

- [21] *N. Seiler & H. Wiechmann*, *Experientia* **20**, 559 (1964).
 [22] *H. Meinardi & L. C. Craig*, Hypotensive Peptides, Proc. of the International Symposium, Florence, Italy 1965; Springer Verlag New York Inc., 1966, S. 594.
 [23] *E. Gross & B. Witkop*, *J. Biol. Chem.* **237**, 1856 (1962).
 [24] *V. Erspamer, A. Anastasi, G. Bertaccini & J. M. Cei*, *Experientia* **20**, 489 (1964).
 [25] *H. Zuber*, *Chimia* **14**, 405 (1960).
 [26] *V. Erspamer & A. Anastasi*, *Experientia* **18**, 59 (1962).
 [27] *G. Zeller, D. Mönkemeier & H. Wiechell*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **262**, 97 (1969).
 [28] *F. Lembeck & G. Fischer*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **258**, 452 (1967).
 [29] *G. Bertaccini, J. M. Cei & V. Erspamer*, *Brit. J. Pharmacol.* **25**, 380 (1965).
 [30] *E. Schröder & K. Lübke*, *The Peptides*, Academic Press, New York and London, 1966, Vol. II, S. 127 ff.
 [31] *G. Zeller*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **242**, 330 (1961).
 [32] *F. Lembeck & K. Starke*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **259**, 307 (1968).
 [33] *J. Baldauf & K. Gebhardt*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **265**, 278 (1969).

84. Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung, Reinheitsprüfung und Stabilitätsmessung von Calcium-Leucovorin

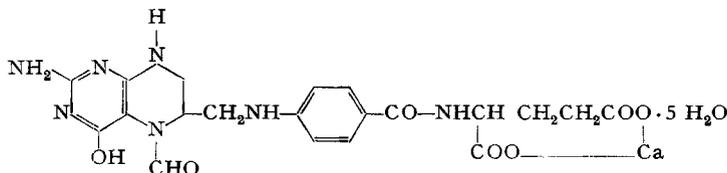
von **Hans Suter, Josef Conti, Menasche Litmanowitsch, Albert Grossmann**
 und **Alfred Hedinger**

Forschungsinstitut EPROVA Aktiengesellschaft Schaffhausen

(23. III. 72)

Zusammenfassung. Die Kombination der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung mit einer spektrophotometrischen Auswertung ergibt eine spezifische quantitative Methode zur Bestimmung von Ca-Leucovorin. Diese Methode ergibt präzise Resultate auch bei Anwesenheit von weiteren Folinaten. Ein speziell gereinigtes Ca-Leucovorin wird als neuer hochaktiver Standard vorgeschlagen.

1. Einleitung. -



Ca-Leucovorin, Calcium-folinat, Calciumsalz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure

$C_{20}H_{21}CaN_7O_7 \cdot 5H_2O$ Mol.-Gew. 601,6

Die Bedeutung von Ca-Leucovorin als Stoffwechselregulator, insbesondere als Überträger von C_1 -Einheiten, ist erst in den letzten Jahren intensiver erforscht worden [1]. In letzter Zeit ist auch die therapeutische Wirkung von Ca-Leucovorin wiederholt bestätigt worden. Besonderes Interesse fanden die Anwendungen zur Herabsetzung der Toxizität von Folsäureantagonisten bei der Krebsbekämpfung [2] und zur

Behandlung der megaloblastischen Anämie [3] und von Leberparenchymschäden [4]. Die physiologische Wirkung von Ca-Leucovorin wird gegenwärtig intensiv erforscht.

Die Erarbeitung einer exakten und spezifischen Methode zur Reinheitsprüfung dieses, in kleinsten Mengen biologisch aktiven Stoffes, schien uns notwendig, da die erhältlichen Präparate meist nur einen kleinen Gehalt an Ca-Leucovorin aufweisen. Des weiteren musste eine reine Bezugssubstanz gefunden werden.

Eine kombinierte DC./UV.-Analysenmethode, welche die dünnschichtchromatographische Auftrennung, die Eluierung des Hauptfleckens und die spektrophotometrische quantitative Bestimmung der eluierten Reinsubstanz umfasst, wird in Abschnitt 4 beschrieben. Dieser Methode kommt im Vergleich zu anderen bekannten Methoden eine hohe Spezifität zu.

2. Physikalische Eigenschaften eines Standardpräparates. – Es wurde von uns ein speziell gereinigtes, chromatographisch einheitliches Präparat von *dl*/L-Ca-Leucovorin · 5H₂O hergestellt, das folgende Analysendaten ergab und durch folgende physikalische Grössen charakterisiert ist:

$C_{20}H_{21}N_7O_7Ca \cdot 5H_2O$	Ber. C 39,9	N 16,3	Ca 6,7	H ₂ O 15,0%
	Gef. „ 39,9	„ 16,2	„ 6,6	„ 15,5%

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{22} = +16,3^\circ$ ($c = 1,7\%$ in H₂O. Als wasserfreies Ca-Salz gerechnet).
(Nach Lit. [5]: $[\alpha]_D^{20} = +14,26^\circ$ ($c = 3,42\%$ in H₂O. Als wasserfreies Ca-Salz gerechnet)).

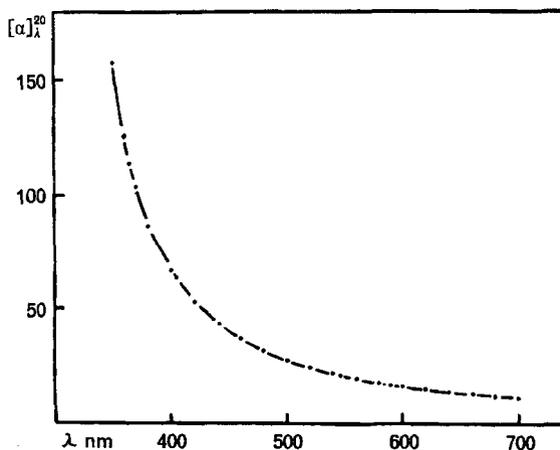


Fig. 1. Rotations-Dispersion von *dl*/L-Ca-Leucovorin (Standard)
Konzentration: 1,765% (wasserfreies Ca-Salz); Lösungsmittel: Wasser
Temperatur: 20° ± 0,1°

UV.-Spektrum in 0,1N NaOH: Max. 282 nm $E_{1cm}^{1\%} = 502$; Min. 242 nm $E_{1cm}^{1\%} = 105,7$;
Verhältnis $\frac{E_{max}}{E_{min}} = 4,75$;

in Puffer pH 7,0: Max.: 287 nm $E_{1cm}^{1\%} = 526$; Min.: 243 nm $E_{1cm}^{1\%} = 133$; Verhältnis $\frac{E_{max}}{E_{min}} = 3,95$.
(Puffer pH 7,0: 36,08 g Na₂HPO₄ · 2H₂O + 17,6 g KH₂PO₄ pro Liter).

In der Lit. [5] sind für wasserfreie Folin säure folgende Werte angegeben:

Max. in 0,1N NaOH (10 mg/l): 282 nm, T = 27,0%, E = 0,5686; umgerechnet auf Ca-Leucovorin · 5H₂O ergibt sich daraus $E_{1cm}^{1\%} = 447,5$.

Min. in 0,1N NaOH (10 mg/l): 243 nm, T = 75,3%, E = 0,1232; umgerechnet auf Ca-Leucovorin · 5H₂O ergibt sich daraus $E_{1cm}^{1\%} = 97,0$. Verhältnis $\frac{E_{max}}{E_{min}} = 4,62$.

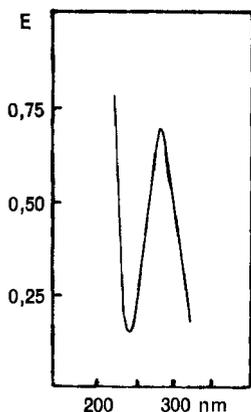


Fig. 2. UV.-Spektrum von *dl*[Ca-Leucovorin (Standard)
 $c = 14,01$ mg Ca-Leucovorin. $5\text{H}_2\text{O}/l$ (0,1 N NaOH, $d = 1$ cm)

IR.-Spektrum (KBr): N–H-Valenzschwingung: Lit. [6] prim. Amine $2,86\text{--}3,03$ μ , sek. Amine $2,86\text{--}3,03$ μ ; Gef.: $3,00$ μ .

C–H-Valenzschwingungen: Lit. [6]: $\text{CH}_2\text{--}$ $3,42\text{--}3,50$ μ , CH– $3,46$ μ ; Gef.: $3,35\text{--}3,45$ μ .

Ausserdem sind in der Lit. [6] folgende Schwingungen angegeben: $6,21\text{--}6,45$ μ , $7,04\text{--}7,80$ μ (COO⁻-Valenzschwingung, aliphatisch); $6,06$ μ (C = O Valenzschwingung arom. sek. Amide); $6,00\text{--}6,13$ μ (C = O Valenzschwingung aliph. tert. Amide); $6,45$ μ (N–H Deformationsschwingung von sek. Amidinen); $6,06\text{--}6,29$ μ und $6,06\text{--}5,46$ μ (N–H Deformationsschwingung von prim. bzw. sek. Aminen); $6,10\text{--}6,17$ μ und $6,33\text{--}6,41$ μ (C=C und C=N Ringschwingung in Pyrimidinen mit $\text{NH}_2\text{-}$ bzw. OH-Substituenten).

Alle die in der Literatur im Bereiche von $6,00\text{--}6,41$ μ für wasserfreie Folsäure angegebenen Absorptionsbanden liessen sich beim Ca-Leucovorin nicht in einzelne Banden auflösen, da sie zu nahe nebeneinander liegen und sich deshalb gegenseitig überlappen.

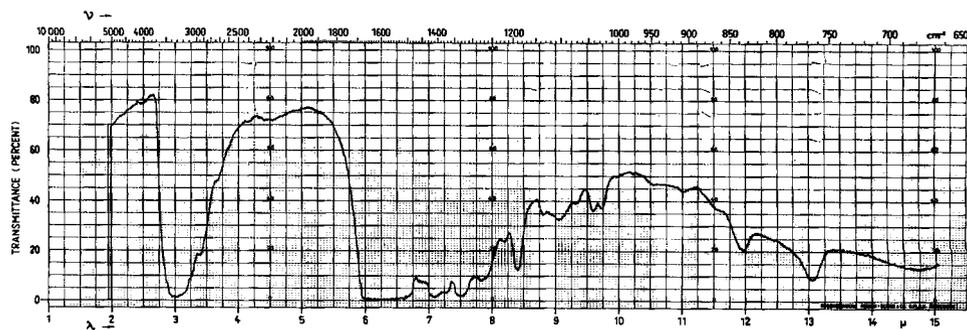


Fig. 3. IR.-Spektrum von *dl*[Ca-Leucovorin (Standard)

3. Bekannte Methoden zur Reinheitsbestimmung von Ca-Leucovorin. 3.1. *Direkte photospektrometrische Messung der UV.-Absorption* in 0,1 N NaOH [7]. Diese Methode erfasst auch die bei 282 nm absorbierenden, Leucovorin-ähnlichen Nebenprodukte und kann dadurch einen zu hohen Reinheitsgrad vortäuschen. Siehe Gegenüberstellung der direkt bzw. der mit der kombinierten DC./UV.-Methode gemessenen Werte, Tab. 1.

3.2. *Polarographische Gehaltsbestimmung* [8] [9]. Diese Methode ergibt gut reproduzierbare Werte. Allen [8] gibt eine Standardabweichung von $\pm 2,4\%$ (abs.) für die Bestimmung von Leucovorin an. Nach v. Stachelberg [10] ist die Höhe einer polarographischen Stufe in günstigen Fällen auf etwa 2% genau reproduzierbar.

3.3. *Gehaltsbestimmung auf Grund der optischen Drehung* [9]. Für eine Gehaltsbestimmung ist diese Methode allein zu wenig spezifisch, da auch Leucovorin-ähnliche Stoffe optisch aktiv sind.

3.4. *Gaschromatographie*. Mehrere Versuche, Leucovorin zu silylieren und dann gaschromatographisch zu analysieren, führten nicht zu brauchbaren Ergebnissen.

3.5. *Mikrobiologische Methode*. *Sauberlich* [11] und mehrere andere Autoren [7] [8] [12] [13] beschreiben die mikrobiologische Gehaltsbestimmung von Ca-Leucovorin. *Allen* [8] gibt für die mikrobiologische Methode eine Standardabweichung von $\pm 7,4\%$ (abs.) an. Die mikrobiologische Methode [13] enthält einige Prozesse, welche nach unseren neueren Stabilitätsuntersuchungen die Genauigkeit dieser Methode beeinträchtigen (vgl. Stabilitätsmessungen im Abschnitt 7). Über eine verbesserte Methode zur mikrobiologischen Gehaltsbestimmung wird an anderer Stelle berichtet.

Tabelle 1. *Ca-Leucovorin-Gehalt verschiedener Präparate nach der direkten spektrometrischen Methode und nach der kombinierten DC./UV.-Methode*

Präparat	Gehalt nach der direkten photospektrometrischen Messung*	Gehalt nach der kombinierten DC./UV.-Methode*	Relative Abweichung bezogen auf die DC./UV.-Werte
1	43,3%	29,0%	+ 49,3%
2	46,1%	30,7%	+ 50,1%
3	46,1%	33,6%	+ 37,2%
4	88,3%	80,6%	+ 9,5%
5	87,5%	80,6%	+ 8,6%
6	87,5%	80,6%	+ 8,6%
7	87,5%	80,6%	+ 8,6%
8	87,5%	80,6%	+ 8,6%
9	89,2%	82,4%	+ 8,2%
10	91,5%	84,5%	+ 8,3%
11	92,8%	84,6%	+ 9,7%
12	95,0%	84,8%	+ 12,0%
13	92,8%	86,0%	+ 7,9%
14	90,2%	86,0%	+ 4,9%
15	101,4%	89,5%	+ 13,3%
16	101,0%	90,5%	+ 11,6%
17	98,1%	90,7%	+ 8,2%
18	97,0%	90,7%	+ 6,9%
19	95,5%	90,7%	+ 5,3%
20	101,2%	92,7%	+ 9,2%

* Standard = 100%

4. Experimentelle Methodik der quantitativen Ca-Leucovorin-Bestimmung. Diese gliedert sich in 4 Stufen: Chromatographische Auftrennung (4.1); Markierung des reinen Ca-Leucovorin-Fleckes (4.2); Eluierung (4.3); photospektrometrische Ausmessung des Eluates (4.4).

4.1. *Chromatographische Auftrennung*. *Tank*: Normaler DC.-Chromatographietank mit PVC-Deckel zur Stickstoffbelüftung. *Platten*: *Schleicher/Schüll* DC.-Fertigfolien (Plastik 20 × 20 cm) F 1440 LS 254 Cellulose oder *Merck* DC.-Aluminiumfolien Cellulose F 254, 20 × 20 cm. *Vorbereitung der Platten*: Die DC.-Folien sind auf 2 gegenüberliegenden Seiten nicht ganz bis zum Rand beschichtet. Diese 2 Seiten bilden den oberen bzw. unteren Rand der Folie. Im Abstand von 2 cm zum unteren Folienrand und im gegenseitigen Abstand von 2,5 cm werden 7 Punkte leicht markiert. 15 cm oberhalb dieser Startpunkte wird eine waagrechte Begrenzungslinie in die Schicht gekratzt. In der Laufrichtung werden ebenfalls 9 mm links und rechts der Startpunkte Begrenzungsrillen in die Schicht gekratzt so dass 18 mm breite Laufbahnen mit 5 mm breiten Zwischenbahnen entstehen (siehe Fig. 4). *Standard*: 125 mg reines Ca-Leucovorin · 5 H₂O «Standard» (siehe

Abschnitt 2), werden in ein trockenes Messkölbchen eingewogen und mit deion. Wasser auf 5 ml gebracht. *Analyselösung*: 125 mg des zu untersuchenden Ca-Leucovorins werden ebenfalls in ein 5 ml Messkölbchen eingewogen und mit deion. Wasser auf 5 ml gebracht. Die Lösungen sind jeweils frisch herzustellen.

Auftragsmenge: 2 mm³ pro Fleck, entsprechend 50 µg Ca-Leucovorin · 5 H₂O, unter N₂ auftragen. Die Art des Auftragens kann einen beträchtlichen Fehler verursachen. Auch weisen einige Pipetten-Fabrikate erhebliche Abweichungen vom Nennvolumen auf. Alle Punkte werden deshalb mit *ein und derselben Mikropipette* aufgetragen. Sehr gute, reproduzierbare Werte werden mit den Mikrokapillaren «Microcaps» von *Drummond Scientific Co.* USA erhalten. Eine Serie von 10 ausgewogenen «Microcaps» wies eine Standard-Abweichung von nur 0,33% auf. Die Abweichung vom Nennvolumen betrug bei der 2 mm³ Microcap 3,9%. Die Kapillare kann sehr gut auf einwandfreie Funktionsweise beobachtet werden. Das Microcap wird sorgfältig mit einem weichen Cellulose-Tüchlein abgewischt und nur *leicht* auf den Startpunkt aufgesetzt. *Startpunkte*: 1–3: Standard (3fach); 4: leer für Blindeluerung; 5–7: Analysenproben (3fach). *Laufstrecke*: 15 cm. *Fließmittel*: 2% Ca-acetat (*Merck*) in Wasser, pH 8–9. *Laufzeit*: ca. 2 Stunden. *Schutzgas*: Auftragen der Substanz, Entwickeln und Trocknen unter Stickstoff.

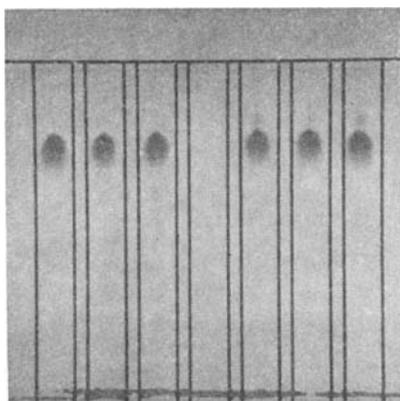


Fig. 4. DC.-Chromatogramm von zwei verschiedenen Ca-Leucovorinpräparaten

4.2. *Markierung des reinen Ca-Leucovorin-Fleckes. Markieren*: Der Ca-Leucovorin-Hauptfleck (Rf ca. 0,7) wird unter der UV.-Lampe bei 254 nm mit einem weichen Bleistift leicht markiert, so dass sich der Fleck innerhalb einer rechteckigen Fläche von ca. 18 mm Seitenlänge befindet. Bevor die einzelnen Hauptflecken in Form rechteckiger Plättchen ausgeschnitten werden, säubert man die Zone ausserhalb der Markierung durch sorgfältiges Wegschaben der überflüssigen Celluloseschicht. Spuren der weggeschabten Cellulose werden mit einem Stickstoffstrahl von den Plättchen weggeblasen, um das Einschleppen allfälliger Nebenflecken zu vermeiden.

Blindwert: Auf einem Startpunkt (Nr. 4) wurde als Kontrolle keine Substanz aufgetragen. Auf gleicher Höhe mit den Hauptflecken der entwickelten Substanzen wird ebenfalls eine gleich-grosse rechteckige Zone markiert und ausgeschnitten. Das Eluat dieses Plättchens dient bei der späteren photospektrometrischen Messung als Vergleichslösung (Referenz) der Messlösungen 1–3 und 5–7 dieser DC.-Folie. Alle markierten Flecken besitzen genau die gleichen Ausmasse.

4.3. *Eluierung. Eluier-tank*: Glastank 44 × 24 × 27 cm (*Desaga*) Glasdeckel mit 2 Bohrungen für die Stickstoffspülung. 2 Kristallisierschalen mit Wasser für die Kammersättigung. *Eluierblock*: Kunststoffblock aus Polyäthylen 40,5 × 14,0 × 5,0 cm. An den beiden grossen Seitenflächen sind je 7 Halteklammern für total 14 Messkölbchen zu 5 ml angebracht. Auf der oberen Stirnseite ist eine Nut eingefräst. In diese Nut werden 2 Lösungsmitteltröge gestellt, wie sie für die Sandwich-Chromatographie verwendet werden. Diese Tröge nehmen das Eluiermittel auf.

Präparierung der Eluier-Sandwichs: Die aus der Chromatographiefolie ausgeschnittenen rechteckigen Plättchen mit dem Ca-Leucovorin-Hauptfleck bzw. Referenzfleck werden mit der Schichtseite auf die Eluierstreifen gelagt (siehe Fig. 6), auf der Gegenseite mit einem sauberen

quadratischen Plastik-Plättchen verstärkt und das ganze Sandwich mit 2 Plastik-Clips oder einer Büroklammer zusammengeklemt. DC.-Schicht und Eluierstreifen sollen nicht mit blosser Hand angefasst werden. Die Verwendung von Baumwollhandschuhen und Pinzette wird empfohlen.

Der schmale Teil der Eluierstreifen wird mit der Pinzette soweit zusammengeklemt, dass er in den Hals der 5 ml Messkölbchen passt. Der breite Teil der Eluierstreifen wird 2mal gefalzt und taucht in einen der Eluiermitteltröge ein (siehe Fig. 5a, 5b).

Eluiermittel: Phosphatpuffer pH 7,0 (36,08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 17,6 g KH_2PO_4 pro Liter).
Eluierzeit: 16 Std.

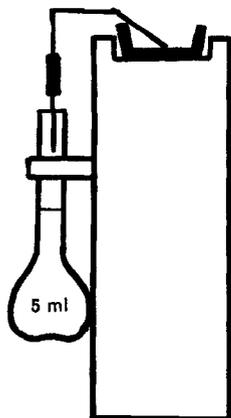


Fig. 5a

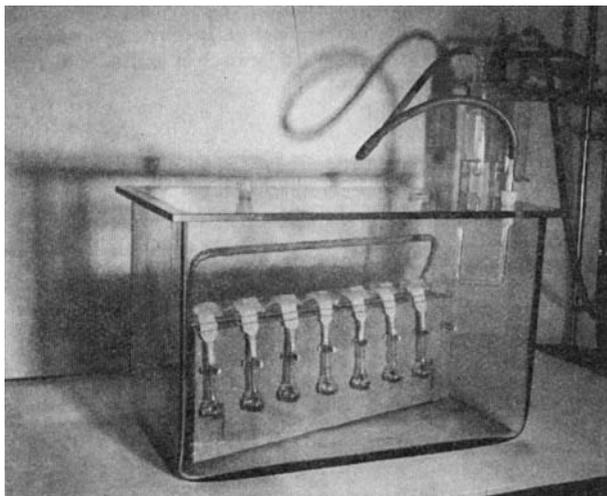


Fig. 5b

Eluierstreifen: Chromatographiepapier Schleicher/Schiüll 2043 B mgl. In Faserlaufrichtung geschnitten.

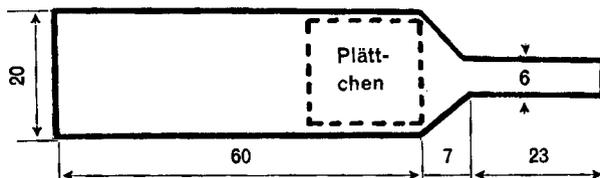


Fig. 6

4.4. *Photospektrometrische Bestimmung*. Die Eluate werden mit Phosphatpuffer pH 7,0 auf exakt 5 ml gebracht und photospektrometrisch gemessen gegen die Blind-Eluierprobe Nr. 4. Quarz-Küvetten (1 cm) verwenden.

Man misst die Extinktion E bei 287 nm.

Im geprüften Bereich von 21 bis 66 Gamma Ca-Leucovorin pro Chromatographieleck fanden wir eine gute Extinktions-Proportionalität. Die grösste relative Abweichung vom Sollwert betrug 1,7% (alle Analysenoperationen eingeschlossen).

Da bei dieser Methode die Analysensubstanz mit einem Standard-Präparat verglichen wird, muss man den in Abschnitt 5.2 erwähnten Eluierverlust nicht in Rechnung stellen.

$$\text{Gehalt} = \frac{\bar{E}_A \cdot 100}{\bar{E}_S} = \dots \% \text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{CaN}_7\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

\bar{E}_A = Mittelwert der 3 Extinktionen (Analyselösung, Punkte 5–7);

\bar{E}_S = Mittelwert der 3 Extinktionen (Standardlösung, Punkte 1–3).

5. Reproduzierbarkeit der Ca-Leucovorin-Bestimmung. - 5.1. *Prüfungs-Methodik.* Es wurde die Reproduzierbarkeit der DC./UV.-Analysemmethode (siehe Abschnitt 4) mit 2 Standard-Ca-Leucovorin Proben A und B geprüft. Beide Proben wurden in Pufferlösung pH 7,0 gelöst und ergaben beim Maximum der Lichtabsorption den gleichen $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 526$ Wert.

Die Lösungen (exakt 125,0 mg Standard Ca-Leucovorin · 5H₂O in 5 ml Wasser wurden jeweils frisch hergestellt und für 2 bis 3 Bestimmungen eingesetzt. Es wurde immer mit demselben ausgemessenen Microcap von 1,949 mm³ Inhalt aufgetragen.

In einer dritten Messreihe C wurde der Eluierverlust ermittelt. Dazu wurden die Standard-Ca-Leucovorin-Proben auf Cellulose-DC.-Plättchen (18 × 18 mm) aufgetragen und *ohne* chromatographische Auftrennung unter gleichen Bedingungen wie in den Abschnitten 4.3 und 4.4 angegeben, eluiert. Aus der Differenz zwischen auftragender und eluierter Menge Ca-Leucovorin ergibt sich der Eluierverlust.

5.2. Ergebnisse.

n = Anzahl Messwerte

\bar{x} = Mittelwert

s = Standardabweichung $\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

v = Variationskoeffizient $\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$

Messreihe A		Messreihe B		Eluierreihe C	
Gemessene Extinktion	Gehalt %	Gemessene Extinktion	Gehalt %	Gemessene Extinktion	Eluierungsgrad %
0,4976	97,1	0,4962	96,8	0,5058	98,5
0,4921	96,0	0,4921	96,0	0,4989	97,2
0,4962	96,8	0,4828	94,2	0,4989	97,2
0,4962	96,8	0,4949	96,6	0,4989	97,2
0,4921	96,0	0,4976	97,1		
0,4908	95,8	0,4935	96,3		
0,4949	96,6	0,4989	97,3		
0,4976	97,1	0,4976	97,1		
0,4921	96,0	0,4962	96,8		
0,4976	97,1	0,4942	96,4		
0,4921	96,0	0,4949	96,6		
0,4921	96,0	0,5017	97,9		
0,4989	97,3	0,4976	97,1		
0,4976	97,1	0,5045	98,4		
0,4935	96,3	0,4976	97,1		
0,4976	97,1	0,4976	97,1		
0,4976	97,1	0,4962	96,8		
0,4962	96,8	0,4935	96,3		
0,4935	96,3	0,4949	96,6		
		0,4949	96,6		
		0,4828	94,2		
		0,4802	93,7		
		0,5072	99,0		
		0,5100	99,5		
		0,5045	98,4		
\bar{x}	96,6%	\bar{x}	96,8%	\bar{x}	97,5 %
s _A	0,51%	s _B	1,35%	s _E	0,65%
v	0,53%	v	1,40%	v	0,67%
n	19	n	25	n	4
$s_{\text{tot}} = \sqrt{s_A^2 + s_E^2} = 0,83\%$		$s_{\text{tot}} = \sqrt{s_B^2 + s_E^2} = 1,50\%$		Eluierverlust	
				100% - 97,5% = 2,5%	

Die relativ kleinen Standardabweichungen weisen auf die gute Reproduzierbarkeit der Bestimmungen hin.

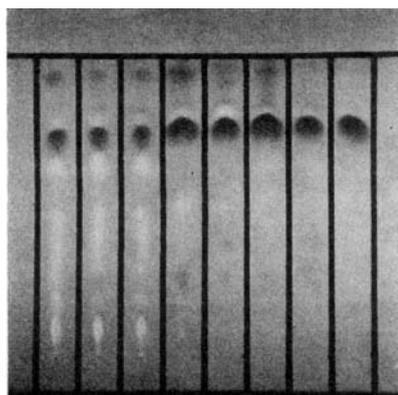
Für die Messreihe A ergibt sich ein korrigierter Mittelwert von $96,6\% + 2,5\%$ (mittlerer Eluierverlust) = $99,1\%$. Bei einem Vertrauensbereich von 95% liegt der effektive korrigierte Mittelwert mit 95proz. Sicherheit zwischen 98,7 und 99,5% Gehalt.

Für die Messreihe B ergibt sich ein korrigierter Mittelwert von $96,8\% + 2,5\% = 99,3\%$. Bei einem Vertrauensbereich von 95% liegt der effektive korrigierte Mittelwert mit 95proz. Sicherheit zwischen 98,6 und 99,9% Gehalt.

6. Untersuchung einiger erhältlicher Präparate. – Die im Abschnitt 4 beschriebene kombinierte DC./UV.-Analysemmethode wurde zur Gehaltsbestimmung einiger käuflicher Ca-Leuovorin-Qualitäten angewendet. Wir fanden folgende Gehalte an $C_{20}H_{21}CaN_7O_7 \cdot 5H_2O$:

Musterbezeichnungen:

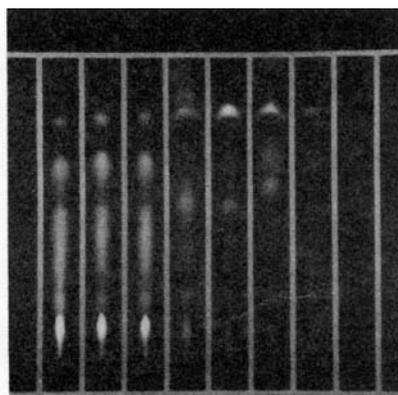
A	B	C	D	E	F	G	H	I	unser Standard
44,9%	50,0%	51,7%	57,5%	76,5%	78,5%	80,0%	82,7%	77,7%	100,0%



A B C D F G I +
unser Standard

(UV. 254 nm)

Fig. 7a



A B C D F G I +
unser Standard

(UV. 366 nm)

Fig. 7b

7. Über die Stabilität von Leuovorin. – Für die Untersuchungen wurde reines Standard-Ca-Leuovorin $\cdot 5H_2O$ eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden mit Hilfe der kombinierten DC./UV.-Methode quantitativ bestimmt. Die Resultate sind ausgedrückt in % unveränderter Substanz, bezogen auf den Anfangsgehalt = 100%.

7.1. Kristallisiertes Ca-Leuovorin $\cdot 5H_2O$. Beim Trocknen der Substanz während 2 Std. bei 100° und 1–2 Torr fanden wir, unter Berücksichtigung des Trockenverlustes, eine Reduktion des Gehaltes auf 98,5%.

7.2. Wässrige Leuovorin-Lösungen. Für diese Versuchsreihe wurde eine Konzentration von 2,5% bezogen auf Ca-Leuovorin $\cdot 5H_2O$ gewählt. Die Versuchsbedingungen und Resultate sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Stabilitätsversuche* bei pH 5,5, 8 Std. bei 20° bzw. 8 Std. bei 90° , wurden doppelt durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Th. H. Jukes*, Federation Proceedings *30*, 155 (1971); *Ch. E. Samuel*, J. biol. Chemistry *245*, 5115 (1970); *N. A. Andreeva*, Us. Biol. Khim. *253* (1968); *L. Jaenicke*, Klin. Physiol. Chem. Probl. Symp. Berlin 1965, 35 (Publ. 1966).
- [2] *W. M. Hryniuk*, J. Clin. Invest. *48*, 2140 (1969); *M. R. Vogler*, Cancer *25*, 894–901 (1971).
- [3] *G. R. Burgio & F. Severi*, Med. Klin. *66*, 976 (1971).
- [4] *R. Molimard & M. Benozio*, Pathol. Biol. *18*, 425 (1970); *M. T. Ramacci & E. T. Ordonez*, Clin. Ter. *53*, 227 (1970).
- [5] Merck Index 7th Ed. 459/60 (1960) & 8th Ed., 468 (1968); *J. A. Brockman, B. Roth & H. P. Broquist*, J. Amer. chem. Soc. *72*, 4325 (1950).
- [6] *L. J. Bellami*, «Ultraschall-Spektrum und chemische Konstitution» 2. Aufl. (1966).
- [7] *D. B. Cosulich, B. Roth & J. M. Smith*, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3252 (1952); *E. H. Flynn, Th. J. Bond & Th. J. Bardos*, J. Amer. chem. Soc. *73*, 1979 (1951).
- [8] *W. Allen, R. L. Pasternak & W. Seaman*, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3264 (1952).
- [9] *Jutaka Asahi & Minosu Nawashima*, Takeda Kenkyusho, Nempo *15*, 22 (1956).
- [10] *M. v. Stackelberg*, Houben-Weyl, «Methoden der organischen Chemie», Bd. 3/2, 323.
- [11] *H. E. Sauberlich & C. H. Baumann*, J. biol. Chemistry *176*, 165 (1948); *H. E. Sauberlich*, J. biol. Chemistry *181*, 467 (1949).
- [12] *Kazuo Jwai, Susumu Nakagawa & Osamu Okinaka*, Mem. Research Inst. Food Sci. (Kyoto Univ.) No. 19, 17 (1959); *Kinsuke Kondo, Kazuo Jwai & Tadatomo Yoshida*, Bull. Research Inst. Food Sci. (Kyoto Univ.) *13*, 67 (1954); *G. Toennies, H. G. Frank & D. L. Gallant*, Growth *16*, 287 (1952).
- [13] Pharmacopeia of the United States *XVI*, 868 (1960).

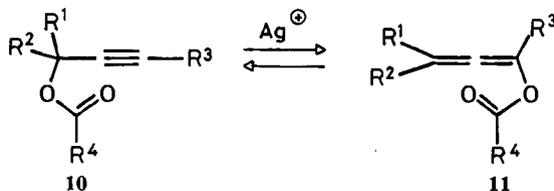
85. Geltungsbereich und Mechanismus der durch Silberionen katalysierten Propargylester-Allenylester-Umlagerung nach Saucy und Marbet

von **Horst Schlossarczyk**¹⁾, **Willi Sieber**²⁾, **Manfred Hesse**, **Hans-Jürgen Hansen**
und **Hans Schmid**

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich

(15. I. 73)

Summary. The mechanism of the catalysis of the reversible (propargylester)/(allenylester) rearrangement (**10** \rightleftharpoons **11**) by silver(I) ions was investigated, using optically active and diastereoisomeric esters as well as ¹⁴C- and ¹⁸O-labelling.



In order to work with crystalline materials, mainly *p*-nitrobenzoates (**10**, **11**: R⁴ = *p*-O₂N-C₆H₄) were used. In some cases the rearrangement **10** \rightleftharpoons **11** was studied using acetates (R⁴ = CH₃). The alkyl substituents R¹, R², R³, were widely varied (*cf.* Tables 1, 2). The solvents in which the rearrangements were performed were in most cases dry chlorobenzene and 96% aqueous

¹⁾ Aus der Dissertation von *H. Schlossarczyk*, Universität Zürich 1964 (Ausführung 1959–1962).

²⁾ Aus der Diplomarbeit von *W. Sieber*, Universität Zürich 1969.