

Zur Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen durch unphysiologische Verbindungen III¹

F-haltige Pyrimidin- und Dicarbonsäure-Derivate

R. RIEMSCHEIDER UND H. PEHLMANN

Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin und Chemisches Institut der Universität Santa Maria, Brasilien ²

(Z. Naturforschg. 20 b, 540—543 [1965]; eingegangen am 18. September 1963)

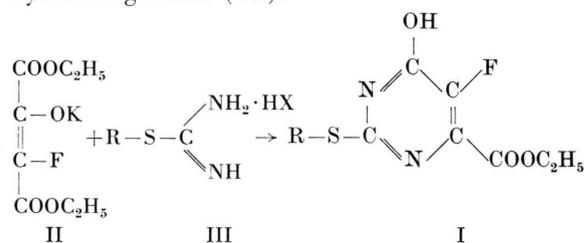
Es wird über die Synthese einiger S-Alkyl-thiofluororotsäureäthylester, der Fluororotsäure, des Difluoroxalessigsäure- und des Difluoräpfelsäurediäthylesters berichtet. Diese Verbindungen wurden dem Futter von Insekten zugesetzt, mit dem Ziel, die Fortpflanzungsfähigkeit der Tiere zu hemmen.

Seit geraumer Zeit³ laufen in unserem Institut Versuche zur Auslösung von Prozessen, die Störungen des Eiweißhaushaltes und der Fortpflanzungsfähigkeit von Schädlingen, z. B. Insekten, zur Folge haben. Ziel dieser Untersuchungen ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Bekämpfung von Schadinsekten durch Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen mit Hilfe unphysiologischer Verbindungen, insbesondere solcher, die konstitutionell den Pyrimidinen, Aminosäuren, Dicarbonsäuren und anderen nahestehen (Sexualsterilisation von Insekten durch chemische Mittel). Es ist uns z. B. gelungen, *p*-Fluorphenylalanin in Eiweißkörper von Insekten und anderen Organismen einzubauen und Defekte solcher Eiweißkörper gegenüber normalen nachzuweisen.

In vorliegender Arbeit sollten F-haltige Pyrimidin- und Dicarbonsäure-Derivate für derartige Versuche bereitgestellt und ihr Effekt auf die Fortpflanzungsfähigkeit von *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Unsere Wahl fiel zunächst auf Orot-

säure-Derivate, da Orotsäure als Vorstufe für die Bildung von Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren, insbesondere des Uracils dient.

Die elf in der Tab. 1 ausgeführten S-R-Thiofluororotsäureäthylester (I) synthetisierten wir — in Anlehnung an Angaben von DUSCHINSKY⁴ für die Äthylverbindung von I — durch Kondensation des Kaliumenolats des Fluoroxalessigsäurediäthylesters (II) mit den entsprechenden S-R-Isothioharnstoffhydrohalogeniden (III).



Hydrolyse von I mit HCl führt zur Fluororotsäure (IV).

Lfd. Nr.	R	Formel	Ausbeute [%]	Schmp. [°C]	F [%]	
					ber.	gef.
1	Äthyl	C ₉ H ₁₁ FN ₂ O ₃ S	9,4	161—164	7,7	8,1
2	n-Propyl	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O ₃ S	12,1	154—156	7,3	7,0
3	Isopropyl	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O ₃ S	3,1	155—158	7,3	7,3
4	n-Butyl	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S	5,2	113—115	6,9	7,8
5	Isobutyl	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S	2,4	113—115	6,9	7,3
6	n-Amyl	C ₁₂ H ₁₇ FN ₂ O ₃ S	6,2	93—94	6,6	5,4
7	n-Hexyl	C ₁₃ H ₁₉ FN ₂ O ₃ S	5,1	78—80	6,3	6,2
8	n-Heptyl	C ₁₄ H ₂₁ FN ₂ O ₃ S	6,3	85—87	6,0	5,4
9	n-Octyl	C ₁₅ H ₂₃ FN ₂ O ₃ S	10,3	77—79	5,7	4,1
10	n-Decyl	C ₁₇ H ₂₇ FN ₂ O ₃ S	11,2	78—82	5,3	3,0
11	Benzyl	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃ S	6,6	155—158	6,2	4,9

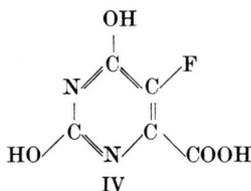
Tab. 1. Synthetisierte S-R-Thiofluororotsäureäthylester (I).

¹ Mitt. I und II, Manuskripte 1958, vgl. auch Z. Naturforschg. 16 b, 142 [1961].

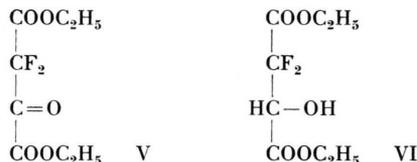
² Anschrift für den Schriftverkehr: Prof. Dr. R. RIEMSCHEIDER, Berlin 19, Bolivarallee 8.

³ Vgl. l. c. ¹.

⁴ R. DUSCHINSKY, J. Amer. chem. Soc. 79, 4559 [1957].



Als F-haltige Dicarbonsäuren haben wir für diese und andere Untersuchungen Difluoroxalessigsäure-diäthylester (V) und Difluoräpfelsäurediäthylester (VI) synthetisiert.



Einige Ergebnisse unserer Testversuche mit den I-Verbindungen sind in Tab. 3 zusammengestellt. Die Testsubstanzen wurden dem Futter der *Drosophila* in einer Menge von 1% hinzugefügt. Die Taufliegen wurden bis zur 6. und 7. Generation gezüchtet. Aus jeder Generation haben wir zur Weiterzucht meist 15 Fliegenpaare verwendet. Bei Anwendung von S-Isopropylthiofluororotsäureäthylester schlüpfen von der 3. Generation an weniger, von der 5. Generation ab keine Fliegen mehr (Tab. 3, lfd. Nr. 3). Unter anderem haben wir auch Fluoruracil und Fluororotsäure in Konzentration von 0,1% dem Futter zugesetzt. Unter diesen Bedingungen schlüpfen keine Fliegen aus. Diese Untersuchungen werden fortgesetzt.

Experimenteller Teil

S-R-Isothioharnstoff-hydrohalogenide (III: Tab. 2,1–11)

Zur Synthese dieser Hydrohalogenide haben wir unter Variation einer Vorschrift von BRAND⁵ für 1 Mol Thioharnstoff etwa 1,2 Mole des entsprechenden Alkylbromids bzw. Benzylchlorids verwendet. Die Reaktionsmischung wurde in einem Kolben mit 50–150 ml abs. Äthanol unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß gekocht, nach dem Lösen des Thioharnstoffs die Reaktionslösung noch 3 Stdn. auf dem Wasserbade auf 60 bis 70° gehalten und dann im Vak. scharf bis zur Trockne eingedampft. Ausbeute praktisch quantitativ.

Beispiel: S-Äthylisothioharnstoff-hydrobromid (Tab. 2,1)

Die Reaktionsmischung, bestehend aus 38 g (0,5 Mol) Thioharnstoff, 65 g (0,6 Mol) Äthylbromid und 60 ml abs. Äthanol, wurde zunächst unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß gekocht, und, nachdem der

Lfd. Nr.	R	Formel	Schmp. [°C]
1	Äthyl	C ₃ H ₉ BrN ₂ S	85–87
2	n-Propyl	C ₄ H ₁₁ BrN ₂ S	82–83
3	Isopropyl	C ₄ H ₁₁ BrN ₂ S	102–103
4	n-Butyl	C ₅ H ₁₃ BrN ₂ S	80–82
5	Isobutyl	C ₅ H ₁₃ BrN ₂ S	103–105
6	n-Amyl	C ₆ H ₁₅ BrN ₂ S	75–77
7	n-Hexyl	C ₇ H ₁₇ BrN ₂ S	78–80
8	n-Heptyl	C ₈ H ₁₉ BrN ₂ S	83–84
9	n-Octyl	C ₉ H ₂₁ BrN ₂ S	85–86
10	n-Decyl	C ₁₁ H ₂₅ BrN ₂ S	103–104
11	Benzyl	C ₈ H ₁₁ ClN ₂ S	112–113

Tab. 2. S-R-Isothioharnstoff-hydrohalogenide (III).

Nr.	I R	1. Generation		2. Generation		3. Generation		4. Generation		5. Generation		6. Generation		7. Generation		
		% I im Futter	Zahl der Paare	geschlüpfte Fliegen												
1	Äthyl	1	15	166	15	155	15	122	15	206	15	186	15	177	15	122
2	n-Propyl	1	15	229	15	—	15	193	15	299	15	259	15	211	—	—
3	Isopropyl	1	15	120	15	173	15	64	15	49	15	—	—	—	—	—
4	n-Butyl	1	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	Isobutyl	1	15	99	15	196	13	189	15	230	15	214	15	198	—	—
6	n-Amyl	1	15	202	15	151	15	243	15	40	15	—	—	—	—	—
7	n-Hexyl	1	15	140	15	231	15	79	15	80	15	131	15	176	15	185
8	n-Heptyl	1	15	308	15	502	15	339	15	212	15	276	15	209	15	286
9	n-Octyl	1	15	301	15	104	15	181	13	343	15	174	15	192	—	—

Tab. 3. Ergebnisse einiger Testversuche (Zusatz von I zum Futter von *Drosophila melanogaster* M.).

⁵ E. BRAND, Org. Syntheses **22**, 59 [1942].

Thioharnstoff gelöst war, noch 3 Stdn. auf dem Wasserbade bei 60–70° gehalten. Beim Eindampfen im Vak. fiel das Hydrobromid aus. Ausbeute: 92,5 g vom Schmp. 85–87°.

S-R-Thiofluororotsäureäthylester
(I: Tab. 1,1–11)

Für einen Ansatz wurden 3,5 g (0,15 Mol) Na in ca. 30 ml abs. Methanol gelöst, dann wurde im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 360 ml abs. Äthanol aufgenommen. In diese Lösung haben wir in einzuhaltender Reihenfolge 0,15 Mol des betreffenden *S*-Alkylisothioharnstoff-hydrobromids bzw. *S*-Arylisothioharnstoff-hydrochlorids (III) und 36,6 g (0,15 Mol) Kaliumenolat des Fluoroxalessigsäure-diäthylesters (II) gegeben.

Die Reaktionsmischung wurde dann 4 Stdn. (vgl. unten) unter Rückfluß und Feuchtigkeitsschluß langsam gekocht, durch Abdestillieren des Alkohols zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit H₂O extrahiert. Die dazu benötigte Wassermenge stieg von 0,3 l bei der *S*-Äthyl-, bis zu ca. 2 l bei der Isobutylverbindung (Tab. 1,1–5). Die Extraktionslösung wurde nun filtriert und mit Äther zwecks Reinigung ausgeschüttelt. Beim Ansäuern auf p_H 2 mit HCl (1 : 1) fiel ein gelblicher Niederschlag aus, der abgesaugt und aus wenig Wasser umkristallisiert wurde.

Bei den restlichen Reaktionsprodukten – von *S*-Amyl- bis zum *S*-Benzylthiofluororotsäureäthylester (Tab. 1,6–11) – wurde die alkoholische Reaktionsmischung nach dem 4-stdg. Kochen nicht vom Alkohol durch Destillieren befreit, sondern der nicht gelöste Teil abfiltriert und die rotbraune Lösung in viel Wasser (3–6 l) eingegossen. Es fiel dann der betreffende Ester ölig aus, der nach wenigen Tagen und nach Ansäuern des Wassers kristallin erstarrte. Der Ester wurde abfiltriert, auf Tontellern durch Pressen vom öligen Teil befreit, nochmals in wenig kaltem Alkohol gelöst, filtriert und wieder in die gleiche Wassermenge eingegossen. Dort kristallisierten bald nach Ansäuern lange Nadeln aus. Das Kristallisat wurde dann abgesaugt, auf Tontellern abgepreßt und an der Luft getrocknet.

Zur weiteren Erläuterung dieser allgemeinen Herstellungsvorschrift seien zwei Beispiele angegeben:

S-Isopropyl-thiofluororotsäure-
äthylester (Tab. 1,3)

3,5 g (0,15 Mol) Na wurden in ca. 30 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde dann im Vak. eingeeengt, der Rückstand mit 360 ml abs. Äthanol aufgenommen. Zu der äthanolischen Natriummethylat-Lösung wurden 24,8 g (0,15 Mol) *S*-Isopropylthioharnstoff-HBr und 36,6 g (0,15 Mol) Kaliumenolat des Fluoroxalessigsäure-diäthylesters gegeben. Nach 4-stdg. Kochen wurde der Alkohol im Vak. zur Trockne abgezogen und der Rückstand mit ca. 1 l H₂O extrahiert. Die rotfarbene Extraktionslösung wurde filtriert, mit Äther ausgeschüttelt und mit HCl (1 : 1) auf p_H 2 angesäuert. Der ausgefallene Ester wurde dann aus H₂O umkristallisiert. Ausbeute: 1,2 Gramm.

S-Benzylthiofluororotsäure-
äthylester (Tab. 1,11)

3,5 g (0,15 Mol) Na wurden in ca. 30 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 360 ml abs. Äthanol aufgenommen. In die Reaktionslösung kamen nun 31,0 g (0,15 Mol) *S*-Benzylisothioharnstoff-HCl und 36,6 g (0,15 Mol) Kalium-Fluoroxalessigsäure-diäthylester. Die Mischung wurde 4 Stdn. gekocht und nach der allgemeinen Herstellungsvorschrift weiterverarbeitet. Ausbeute: 3,0 Gramm.

Kaliumenolat des Fluoroxalessig-
säure-diäthylesters⁶ (II)

8 g (0,2 Mol) K wurden in eine Mischung von ca. 40 ml abs. Äther und 30 ml abs. Äthanol portionsweise unter Feuchtigkeitsschluß und Kühlen gegeben (Reaktionskolben mit Rückflußkühler). Zwecks vollständiger Auflösung des Kaliums kam noch etwas Alkohol hinzu.

Danach wurden 29,2 g (0,2 Mol) Oxalsäure-diäthylester und 21,2 g (0,2 Mol) Fluoroxalessigsäure-äthylester in der angegebenen Reihenfolge in die Lösung getropft. Die Reaktionsmischung blieb über Nacht stehen. Es fiel ein hellgelber Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Äther gewaschen wurde, bis dieser klar durch das Filter lief.

Für jeden Ansatz zur Herstellung der I mußte das hygroskopische Kaliumenolat frisch hergestellt und sofort verarbeitet werden. Ausbeute: 38 g (90%).

S-Äthylthiofluororotsäureäthylester
(Tab. 1,1)

Es wurden 3,5 g (0,15 Mol) Na in ca. 30 ml abs. Methanol gelöst, die Lösung im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 360 ml abs. Äthanol aufgenommen. In der angegebenen Reihenfolge kamen nun 27,6 g (0,15 Mol) *S*-Äthylisothioharnstoff-HBr (Tab. 2,1) und 36,6 g (0,15 Mol) Kaliumenolat in die Lösung. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stdn. gekocht, danach im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit ca. 200–300 ml H₂O extrahiert. Die Lösung wurde filtriert, mit Äther ausgeschüttelt und zum Schluß mit HCl (1 : 1) auf p_H 2 angesäuert. Es fiel der Ester aus, der aus Wasser umkristallisiert wurde.

Fluororotsäure (IV)

8 g *S*-Äthylthiofluororotsäureäthylester wurden mit einer Mischung von 20 ml konz. HCl, 50 ml H₂O und 70 ml Äthanol einen Tag lang gekocht. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert und aus H₂O umkristallisiert. Ausbeute: 4,6 g Fluororotsäure-monohydrat vom Schmp. 245–250°.

C₅H₃O₄N₂F·H₂O (192,1)

Ber. F 9,9 Gef. F 9,7.

Difluoroxalessigsäure-diäthylester (V)

In eine Suspension von 0,1 Mol Natriumenolat des Oxalessigsäure-diäthylesters in abs. Äthanol wurde

⁶ E. D. BERGMANN, J. chem. Soc. [London] 1955, 2192.

unter Rühren bei -10° FCIO_3 -Gas eingeleitet. Um die Reaktion der Lösung neutral zu halten, haben wir laufend eine Natriumalkohol-Lösung hinzugegeben, insgesamt etwa 3 g Na in 50 ml abs. Äthanol. Das Reaktionsgemisch wurde nach Durchleiten von Stickstoff in ca. 300 ml Eiswasser gegeben, filtriert und ausgeäthert. Die Destillation der mit Natriumsulfat getrockneten Ätherlösung ergab nach Abziehen des Äthers: 11 g V vom Sdp._{0,8}: $65-67^{\circ}$, $n_D^{20} = 1,398$.

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_5$ (224,2)
Ber. C 42,85 H 4,50 F 16,95,
Gef. C 42,92 H 4,68 F 17,02.

Die durch $1\frac{1}{2}$ -stdg. Kochen mit 8-proz. HCl erhaltene Difluoroxalessigsäure schmolz nach Umkristallisierung bei 121° .

$\text{C}_4\text{H}_2\text{F}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (186,1)
Ber. C 25,81 H 2,17 F 20,42,
Gef. C 25,59 H 2,09 F 20,36.

Difluoräpfelsäurediäthylester (VI)

20 g V wurden unter Rühren innerhalb von 3 bis 5 Stdn. bei 15° in eine Lösung von 8,5 g NaBH_4 , in 80 ml Pyridin eingetragen. Nach Hinzufügen der gleichen Menge Wasser zogen wir im Wasserstahlvakuum die Hauptmenge des Pyridins ab, den Rückstand mit Methylchlorid aus. Nach Entfernen des Lösungsmittels gingen 5 g VI bei 0,7 mm und $73-76^{\circ}$ über.

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_5$ (226,2)
Ber. C 42,48 H 5,35 F 16,80,
Gef. C 42,80 H 5,40 F 16,69.

Diese Arbeiten wurden in den Jahren 1958–1961 durchgeführt.

Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen

R. TSCHESCHE und G. WULFF

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 20 b, 543–546 [1965]; eingegangen am 24. Februar 1965)

Es wird über die antimikrobielle und cyto-statische Wirksamkeit von 19 verschiedenen Saponinen der Steroid- und Triterpenreihe berichtet und ihre biologische Bedeutung diskutiert.

Vor kurzem gaben wir eine Übersicht über die bisher in ihrem chemischen Aufbau geklärten Saponine und haben versucht, Zusammenhänge zwischen Struktur und Eigenschaften aufzuzeigen¹. Als typische Eigenschaften der Saponine gelten das starke Schaumbildungsvermögen, die Hämolyse, die Toxizität für Fische und die Cholesterinfällbarkeit, die in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße vorhanden sein können. Daneben kennt man noch Eigenschaften, die nur einige Saponine zeigen. Dazu zählt die antimikrobielle Wirksamkeit, die bisher am Tomatin^{2a, 2b}, Solanin^{2a}, Demissin^{2b}, Solanocapsin^{2b}, Asiaticosid³, Oxyasiaticosid³ und Avenacin^{4, 5} nachgewiesen wurde.

Die bisherigen Ergebnisse wurden von verschie-

den Bearbeitern jeweils mit einem Saponin gegenüber sehr unterschiedlichen Mikroorganismen erhalten. Es erschien daher wünschenswert, die verfügbaren Saponine systematisch bei einer Auswahl verschiedenartiger Mikroorganismen zu prüfen (mikrobiologisches Spektrum).

In der Tab. 1 sind die Ergebnisse der antimikrobiellen Prüfung von 15 Saponinen enthalten. Dabei wurden die einzelnen Saponine in einer Konzentration von 10 mg/ml in der üblichen Weise im Agardiffusionstest⁶ bei 7 Mikroorganismen geprüft, wobei in der Tabelle der Durchmesser der Wirkungszone in mm angegeben ist. In entsprechender Weise wurde der Miyamuratest zur Ermittlung der cyto-statischen Aktivität ausgeführt⁷. Die Ergebnisse im

¹ R. TSCHESCHE u. G. WULFF, *Planta med.* [Stuttgart] **12**, 272 [1964].

² Zusammenfassungen: a) F. A. SKINNER, in: K. PAECH u. M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Springer-Verlag, Berlin 1955, Bd. III, 626. b) K. HILLER, *Pharmazie* **19**, 167 [1964].

³ Zusammenfassung: P. BOITEAU, B. PASICH u. A. R. RATSI-MAMANGA, *Les Triterpénoïdes*, Gauthier-Villars, Paris 1964, S. 1252.

⁴ E. M. TURNER, *J. exp. Botany* **12**, 169 [1961].

⁵ J. V. MAJZEL, H. J. BURCKHARDT u. H. K. MITCHELL, *Biochemistry* **3**, 424 [1964].

⁶ Ausführung nach F. KAVANAGH, *Analytical Microbiology*, Academic Press, New York 1963.

⁷ J. MEYER-ROHN, M. JÄNNER u. H. KRUMME, *Arzneimittel-Forsch.* **10**, 563 [1960].