

УДК 547.85

СИНТЕЗ ТИМИНА-2-¹³C И ТИМИНА-1,3-¹⁵N**В. Д. БЛИННИКОВА, В. И. ПИЧУЖКИН, Г. П. ТОКМАКОВ****(Кафедра неорганической и аналитической химии)**

Разработан метод синтеза тимина-2-¹³C и тимина-1,3-¹⁵N, основанный на конденсации меченой мочевины с диэтиловым эфиром β-метиляблочной кислоты. Внесены существенные изменения в методики синтеза диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты. Методом ПМР показано, что при синтезе образуется смесь эритро- и трео-изомеров, причем соотношение их зависит от способа получения. Подобраны температурные условия реакции конденсации мочевины с диэтиловым эфиром β-метиляблочной кислоты, что позволило добиться 45 % выхода меченого тимина с чистотой 97—99 %.

Синтезированные меченые тимин-2-¹³C и тимин-1,3-¹⁵N идентифицированы методами ТСХ в воде, спектрофотометрического и ПМР анализа.

Цель наших исследований — разработка метода синтеза тимина-2-¹³C и тимина 1,3-¹⁵N, необходимых для изучения структуры и процесса синтеза ДНК, а также для выяснения причин наследственных заболеваний.

В литературе описаны способы получения тимина, меченого радиоактивным углеродом-14 во 2-м положении [7], в метильной группе [11] и азотом-15 [13]. Эти способы основаны на реакциях конденсации меченых тиомочевины или мочевины с этилформилпропионатом [17], этил-β, β-диэтоксипропионатом [7], β-метиляблочной кислотой или ее диэтиловым эфиром [10, 15], α-цианпропионовой кислотой [8, 14]. В случае применения тиомочевины образовывался тиотимин, который в дальнейшем подвергался обессериванию [17].

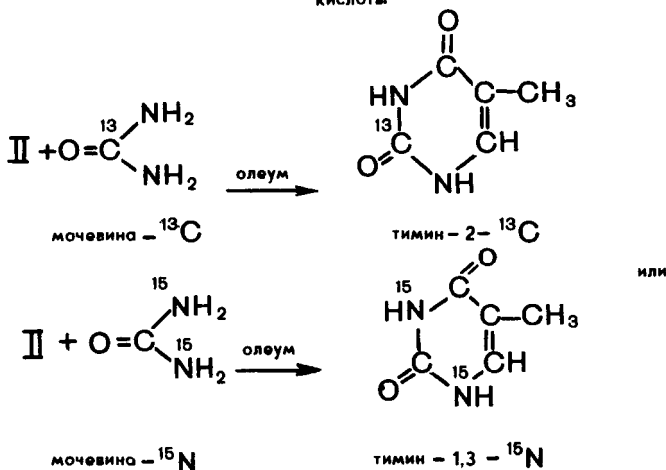
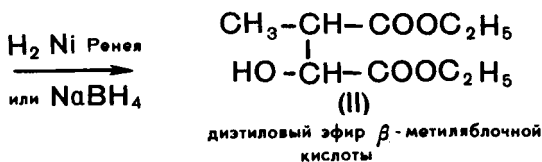
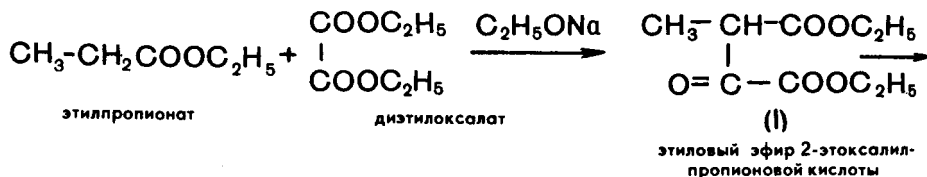
При получении тимина с меткой ¹⁴C в метильной группе исходным меченым сырьем в 5-стадийном синтезе был пропионат натрия. Выходы тимина в расчете на меченый ис-

ходный продукт составляли 20—30 % [7]; 3,3—17 [11]; 39—50 [15]; 37,5 % [6].

В настоящей работе использовали метод Шерпа [15] — конденсации мочевины с диэтиловым эфиром β-метиляблочной кислоты как метод, обеспечивающий наибольший выход меченого продукта из всех представленных в литературе.

Необходимый для синтеза тимина диэтиловый эфир β-метиляблочной кислоты получали в 2 стадии: 1-я стадия включала получение этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты (I) из этилпропионата и диэтилоксалата при участии этилата натрия; 2-я стадия — получение диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты (II) гидрированием кетозефира (I) с помощью боргидрида натрия NaBH₄ или водородом на катализаторе никеле Ренея.

Таким образом, схема процесса получения тимина 2-¹³C и тимина-1,3-¹⁵N может быть представлена в 3 стадии:

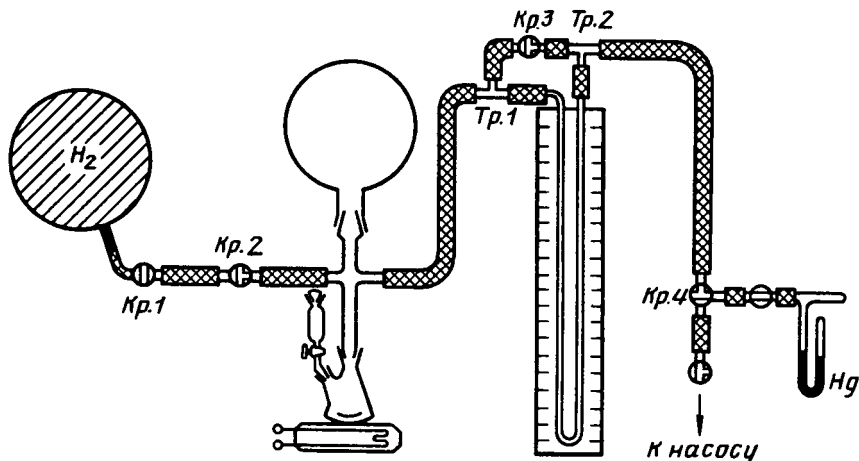


I стадия. Синтез этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты путем конденсации диэтилоксалата и этилпропионата, осуществлен по двум методикам [1, 2]. Выход по 1-й методике колебался от 20 до 50 % и был нестабилен, составляя не более 50 % [2], по 2-й методике — от 60 до 70 % [1], в наших исследованиях он достигал 80 %. Применение 2-й методики обеспечивало более высокий стабильный выход и чистоту этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты.

II стадия. Синтез диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты. Известны способы получения диэти-

лового эфира β-метиляблочной кислоты гидрированием этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты водородом на катализаторе Адамса (PtO₂) [2, 11], на никеле Реня при давлении 3—4 атм без растворителя [15] и на никеле Реня при нормальном давлении, температуре 40—50 °С в среде абсолютного спирта [6], а также восстановлением боргидридом натрия [9].

Нами было проведено восстановление кетоэфира (I) двумя различными способами: водородом на никеле Реня в этаноле при комнатной температуре и обычном давлении и с помощью боргидрида натрия в абсолютном этаноле.



Установка для проведения реакции гидрирования.

Для проведения каталитического гидрирования на никеле Ренея использовали установку (рисунок), состоящую из реакционной двугорлой колбы, снабженной магнитной мешалкой, форбаллона, дифманометра, заполненного полиметилсилоксаном (ПМС-100). В систему подавали хроматографически чистый водород. По изменению давления устанавливали количество вступившего в реакцию водорода, скорость гидрирования, фиксировали окончание реакции гидрирования. Реакция протекала 6 ч (90 % — по результатам ГЖХ анализа реакционной смеси). Содержание эритро-изомера 70 %, а трео-изомера — 30 %.

Для восстановления кетозэфира I боргидридом натрия мы воспользовались методикой [9], в которой приводится высокий (80 %) выход оксизэфира II. Повторив методику, мы получили оксизэфир II, но с гораздо меньшим выходом (48 %). С целью повышения выхода этот метод был несколько видоизменен. Во-первых, количество NaBH_4 на

1 моль кетозэфира было снижено с 0,52 до 0,29 моль, т. е. почти до стехиометрического соотношения. Во-вторых, поскольку оксизэфир II хорошо растворяется в воде, при его выделении мы отказались от промывания реакционной смеси водой и водными растворами. В-третьих, во избежание гидролиза эфира II сильнощелочным раствором NaBO_2 , образующимся при разложении реакционной смеси водой, было проведено разложение минимальным количеством разбавленной уксусной кислоты. Таким образом, удалось поднять выход оксизэфира II до 81 %.

ГЖХ анализ и данные спектров ПМР показали, что образцы оксизэфира II, полученные при восстановлении как водородом, так и NaBH_4 , представляли собой смеси трео- и эритро-изомеров с различным их соотношением. Сравнение спектров ПМР смесей изомеров эфира II с литературными данными [16] позволило установить, что эритроизомер в том и другом случае образуется в большем коли-

честве. Так, по данным ГЖХ, при восстановлении кетозифира I водородом над никелем Ренея соотношение трео- и эритро-оксиэфиров II в реакционной смеси составляло 30:70 %, а при восстановлении NaBH_4 — 10:90 %.

При анализе спектров ПМР изомеров оксиэфира II нам удалось более детально провести интерпретацию сигналов в области 4,0—4,4 м. д. по сравнению с таковой в работе [16]. В этой области находятся сигналы метиленовых протонов этильных радикалов обоих изомеров и дублет протона в положении 2 эритро-изомера (4,29 м. д.). Протоны каждой метиленовой группы эритро-изомера являются неэквивалентными диастереотопными парами протонов и имеют различные химические сдвиги. Их сигналы представляют собой АВ-части двух систем АВХ₃. Каждому из четырех метиленовых протонов эритро-изомера свойствен сигнал из 8 линий в виде дублета квадруплетов. Для этих протонов удалось определить точные химические сдвиги: для одной метиленовой группы — 4,14 и 4,16 м. д., для другой — 4,24 и 4,28 м. д., а также значение геминальной КССВ для обеих метиленовых групп, равное 11 Гц. В трео-изомере химические сдвиги протонов одной из метиленовых групп имеют практически одинаковые значения и их сигнал проявляется в виде квадруплета (4,19 м. д.). Протоны другой метиленовой группы находятся в более слабом поле и, по видимому, имеют разные химические сдвиги, но точные их значения определить не удалось из-за взаимного наложения сигналов.

III стадия. Синтез тимина, меченного углеродом-13 и азотом-15. Повторение методики [5, 15] не давало 50 % выхода продукта. Для отработки оптимального варианта по-

лучения меченого тимина были изменены некоторые параметры процесса: концентрация олеума, порядок добавления исходных компонентов, температура конденсации.

Внесены изменения и в температурный режим при добавлении исходного компонента, диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты, а именно последний добавляли в реакционную смесь, не прекращая наружного охлаждения. Снижена температура конденсации с 90 °С, как рекомендуют в [5, 15], до 80—83 °С, что повысило чистоту меченого продукта до 97—99 % и выход на 12—13 %. При дальнейшем снижении температуры конденсации до 70—73 °С выход снизился на 10—11 %. Таким образом, наблюдался некоторый оптимум в области 80—83 °С, при котором выход тимина был наибольший (40—50 %).

Синтезированные меченые тимин-2-¹³C и тимин-1,3-¹⁵N идентифицированы методами ТСХ на силуфоле в воде, спектрофотометрического и ПМР анализа.

Итак, отработан метод получения необходимых для научных, медицинских и биологических исследований меченых тимина-2-¹³C и тимина-1,3-¹⁵N. Внесены существенные изменения в методики синтеза диэтилового эфира метиляблочной кислоты. Показано, что при гидрировании кетозифира I образуется смесь эритро- и трео-изомеров оксиэфира II, причем их соотношение зависит от способа гидрирования. Изменены температурные условия реакции конденсации мочевины с диэтиловым эфиром метиляблочной кислоты, в результате выход увеличился на 12—13 % по сравнению с таковым в первоначальном варианте, чистота тимина — до 97—99 %.

Экспериментальная часть

Хроматографический анализ проводили на газожидкостном хроматографе «Сhrom-5» с пламенно-ионизационным детектором, хроматографическая фаза SP 1000 на Supelco. ИК-спектры снимали на приборе Perkin-Elmer 577 в жидкой пленке, спектры ПМР — на приборе Bruker WM (250 МГц) в CDCl_3 и на Varian-300 в DMSO, внутренний стандарт ТМС. Контроль чистоты меченого тимина осуществляли спектрофотометрически на приборе СФ-4А и тонкослойной хроматографией на пластинках Silufol UV-254, элюент — вода, проявлена УФ-светом.

Для синтеза этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты по методике [2] необходимый этилпропионат готовили по методу [3] ($T_{\text{кип}}=97\text{...}99^\circ\text{C}$; $n_D=1,385$), продажный диэтилоксалат (кв. «ч») сушили хлоридом кальция и перегоняли при $T_{\text{кип}}=184\text{...}191^\circ\text{C}$; $n_D=1,4105$.

Согласно методике [1] этилпропионат и диэтилоксалат использовали в виде продажных реагентов, перегнанных над P_2O_5 .

Этиловый эфир 2-этоксалилпропионовой кислоты (I) получали по методике [2] с выходом от 20 до 50 %, $T_{\text{кип}}=60\text{...}64^\circ\text{C}$ (1 мм рт. ст.) и по методике [1] с выходом 80 %, $T_{\text{кип}}=94^\circ\text{C}$ (2 мм рт. ст.). По литературным данным [1], $T_{\text{кип}}=114\text{...}116^\circ\text{C}$ (10 мм рт. ст.), выход 60—70 %.

ГЖХ-анализ образцов, полученных по обоим методикам, дал одинаковые результаты: $T_{\text{удерж}}=11,7$ мин. Найдено: С 53,45; Н 6,97 %; $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_5$. Вычислено: С 53,46; Н 6,93 %.

Восстановление кето-эфира (I) водородом на ни-

келе Ренея. Каталитическое гидрирование осуществляли на установке (рисунок). Предварительно готовили катализатор никель Ренея из сплава Ni—Al обработкой последнего 20 % раствором едкого натра [12]. Установку откачивали вакуум-насосом до давления 30—40 мм рт. ст., через систему пропускali хроматографически чистый водород и заполняли им систему до атмосферного давления. Далее водород откачивали до давления меньше атмосферного и через капельную воронку приливали 6 мл (32 ммоль) этилового эфира 2-этоксалилпропионовой кислоты (I), полученного по методике [2].

При открытом кране 3 напускали водород до давления немного больше атмосферного, краны 2 и 3 закрывали.

Об окончании реакции судили по прекращению изменения давления. Реакционную смесь отфильтровывали, хроматографировали (ГЖХ) и перегоняли диэтиловый эфир β -метиляблочной кислоты при $T_{\text{кип}}=90\text{...}92^\circ\text{C}$ и вакууме 1,5 мм рт. ст. (выход 30 %).

По литературным данным [4], $T_{\text{кип}}$ оксизфира II = 138°C (17 мм рт. ст.); $T_{\text{кип}}=250^\circ\text{C}$ (745 мм рт. ст.). ГЖХ-анализ продукта представлен в виде 2 пиков (эритро- и трео-изомеров) с $t_{\text{удерж}}$ 19,4 и 24,5 мин; соотношение трео-изомеров и эритро-изомеров 30:70 %, ИК-спектр 3510 см^{-1} (ОН).

Найдено: С 53,47; Н 7,50 %; $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$. Вычислено: С 52,9; Н 7,84 %.

Восстановление кето-эфира (I) NaBH_4 . К раствору 20,2 г (0,1 моль) кетоэфира I в 60 мл абс. спирта, охлажденному на ледяной бане, добавляли при перемешивании небольшими порциями 1,1 г (0,029 моль) NaBH_4 так,

чтобы температура не поднималась выше 6 °С. Охлаждение убирали и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем к ней добавляли смесь 2 мл концентрированной уксусной кислоты и 1,5 мл воды и упаривали этиловый спирт в вакууме. К оставшейся густой массе добавляли 250 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали и промывали на фильтре эфиром (3××30 мл). Фильтрат сушили над пошатом и эфир упаривали. Остаток перегоняли в вакууме. Получали 16,5 г (81 %) диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты в виде смеси эритро- и трео-изомеров в соотношении 90,5:9,5 % (ГЖХ), $T_{\text{кип}}=95\text{--}97\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 мм рт. ст.); $n_D^{16}=1,4378$. По данным [9], $T_{\text{кип}}=120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 мм рт. ст.). ГЖХ: $\tau_{\text{удерж}} 19,0$ и $24,03$ мин соответственно для эритро- и трео-изомеров.

Спектр ПМР эритро-изомера: 1,25 т ($\text{CH}_3\text{—CH}_2$); 1,29 д (3—CH_3 , $I=7,5$ Гц); 1,30 т ($\text{CH}_3\text{—CH}_2$); 3,02 кд (3—H , $I_1=7,5$ Гц, $I_2=3,8$ Гц); 3,30 уш. с. (ОН); 4,14 и 4,16 дк (CH_2 , $I_1=11$ Гц, $I_2=7,5$ Гц); 4,24 и 4,28 дк (CH_2 , $I_1=11$ Гц, $I_2=7,3$ Гц); 4,29 д (2—H , $I=3,8$ Гц).

Спектр ПМР трео-изомера: 1,17 д (3—CH_3 , $I=7,5$ Гц); 1,28 т ($\text{CH}_3\text{—CH}_2$); 1,31 т ($\text{CH}_3\text{—CH}_2$); 2,92 кд (3—H , $I_1=7,5$ Гц, $I_2=4,0$ Гц); 3,7 уш. с. (ОН); 4,19 к (CH_2 , $I=7,5$ Гц); 4,25—4,35 м (CH_2); 4,60 д (2—H , $I=4,0$ Гц).

Тимин-2- ^{13}C . В двугорлую колбу, снабженную термометром и капельной воронкой с хлоркальциевой трубкой, вводили 6,2 мл 19,5 % олеума, охлаждали при перемешивании до температуры $-10\text{--}-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Порциями добавляли 0,72 г (12 ммоль) меченой мочевины — ^{13}C (обогащение 80 % по ^{13}C , СОВ 96 %), чтобы температура не

поднималась выше 0 °С. Перемешивание продолжали еще в течение 30 мин до полного растворения мочевины. Не прекращая охлаждения, добавляли по каплям 2,3 мл (12,4 ммоль) диэтилового эфира β-метиляблочной кислоты. Охлаждение прекращали и на водяной бане медленно нагревали реакционную смесь до 80 °С в течение 1,5—2 ч и далее выдерживали при 80...83 °С до прекращения выделения газа. Смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали небольшими порциями в охлажденную до 0 °С смесь из 40 мл этанола и 40 мл эфира. Через несколько минут выделялся осадок тимина-2- ^{13}C , реакционную смесь оставляли в холодильнике при температуре $-5\text{--}-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ на ночь. Осадок тимина-2- ^{13}C отфильтровывали, промывали 10—15 мл охлажденной эфирно-спиртовой смесью (1:1).

Выход тимина-2- ^{13}C 0,66 г (45 %); СОВ 99 %, по данным УФ-спектра, ТСХ (вода) $R_F=0,61$ (R_F -этанола=0,61). УФ-спектр: $\lambda_{\text{max}}(\text{лге}) 264,5$ нм (3,90).

Спектр ПМР тимина-2- ^{13}C : CH_3 — 1,73 (д); H_6 — 7,20 (м); H_1 — 10,43 (с); H_3 — 10,82 (с).

Тимин-1,3- ^{15}N . Методика аналогична приведенной выше. Выход тимина-1,3- ^{15}N 0,66 г (45 %); СОВ 97 %. ТСХ (вода) $R_F=0,61$. УФ-спектр: $\lambda_{\text{max}}(\text{лге}) 264,5$ нм (3,90).

Спектр ПМР тимина-1,3- ^{15}N : CH_3 — 1,73 (д); H_6 — 7,20 (м); H_1 — 10,43 (м), $I_{\text{N}_1^{15}\text{—H}_1}=94,86$ Гц; $I_{\text{N}_3^{15}\text{—H}_1}=2,1$ Гц; $I_{\text{H}_6\text{—H}_1}=5,68$ Гц; $\text{H}_3=10,82$ (м); $I_{\text{N}_3^{15}\text{—H}_3}=89,74$ Гц; $I_{\text{N}_1^{15}\text{—H}_3}=2,10$ Гц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кокс Р., Мак-Эльвен С. Получение этилового эфира этюксалил-пропионовой кислоты.— Синтезы орга-

нических препаратов. Сб. 2.— М.: ИЛ, 1949, с. 604—606.— 2. Мэррей А., Уильямс Д. Синтезы органических соединений с изотопами углерода. Ч. 2.— М.: ИЛ, 1962.— 3. Препаративная органическая химия.— М.: ГХИ, 1959.— 4. Словарь органических соединений. Т. 2.— М.: ИЛ, 1949.— 5. Фельдман И. Х., Гинесина А. А., Абрамзон А. А., Езриелев Р. И. Тимидин-2-¹⁴C.— Меченые биологически активные вещества. Вып. 2. М.: Атомиздат, 1966, с. 87.— 6. Фельдман И. Х., Шепшелевич Л. В. Синтез тимина-2-¹⁴C.— Меченые биологически активные вещества. Вып. 1. М.: Атомиздат, 1962, с. 90.— 7. Venner L.— J. Amer. Chem. Soc., 1952, vol. 74, p. 2432—2434.— 8. Bergmann W.— J. Amer. Chem. Soc., 1937, vol. 55, p. 1733—1736.— 9. Bhat K. S., Dixit K. N., Rao A. S.— Indian

J. Chem. Sect. B, 1985, vol. 24 B, N 5, p. 509—512.— 10. Davidson D., Baudisch O.— J. Amer. Chem. Soc., 1926, vol. 48, p. 2379—2381.— 11. Henderson R. B.— J. Amer. Chem. Soc., 1955, vol. 77, p. 6381—6385.— 12. Methoden der organischen Chemie. Bd. IV/2, S. 303—306.— 13. Plentle A., Schoenheimer R.— Biol. Chem., 1944, vol. 153, p. 203—207.— 14. Quiot A.— Mentzer C. C. R. Acad. Sci. Paris, 1958, vol. 246, p. 436—437.— 15. Scherp H. M.— J. Amer. Chem. Soc., 1946, vol. 68, p. 912—915.— 16. Trowitzsch W., Höfle G., Sheldrick W.— Tetrahedron Lett., 1981.— vol. 22, N 39, p. 3829—3833.— 17. Wheeler H. L., Liddle L.— Amer. Chem. J., 1908, vol. 40, p. 547—549.

Статья поступила 5 декабря 1989 г.

SUMMARY

The method of synthesizing thimine-2-¹³C and thimine-1.3-¹⁵N based on condensation of labeled urea with diethyl ether of β -methylmalic acid has been developed. Substantial changes have been made in methods of synthesizing diethyl ether of β -methylmalic acid. It is shown by PMR method that with this synthesis a mixture of erythro- and threo-isomers is formed, their ratio depending on the way of their production. Temperature conditions for reaction of condensation of urea with diethyl ether of β -methylmalic acid are chosen, which allowed to achieve 45 % of labeled thimine output with 97—99 % purity.

Synthesized labeled thimine-2-¹³C and thimine-1.3-¹⁵N are identified by TSKh methods in water, by spectrophotometric and PMR analysis.