

angehören. Mit Triphenylchlormethan tritt keine Reaktion ein, nach HELFERICH ein Hinweis, daß keine primären Hydroxylgruppen in der Bis-DHA-Molekel vorhanden sind.

Für die Auffassung der Bis-DHA als Dioxanderivat spricht das analoge Verhalten von α -Oxyaldehyden, bei denen über die primäre Bildung von Epoxyden Dimerisierung der Grundmolekel zu Dioxanderivaten angenommen wird.

Institut für Therapeutische Chemie der Universität, Mainz
H. ALBERS und E. MÜLLER

Eingegangen am 31. Oktober 1958

*) Dimethylsulfoxyd wurde uns freundlicherweise von der „Union Rheinische Braunkohlen Kraftstoff AG“ überlassen. Der Wert der Gefrierpunktskonstanten wurde empirisch mittels meso-Inositol (4,26), Diacetonalkohol (4,88), L-Ascorbinsäure (4,57), trans-Zimtsäure (4,10) und Tetraacetyl-bis-DHA (4,17) zu 4,40 ($\pm 0,50$) bestimmt.

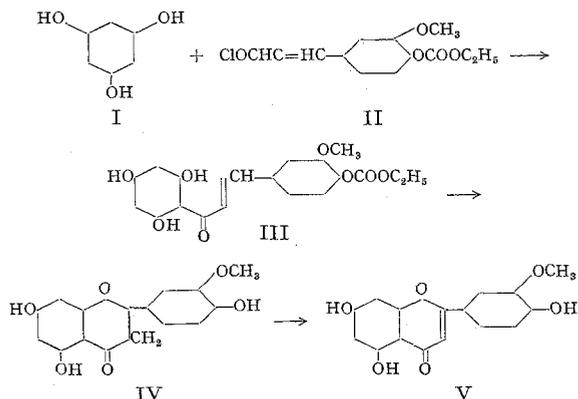
***) KARRER, P. u. Mitarb.: Biochem. Z. 258, 14 (1933) bestimmten das Molekulargewicht der DHA nach BARGER-RAST zu 186. Wir fanden, daß Bis-DHA in Kampfer sehr schwer löslich ist und daß sich die Schmelzen mit DHA unter Zersetzung gelbbraun färben.

¹) KENYON, J., u. N. MUNRO: J. Chem. Soc. [London] 1948, 158. — ²) EISTERT, B.: Z. angew. Chem. 66, 160 (1954). — ³) EULER, H. v., u. B. EISTERT: Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate, S. 225. Stuttgart: Ferdinand Enke 1957.

The Synthesis of Chrysoeriol (3'-methyl ether of Luteolin) and Homoeriodictyol (5,7,4-trihydroxy-3'-methoxy flavanone)

During the course of the study of the anthoxanthin glycosides from Indian celery seeds (*Apium graveolens*)¹⁾, the identity of chrysoeriol (V) had to be confirmed. This compound had earlier been synthesized by ROBINSON et al.²⁾ by the well known Allan-Robinson synthesis. Chrysoeriol (V) was therefore prepared by the method adopted by ROBINSON et al.²⁾ as well as by a different route via homoeriodictyol (IV) given below.

Phloroglucinol (I) has been condensed with carboethoxy ferulyl chloride (II) in presence of aluminum chloride (anhydrous) in dry ether and yielded 2',4',6'-trihydroxy-4-carboethoxy-3-methoxy chalcone (III) which could not be obtained in crystalline form but responded to the usual chalcone tests. The crude chalcone (III) was subjected to cyclisation with a mixture of alcohol and sulphuric acid for 48 hours when it yielded a product which gave a salmon pink colouration both with magnesium and hydrochloric acid and sodium amalgam followed by acidification. All attempts to purify the substance by crystallization failed and therefore its purification undertaken through chromatography on alumina „Merck“ (Brockmann). This resulted in the separation of three distinct substances. One of them was identified as homoeriodictyol (IV), m. p. 220,5 to 22,5° [cf. SHINODA and SATO³⁾ m. p. 224 to 5°; RUSSEL and TODD⁴⁾ m. p. 219 to 20°¹⁾].



The flavanone, homoeriodictyol (IV) was subjected to oxidation with sodium acetate and iodine in alcoholic solution and the product so obtained chromatographed on alumina when it yielded a yellow substance. The yellow substance was identified as chrysoeriol (V) by along side paper chromatography (ascending) with authentic samples obtained by the synthesis of ROBINSON et al.²⁾ and from *apium graveolens*¹⁾, ⁵⁾ using Whatman filter paper No. 1 and butanol:acetic acid:water (40:10:50) (R_f 0,91) and acetic acid:water (60:40) (R_f 0,72) as solvent mixtures. The spots were revealed by examination in u. v. light, u. v. light and ammonia vapours

and spraying with sodium carbonate solution. The flavone (V) on acetylation and crystallization with ethyl acetate gave colourless, crystalline shining needles identified by melting and mixed melting points with an authentic sample of chrysoeriol acetate.

All melting points have been taken on Koflers block.

Department of Chemistry, Muslim University, Aligarh (India)

M. O. FAROOQ, I. P. VARSHNEY, W. RAHMAN and P. C. GANGWAR

Eingegangen am 5. November 1958

¹) FAROOQ, M. O., S. R. GUPTA, M. KIAMUDDIN, W. RAHMAN and T. R. SESHADRI: J. Sci. Ind. Res. India B 12, 400 (1953). — ²) LOVECY, A., R. ROBINSON and S. SUGASAWA: J. Chem. Soc. [London] 1930, 817. — ³) SHINODA, J., and S. SATO: J. Pharm. Soc. Japan 49, 6470 (1929). — Chem. Abstr. 23, 4210 (1929). — ⁴) RUSSEL, A., and J. TODD: J. Chem. Soc. [London] 1937, 421. — ⁵) FAROOQ, M. O., I. P. VARSHNEY and W. RAHMAN: Naturwiss. 45, 265 (1958).

Die Verwendung von Zn²⁺-Ionen bei der Herstellung gereinigten und konzentrierten Antitoxins durch enzymatische Hydrolyse

Heutzutage wird die Reinigung und Konzentrierung von zum therapeutischen Gebrauch bestimmten antitoxinhaltigen Sera im allgemeinen durch enzymatische Abbauverfahren bewerkstelligt. Die in der Industrie angewandten Methoden sind jedoch langwierig (Dialyse, usw.) und begünstigen dadurch die bakterielle Verunreinigung der bearbeiteten Sera, was wieder in manchen Fällen das Auftreten von pyrogenen Stoffen zur Folge hat. In der Hoffnung, ein Reinigungs- und Konzentrierungsverfahren antitoxinhaltiger Sera durch enzymatische Hydrolyse zu entwickeln, das die oben erwähnten Nachteile ausschließt, haben wir in den letzten Jahren, durch die Arbeiten über die Eiweißfraktionierung mit Schwermetallen¹⁻³⁾ angeregt, die Wechselwirkung zwischen Zn²⁺-Ionen und den verschiedenen Eiweißkomponenten, die in den antitoxischen Sera nach der Proteolyse auftreten, zu erforschen versucht.

Die bei diesen Untersuchungen angestellten Beobachtungen haben es uns ermöglicht, eine Methode zur Herstellung von gereinigten und konzentrierten antitoxinhaltigen Sera auszuarbeiten, der ein neues Prinzip zugrunde liegt und welche folgende Hauptabschnitte umfaßt:

1. Proteolyse des antitoxischen Serums.
2. Fraktionierung des Proteolysates durch die kombinierte Wirkung von Zn²⁺-Ionen und des thermischen Faktors in Anwesenheit von Phenol. (Das Nativserum wurde zu Beginn mit 0,25 g Phenol pro 100 ml Serum versetzt.) Nach Beendigung der Proteolyse wird auf $pH = 7,0$ eingestellt und soviel einer 10%igen Zn(CH₃-CO₂)₂ · 2H₂O-Lösung hinzugefügt, daß im System eine Konzentration von 0,17 g Zn(CH₃-CO₂)₂ pro 100 ml erreicht wird. Nun Einstellung auf $pH = 6,25$ und Erwärmen der Proben auf 58° C. Nach 45 min langer Belassung bei dieser Temperatur wird der inzwischen gebildete Niederschlag durch Abzentrifugieren entfernt. Der Überstand wird auf $pH = 7,8$ gebracht [Bildung von Zn(OH)₂ in statu nascendi] und nach 2 Std Stehen bei +4° C zentrifugiert.
3. Entfernung der Zn²⁺-Ionen mit Hilfe eines Ionenaustauschers, so daß die Endkonzentration des Zn im gereinigten und konzentrierten Serum den Vorschriften für injizierbare biologische Präparate entspricht.

4. Die Isolierung des Antitoxins durch eine einfache Fällung mit Äthanol bei -5° C. Die Endkonzentration des Äthanol im System betrug 37,5% (v/v) und die Temperatur des Gemisches -5 bis -7° C.

5. Entfernung der Äthanolreste aus dem Niederschlag durch Gefrierdrying, Lösung des lyophilisierten Präparates in physiologischer NaCl-Lösung, Einstellen des pH auf 7,0 und Entkeimung durch Filtration.

Die Dauer dieses Reinigungs- und Konzentrierungsverfahrens antitoxinhaltiger Sera beträgt ungefähr 72 Std; das Fertigpräparat ist den Vorschriften entsprechend unschädlich und frei von pyrogenen Stoffen.

Bei nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten gereinigten und konzentrierten Diphtheriesera gelang eine Anreicherung der AE pro mg Eiweiß-N zwischen 1,81 und 2,24 mit einem Durchschnittswert von 2,03, eine Konzentrierung der Sera von 2,3 bis 3,2, im Durchschnitt 2,8 (bei einer maximalen Konzentration von 12 g Eiweiß pro 100 ml der gereinigten und konzentrierten Sera), mit einer Ausbeute von 51,7 bis 64,0%, im Durchschnitt 56,5%.