

Die genannten Reaktionen sind in Weiterverfolgung geeignet, zur Konstitutionsaufklärung für Voacamin und Voacarin herangezogen zu werden.

Fräulein S. DEMANN, Fräulein E. LUNAU und Fräulein E. MÜCKISCH danken wir für die experimentelle Unterstützung.

Pharmazeutisch-Chemische Abteilung der Fa. Dr. Madaus & Co. (Leiter: Prof. Dr. H. ERBRING), Köln-Merheim

Eingegangen am 7. März 1961

WILHELM WINKLER

¹⁾ GOUTAREL, R., F. PERCHERON u. M.M. JANOT: C. R. Acad. Sci. [Paris] 243, 1670 (1956). — ²⁾ PERCHERON, F.: Ann. Chimie 4, 303 (1959). — ³⁾ BERTHO, A., M. KOLL u. M. ISHAK FEROSIE: Chem. Ber. 91, 2581 (1958). — ⁴⁾ STAUFFACHER, D., u. E. SEEBECK: Helv. chim. Acta 41, 169 (1957). — ⁵⁾ RENNER, U.: Experientia [Basel] a) 13, 468 (1957); b) 15, 185 (1959). — ⁶⁾ RAO, K.V.: J. org. Chemistry 23, 1455 (1958). — ⁷⁾ RENNER, U., u. D.A. PRINS: Experientia [Basel] 15, 456 (1959).

Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von 1,4-Dien-3-keto-steroiden neben 4-En-3-keto-steroiden (Kreuzkonjugation neben einfacher Konjugation)

Bis auf Cortison und Hydrocortison besitzen alle heute in der Corticosteroidtherapie wichtigen Stoffe¹⁾ wie Prednison, Prednisolon, 6 α -Methyl-prednisolon, Triamcinolon, Dexamethason usw. im Ring A des Steroidgerüsts 1,4-Dien-3-keto-Struktur. Das gleiche gilt z. B. auch für das als anaboles Hormon angewendete 1-Dehydro-17 α -methyl-testosteron²⁾. Sofern die Darstellung dieser 1,4-Dien-3-keto-steroiden, sei es in der End- oder in einer Vorstufe, aus den jeweiligen 4-En-3-keto-steroiden erfolgt, wofür sowohl chemische^{2, 3)} als auch mikrobiologische⁴⁾ Verfahren beschrieben wurden, ist die analytische Erfassung beider Systeme nebeneinander von Bedeutung. Dies ist in besonderem Maße bei der mikrobiologischen Dehydrierung der Fall, die in ihrem zeitlichen Ablauf ständig verfolgt werden muß, um nach völligem Umsatz durch rechtzeitige Isolierung das Steroid vor weiteren fermentativen Reaktionen zu schützen.

Zur direkten Bestimmung von 1,4-Dien-3-keto-steroiden neben 4-En-3-keto-steroiden wurden bisher polarographische⁵⁾ und kolorimetrische⁶⁾ Methoden beschrieben. Wir benutzen

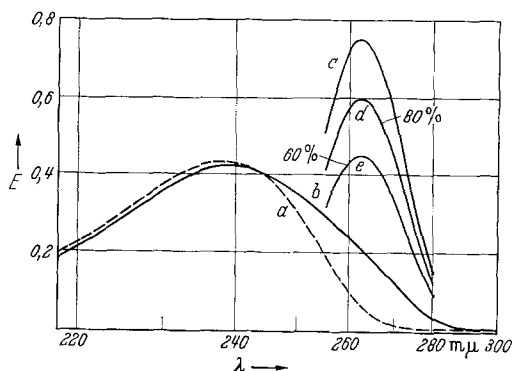


Fig. 1 a—e. UV-Absorptionsspektren von Cortison (a) und Prednison (b) (beide 0,001 g/100 ml) sowie deren Differenzkurven (0,005 g/100 ml) in Äthanol, c reines Prednison, d und e mit 80% bzw. 60% Gehalt

seit Jahren sowohl zur Reinheitsbestimmung als auch zur Verfolgung mikrobiologischer 1,2-Dehydrierungen eine einfache UV-spektroskopische Differenzmethode, die mit jedem handelsüblichen UV-Spektrophotometer durchgeführt werden kann.

1,4-Dien-3-keto-steroiden besitzen ein UV-Absorptionsmaximum annähernd gleicher Intensität bei nahezu der gleichen Wellenlänge wie die jeweils entsprechenden 4-En-3-keto-steroiden, während sich die Spektren beider Verbindungsreihen an der langwelligen Flanke der Banden erheblich unterscheiden. Fig. 1 zeigt als Beispiel dafür die UV-Absorptionskurven des Cortisons (a) und Prednisons (b), wovon die des Prednisons einen erheblich flacheren Abfall nach längeren Wellen besitzt.

Mißt man daher Lösungen beider Stoffe in gleicher Konzentration gegeneinander, so ergibt sich die in der Fig. 1 abgebildete Absorptionsdifferenzkurve mit einem gut definierten Maximum bei 263 mμ, die offensichtlich den Absorptionsanteil der Kreuzkonjugation darstellt. Für die analytischen Bestimmungen wird der Wert von ΔE im Maximum der Differenzkurve verwendet. Die Fig. 1 zeigt z. B. neben der Differenz-

kurve des reinen Prednisons Kurven von Material mit 60 bzw. 80% Gehalt. In der Praxis hat sich für die Messung eine Konzentration von 0,005% in Äthanol am besten bewährt. Durch Umrechnung auf eine Konzentration von 1 g in 100 ml Lösungsmittel erhält man die bei uns üblichen Vergleichswerte $\Delta E_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Die Methode ist für alle 1,4-Dien-3-keto-steroiden anwendbar. Die Lage des Maximums der ΔE -Kurve variiert in engen Grenzen, die ΔE -Werte sind für jeden Stoff in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Struktur verschieden. Nachstehende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung mehrerer von uns untersuchter Systeme. Als Ergänzung wurde noch die molare Extinktionsdifferenz, die für die analytische Behandlung aber unbedeutend ist, angegeben. Ihre Errechnung aus den ΔE -Werten ist zulässig, da der Unterschied im Molekulargewicht der jeweiligen Steroide unter 1% und damit innerhalb der Fehlergrenze der Extinktionsmessung liegt.

Tabelle. Photometrische Differentialanalyse von 1,4-Dien-3-keto-steroiden gegenüber 4-En-3-keto-steroiden

Steroid	$\lambda_{\text{m}\mu}$	$\Delta E_{1\text{cm}}^{1\%}$	$\Delta \epsilon$
Prednison	262,5	151	5410
Prednison-21-acetat	263	136	5440
Prednisolon	264,5	163	5870
1,4-Pregnen-17 α , 21-diol-3,20-dion	264,5	193	6650
16-Methylen-prednisolon	264,5	164	5940
16-Methylen-prednison	262	158	5850
9 α -Fluor-16-methylen-prednisolon	264	143	5580
16-Methylen-17 α -methyl-1,4-androstadien-17 β -ol-3-on	262,5	220	6860
1-Dehydro-testosteron	264	229	6550

Die Genauigkeit der Methode liegt bei $\pm 1,5\%$. Bei der Kontrolle laufender mikrobiologischer Dehydrierungen wird das Steroidgemisch durch Extraktion gewonnen. Die Konzentration wird zweckmäßigerweise nach beliebiger Einwaage durch Zugabe entsprechender Menge Lösungsmittel eingestellt.

Wir danken Herrn Dr. HAMPEL für die Messung der Absorptionskurven, Herrn Dr. METZ für die Durchführung mikrobiologischer Dehydrierungen.

Forschungslaboratorium der E. Merck AG, Darmstadt

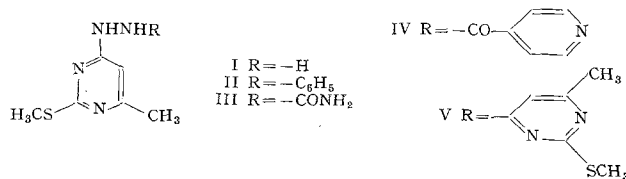
H. RÖSSLER und K. BRÜCKNER

Eingegangen am 15. August 1961

¹⁾ FIESER, L.F., u. M. FIESER: Steroids. New York: Reinhold Publishing Corporation 1959. — ²⁾ MEYSTRE, CH., H. FREY, M. VOSER u. A. WETTSTEIN: Helv. chim. Acta 39, 737 (1956). — ³⁾ SZILFÖGEL, S.A., T.A.P. POSTHUMUS, M.S. DE WINTER u. D.A. VAN DORP: Recueil Trav. Chim. Pays-Bas 75, 475 (1956); — BURN, D., D.N. KIRK u. V. PETROW: Proc. Chem. Soc. 1960, 14. — ⁴⁾ NOBLE, A., W. CHERNEY, P.L. PERLMAN, H.L. HERZOG, C.C. PAYNE, M.E. TULLY, M.A. JEVNIK u. E.B. HERSHBERG: J. Amer. Chem. Soc. 77, 4184 (1955). — ⁵⁾ KABASAKALIAN, P., S. DE LORENZO u. J. MCCLOTTEN: Analyt. Chem. 28, 1669 (1956); — DEYS, H.P., u. J.A.C. VAN PINXTAREN: Pharmaz. Weekbl. 93, 760 (1958). — ⁶⁾ BIANCHI, H.: Chim. e Ind. 41, 33 (1959); — KAKÁČ, B.: Českoslov. Farmac. 8, 427 (1959).

Syntheses of some 4-Substituted-amino-2-Methylthio-Pyrimidines

A number of 4-substituted pyrimidines having a thiol or a methylthio group in 2-position have been reported to exert inhibitory effect on the growth of some microorganisms¹⁾. In continuation of our studies on the synthesis of pyrimidine derivatives having biological and chemotherapeutic properties^{2, 3)}, we have now synthesized the following 2-methylthio-pyrimidines having hydrazino and substituted hydrazino groups in position 4 (Compounds I to V).



I. M.p. 143°–44° C, λ_{max} = 244 mμ. (Found C: 42.37, H: 5.56, N: 32.90, S: 18.98%. C₆H₁₀N₄S requires C: 42.35, H: 5.88, N: 32.94, S: 18.94%.) This on treatment with benzaldehyde in warm ethanol gave the corresponding benzal-

dehyde pyrimidyl hydrazone (Found N: 21.91%, $C_{13}H_{14}N_4S$ requires N: 21.7%). II gave no such derivative.

II. M.p. $141^\circ-42^\circ$ C (vac. sealed tube). $\lambda_{\max} = 252$ m μ . (Found C: 58.31, H: 5.79, N: 22.51%. $C_{12}H_{14}N_4S$ requires C: 58.54, H: 5.69, N: 22.69%).

III. M.p. $217^\circ-18^\circ$ C. $\lambda_{\max} = 246$ m μ . (Found C: 39.12, H: 4.80, N: 32.65, S: 15.02%. $C_7H_{11}N_5OS$ requires C: 39.43, H: 5.16, N: 32.86, S: 15.02%).

IV. M.p. $188^\circ-189^\circ$ C. $\lambda_{\max} = 248$ m μ . (Found C: 52.4, H: 4.8, N: 25.32%. $C_{12}H_{13}N_5OS$ requires C: 52.36, H: 4.73, N: 25.45%).

V. M.p. $223^\circ-24^\circ$ C. $\lambda_{\max} = 256$ m μ . (Found C: 46.45, H: 5.12, N: 27.84%. $C_{12}H_{16}N_6S_2$ requires C: 46.75, H: 5.19, N: 27.80%).

(The melting points were determined in capillary tubes on a copper block. $\lambda_{\max}$ indicates the wave length corresponding to the peak in the U.V. spectra determined in 0.1 N hydrochloric acid.)

The compounds (I–IV) were synthesized by the condensation of 2-methylthio-4-chloro-6-methylpyrimidine (VI) with hydrazine hydrate (30%), phenylhydrazine hydrochloride, semicarbazide hydrochloride and isonicotinic acid hydrazide respectively. Magnesiumoxide was used as acid acceptor in the case of I and sodium acetate in the case of II. The compounds III and IV were obtained as the hydrochlorides. Their free bases were prepared by treating their warm aqueous solutions with ammonia. Compound V was obtained by refluxing I and VI in dioxane in presence of sodium bicarbonate.

Compound I was crystallized from benzene, compounds III, IV and V from aqueous alcohol. Compound II was purified by dissolving it in acid and then precipitating with ammonia. The effect of these compounds on the growth of certain microorganisms and on tumour growth is under investigation.

We wish to express our thanks to the Council of Scientific and Industrial Research, Government of India, for financing this work and to Mr. B. BHATTACHARYYA of this Department for microanalyses.

Department of Applied Chemistry, University Colleges of Science and Technology, Calcutta-9, India

M. GANGULY, D. SEN and B. C. GUHA

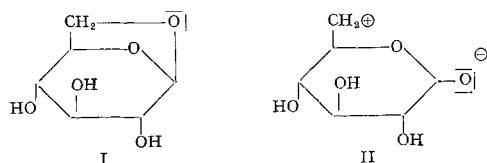
Eingegangen am 17. August 1961

¹⁾ McNair Scott, D. B., T. L. V. Ulbricht, M. L. Rogers, E. Chu and C. Rose: Cancer Res. 19 (Part 2), 15 (1959). — ²⁾ Roy, D., S. Ghosh and B. C. Guha: Arch. Biochem. Biophys. 92, 366 (1961). — ³⁾ Roy-Burman, P., D. Roy and D. Sen: Naturwissenschaften 47, 515 (1960).

Über die Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf Lävoglucosan

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß bei der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf Lävoglucosan (20 Std 20° , 1 bis 5 Torr) ein Saccharidgemisch gebildet wird. Die Trennung dieses Gemisches erfolgte durch Säulenchromatographie an Knochenkohle Darco G 60 und Celite Nr. 535 (1:1). Erhalten wurden dabei Mono-, Di- und einzelne Polysaccharidfraktionen. Die Disaccharide wurden papierchromatographisch im präparativen Maßstabe voneinander getrennt. Das Saccharidgemisch besteht aus: Spuren Lävoglucosan, 15 bis 20% Glucose, 12 bis 16% Isomaltose, 3 bis 4% Gentiobiose, 1 bis 2% Cellobiose, 60 bis 70% Tri- und höhere Saccharide. Aus IR-Spektren geht hervor, daß die höheren Saccharide aus in α und β (1,6) verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten bestehen.

Bei der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf Lävoglucosan (I) wird der (1,6) O-Ring geöffnet, und mit der entstehenden ionischen Molekel (II) spielen sich die Polymerisationsvorgänge ab.



Durch Wasseranlagerung an II geht Glucose hervor. Die Bildung der Cellobiose erfolgt sekundär durch Wasserabspaltung aus zwei Glucosemolekeln.

Ein monomerer Anhydrozucker¹⁾ wird nicht gebildet. Papierchromatographisch konnte nachgewiesen werden, daß ein Saccharidgemisch vorlag, das durch die alten Methoden nicht zu trennen war. Auch der Pringsheimsche γ -Zucker²⁾ konnte als ein- und dasselbe Saccharidgemisch identifiziert werden.

Die näheren Einzelheiten dieser Arbeit werden an anderer Stelle veröffentlicht.

Institut für Chemie an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität, Berlin (Direktor: Prof. Dr. L. REICHEL)

LUDWIG REICHEL und HUBERT SCHIWECK

Eingegangen am 30. August 1961

¹⁾ REICHEL, L., G. ERDÖS u. F. NAGEL: Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1618 (1932); 74, 1742 (1941). — ²⁾ PRINGSHEIM, H., S. KOLODNY u. A. BAISER: Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 1135, 2241 (1926).

Charakterisierung von hochgereinigtem Hämopexin

Das von einigen Autoren¹⁻⁶⁾ bei elektrophoretischen Untersuchungen beobachtete hämbindende Serumprotein Hämopexin konnte von uns in reiner Form aus Humanserum isoliert

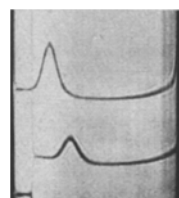


Fig. 1

Fig. 1. Ultrazentrifugen-Analyse von Hämopexin. Spinco Modell E. 59800 U/min. 1% und 0,5% Eiweiß, Aufnahme nach 55 min

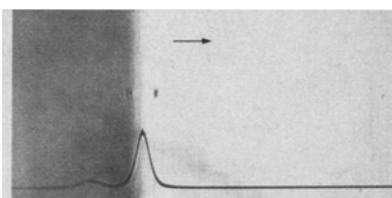


Fig. 2

Fig. 2. Tiselius-Elektrophorese von Hämopexin. Spinco Modell H. Aufsteigend, Aufnahme nach 63,9 min. Longworth-Puffer $pH = 8,6$, $\mu = 0,1$

werden. Die Darstellung des nachstehend beschriebenen Präparates erfolgte aus dem durch Ultrafiltration eingeeengten Perchlorsäureabguß³⁾, ⁴⁾ durch Ammonsulfatfällung zwischen 60 und 70% Sättigung und anschließende Zonenelektrophorese in Polyvinylchlorid bei $pH = 4,5$ und $pH = 8,6$. Als Ausgangsmaterial für die Hämopexingewinnung verwandten wir außer dem Perchlorsäure-Abguß auch die bei der Serumfraktionierung nach dem kombinierten Ammonsulfat-Aluminiumhydroxyd-Verfahren anfallende Fraktion L IV + VI⁷⁾ (Mutterlauge der Humanalbumin-Gewinnung), aus der wir durch Fraktionierung mit Rivanol und Zonenelektrophorese bei $pH = 8,6$ gleichfalls ein einheitliches Hämopexin erhalten konnten. Das Hämopexin-Präparat war in der Ultrazentrifuge (Fig. 1), Tiselius-Elektrophorese (Fig. 2) und Stärkegelelektrophorese, in der es etwas schneller als Transferrin wandert, (Fig. 3) einheitlich. Es enthielt jedoch noch eine geringe Menge an gebundenem Häm (Absorption bei 410 m μ), die eine leichte Gelbfärbung der Lösung bedingte, und die sich in der Tiselius-Elektrophorese (Fig. 2) als dunkle Zone bemerkbar machte. In der Immunoelktrophorese (Fig. 4) waren noch Spuren eines nicht definierten α_2 -Globulins, die in der Tiselius-Elektrophorese nicht erkennbar waren, nachweisbar. Mit Antitransferrinserum von Kaninchen wurde keine Reaktion beobachtet.

Die chemische Analyse ergab: Der Proteinanteil beträgt etwa 80% (BiuretWert). Der übrige Teil der Molekel besteht aus Kohlehydraten, und zwar 9,0% Hexosen (Galaktose/Mannoseverhältnis etwa 1:1), 7,4% Acetylhexosamin, 5,8% Acetylneuraminsäure und 0,41% Fucose. Lipoid ist nicht nachweisbar. Die hohe Extinktion $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 280$ m $\mu = 16,9$ ist auf einen kolorimetrisch bestimmten Gehalt von 4,4% Tyrosin und 4,7% Tryptophan zurückzuführen.

Hämopexin sedimentiert in der Ultrazentrifuge mit $S_{20,w}^0 = 4,8$. Das Molekulargewicht dürfte auf Grund dieser Sedimentationskonstanten und unter Berücksichtigung des Fucosegehaltes (2 Molekeln Fucose pro Molekel Hämopexin) etwa 80000 betragen. Hämopexin besitzt bei $pH = 8,6$ eine elektrophoretische Beweglichkeit von $-3,1 \cdot 10^{-5}$ cm/V · sec. Es ist durch Rivanol bei $pH = 7,5$ nicht fällbar und in Perchlorsäure, Sulfosalicylsäure und Trichloressigsäure löslich. Hämopexin besitzt keine Phosphatase- oder Cholinesterase-Aktivität und