

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Herrn Priv. Doz. Dr. EDMUND BÄUERLEIN im Max-Planck-
Institut für medizinische Forschung, Abteilung Natur-
stoffchemie (Prof. Th. Wieland) in Heidelberg in der
Zeit von Mai 1974 bis Oktober 1974 durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

E I N L E I T U N G

Es gibt eine verwirrende Vielzahl von publizierten Methoden zum Nachweis von -SH und -SS-Gruppen in biol. Geweben, wahrscheinlich mehr als für irgendeinen anderen biochem. Nachweis. Natürlich spiegelt dies das große biologische Interesse an diesen Gruppen wieder, aber es macht es auch schwierig, die verschiedenen Ergebnisse zu interpretieren. Neuere Monographien (Jocelyn, P.C., 1972 und Friedman, M., 1973) versuchen Ordnung in diese Fülle von Erfahrung zu bringen.

Welche Methoden auch benutzt werden, die Nachweise für totale SH/SS-Gruppen in Gewebe-Extrakten sind bis jetzt mehr informativ auch wenn sie Thiol- und Disulfidgruppen unterscheiden können.

Das Studium speziell ausgewählter Reviews (Rothstein, A., 1970; Lennan, D.H.M., 1970; Bäuerlein, E., 1972; Boyer, P.D., 1971; Sabadie-Pialoux, N. und Gautheron, D., 1971; Baltscheffsky, H. und M., 1974; Follmann, H., 1974; Heitmann, P., 1968) gestattet folgendes Bild der Anforderungen an ein Nachweisreagens für zelluläre und subzelluläre SH-Gruppen aufzuzeichnen:

Das Reagens muß zunächst einmal SH-spezifisch reagieren - wobei eine Selektivität hinsichtlich bestimmter SH-Gruppen erwünscht ist. Es darf keine Variation der SH-Gruppen aufgrund von Disulfidspaltung und Oxydation/Reduktion von SH-Gruppen auftreten, wozu schonende Reaktionsbedingungen und entsprechendes Verhalten von Reagentien gehören.

Das Reagens muß unter schonenden Bedingungen (ideal: physiologisch) reaktiv genug sein, um schnell (kurze Reaktionszeit) auch instabile Protein-SH-Gruppen abfangen zu können - das heißt nicht nur die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ist entscheidend, sondern auch ein schneller Endpunkt der Reaktion auf der gewünschten Seite (qualitative und quantitative Umsetzung).

Je nach Anforderung (Isolierung eines SH-Proteins, Suchen einer SH-Funktion) muß das Reagens entweder reversible oder irreversible Bindungen eingehen. Auch geringste Spuren von SH-Gruppen-Proteinen müssen nachweisbar sein (hohe Sensibilität).

Die verschiedenen Umgebungen der SH-Gruppen, die einen eingebettet in lipophile Bereiche, die anderen in hydrophiler Umgebung machen eine Variation der SH-Agentien notwendig - mehr lipophile Reagentien dringen leichter in lipophile Bereiche vor (hydrophobe Wechselwirkungen u.ä.) und so sind sonst nicht erreichbare SH-Gruppen nachzuweisen (vor allem in nativen Zellen und ihren Untereinheiten). Wichtig ist hier das Lösungsvermögen der Reagentien sowohl in lipophiler wie auch hydrophiler Umgebung (→Transport). Man kann sich leicht vorstellen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von Substraten davon abhängt, wie sie zum aktiven Zentrum gelangen können, sicherlich wird dieser Vorgang auch von Substratgröße und -Struktur mitbestimmt (→Dissoziation von Untereinheiten von Enzymen infolge sterischer Effekte durch S-Substituenten: SH-Agentien). Einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben sicherlich auch hydrophobe Bindungen (evtl. hydrophoben Charakter der SH-Gruppe selbst in Betracht ziehend).

Wichtig ist nun, daß Sulfensäurederivate (wie Sulfenyljodid) in lipophiler Umgebung annähernd stabil sind und hier auch mit entsprechenden Agentien nachgewiesen werden können - entweder direkt, falls sie vorkommen sollten, oder nach ihrer Darstellung aus Thiolen - zum indirekten Nachweis jener.

Zur Untersuchung der nativen Zelle oder ihrer Untereinheiten sind Reagentien notwendig, die entweder nicht durch die Membran dringen und somit -SH im Außenbereich anzeigen oder aber Reagentien, die die Membran durchdringen und für Untersuchungen im Innenraum in Frage kommen (einmal mit, einmal ohne Membraneffekt - um so einen Durchleitungsmechanismus ablesen zu können).

Für Untersuchungen im Innern der Zelle (nativ) oder ihrer Untereinheiten ist nun ebenfalls wichtig zu wissen, daß die Spezifität einzelner isolierter Enzymsysteme nicht auch im größeren Verband angetroffen werden muß - was die Untersuchungen

erschwert! Von entscheidender Bedeutung dürfte hier Konformation und die Struktur der Umgebung sein.

Eine Hemmung (oder Aktivierung) einer Funktion aufgrund der Behandlung mit SH-Agens muß nicht auf dem chemischen Abfangen einer SH-Gruppe beruhen - auch eine Konformationsänderung kann die Ursache sein. Mit Hilfe spezieller (gezielter) Konformationsänderung (durch die Struktur eines Agenses; durch Licht induziert) kann eine Änderung des spezifischen Verhaltens hervorgerufen werden. Kein Effekt durch ein SH-Agens bedeutet nun nicht, daß keine SH-Gruppe vorhanden ist - unter Konformationserhalt kann eine SH-Gruppe verdrängt worden sein (allerdings recht unwahrscheinlich).

Das gerade Dargebrachte macht klar, daß die Wirkung von SH-Agentien nur richtig interpretiert werden kann, wenn die Struktur (Konformation) der zu untersuchenden Teilchen genau bekannt ist.

Auch wenn ein SH-Reagens allen Anforderungen genügt, heißt das noch lange nicht, daß es auch für den Nachweis zu gebrauchen ist. Der Umsetzungsgrad oder eine funktionelle Störung muß mit einer einfachen und raschen analytischen Methode bestimmbar sein (Colorimetrisch, UV, IR, gekoppelte Enzym. Reaktion, Tracer-Atome usw.).

Diese Arbeit geht aus von den Ergebnissen Merz, H. et al. (1965), Holbrook, J. J. et al. (1966), Heitz, J. R. et al. (1968), Anderson, B. M. et al. (1970), mit radioaktiv markiertem N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid an Cystein (Merz) bzw. essentiellen SH-Gruppen der Lactatdehydrogenase und Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (Holbrook) sowie mit N-Alkylmaleimiden an Hefe-Alkohol-Dehydrogenase (Heitz) bzw. Pepsin (Anderson).

Das Ziel dieser Arbeit ist zunächst die Darstellung von N(N-Alkyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimiden wachsender Alkylkettenlänge (d.h. wachsender Lipophilie). Die Synthese soll möglichst einfach vom Ausgangsprodukt zum Endprodukt erfolgen, so daß eine schnelle und einfache Darstellung der radioaktiv markierten Substanz analog erfolgen kann.

Der zweite Teil dieser Arbeit umfaßt die Darstellung

Monosubstituierter N-Alkyl-Thioharnstoffe und 6-Alkyl-2-Thio-
uracils, d.h. Sulfensäurereagentien wachsender Lipophilie.
Es soll hier die Tatsache relativ stabiler Sulfensäurederivate
(wie Sulfenyljodid) in gewissen Proteinen (s. Allgemeiner Teil),
in Fortsetzung der Arbeit von Cunningham, L.W. (1964), genutzt
werden für einen direkten Nachweis von Sulfensäurederivaten
oder den indirekten Nachweis von Thiol-Gruppen. Auch diese
Reagenzien sollen in Hinblick auf eine radioaktive Markierung
möglichst einfach aus einem geeigneten Ausgangsprodukt synthe-
tisiert werden.

Den Abschluß bildet eine systematische Untersuchung mit den
Sulfensäureagentien an β -Lactoglobulin. Es soll hier die größere
Reaktivität lipophiler Reagentien an SH-Gruppen in lipophiler
Umgebung bewiesen werden, denn dieser Aspekt wurde bisher in
allen Arbeiten mit SH-Reagenzien vernachlässigt.

Monosubstituierter N-Alkyl-Thioharnstoffe und 6-Alkyl-2-Thio-
uracils, d.h. Sulfensäurereagentien wachsender Lipophilie.
Es soll hier die Tatsache relativ stabiler Sulfensäurederivate
(wie Sulfenyljodid) in gewissen Proteinen (s. Allgemeiner Teil),
in Fortsetzung der Arbeit von Cunningham, L.W. (1964), genutzt
werden für einen direkten Nachweis von Sulfensäurederivaten
oder den indirekten Nachweis von Thiol-Gruppen. Auch diese
Reagenzien sollen in Hinblick auf eine radioaktive Markierung
möglichst einfach aus einem geeigneten Ausgangsprodukt synthe-
tisiert werden.

Den Abschluß bildet eine systematische Untersuchung mit den
Sulfensäureagentien an β -Lactoglobulin. Es soll hier die größere
Reaktivität lipophiler Reagentien an SH-Gruppen in lipophiler
Umgebung bewiesen werden, denn dieser Aspekt wurde bisher in
allen Arbeiten mit SH-Reagenzien vernachlässigt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. ALLGEMEINER TEIL

	Seite
A. Ergebnisse bisheriger Arbeiten mit Maleimiden	1
1. mit N(N-Acetyl-4-sulfamoyl)-maleimid	1
2. mit N-Alkylmaleimiden wachsender Kettenlänge	2
3. in Folge erwartet mit N(N-Alkyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimiden	4
B. Ergebnis der Arbeiten mit Thioharnstoffen und Thiouracils	5
1. Stabile Sulfenyljodide	5
2. β -Lactoglobulin	5
3. Bisherige Arbeiten mit Sulfenylagentien an β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid	7
4. Eigene Versuche mit Sulfenylagentien an β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid	10

II. SYNTHESE DER LIPOPHILEN THIOL- UND SULFENSÄUREAGENTIEN

A. Synthese der $N^4(N^1\text{-Alkyl-sulfamoylphenyl})\text{-maleimide}$	17
1. Gesamtsyntheseweg	17
2. Synthese der $N^4\text{-Acetyl-}N^1\text{-Alkylsulfanilamide}$	18
3. Verseifung der $N^4\text{-Acetyl-}N^1\text{-Alkylsulfanilamide}$	19
4. Darstellung der Maleinsäuremonoamide	19
5. Cyclisierung der Maleinsäuremonoamide	21
a. Dehydration, Versuche und Ergebnisse	21
b. Dehydration, Reaktionsmechanismen	23
c. Diskussion zur Cyclisierung mit Na-acetat/ Essigsäure, Reaktionsmechanismen	27
d. Ergebnisse unserer Maleinsäuremonoamid- Cyclisierung mit Na-acetat/Essigsäure	29

6.NMR, IR und MS-Spektren zu den dargestellten Maleimiden	32
a.N(4-sulfamoylphenyl)-maleimid	32
b.N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	33
c.N(N-Methyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	34
d.N(N-Acetyl-N-Methyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	35
e.N(N-Dimethyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	36
f.N(N-Isopropyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	37
g.N(N-n-Propyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid	37
B.Synthese der monosubstituierten Thioharnstoffe	38
C.Synthese der 6-Alkyl-2-Thiouracile	38
a.NMR-Spektren der Thioharnstoffe	41
b.NMR-Spektren der Thiouracile	42

III.EXPERIMENTELLER TEIL

A.Allgemeine Hilfsmittel	44
1.Dünnschichtchromatographie	44
2.Ausgangsmaterialien, die nicht selbst hergestellt wurden	45
3.Lösungsmittel	45
B.Synthesen	46
1.Darstellung der N ⁴ -Acetyl-N ¹ -Alkylsulfanilamide	46
a. -N ¹ -Methyl-	46
b. -N ¹ -Dimethyl-	46
c. -N ¹ -Isopropyl-	46
d. -N ¹ -n-Propyl-	46
e. -N ¹ -n-Pentyl-	47
f. -N ¹ -n-Heptyl-	47
g. -N ¹ -n-Nonyl-	47
2.Darstellung der N ¹ -Alkylsulfanilamide	47
a.N ¹ -Methyl-	47
b.N ¹ -n-Pentyl-	47
3.Darstellung der N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -Alkylsulfanilamide	48
a.Maleoylsulfanilamid	48

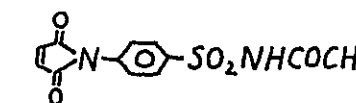
1. Darstellung der N⁴-Maleoyl-N¹-Alkylsulfanilamide
 a. N⁴-Maleoyl-N¹-Methylsulfanilamid
 b. N⁴-Maleoyl-N¹-Dimethylsulfanilamid
 c. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Propylsulfanilamid
 d. N⁴-Maleoyl-N¹-Isopropylsulfanilamid
 e. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Pentylsulfanilamid
 f. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Heptylsulfanilamid
 g. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Nonylsulfanilamid
 2. Cyclisierung der N⁴-Maleoyl-N¹-Alkylsulfanilamide
 a. N(4-Sulfamoylphenyl)-maleimid
 b. N(N-Acetyl-4-Sulfamoylphenyl)-maleimid
 3. Darstellung der monosubstituierten Thioharnstoffe
 a. Tert. Butyl-Isothiocyanat
 b. 1-n-Propyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff
 c. 1-n-Pentyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff
 d. 1-n-Heptyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff
 e. 1-n-Nonyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff
 f. 1-n-Propyl-Thioharnstoff
 4. Darstellung der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile
 a. n-Caproylacetessigester
 b. n-Caprylacetessigester
 c. n-Caprinacetessigester
 d. n-Caproylessigester
 e. n-Caprylessigester
 f. n-Capriinessigester
 g. 6-n-Pentyl-2-Thiouracil
 h. 6-n-Heptyl-2-Thiouracil
 i. 6-n-Nonyl-2-Thiouracil
 5. Kinetik
 a. β -Lactoglobulin-Lösung
 b. Titration der β -Lactoglobulin-Lösung
 c. Herstellen des β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid
 d. Herstellen der Thioharnstoff- und Thiouracil-Lösungen
 e. Abfangreaktionen

	Seite
b. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -Methylsulfanilamid	48
c. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -Dimethylsulfanilamid	48
d. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -n-Propylsulfanilamid	48
e. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -Isopropylsulfanilamid	49
f. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -n-Pentylsulfanilamid	49
g. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -n-Heptylsulfanilamid	49
h. N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -n-Nonylsulfanilamid	49
4. Cyclisierung der N ⁴ -Maleoyl-N ¹ -Alkylsulfanilamide	50
a. N(4-Sulfamoylphenyl)-maleimid	50
b. N(N-Acetyl-4-Sulfamoylphenyl)-maleimid	50
5. Darstellung der monosubstituierten Thioharnstoffe	51
a. Tert. Butyl-Isothiocyanat	51
b. 1-n-Propyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff	52
c. 1-n-Pentyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff	52
d. 1-n-Heptyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff	52
e. 1-n-Nonyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff	52
f. 1-n-Propyl-Thioharnstoff	52
6. Darstellung der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile	53
a. n-Caproylacetessigester	53
b. n-Caprylacetessigester	53
c. n-Caprinacetessigester	53
d. n-Caproylessigester	54
e. n-Caprylessigester	54
f. n-Capriinessigester	54
g. 6-n-Pentyl-2-Thiouracil	54
h. 6-n-Heptyl-2-Thiouracil	55
i. 6-n-Nonyl-2-Thiouracil	55
7. Kinetik	55
a. β -Lactoglobulin-Lösung	55
b. Titration der β -Lactoglobulin-Lösung	55
c. Herstellen des β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid	56
d. Herstellen der Thioharnstoff- und Thiouracil-Lösungen	56
e. Abfangreaktionen	56

I. ALLGEMEINER TEIL

A. Ergebnisse bisheriger Arbeiten mit Maleimiden (SH-Reagentien)

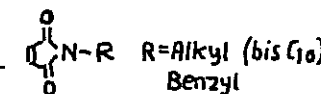
1. mit N(N-Acetyl-4-sulfamoyl)-maleimid



Merz, H. et al (1965) synthetisierten unter anderem, zur Markierung von SH-Gruppen in Proteinen, die nachträglich enzymatisch zerlegt und in der Umgebung der Cysteinreste untersucht werden sollten, N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid. Die Substanz ist als Na-Salz (säurer Imidostickstoff) in Wasser mit neutraler Reaktion löslich. Die wäßrige Lösung reagiert bei pH6 rasch und quantitativ mit Cystein. Orientierende versuche hatten gezeigt, daß die Verbindung trotz ihres raumfüllenden Substituenten in vielen Fällen rasch mit funktionellen SH-Gruppen von Enzymen reagiert. Die Reaktion der Verbindung, die durch ³⁵S-Gehalt radioaktiv markiert wurde, mit Cystein bei pH6 wurde papierchromatographisch verfolgt. Nach 2 Stunden wurde aus dem Vergleich der Aktivitäten gefunden, daß 63,5 % des radioaktiven Reagens im gewünschten Sinne mit Cystein reagiert hatten, 29,3 % hydrolytisch aufgespalten waren und 7,2 % unverändert geblieben sind.

Holbrook, J. J. et al (1966) beschreiben die Reaktion von 13 N-substituierten Maleimiden mit essentiellen SH-Gruppen der Lactatdehydrogenase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase. Je kleiner die N-Substituenten sind, desto schneller reagieren die Maleimide mit den beiden Enzymen. Eine Ausnahme bilden N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)- und N(γ-phenyl-n-butyl)-maleimid $\left[\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \right]$, es wird auf aromatische Wechselwirkungen verwiesen. Nach Reaktion der essentiellen SH-Gruppen von LDH-I und aller SH-Gruppen von LDH-5 mit N(N-Acetyl-4-³⁵S-sulfamoylphenyl)-maleimid wurden die beiden Enzyme einer tryptischen Hydrolyse unterworfen, und die radioaktiv markierten Peptide rein dargestellt.

2. mit N-Alkylmaleimiden wachsender Kettenlänge



Heitz, J.R. et al (1968) synthetisierten sieben N-Alkylmaleimide wachsender Kettenlänge. Die effektive Desaktivierung von Hefe-ADH bei pH7 durch diese Alkylmaleimide wurde beobachtet. Der Effekt des pH-Wertes (von 8,6 bis 9,4) auf die Hydrolyse von N-Äthylmaleimid (NEM) wurde studiert, wobei eine spezifische Basenkatalyse der Reaktion festgestellt wurde. Es wurde auf pH7 extrapoliert und ein extrem kleiner Wert für Hydrolyse gefunden, vernachlässigbar für die weiteren Messungen. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Maleimid-Desaktivierung von ADH wuchs mit wachsender Kettenlänge des Alkylsubstituenten der Maleimid-Derivate (Fig.1). Kein 'Kettenlängen-Effekt' wurde

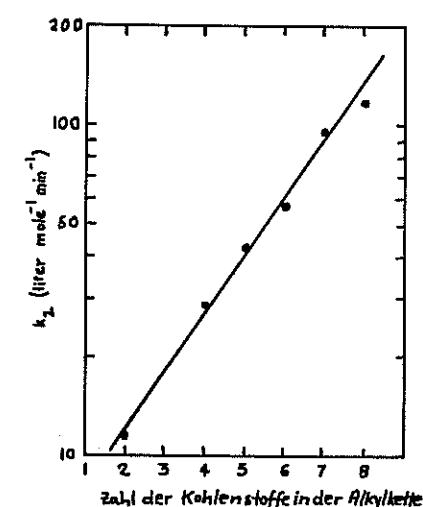


Fig. 1. Effekt der Kettenlänge auf die Desaktivierung von Hefe-ADH durch N-Alkylmaleimide.

beobachtet bei der Reaktion von NEM und N-Heptylmaleimid mit Cystein und Glutathion (Die Kinetik dieser Reaktion beschreibt Gorin, G. et al, 1966, als Kinetik 2. Ordnung). Hefe-Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die weniger empfindlich durch Maleimide inaktiviert wird als Hefe-ADH, zeigte keinen nennenswerten Kettenlängeneffekt durch NEM und Heptylmaleimid.

Für die Messungen wurde das UV-Maximum der NEM-Absorption bei 300 mμ mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von 620 und seine spezifische Änderung durch quantitative Mengen von Thiol-Gruppen ausgenutzt. Dieses UV-Maximum ist allerdings nicht auf aromatische Maleimid-Derivate wie N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid anwendbar. Die starke UV-Absorption des substituierten Benzolringes (Ausgangsprodukt, Hydrolyseprodukt, Additionsprodukt usw.) machen eine Beobachtung dieser schwachen Änderung bei 300 mμ unmöglich, weshalb auf Isotopenmarkierung zurückgegriffen wurde (Merz, H. et al, 1965, Holbrook, J.J. et al, 1966).

Es konnte gezeigt werden, daß der Kettenlängeneffekt die SH-Gruppe eines Enzymes in nichtpolarer Umgebung anzeigt; kein Effekt dagegen auf eine SH-Gruppe außerhalb einer nichtpolaren Umgebung deutet. Es werden zwei Möglichkeiten zur Erklärung des Effekts angeboten: entweder zunächst Enzym-Maleimid-Komplex mittels nichtpolarer Wechselwirkung, Komplex-Stabilisierung verbunden mit Desaktivierung und dann Weiterreaktion oder aber schnelle Reaktion vom Maleimid mit einer funktionellen Gruppe ohne Desaktivierung und nachfolgende desaktivierende Strukturänderung gefördert durch nichtpolare Wechselwirkungen. Es war nicht möglich aufgrund der erhaltenen kinetischen Daten zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden. Die erste Möglichkeit erscheint allerdings plausibler.

Anderson, B.M. et al (1970) synthetisierten eine Serie von N-Alkylmaleimiden und beobachteten die Desaktivierung von Papain bei pH 7 als Pseudo-1. Ordnungs-Prozeß bei Maleimid-Überschuß. Es wird gezeigt, daß die augenscheinliche Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung der Papain-Desaktivierung steigen mit wachsender Kettenlänge der Maleimid-Derivate (Fig. 2). Die

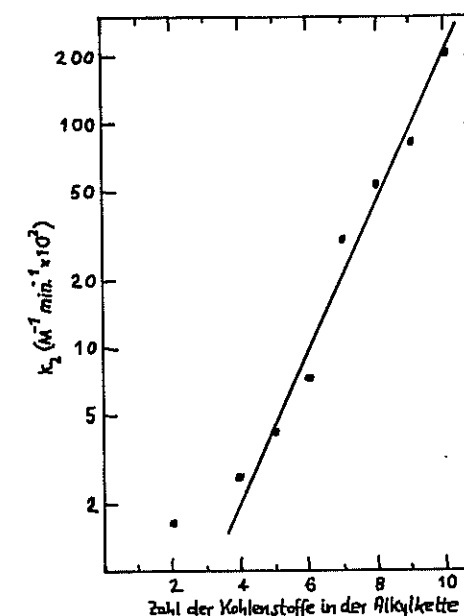


FIG. 2. Effekt der Kettenlänge auf die Desaktivierung von Papain durch N-Alkylmaleimide.

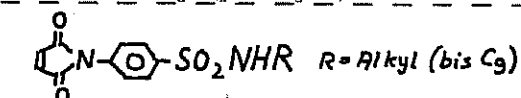
Titration des Enzymes mit N-Pentylmaleimid ergibt eine einzige funktionelle Gruppe, die mit dem Maleimid reagiert, und es existiert eine 1:1 Stöchiometrie zwischen der Modifikation dieser Gruppe und dem Verlust der katalytischen Aktivität. Es wurde eine Sättigungskinetik (Pseudo 1. Ordnungs-Kinetik bei Überschuß von Maleimid) erhalten in der Maleimid-Desaktivierung von Papain und die Abwesenheit eines Kettenlängeneffektes in der max. Geschwindigkeit der Desaktivierung mit vier verschiedenen N-Alkylmaleimiden, zeigt an, daß die

Einbeziehung der Alkylseitenkette in den gesamten Desaktivierungsprozeß vorwiegend auf der Bindung des Maleimides an das Enzym

beruht. Die Maleimid-Desaktivierung von Papain wird beschrieben als Zwei-Stufen-Prozeß: die Bindung des Maleimids an das aktive Zentrum, welches erleichtert wird durch nichtpolare Wechselwirkungen der Alkylseitenkette des Maleimides mit nichtpolarer Region des Enzymes, und anschließender irreversibler Desaktivierungs-Reaktion zwischen dem gebundenen Maleimid und der SH-Gruppe im aktiven Zentrum. α -L-Benzoyl-L-Arginine, ein Substrat kompetiver Hemmer von Papain, fungierte teilweise als Schutz gegen die Maleimid-Desaktivierung.



3. in Folge erwartet mit N(N-Alkyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimiden



In den zu synthetisierenden N(N-Alkyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimiden sollen die Eigenschaften von N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid (Merz, H. et al, 1965, und Holbrook, J. J. et al, 1966 und der N-Alkylmaleimide (Heitz, J. R. et al, 1968, und Anderson, B. M. et al, 1970) vereint werden. Unter der Betrachtungsweise von Simon, Z. (1974), ergäbe dies folgendes Bild:

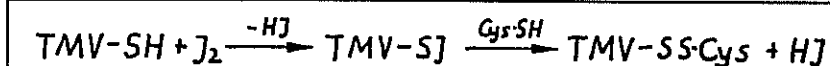
Die Affinitätsdifferenz ΔG_1 zwischen dem Erkennen A_0 (Maleimid) und dem Effektor B_0 (bestimmtes zu untersuchendes Enzym) dürfte groß genug sein, um eine hinreichende Spezifität zu garantieren. Es dürfte eine ausreichend große 'Erkennungsregion' (Kontaktregion) vorliegen für eine hohe Spezifität. Im Molekül liegt ein zusätzliches Teilstück für eine Stabilisierung der Erkennungsregion vor, die Reaktivität ist hoch genug, um das Reagens nicht als Substrat kompetiven Hemmer wirken zu lassen. Genügend intermolekulare Kräfte können zur Wirkung kommen - beruhend auf Hydrophobizität (Lipophilie), aromatischem Charakter (mögliche Charge-Transfer-Wechselwirkung, wie zwischen aromatischen Nitroverbindungen oder Chinonen und z.B. Tryptophanresten) und Wasserstoffbrückenbindung.

B. Ergebnis der Arbeiten mit Thioharnstoffs und Thiouracils (Sulfensäurereagentien).

1. Stabile Sulfenyljodide

Der Grund für die Einführung des Jods in die Untersuchungen von Protein-SH-Gruppen liegt in der Stabilität der gebildeten Sulfenyljodide in biologischem Material und der leichten Nachweisbarkeit des Umsetzungsgrades (UV-Spektrum von J_2^- , J^-).

So konnte Fränkel-Conrat, H. (1955), zum 1. Mal ein stabiles Sulfenyljodid im Tabakmosaikvirus durch Jodtitration der SH-Gruppen und eine nachfolgende Abfangreaktion mit Cystein identifizieren:



In einer ganzen Reihe von Proteinen, wie z.B. β -Lactoglobulin (Cunningham, L.W., Nuenke, B.J., 1959 und 1960a), Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (Parker, D.J., Allison, W.S., 1969) und Streptokokkenproteinease (Liu, T.J., 1967) wurden stabile Sulfensäurederivate erzeugt und nachgewiesen. Es gibt eine wachsende Zahl von Hinweisen dafür, daß die Stabilität dieser Derivate gegen Hydrolyse durch eine lipophile Umgebung bewirkt wird und Thiole wahrscheinlich bevorzugt in lipophile Regionen der Proteinstruktur eingebettet sind. Diese Tatsache ermöglicht generell den Nachweis jener Gruppen über geeignete Sulfensäurederivate und spezieller Abfangreagentien.

2. β -Lactoglobulin

Lactoglobuline können aus Kuhmilch (und der Milch anderer Paarhufer) leicht kristallin hergestellt werden. Sie werden immer wichtiger als Modellsustanzen physikalisch-chemischer und auch biochemischer Untersuchungen, dies beruht zum größten Teil darauf, daß mit diesen fast vollständig bekannten globulären Proteinen mit ca. 10 bis 15 % α -Helix-Bereichen (Timasheff, J.N. et al, 1966), Methoden zur Untersuchung weniger bekannter oder unbekannter Partikel getestet und Ergebnisse der Untersuchung unbekannter Partikel anhand des Erfahrungsmaterials leichter

gedeutet werden können.

Eine umfassende Zusammenfassung des Kenntnisstandes über β -Lactoglobulin bis 1966 gibt McKenzie, H.A. (1967). Zwei genetische Varianten, β -Lactoglobulin A und B sind seit langem durch Elektrophorese und Aminosäureanalysen charakterisiert. In neuerer Zeit wurden zwei weitere Varianten C und D entdeckt (Bell, K., 1962; Grosclande, F., 1966).

Die Arbeiten von Green, D.W. und Aschaffenburg, R. (1959), Townend, R. et al (1961, 1969), Tanford, Ch. und Taggart, V.G. (1961), Timasheff, S.N. und Townend, R. (1964), Dunnill, P. und Green, D.W. (1965), Frank, G. und Braunitzer, G. (1967, 1968), Basch, J.J. und Timasheff, S.N. (1969), Braunitzer, G. et al (1972), Weissbluth, M.D. und Grieger, R.A. (1974), vervollständigen das Bild von B-Lactoglobulin (dazu Fig. 3).

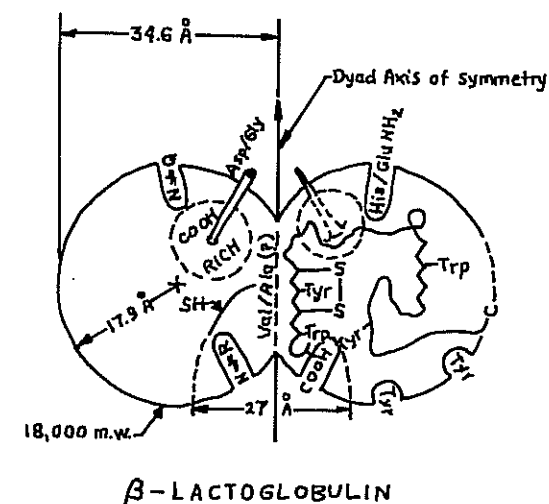


FIG. 3. Schematische Darstellung der gefolgerten strukturellen Merkmale der genetischen Varianten von Rinder β -Lactoglobulin.

Die Lokalisierung der -SH und -SS-Gruppe gelang Mainferme, F. et al (1971), Martiel, J. et al (1971), Gomez, G. P. et al (1971), McKenzie, H. A. et al (1972), McKenzie, H. A. und Shaw, D. C. (1972). Wichtig ist dabei, daß die SH-Gruppe ihren Platz wechselt: von 68 auf 70 und umgekehrt, was auch einen Wechsel der Disulfidbrücke beinhaltet (57 auf 68 oder 57 auf 70, Fig. 4). Die SH-Gruppe soll sich mehr in lipophiler Umgebung aufhalten, obwohl sie noch bei der Dimerisation und Weiterassoziation eine Rolle spielt.

Das von Kessler, E. und Brew, K. (1970), sowie Bell, K. et al (1970) gefundene Schweine β -Lactoglobulin (Variante A und B) zeigt dies deutlich. Im Unterschied zum Wiederkäuer β -Lactoglobulin hat es keine SH-Gruppe und zwei Cystin-Reste. Unter allen Bedingungen existiert nur ein monomeres und es kann keine Konformationsänderung nahe pH7 eingeht. Auch sein Verhalten in Harnstoff ist völlig verschieden von dem der Wiederkäuer β -Lactoglobuline.

Ein Denaturierungseffekt von Harnstoff an Rinder- β -Lactoglobulin

in saurem Bereich (pH 3,5 und 5,2 sowie höher) tritt erst bei 5 M Harnstoffkonzentrationen ein (McKenzie, H.A. und Ralston, G.B. 1973, Fig. 5).

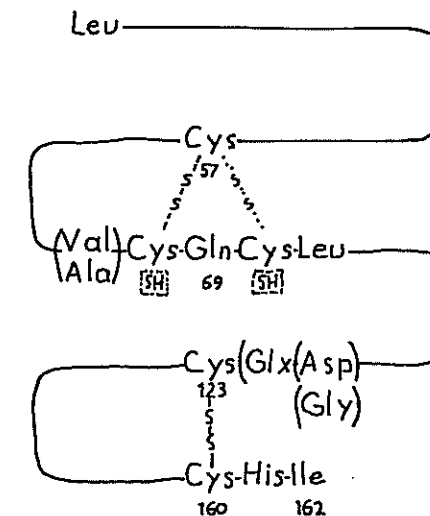


Fig. 4. Schematische Darstellung der monomeren Kette von Rinder β -Lactoglobulin A, gezeigt die Lokalisation der Thiolgruppe und der Disulfid-Brücke. Es gibt eine S-S-Brücke von 123 zu 160. Eine Form (...) hat Cys-SH an 68, mit der zweiten S-S-Brücke von 57 zu 70. Die andere Form (...) hat Cys-SH an 70, mit der zweiten S-S-Brücke von 57 auf 68.

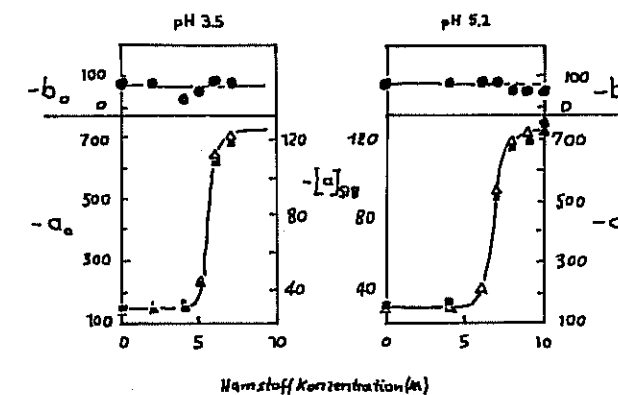


Fig. 5. Effekt der Harnstoffkonzentration auf die spez. Rotation bei 578 nm, $[\alpha]_{578}$ (Δ), und die Parameter a_0 ($\blacksquare$) und b_0 ($\bullet$) auf die Moffitt-Yang Gleichung (1956) zu dem Ende der Anfangsreaktion von Rinder β -Lactoglobulin B bei pH 3.5 und 5.2.

Zu einem in dieser Arbeit noch auszuführenden ersten Test mit den zu synthetisierenden lipophilen Sulfonylagentien, erscheint Rinder- β -Lactoglobulin das ideale Modells substrat zu sein (stabiles Sulfonyljodid $\rightarrow$ SH in lipophilem Bereich).

3. Bisherige Arbeiten mit Sulfonylagentien an β -Lactoglobulin-Sulfonyljodid

Infolge der Arbeit von Fränkel-Conrat, H. (1955), erarbeiteten Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1960b, 1961), und Cunningham, L.W. (1964), mit β -Lactoglobulin als Modells substrat ein Verfahren

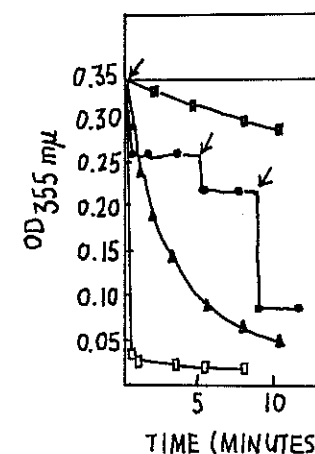


FIG. 8.—Der Abfall der Absorption von β -lactoglobulin sulfenyl iodid (OD_{355}) als Resultat seiner Reaktion mit verschiedenen Reagentien. (a), SCN^- , $49 \times 10^{-4} M$ bei 1. Addition, $98 \times 10^{-4} M$ totale Konzentration nach 2. Addition, $588 \times 10^{-4} M$ totale Konzentration nach 3. Addition; (b), Mercaptoethanol, $20.8 \times 10^{-4} M$; (c), Thiouracil, $10.4 \times 10^{-4} M$; (d), Thiocarbonyl, $27.0 \times 10^{-4} M$, pH 6.1, 0.2 MK, 5°. [β -lactoglobulin sulfenyl iodid] = $8.1 \times 10^{-4} M$.

Auch hier wurde die H^+ -Bildung mittels Titration gemessen (Cunningham, L.W., Nuenke, B.J., 1961).

Die Bildung des Endproduktes (gemischtes Disulfid) aus b) wurde am Umsatz mit $[2-^{14}C]$ -Thiouracil und anschließender Fraktionierung an Sephadex G-25 verfolgt.

Sie beschreiben die Abfangreaktion als Kinetik 2. Ordnung:

$$-\left[\frac{d(P-S)}{dt}\right] = k_2 [P-S][R-SH]$$

Die von ihnen getesteten

(Tafel I), am besten reagierentsten eingestuften Reagentien, welche auch in die Nähe äquimolarer Umsetzungsgrade kamen, enthielten alle die Struktur $\begin{smallmatrix} H & S \\ | & | \\ -N & -C- \end{smallmatrix}$, welche die Fähigkeit besitzt in der alternativen Thiol-Form $\begin{smallmatrix} HS \\ | \\ -N=C- \end{smallmatrix}$ zu existieren. Es ist nicht bekannt, welche Form des Sulfenyljodid angreift. Aufgrund des pK_s -Wertes der potentiellen SH-Gruppe dieser Agentien, $pK_s > 8$, erscheint ihnen, im Vergleich zum angewandten pH-Wert, pH 6,1, die Thion- und nicht die Thiol-Form die reaktivere Spezies zu sein.

TAFEL I
Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von verschiedenen Reagentien mit β -LACTOGLOBULIN SULFENYL IODIDE^a

Getestete Reagentien	Konzentration Getestet, $M \times 10^4$	k_2 (liter mole ⁻¹ min ⁻¹)
1-Methyl-2-mercaptoimidazole	2.1; 10.4	>3000
Goitrin ^b	10.4	>1100
Thiourea	27.3	830 ± 110
Thiouracil	10.4; 24.3	270 ± 30
Propylthiouracil	10.4	78 ± 8
Mercaptoethanol	487; 208	8.0 ± 4
CN ⁻	433; 43.3	3.5 ± 1
SO_3^-	43.3; 533	3.7 ± 1
Cysteine	249	1.7 ± 1.2
Alanine	200	<0.1
H_2NOH	43.2	83 ± 20
Imidazole	1300	<0.1
U 9189 ^c	10.4	<0.1

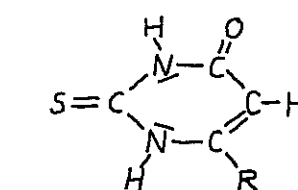
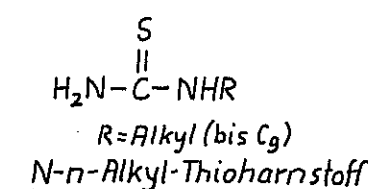
^a Die Sulfenyljodid-Konzentration war zwischen 6.1 und $8.7 \times 10^{-4} M$ in allen Versuchen. Alle Versuche wurden ausgeführt bei 5° , pH 6.1, 0.2 MK Puffer. ^b 5-Vinyl-2-Thioxazolidon. ^c 1,1,3-Tricyano-2-amino-1-propene.

Es erscheint uns sinnvoll, in Sicht auf die mehr lipophile Umgebung der Thiol-Gruppe in β -Lactoglobulin und der Reaktivität der $\begin{smallmatrix} H & S \\ | & | \\ -N & -C- \end{smallmatrix}$ -Struktur, diese Agentien, Thiocarbonyl sowie Thiouracil, in Blick auf eine größere Lipophilie abzuwandeln um den Einfluß der gesteigerten Lipophilie auf die Reaktivität und den Umsetzungsgrad an Sulfenyljodid (oder anderer Sulfenyllderivate) in lipophiler Umgebung unter-

suchen zu können. Als Modells substanz dient β -Lactoglobulin. Falls das erwartete Ergebnis - größere Reaktionsfähigkeit und besserer Umsetzungsgrad (mehr äquimolar) - gefunden wird, sollen diese Agentien zur Untersuchung anderer weniger bekannter Spezies verwandt werden.

4. Eigene Versuche mit lipophilen Sulfensäureagentien an β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid

Es wurden eine Reihe von Sulfensäureagentien wachsender Lipophilie synthetisiert:



6-n-Alkyl-2-Thiouracil

Es waren dies N-n-Alkyl-Thioharnstoffe und 6-n-Alkyl-2-Thiouracile und zwar die ungeraden Alkyl-derivate bis zum Nonyl-Derivat (Teil II und III dieser Arbeit).

Analog der Arbeit von Cunningham, L.W. (1964), wurden diese Agentien getestet (III). Das Ergebnis der Versuche soll hier - zum direkten Vergleich mit der Arbeit von Cunningham - gebracht werden, mit anschließender Diskussion.

Bei allen Messungen wurden die gleichen Bedingungen angewandt dabei auch jeweils dieselben Konzentrationen, sowohl an Protein, wie auch an Sulfenylagens (letzteres mit 80 % Überschuß).

Probleme bereiteten zunächst einmal, wie erwartet, die steigende Schwerlöslichkeit der länger-kettigen Derivate in Wasser und Wasser-Alkohol-Gemischen, die der Uracils mehr, als jene der Harnstoffe. Der Alkohol-Gehalt der Reaktionsmischungen war, einschließlich der Stopped-Flow-Messungen, nie höher als 1,7 %. Thiouracil und Methylthiouracil waren in Wasser, wie auch Alkohol schwerlöslich, weshalb für die Messungen die gesättigten Lösungen eingesetzt wurden (Teil III).

Der N-n-Nonyl-Thioharnstoff und das 6-n-Heptyl-2-Thiouracil, beide in Alkohol bei Raumtemperatur löslich, fielen beim Kontakt mit der wäßrigen Reaktionslösung bei 5°C wieder teilweise aus (das 6-n-Nonyl-2-Thiouracil konnte aus diesem Grund nicht vermessen werden), doch auch ihre Reaktionen aus heterogener Phase können in die Betrachtungsweise mit einbezogen werden. Ein Wechsel des Reaktionsmediums konnte nicht vorgenommen werden,

da β -Lactoglobulin sich nicht in Alkohol löste-- außerdem wäre ein Wechsel des Mediums auch insofern von Nachteil, als β -Lactoglobulin in alkoholischer Lösung sich anders verhalten würde als in Wasser.

Die Reaktionen wurden bei 5°C durchgeführt. Außer den Abfangreagentien waren alle Substrate auf 5°C gekühlt.

Ein anderes Problem war die genaue Messung der sehr schnellen Reaktion von Thioharnstoff und N-n-Heptyl-Thioharnstoff mit dem Proteinsulfenyljodid. Wir sind deshalb auf 'Stopped-Flow'-Messungen (Aminco DW2-UV-Spektrometer mit zugehörigem Stopped-Flow-Zusatz) übergegangen.

Mit unserer apparatellen Anordnung sind Protein-Konzentrationen bis ca. $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ gerade noch zu vermessen, da die starken Schwankungen der Grundlinie, bei einer größeren Verstärkung (notwendig bei noch kleineren Konzentrationen) als der verwendeten, die Meßwerte zu stark verändern.

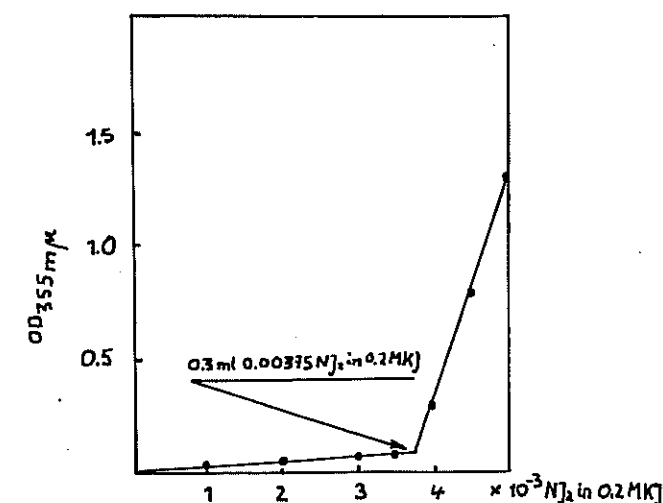


Fig. 9. Titration von Rinder β -Lactoglobulin mit I_2 bei pH 6.1 und 5° . $5.91 \times 10^{-7} \text{ Mol Protein} / 2.7 \text{ ml}$, addiert 0.3 ml Portionen an Normal-Jod-Lösung in 0.2 MKJ.

Aus dem zeitlichen Verlauf der Abfangreaktionen (Fig. 10 und 11) konnten wir, unter Annahme einer Reaktion 2. Ordnung, Geschwindigkeitskonstanten k_2 berechnen:

$$k = [2.303 / (a-b)t] \log [b(a-x) / a(b-x)]$$

a und b sind die Anfangskonz. der Reaktanten:

$$a = [\text{RSH}]_0 = 3.25 \cdot 10^{-4} \text{ M} \quad b = [\text{PSJ}]_0 = 1.84 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

80% Überschuß
(bei allen Messungen gleich)

x = Umsatz an a und b :

$$x = [\text{PSJ}]_0 \cdot \frac{\Delta \text{OD}_{\text{PSJ}}}{\Delta \text{OD}_{\text{PSH}}}$$

$$\Delta \text{OD}_{\text{PSJ}} = \text{OD}_{\text{PSJ}} - \text{OD}_{\text{PSH}}$$

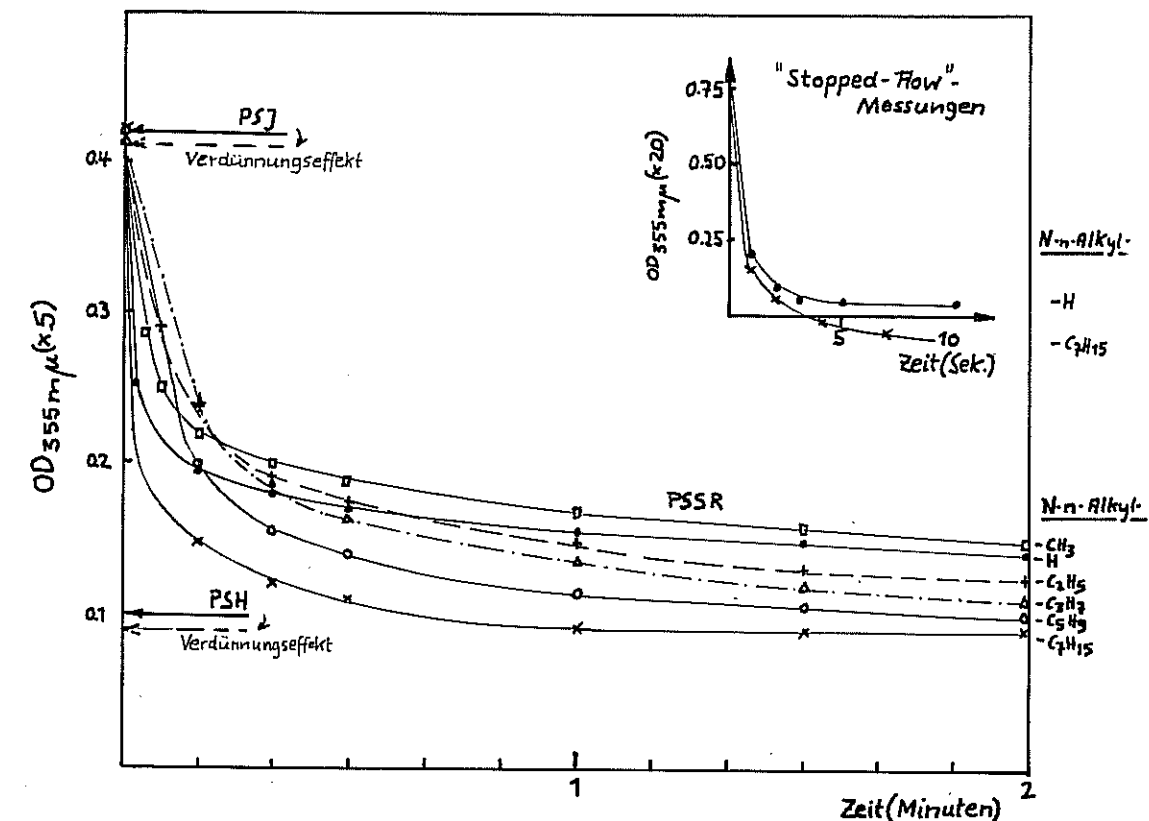


Fig. 10. Abfall der Absorption von β -Lactoglobulin sulfenyl iodid (OD_{355}) als Resultat seiner Reaktion mit N - n -Alkyl-Thioharnstoff. Thioharnstoffkonzentrationen alle $3,25 \times 10^{-4} M$, Proteinsulfenyljodidkonz. $1,84 \cdot 10^{-4} M$, pH 6.1, 0.2 MK, 5° .

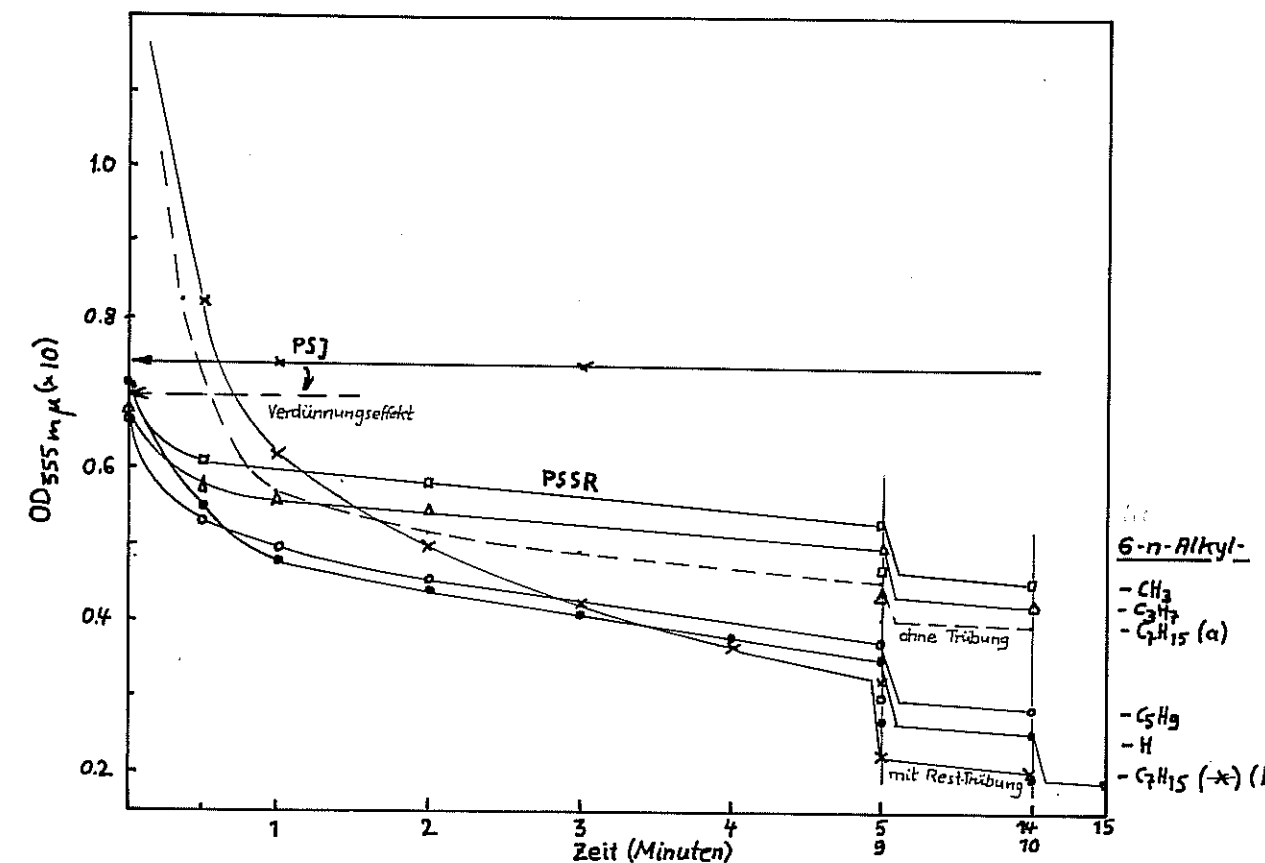


Fig. 11. Abfall der Absorption von β -Lactoglobulin sulfenyl iodid (OD_{355}) als Resultat seiner Reaktion mit 6- n -Alkyl-2-Thiouracil. Thiouracilkonzentrationen alle $3,25 \times 10^{-4} M$, außer 6- n -Heptyl-2-Thiouracil (a) $1,62 M$; Proteinkonzentration $1,84 \cdot 10^{-4} M$; pH 6.1; 0.2 MK; 5° .

TAFEL II
Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten und des Endumsatzes
für die Reaktion der N-n-Alkyl-Thioharnstoffe und der
S-n-Alkyl-2-Thiouracile mit β -LACTOGLOBULIN SULFENYLJODID^a

Getestete Reagentien	Kon- zentration Getestet, M $\times 10^4$	Anfangs- k ₂ (liter mole ⁻¹ min ⁻¹) $\times 10^4$	End- umsatz % / Min.
Thioharnstoff	3,25	10	85 2
Methylthioharnstoff		5,4	82 2
Ethylthioharnstoff		3,0	88 2
N-n-Propylthioharnstoff		1,6	94 2
N-n-Pentylthioharnstoff		2,3	97 2
N-n-Heptylthioharnstoff		20	100 1
Thiouracil		0,36	63 10
Methylthiouracil		0,19	36 10
S-n-Propyl-2-Thiouracil		0,20	41 10
S-n-Pentyl-2-Thiouracil		0,31	60 10
S-n-Heptyl-2-Thiouracil	3,25	[0,45]	[0,70] 10

^a Die Sulfenyljodid-Konzentration betrug $1,84 \cdot 10^{-4}$ M bei allen Versuchen.
Alle Versuche wurden ausgeführt bei 5°, pH 6,1, 0,2 M K₂PO₄ Puffer.

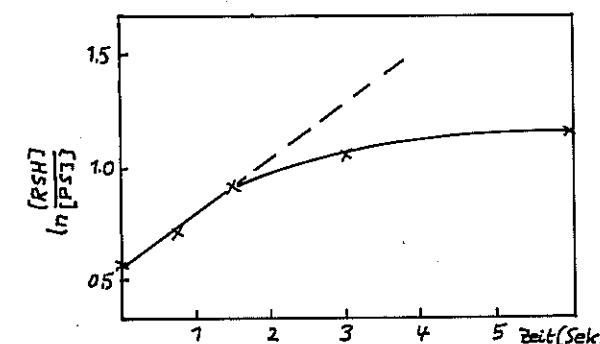


Fig. 12. $\ln [RSH]/[PS]$ - Zeit-Diagramm der Reaktion von β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid mit Thioharnstoff.

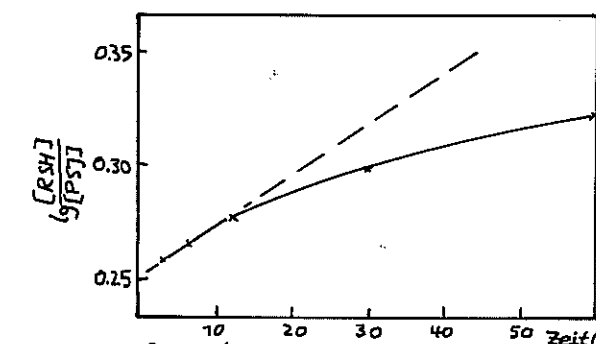
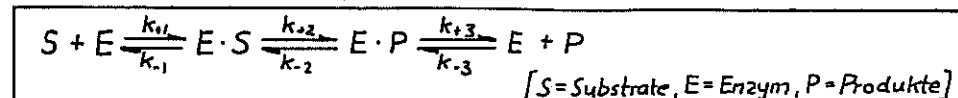


Fig. 13. $\lg [RSH]/[PS]$ - Zeit-Diagramm der Reaktion von β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid mit Thiouracil.

Aus der Berechnung ergab sich, daß die Reaktion zwar in den ersten 2-3 Sekunden angenähert nach 2. Ordnung verläuft (danach auch die 'Anfangs-Geschwindigkeitskonstanten k_2' ', Tafel II), aber sich dann erheblich verlangsamt (Fig. 12 und 13) und keineswegs mehr durch eine Kinetik 2. Ordnung zu beschreiben ist, wie dies von Cunningham, L.W. (1964) angegeben wird.

Im Rahmen dieser Arbeit kann dieser Effekt, d.h. die genaue Kinetik dieser Reaktion, nicht geklärt werden. Die Kompliziertheit der Reaktion wird deutlicher, wenn man zum Vergleich eine Enzym-katalysierte Reaktion heranzieht (was wohl in Anbetracht der Konzentrationen und der Geschwindigkeit unserer Reaktion gerechtfertigt erscheint):



Als 'E' kann in unserer Reaktion eine der -SJ-Gruppe benachbart Stelle auf dem β -Lactoglobulinsulfenyljodid fungieren. Der Beweis für diese Annahme dürfte in den folgenden Ergebnissen zu finden sein.

Das Ziel unserer Arbeit lag darin, eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Lipophilie unserer Reagentien zu finden.

Das die Geschwindigkeit der Reaktion tatsächlich von der Lipophilie unserer verwendeten Agentien abhängt, ist das wichtigste Ergebnis unserer Bemühungen. Die Geschwindigkeit der Abfangreaktion fällt zunächst, bei den Thioharnstoffs von 0 bis 4 C-Atomen der Alkylseitenkette - bei den Thiouracils von 0 bis um dann wieder anzusteigen (Fig.14):

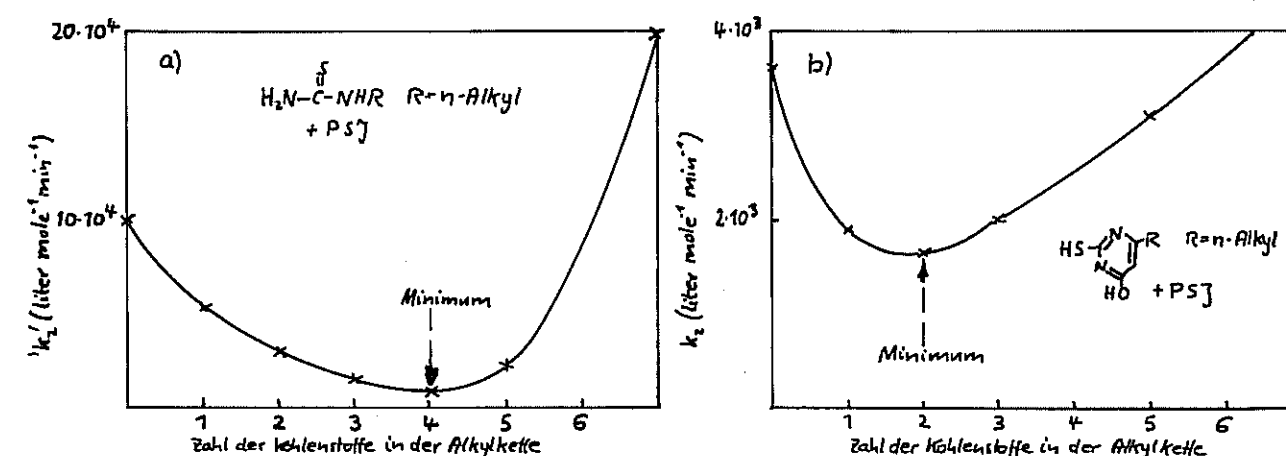


Fig.14: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkylseitenkette (Lipophilie) der getesteten Thiouracile (b) Thiouarnstoffe (a)

Die Reaktion verschiebt sich außerdem immer mehr auf die Seite der Endprodukte, das n-Heptyl-Thioharnstoff-Disulfid des β -Lactoglobulins ist nach einer Minute bereits zu 100 % gebildet.

In der Reihe der getesteten Substanzen (Thioharnstoffe und Thiouracile) an β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid, erwies sich das Abfangreagens n-Heptyl-Thioharnstoff als das optimalste:

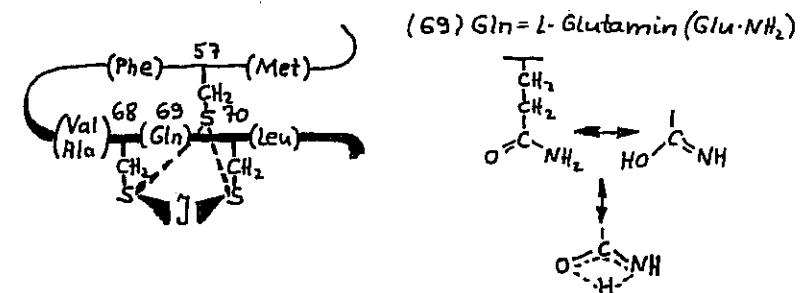
Es hat nach einer Minute nicht nur zu 100 % das Sulfenyljodid abgefangen, es reagiert auch doppelt so schnell wie

] der Thioharnstoff selbst.

In der Reihe der Thiouracils alleine, dürfte das beste Reagens ebenfalls das n-Heptyl-Derivat sein, obwohl hier eine heterogene Reaktion stattfindet: Es reagiert schneller als das Thiouracil und die Reaktion ist stärker auf der Seite der Endprodukte.

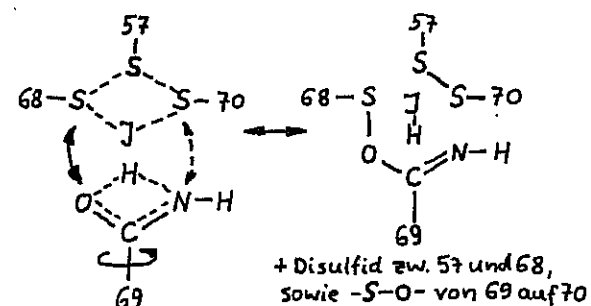
Um diese Ergebnisse deuten zu können, muß noch einmal kurz auf die -SJ-Gruppe in der Struktur des β -Lactoglobulin-Sulfenyljodids eingegangen werden:

Wie schon gesagt, enthält β -Lactoglobulin eine Disulfidbrücke und eine SH-Gruppe (das Disulfid entweder von 57 auf 68 oder von 57 auf 70 - was einen Wechsel der SH-Gruppe von 70 auf 68 beinhaltet) und zwar in lipophiler Umgebung. Durch Jod wird die SH-Gruppe zum Sulfenyljodid oxidiert. Das Jod ist nun entweder Position 68 oder 70 zuzuschreiben:



Phe, Met, Val, Ala, Leu sind Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, nur Gln enthält noch eine Seitenkette mit hydrophilen Eigenschaften.

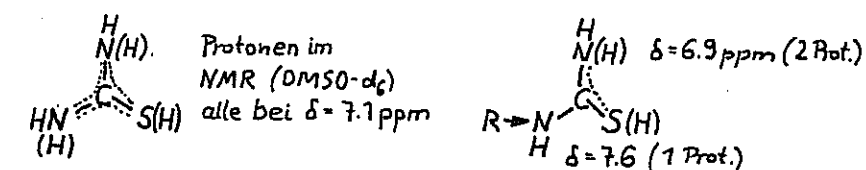
Man könnte sich nun vorstellen, daß die (Gln)-Seitenkette in Position 69 aufgrund ihrer mesomeren Struktur in die Wechselwirkung zwischen Position 68 und 70 mit einbezogen wird. Die langsame Zersetzung des Sulfenyljodids könnte damit erklärt werden:



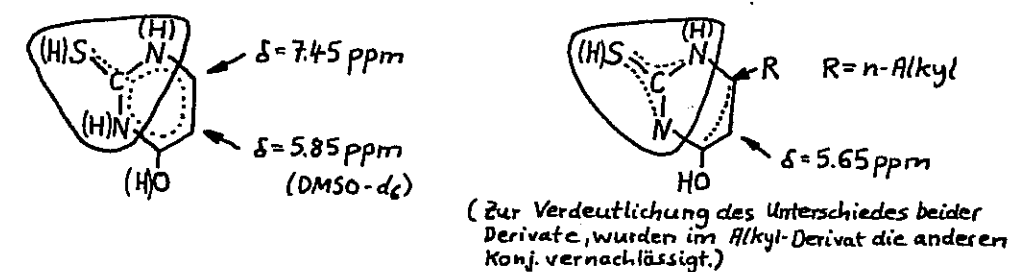
Auch unsere Ergebnisse können anhand der lipophilen Umgebung und dieser Strukturbeziehungen erklärt werden.

Beide Agentien, der Thioharnstoff ebenso wie das Thiouracil, sind in der Lage aufgrund ihrer mesomeren Strukturen die Funktion von (Gln) zu ersetzen und stabile Bindungen mit dem Sulfenylsäurekation einzugehen.

Daß die Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Agentien mit dem Sulfenyljodid zunächst bei Anwesenheit von Alkylseitenketten fällt, liegt an der Einschränkung ihrer Mesomeriemöglichkeiten (Enthiolisierung) und der damit verbundenen Einschränkung der Acidität der potentiellen SH-Gruppe.



Durch die SH-Gruppe sollten wässrige Lösungen sauer reagieren, diese sind aber neutral - Werner, A. (1912) nimmt an, daß ein inneres Salz der Isoform vorliegt (Houben-Weyl, 1955a): $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_3^+)\text{S}^-$



Daß der Thioharnstoff eine viel höhere Reaktionsgeschwindigkeit hat als das Thiouracil liegt an dem Strukturunterschied beider Agentien. Durch die Nachbarschaft der vinylogenen CO-Gruppe (Einspannung des Harnstoffs in einen 6-Ring) kann der 'Thioharnstoff' nicht mehr so stark mit dem R-Lactoglobulin-Sulfenyljodid-System in Wechselwirkung treten, seine 'partielle Protonendonorfunktion' ist stark abgeschwächt, durch die hinzukommende Alkylkette wird diese noch mehr vermindert.

Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit in wässriger Lösung bei zunehmender Lipophilie der Agentien, liegt in der hydrophoben Wechselwirkung der lipophilen Seitenkette dieser Agentien mit der lipophilen Umgebung des Sulfenyljodids. Auf dieser Wechselwirkung beruht auch die Verschiebung des Umsatzes zugunsten der gewünschten Endprodukte.

Die Abstoßungskräfte zwischen lipophilem Rest des Agenses und Wasser beschleunigen den Übergang des in der Nähe des Proteins befindlichen Agenses in den lipophilen Bereich des Proteins (Erschwerung der umgekehrten Reaktion). Eine intramolekulare Micellenbildung bei höherer Alkylseitenkette dürfte das Agens noch unpolarer machen und dadurch die Abstoßungskräfte noch vergrößern (dazu Overberger, C.G. und Sannes, K.N., 1974).

Das Ergebnis der Wechselwirkungen:

n-Heptyl-Thioharnstoff, a) reagiert doppelt so schnell wie der Thioharnstoff, b) Umsatzende nach ca. einer Minute bei 100 % Endprodukt.

Auch die der Alkylseitenkette folgende NH-Gruppe der n-Alkyl-Thioharnstoffe kann zur hydrophoben Wechselwirkung beitragen.

Eine Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Denaturierungseffekte kann ausgeschlossen werden, da die Konzentrationen hierfür zu gering sind (McKenzie, H.A. und Ralston, G.B. 1973). Eine Beeinflussung durch intermolekulare Micellenbildung (Jencks, W.R., 1969) ist aus denselben Gründen ebenfalls auszuschließen. (X)

Durch die Verwendung des sehr schnell zu 100 % reagierenden n-Heptyl-Thioharnstoffs als Abfangreagens, kann die Temperatur der Messungen bis auf 37°C erhöht werden. Der Abfall der Extinktion durch diese Temperaturerhöhung zieht allerdings eine kleinere Sensibilität nach sich. Durch Anwendung eines Integrationsverfahrens kann die Meßgenauigkeit allerdings auch wieder etwas gesteigert werden.

⑤ Ein Versuch mit Thg u. Thg-analogen Hg u. Hg ergab keine Reaktion → d.h. auch die Wechselwirkung der Lipophil-Kette mit Lipophil-Teilen des Proteins und dadurch Freisetzung des S-J mit Hydrolyse nicht ausschließl.

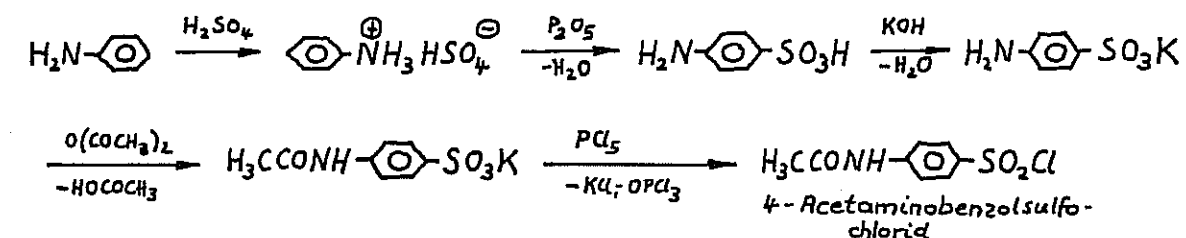
II. Synthese der lipophilen Thiol- und Sulfensäureagentien

A. Synthese der N⁴-(N¹-Alkyl-sulfamoylphenyl)-maleimide

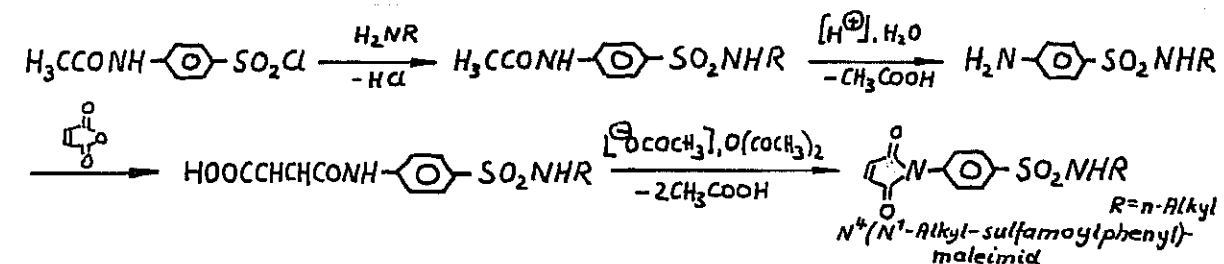
1. Gesamtsyntheseweg

Als Ausgangsprodukt dient bei allen Darstellungen 4-Acetaminobenzolsulfochlorid, welches in Hinsicht auf eine radioaktive

Markierung nach den von Merz, H. et al (1965) erarbeiteten Vorschriften, für seine mikropräparative Synthese von N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid-³⁵S (mit einer Endausbeute nach Umkristallisation von ca. 15 % über acht Synthesestufen) aus trägerfreiem Sulfat, hergestellt werden kann:

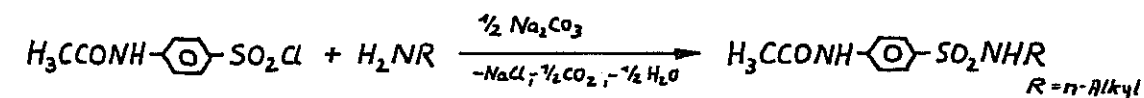


Die Umsetzung wird in Anlehnung an die Vorschriften von Merz, H. et al (1965) durchgeführt:



2. Synthese der N⁴-Acetyl-N¹-n-Alkylsulfanilamide

Als beste Methode erscheint uns die Umsetzung des 4-Acetaminobenzolsulfochlorids mit einem schwachen Überschuß (15 %) an primären n-Alkylamin in Gegenwart von Natriumcarbonat (Houben-Weyl, 1955b):



Treibende Kraft der Umsetzung ist die HCl-Bildung mit anschließender CO₂-Entwicklung und dessen Entweichen aus der Reaktionsmischung.

Die Umsetzung erfolgt in wässrigem Medium zwischen 30 und 40°C. Bei schlecht löslichen Aminen (ab dem n-Pentylamin) in Gegenwart von Alkohol.

Das wässrige Medium kann deshalb angewendet werden, weil das Sulfochlorid relativ stabil gegen eine Hydrolyse ist.

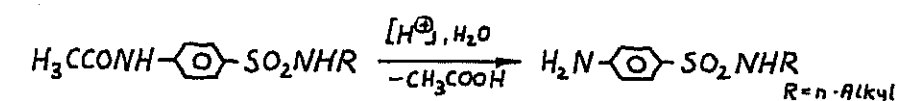
Der Umsatz kann bis zum Pentyl-Derivat mittels wässriger NaOH überprüft werden. Man rührt solange bei 30°C, bis eine Probe in 2 N NaOH klar löslich ist, wobei das gebildete Na-Salz mit wässriger HCl wieder fällbar sein sollte. Auch die Reinigung kann über die Na-Salze mit anschließender Umkristallisation aus Alkohol-Wasser oder Alkohol erfolgen.

Ab dem Pentyl-Derivat muß eine entsprechend lange Reaktionszeit (bis zu 20 Std.) einen vollständigen Umsatz garantieren.

Die relativ sauber anfallenden Produkte, Ausbeute um die 80 % (DC, Smp., Analyse), können ohne Umkristallisation in die nächste Stufe eingesetzt werden.

3. Verseifung der N⁴-Acetyl-N¹-Alkylsulfanilamide zu N¹-Alkylsulfanilamiden

Die Verseifung der N⁴-Acetyl-Derivate erfolgt in 18,5 %iger Salzsäure unter Rückflußtemperatur (bis 100°C; Merz, H. et al, 1965)



Neutralisiert wird mit wässriger Na₂CO₃-Lösung unter Eiskühlung (d.h. bis pH 6 - zur Vermeidung der Lösung des Verseifungsproduktes als Na-Salz).

Die Sulfamidbindung ist sehr stabil und unter den angewandten Bedingungen nicht spaltbar.

Die von Tanaka, Y. (1965) gefundenen charakteristischen IR-Frequenzen der S-N-Bindung in N¹-Alkylsulfanilamiden (bis -C₄) können zur Charakterisierung der Verbindungen (bis -C₉H₁₉) herangezogen werden.

Die sauber anfallenden Produkte, Ausbeuten um die 80 % (DC, Smp., Analyse) können ohne Umkristallisation in die nächste Stufe eingesetzt werden.

4. Darstellung der Maleinsäuremonoamide

Die Darstellung der Maleinsäuremonoamide erfolgt, ebenso wie die vorangegangenen Stufen, ohne wesentliche Schwierigkeiten.

TAFEL III

$\text{CH}_3\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHR}$
 $\text{N}^1\text{-Acetyl-N}^1\text{-Alkylsulphanilamid aus N}^1\text{-Acetaminobenzolsulfchlorid}$

Eingesetztes Amin	Molge- wicht	Produkt	Ausbeute %	Smp. °C	Molge- wicht	%C ber.	%C gef.	%H ber.	%H gef.	%N ber.	%N gef.
Monomethylamin	31.06	-N ¹ -Methyl-	84	181	228.24	47.30	47.27	5.25	5.41	12.28	12.00
Dimethylamin	45.08	-N ¹ -Dimethyl-	79	135	242.26	49.50	48.35	5.78	5.80	11.57	11.50
n-Propylamin	59.11	-N ¹ -n-Propyl-	70	132	256.33	51.50	51.52	6.24	6.46	10.90	10.94
i-Propylamin	59.11	-N ¹ -i-Propyl-	50	160	256.33	51.50	51.58	6.24	6.37	10.90	11.24
n-Pentylamin	87.17	-N ¹ -n-Pentyl-	87	128	284.35	54.80	54.88	7.03	7.29	9.84	9.65
n-Heptylamin	115.22	-N ¹ -n-Heptyl-	82	116	372.40	57.60	57.86	7.68	7.75	8.96	8.81
n-Nonylamin	143.27	-N ¹ -n-Nonyl-	85	110	340.45	59.20	59.53	8.22	8.25	8.22	8.40

^a Schmelzpunkte unkorrigiert

TAFEL IV

$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHR}$
 $\text{N}^1\text{-Alkylsulphanilamid aus N}^1\text{-Acetyl-N}^1\text{-Alkylsulphanilamid}$

N ¹ -Acetyl-N ¹ -Alkyl-	Molge- wicht	N ¹ -Alkyl-	Ausbeute %	Smp. °C	Molge- wicht	%C ber.	%C gef.	%H ber.	%H gef.	%N ber.	%N gef.
-N ¹ -Methyl-	228.24	N ¹ -Methyl-	82	110	186.24	45.10	45.30	5.37	5.64	15.03	15.22
-N ¹ -Dimethyl-	242.26	N ¹ -Dimethyl-	69	171	200.26	48.00	48.22	6.00	6.21	14.00	14.09
-N ¹ -n-Propyl-	256.33	N ¹ -n-Propyl-	67	82	274.33	50.40	49.91	6.53	6.91	13.05	12.23
-N ¹ -i-Propyl-	256.33	N ¹ -i-Propyl-	66	113	274.33	50.40	49.82	6.53	6.67	13.05	13.37
-N ¹ -n-Pentyl-	284.35	N ¹ -n-Pentyl-	93	121	242.35	54.40	54.11	7.42	7.58	11.54	10.69
-N ¹ -n-Heptyl-	312.40	N ¹ -n-Heptyl-	92	115	222.40	57.60	56.54	8.14	8.34	10.36	10.09
-N ¹ -n-Nonyl-	340.45	N ¹ -n-Nonyl-	92	116	203.77	60.30	59.17	8.71	8.77	9.38	9.15

^a Schmelzpunkte unkorrigiert

Umgesetzt wird N¹-Alkylsulfanilemid mit Maleinsäureanhydrid in Aceton unter Ausschluß von Wasser bei 30 bis 40°C (Merz, H. et al, 1965):



Der Grund, daß die Reaktion an der Benzol-NH₂-Gruppe und nicht an der -SO₂NH-Gruppierung stattfindet, liegt in der höheren Nucleophilie der -NH₂-Gruppe. In dem dipolaren aprotischen Lösungsmittel Aceton kommt diese Nucleophilie voll zur Geltung. Der Übergangszustand wird außerdem durch das benachbarte Benzol stärker stabilisiert.

Die höheren n-Alkylderivate (C₅, C₇, C₉) fallen nicht so sauber an (DC, Smp., Analyse), sie enthalten noch Ausgangsprodukte. Ihre Reinigung erfolgt über die Na-Salze der Säuren (DC, Smp., Analyse).

Die Ausbeuten liegen bei 90 %.

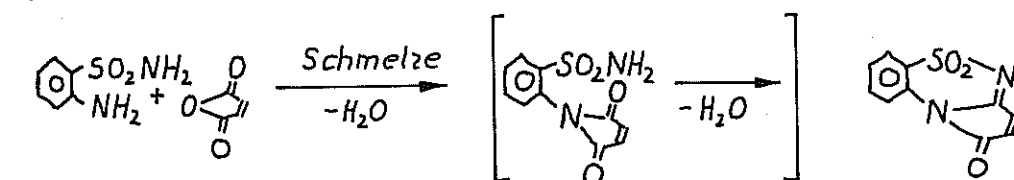
5. Cyclisierung der Maleinsäuremonoamide

a. Dehydration, Versuche und Ergebnisse

Die Schwierigkeit der Gesamtsynthese besteht in der Cyclisierung der dargestellten Monoamide zu den correspondierenden Maleimiden.

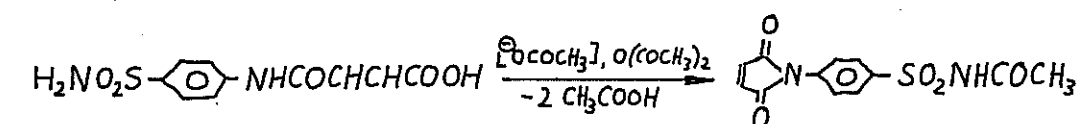
Bisher wurde keines dieser Imide dargestellt.

Das N(2-Sulfamoylphenyl)-maleimid beschreibt Kratzel und Ruis, H. (1966) als Zwischenprodukt bei seinen Synthesen. Es konnte in 7 %iger Ausbeute nach kurzem Zusammenschmelzen von o-Aminobenzolsulfamid und Maleinsäureanhydrid, mit einem Schmelzpunkt von 249-253°C (Zersetzung) aus Äthanol, isoliert werden:



Das Zusammenschmelzen von p-Aminobenzolsulfamid mit Maleinsäureanhydrid könnte zu einer wesentlich höheren Ausbeute an Maleimid führen: Das Sulfamid ist zu weit weg von der Maleinsäure Carbonylgruppe, um weiter reagieren zu können.

Die Cyclisierung des N⁴-Maleoyl-Sulfamids mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart katalytischer Mengen Na-acetat bei 95-100°C (15 Minuten) ergibt das N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid (Merz, H. et al, 1965):



Es bestand also wenig Hoffnung mit der gleichen Cyclisierungsmethode die nichtacylierten Produkte zu erhalten. Vor allem, da schon lange die Acylierung von Aminen zum Schutz der Amino-Gruppe verwandt wird (auch bei der Synthese von 4-Acetaminobenzolsulfonchlorid). Die Bedingungen unter denen die Acylgruppe wieder abgespalten wird, würden auch das gebildete Imid wieder öffnen.

Eine Cyclisierung mittels Pyridin, analog den Arbeiten von Miller, E. et al (1939) mit succinanhydrid, schlug fehl.

Die Cyclisierungsversuche von Kretov, A. E. und Kul'chitskaya, N. E. (1956) mit P₂O₅, PCl₃ bei höherer Temperatur (Darstellung von N-Phenylmaleimid, N-p-Tolylmaleimid) erscheinen uns in Anbetracht des Elektronenmangels des Benzolringes der Sulfonamide (welcher Succinimid-Bildung begünstigt, Pyriadi, T. M., 1972) als zu hart.

Auch die Methode von Coleman, L. E. et al (1959) zur Darstellung der N-Alkylmaleimide in Xylol bei 170-180°C (mit anschließender Destillation) kann nicht zum Ziel führen. Falls keine Lösungsprobleme auftreten würden, wären unter diesen Bedingungen ebenfalls keine einheitlichen Produkte zu erwarten (einschließlich der Polymerisation $\left[\text{N}(\text{C(=O)CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C(=O)CH}_3)_2 \right]_x$ als Konkurrenz-Reaktion).

Der Versuch einer azeotropen Destillation mit Toluol unter milderer Bedingungen ist nicht durchzuführen, da sich das Sulfamid nicht löst.

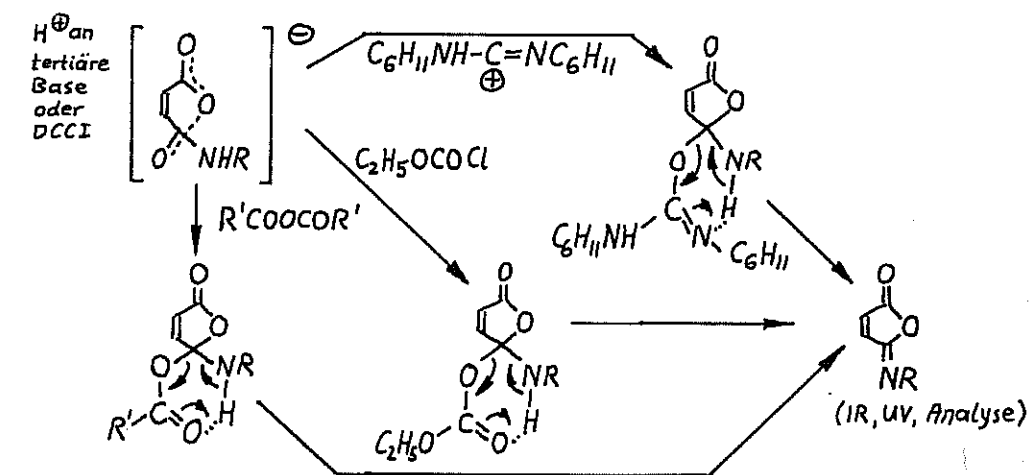
Eine Dehydratisierung mit Dicyclohexylcarbodiimid wurde nicht versucht, da Merz, H. et al (1965) schon negative Erfahrungen bei der Cyclisierung ihres N(4-Sulfophenyl)-maleinsäuremonoamids

mit diesem Substrat gemacht hatten. Ihre Methode mittels Dimethylanilin erscheint uns ebenfalls nicht geeignet. Sie erhielten 35-40 %iges Rohprodukt, das sie nicht reinigen konnten.

b. Dehydration, Reaktionsmechanismen

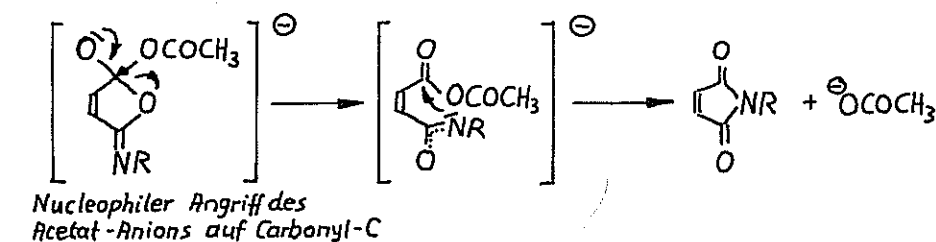
Im folgenden seien noch einige interessante Arbeiten mit Cyclisierungsagentien an Maleinsäuremonoamiden genannt. Die entsprechenden Reaktionsmechanismen (vorgeschlagen oder bewiesen), welche die späteren eigenen durchgeführten Cyclisierungen teilweise erklären können, werden mit angegeben. Die Ergebnisse der folgenden Arbeiten sind außerdem dazu geeignet, weitere Probleme der Cyclisierung der N^4 -Maleoyl- N^1 -Alkylsulfanilamide aufzuzeigen.

Cotter, J. et al (1961), synthetisierten N-Alkyl- und N-Aryl (Phenyl)-substituierte Isomaleimide und Bisomaleimide durch Dehydration von N-substituierten Maleamiden mit N,N'-dicyclohexylcarbodiimid, Äthylchloroformiat-Triäthylamin, Trifluoressigsäure-Triäthylamin. Diese N-substituierten Isomaleimide isomerisierten sie zu den symmetrischen N-substituierten Maleimiden in der Gegenwart von Na-acetat oder Triäthylammonium-acetat.



Sie fanden, daß die Dehydration von N-substituierten Maleamiden mit Acetanhydrid, in Gegenwart von Triäthylamin anstatt von Na-acetat, bessere Ausbeuten an Maleimid liefert (N-n-Butylmaleinsäuremonoamid zu N-n-Butylmaleimid).

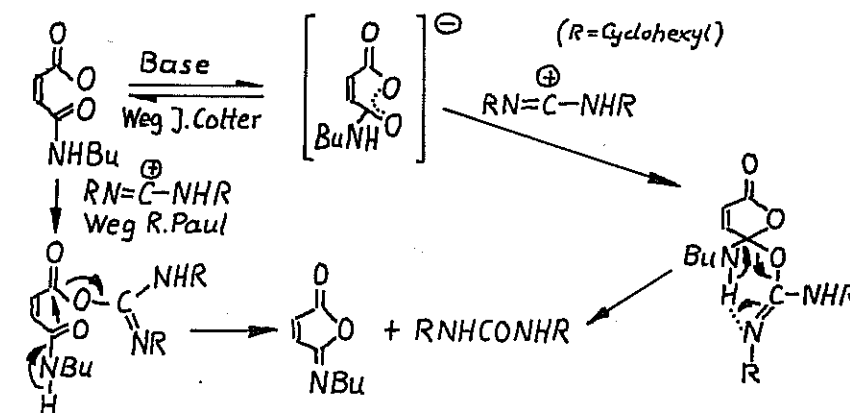
Für die Isomerisation vom Isomaleimid zum Maleimid formulieren sie folgenden Mechanismus:



Sie nehmen an, daß auch bei sofortiger Dehydratation, mittels Acetylchlorid-Triäthylamin, Acetanhydrid-Triäthylamin (oder Na-acetat), zu den N-substituierten Maleimiden, das Isomaleimid primäres Dehydrationsprodukt ist (N-n-Butylmaleinsäuremonoamid zu N-n-Butylisomaleimid in sehr geringer Ausbeute bei niedriger Temperatur).

Paul, R. und Kende, A.S. (1964), vergleichen zwei alternative Dehydrationsmechanismen mit DCCI an N-Butylmaleinsäuremonoamid zu N-Butylmaleisoimid und zeigen mit O^{18} -Markierung, daß der von Cotter, J. et al (1961), beschriebene Mechanismus der Dehydratation mit DCCI nicht stimmt.

Verwandte Mechanismen (Weg Paul, R.) beschreiben Roderick, W.R. (1964) und Hedaya, E. et al (1966), für die Trifluoracethanhydrid-Dehydratation.

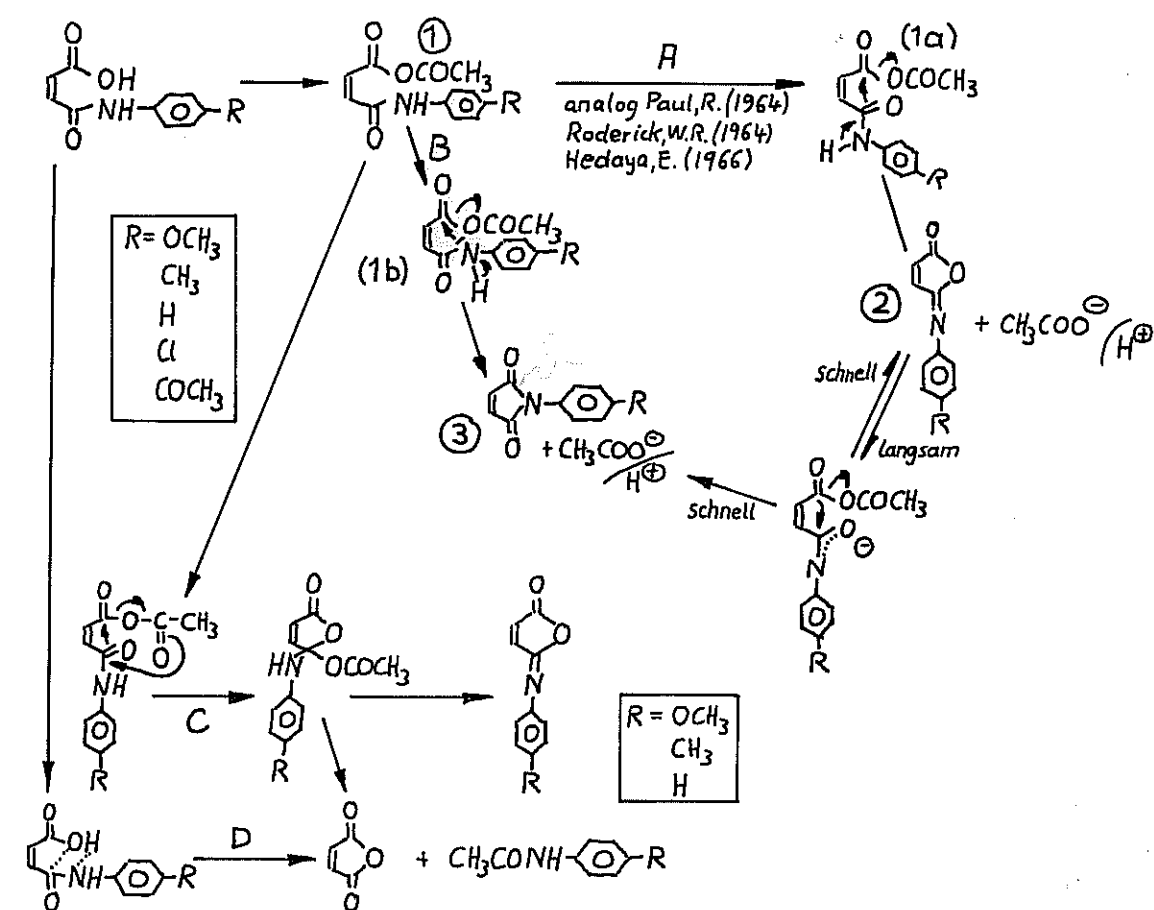


Die Dehydration von N-Arylmaleinsäuremonoamiden mit Acetanhydrid mit und ohne Na-acetat beschreibt Sauers, C.K. (1969). Er fand, daß bei der Dehydratation von N-Arylmaleinsäuremonoamiden mit Acetanhydrid alleine, Mischungen entstehen, in denen das Maleisoimid dominiert über das Maleimid. In der Gegenwart von Na-acetat wurde anfangs mehr Imid geformt und die Menge vom Maleimid zum Isoimid wuchs mit fallender Elektronendichte des Benzolringes. Die Geschwindigkeit der Umwandlung vom Maleisoimid

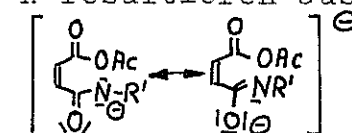
zum Maleimid war zu niedrig, um die Höhe der entstandenen Maleimid-Menge in Gegenwart von Na-acetat nach drei Minuten, erklären zu können. Die bei fortschreitender Reaktion entstehende Essigsäure kann die Umwandlungsreaktion beschleunigen, aber auch die Möglichkeit der Katalyse durch andere Spezies, welche in der Reaktionsmischung anwesend sind, kann nicht ausgeschlossen werden. In allen Dehydratationen, die über eine längere Zeitdauer verlaufen, muß das Imid durch Umwandlung des Isoimids erhalten worden sein.

In der wichtigsten 'Seitenreaktion' in Gegenwart von Na-acetat kann Acetanilid und Maleinsäureanhydrid entstehen (dies hauptsächlich bei großen Elektronendichten im Benzolkern).

Folgende Reaktionsmechanismen werden aufgrund der erhaltenen Ergebnisse angeboten:



Die hohen Ausbeuten an Isoimid (2) über Weg A resultieren aus der dipolaren Amid-Resonanzstruktur von (1) nach der Deprotonierung:



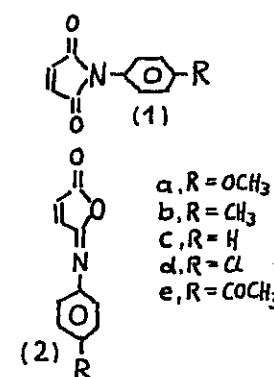
Das Acetat-Ion beschleunigt wahrscheinlich die Bildung des gemischten Anhydrids ① und außerdem muß es die Protonen-Abspaltung aus (1a und 1b) unterstützen.

Seine Ergebnisse erhielt er aus den NMR-Signalen der Reaktionsmischung.

TAFEL VII
NMR Daten für N-Arylmaleisoimide und N-Arylmaleimide^a

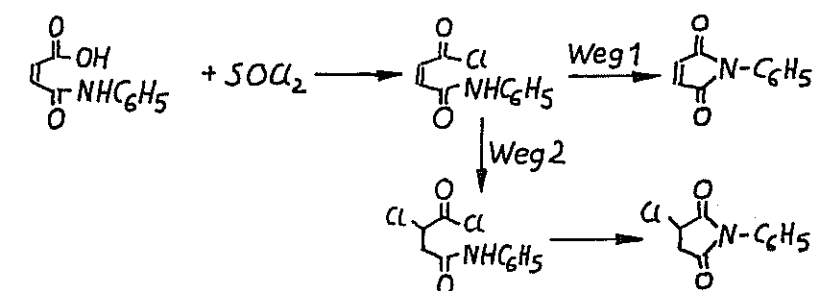
Subst.	Olefinische Protons		Aromatische Protons		Substituent protons, δ
	δ	J, cps	δ	J, cps	
2a	7.47, 6.76	5.5	7.50, 6.98	9	3.82
1a	6.91		7.27, 7.03	9	3.83
2b	7.50, 6.79	5.5	7.28		2.34
1b	6.91		7.28		2.38
2c	7.54, 6.84	5.5	7.38		
1c	6.93		7.44		
2d	7.53, 6.86	5.5	7.40		
1d	6.95		7.51, 7.41	9.5	
2e	7.58, 6.92	5.5	8.05, 7.35	8.5	2.58
1e	7.00		8.11, 7.58	8.5	2.60

^a Werte für δ relative zu TMS in Acetanhydrid.



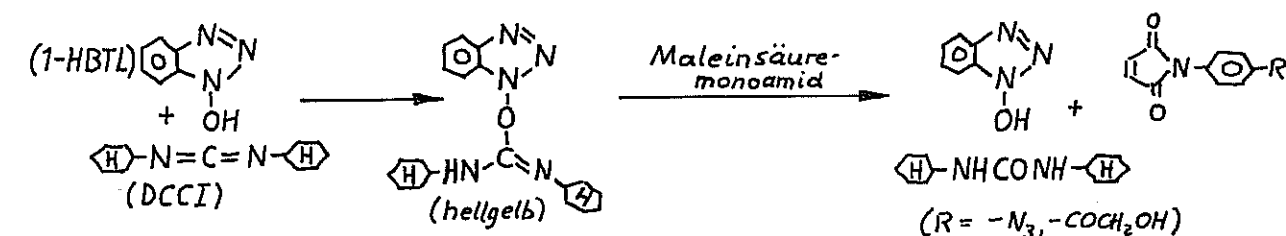
Den Gebrauch von Acetylchlorid-Triäthylamin, Acetanhydrid-Triäthylamin-Mischungen für die Synthese von Isomaleimiden aus Maleinsäuremonoamiden beschreiben Pyriadi, T.M. und Harwood, H.J. (1971). Sie untersuchten den Einfluß der Temperatur, der Amin- und Dehydratisierungs-Agens-Konzentrationen und des Lösungsmittels in der Darstellung von N-Alkylisomaleimiden und N-Phenylisomaleimid. Die Dehydratation von N-Phenylmaleinsäuremonoamid ergab mit Acetylchlorid-Triäthylamin (2-1 Mol pro Mol Säure) bei höherer Temperatur in Benzol (über 1-2 Stunden) 40-50 % reines Imid.

Die Reaktion von N-substituierten Maleinsäuremonoamiden mit Thionylchlorid und Chloracetylchlorid beschreibt Pyriadi, T.M. (1972). Bei sehr tiefen Temperaturen (-20°C) entsteht mit SOCl_2 (äquimolare Menge) und Triäthylamin (1 Mol pro Mol Säure) in CH_2Cl_2 in sehr geringer Ausbeute (ca. 3-4 %) das Maleimid. Bei N-Arylmaleinsäuremonoamiden mit Elektronenmangel nur α -Chloro-Succinimid:



Diese letzte Methode würde, aus dem gerade geschilderten Grund, wohl wenig geeignet sein für unsere Cyclisierungen.

Als letztes sei noch die Arbeit von Trommer, W. und Hendrick, M. (1973), erwähnt. Diese cyclisierten p-substituierte N-Phenyl-maleinsäuremonoamide ($-N_3$, $-COCH_2OH$) zu den, möglicherweise als Vernetzer von Globulären Proteinen dienenden, maleimiden in Methylenchlorid in Gegenwart von 1-Hydroxy-Benzotriazol und N,N'-dicyclohexylcarbodiimid bei $0^\circ C$ in Ausbeuten von 80 %:



Mit DCCI alleine wird bei vielen Aromaten (Elektronenmangel im Kern) keine Reaktion erzielt, mit 1-HBTL als Katalysator erfolgt schneller Umsatz zum Imid. Hier dürfte die Möglichkeit einer Einstufencyclisierung die entscheidende Rolle spielen, was teilweise durch eine sterisch günstigere Anordnung erreicht wird (außer der Bildung eines aktiven Harnstoffderivates).

Diese Methode könnte geeignet sein, die Schwierigkeit zu beheben, die Merz, H. et al (1965) mit DCCI alleine, bei ihrem Cyclisierungsversuch von N(4-Sulfophenyl)-maleinsäuremonoamid, hatten. Möglicherweise kann sie auch für unsere Cyclisierungen dienen.

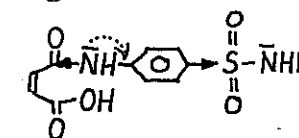
c. Diskussion zur Cyclisierung mit Na-acetat/Essigsäure, Reaktionsmechanismen

Nach den Ergebnissen mit Acetanhydrid-Na-acetat (Triäthylamin) soll nun noch einmal auf unser Cyclisierungsproblem mit dieser Methode eingegangen werden. Zunächst die hiermit gefundenen Ergebnisse:

Fallende Elektronendichte im Kern vom Aromaten begünstigt Imid-Bildung gegenüber dem Isoimid. Große Elektronendichte verschiebt die Reaktion zur Seitenreaktion einer Maleinsäureanhydrid- und Acetanilid-Bildung. Die Gegenwart von Na-acetat in

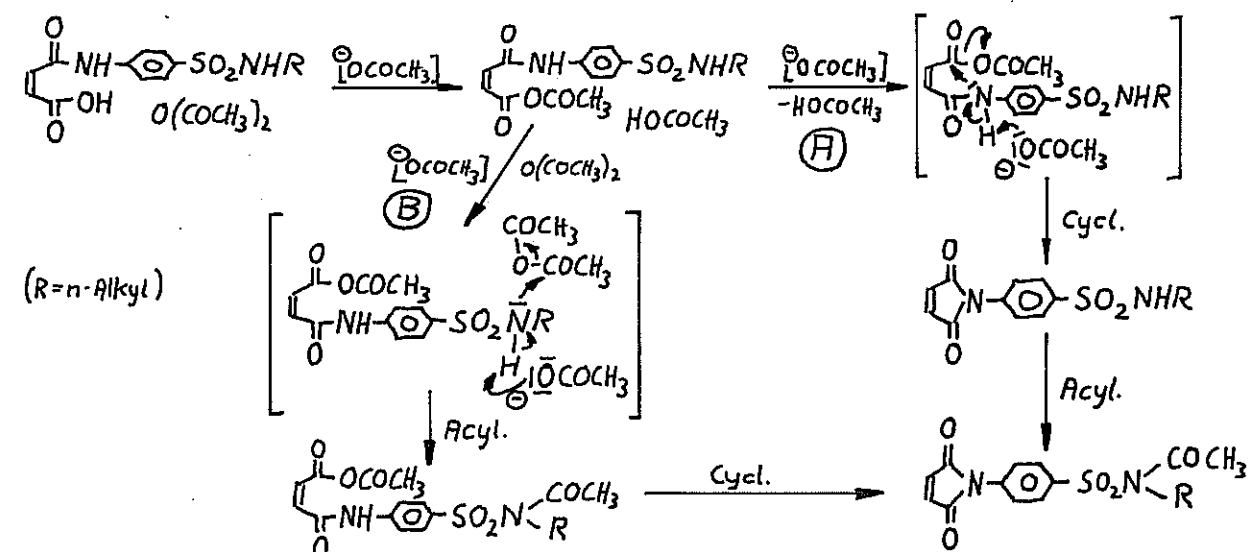
Acetanhydrid verschiebt auf die Seite vom Imid. Na-acetat beschleunigt die Bildung des gemischten Anhydrids und unterstützt die Abspaltung der Protonen. Durch Triäthylamin anstatt Na-acetat wird die Ausbeute am Imid erhöht. Hohe Ausbeuten an Isoimid bringen in Beziehung zu einer dipolaren Amid-Resonanzstruktur (bei Aromaten mit Elektronendefizit kaum möglich, daher hohe Ausbeute an Imid).

Nun zu den N⁴-Maleoyl-N¹-Alkylsulfanilamiden: durch die p-Substituenten am Kern ist jener Elektronenarm, wodurch die Isoimid-Bildung und die Reaktion zu Maleinsäureanhydrid und Acetanilid bei einer Cyclisierung in Acetanhydrid kaum mehr möglich sind.



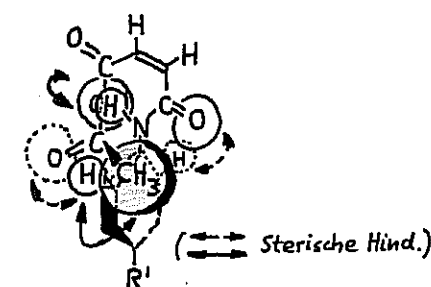
Die Verbindung enthält jedoch drei acide Funktionen, wobei das Verhältnis zweier (und die Nucleophilie der deprotonierten Spezies), nämlich -SO₂NHR und -CONHAr, für uns von Interesse sind.

Der erste Reaktionsschritt ist die Bildung des gemischten Anhydrids (Basenkatalysiert: Acetat, Triäthylamin) der Säurefunktion, als nächstes müßte jetzt die Abspaltung des Protons aus -CONHAr folgen, mit einem Angriff des jetzt nucleophilen Stickstoffs auf die gemischte Anhydrid-Struktur unter Abspaltung von Acetat (Weg A). Als Konkurrenz-Reaktion tritt allerdings die Abspaltung eines Protons aus -SO₂NHR mit anschließender Acylierung des entstandenen nucleophilen N auf (Weg B):



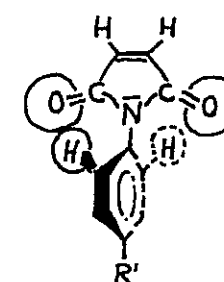
Durch die Anwesenheit der Alkylgruppe mit ihrem +I-Effekt wird die Acidität des $-\text{SO}_2\text{NH}-\text{R}$ abgeschwächt. Durch diese voluminösere Alkylgruppe (gegenüber H) wird auch der Angriff auf die NH-Gruppe erschwert (voluminösere Basen wie Triäthylamin vergrößern diesen Effekt). Die Nucleophilie des Phenyl-benachbarten N dürfte geringfügig steigen, da der Elektronenmangel des Kernes etwas gesenkt wird.

Auch die Struktur des Maleoylrestes sollte Reaktion an Phenyl-NH- begünstigen - dazu kommt die Fähigkeit des Acetanhydrids als polares protisches Lösungsmittel zu wirken und in Richtung auf $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktion zu verschieben.



Der Maleoylrest ist aufgrund seiner Mesomerien planar. Das Proton vom Stickstoff wird auf den Sauerstoff des gemischten Anhydrids gedrückt, wodurch die zu eliminierende Essigsäure schon vorgebildet ist. Durch die Mesomerie zwischen $\text{N}=\text{C}-\text{O}$ ist die zweite $-\text{CO}-$ Gruppe in Richtung des Stickstoff verschoben.

Der Katalysator $^-\text{OCOCH}_3$ muß jetzt praktisch nur noch die Nucleophilie des N, durch den Zug auf das Proton am N, vergrößern, um damit den Ringschluß unter Essigsäure-Eliminierung zu ermöglichen.



Im cyclischen Produkt sind die sterischen Hinderungen stark verringert und Elektronenwechselwirkung zwischen Maleimid und Benzolring ist eher möglich (wenn auch immer noch behindert).

Die Betrachtung zeigt, daß die Reaktion über Weg A begünstigt sein sollte. Durch eine kurze Reaktionszeit und nicht zu hohe Temperatur müßte anschließende Acylierung vermeidbar sein.

d. Ergebnisse unserer Maleinsäuremonoamid-Cyclisierung mit Na-acetat/Essigsäure

Diese Aspekte ermutigten uns diese Cyclisierungsmethode für die Alkylderivate, unter verschiedenen Reaktionszeiten und

Temperaturen, doch noch auszuprobieren. Daß unsere Hoffnung, ein nicht acyliertes Cyclisierungsprodukt zu erhalten, erfüllt wurde und wir schließlich auch das N(4-Sulfamoylphenyl)-maleimid erhielten, ist das Ergebnis einer systematischen Ausnutzung aller bei der Änderung der Reaktionsbedingungen gemachten Beobachtungen. Dabei waren die Tatsache, daß die N-substituierten Maleimide mit Hydroxylamin eine mit Fe^{III} -Ionen nachweisbare Hydroxamsäure bilden und die NMR-Spektroskopie, die wichtigsten Helfer.

TAFEL IIX

Ergebnisse der N⁴-Maleoyl-N¹-Alkylsulphanilamid Cyclisierung

N ¹ -Alkyl-	Zeit/min.	Temp./°C	Isoliert/%	Cycl.Pr./%	Cycl.Pr./%	
			Cycl.+off.Pr.	(aus NMR)	nicht acyliert	acyliert (aus NMR)
-n-Propyl-	90	95-100	50	100	67	33
	45	95-100	75	100	90	10
	5	95-98	70	100	100	-
-i-Propyl-	150	95-105	70	100	100	-
	180	90-97	55	100	-	100
-Methyl-	5	95-100	65	100	75	25
	3	85-90	60	100	100	-
	10	97-100	65	100	-	100
-H	10	78-81	20	100	20	80
	2	91	70	100	25	75
	30	60	25	30	100	-

Aus Tafel IIX ist zu ersehen, daß tiefere Temperatur - wodurch allerdings die Löslichkeit des offenen Produktes sinkt (und dadurch die Endausbeute an cyclischem Produkt) - und kürzere Reaktionszeit, die Isolierung des nichtacylierten Produktes vor der Acylierung gestattet. Die Ergebnisse sind auch ein Beweis für die Reaktion über den Weg A. Raumerfüllende Substituenten wie i-Propyl verhindern ebenfalls eine weitere Acylierung

TAFEL V
HOOC-CH=CH-CONH-C₆H₄-SO₂NHR N⁴-Maleoyl-N¹-Alkylsulphanilamid aus N¹-Alkylsulphanilamid

N ¹ -Alkyl-	Molge- wicht	N ⁴ -Maleoyl- N ¹ -Alkyl-	Ausbeute %	Smp. °C	Molge- wicht	%C		%H		%N	
						ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
N ¹ -H	172.21	Maleoylsulphanilamid	87	186	270.27	44.00	44.89	3.66	4.07	10.62	10.66
N ¹ -Methyl-	186.24	-N ⁴ -Methyl-	88	168	284.30	46.40	46.64	4.22	4.33	9.85	9.64
N ¹ -Dimethyl-	200.26	-N ⁴ -Dimethyl-	79	198	298.32	48.30	48.46	4.70	5.00	9.40	9.48
N ¹ -n-Propyl-	214.33	-N ⁴ -n-Propyl-	90	158	312.39	49.90	50.20	5.12	5.42	8.96	8.91
N ¹ -i-Propyl-	214.33	-N ⁴ -i-Propyl-	93	178	312.39	49.90	50.28	5.12	5.45	8.96	9.23
N ¹ -n-Pentyl-	242.35	-N ⁴ -n-Pentyl-	89	166	340.41	52.90	52.74	5.87	6.10	8.23	8.05
N ¹ -n-Heptyl-	270.40	-N ⁴ -n-Heptyl-	78	167	368.46	55.35	55.36	6.51	6.79	7.59	7.49
N ¹ -n-Nonyl-	298.45	-N ⁴ -n-Nonyl-	83	168	396.51	57.50	57.42	7.06	7.00	7.06	6.92

TAFEL VI
N⁴-Maleoyl-N¹-Alkyl-4-sulfamoylphenyl-maleimid aus N⁴-Maleoyl-N¹-Alkyls.a.
Schmelzpunkte unkorrigiert

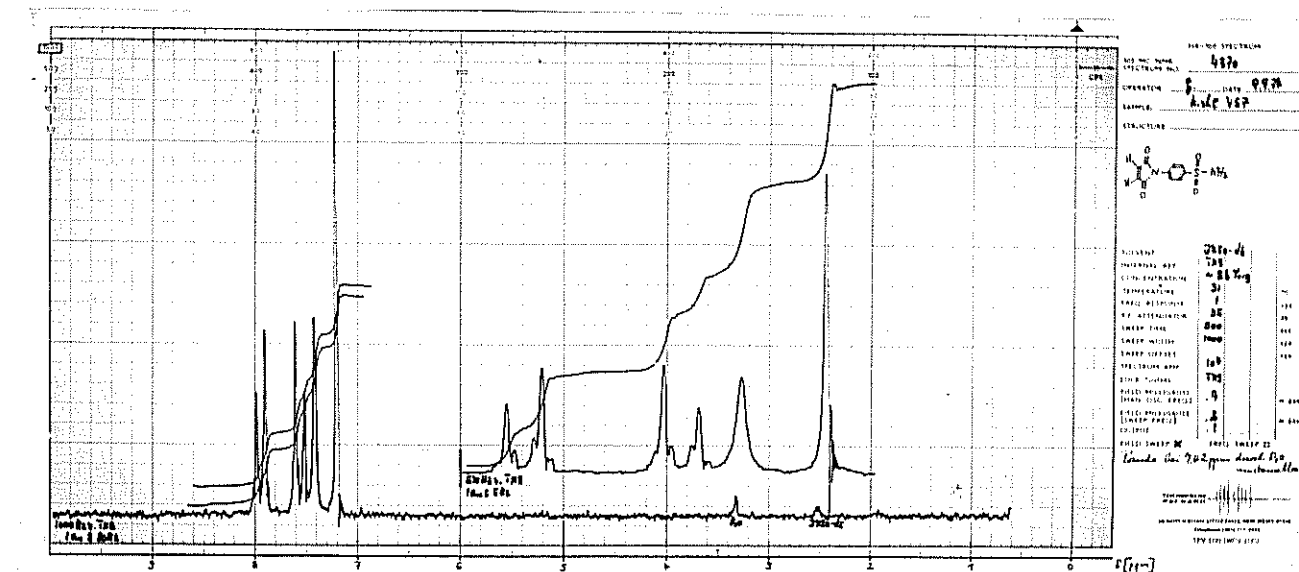
N ⁴ -Maleoyl- N ¹ -Alkyl-	Molge- wicht	Endprodukt - Maleimid.	Ausbeute %	Smp. °C	Molge- wicht	%C		%H		%N	
						ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Maleoylsulphanilamid	270.27	N ⁴ -4-sulfamoylphenyl-	8-17	230	252.27	47.55	47.56	3.17	3.44	11.10	11.09
-N ¹ -Methyl-	284.30	N(N-Methyl)-	59	124	266.30	49.60	49.28	3.76	4.08	10.51	10.34
-N ¹ -Dimethyl-	298.32	N(N-Dimethyl)-	82	142	280.32	51.40	51.32	4.28	4.56	9.99	9.70
-N ¹ -n-Propyl-	312.39	N(N-n-Propyl)-	52	111-12	294.39	53.00	52.67	4.76	5.05	9.51	9.09
-N ¹ -i-Propyl-	312.39	N(N-i-Propyl)-	70	172	294.39	53.00	52.96	4.76	5.02	9.51	9.45
-N ¹ -n-Pentyl-	340.41	N(N-n-Pentyl)-	86	167	322.41	55.85	55.72	5.59	5.75	8.69	8.22
-N ¹ -n-Heptyl-	368.46	N(N-n-Heptyl)-	91	167	350.46	58.20	58.02	6.27	6.57	7.98	7.91
-N ¹ -n-Nonyl-	396.51	N(N-n-Nonyl)-	93	167	378.51	60.20	60.93	6.86	6.96	7.40	7.21
Maleoylsulphanilamid	270.27	N(N-Acetyl)-	64	167	294.27	48.70	48.68	3.40	3.68	9.51	9.58
-N ¹ -Methyl-	284.30	N(N-Acetyl-N-Methyl)-	54	118	308.30	50.55	50.37	3.89	3.99	9.08	9.04

a Schmelzpunkte unkorrigiert b Sulfanilamid = s.a.

6. NMR, IR und MS-Spektren zu den dargestellten Maleimiden

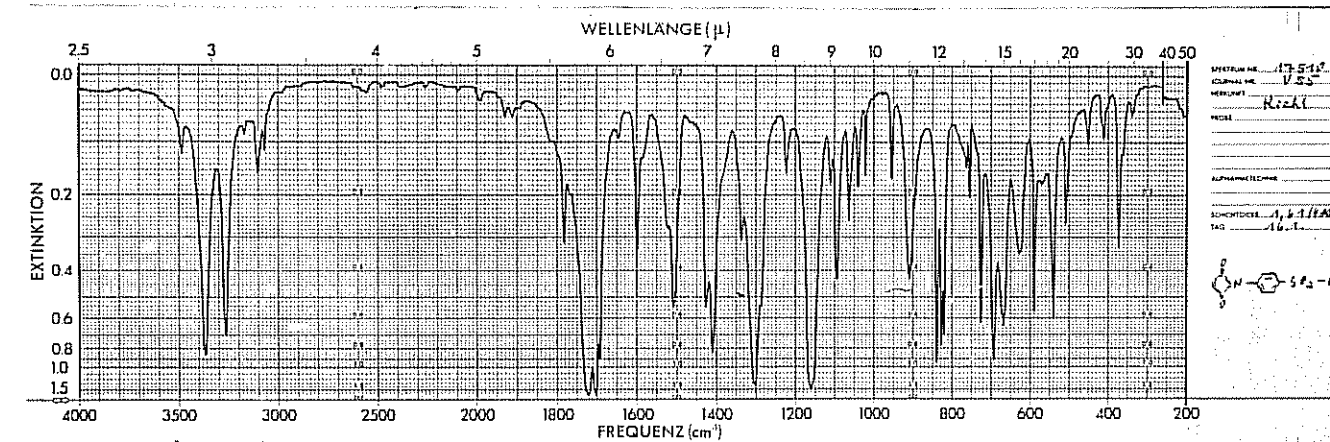
a. N(4-sulfamoylphenyl)-maleimid

NMR:



IR:

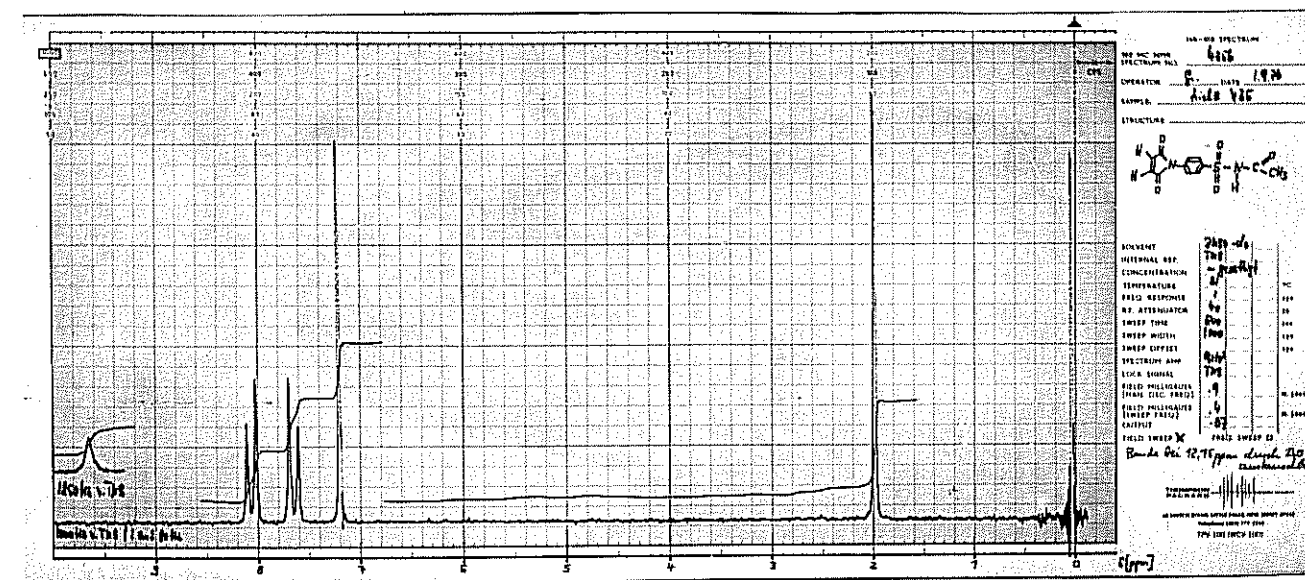
(KJ-Preßling)



MS: m/e-I%, 252-100 (Molpeak), 236-47, 188-9, 172-55, 144-8, 116-10, 58-17, 43-57.

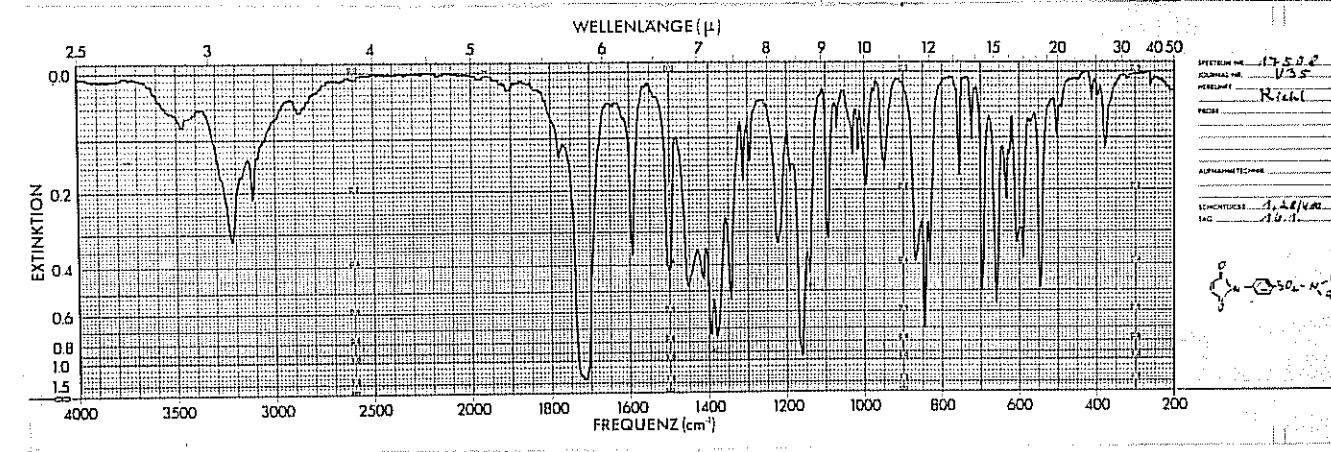
b.N(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid

NMR:



IR:

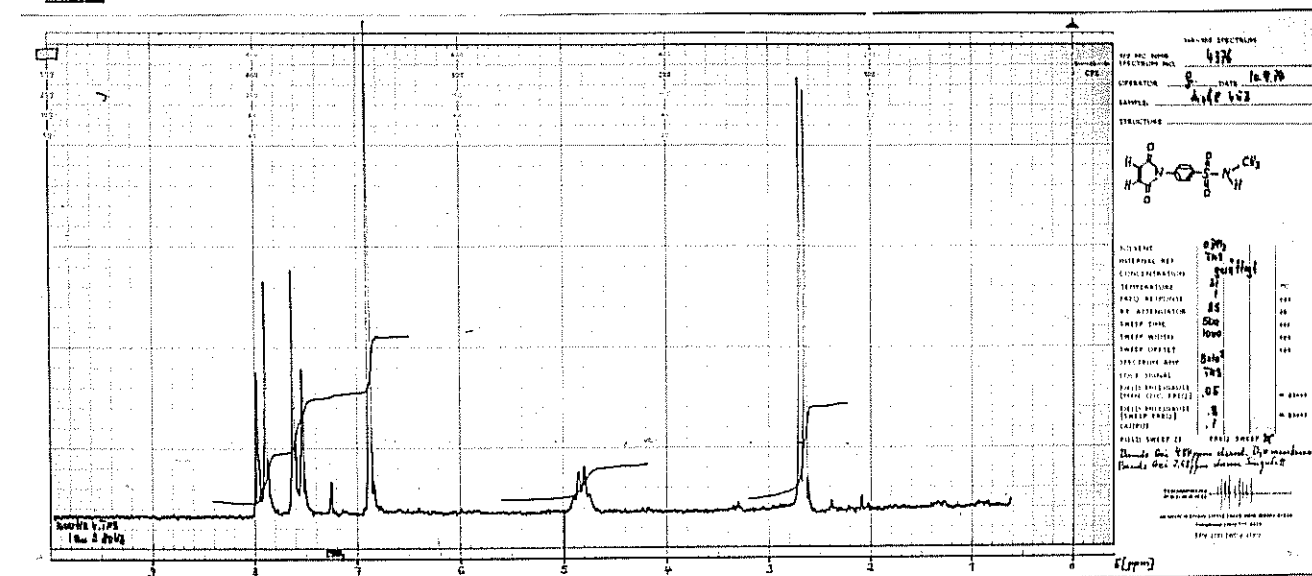
(KJ-Preßling)



MS: m/e-I%, 294-0,2 (Molpeak), 252-0,6, 236-3, 230-4, 189-100,
172-21, 144-4, 116-5, 90-4, 82-5, 54-4, 43-21.

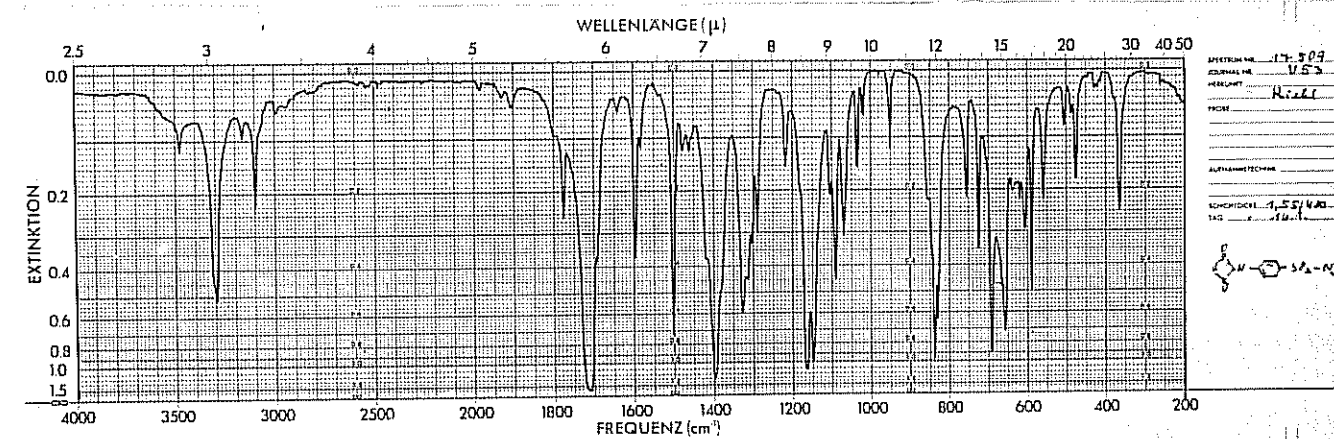
c.N(N-Methyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid_

NMR :



IR:

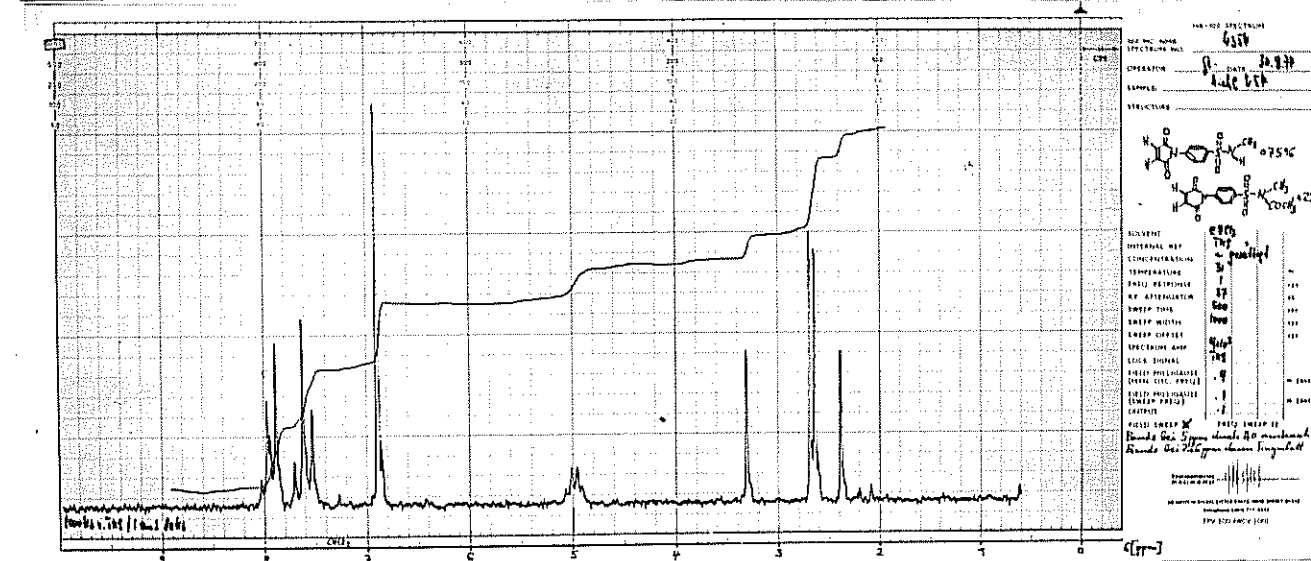
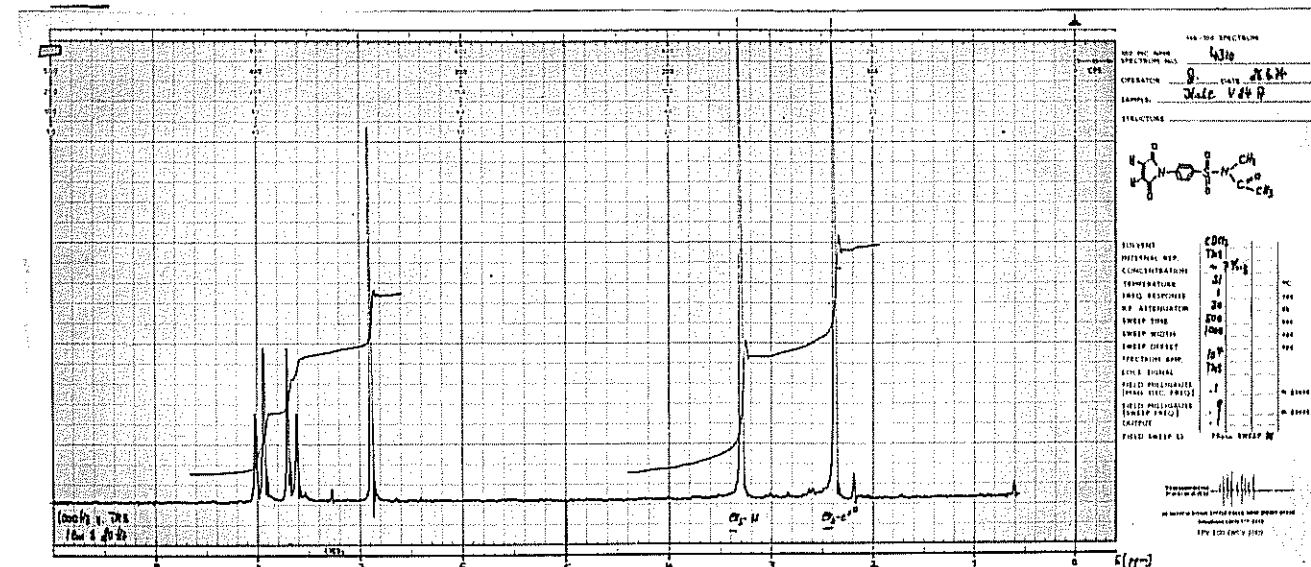
(KJ-Preßling)



MS: m/e-I%, 266-40 (Molpeak), 236-18, 220-2, 202-31, 188-10,
172-100, 144-22, 116-32, 90-15, 82-20, 54-17.

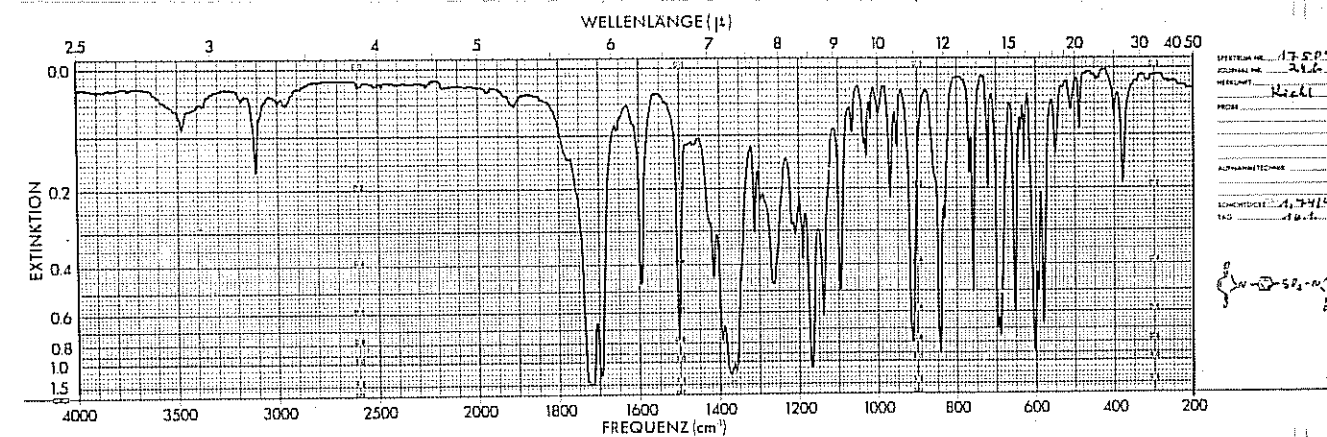
d.N(N-Acetyl-N-Methyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimid

NMR:



IR:

(K₂Preßling)

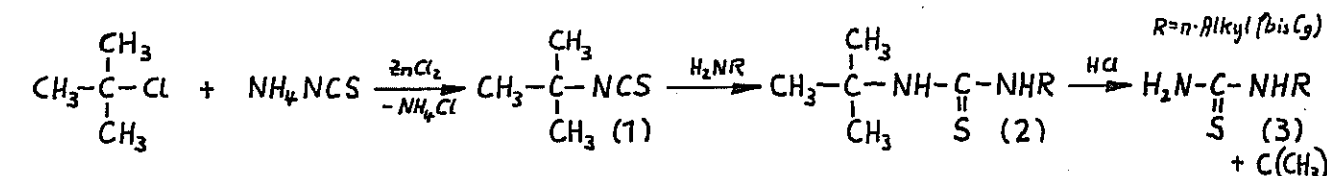


MS: m/e-I%, 309-1 (Molpeak+1), 266-3, 244-22, 236-28, 220-5, 202-23, 188-10, 172-100, 144-18, 116-23, 90-14, 82-26, 56-43.

B. Synthese der monosubstituierten Thioharnstoffe $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NHR}$ $\text{R}=\text{Alkyl (bis C}_9\text{)}$

Als Ausgangsmaterial dient für die Darstellungen Ammoniumthiocyanat, welches in Hinsicht auf eine radioaktive Markierung mit ^{35}S -markierbar ist.

Dargestellt wurden von Nair, G.V. (1966), die Derivate bis $\text{R} = \text{Butyl}$ und auch charakterisiert. Wir synthetisierten unsere Derivate bis $\text{R} = n\text{-Nonyl}$ analog diesem Verfahren (Teil III):



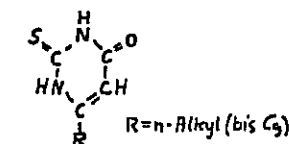
Er beschreibt die Darstellung des tert.-Butylisothiocyanates (1) mit einer Endausbeute von 98%. Dies können wir nicht bestätigen: bei unseren Ansätzen erhalten wir höchstens 45%. Anhand des Brechungsindex, $n_D^{25}: 1,4770$, kann diese Substanz charakterisiert werden - auch dies wird von Nair nicht angegeben.

Für eine radioaktive Markierung muß die Ausbeute dieser Stufe erhöht werden.

Bei der Darstellung des 1-substituierten-3-tert.-butyl-Thioharnstoffs (2) können ausbeuten um 90%, wie bei Nair beschrieben gefunden werden. Diese Substanzen werden, da sie sehr sauber anfallen, ohne Umkristallisation in die nächste Stufe eingesetzt.

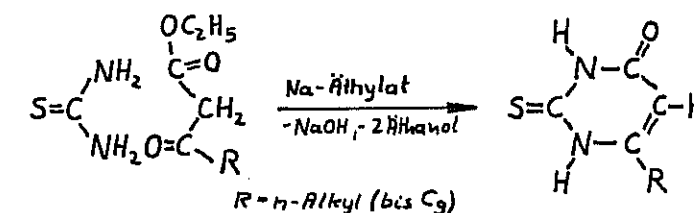
Auch die Abspaltung der tert.-Butylgruppe verläuft unter den von Nair angegebenen Ausbeuten von ca. 90%.

C. Synthese der 6-Alkyl-2-Thiouracile



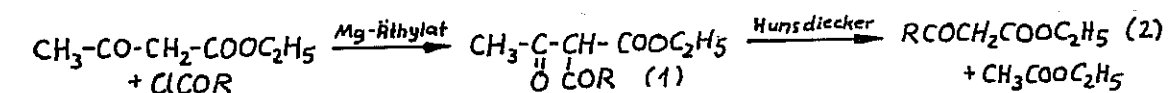
Die Synthese erfolgt durch Kondensation von Thioharnstoff und den entsprechenden β -Ketoestern mit Hilfe von Na-Äthylat in Ausbeuten (bezogen auf den β -Ketoester) von 94-99% (Anderson, G.W. et al, 1945, Teil III); **bisher dargestellt bis $\text{R} = n\text{-Pentyl (C}_5\text{)}$.**

Der Thioharnstoff kann in Hinsicht auf eine ^{35}S -Markierung leicht aus Ammoniumthiocyanat hergestellt werden.



Die höheren β -Ketoester (2) können über die Acylacetessigester (1) durch Hunsdiecker-Esterspaltung dargestellt werden (Organikum, 1971b; Teil III).

Die Acylacetessigester werden aus Acetessigsäureäthylester und dem Acylchlorid mit Magnesium-Äthylat als Hilfsbase gewonnen (Organikum, 1971a; Teil III):



Es werden die rohen Acylacetessigester der Esterspaltung nach Hunsdiecker unterworfen. Die so erhaltenen β -Ketoester werden durch Hochvakuum-Destillation über eine 20 cm Vigreux-Kolonne gereinigt, wobei die höheren Produkte, wie erwartet, immer schwerer übergehen (mit Zersetzung). Durch Gaschromatographie wird die Reinheit der einzelnen Fraktionen untersucht. Zur Charakterisierung verwendet werden kann der Brechungsindex- n_D^{25} . Es ergeben sich Ausbeuten (bezogen auf das Acylchlorid) von 52-43 Prozent, die Reinheit liegt bei 82-86 %. Diese Fraktionen können ohne weitere Reinigung mit Thioharnstoff umgesetzt werden.

TAFEL IX

$H_2^3N-C(=S)-NH^+$ N-monosubstituierte-Thioharnstoffe

1-monosubs.-3-tert.-butyl-Thioharnstoff				1-monosubs.-Thioharnstoffe					
Eingesetztes Amin	n-Alkyl	Molge- wicht	Ausbeute Smp ^a %	%C ber.	%C gef.	%H ber.	%H gef.	%N ber.	%N gef.
n-Propylamin	1-n-Propyl-	174.31	90	58					
n-Pentylamin	1-n-Pentyl-	202.37	88	63-64					
n-Heptylamin	1-n-Heptyl-	230.42	93	Öl					
n-Nonylamin	1-n-Nonyl-	258.47	90	Öl					

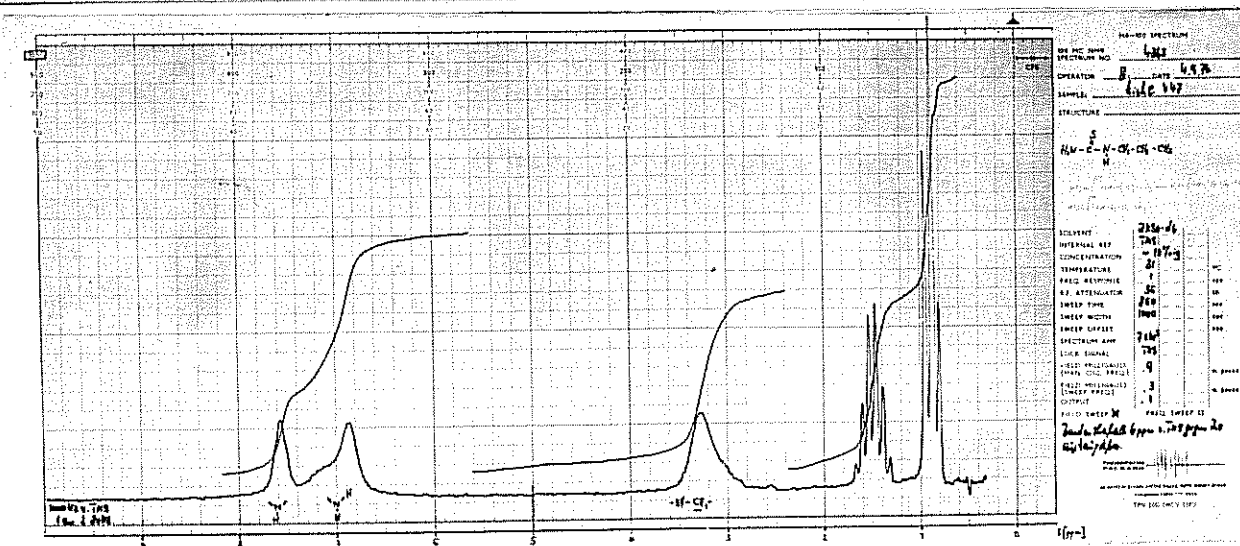
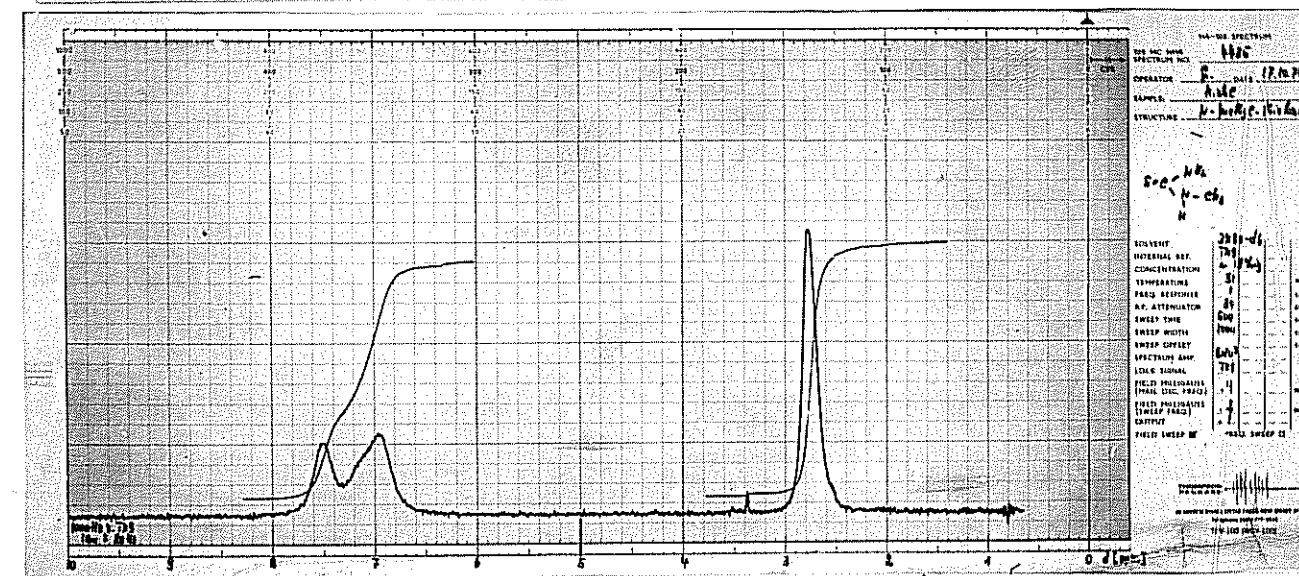
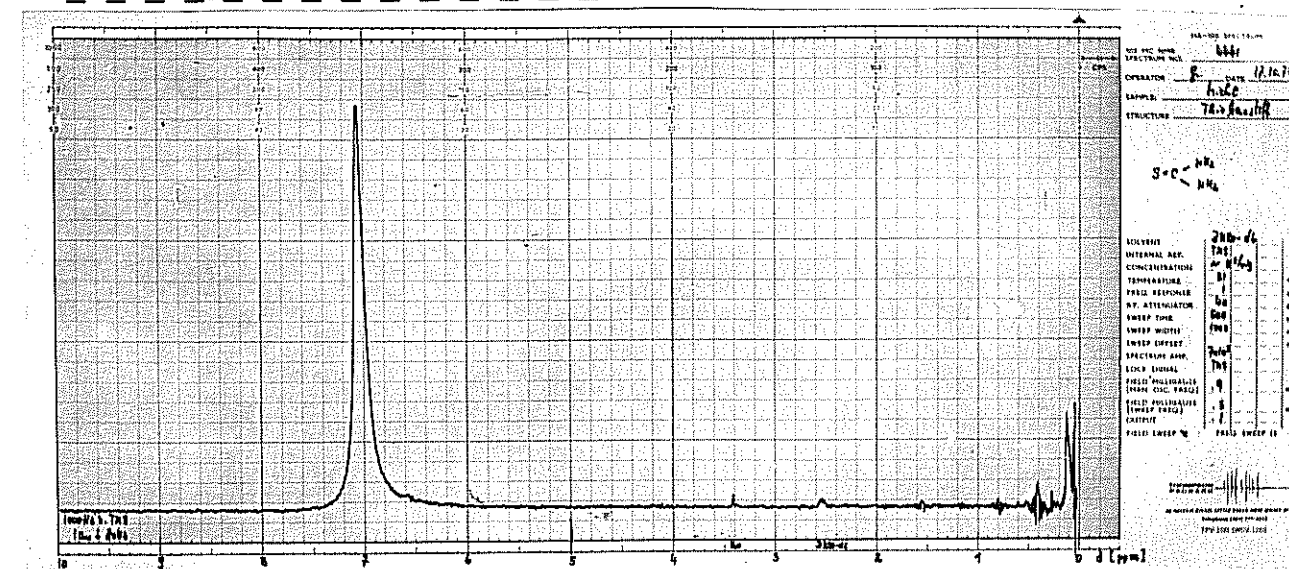
a Schmelzpunkte unkorrigiert Lit.: Nair, G.V. (1966)

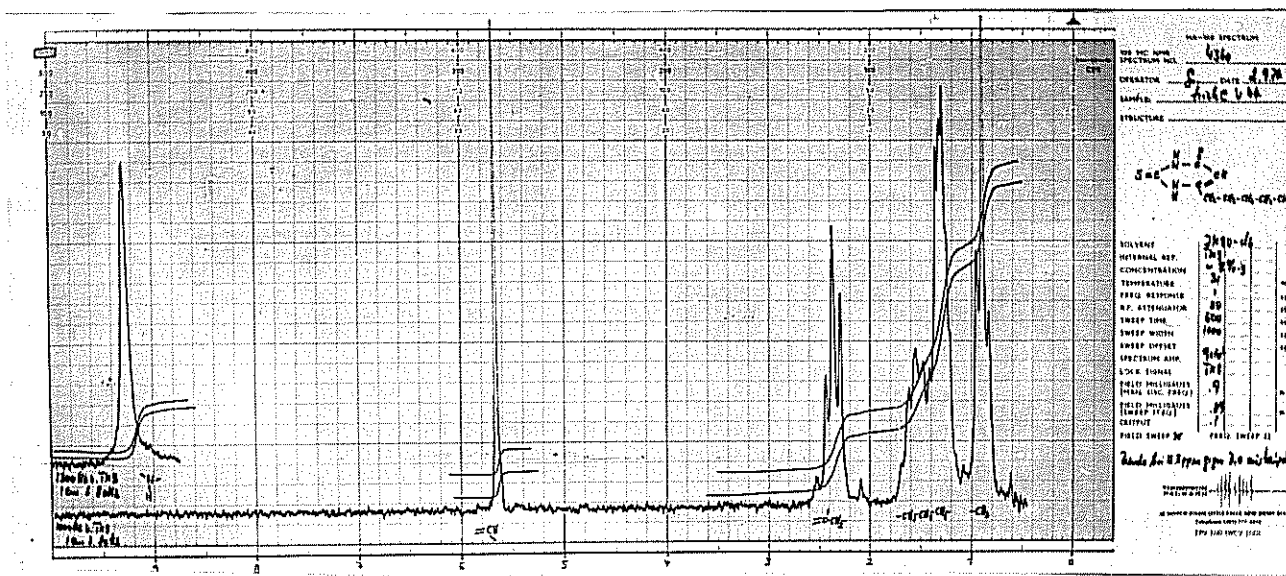
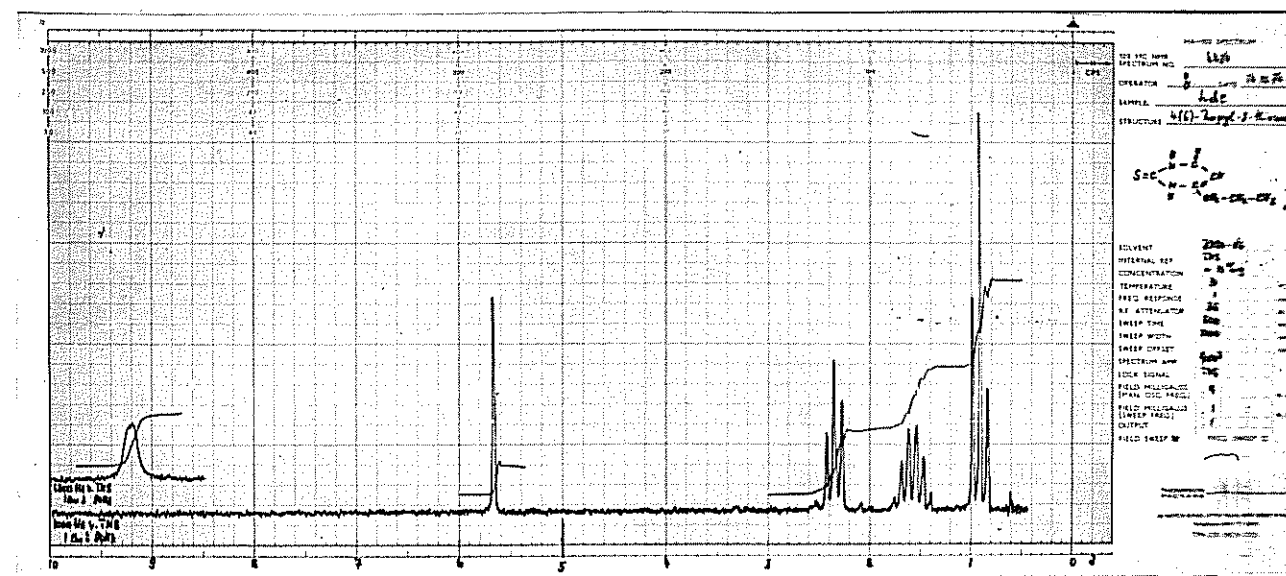
TAFELIX

n-Äcylsäureäthylester				6-n-Alkyl-2-Thiouracil												
Eingesetztes Säurechlorid	n-Äcyl-	Dest.-Übergang Druck/mm	Ausbeute %	Rein- heit/%	n_D^{25}	n-Alkyl-	Molge- wicht	Ausbeute %	Smp. °C	%C ber. gef.	%H ber. gef.	%N ber. gef.				
n-Capron-	n-Caproyl-	13	113-121	52	82	1.4381	6-n-Pentyl-	198.37	95	151-52	54.45	54.70	7.06	6.95	14.11	13.91
n-Capryl-	n-Octoyl-	2-3	119-133	51	86	1.4397	6-n-Heptyl-	226.42	98	146-49	58.30	58.57	7.94	8.06	12.38	12.19
n-Caprin-	n-Dekoyl-	0.4-1.0	107-135	43	85	1.4447	6-n-Nonyl-	254.48	95	135-38	61.30	61.61	8.64	8.78	11.00	11.13

^a Schmelzpunkte unkorrigiert ^b Lit.: Anderson, G.W. et al. (1945)

a. NMR-Spektren der Thioharnstoffe





III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Hilfsmittel

Zur Charakterisierung und Identifizierung der einzelnen Verbindungen wurden die Schmelzpunkte, Siedepunkte, Brechungsindices, Elementaranalysen, IR-Spektroskopie, Massenspektroskopie, UV-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie, Gas- und Dünnschichtchromatographie herangezogen.

Die Kinetik wurde mittels UV-Absorption verfolgt. Für die schnellen Reaktionen verwendeten wir eine Stopped-Flow-Apparatur (Aminco DW 2 mit zugehörigem Stopped-Flow-Zusatz).

1. Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden DC-Fertigplatten von Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄ Schichtdicke 0,25 mm.

Als Laufmittel verwendeten wir

a) sauer: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ - 50/30/4/8 ml

b) basisch: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ conc. - 130/70/8/0,5 ml

beide Mischungen von Bäumlein, E. (unveröffentlicht) erfolgreich verwendet.

Das Sprühmittel zum Nachweis der cyclischen Maleimide nach Whittacker, V.P., Wijesundera, S. (1952), Biochem. J. 51, 348:

Lösung a: 20 g Hydroxylammoniumchlorid in 50 ml Wasser lösen

Die Lösung mit Äthanol auf 200 ml auffüllen und kühl aufbewahren.

Lösung b: 50 g Kaliumhydroxid in möglichst wenig Wasser lösen

Dann mit Äthanol auf 500 ml auffüllen.

Sprühlösung I: 1 Vol. a mit 2 Vol. b mischen. Das ausfallende KCl abfiltrieren. Die so erhaltene Sprühlösung I im Kühlschrank aufbewahren (ca. 2 Wochen haltbar).

Sprühlösung II: 10 g feinstgepulvertes Fe(III)-chlorid

($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in 20 ml HCl (36%ig) lösen. Die Lösung solange mit 200 ml Diäthyläther schütteln bis eine homogene Mischung entstanden ist. Die Sprühlösung II ist gut verschlossen längere Zeit haltbar.

2. Ausgangsmaterialien, die nicht selbst hergestellt wurden

J.T.Baker chem.Co: Monomethylamin

Barth: β -Lactoglobulin vom Rind 3 mal krist. (Biomol)

BASF: Isopropylamin, Acetessigsäureäthylester (vor Gebrauch dest.)

Fluka: Maleinsäureanhydrid, Essigsäureanhydrid,

n-Propylamin, n-Pentylamin, n-Heptylamin, n-Nonylamin,

Ammoniumthiocyanat, Thioharnstoff, N-Methylthioharnstoff,

N-Äthylthioharnstoff, 4(6)-Methyl-2-Thiouracil,

4(6)-Propyl-2-Thiouracil,

KJ (neutral z.An.), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (z.An.),

0,1 N-Jodlösung (gegen Stärke titriert)

Merck-Schuchardt: Tert. Butylchlorid, Capronsäurechlorid,

Caprylsäurechlorid, Caprinsäurechlorid.

Die aufgeführten Namen sind auch die Handelsbezeichnungen.

Im Hause waren vorhanden: Dimethylamin, 2-Thiouracil.

3. Lösungsmittel

Es wurden nur reinste Lösungsmittel - hauptsächlich von Merck - verwendet, welche teilweise wasserfrei gemacht werden mußten nach herkömmlichen Methoden: Äthanol wurde über Mg-Spänen getrocknet, Äther absolutiert über Na-Draht, Aceton über Molekularsieb.

B. Synthesen

1. Darstellung der N^4 -Acetyl- N^1 -n-Alkylsulfanylamide

a. - N^1 -Methyl-

7,15 g Monomethylamin (0,23 Mol) in 50 ml Wasser eingasen, dazu 28,8 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ (0,1 Mol) einrühren; 46,74 g 4-Acetaminobenzolsulfochlorid (A.b.s.; 0,2 Mol) portionsweise innerhalb 5 Min. zugeben (Temp.anstieg von 25°C auf 42°C); nochmal 50 ml Wasser zulaufen lassen. Nun 2 Std. bei 30°C rühren (Probe in 2 N NaOH klar löslich), abkühlen auf 0°C, 10 Min. bei 0°C rühren, absaugen, waschen mit viel Wasser, trocknen über KOH und H_2SO_4 conc. im Vakuum über Nacht. Ausbeute: 38,7 g (84%) Smp.: 181°C
DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, **S.20.**

b. - N^1 -Dimethyl-

28,8 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ (0,1 Mol) in 50 ml Wasser lösen, dazu 30 ml ca.40%ige wässr. Dimethylamin-Lösung (0,23 Mol) einrühren; 46,74 g Acetaminobenzolsulfochlorid (0,2 Mol) portionsweise innerhalb 5 Min. zugeben (Temp.anstieg von 25°C auf 41°C); nochmal 30 ml Wasser zulaufen lassen. Nun 2 1/2 Std. bei 30°C rühren (Probe in 2 N NaOH klar löslich), abkühlen auf 0°C, 10 Min. bei 0°C rühren, absaugen, mit viel Wasser waschen, trocknen über KOH und H_2SO_4 conc. im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 38 g (78%) Smp.: 135°C
DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, **S.20.**

c. - N^1 -Isopropyl-

analog b. mit 19,4 ml (13,6 g; 0,23 Mol) Isopropylamin

d. - N^1 -n-Propyl-

analog b. 0,1 Mol-Ansatz; 9,6 ml (6,8 g; 0,115 Mol) n-Propylamin

e. -N¹-n-Pentyl-

analog b. mit 27 ml (20,1 g; 0,23 Mol) n-Pentylamin.
4 Std. bei 30°C rühren (Probe nach 3 Std. nur teilweise gelöst
in 2 N NaOH).

f. -N¹-n-Heptyl-

analog b. mit 34,2 ml (26,5 g; 0,23 Mol) n-Heptylamin.
20 Std. bei 30°C rühren (Probe kaum in 2 N NaOH löslich).

g. -N¹-n-Nonyl-

analog b. mit 40 ml (31,5 g; 0,22 Mol) n-Nonylamin und zur
besseren Lösung 10 ml Äthanol. 18 Std. bei 30°C rühren.

2. Darstellung der N¹-n-Alkylsulfanilamide

a. -N¹-Methyl-

11,41 g N⁴-Acetyl-N¹-Methylsulfanilamid (0,05 Mol) 30 Min.
mit 70 ml 18,5%iger HCl (klare Lösung ab ca. 80°C) Rückfluß
kochen, abkühlen, unter Eiskühlung mit Na₂CO₃-Lösung (mit ca.
60 g Na₂CO₃ · 10H₂O in 100 ml Wasser) auf pH 6 eustellen, absaugen,
mit wenig Wasser waschen (Substanz löslich!), trocknen über
KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 7,6 g (82%) Smp.: 110°C

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C, H, N in Ordnung, S. 20.

Die Darstellung der anderen Sulfanilamide erfolgt analog.
Die höheren Alkylsulfanilamide werden immer weniger wasserlöslich

b. -N¹-n-Pentyl-

analog a. 1 Std. Rückfluß, Niederschlag zur Entfernung des
NaCl ein paarmal mit Wasser aufschlämmen, trocknen über P₄O₁₀
bei 50°C im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 11,3 g (93,5%) Smp.: 120-43°C

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C, H, N, in Ordnung, S. 20.

N^1 -n-Heptyl- und N^1 -n-Nonylsulfanilamid werden analog b. hergestellt.

3. Darstellung der N^4 -Maleoyl- N^1 -n-Alkylsulfanilamide

Bei allen Ansätzen: Apparatur mit $CaCl_2$ -Rohr und Verwendung von wasserfreiem Aceton.

a. Maleoylsulfanilamid

13,78 g (0,08 Mol) Sulfanilamid in 70 ml Aceton lösen, auf $40^\circ C$ aufheizen, bei $40^\circ C$ 7,84 g (0,08 Mol) Maleinsäureanhydrid in 25 ml Aceton zutropfen (Gelbfärbung), 3 Std. bei $30^\circ C$ rühren (Niederschlagsbildung nach 5 Min.), 15 Min. bei $0^\circ C$ rühren, absaugen, mit wenig Aceton waschen, trocknen über Blaugel bei $75^\circ C$ im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 19 g (87,5%) Smp.: $186^\circ C$ (Zers.)

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C, H, N in Ordnung, **S. 31**.

b. N^4 -Maleoyl- N^1 -Methylsulfanilamid

analog a. mit 15,16 g (0,0813 Mol) N^1 -Methylsulfanilamid in 60 ml Aceton; 7,98 g (0,0813 Mol) Maleinsäureanhydrid in 25 ml Aceton.

c. N^4 -Maleoyl- N^1 -Dimethylsulfanilamid

analog a. mit 6,8 g (0,034 Mol) N^1 -Dimethylsulfanilamid in 40 ml Aceton; 3,34 g (0,034 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

d. N^4 -Maleoyl- N^1 -n-Propylsulfanilamid

analog a. mit 3,5 g (0,0163 Mol) N^1 -n-Propylsulfanilamid in 30 ml Aceton; 1,6 g (0,0163 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

e. N⁴-Maleoyl-N¹-Isopropylsulfanilamid

analog a. mit 7 g (0,0326 Mol) N¹-Isopropylsulfanilamid in 40 ml Aceton; 3,2 g (0,0326 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

f. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Pentylsulfanilamid

analog a. mit 11 g (0,0454 Mol) N¹-n-Pentylsulfanilamid in 45 ml Aceton; 4,45 g (0,0454 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

Ausbeute: 9,2 g Smp.: 157-59°C

Weitere 4,58 g aus der Acetonlösung mit Wasser ausgefällt.

Smp.: 156-58°C

Ausbeute insgesamt: 13,8 g (89%)

DC (bas.): Beide Fraktionen sehr wenig verunreinigt.

Elementaranalyse: C,H,N bei beiden Fraktionen in Ordnung.

Die Reinigung erfolgt über das Na-salz. Smp.: 166°C

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, **S.31.**

g. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Heptylsulfanilamid

analog f. mit 12,1 g (0,0447 Mol) N¹-n-Heptylsulfanilamid in 50 ml Aceton; 4,39 g (0,0447 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

Ausbeute: 12,87 g (78%) Smp.: ab 160°C sinter

DC (bas.): wenig verunreinigtes Produkt.

Nach der Reinigung über das Na-salz, Smp.: 167°C

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, **S.31.**

h. N⁴-Maleoyl-N¹-n-Nonylsulfanilamid

analog f. mit 13,6 g (0,0455 Mol) N¹-n-Nonylsulfanilamid in 55 ml Aceton; 4,46 g (0,0455 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml Aceton.

Ausbeute: 15,01 g (83,2%) Smp.: ab 162°C sinter

Nach der Reinigung über das Na-salz, Smp.: 168°C

DC (bas.): 1 Peak Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, **S.31.**

4. Cyclisierung der N⁴-Maleoyl-N¹-n-Alkylsulfanilamide

Bei allen Ansätzen: Apparat mit CaCl₂-Rohr und Verwendung von wasserfreiem Na-acetat.

a. N(4-Sulfamoylphenyl)-maleimid

Versuch I: 5,4 g (0,02 Mol) Maleoylsulfanilamid mit 1,2 g Na-acetat und 55 ml Essigsäureanhydrid auf 91°C aufheizen, 2 Min. bei 91°C rühren, heiß in 280 ml Eiswasser filtrieren (sofort Niederschlagsbildung), 20 Min. bei 0°C rühren, absaugen, mit viel Wasser waschen, trocknen über KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht. Ausbeute: 3,55 g Smp.: 158-92°C

DC (bas.): 2 cycl. Produkte NMR: 25% nichtacyl. Prod./75% acyl. P

Die Kristalle mehrmals in CHCl₃ und Methanol aufgerührt, getrocknet über P₄O₁₀ und Blaugel bei 90°C im Vakuum für 3 Std.

Ausbeute: 0,88 g (17,5%), Smp.: 220-32°C (Z

DC (bas.): 1 cycl. Prod. NMR: 100% nichtacyl. Produkt

Elementaranalyse: C, H, N in Ordnung, **S.31.**

Versuch II: 2,7 g (0,01 Mol) Maleoylsulfanilamid mit 0,6 g Na-Acetat und 27,6 ml Essigsäureanhydrid auf 60°C aufheizen, 30 Min. bei 60°C rühren, heiß in 140 ml Eiswasser filtrieren (sofort Niederschlagsbildung), 20 Min. bei 0°C rühren, absaugen, mit viel Wasser waschen, trocknen über KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht.

DC (bas.): 1 cycl. nichtacyl. Produkt, 1 offenes Prod.

Die Kristalle mehrmals in Methanol verrührt, getrocknet über P₄O₁₀ und Blaugel bei 90°C im Vakuum für 3 Std.

Ausbeute: 0,2 g (8%), Smp.: 230°C (Zers.

DC (bas.): 1 cycl. Prod. NMR: 100% nichtacyl. Produkt

Elementaranalyse: C, H, N in Ordnung, **S.31.**

b. N(N-Acetyl-4-Sulfamoylphenyl)-maleimid

9,29 g (0,0343 Mol) Maleoylsulfanilamid mit 2,05 g Na-acetat und 94 ml Essigsäureanhydrid auf 100°C aufheizen, 10 Min.

zwischen 97 und 100°C rühren, heiß in 470 ml Eiswasser filtrieren 1 Std. im Eiswasser rühren (Niederschlagsbildung), absaugen, mit viel Wasser waschen, trocknen über KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht. Ausbeute: 7,9 g Smp.: ab 99°C sintern

Elementaranalyse: C,N zu tief; H zu hoch

Kristalle in 50 ml Methanol aufschlämmen, absaugen, waschen mit Methanol, trocknen über P₄O₁₀ und Bleugel bei 105°C im Vakuum für 3 1/2 Std.: gelb-glasigen Rückstand zerreiben.

Ausbeute: 6,51 g (64,5%) Smp.: 167°C.

DC (bas.): 1 cycl.Prod. NMR: 100% acyl. Produkt

Elementaranalyse: C,N,H in Ordnung, **S.31.**

Die Cyclisierung der übrigen Maleoyl-Sulfanilamide erfolgt analog b. mit den gleichen Mengenverhältnissen, jedoch abgewandelten Cyclisierungstemperaturen und -zeiten: Tafel IIX, S.30.

Die höheren n-Alkylderivate werden 15 Min. zwischen 96-98°C cyclisiert. Diese müssen solange in Eiswasser gerührt werden, bis der zunächst ölige Niederschlag kristallisiert (bis 2 Std.).

Eine Reinigung der nicht ganz sauber anfallenden höheren n-Alkylderivate schlug fehl (hier muß das gereinigte - über das Na-salz - Maleinsäuremonoamid eingesetzt werden).

N(N-Acetyl-N-Methyl-4-Sulfamoylphenyl)-maleimid und N(N-Dimethyl-4-Sulfamoylphenyl)-maleimid für die Aufnahme der IR- und MS-Spektren aus CCl₄ umkristallisieren.

5. Darstellung der monosubstituierten Thioharnstoffe

a. Tert. Butyl-Isothiocyanat

82,2 g (1,08 Mol) NH₄NCS, 30 g ZnCl₂, 83,4 g (0,9 Mol) tert. Butylchlorid und 300 ml Wasser 96 Std. schütteln. Die gelbliche org. Oberschicht abtrennen, waschen mit 3.50 ml Wasser, trocknen mit CaCl₂, 1 Std. mit 15 g gepulvertem wasserfreiem ZnCl₂ (geht in Lösung) schütteln, 160 Std. stehen lassen (3 Phasen), obere Phase abtrennen, mit 3.50 ml Wasser waschen, trocknen mit CaCl₂. Ausbeute: 44,1 g (45,6%) n_D²⁵: 1,4780

b.1-n-Propyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff

10,38 g (0,09 Mol) Tert. Butyl-Isothiocyanat in 45 ml Petroläther eintropfen in 5,32 g (0,09 Mol) n-Propylamin in 45 ml Petroläther bei 0°C. Rühren 2 1/2 Std. bei Raumtemperatur (wobei die Lösung langsam dickflüssig wird), absaugen, waschen mit Petroläther, trocknen über Blaugel im Vakuum bei Raumtemperatur über Nacht.

Ausbeute: 14,17 g (90,4%) Smp: 58°C

c.1-n-Pentyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff

analog b. mit 10,38 g (0,09 Mol) Tert. Butyl-Isothiocyanat
7,85 g (0,09 Mol) n-Pentylamin

d.1-n-Heptyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff

analog b. mit 10,38 g (0,09 Mol) Tert. Butyl-Isothiocyanat
10,37 g (0,09 Mol) n-Heptylamin
da hier keine Niederschlagsbildung eintritt, den Ansatz im Vakuum eingengt. Alle Kristallisationsversuche schlugen fehl.

Ausbeute: 17 g Öl (93,1%)

e.1-n-Nonyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff

analog d. mit 10,38 g (0,09 Mol) Tert. Butyl-Isothiocyanat
12,9 g (0,09 Mol) n-Nonylamin

f.1-n-Propyl-Thioharnstoff

14,17 g (0,081 Mol) 1-n-Propyl-3-tert. Butyl-Thioharnstoff in 70 ml HCl conc. auf Rückflußtemperatur aufheizen, innerhalb 30 Min. zwischen 64-95°C tert. Butylchlorid abdestillieren, abkühlen, mit NH₃ conc. (ca. 59 ml) neutralisieren, absaugen, waschen mit sehr wenig Wasser, trocknen über KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht.

Das Rohprodukt in 50 ml Aceton (wasserfrei) lösen, den Rückstand abfiltrieren, die Lösung einengen, trocknen über Blaugel bei 75°C im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 6,93 g (72,1%) Smp: 108°C

Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, 5,40. NMR: erwartetes Produkt

Die Darstellung der anderen Thioharnstoffe erfolgt analog. Die höheren Alkylthioharnstoffe werden immer weniger wasserlöslich.

6. Darstellung der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile

a. n-Caproylacetessigester (C₅H₁₁CO-)

analog Vorschrift: Organikum (1971a), 1 molarer Ansatz -

24,31 g (1 g-Atom) Magnesium, 50 ml abs. Äthanol, 5 ml trock. CCl₄

Gemisch aus 130,14 g (1 Mol) Acetessigester, 100 ml abs. Äthanol und 400 ml abs. Äther;

134,61 g (1 Mol) Capronsäurechlorid in 100 ml abs. Äther;

Mischung aus 400 ml Eis und 25 ml H₂SO₄ conc.

Rohausbeute: 204,95 g (89,8%)

b. n-Caprylacetessigester (C₇H₁₅CO-)

analog a. mit 162,66 (1 Mol) Caprylsäurechlorid

Rohausbeute: 236 g (92%)

c. n-Caprinacetessigester (C₉H₁₉CO-)

analog a. mit 184,2 g (0,966 Mol) Caprinsäurechlorid

Rohausbeute: 262,2 g (92,2%)

d.n-Caproylessigester

analog Vorschrift: Organikum (1971b),

204,95 g (0,898 Mol) n-Caproylacetessigester, 53 g (0,944 Mol) Ätzkali in 450 ml Äthanol;

2,7 l Eis und 24 ml H_2SO_4 conc.

Rohausbeute: 168 g

Das Rohprodukt über eine 30 cm Vigreux-Kolonne destillieren.
Fraktion II: Kp.₁₃ 113-27°C, 96,43 g (51,8%) 82%iges Produkt
(Gaschromatogr.), n_D^{25} : 1,4381

e.n-Caprylessigester

analog d. mit 236 g (0,92 Mol) n-Caprylacetessigester, 54,1 g (0,966 Mol) Ätzkali in 460 ml Äthanol;

2,8 l Eis und 25 ml H_2SO_4 conc.

Rohausbeute: 198,6 g

Fraktion III: Kp.₂₋₃ 119-33°C, 100,08 g (50,8%) 86%iges Produkt
(Gaschromatogr.), n_D^{25} : 1,4397

f.n-Caprinessigester

analog d. mit 262,2 g (0,922 Mol) n-Caprinacetessigester, 54,3 g (0,968 Mol) Ätzkali in 460 ml Äthanol;

2,8 l Eis und 25 ml H_2SO_4 conc.

Rohausbeute: 223,5 g

Fraktion III: Kp._{0,4-1} 107-35°C, 95,58 g (42,8%) 85%iges Produkt
(Gaschromatogr.), n_D^{25} : 1,4447

g.6-n-Pentyl-2-Thiouracil

2,3 g (0,1 g-Atom) metall.Natrium verteilen in 50 ml wasserfreiem Äthanol; 5,33 g (0,07 Mol) Thioharnstoff und 9,31 g (0,041 Mol) n-Caproylessigester zur klaren Lösung geben. Die Mischung erhitzen auf Rückflußtemperatur, nach ca. 10 Min. ist

eine Lösung erreicht (etwas trübe); es beginnt sich ein Niederschlag zu formen, nach 6 1/2 Std. abkühlen lassen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen. Einengen bis 50°C im Vakuum bis zur Trockene, den Rückstand in 50 ml Wasser lösen. Das Produkt ausfällen durch Zufügen von 7 ml HCl conc. und nachfolgendem Ansäuern zu pH4 mit Eisessig; das rohe Thiouracil absaugen, waschen mit 3.20 ml Wasser und trocknen über KOH und H₂SO₄ conc. im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 7,68 g (94,5%) Smp.: 151-52°C

Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, S.40. NMR: erwartetes Produkt

h.6-n-Heptyl-2-Thiouracil

analog g. mit 10,71 g (0,043 Mol) n-Caprylessigester

Ausbeute: 9,65 g (99%) Smp.: 146-49°C

Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, S.40. NMR: erwartetes Produkt

i.6-n-Nonyl-2-Thiouracil

analog g. mit 12,12 g (0,0425 Mol) n-Caprinessigester

Ausbeute: 10,29 g (95%) Smp.: 135-38°C

Elementaranalyse: C,H,N in Ordnung, S.40. NMR: erwartetes Produkt

7.Kinetik

a.β-Lactoglobulin-Lösung

0,58 g β-Lactoglobulin in 50 ml Wasser lösen und filtrieren.

Messen am DW 2 UV-Spektrometer bei 280 mμ:

0,3 ml Lösung und 2,7 ml Wasser.

Es gilt:

mg Protein pro ml Lösung = 1,11.O.D. bei 280 mμ.

b.Titration der β-Lactoglobulin-Lösung

2,5 ml Protein-Lösung/0,5 ml Phosphatpuffer 1 M, pH6,1 und

1,5 ml 0,6 M KJ-Lösung zusammengeben.

Messen am DW 2 UV-Spektrometer bei 355 mμ:

2,7 ml Mischung und $0,3 \text{ ml } x \cdot 10^{-3} \text{ N J}_2$ in $0,2 \text{ M KJ-Lösung}$.
($x = 1$ bis 5) - 5°C -

c. Herstellen des β -Lactoglobulin-Sulfenyljodid

2,7 ml Mischung b. und $0,3 \text{ ml } 0,0035 \text{ N J}_2$ in $0,2 \text{ M KJ-Lösung}$.
- 5°C -

d. Herstellen der Thioharnstoff- und Thiouracil-Lösungen

Von jedem Reagens (außer Thiouracil und Methylthiouracil)
 $20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Lösungen herstellen und zwar

Thioharnstoffe:

R = H, CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 in Wasser

C_5H_{11} in 9:1-Wasser/Äthanol

C_7H_{15} in 1:1-Wasser/Äthanol

C_9H_{19} in Äthanol.

Thiouracile:

R = H und CH_3 (beide $10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), C_3H_7 in 1:1-Wasser/Äthanol

C_5H_{11} , C_7H_{15} , C_9H_{19} in Äthanol.

e. Abfangreaktionen

Messen am DW 2 UV-Spektrometer bei $355 \text{ m}\mu$:

3 ml Lösung c. und $50 \mu\text{l}$ Reagens-Lösung d. (bei Thiouracil und Methylthiouracil $100 \mu\text{l}$).

Messen am DW 2 UV-Spektrometer mit Stopped-Flow-Zusatz
bei $355 \text{ m}\mu$:

Thioharnstoff- und Heptylthioharnstoff-Lösungen d. 1:60
mit $0,2 \text{ M KJ-Lösung}$ verdünnen; zusammengeben im Verhältnis 1:1
Lösung c. und diese verdünnten Lösungen.

- 5°C -

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Anderson, B.M. et al (1970), Biochemistry, Vol. 9, No 17, 3348.
Anderson, G.W. et al (1945), J. Amer. Chem. Soc. 67, 2197.
Awtrey, A.D., Connick, R.E. (1951), J. Amer. Chem. Soc. 73, 1842.
Baltscheffsky, H. und M. (1974), Ann. Rev. of Biochem., Vol. 43, 871.
Basch, J.J., Timasheff, S.N. (1969), Arch. of Biochem. and Biophys. 103, 720.
Bell, K. (1962), Nature (London) 195, 705.
Bell, K. et al (1970), Proc. Austr. Biochem. Soc. 3, 82.
Bäuerlein, E. (1972), Habilitationsschrift, 56.
Boyer, P.D. (1971), in Proceedings of the Intern. Sympos. on the
"Biochem. and Biophys. of the Mitochondrial Membranes"
Bressanone-Padua, Academic Press, New York-London, S. 343.
Braunitzer, G. et al (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 832.
Coleman, L.E. et al (1959), J. of org. Chem. 24, 135.
Cotter, R.J. et al (1961), J. of org. Chem. 26, 10.
Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1959), J. Biol. Chem. 234, 1447.
(1960a), J. Biol. Chem. 235, 1711.
(1960b), Biochim. Biophys. Acta 39, 565.
(1961), J. Biol. Chem. 236, 1716.
Cunningham, L.W. (1964), Biochemistry, Vol. 3, No 11, 1629.
Dunnill, P., Green, D.W. (1965), J. Mol. Biol. 15, 147.
Follmann, H. (1974), Angewandte Chemie, 624.
Fraenkel-Conrat, H. (1955), J. Biol. Chem. 217, 373.
Frank, G., Braunitzer, G. (1967), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 169.
(1968) 349, 145.
Friedman, M. (1973), The Chemistry and Biochemistry of the SH-Group
in Amino Acids, Peptides and Proteins, Pergamon Press.
Gomez, G.P. et al (1971), Arch. Intern. de Physiol. 79, 843.
Green, D.W., Aschaffenburg, R. (1959), J. Mol. Biol., Vol. 1, 54.
Grosclande, F. et al (1966), Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 6, 215.

- Hedaya, E. et al (1966), J. of org. Chem. 31, 1311 und 1317.
- Heitmann, P. (1968), European J. Biochem. 3, 346.
- Heitz, J. R. et al (1968), Arch. of Biochem. and Biophys. 127, 627.
- Holbrook, J. J. et al (1966), Biochem. Zeitschrift 344, 1.
- Houben-Weyl (1955a), Methoden der org. Chemie, 4. Aufl., Bd. 9, 799.
(1955b) 9, 609.
- Jencks, W. R. (1969), Catalysis in Chemistry and Enzymology, Kap. 8, 4
- Jocelyn, P. C. (1972), Biochemistry of the SH-Group, Academic Press
London und New York.
- McKenzie, H. A. (1967), "Milk Proteins" in Advances in Protein
Chemistry, Vol. 22, 147.
- McKenzie, H. A., Ralston, G. B. (1973), Biochemistry, Vol. 12, No 6, 102
- Kessler, E., Brew, K. (1970), Biochim. Biophys. Acta 200, 449.
- Kratzel and Ruis, H. (1966), Chem. Abstr. 64, 5095c.
- Kretov, A. E. and Kul'chitskaya, N. E. (1956), Chem. Abstr. 50, 13771g.
- Lennan, D. H. M. (1970), Current topics in membranes and transport,
F. Bronner und A. Kleinzeller, Vol. 1, 177.
- Liu, T. J. (1967), J. Biol. Chem. 242, 4029.
- Mainferme, F. et al (1971), Arch. Intern. de Physiol. 79, 840.
- Martial, J. et al (1971), Arch. Intern. de Physiol. 79, 842.
- Merz, E. et al (1965), Biochem. Zeitschrift 342, 66.
- Miller, E. et al (1939), J. Amer. Chem. Soc. 61, 1198.
- Nair, G. V. (1966), Indian J. Chem., Vol. 4, 516.
- Organikum (1971a), 10. Auflage, VEB Berlin, 526.
(1971b) 529.
- Overberger, C. G. und Sannes, K. N. (1974), Angewandte Chemie 4, 139.
- Parker, D. J., Allison, W. S. (1969), J. Biol. Chem. 244, 180.
- Paul, R. und Kende, A. S. (1964), J. Amer. Chem. Soc. 86, 4162.
- Pyriadi, T. M. und Harwood, H. J. (1971), J. Org. Chem. 36, 821.
- Pyriadi, T. M. (1972), J. org. Chem. 37, 4184.
- Roderick, W. R. (1964), J. of org. Chem. 29, 745.
- Rothstein, A. (1970), Current topics in membranes and transport,
F. Bronner und A. Kleinzeller, Vol. 1, 135.
- Sabadie-Pialoux, N. und Gautheron, D. (1971), Biochim. Biophys. Acta
234, 9.
- Sauers, C. K. (1969), J. of org. Chem. 34, 2275.

Simon, Z. (1974), Angewandte Chemie 22, 802.

Tanaka, Y. (1965), Chemical and Pharmaceutical Bull., Vol. 13,
No 4, 399.

Tanford, Ch., Taggard, V. G. (1961), J. Amer. Chem. Soc. 83, 1634.

Timasheff et al (1966), J. of Biol. Chem., 241, No 8, 1843.

Timasheff, S. N., Townend, R. (1964), Nature, Vol. 203, 517.

Townend, R. et al (1961), J. Amer. Chem. Soc. 83, 1419.

(1969), Arch. of Biochem. and Biophys. 129, 567.

Trommer, W. and Hendrick, M. (1973), Synthesis (August), 484.

Weissbluth, M. D., Grieger, R. A. (1974), Biochemistry 13, No 6, 1285.

Werner, A. (1912), Soc. 101, 2185; vgl. Rivier, H. und Borel, J. (1928),
Helv. 11, 1219.

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg, den 27. Februar 1975

Reinhold Kuhl