

## $\beta$ -Oxo N-Substituted Benzotriazoles

In continuation of our studies on  $\beta$ -oxo N-substituted benzotriazoles<sup>1</sup> which involved the use of tertiary ketonic Mannich Bases as a source of alkylating agent<sup>2</sup>, we now wish to report the preparation of the  $\beta$ -oxo N-substituted benzotriazoles.

(log  $\epsilon$  3.81–3.91) and 279–283 nm (log  $\epsilon$  3.68) ranges and the 2-substituted ones a single maximum at 274 nm (log  $\epsilon$  3.96).

Melting points and UV-absorption data of the new benzotriazoles are summarized in the Table<sup>4,5</sup>.

Compound	mp	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log $\epsilon$ )	Yield (%)
Benzotriazole	96–98°	252 (3.82); 273 (3.74)	
IIa	–	244 (4.17); 277 (3.10)	
IIb	–	236 (4.12); 325 (4.16)	
IIIa (C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ON <sub>3</sub> )	82–84°	243 (4.25); 252 sh (4.21); 280 (3.89)	73
IIIb (C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> )	103–105°	236 (4.23); 262 (3.71); 290 sh (3.97); 322 (4.22)	50
IVa	92–94°	245 (4.26); 278 (4.23)	24
IVb	135–138°	234 (4.07); 286 (4.15); 322 (4.26)	23
Va (C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> ON <sub>3</sub> )	80–82°	255 (3.91); 276 (3.81)	75
Vb (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> )	106–108°	262 (4.19); 293 sh (3.96)	98

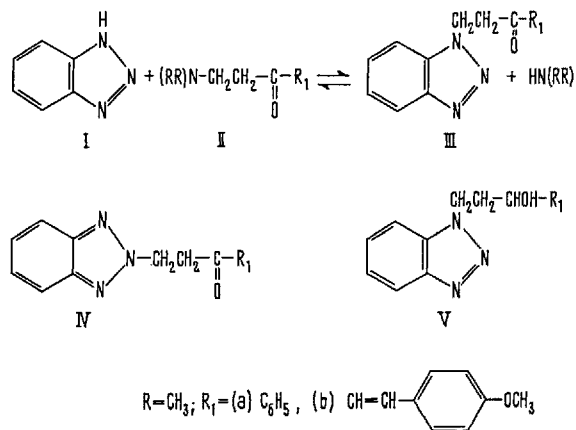
Benzotriazole (I) and the appropriate dimethylamino Mannich Base (II) reacted in ethanol under reflux. After complete elimination of the volatile amine and concentration of the solvent, the residue was purified by recrystallization or by column chromatography and afforded the desired compounds (III) as well as the isomeric products (IV). NaBH<sub>4</sub> reduction of the new ketones gave the secondary alcohols (V).

Alkylation at either of 2 different nitrogen atoms has previously been shown to occur with a number of N-substituted benzotriazoles and the structural isomerism is clearly resolved by UV-spectroscopy<sup>3</sup>: the 1-substituted derivatives exhibit double maxima in the 256–266 nm

**Résumé.** L'alkylation du benzotriazole au moyen des bases de Mannich a permis d'obtenir de nouveaux dérivés  $\beta$ -oxo N-substitués en position 1. La réaction a également fourni les dérivés de substitution en 2.

R. ZELNIK and F. STREHLAU

Serviço de Química Orgânica, Instituto Butantan, C.P. 65, São Paulo (Brasil), 27 June 1970.



<sup>1</sup> R. ZELNIK and F. STREHLAU, *Experientia* 21, 617 (1965).

<sup>2</sup> J. H. BREWSTER and E. L. ELIEL, in *Organic Reactions* (Ed. R. ADAMS; John Wiley and Sons, New York 1953), vol. 7, p. 99.

<sup>3</sup> R. H. WILEY, N. R. SMITH, D. M. JOHNSON and J. MOFFAT, *J. Am. chem. Soc.* 76, 4933 (1954). – R. H. WILEY, K. H. HUSSUNG and J. MOFFAT, *J. Am. chem. Soc.* 77, 5105 (1955). – D. DAL MONTE, A. MANGINI, R. PASSERINI and C. ZAULI, *Gazz. chim. ital.* 88, 977 (1958); and references cited therein.

<sup>4</sup> Biological activities. Compounds (IIIa) and (IIIb) did not display any activities: 1. in the in vivo tests with mouse transplanted tumors *Mecca lymphosarcoma* and *Ridgway osteogenic sarcoma*, we are indebted to Drs. C. CHESTER STOCK and GEORGE S. TARNOWSKI (The Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York) for these assays; 2. in mouse infected with *Plasmodium berghei* or *Schistosoma mansoni*, we are indebted to Dr. Z. BRENER (Instituto Nacional de Endemias rurais) and to Dr. J. PELLEGRINO (Instituto de Biologia da Universidade de Minas Gerais) for these tests.

<sup>5</sup> We gratefully acknowledge research grants from the Conselho Nacional de Pesquisas, the Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de São Paulo and the Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.

## Kinetik der Reaktion von Imidazol-SH-Verbindungen mit Ellman Reagenz [5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)]

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Reaktivität von SH-Gruppen unter dem Einfluss ideal benachbarter Imidazolreste<sup>1,2</sup> haben wir uns bisher mit der Kinetik der Reaktion von Imidazol-SH-Verbindungen mit N-Äthylmaleinimid<sup>3</sup> und Bromacetamid<sup>4</sup> sowie der pH-Abhängigkeit der durch diese Verbindungen katalysierten Esterhydrolyse befasst<sup>5</sup>. Es handelt sich bei

diesen Reaktionen um nucleophile Additions- und Verdrängungsreaktionen.

In neuerer Zeit hat das ELLMAN-Reagenz<sup>6</sup> (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure) nicht nur zum qualitativen und quantitativen Nachweis von SH-Gruppen Verwendung gefunden, sondern auch zur Beurteilung der Reaktivität von SH-Gruppen in niedermolekularen Ver-

bindungen und Enzymen<sup>7-10</sup>. Wir haben es hier mit einer Disulfidaustauschreaktion zu tun, und die Kinetik der Reaktion erlaubt eine Aussage über die Reaktivität von SH-Gruppen. Wir berichten daher nachstehend über die Kinetik der Reaktion einfacher SH-Verbindungen sowie Imidazol-SH-Verbindungen mit ELLMAN-Reagenz.

**Material und Methoden.** Zur Herkunft der SH-Verbindungen siehe loc cit<sup>5</sup>. ELLMAN-Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure DTNB), Präparat der Firma Serva, Heidelberg.

Alle Reaktionen wurden in 0,133M Phosphatpuffer durchgeführt. Endkonzentration der SH-Verbindung 10<sup>-4</sup>M, DTNB 1,4 × 10<sup>-4</sup>M, d.h., die Reaktionen liefen unter Bedingungen zweiter Ordnung ab. Die Messungen erfolgten im Eppendorf-Photometer mit Transformationsstufe und Schreiber, Filter 405 nm, temperierbarer Küvettenhalter. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung *k* erfolgte nach

$$k = \frac{1}{t(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$$

*a*, Konzentration der DTNB;

*b*, Konzentration der SH-Verbindung;

*x*, Konzentration des Reaktionsproduktes zur Zeit *t*.

Für die Berechnung der Konstanten wurde eine elektronische Datenverarbeitungsanlage CDC 3300 und ein ALGOL-Programm verwendet<sup>11</sup>. Dabei wurden folgende Extinktionskoeffizienten zugrunde gelegt: pH 5  $\epsilon$  = 8440; pH 5,5  $\epsilon$  = 11700; pH 6  $\epsilon$  = 12400; pH 6,5  $\epsilon$  = 13600.

**Ergebnisse und Diskussion.** Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Reaktion von SH-Verbindungen und Imidazol-SH-Verbindungen mit ELLMAN-Reagenz im pH-Bereich von 5,0–6,5 sind in Tabelle I zusammengestellt. Mit der hier verwandten Methode ist die Reaktion bei höheren pH-Werten nicht zu messen, da sie zu schnell verläuft; die Halbwertszeiten bei pH 6,5 liegen zwischen 10–20 sec, bei pH 8 im Bereich von 1/10–1/100 sec (*c* = 10<sup>-4</sup>M).

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten untereinander lässt die aussergewöhnliche Reaktivität bestimmter Imidazol-SH-Verbindungen erkennen; so reagiert das Mercaptomethylimidazol eine Zehnerpotenz schneller mit ELLMAN-Reagenz als das Glutathion und über 30mal schneller als das N-Acetyl-cystein. Die in früheren Untersuchungen gefundene Erhöhung der Reaktivität von SH-Gruppen unter Einfluss von Imidazolresten kommt nach diesen Befunden also auch bei der Reaktion mit ELLMAN-Reagenz zum Ausdruck. Eine ausführliche Diskussion des Mechanismus dieser Aktivierung findet sich in loc cit<sup>1-4</sup>.

Trägt man den reziproken Wert der Wasserstoffionenkonzentration gegen die Geschwindigkeitskonstanten auf, so erhält man für eine Auswahl von Verbindungen die in der Figur dargestellten Graden. Für die Graden lassen sich auf folgendem Weg Gleichungen ableiten: Die Geschwindigkeit der Reaktion lässt sich durch

$$v = k^{R'SH} [R'SH] \cdot [RSSR] + k^{R'S^{\ominus}} [RS^{\ominus}] \cdot [RSSR]$$

ausdrücken, falls man annimmt, dass sowohl die undissoziierte SH-Gruppe als auch das Thiolatanion mit dem Disulfid reagierten.  $k^{R'SH}$  bzw.  $k^{R'S^{\ominus}}$  bedeuten die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für diese Reaktionen. Substituiert man  $R'S^{\ominus}$  durch den Ausdruck

$$R'S^{\ominus} = \frac{K_D \cdot [R'SH]}{[H^+]}$$

Tabelle I. pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung *k* der Reaktion von SH-Verbindungen mit ELLMAN-Reagenz

SH-Verbindung	<i>k</i> [1 × Mol <sup>-1</sup> × sec <sup>-1</sup> ]				pK <sub>SH</sub>
	pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5	
Cystein (cys)	19,6	66,0	215	672	8,50
N-Acetyl-cys	5,53	10,3	31,6	104	9,7
N-Acetyl-cys-amid	35,9	61,6	240	534	8,75
Cyclo-cys-gly	46,0	87,7	498	800	8,75
Glutathion	17,3	31,4	112	335	9,1
Mercaptobernsteinsäure	13,0	7,74	15	15,9	10,1
Dithioerythrit	14,2	34,3	120	440	–
Mercaptomethylimidazol	282	510	1300	3660	9,5
Mercaptoäthyl-imidazol	50,3	89,2	222	737	9,8
1-Methyl-5-mercapto-äthyl-imidazol	41,0	108	339	1225	9,5
Cyclo-cys-his	55	117	300	850	9,0
N-Ac-cys-his-asp	29,7	40,0	120	380	9,1
N-Ac-cys-γ-abu-his-γ-abu-asp	52,7	90,2	260	780	9,2

Tabelle II. Gleichungen für die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung *k* der Reaktion von SH-Verbindungen mit ELLMAN-Reagenz bei 25° sowie errechnete Geschwindigkeitskonstanten für pH 8

SH-Verbindung	<i>k</i> [1 × Mol <sup>-1</sup> × sec <sup>-1</sup> ]	<i>k</i> [1 × Mol <sup>-1</sup> × sec <sup>-1</sup> ] bei pH 8
Cystein	2,13 × 10 <sup>-4</sup> /[H <sup>+</sup> ]	2,13 × 10 <sup>4</sup>
Glutathion	1,06 × 10 <sup>-4</sup> /[H <sup>+</sup> ]	1,0 × 10 <sup>4</sup>
Ac-cys-his-asp	1,21 × 10 <sup>-4</sup> /[H <sup>+</sup> ]	1,21 × 10 <sup>4</sup>
Ac-cys-γ-abu-his-γ-abu-asp	2,46 × 10 <sup>-4</sup> /[H <sup>+</sup> ]	2,64 × 10 <sup>4</sup>
Mercaptomethylimidazol	180 + 1,1 × 10 <sup>-3</sup> /[H <sup>+</sup> ] <sup>a</sup>	1,1 × 10 <sup>5</sup>
1-Methyl-5-mercapto-äthyl-imidazol	3,6 × 10 <sup>-4</sup> /[H <sup>+</sup> ]	3,6 × 10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Der Wert von 180 für *k*<sub>RSH</sub> ist fraglich; er fällt von pH 7 an nicht ins Gewicht.

<sup>1</sup> FR. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1034 (1967).

<sup>2</sup> FR. SCHNEIDER, E. SCHAICH und H. WENCK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1525 (1968).

<sup>3</sup> FR. SCHNEIDER und H. WENCK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1521 (1969).

<sup>4</sup> E. ZIEGLER, H. WENCK und FR. SCHNEIDER, Z. Naturforsch. B, im Druck.

<sup>5</sup> FR. SCHNEIDER und H. WENCK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1653 (1969).

<sup>6</sup> G. L. ELLMAN, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).

<sup>7</sup> P. M. WASSARMAN und J. P. MAJOR, Biochemistry 8, 1076 (1969).

<sup>8</sup> R. F. COLMAN, Biochemistry 8, 888 (1969).

<sup>9</sup> K. KLEPPE und S. DAMJANOVICH, Biochim. biophys. Acta 185, 88 (1969).

<sup>10</sup> K. KIRSCHNER, in Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions (Academic Press, New York 1968), p. 39.

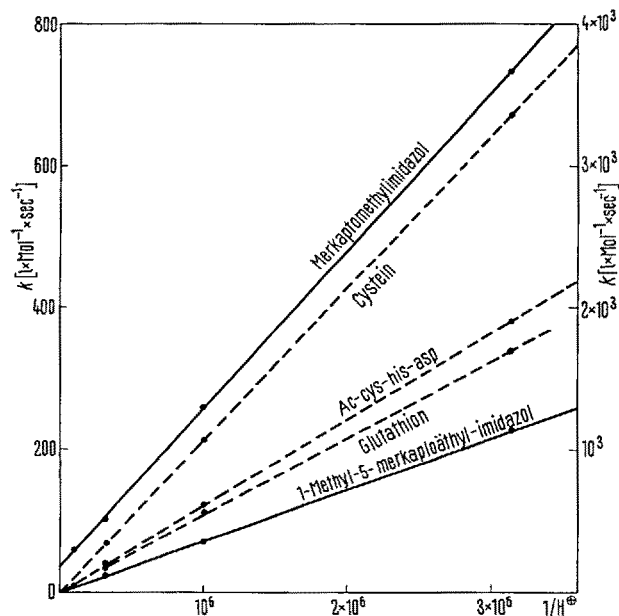
<sup>11</sup> Dem Rechenzentrum der Universität Tübingen danken wir für die freundliche Unterstützung.

so erhält man

$$v = [R'SH] [RSSR] \left( k^{R'SH} + \frac{k^{R'S^-} K_D}{[H^+]} \right).$$

Daraus ergibt sich unmittelbar

$$k = k^{RSH} + \frac{k^{RS^-} \cdot K_D}{[H^+]}$$



pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion von SH-Verbindungen mit ELLMAN Reagenz (linke Ordinate für gestrichelte Geraden, rechte Ordinate für ausgezogene Geraden).

d.h., bei einer Auftragung von  $k$  gegen  $1/[H^+]$  liefert der Ordinatenabschnitt die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Reaktion von  $R'SH$  mit ELLMAN-Reagenz, und die Neigung erlaubt uns bei Kenntnis des  $pK_{SH}$ -Wertes die Berechnung von  $k^{R'S^-}$ .

Tabelle II enthält die Gleichungen der Geschwindigkeitskonstanten für eine Auswahl von SH-Verbindungen; diese erlauben die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für beliebige pH-Werte.

Die Gleichungen besagen, dass die undissoziierte Thiolgruppe nicht reagiert, sondern dass Thiolatanion Reaktionspartner des ELLMAN-Reagenzes ist. Da Reaktionen mit diesem Reagenz meistens bei pH 8 durchgeführt werden, sind in der Tabelle auch die errechneten Geschwindigkeitskonstanten für diesen pH-Wert angegeben.

Die Gleichungen erlauben bei Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von ELLMAN-Reagenz mit SH-Gruppen von Enzymen auch die Errechnung der  $pK_{HS}$ -Werte der Enzyme<sup>12</sup>.

**Summary.** The rate of reaction of some derivatives and peptides of cysteine and a number of imidazole-SH-compounds with 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as well as the dependence of the reaction rate upon pH were investigated; for several compounds an equation is given, by which the rate constants and half reaction times can be estimated for various pH values. For some of the imidazole-SH-compounds studied the  $pK$  of the SH-group is no criterion of their reactivity with DTNB.

H. WENCK und FR. SCHNEIDER

*Physiologisch-chemisches Institut der Universität,  
D-74 Tübingen (Deutschland), 3. August 1970.*

<sup>12</sup> Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

## Hydratation und Sekundärstruktur doppelhelikaler synthetischer Polynukleotide

Die Hydratation der Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist sowohl für die Konformation des DNS-Moleküls als auch für die Stabilität seiner Sekundärstruktur ein bestimmender Faktor<sup>1-3</sup>. Änderungen der Basenlagen relativ zur Helixachse sind durch Messungen des linearen Dichroismus (LD) in der UV-Absorptionsbande bei 260 nm nachweisbar<sup>3-5</sup> und an orientierten DNS-Filmen in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte (RF) mehrfach beschrieben worden<sup>3,6,7</sup>. Dabei wurde im Dehydratations-Hydratations-Zyklus (94% RF  $\rightarrow$  0% RF  $\rightarrow$  94% RF) eine Strukturhysterese festgestellt<sup>6,7</sup>, und zwar auch bei DNS in situ<sup>8</sup>.

Im folgenden wird über hydratationsabhängige Sekundärstrukturänderungen der doppelhelikalen Polynukleotide Poly (rA + rU)<sup>9</sup> und Poly (rA + rA)<sup>9</sup> berichtet, deren Sekundärstruktur bekannt ist<sup>10-12</sup>.

**Material und Methode.** Verwendet wurden Kalbsthy-mus-DNS eigner Präparation<sup>7</sup>, Polyriboadenylsäure  $\times$  K-Salz und Polyribouridylsäure  $\times$  NH<sub>4</sub>-Salz (SERVA). Aus den synthetischen Polynukleotiden wurden unter geeigneten Bedingungen<sup>13-17</sup> Gele doppelhelikaler Moleküle Poly (rA + rU) und Poly (rA + rA) hergestellt. An orientierten Filmen aus DNS und den doppelhelikalen

Polynukleotiden wurde das dichroitische Verhältnis  $D = E_{\parallel}/E_{\perp}$  ( $E_{\parallel}$ ;  $E_{\perp}$  sind die Extinktionen parallel und senkrecht zur Vorzugsrichtung der Helixachsen linear polarisierter Strahlung) als Funktion der RF<sup>18</sup> bestimmt. Eine Änderung von  $D = f$  (RF) zeigt eine Veränderung der Basenorientierung relativ zur Helixachse an. Messmethodik und Kontrolle des Gleichgewichts zwischen RF und Hydratation der Messproben wurden bereits beschrieben<sup>7</sup>.

**Ergebnisse und Diskussion.** Bei der Dehydratation der DNS (Figur 1) tritt eine zunehmende Desorientierung der Basen zwischen 65% und 0% RF auf. Bei Hydratation bleibt  $D$  bis etwa 50% RF konstant und verringert sich dann stark innerhalb eines engen RF-Bereiches (Wiederaufbau der geordneten DNS-Sekundärstruktur). Eine Deutung der Strukturhysterese als Funktion der RF erfolgte bereits<sup>7</sup>. Grundlage hierfür war die Annahme, dass zwischen den im DNS-Molekül vorhandenen H-Donator- und -Akzeptorgruppen Wasserbrücken unterschiedlicher Bindungsstärke auftreten<sup>19</sup>. Bei der Hydratation werden zunächst die Phosphatgruppen hydratisiert und dann die Ringsauerstoffe der Desoxyribose<sup>3</sup>. Bedingt durch den bereits erreichten Hydratationsgrad setzt bei