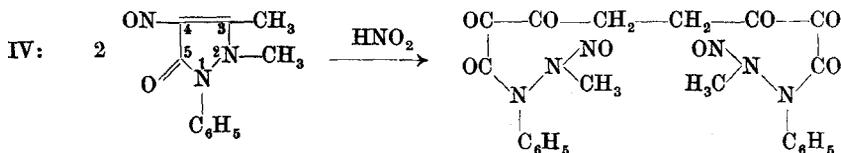
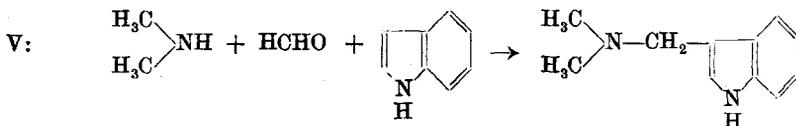


Einen ähnlichen Reaktionsverlauf beobachteten *O. Bockmühl* und Mitarbeiter⁶⁾, als sie das Verhalten des 4-Nitroso-antipyryns gegenüber salpetriger Säure studierten. Hierbei entsteht jedoch unter Aufspaltung des Pyrazolonringes zwischen C_3 und N_2 ein sauerstoffreicheres Produkt (Reaktionsverlauf IV).



Unser erstes faßbares Zwischenprodukt (II, R = H) ist alkalilöslich und kann als Bis-azetyl-Derivat (IIa) und Bis-benzyl-aether (IIb) charakterisiert werden. Das abgespaltene Dimethylamin ist u. a. durch Überführung in Gramin (Reaktion V)⁷⁾ nachweisbar. Dabei liegt eine „Mannich“-Reaktion aus Dimethylamin, Formaldehyd und Indol vor.



Die Verätherung von II mit Benzylchlorid gelang verhältnismäßig leicht, die Veresterung mit Essigsäure war nach vergeblichen anderen Versuchen nur möglich, wenn das Essigsäureanhydrid unter katalytischer Wirkung einer Spur Perchlorsäure zur Einwirkung gelangte.

Über weitere Derivate des interessanten Bis-pyrazolinyln-aethans II berichten wir später in anderem Zusammenhang.

Es gelang dann durch weiteren Abbau, für die „Bis“-Verbindung II einen Konstitutionsbeweis zu erbringen. Dazu bedienten wir uns einer am Pyrimidon bekannten Reaktion von *R. Charonnat* und *R. Delaby*⁸⁾, bei der die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd in neutraler Lösung unter Sprengung der $C_3 = C_4$ -Bindung zu einem fälschlich als „Dioxy-pyrimidon“ bezeichneten Derivat führt. Wir wandten das Wasserstoffperoxyd, da II in Wasser nicht löslich und in anderen Lösungsmitteln meist sehr schwer löslich ist, erstmals auf dem Pyrazolongebiet in alkalischer Lösung an, dabei erhielten wir unter auch hier erfolgter Ringsprengung $C_3 = C_4$ und anschließender Hydrolyse am $N_1 - C_5$ eine Spaltung in Oxalsäure, die in üblicher Weise identifiziert wurde, und in das Bis-(2-Phenyl-2-methyl-Hydrazid) der Bernsteinsäure (VI), das als Bis-Nitroso-Derivat charakterisiert werden konnte (VIa). Es ließ sich zu Bernsteinsäure und 2 Molekeln 1-Phenyl-1-nitroso-2-methyl-hydrazin spalten (Reaktionsfolge VIb), die jedoch in dem alkalischen Milieu weiter zersetzt wurden.

⁶⁾ Medizin u. Chemie; Abhandlungen aus den Medizinisch-chemischen Forschungsstätten der I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft, Bd. III, 294.

⁷⁾ *H. Kühn* und *O. Stein*, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 567 (1936).

⁸⁾ C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 189, 850 (1929); s. auch Zitat ⁶⁾.

640 mg blaßgelbe Kristalle ab. Sie schmolzen unter Zersetzung bei 284° und waren sehr leicht in n-Natronlauge, schwerer in 5%iger Sodalösung löslich.

$C_{22}H_{22}O_4N_4$ (406,4)	Ber.: C 65,01	H 5,46	N 13,79	C—CH ₃ 0,00
	Gef.: C 65,02	H 5,58	N 13,34	0,9

Vergleichende C—CH₃-Bestimmung am 4-Hydroxyantipyrin:

Ber.: CH ₃ 7,37	Gef.: CH ₃ 7,6
----------------------------	---------------------------

b) durch Bromwasserstoff:

1 g Bisbenzyläther wurden in 30 ml Eisessig gelöst und nach dem Hinzufügen von 10 ml Bromwasserstofflösung (60%ig) 4 Stunden lang auf dem Wasserbade am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionsgemisch roch stark nach dem tränenreizenden Benzylbromid. — Es wurden 610 mg blaßgelbe Kristalle erhalten. Sie schmolzen bei 281—282° unter Zersetzung und zeigten im Mischschmelzpunkt mit den unter a) erhaltenen Kristallen eine Depression von 1—2°.

3a) Azetyl-Derivat

2 g Bis (1,1'-phenyl-2,2'-methyl-4,4'-hydroxy-5,5'-oxopyrazolinyl-3,3'-)aethan schüttelte man mit 200 ml Essigsäureanhydrid an und gab eine 4 cm lange, enge Kapillare voll Perchlorsäure hinzu. Es wurde zunächst 3 Stdn. lang auf dem Wasserbade und dann 10 Min. auf dem Drahtnetz unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich dunkelblaugrün. Von nicht umgesetzter Ausgangsverbindung, etwa 0,15 g, filtrierte man ab und engte das Lösungsmittel im Vakuum weitgehend ein. Nach kurzem Stehen im Eisschrank begann der Rückstand kristallin zu erstarren. Nach dreimaligem Umlösen aus wasserfreiem Aceton wurden 0,87 g sehr feine farblose Nadeln erhalten. Sie sinterten ab 203° und schmolzen bei 211—213°. Selbst nach erneutem zweimaligem Umkristallisieren konnte unter der Mikro-Kofler-Apparatur ein vollkommen scharfes Schmelzen der Substanz nicht beobachtet werden.

$C_{26}H_{26}O_6N_4$ (490,5)	Ber.: C 63,66	H 5,34	O 19,57	N 11,42
	Gef.: C 63,70	H 5,35	O 19,64	N 11,16
	C 63,52	H 5,29		

3b) Verseifung des Azetylderivates

0,4 g des nach 3a erhaltenen Essigsäureesters wurden mit einem Gemisch aus 40 ml Methanol und 10 ml Wasser 30 Minuten lang auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Abdestillieren des Methanols schieden sich aus der wäßrigen Lösung 0,29 g farblose Kristalle ab. Sie sinterten wenig ab 273° und schmolzen bei 282°, waren unlöslich in organischen Lösungsmitteln, lösten sich dagegen leicht in verdünnter Natronlauge und zeigten das Verhalten des Bis(1,1'-phenyl-2,2'-methyl-4,4'-hydroxy-5,5'-oxo-pyrazolinyl-3,3'-)aethans.

4. Oxydativer Abbau des Bis-(1,1'-Phenyl-2,2'-methyl-4,4'-hydroxy-5,5'-oxo-pyrazolinyl-3,3')aethans mit Wasserstoffperoxyd in alkalischer Lösung

6 g Bis-(1,1'-Phenyl-2,2'-methyl-4,4'-hydroxy-5,5'-oxo-pyrazolinyl-3,3')aethan wurden in 300 ml n-Natronlauge gelöst und zu der nach Filtration durch eine Fritte G₃ vollkommen klaren, gelbbraunen Lösung unter gutem Kühlen 90 ml Wasserstoffperoxyd (30%ig) in Anteilen hinzugegeben. Nach 14stündigem Stehen bei Zimmertemperatur hatte die Gasentwicklung nachgelassen. Nach vorsichtigem Abgießen der überstehenden noch hellgelb gefärbten Lösung (b) wurde zunächst der kristalline Bodensatz (a) untersucht.

a) Isolierung von Bernsteinsäure-bis-[1,1'-phenyl-2,2'-methyl-hydrazid]

Nach zweimaligem Umlösen aus Methanol wurden 3,2 g farblose Kristalle vom Fp. 170—171° erhalten.

$C_{18}H_{22}O_2N_4$ (326,4)

Ber.: C 66,23 H 6,79 O 9,80 N 17,17 Mol.-Gew. 326,4

Gef.: C 66,05 H 6,65 O 9,80 N 16,91 Mol.-Gew. 330 (Kampfer)

b) Nachweis der Oxalsäure

Eine Probe der alkalischen Lösung wurde mit Essigsäure angesäuert und mit etwas Calciumchloridlösung versetzt. Es entstand ein weißer Niederschlag, der sich nach Zugabe von verd. Salzsäure wieder löste. — Darauf wurde die gesamte alkalische Lösung auf etwa 200 ml eingedampft, mit Salzsäure angesäuert und nach dem Hinzufügen von wenigen Tropfen Methylrotlösung und einer Lösung von 5 g Calciumchlorid in 20 ml Wasser bei etwa 70° nach und nach bis zum Farbumschlag mit verd. Ammoniak versetzt, der weiße Niederschlag nach einstündigem Stehen auf einem Glasfildertigel gesammelt, mit wenig Wasser nachgewaschen und bei 105° getrocknet. Gewicht 2,98 g. Die Resorcin-schwefelsäure-Schichtprobe auf Oxalsäure war positiv (blauvioletter Ring).

Titrationen mit 0,1 n-KMnO₄-Lösung:

Einwaagen: 1. 205,4 mg

2. 123,1 mg Ca-Fällung

Gef.: 1. 200,5 mg

2. 121,2 mg [(COO)₂Ca+H₂O]

5. Bernsteinsäure-bis-[1,1'-phenyl-2,2'-methyl-1,1'-nitroso-hydrazid]

3 g des nach 4 erhaltenen Bernsteinsäure-[bis-(1,1'-phenyl-2,2'-methyl)-hydrazids (2,2')] (Fp. 170—171°) wurden in 36 ml Eisessig gelöst und nach und nach mit einer Lösung von 0,85 g Natriumnitrit in wenigen ml Wasser versetzt. Beim Stehenlassen über Nacht im Eisschrank schieden sich gelbe Kristalle (2,7 g) aus, die von der überstehenden Eisessiglösung abgetrennt und aus Äther umkristallisiert wurden. Sie schmolzen bei 106 bis 108°. — Die vorsichtig mit Natrium-Hydrogenkarbonatlösung neutralisierte essigsaure Lösung wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der vereinigten und getrockneten Ätherauszüge konnten nochmals 0,55 g gelbe Kristalle vom Fp. 106—108° erhalten werden. Gesamtausbeute 3,25 g.

$C_{18}H_{20}O_4N_6$ (384,4)

Ber.: C 56,24 H 5,24 O 16,65 N 21,87

Gef.: C 56,56 H 5,32 O 16,42 N 21,23

6. Spaltung des Bernsteinsäure-bis-[1,1'-phenyl-2,2'-methyl-1,1'-nitroso-hydrazids]

3 g Bernsteinsäure-[bis-(1,1'-phenyl-2,2'-methyl-1,1'-nitroso)-hydrazid(2,2')] löste man in 200 ml Äthanol und gab 5,6 g Kaliumhydroxyd hinzu. Die Lösung nahm einen orangefarbenen Farbton an. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde filtriert und nach Zugabe von 100 ml Wasser das Äthanol im Vakuum abdestilliert. Die nunmehr zurückbleibende wäßrige Lösung wurde mehrmals mit Methylenechlorid ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der vereinigten Methylenechloridauszüge konnten keine kristallinen Anteile gefunden werden. — Die wäßrige Phase versetzte man mit verd. Salzsäure im schwachen Überschuß (pH 3—4) und dampfte im Vakuum zur Trockne ein. Der kristalline Rückstand — zum größten Teil Kaliumchlorid — wurde bei 60—70° nachgetrocknet und dann mit 200 ml trockenem Äther auf dem Wasserbade unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Filtrieren wurde die klare ätherische Lösung eingeengt. Es schieden sich 0,38 g nahezu farblose Kristalle ab. Sie sublimierten stark ab 140° und schmolzen bei 181—182°. Die Probe nach *Lassaigne* auf Stickstoff war negativ. Die Kristalle lösten sich sehr leicht in warmem Wasser mit saurer Reaktion, ihre Löslichkeit in kaltem Wasser war geringer. Die wäßrige Lösung ergab mit Bleiacetatlösung eine Trübung. Vollkommen farblose Kristalle konnten durch Umlösen aus Wasser unter Filtration über Kohle er-

halten werden. Sie schmolzen bei 183° und zeigten im Mischschmelzpunkt mit Bernstein-säure keine Depression.

7. Oxydativer Abbau des 4-Hydroxy-antipyryns mit Wasserstoffperoxyd in alkalischer Lösung

3 g 4-Hydroxy-antipyryrin löste man in 150 ml n-Natronlauge und gab in Anteilen unter gutem Kühlen 45 ml Wasserstoffperoxyd (30%ig) hinzu. Nach 6stündigem Stehen wurde die überstehende, orangerot gefärbte, alkalische Lösung (b) von einer kristallinen Ab-scheidung (a) abfiltriert.

a) Identifizierung des Essigsäure-[1-phenyl-2-methyl]-hydrazids(2)].

Die Probe nach *Lassaigne* auf Stickstoff war positiv. — Nach dem Umlösen aus Äther wurden 0,7 g farblose Kristalle vom Fp. 91–92° erhalten (*K. Auwers* und *H. Mauss*⁹⁾: 92°).

$C_9H_{12}ON_2$ (164,2)	Ber.: C 65,84	H 7,37
	Gef.: C 65,66	H 7,33

b) Nachweis der Oxalsäure wie unter 4b.

Die gewogene Menge Calciumoxalat (1,420 g) wurde zur Reinigung in verd. Salzsäure gelöst, die filtrierte Lösung mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und aus der wäßrigen Phase nach Zugabe von etwas Calciumchlorid das Calciumoxalat durch verd. Am-moniak erneut gefällt. Erhalten wurden nun 1,370 g rein weißer Niederschlag. — Hier-von wurde eine Probe in verd. Schwefelsäure gelöst und durch die Resorcin-Schwefel-säure-Schichtprobe auf Oxalsäure geprüft (blauvioletter Ring).

Titration mit 0,1 n-KMnO₄-Lösung.

Einwaagen: 1. 244,1 mg	Gef.: 1. 239,6 mg
2. 153,0 mg Ca-Fällung	2. 152,6 mg [(COO) ₂ Ca + H ₂ O]

8. Versuche zur Auffindung weiterer Reaktionsprodukte der Oxydation des Pyramidons mit geringen Mengen Jodsäure

a) Nachweis des Dimethylamins

600 ml der nach Versuch Nr. 1 erhaltenen wäßrigen, orangefarbenen Mutterlauge wurden mit Natronlauge im Überschuß versetzt und einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat reagierte alkalisch und roch stark nach Dimethylamin. Der Nachweis des Dimethylamins erfolgte durch Umsetzung des Destillates mit Indol und Formaldehyd. Es wurden farblose Kristalle erhalten. Sie schmolzen nach dem Umlösen aus Äther bei 133° und zeigten im Mischschmelzpunkt mit Gramin (Fp. 134°) keine Dep-ression.

b) Isolierung von 4-Hydroxy-antipyryrin

600 ml der wäßrigen Mutterlauge wurden mit Methylenchlorid mehrmals ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der vereinigten Methylenchloridauszüge über Natriumsulfat destil-lierte man das Lösungsmittel auf etwa 20 ml ab, gab etwas Methanol hinzu und engte erneut auf 3–4 ml ein. Es schieden sich 0,57 g bräunliche Kristalle ab. Man löste sie in etwas Methylenchlorid und filtrierte über eine Aluminiumoxydsäule. Nach erneutem Einengen des Lösungsmittels wurden farblose Kristalle erhalten. Sie sublimierten stark ab 165°, schmolzen bei 182–183° und zeigten im Mischschmelzpunkt mit 4-Hydroxy-antipyryrin keine Depression.

c) Die restliche Mutterlauge (600 ml) wurde auf etwa 100 ml eingedampft. Es schieden sich 0,7 g bräunliche Flocken aus. Nach dem Reinigen mit Tetrahydrofuran (s. Vers. Nr. 1) schmolz der graugelbliche Rückstand nach vorherigem Sintern ab 268° bei 280 bis 282° unter Zersetzung. Durch Umsetzen dieser Substanz mit Benzylchlorid in alkalischem Äthanol (s. Vers. Nr. 2) konnten nochmals 0,4 g des Bisbenzyläthers vom Fp. 149° erhalten werden.

9. Umsetzung des 4-Hydroxy-antipyryns mit wenig Jodsäure

8 g Hydroxy-antipyryrin wurden mit 800 ml 0,1 n-Kaliumjodatlösung und 20 ml 20%iger Schwefelsäure 1 Stde. lang auf dem Wasserbade erhitzt. Die anfangs sehr dunkle Lösung hellte sich vorübergehend stark auf und nahm dann nach etwa halbstündiger Reaktionszeit unter Abscheidung eines Niederschlages einen hellroten Farbton an. Nach dem Erkalten wurde die überstehende Flüssigkeit vom Bodensatz abfiltriert. Das braunrote Rohprodukt wurde mit Tetrahydrofuran gereinigt (s. Versuch Nr. 1). Die nun grau-gelbe Substanz (1,58 g) war in verd. Natronlauge leicht löslich, begann ab 273° zu sintern und schmolz bei 280–281°. Nach Umsetzung mit Benzylchlorid in alkalischem Äthanol (s. Versuch Nr. 2) erhielt man gelbe Kristalle vom Fp. 149–150°. Sie ergaben im Mischschmelzpunkt mit den unter Nr. 2 dargestellten Kristallen (Bisbenzyläther) keine Depression.

Nach dem Ausschütteln der wäßrigen Mutterlauge mit Methylenchlorid und dem Einengen der Methylenchloridauszüge wurden 3 g der Ausgangsverbindung, 4-Hydroxy-antipyryrin, zurückerhalten.

1812. H. Janecke und W. Hennig

Über einige Eigenschaften von in Drogen vorkommenden Phosphatasen*

4. Mitteilung¹⁾: Versuche zur Extraktion von Desmophosphatasen

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität in Frankfurt/M.

(Eingegangen am 10. Juni 1959)

Versuche zur Extraktion von Desmophosphatasen

Es wird von *J. Courtois* und Mitarbeitern²⁾ berichtet, daß es ihnen nicht oder nur in geringem Umfang gelungen ist, Desmophosphatasen in Lösung zu bringen. Dabei wurden die gebräuchlichen Methoden herangezogen, die bei anderen Enzymen zum Teil zu guten Erfolgen geführt haben. Es waren die folgenden Verfahren:

Extraktionen mit n-Butanol, Petroläther, Azeton oder anderen organischen Lösungsmitteln zur Aufspaltung von Symplexbindungen, mit Neutralsalzlösungen, wie Kochsalzlösung, mit Harnstofflösung, mit leicht alkalischen Pufferlösungen (wie z. B. Ammoniak-Ammoniumchlorid) sowie Behandlung mit Papain. Diese Verfahren führten zu keiner Erhöhung der extrahierten Phosphatasemenge. Auch die Extraktion mit Glycerin brachte nicht den erwünschten Erfolg.

Von *E. Bamann*, *E. Ullmann* und *U. Tietz*³⁾ wurde gezeigt, daß die als weitgehend unlöslich angesehene Lipase in Nigella-Samen durch 0,025 n-Ammoniak-

*) Herrn Professor Dr. Dr. h. c. *H. P. Kaufmann* zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ *H. Janecke* und *W. Hennig*, *Pharmaz. Zhalle* 98, 229, 285 (1959); Mitt. 3 demnächst in ds. Ztschr.

²⁾ *J. Courtois* und *M. Khorsand*, *Biochim biophys. Acta* (Amsterdam) 6, 175 (1950); *J. Courtois*, *C. Anagnostopoulos* und *M. Khorsand*, *Bull. Soc. Chim. biol.* 33, 1813 (1951).

³⁾ *E. Bamann*, *E. Ullmann* und *U. Tietz*, *Biochem. Z.* 323, 489 (1953).