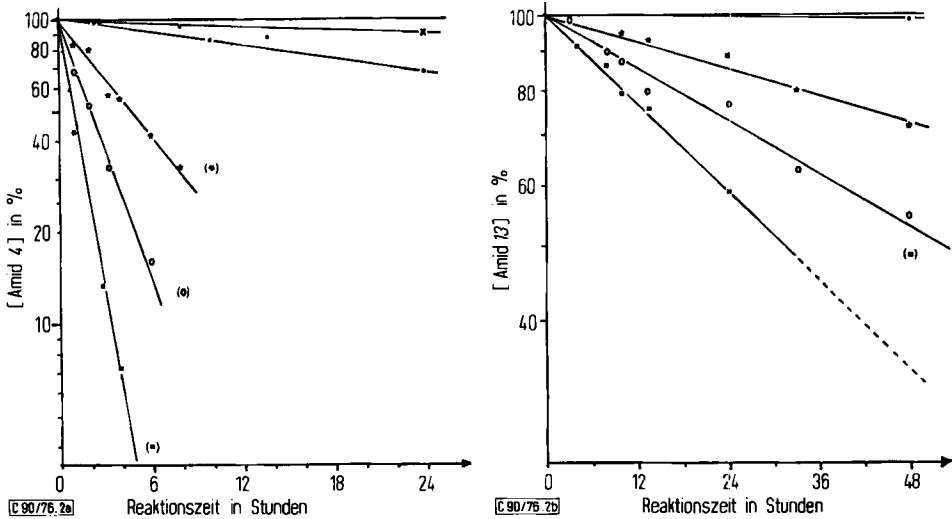


Abb. 2. a) Abnahme der Konzentration an Amid 4 in wässriger Lösung bei Raumtemperatur in Abhängigkeit vom pH-Wert
 b) Abnahme der Konzentration an Amid 13 in wässriger Lösung bei 60°C in Abhängigkeit vom pH-Wert
 pH 3 ■; pH 4 ○; pH 5 *; pH 6 ●; pH 7 ×

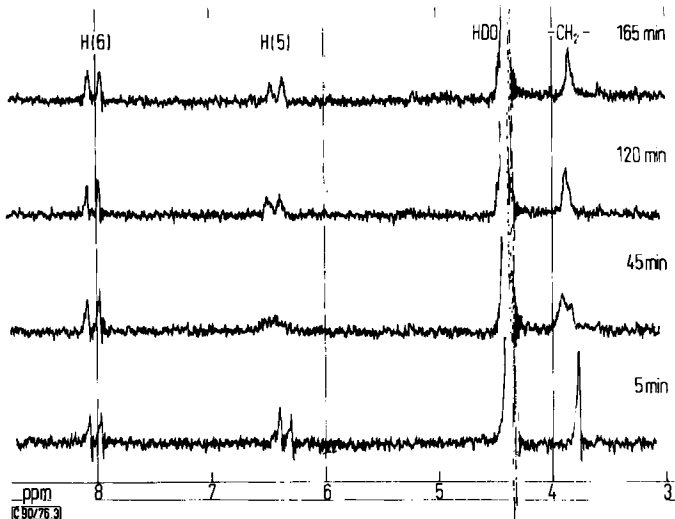


Abb. 3. Beobachtung des Verlaufes der Hydrolyse des Amids 4 im NMR-Spektrum in $[D_6]DMSO$ nach Zugabe einer Lösung von $KHSO_4$ in D_2O (Verhältnis $[D_6]DMSO : D_2O$ 1:1)

Wie Abb. 2a zeigt, hydrolysiert bei pH 3 (Raumtemperatur) das Amid 4 nach 1 h zu mehr als 40%. Hingegen setzte beim Amid 13 unter diesen Reaktionsbedingungen keine merkliche Hydrolyse ein. Kinetisch signifikante Werte an hydrolysiertem 13 waren erst nach Temperaturerhöhung auf 60°C erhältlich (Abb. 2b).

Vergleicht man die Reaktionskonstanten der Hydrolysen von **4** und **13** an Hand der 50%-Umsatzzeiten der Reaktion 1. Ordnung (Tab. 3), so stellt man fest, daß die pH-abhängigen Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeiten untereinander proportional sind. Durch graphische Verschiebung der beiden logarithmischen Auftragungen lassen sich die Kurven nahezu deckungsgleich aufeinander legen (Tab. 3).

Diese Befunde zeigen, daß beide Hydrolysen nach gleichem Mechanismus ablaufen, wobei wir aus den oben diskutierten Gründen dem Mechanismus (A) den Vorzug geben.

Die Kinetik der Amidhydrolyse kann nicht nur chromatographisch sondern auch NMR-spektroskopisch beobachtet werden. Wir haben zu diesem Zweck die zeitliche Abhängigkeit der Reaktion für das Amid **4** in $[D_6]DMSO : D_2O$ (1:1) unter Zusatz von Kaliumhydrogensulfat gemessen. Die zur Carbonylgruppe α -ständigen Methylenprotonen sollten nach der Hydrolyse des Amids zur Säure **5** eine chemische Verschiebung erfahren. Ähnliches ist für das 5-H-Ringproton zu erwarten, während 6-H unbeeinflußt bleiben sollte.

Wie Abb. 3 zeigt, tritt schon nach 45 min das Methylensignal der Säure **5** bei 3.93 ppm auf, während die 5-H-Protonen überlagern. Nach 165 min ist diese Überlagerung vollständig verschwunden, und es werden nur noch Signale der reinen Säure **5** beobachtet¹⁵⁾.

Wir danken Dr. M. Sprinzl für wertvolle Anregungen und Dr. A. Rabczenko für hilfreiche Diskussionen. Herrn B. Seeger danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren, sowie Herrn Steinert, Stöckheim, für die Aufnahme der Massenspektren. M. Kröger dankt Prof. K. Heyns und besonders Dr. H. Köster für die freundliche Unterstützung bei der Genehmigung der Anfertigung der Diplomarbeit außerhalb des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg und für ihr stetes Interesse.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Monoskop (Reichert, Österreich); nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen, ausgeführt. NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (Tetramethylsilan als innerer Standard). UV-Spektren: Zeiss PMQ II, bzw. Shimadzu UV 200-Spektrometer. Massenspektren: Varian-MAT CH-4-Spektrometer, aufgenommen in der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim.

Analytische Dünnschichtchromatographie (DC): an Kieselgeldünnschichtplatten (DC-Mikroarten SI F, 37340, Riedel-de Haën AG, Seelze, und Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten, Merck, Darmstadt). Als Substanznachweis diente die UV₂₅₄-Absorption. Analytische Dünnschicht-elektrophorese (DE): in einer DE-Doppelkammer (DESAGA, Heidelberg) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (ICN-Woelm, Eschwege). Elektrophorese-Puffer: 0.1 M Na-Citrat-Puffer pH 6.5. Quantitative Auswertung der Dünnschichtelektrophorogramme: mit Hilfe eines Densitometers Vitatron TCD 100 (Dieren, Niederlande).

Jodacetamid, Chlorpropionamid und Thioharnstoff wurden von Merck und Aldrich bezogen. 2-Thiocytosin (**3**) wurde nach Wislicenus¹⁷⁾ und Wheeler und Liddle¹⁸⁾ sowie nach Arantz und Brown¹⁹⁾ aus Thioharnstoff und Essigsäure-äthylester dargestellt. 1-Methyl-2-thiocytosin (**10**) wurde nach der Vorschrift von Brown und Jacobsen¹⁰⁾ sowie Ueda und Ohtsuka¹²⁾ aus 2-Thiocytosin (**3**) und Methyljodid und durch nucleophilen Austausch mit NaHS dargestellt.

¹⁷⁾ W. Wislicenus, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **20**, 2930 (1887).

¹⁸⁾ H. L. Wheeler und L. M. Liddle, Amer. Chem. J. **40**, 547 (1908).

¹⁹⁾ W. Arantz und D. J. Brown, in Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, Vol. 1, ed. W. W. Zorbach und R. S. Tipson, pp 55–57, Interscience Publishers, New York 1968.

(4-Amino-2-pyrimidinylthio)acetamid (4): 254.4 mg (2 mmol) 2-Thiocytosin (3) werden mit 369.9 mg (2 mmol) Jodacetamid 3 h bei 43°C in 25 ml 2proz. Natriumhydrogencarbonatlösung gerührt. Der pH-Wert stellt sich dabei auf 9.2 ein. Nach dem Erkalten fallen 264.1 mg (71.6%) farbloses feinkristallines 4 analysenrein aus. Schmp. 215°C (Zers.).

MS: M^+ m/e 184 (24%), $M + 1$ 185 (4.2), $M + 2$ 186 (2.4), 169 (26), 168 (24), 167 (66), 141 (63), 140 (64), 139 (33), 127 (17), 112 (60), 99 (24), 95 (93), 94 (24), 86 (20), 81 (67), 70 (33), 69 (36), 68 (49), 67 (51), 60 (26), 57 (34), 56 (99), 55 (33), 45 (36), 44 (93), 43 (99), 28 (100), Basispeak 28.

$C_6H_8N_4OS$ (184.2) Ber. C 39.12 H 4.38 N 30.42 S 17.41

Gef. C 39.11 H 4.28 N 30.28 S 17.47

(4-Amino-2-pyrimidinylthio)essigsäure (5)⁴⁾: 254.4 mg (2 mmol) 2-Thiocytosin (3) und 369.9 mg (2 mmol) Jodacetamid in 20 ml Wasser werden 3 h bei 43°C gerührt. Die schwach saure Lösung (pH 4.2) wird mit 1 N NaOH bis pH 7.0, dann mit Eisessig bis pH 5.2 titriert, wobei 247.8 mg (67.2%) farblose Plättchen ausfallen. Schmp. 222°C (Zers. ab 193°C, Lit.⁴⁾: 220°C).

MS: M^+ m/e 185 (3.0%), $M + 1$ 186 (0.5), $M + 2$ 187 (\approx 0.3), 167 (27), 141 (100), 140 (31), 139 (23), 127 (7), 95 (81), 94 (26), 68 (27), 67 (27), 45 (21), 43 (19), 41 (23), 40 (23), 36 (67), Basispeak 141, m_1^+ = 150.7 = 185 \rightarrow 167, m_2^+ = 115.6 = 167 \rightarrow 139, m_3^+ = 107.4 = 185 \rightarrow 141, m_4^+ = 64.0 = 141 \rightarrow 95, m_5^+ = 48.67 = 95 \rightarrow 68.

$C_6H_7N_3O_2S$ (185.2) Ber. C 38.91 H 3.81 N 22.69 S 17.31

Gef. C 38.89 H 3.97 N 22.74 S 17.52

(4-Amino-2-pyrimidinylthio)essigsäure-methylester (6): 254.4 mg (2 mmol) 2-Thiocytosin (3) und 369.9 mg (2 mmol) Jodacetamid werden in 10 ml absol. Methanol 3 h auf dem Wasserbad bei 56°C gerührt. Nach dem Abkühlen kann wenig kristallines 6 erhalten werden, zur Gewinnung der Hauptmenge wird die Lösung abgedampft und der Abdampfrückstand dreimal mit 250 ml Äther ausgekocht. Nach dem Einengen fallen 240.5 mg 6 aus. Weitere 41.5 mg werden durch Abdampfen des Ätherüberstandes gewonnen. Gesamtausbe. 301.9 mg (75.6%) blaßgelbe Kristalle vom Schmp. 111°C.

$C_7H_9N_3O_2S$ (199.2) Ber. C 42.20 H 4.55 N 21.09 S 16.10

Gef. C 42.04 H 4.55 N 21.18 S 15.94

(4-Amino-2-pyrimidinyl)essigsäure-äthylester (7): 636 mg (5 mmol) 2-Thiocytosin (3) und 925 mg (5 mmol) Jodacetamid werden in 20 ml Äthanol/H₂O (95:5) 2 h bei 40°C gerührt. Die bernsteinfarbene Lösung wird eingedampft und mit 30 ml 0.5 N NaOH versetzt, wobei der größte Teil des Abdampfrückstandes in Lösung geht. Nach Zugabe von ca. 70 ml Wasser wird dreimal mit 150 ml Chloroform extrahiert, die Chloroformphase abgedampft und mit dem in 0.5 N NaOH unlöslichen Rückstand vereinigt. Umkristallisation aus Äther führte zu 59.6 mg (10.1%)²⁰⁾ gelblicher Würfel vom Schmp. 75.5°C.

MS: M^+ m/e 212 (56%), $M + 1$ 213 (6), $M + 2$ 214 (3.5), 167 (27), 166 (25), 140 (23), 139 (100), 138 (21), 126 (13), 94 (38), 93 (14), 80 (46), 66 (13), 55 (16), 28 (14), Basispeak 139, m_1^+ = 129.6 = 212 \rightarrow 166, m_2^+ = 114.7 = 166 \rightarrow 139.

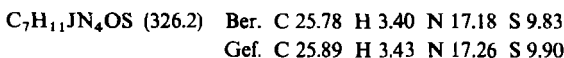
$C_8H_{11}N_3O_2S$ (213.3) Ber. C 45.05 H 5.20 S 15.04 Gef.²¹⁾ C 43.87 H 5.03 S 14.44

4-Amino-2-(carbamoylmethylthio)-1-methylpyrimidinium-jodid (11): 70.59 mg (0.5 mmol) 1-Methyl-2-thiocytosin (10) und 92.49 mg (0.5 mmol) Jodacetamid werden in 10 ml Wasser 3 h bei 43°C gerührt. Dann wird die Lösung bis fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus

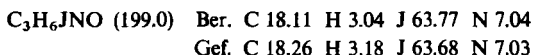
²⁰⁾ Hauptprodukt dieser Präparation ist die Säure 5.

²¹⁾ Die Analysendaten wurden nicht verbessert, da offensichtlich die Kristalle mit dem Hydrojodid verunreinigt waren, was jedoch eine eindeutige spektroskopische Charakterisierung erlaubte.

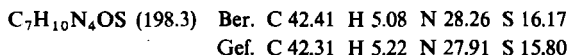
1 ml Wasser umkristallisiert. Dabei werden 137.8 mg (84.0%) farblose Nadeln vom Schmp. 218°C (Zers. ab 210°C) erhalten, die im Laufe von Monaten wenig Jod abscheiden.



*3-Jodpropionamid (12)*¹⁴⁾: 8.97 g (83.4 mmol) Chlorpropionamid und 25 g (167 mmol) Natriumjodid werden in 100 ml Aceton und 50 ml Äthanol 3 h bei 40°C gerührt und anschließend 2 d bei Raumtemp. belassen. Die jetzt braunrote Lösung wird vom ausgefallenen NaCl abfiltriert und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird aus 1 Liter Toluol umkristallisiert. Man erhält 9.12 g (54.9%) farblose Plättchen vom Schmp. 140.5°C (Lit.¹⁴⁾ 141.5–142.5°C). – NMR ([D₆]-DMSO): 2.72 und 3.33 (2t, 4H, J = 6.5 Hz), 6.92 und 7.37 (2s, 2H, CONH₂).



3-(4-Amino-2-pyrimidinylthio)propionamid (13): 1.27 g (10 mmol) 2-Thiocytosin (3) werden in 20 ml absol. Methanol aufgeschlämmt und mit 30 ml 1 proz. methanolischer NaOCH₃-Lösung (aus 243 mg = 10.57 mmol Na) und 2.00 g (10.05 mmol) 3-Jodpropionamid (12) versetzt. Die zuerst klare, dann getrübbte Lösung wird 3 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf 4°C werden 520 mg unumgesetztes 3 zurückerhalten. Die Lösung wird bis zur Trockne eingengt und der Rückstand aus 20 ml Wasser zweimal umkristallisiert: 790 mg (67.5%) feine, farblose Nadeln vom Schmp. 170°C.



Kinetische Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolyse von 4 und 13: Aus einer Lösung von je 10 mg 4 bzw. 13 in 100 µl H₂O wurden je 10 µl zu 150 µl Puffer-Lösung gegeben und daraus nach verschiedenen Zeiten je 10-µl-Proben dünnschichtelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Messung bei pH 3, 4, 5 und 6 wurde Na-Citrat-Puffer nach Lit.¹⁶⁾, bei pH 7 und 8 Phosphat-Puffer nach Lit.¹⁶⁾ benutzt. Mit Hilfe eines Densitometers, das die Löschung der Eigenfluoreszenz der benutzten Dünnschichtplatten bei 254 nm erfaßt, wurde das Verhältnis der UV-aktiven Substanzen quantitativ bestimmt. Alle kleinen Werte sind mit relativ großen Fehlern behaftet, da sie sich wenig vom Untergrundrauschen des Gerätes abheben. Deswegen wurden bei der graphischen Auswertung bevorzugt die mit kleinerem Fehler behafteten Werte zwischen 20 und 80% gewichtet (Abb. 2, Tab. 3). Der geringe Extinktions-Unterschied zwischen 4 und 5 wurde nicht berücksichtigt.

NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 4: 20 mg des Amids 4 wurden in 1 ml [D₆]DMSO gelöst und mit 1 ml einer Lösung von 100 mg KHSO₄/ml D₂O versetzt. Von dieser Lösung wurde bei 30°C nach verschiedenen Zeiten das NMR-Spektrum gemessen (vgl. Abb. 3).