

Die Konstitutionsunterschiede zwischen diesen Pyrazolinen sind verhältnismäßig gering. Umso mehr überrascht, daß aus den Meßergebnissen einige Regelmäßigkeiten abgelesen werden können: Durch Halogensubstitution im Phenylkern an C-3 wird das Absorptionsmaximum nach längeren Wellen verschoben; Absorptions- und Fluoreszenzmaximum liegen näher beieinander. Mit steigender Anzahl der Chlor-Atome im Molekül nimmt das Absorptionsmaximum, ausgedrückt in der molaren Extinktion, zu; diese Zunahme äußert sich noch stärker beim Fluoreszenzmaximum. Auf Celluloseacetat sind, was aus den Angaben der relativen Bandenhöhe in Tabelle 1 nicht zu entnehmen ist, die Fluoreszenzmaxima ungefähr 30-mal höher als in methanolischer Lösung. Die unerwartet geringe Fluoreszenz der zweiten Verbindung [(2a)] auf Celluloseacetat beruht möglicherweise auf einem verringerten Ziehvermögen oder auf einer Behinderung der für die Fluoreszenz optimalen Absorptionslage des Moleküls an der Faser. In der letzten Spalte der Tabelle ist die in Wellenzahlen gemessene Differenz zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum der Lösungsspektren angegeben. Man beobachtet eine umso höhere Fluoreszenzbande, je geringer der Differenzbetrag ist; dieser erlaubt eine Aussage über den strahlungslosen Energieverlust. Die Differenzen

zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren auf der Faser wurden nicht bestimmt, jedoch geht aus dem Vergleich der Lage der Fluoreszenzmaxima in Lösung und auf der Faser klar hervor, daß durch die Anlagerung der Pyrazolin-Moleküle an die Faser weniger Energie strahlungslos verlorengeht, wie die starke Erhöhung der Faserfluoreszenz im Vergleich zur Lösungsfluoreszenz zeigt [*].

Die hier dargelegte Betrachtungsweise genügt nicht, um die Verwendbarkeit von Aryl- Δ^2 -pyrazolinen als optische Aufheller genau zu bestimmen. Anwendungstechnische Gesichtspunkte wie Nuance der Aufhellungsfärbung, Ziehvermögen und Echtheitseigenschaften müssen gleichfalls genau betrachtet werden. – Arylpyrazoline haben auch als Scintillatoren Interesse gefunden [24,46].

Eingegangen am 15. September 1965 [A 524]

[*] Die Meßwerte wurden an einem Zeiss-Spektralphotometer PMQII ermittelt. Wir danken Frau Dr. A. Berger für ihre Hilfe bei den Messungen.

[46] S. R. Sandler u. K. C. Tsou, J. chem. Physics 39, 1062 (1963).

ZUSCHRIFTEN

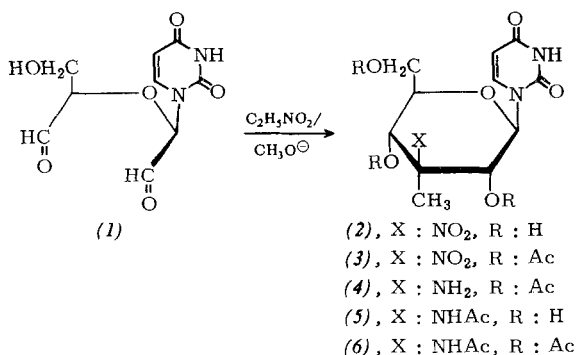
Synthese C-methyl-verzweigter Uracil-Nucleoside

Von Doz. Dr. F. W. Lichtenhaler und Dipl.-Chem. H. Zinke

Institut für Organische Chemie
der Technischen Hochschule Darmstadt

Bei Übertragung des Reaktionsprinzips der Cyclisierung von „Nucleosid-dialdehyden“ mit Nitromethan [1,2] auf Nitromethan-Homologe [3] sind verzweigte Nucleoside zu erwarten, die pharmakologisches Interesse besitzen.

2-O-[(R)-(Formyl-uracil-1-yl)methyl]-(R)-glyceraldehyd („Uridindialdehyd“) (1), durch Perjodatoxidation aus Uridin darstellbar, gibt mit Nitroäthan/Natriummethylat in Methanol ein kristallines Isomerengemisch (Ausb. 79,7%, bez. auf Uridin), aus dem durch fraktionierte Kristallisation als Hauptprodukt 1-(3'-C-Methyl-3'-nitro-3'-desoxy- β -D-glucopyranosyl)uracil (2) [Fp = 226–240 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = +25,5^\circ$ (H₂O)] abgetrennt werden kann. Saure Acetylierung von (2) ergibt das Tri-O-acetat (3) [Fp = 228 °C, $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ (CHCl₃)], während Hydrierung mit Raney-Nickel 1-(3'-Amino-3'-C-methyl-3'-desoxy- β -D-glucopyranosyl)uracil (4) als Monohydrat [Fp = 146–148 °C, $[\alpha]_D^{20} = +39^\circ$ (H₂O)] liefert. (4) läßt sich mit Acetanhydrid/Methanol in die Acetamido-Verbindung (5) [Fp = 248–250 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = +72^\circ$ (H₂O)] überführen, die bei weiterer Acetylierung in das Tetraacetat (6) [Fp = 133 °C, $[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$ (CHCl₃)] übergeht.



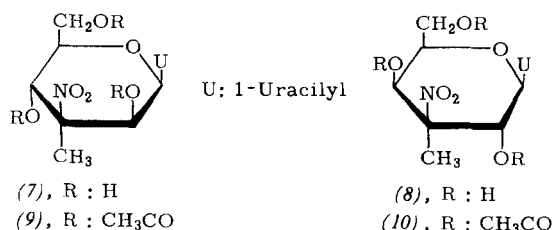
Die 3'-C-Methyl-D-glucio-Konfiguration der Nitroverbindung (2) sowie ihrer Folgeprodukte (3) bis (6) ergibt sich aus NMR-spektroskopischen Daten:

1. In (CD₃)₂SO gibt (2) bei $\tau = 4,02$ ein 1H-Dublett mit J = 6 Hz, das die diaxiale Anordnung der Protonen an C1' und C2' und damit die äquatoriale Orientierung der C2'-OH-Gruppe beweist [5].

2. Im NMR-Spektrum von (3) in CDCl₃ werden im Gebiet $\tau \approx 8$ zwei Signale im Intensitätsverhältnis 2:1 erhalten, die neben der primären Acetoxygruppe an C6' ($\tau = 8,02$; 3H) äquatoriale Acetoxygruppen ($\tau = 7,93$; 6H) an C2' und C4' beweisen. Analog müssen die Acetoxy-Signale des Tetraacetats (6) in CDCl₃ ($\tau = 7,99$; C6'-OAc; $\tau = 7,90$ und 7,93: äquatoriale C2'-OAc und C4'-OAc) interpretiert werden.

3. Die Konfiguration am tertiären C-Atom C3' kann durch Vergleiche der Acetamido- und Acetoxy-Signale analoger Verbindungen ermittelt werden [6]. Das 3H-Singulett bei $\tau = 8,15$ im CDCl₃-Spektrum von (6) ist danach einer äquatorial orientierten Acetamido-Gruppe an C3' zuzuordnen. Entsprechend ist für die Nitrogruppe in (2) äquatoriale Orientierung anzunehmen.

Aus dem nach Abtrennung des Hauptproduktes (2) verbleibenden Gemisch können durch fraktionierte Kristallisation (Wasser) zwei weitere Nitrohexosyl-uracil-Isomere (7) [Fp = 186–190 °C, $[\alpha]_D^{20} = +121^\circ$ (Methanol)] und (8) [Fp = 157–160 °C, $[\alpha]_D^{20} = +50^\circ$ (Methanol)] in geringerer Ausbeute als Monohydrate isoliert werden, die, sauer acetyliert,



die entsprechenden Tri-O-acetate (9) [Fp = 106–109 °C, $[\alpha]_D^{20} = +124^\circ$ (CHCl₃)] bzw. (10) [Fp = 107–110 °C, $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$ (CHCl₃)] liefern. Aufgrund NMR-spektroskopischer Daten besitzen die Verbindungen (7) sowie (9) D-manno- und die Verbindungen (8) sowie (10) D-galacto-Konfiguration.

Unter Berücksichtigung der Gesamtausbeute (79,7%) an Isomerengemisch ist die von Baer^[4c] bei der Nitroäthan-Cyclisierung von 2-O-[(S)-Formyl-methoxy-methyl]-(R)-glycerinaldehyd beobachtete C⁵-Epimerisierung hier auszu-schließen.

Eingegangen am 30. Juni 1966 [Z 277]

[1] F. W. Lichtenthaler, Angew. Chem. 76, 84 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 211 (1964).

[2] K. A. Watanabe, J. Beranek, H. A. Friedman u. J. J. Fox, J. org. Chemistry 30, 2735 (1965); J. Beranek, H. A. Friedman, K. A. Watanabe u. J. J. Fox, J. heterocyclic Chem. 2, 188 (1965); F. W. Lichtenthaler u. H. P. Albrecht, Chem. Ber. 99, 575 (1966).

[3] Bei aliphatischen [4a] und von Methylglykosiden abgeleiteten [4b, 4c] Dialdehyden sind Cyclisierungen mit Nitroäthan bereits durchgeführt worden.

[4a] F. W. Lichtenthaler, H. Leinert u. H. K. Yahya, Z. Naturforsch., im Druck.

[4b] S. W. Gunner, W. G. Overend u. N. R. Williams, Chem. and Ind. 1964, 1523.

[4c] H. H. Baer u. G. U. Rao, Liebigs Ann. Chem. 686, 210 (1965).

[5] Vgl. L. D. Hall, Tetrahedron Letters 1964, 1458.

[6] P. Emig, Diplomarbeit, Technische Hochschule Darmstadt, 1966; F. W. Lichtenthaler u. P. Emig, Tetrahedron Letters, im Druck.

Isolierung von Protease-Inhibitoren^[1]

Von Dr. H. Fritz, cand. chem. H. Schult,
cand. med. M. Neudecker und Prof. Dr. Dr. E. Werle

Klinisch-Chemisches Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München

Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Copolymer (Molgew. 13 500 bis 135 000; Zusammensetzung: 1:1, Typ: DX 840-21 EMA-M) reagiert in wäßrigen Pufferlösungen (0,2 M Phosphatpuffer, pH = 7,5) mit den ε-Aminogruppen der Lysinreste von Trypsin (EC 3.4.4.4) [1 g EMA-M bindet ca. 5g Trypsin], wobei in Gegenwart von Hexamethyldiamin als Vernetzungsmittel wasserunlösliches Trypsin-Maleinsäure-Äthylen-Copolymer entsteht^[2]. Der noch enzymatisch wirksame Anteil (ca. 20 %) des an den unlöslichen Träger covalent fixierten Trypsins läßt sich durch Trypsin-Inhibitoren wie Kunitz-Inhibitor aus Pankreas oder Sojabohnen-Inhibitor hemmen^[2].

Wir verwendeten das Trypsin-Harz zur selektiven Adsorption von Trypsin-Inhibitoren aus nicht vorgereinigten Organextrakten im neutralen pH-Bereich. Nach dem Auswaschen aller Begleitsubstanzen mit 0,1 M Triäthanolaminpuffer + 0,1 M NaCl (pH = 7,8) aus dem Trypsin-Harz wurden die Inhibitoren mit 0,2 M KCl/HCl-Puffer eluiert. Die in der Tabelle angegebenen, von uns früher näher charakterisierten Trypsin-Inhibitoren^[1, 3] konnten so aus mit 3-proz. Perchlorsäure eiweißfrei gemachten Organextrakten in einem Arbeitsgang rein und in hohen Ausbeuten isoliert werden.

Der Inhibitor aus Schweinepankreas wurde elektrophoretisch [Träger: Celluloseacetatfolien (275 × 310 mm) der Fa. Schleicher & Schüll; 0,01 M Boratpuffer (pH = 8), 400 Volt, 3 Std. Laufzeit, Elphorkammern der Fa. Bender & Hobein, München] in seine drei inhibitorisch aktiven Fraktionen getrennt^[1, 3] und die Aminosäurezusammensetzung der mittleren Fraktion bestimmt (*): 4 Lys, 2 Arg, 4 Asp, 5 Thr, 6 Ser, 6 Glu, 5 Pro, 4 Gly, 1 Ala, 6 Cys1/2, 4 Val, 3 Ileu, 2 Leu, 2 Tyr. Auffallend ist das Fehlen der Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Histidin. Außerdem wurden die wasser-unlöslichen Enzym-Maleinsäure-Äthylen-Copolymere von Chymotrypsin (EC 3.4.4.5) und Kallikrein (EC 3.4.4.21) hergestellt. Aus Extrakten von Rinderpankreas wurde mit Hilfe des Chymotrypsin- oder Kallikrein-Harzes zuerst der Kunitz-Inhibitor und anschließend mit dem Trypsin-Harz der im Extrakt verbliebene spezifische Trypsin-Inhibitor isoliert. Die

Mit Hilfe eines Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Copolymers isolierte Inhibitoren und Enzyme.

Copolymer plus	Isolierung von	reines Enzym bzw. Inhibitor Ausb. (%)
Trypsin (EC 3.4.4.4)	Trypsin-Inhibitor aus: Schweinepankreas Hundepankreas Rinderpankreas Mäusesamenblasen	90 82 95 75
Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)	Kunitz-Inhibitor aus: Rinderpankreas	90
Kallikrein (EC 3.4.4.21)	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus: Rinderorganen	70
Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol®	Trypsin Chymotrypsin	95 90

Trennung der beiden in ihrer Molekülgröße [Kunitz-Inhibitor: M = 6513; spez. Trypsin-Inhibitor: M ≈ 6000, nach Aminosäurezusammensetzung; M = 6800 nach^[4] Molekularsiebmethode nach Andrews] ähnlichen Inhibitoren war quantitativ.

Das Verfahren haben wir auch zur Reinigung von Enzymen verwendet: Der an das Copolymer fixierte Kallikrein-Inhibitor^[5] adsorbiert aus proteinhaltigen Lösungen spezifisch Trypsin oder Chymotrypsin oder Kallikrein. Trypsin und Chymotrypsin ließen sich von dem Kallikrein-Inhibitor-Harz in 90- bis 95-proz. Ausbeute mit sauren Puffer-Lösungen, z.B. 0,2 M KCl/HCl-Puffer (pH = 2), eluieren.

Die Enzym- und Inhibitor-Maleinsäure-Äthylen-Copolymere verlieren auch bei häufiger Verwendung (erprobt bis zu 60 mal) zur Isolierung von Inhibitoren bzw. Enzymen ihr spezifisches Bindungsvermögen nicht, sofern man bei 4 bis 8 °C arbeitet.

Eingegangen am 23. Juni 1966 [Z 275]

[1] 3. Mittlg. — 2. Mittlg: H. Fritz, F. Woitinas u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 168 (1966).

[2] Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein u. E. Katchalski, Biochemistry 3, 1905 (1964).

[3] H. Fritz, G. Hartwich u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966).

[*] Wir danken Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, für die Analyse.

[4] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965).

[5] R. Vogel, I. Trautschold u. E. Werle: Natürliche Proteinase-Inhibitoren. Thieme, Stuttgart 1966, im Druck; dieser Inhibitor ist mit dem Kunitz-Inhibitor identisch.

Metabolismus des Thiodans® in Insekten

Von Dr. K. Ballschmiter und Priv.-Doz. Dr. G. Tölg^[1]

Institut für anorganische Chemie und Kernchemie der Universität Mainz

Bisher wurde bei Hausfliegen (*Musca domestica*) als Metabolit des Insektizids Thiodan®, 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-bicyclo[2.2.1]hept-2-en-5,6-bismethylen-sulfit, (1a) + (1b), nur das Sulfat (2)^[2] identifiziert^[3].

Wir untersuchten den Metabolismus in männlichen Imagines der Wanderheuschrecke (*Pachytillus migratorius migratorius*) und fanden, daß Thiodan, (1a) + (1b), nach peroraler, kutaner und subkutaner Applikation (DL₅₀ = 5–10 µg/g^[3]) teils unverändert, teils verändert mit den Faeces ausgeschieden wird.

Die Metabolite (2) bis (5) konnten^[4] auf folgendem Weg identifiziert werden: Die nach Annahme von Hydrolyse, Oxidation und Konjugation als Entgiftungsreaktionen für das