

## Die Eignung von 4.5-Dichlor-pyridazonen-(6) zur selektiven Umsetzung von Mercaptogruppen

Von WOLFGANG SCHREIBER\*

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Schütte)

(Der Schriftleitung zugegangen am 10. Dezember 1966)

**Zusammenfassung:** 1. Die Reaktion von 4.5-Dichlor-1-[2-carboxy-äthyl]-pyridazon-(6) mit Mercaptanen wird durch kinetische Messung und durch Isolierung der Reaktionsprodukte untersucht: es handelt sich um eine  $S_{N_2}$ -Reaktion mit  $RS^\ominus$  als nucleophilem Agens.

2. Das Verhältnis der Geschwindigkeit der Reaktion mit der SH-Gruppe von Cystein zur Geschwindigkeit der Reaktion mit Amino- bzw. Imidazolgruppen ist für die untersuchte Verbindung ca. 50mal größer als für Jodacetamid und Jodacetat.

**Summary:** 1. The reaction of 4.5-dichlor-1-(2-carboxyethyl)-pyridazone-(6) with mercaptans was studied by kinetic measurements and by isolation of the reaction products: it is an  $S_{N_2}$ -reaction with  $RS^\ominus$  as the nucleophilic agent.

2. The ratio of the rate of reaction with the SH-group of cysteine and the rate of reaction with amino or imidazole groups is about 50 times greater for the above compound than for iodoacetamide and iodoacetate.

Während die mengenmäßige Bestimmung von SH-Gruppen in Proteinen mit Hilfe einer Reihe von Methoden<sup>1</sup> zufriedenstellend gelöst werden kann, kommen von verschiedenen Seiten<sup>2</sup> immer wieder Hinweise, daß zur Charakterisierung des Verhaltens und der Funktionen von SH-Gruppen in Proteinen eine größere Anzahl möglichst verschiedenartiger und möglichst spezifischer Reagenzien zur Umsetzung der SH-Gruppen und damit Modifizierung der Proteine wünschenswert sei. Im Zusammenhang

damit stehen die verschiedenen Berichte über Wirkungen der für diese Zwecke üblichen Reagenzien, die nicht auf Reaktionen mit SH-Gruppen zurückzuführen sind, wie z. B. die Hemmung der Katalase durch *p*-Chlormercuri-benzoat<sup>3</sup> oder Alkylierungen von Amino-, Imino- und Methylmercapto-Gruppen durch Jodacetamid<sup>4</sup>, Jodacetat<sup>5</sup> und *N*-Äthylmaleinsäureimid<sup>6</sup>.

Wir haben daher in Verfolgung einer Beobachtung von DURY<sup>7</sup> über die leichte Reaktion von Derivaten des 4.5-Dichlor-pyridazons-(6) mit Mercaptanen untersucht, ob sich Verbindungen dieser Art, ähnlich Jodessigsäure und Jodacetamid, zur selektiven

\* Neue Anschrift: Dr. W. SCHREIBER, N. I. H./N. I. A. M. D., Building 4, Room 215, Bethesda, Md. 2014, U. S. A.

<sup>1</sup> Vgl. R. BENESCH u. R. BENESCH, *Methods biochem. Analysis* **10**, 41 [1962].

<sup>2</sup> K. WALLENFELS u. Chr. STREFFER im 14. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie, S. 6, Springer Verlag, Berlin 1964; P. D. BOYER in P. D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Bd. I, S. 511, Academic Press, New York 1963; K. Ch. TSOU, R. J. BARNETT u. A. M. SELIGMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4613 [1955]; J. K. HARDMAN u. Ch. YANOFSKY, *J. Biol. Chemistry* **240**, 725 [1965]; J. J. HOLBROOK, G. PFLIEDERER, J. SCHNETZER u. S. DIEMAIR, *Biochem. Z.* **344**, 1 [1966]; siehe auch l. c.<sup>11a</sup>.

<sup>3</sup> M. R. SOHLER et al., *J. Biol. Chemistry* **198**, 281 [1952]; vgl. auch R. E. BENESCH et al., *J. Biol. Chemistry* **216**, 663 [1955].

<sup>4</sup> T. INAGAMI, *J. Biol. Chemistry* **240**, 3453 [1965].

<sup>5</sup> R. L. HEINRIKSON, W. H. STEIN, A. M. CRESTFIELD u. St. MOORE, *J. Biol. Chemistry* **240**, 2921 [1965] und vorangehende Arbeiten.

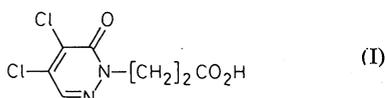
<sup>6</sup> a) G. GUIDOTTI u. W. KONIGSBERG, *J. Biol. Chemistry* **239**, 1474 [1964]; b) D. G. SMYTH, A. NAGAMATSU u. J. S. FRUTON, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 4600 [1960].

<sup>7</sup> K. DURY, *Angew. Chem.* **77**, 282 [1965].

Alkylierung von SH-Gruppen neben den anderen in Proteinen vorkommenden funktionellen Gruppen eignen.

### 1. Umsetzung mit verschiedenen nucleophilen Verbindungen

In einigen Vorversuchen wurde hierzu ein 5facher Überschuß von 4,5-Dichlor-1-[2-carboxy-äthyl]-pyridazon-(6) (I) in sodaalkalischer Lösung eine



halbe Stunde der Einwirkung der Thiole Cystein, 2-Mercapto-äthanol, Thioglykolsäure, Thiosalicylsäure, *p*- und *m*-Thiokresol und Thionalid sowie der — andere nucleophile Gruppen enthaltenden — Verbindungen Cystin, Methionin, Threonin, Serin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Leucin, Di- und Triäthylamin, Äthanolamin und *S*-Acetyl-thioglykolsäure ausgesetzt. Die bei den Reaktionen abgespaltenen Cl<sup>-</sup>-Ionen wurden dann potentiometrisch mit AgNO<sub>3</sub>-Lösung bestimmt. Es ergab sich eine sehr gute Spezifität von I für die Bildung gemischter Sulfide mit den benutzten Thiolen: in jeweils 5 Bestimmungen von ca. 15 µMol Thiol wurden 99,3 ± 0,8% als Cl<sup>-</sup> wiedergefunden, während mit je 200 µMol der nicht SH-haltigen Substanzen sowie beim 72stündigen Stehenlassen von I in der benutzten Natriumcarbonat-Lösung kein Cl<sup>-</sup> nachgewiesen werden konnte. Nur im Falle der *S*-Acetylthioglykolsäure traten, wohl infolge der einsetzenden Esterhydrolyse, 8,6% Cl<sup>-</sup> auf.

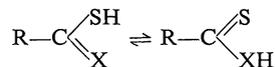
Bei einigen der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen, und zwar bei solchen, die teilweise oder vorwiegend als Thione vorliegen<sup>8</sup>, besteht dagegen der

Tab. 1. Zusammensetzung der bei der Reaktion mit I und Titration mit AgNO<sub>3</sub> entstehenden Niederschläge.

Verbindung	%AgCl-Gehalt i. Niederschlag	Verbindung	%AgCl-Gehalt i. Niederschlag
<i>p</i> -Thiokresol	98	Thiosemicarbazid	9
Thiosalicylsäure	95	2-Mercapto-benzthiazol	6
Thionalid	93	Thioharnstoff	6
Thioessigsäure	33	Thioacetamid	0
2-Thio-uracil	37		

<sup>8</sup> K. B. SANDELL, *Naturwissenschaften* **53**, 330 [1966] und dort zitierte ältere Literatur.

bei der Reaktion mit I und der folgenden Titration erhaltene Niederschlag *nur zu einem gewissen Teil* aus Silberchlorid: er löst sich teilweise in konz. Salpetersäure, und der Potentialverlauf bei der Titration entspricht nicht dem einer reinen Cl<sup>-</sup>-Titration. Ob die Reaktion mit I unter standardisierten Bedingungen demnach als Indikatorreaktion für die Lage des protonieren Gleichgewichtes



dienen kann, muß noch untersucht werden. Dieses Verhalten von I hebt sich jedenfalls deutlich von dem der 5,5'-Dithio-bis-[2-nitro-benzoesäure] ab, die mit allen diesen Verbindungen leicht reagiert<sup>9</sup>, und darf wohl als Zeichen erhöhter Selektivität von I gewertet werden.

### 2. Kinetik der Reaktion mit Cystein

Da somit eine Verwendung von I als SH-spezifisches Reagenz erwägenswert schien, wurde als nächstes die Reaktion von I mit Cystein durch Verfolgung ihrer Geschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert, von der Konzentration der Reaktanten und von der Temperatur untersucht (vgl. Tab. 2—4).

Tab. 2. Geschwindigkeitskonstante *k* der Reaktion von Cystein mit einem 5- bis 10fachen Überschuß an I bei 20<sup>0</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert ( $\mu$  = Ionenstärke).

pH-Wert	benutzter Puffer <sup>10</sup>	$\mu$	$k [l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Sec}^{-1}]$	$t_{1/2}$ [Min.] für $c_1 = 1 \text{ Mol/l}$
7,5	Triäthanolamin + HCl	0,07	0,19	3,66
8	Triäthanolamin + HCl + KCl	0,13	0,59	1,16
8,5	Triäthanolamin + HCl + KCl	0,12	0,99	0,70
8,5	Borsäure + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + KCl	0,58	1,05	0,66
9,0	Tris + HCl	0,09	1,47	0,56
9,5	Borsäure + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + KCl	0,8	2,78	0,25
10	Borsäure + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + KCl	0,99	4,67	0,15
10	Glycin + NaOH + NaCl	0,56	4,70	0,15

<sup>9</sup> G. L. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophysics* **74**, 443 [1958].

<sup>10</sup> J. STAUFF u. R. JAENICKE in H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Aufl., Bd. II, S. 37, Springer-Verlag, Berlin 1964.

Tab. 3. Prüfung der Ordnung der Reaktion von Cystein mit I bei 20° und pH 9 in Tris-Puffer<sup>10</sup> ( $\mu = 0,09$ ).

$10^3 c_I [\text{Mol/l}]$	25	20	15	12,5	7,5
$k [l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Sek.}^{-1}]$	1,40	1,38	1,49	1,49	1,40

Tab. 4. Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Reaktion von Cystein mit I bei pH 9 in Tris-Puffer<sup>10</sup> in Abhängigkeit von der Temperatur ( $\mu = 0,09$ ).

Temperatur	3°	20°	35°	} $\frac{d \lg k}{d(1/T)} = -2,2 \cdot 10^3$
$k [l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Sek.}^{-1}]$	0,52	1,47	4,1	

Aus der pH-Abhängigkeit (Tab. 2) und der Konzentrationsabhängigkeit (Tab. 3) der Reaktion zwischen I und Cystein ergibt sich das typische Bild einer  $S_N2$ -Reaktion mit dem Anion  $RS^\ominus$  als nucleophilem Agens, wie sie auch für die Reaktion von Cystein mit Jodacetat und Jodacetamid angenommen wird (vgl.<sup>11</sup>).

### 3. Reaktionsprodukte mit Mercaptanen

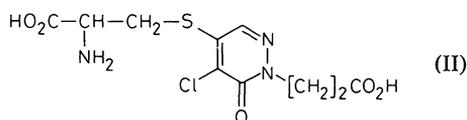
Als Reaktionsprodukte entstehen mit einfachen Mercaptanen durch Substitution des Chlor-Atoms in 4-Stellung (vgl. 1. c.<sup>7</sup>) entsprechende gemischte Sulfide, die im Falle von 2-Mercapto-äthanol, Thioglykolsäure u. a. isoliert wurden (vgl. Beschreibung der Versuche). Eine Weiterreaktion unter Ersatz des zweiten Chloratoms in 5-Stellung tritt bei den gewählten Bedingungen (sodaalkalische Lösung, Raumtemperatur, 3facher Überschuß an Thiol) nicht ein.

### 4. Reaktionsprodukte mit Cystein

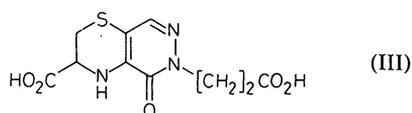
Im Falle des Cysteins wird allerdings das Auftreten zweier Reaktionsprodukte beobachtet: ein bei pH 9 bis zum Verschwinden der Nitroprussiat-Reaktion gehaltener Reaktionsansatz konnte durch Chromatographie an Kieselgel präparativ in zwei dünn-schichtchromatographisch einheitliche Fraktionen getrennt werden. Obwohl es uns nicht gelang, diese beiden bei der *schonenden* Umsetzung von Cystein mit I entstehenden Produkte in kristalliner Form darzustellen, konnten wir ein Hydrochlorid der mit größerem  $R_F$ -Wert wandernden Verbindung isolieren, dem wir auf Grund seiner Reaktion mit Ninhydrin und seines prozen-

<sup>11</sup> a) R. CECIL u. J. R. MCPHEE, *Advances Protein Chem.* **14**, 255 [1959]; b) H. LINDLEY, *Biochem. J.* **74**, 577 [1960]; ebenda **82**, 418 [1963]; c) K. WALLENFELS u. Chr. STREFFER, *Biochem. Z.* **346**, 119 [1966].

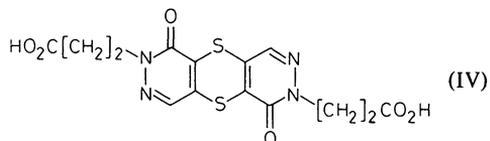
tualen Gehaltes an ionisierbarem und nicht ionisierbarem Chlor die Konstitution des normalen Cystein-S-alkyl-Derivates II zuschreiben. Das Auf-



treten einer zweiten Verbindung kann zwanglos durch die bekannte Tendenz des Cysteins zur Cyclisierung mit 1,2-bifunktionellen Reagenzien unter Bildung von Thiazanderivaten<sup>12</sup>, in unserem Falle von III, erklärt werden. Wird dagegen die



Reaktion von Cystein mit I in *heißem Pyridin* durchgeführt oder wird das Gemisch der obigen Reaktionsprodukte mit Alkohol gekocht, so wird durch  $\beta$ -Eliminierung von Dehydroalanin das auch aus I und Thioharnstoff erhältliche, orange-rote *Dithiinderivat* IV gebildet (vgl. auch 1. c.<sup>7</sup>). Bei



der in Natriumcarbonat-Lösung ausgeführten Reaktion bleibt die Bildung des Dithiinderivates, gemessen an der Extinktion bei 400 nm, selbst bei 24stündigem Stehenlassen jedoch mit Sicherheit unterhalb 3%.

Das Differenzspektrum eines Reaktionsansatzes von I mit Cystein gegen die Reaktanten zeigt ein Maximum bei 302 nm mit einem  $\Delta\epsilon$  von 4000.

### 5. Selektivität des Reagenzes

Verbindung I kann natürlich nur dann in Konkurrenz mit den bisher bekannten, alkylierenden Reagenzien treten, wenn neben ihrer ausgezeichneten

<sup>12</sup> Th. WIELAND et al. in HOUBEN-WEYL: *Meth. der organ. Chemie*, Bd. XI/2, S. 269, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958; R. KUHN u. H. BEINERT, *Chem. Ber.* **77**, 606 [1944]; S. S. HUSAIN u. G. LOWE, *Chem. Commun. Supersedes in part Proc. chem. Soc. [London]* **1965**, 345, 1. c.<sup>6b</sup>.

Tab. 5. Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Reaktion von Jodacetamid, Jodessigsäure, Acrylnitril und Verbindung I mit Cystein und anderen nucleophilen Verbindungen.

Verbindung	$10^3 k [l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Sec}^{-1}]$			Selektivität $S^+$			
	Jodacetamid	Jodacetat	Verb. I	Jodacetamid	Jodacetat	Acrylnitril	Verb. I
	pH 6,9; 30 <sup>0</sup> (l. c. <sup>14</sup> )			pH 9; 20 <sup>0</sup>			
Pyridin	17	38	< 0,005	31	< 58	—	> 300 000
Urotropin	180	540	< 0,005	3	< 4,1	—	> 300 000
Triäthylamin	—	—	0,017	—	—	—	> 86 000
Glycin	0,52	0,48	0,052	1030	< 4600	—	> 28 000
Arginin	—	1,2	—	—	< 1850	—	—
Lysin	—	—	0,11	—	—	—	> 13 400
Histidin	—	3,2	0,036	—	< 690	—	> 41 000
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	—	—	18,6	—	—	—	79
β-Alanin	—	—	—	—	—	280 <sup>++</sup>	—
Cystein	0,534 <sup>*</sup>	2,22 <sup>**</sup>	1,47 <sup>***</sup>	—	—	—	—

+ Vgl. Anmerkung unten.

++ l.c.<sup>13</sup>, bezogen auf β-Mercapto-propionsäure, gemessen bei pH 8,1 und 30°;

\* l.c.<sup>16</sup>, gemessen bei pH 7 und 30°;

\*\* l.c.<sup>15</sup>, gemessen bei pH 7 und 37°;

\*\*\* gemessen bei pH 9 und 20°.

neten Hydrolysebeständigkeit auch ihre Spezifität gleich groß oder größer als die der bisher benutzten Verbindungen ist. Ein Maß für diese Spezifität ist das Verhältnis  $S$  der Geschwindigkeiten der Reaktion mit der SH-Gruppe des Cysteins zu der der Reaktion mit anderen nucleophilen Gruppen:

$$S = \frac{k_{\text{Cystein}}}{k_{\text{Nucleophil}}}$$

Wir haben daher die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen I und verschiedenen Aminen gemessen. Die daraus berechneten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Spezifitätsverhältnisse  $S$  sind zusammen mit einigen der Literatur entnommenen Werten für entsprechende Reaktionen von Jodessigsäure, Jodacetamid und Acrylnitril (das FRIEDMAN et al. als Modell für *N*-Äthylmaleinsäureimid benutzten<sup>13</sup>) in Tab. 5 aufgeführt. Die in Tab. 5 genannten Werte für  $S^+$  lassen die er-

<sup>13</sup> M. FRIEDMAN, J. F. CAVINS u. J. S. WALL, J. Amer. chem. Soc. **87**, 3672 [1965].

+ Die angegebenen Werte für  $S$  stellen im Falle von Jodacetat nur Maximalwerte dar, da die Werte in l. c.<sup>11</sup> bei 37<sup>0</sup> gemessen wurden. Eine Angleichung des pH-Wertes auf den bei den Reaktionen mit I benutzten Wert 9 würde ferner das Verhältnis der  $S$ -Werte noch weiter zugunsten von I verschieben: vgl. die von ZAHN und TRAUMANN<sup>17</sup> beobachtete Zurückdrängung der Reaktivität der Amino- gegenüber der der SH-Gruppe mit fallendem pH-Wert bei der Reaktion von Cystein

hebt größere Spezifität von I für die Umsetzung von SH-Gruppen erkennen.

Wir schlagen daher auf Grund dieser größeren Spezifität, der sehr guten Hydrolysebeständigkeit und der guten Wasserlöslichkeit die Benutzung der Verbindung I als spezifisches Alkylierungsmittel für SH-Gruppen in Proteinen vor. Ob sich die in die Verbindung gesetzten Erwartungen hinsichtlich des weitgehenden Ausschlusses von Nebenreaktionen erfüllen, bleibt natürlich weiteren Versuchen an Enzymen mit und ohne essentielle SH-Gruppen vorbehalten.

Die BADISCHE ANILIN- & SODA-FABRIK AG (Ludwigshafen am Rhein) unterstützte diese Arbeit durch die Überlassung von 4.5-Dichlor-1-[2-carboxy-äthyl]-pyridazon-(6) und 4.5-Dichlor-1-phenyl-pyridazon-(6), der VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, Düsseldorf, durch Chemikalienspenden und die PERMUTIT AG, Berlin, durch Überlassung einer Probe Permutit RS.

Frau L. RICHTER und Frl. Chr. DOROW möchte ich für ihre sorgfältige und eifrige Mitarbeit danken.

mit 1-Fluor-2.4-dinitro-benzol. Weiterhin wurden die Werte für die Reaktion von I mit Aminen aus der nach 72 Stdn. beobachteten Cl<sup>-</sup>-Bildung berechnet; da aber diese Reaktionen deutlich autokatalytisch beschleunigt sind, liegen die wahren  $S$ -Werte für I höher.

<sup>14</sup> M. SCHUBERT, J. biol. Chemistry **116**, 437 [1936].

<sup>15</sup> U. HAGEN, Arzneimittel-Forsch. **6**, 384 [1956].

<sup>16</sup> Chr. STREFFER, Dissertation, Freiburg 1962.

<sup>17</sup> H. ZAHN u. K. TRAUMANN, Z. Naturforsch. **9b**, 518 [1954].

## Beschreibung der Versuche

Die *Schmelzpunkte* wurden mit einem Apparat nach Dr. TORTOLI der Firma Büchi, Schweiz, bestimmt und sind unkorrigiert. Die *Cl-* und *S-Analysen* wurden im Halbmikromaßstab nach Aufschluß mit  $\text{Na}_2\text{O}_2$  ausgeführt, S wurde gravimetrisch als  $\text{BaSO}_4$  bestimmt. Die *UV-Spektren* wurden mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer M4QIII der Firma C. Zeiss, Oberkochen, aufgenommen. Zur *Dünnschichtchromatographie* wurde Kieselgel GF<sub>254</sub> der Firma E. Merck, Darmstadt, in folgenden Lösungsmittelsystemen benutzt: a) Chloroform (stabilisiert mit 0,5% Äthanol)/Äthylacetat/Ameisensäure 10:4:1; b) Äthylacetat/Methanol/Methylenchlorid/Eisessig 100:50:50:1; c) Äthylacetat/Methylenchlorid 1:1; d) n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1. Die beschichteten Platten wurden  $\frac{1}{2}$  Std. an der Luft und  $\frac{1}{2}$  Std. bei ca. 110° getrocknet. Sie wurden über Calciumchlorid im Exsikkator aufbewahrt und mit Kammersättigung nach RANDERATH<sup>18</sup> entwickelt.

Die kinetischen Untersuchungen erfolgten zur Vermeidung einer Oxydation des Cysteins unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre. Die Temperatur hielt man durch Einhängen in einen Ultrathermostaten der Firma Dr. R. Wobser, Lauda, konstant, die Lösungen wurden vor dem Vereinigen vortemperiert. Der pH-Wert der Lösungen wurde vor und nach der Reaktion mit der Glaselektrode kontrolliert.

### 1. Analytische Reaktionsansätze

a) *Umsetzung verschiedener Verbindungen mit I und Titration des entstandenen Chlorids*: 0,2 mMol der nucleophilen Verbindung wurden mit einer Lösung von 1 mMol I in 5 ml 10proz. Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Die Mischung wurde nach  $\frac{1}{2}$ stgd. Rühren bei Raumtemperatur mit 30proz. Schwefelsäure angesäuert und mit 0,05–0,01N  $\text{AgNO}_3$ -Lösung potentiometrisch unter Benutzung einer Ag- und einer Thalamid-Elektrode (Schott & Gen., Mainz) titriert. Wasserunlösliche Verbindungen wurden vorher in 3 ml Dimethylformamid gelöst.

b) *Untersuchung der erhaltenen Niederschläge*: Ein Teil des bei der Titration erhaltenen Niederschlages wurde auf Löslichkeit in Ammoniak sowie in Salpetersäure geprüft. Der Rest wurde abfiltriert, mit Wasser säurefrei und zweimal mit Aceton gewaschen und 1 Std. bei 120° getrocknet. Ein Teil dieses Produktes wurde gegebenenfalls mit Na aufgeschlossen und die Lösung auf Sulfid geprüft, der Rest gewogen und mit konz. Salpetersäure gekocht. Nach dem Verdünnen mit einem gleichen Volumen Wasser wurde der unlösliche Teil abfiltriert, gewaschen,  $\frac{1}{2}$  Std. auf ca. 390° erhitzt und gewogen. Die so erhaltenen Werte für den  $\text{AgCl}$ -Gehalt

der Niederschläge (vgl. Tab. 1) schwankten in Doppelbestimmungen um  $\pm 3\%$ .

c) *Messung der Reaktionsgeschwindigkeit k von I mit Cystein*: Der Reaktionsansatz bestand aus 1 ml 0,01M Cysteinlösung + 1 ml 0,1M Lösung der Verb. I + 2 ml Pufferlösung. Die 0,01M Cysteinlösung wurde kurz vor der Messung durch Mischen von 0,5 ml einer 0,4M-Lösung von Cystein-hydrochlorid mit 0,4 ml 1N NaOH und Auffüllen auf 20 ml hergestellt, die Lösung von I durch Aufnehmen von I in Pufferlösung. Die Pufferlösungen wurden in Anlehnung an die l.c.<sup>10</sup> gemachten Angaben hergestellt. Ihre Molarität wurde allerdings zur Erzielung guter pH-Konstanz vergrößert. Die Abweichung des pH-Wertes der Reaktionslösungen vom Anfangswert nach 80- bis 100proz. Umsatz betrug maximal 0,1. Die jeweils vorhandene Cysteinmenge in Proben von 0,2 ml wurde zu verschiedenen Zeiten nach LYNEN<sup>19</sup> mit Natriumnitroprussiat bestimmt. Die Werte der Tab. 3 wurden durch Verwendung von 1 ml einer entsprechend geringer konzentrierten I-Lösung im obigen Reaktionsansatz erhalten. Die durch Auftragen von  $\lg(c_0 - x)$  bzw. von  $\lg(c_0^A - x)/(c_0^B - x)$  gegen t erhaltenen Kurven stellten bis zu einem Umsatz von 60–80% Geraden dar, deren Steigung nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt wurde<sup>20</sup>.

d) *Messung der Reaktionsgeschwindigkeit k von I mit Natriumsulfit und mit Amin*: Der Reaktionsansatz bestand aus 5 ml einer 0,2M-Lösung von I in einem 0,6M Borsäure- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer von pH 9 und aus 5 ml einer 0,2M Amin-Lösung in Puffer. Zu verschiedenen Zeiten wurden dem bei Raumtemperatur (23–24°) aufbewahrten Ansatz Proben von 2 ml entnommen und das entstandene  $\text{Cl}^-$  potentiometrisch bestimmt. Im Falle der Reaktion mit  $\text{SO}_3^{2-}$  wurde I in 2M  $\text{Tris-HNO}_3$ -Puffer von pH 9 aufgenommen, die 0,2M  $\text{SO}_3^{2-}$ -Lösung wurde mit einer entsprechenden Einwaage von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  hergestellt.

e) *Differenzspektrum der Reaktionslösung von I mit Cystein*: Eine 0,173M-Lösung von Cystein in 5proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 0,212M Lösung von I in 5proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt. Das 2 Stdn. bei 23° aufbewahrte Gemisch wurde dann — wie auch die Einzellösungen — 1:2500 verdünnt und in zwei im Meßstrahlengang befindliche 1-cm-Küvetten gefüllt. Zwei im Vergleichsstrahlengang befindliche 1-cm-Küvetten wurden jeweils mit den beiden verdünnten Einzellösungen gefüllt.

f) *Einwirkung von 2-Mercapto-äthanol auf 5-Chlor-4-[2-hydroxy-äthylmercapto]-1-[2-carboxy-äthyl]-pyridazon-(6)*: 36  $\mu\text{Mol}$  des Dicyclohexylammoniumsalzes der genannten Verbindung wurden mit 50 mg Natriumcarbonat und 2 ml einer 0,036M wäbr. 2-Mercapto-äthanol-Lösung bei Raumtemperatur versetzt und nach

<sup>19</sup> F. LYNEN, Liebigs Ann. Chem. 574, 33 [1951].

<sup>20</sup> A. LINDER, Statistische Methoden, Birkhäuser-Verlag, Basel 1964.

<sup>18</sup> K. RANDERATH, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1965.

Tab. 7. 5-Chlor-4-alkylmercapto-1-[2-carboxy-äthyl]-pyridazone-(6).

Ausgangs-thiol	Alkylrest	Summenformel [Mol.-Gew.]	Cl-Analyse	Schmp.	Meth. Ausbeute [%d.Th.]	R <sub>F</sub> -Wert
2-Mercapto-äthanol	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> OH	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S · C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N* (460,08)	Ber. 7,71 Gef. 7,6	180—180,50 <sup>+</sup> (Nadeln)	A	46 0,13 (a) 0,50 (b)
Thioglykol-säure	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S (292,71) C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S · 2C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N** (654,35)	Ber. 12,11 Gef. 11,6 Ber. 5,42 Gef. 5,0	166 <sup>0</sup> (Äthanol) 179,5—180,50 <sup>++</sup> (Nadeln)	C, B	40 0,14 (a)

Tab. 8. 5-Chlor-4-alkyl(bzw. aryl)mercapto-1-phenyl-pyridazone-(6).

Ausgangs-thiol	Alkylrest	Summenformel [Mol.-Gew.]	Cl-Analyse	Schmp.	Meth. Ausbeute [%d.Th.]	R <sub>F</sub> -Wert
2-Mercapto-äthanol	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> OH	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S (282,76)	Ber. 12,54 Gef. 12,0	104—105 <sup>0</sup> (Prismen; Äthanol)	A	71 0,38 (c)
Thioglykol-säure	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S · C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N* (478,06)	Ber. 7,42 Gef. 6,9	194—194,5 <sup>0</sup> (Nadeln)	A, B	0,42 (a) 0,34 (b)
<i>p</i> -Thiokresol	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> OS (328,83)	Ber. 10,78 Gef. 10,8	145—146 <sup>0</sup> (gelbe Nadeln; Äthanol)	A	89 0,71 (c)
Thionalid	-CH <sub>2</sub> CO-β-naphthylamid	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S (421,91)	Ber. 8,40 Gef. 7,9	224—225 <sup>0</sup> (Dioxan)	A	91

\* Dicyclohexylammoniumsalz \*\* Bis-[dicyclohexylammonium]-Salz

+ Misch-Schmp. mit dem Dicyclohexylammoniumsalz von I [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N, Schmp. 173,5—174,0<sup>0</sup> (Nadeln), Ber. Cl 16,95 Gef. 16,9]: 165—169<sup>0</sup>.++ Misch-Schmp. mit I-Dicyclohexylammoniumsalz: 161—163<sup>0</sup>.

20 Min. auf 10 ml aufgefüllt. 0,02 ml dieser Lösung sowie 0,02 ml einer gleich verdünnten Probe der 2-Mercapto-äthanol-Lösung wurden dann mit *p*-Chlormercuri-benzoat nach i.c.<sup>1</sup> titriert. Der so in 3 Bestimmungen ermittelte SH-Gehalt des Versuchsansatzes lag um 0,5 ± 2% über dem des Kontrollwertes. Der restliche Versuchsansatz wurde mit Schwefelsäure angesäuert, mit etwas FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> versetzt und 3 Min. gekocht. In der abgekühlten Lösung wurde potentiometrisch Cl<sup>⊖</sup> bestimmt. Gleichbehandelte Kontrollansätze ohne 2-Mercapto-äthanol-Zusatz ergaben einen Blindwert von 15,2 ± 1,2% an Cl<sup>⊖</sup> (Zers. des Sulfides durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), in den Versuchsansätzen wurde 19 ± 3% an Cl<sup>⊖</sup> gefunden.

## 2. Präparative Reaktionsansätze

a) 5-Chlor-4-alkyl (bzw. aryl) mercapto-pyridazone-(6): Die in Tab. 7 und 8 aufgeführten Verbindungen wurden folgendermaßen erhalten:

*Methode A:* 1 mMol 4,5-Dichlor-pyridazon-(6) und 1 mMol Thiol wurden in 5 ml Dimethylformamid gelöst

und mit 0,2 ml Triäthylamin versetzt. Nach 1/4stdg. Stehenlassen wird mit 2N HCl verdünnt und mit Methylchlorid nochmals ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde, falls in Tab. 7 nicht anders angegeben, in 96proz. Äthanol aufgenommen und die erhaltene Lösung nach eventuellem Zusatz von Dicyclohexylamin vorsichtig mit Äther und Petroläther versetzt.

*Methode B:* analog unter Ersatz des Dimethylformamids durch 10 ml Acetonitril, Reaktionszeit: 1/2 Stde.

*Methode C:* analog unter Ersatz des Dimethylformamids durch 15proz. Natriumcarbonat-Lösung, Reaktionszeit 1/2 Stde.

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf analysenreine Verbindungen.

b) *Umsetzung von I mit Cystein:* 5 mMol L-Cysteinhydrochlorid · H<sub>2</sub>O wurden in N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 20 ml Wasser, 7,5 mMol I und 24 mMol Triäthylamin versetzt. Nach 1/2stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 10proz. HCl auf pH 3—4

gebracht, gefriergetrocknet und aus dem Rückstand Triäthylammoniumchlorid und überschüssiges I durch Digerieren mit 3mal 30 ml Chloroform herausgelöst. Der unlösliche Rest wurde in 20 ml Äthanol gelöst, die Lösung mit 150 ml Diäthyläther versetzt und mehrere Stunden bei  $-30^{\circ}$  aufbewahrt, worauf sich ein öliger Niederschlag abschied. Dieser wurde in 5 ml Äthanol gelöst, die Lösung mit 15 ml Äthylacetat verdünnt und vorsichtig mit Diäthyläther bis zur gerade wahrnehmbaren Trübung versetzt. Nach 3tägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur hatten sich Kristalle abgesetzt (0,8 g), die in wenig Äthanol gelöst und durch Versetzen der Lösung mit Äthylacetat wieder ausgefällt wurden. Das Produkt gab keine Reaktion mit Natriumnitroprussiat, war aber ninhydrinpositiv und zeigte im System d dünnstschichtchromatographisch zwei Flecken von  $R_F$  0,12 und 0,36. Der Schmp. lag bei ca.  $174^{\circ}$ ;  $\lambda_{\max}$  296 nm (pH 3) bzw. 300 nm (pH 10).  $\text{Cl}^{\ominus}$  wurde durch Filtrieren einer in Wasser gelösten Probe über Permutit RS ( $\text{H}^{\oplus}$ ) und Titration des Eluats, das organisch gebundene Cl nach Eluieren des Harzes mit 5proz. Ammoniak, Eindampfen des Eluates und 7tägigem Erhitzen mit 20proz. NaOH auf  $60^{\circ}$  bestimmt:

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  Ber.  $\text{Cl}_{\text{ges.}}$  19,8  $\text{Cl}^{\ominus}$  9,9  $\text{Cl}_{\text{org.}}$  9,9  
(358,22) Gef.  $\text{Cl}_{\text{ges.}}$  17,4  $\text{Cl}^{\ominus}$  8,4  $\text{Cl}_{\text{org.}}$  6,6

Durch Chromatographieren von 10 mg des beim Gefrier-trocknen erhaltenen Rückstandes an einer Kieselgelsäule (30 cm  $\times$  12 mm Durchmesser, 2 Stdn.

auf  $120^{\circ}$  erhitztes Kieselgel der Firma Riedel de Haen, Seelze) mit dem gut entgasten Lösungsmittelsystem d ließen sich durch Auffangen der Fraktionen 42–72 ml und 100–180 ml zwei dünnstschichtchromatographisch einheitliche, ninhydrinpositive, die oben genannten  $R_F$ -Werte aufweisende, amorphe Verbindungen isolieren.  $\lambda_{\max}$  296 (Verbindung mit  $R_F$  0,36) und  $\lambda_{\max}$  305 (Verbindung mit  $R_F$  0,12).

c) 2.7-Bis- $[\beta$ -carboxy-äthyl]-dipyridazo[4.5-b:4'.5'-e]1.4-dithiin-dion-(1.6) (IV):

*Methode A:* 20 mMol I wurden mit 20 mMol Thioharnstoff in 10 ml absol. Pyridin 2 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Der beim Abkühlen und 1stdg. Stehenlassen der Lösung bei  $4^{\circ}$  ausfallende Niederschlag wurde abgesaugt, mit 2N HCl gewaschen, im Exsikkator getrocknet und aus wenig Dimethylformamid umkristallisiert (orangerote Kristalle), Ausb.: 3,4 g (8,6 mMol), entspr. 86% d. Th.

*Methode B:* analog Methode A unter Ersatz des Thioharnstoffs durch 20 mMol L-Cystein-hydrochlorid. Ausb.: 2,1 g (5,3 mMol), entspr. 53% d. Th. Orangerote Nadeln; Schmp.  $274,5$ – $275,5^{\circ}$ ;  $\lambda_{\max}$  314 nm,  $\epsilon = 14670$  (in 5proz. Natriumcarbonat-Lösung).

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$  (396,42) Ber. S 16,18, Gef. S 15,3

Durch Titration mit 0,05N NaOH in 50proz. Dimethylformamid gefundenes Äquivalentgewicht: 201.