

KURZE MITTEILUNGEN

*Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht
Es werden auch Manuskripte aus dem Auslande angenommen*

Etude thermique de préparations microcristallines d'hydroxylapatites et d'autres phosphates de l'os préparés *in vitro**

Zusammenfassung

Um den Unterschied der chemischen Zusammensetzung der Phosphate im Knochengewebe und analoger, *in vitro* gefällter Substanzen festzustellen, genügen röntgenographische Untersuchungen und chemische Analysen nicht. Die Thermogravimetrie und die differentielle Thermoanalyse zeigen dagegen verschiedenes Verhalten. So geben die Präparate von hydratisiertem Tricalciumphosphat zwischen 700 und 750°C ein halbes Molekül Wasser ab, was mit einer Änderung der kristallinen Struktur verbunden ist. Beim Hydroxylapatit tritt dagegen dieses Verhalten nicht auf. Die Präparate, welche einen

niederen Ca/P-Faktor aufweisen und mit den zwei andern Substanzen Mischkristalle eingehen, weisen thermogravimetrische und thermoanalytische Kurven auf, welche von den vorhergehenden sehr verschieden sind.

Summary

X-ray diffraction patterns and chemical analyses are insufficient to differentiate chemically between the phosphates of bone tissue. But thermogravimetry and differential thermic analysis provide evidence of distinct properties: thus hydrated tricalcium phosphate suddenly loses half a molecule of water of crystallization between 700 and 750 °C, accompanied by a change in crystalline structure, while hydroxyapatite do not

* Communication présentée le 10 octobre 1964 à la session d'hiver de la Société Suisse de Chimie à Zurich.

undergo this phenomenon. Lastly, preparations with a low Ca/P ratio, which still syncrystallize with the two preceding substances, give rise to thermogravimetric curves and differential thermic analysis which are quite distinct from them.

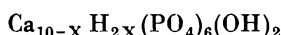
1. Introduction

Dans un précédent travail¹, la méthode de préparation et quelques-unes des propriétés d'hydroxylapatites microcristallines et d'autres orthophosphates calciques ont été décrites. Le présent travail expose les résultats obtenus en vue de préciser la constitution de ces phosphates de calcium.

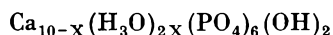
La constitution chimique des phosphates du tissu osseux demeure encore incertaine; en particulier, trois substances²⁻⁵:

- | | | |
|--|-------------------------------|--------|
| a) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | hydroxylapatite | (HYAP) |
| b) $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, 2\text{H}_2\text{O}$ (ou $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) | phosphate tricalcique hydraté | (TCPH) |
| c) $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6, 6\text{H}_2\text{O}$ (ou $4\text{H}_2\text{O}$) | phosphate octocalcique | (OCP) |

peuvent être présentes dans l'os; leurs rapports Ca/P sont respectivement 2,15, 1,94 et 1,72 et elles cristallisent toutes avec la même maille hexagonale de type $\text{C6}_3/\text{m}$. Or, les substances tirées de l'os ou préparées *in vitro* ont des rapports Ca/P qui varient continûment entre 1,60 et 2,20. Comme elles présentent la même structure cristalline, certains pensent qu'il s'agit de syncrystallisés des trois substances précédentes; d'autres estiment qu'une seule substance – HYAP ou TCPH – existe dans l'os qui, par adsorption de cations Ca^{++} ou d'anions PO_4^{---} , donne des rapports Ca/P variés; enfin, les trois substances pourraient dériver d'une forme unique à l'hydratation près⁶ ($0 \leq X \leq 2$):



ou même:



Or, la quantité d'eau des diverses formes est encore controversée, de même que son comportement au cours des traitements thermiques. A cause de l'importance des phénomènes d'adsorption, les petites dimensions des cristaux du tissu osseux compliquent les tentatives de mieux connaître les rapports respectifs réels de H_2O , Ca^{++} et PO_4^{---} dans la maille cristalline. L'étude thermique de nos préparations microcristallines nous est apparue susceptible de palier aux insuffisances des autres méthodes d'investigation. En effet:

a) A cause de la similitude des mailles de HYAP, TCPH et OCP, les diagrammes de diffraction aux rayons X diffèrent trop peu. La variation de la longueur c ne peut être mise en évidence à cause de l'élargissement des raies: même pour des cristaux longs de quelques μ , la différenciation doit être encore très difficile, car les variations signalées des dimensions de la maille cristalline sont faibles⁷:

$$a = 9,42 \text{ à } 9,49 (\sim 1\%) \quad c = 6,81 \text{ à } 6,89 (\sim 1\%)$$

b) La détermination du rapport Ca/P par analyse chimique est un moyen global, incapable de distinguer entre ions internes et ions adsorbés. Des méthodes plus fines, radiochimiques ou électrochimiques, sont nécessaires; encore à l'étude, elles feront l'objet de travaux futurs. Nous avons résolu d'étudier simultanément les courbes thermogravimétriques (TG) et celles de l'analyse thermique différentielle (DTA) et de les compléter par des diagrammes de diffraction aux rayons X après calcination à différentes températures.

Par surcroît, cette étude de nos préparations microcristallines doit être complétée par celle de cristaux plus gros, afin de mieux apprécier le rôle de l'adsorption. Le mode préparatoire de ces cristaux sera exposé ailleurs. Les surfaces spécifiques, de $105 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$ pour les microcristaux, atteignent $10 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$ pour ces nouvelles préparations.

2. Mode opératoire

La détermination des rapports Ca/P est effectuée par les méthodes analytiques décrites¹; pour les ions PO_4^{---} cependant, la méthode spectrophotométrique au bleu de molybdène est remplacée par une autre, plus précise: après dissolution en milieu acide, la solution des phosphates est passée sur un échangeur d'ions, puis H_3PO_4 titré potentiométriquement.

Les courbes thermogravimétriques sont obtenues avec deux thermobalances Chévenard, construites par Sadamel, l'une à enregistrement photographique, de sensibilité 1 g (type TB 21), et l'autre à enregistreur photo-mécanique, de sensibilité 0,3 g (type PBV-B).

La vitesse de chauffage est $2,5^\circ\text{C}$ par minute et la température maximum 1000°C .

Les courbes d'analyse thermique différentielle sont obtenues par un instrument construit à l'institut de Minéralogie de l'Université de Berne*, composé d'un four vertical atteignant 1200°C , d'un programmeur Borel (Peseux) pour des vitesses de chauffage de 10°C , 20°C ou 30°C par minute, d'un porteur d'échantillons à 3 trous équipé d'un couple chrome-alumel pour mesurer la différence de température entre échantillon et étalon (Al_2O_3) et d'un couple Pd-Pd/Pt pour mesurer la température de l'échantillon, et d'un enregistreur photo-

¹ P. LERCH et C. VUILLEUMIER, *Chimia* 18 (1964) 20.

² J. R. VAN WAZER, *Phosphorus and Its Compounds*, Interscience Publ., 1958, p. 530.

³ R. WALLAEYS, Thèses de la Faculté des Sciences, Université de Paris, n° 350 (1952).

⁴ M. J. DALLEMAGNE, *Bull. Acad. Roy. Med.* (Belgique) 1 (1961) 749.

⁵ P. W. ARNOLD, *Trans. Faraday Soc.* 46 (1950) 1061.

⁶ W. F. NEUMAN et M. W. NEUMAN, *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*, University of Chicago Press, 1958, p. 43.

⁷ D. CARLSTRÖM, *Acta Radiolog. Suppl.* 121 (1955) 12.

* Nous remercions le Professeur NIGGLI, directeur de cet institut, pour avoir mis à notre disposition l'une des thermobalances et l'analyseur thermique différentiel.

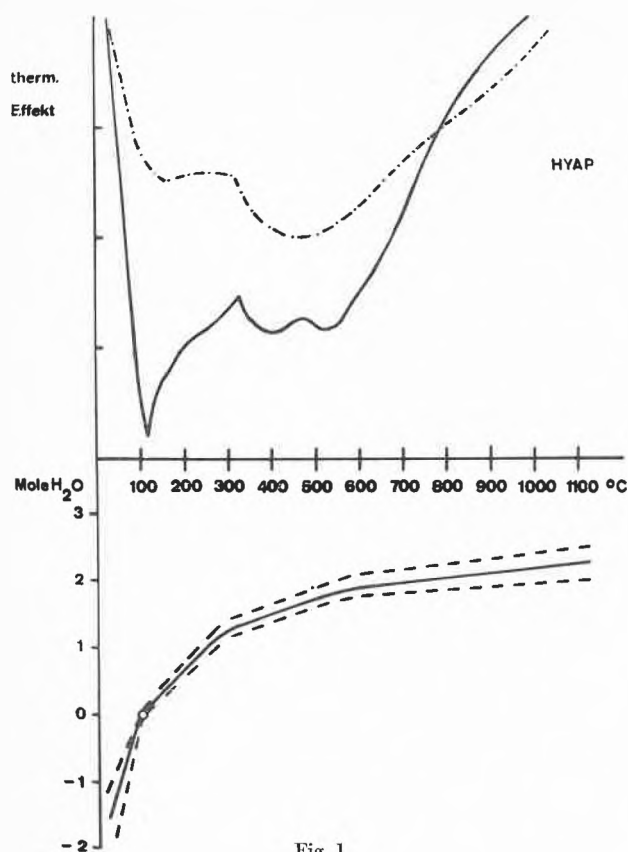


Fig. 1

graphique. La vitesse de chauffage de 30°C par minute a été choisie.

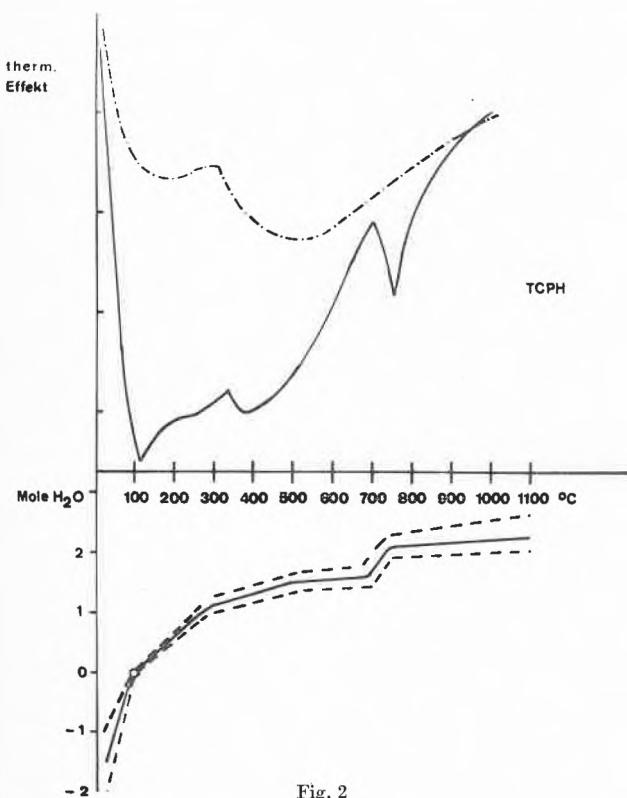


Fig. 2

3. Résultats obtenus

Les figures 1 et 2 concernent respectivement les microcristaux ($d_c \approx 300 \text{ Å}$) de HYAP ($\text{Ca/P} = 2,10 \pm 0,05$) et de TCPH ($\text{Ca/P} = 1,90 \pm 0,05$). Au bas, les courbes de TG sont la moyenne de six préparations différentes, les lignes traitillées donnant la fluctuation observée, lorsque toutes les courbes coïncident à 100°C. En haut, les courbes de DTA sont aussi la moyenne des six préparations; comme les valeurs mesurées sont essentiellement relatives et dépendent de facteurs expérimentaux de contrôle malaisé (tassement, masse), l'indication de la fluctuation a été jugée superflue; les pics dirigés vers le haut indiquent des effets exothermiques, ceux vers le bas, des effets endothermiques. La courbe inférieure concerne le premier chauffage et la supérieure, un second chauffage de l'échantillon qui doit faire apparaître les mouvements de la courbe indépendants du comportement chimique ou dus à des transformations réversibles.

Jusqu'à 650°C, les courbes de TG sont les mêmes pour HYAP et TCPH. Dès cette température, la courbe de HYAP reste lentement ascendante alors que celle de TCPH présente un brusque saut entre 700 et 750°C qui correspond sensiblement au départ de $\frac{1}{2} \text{ H}_2\text{O}$. Pour les préparations intermédiaires, avec $\text{Ca/P} \approx 2,0$, le saut caractéristique de TCPH apparaît, mais sa hauteur est d'autant plus faible que le rapport Ca/P est plus élevé.

Les courbes de DTA, de HYAP et de TCPH sont assez semblables jusqu'à environ 500°C; au-dessus, alors que la courbe de HYAP est monotone, celle de TCPH montre un pic très net entre 700 et 750°C. Quant aux courbes de DTA de second chauffage, elles coïncident assez bien.

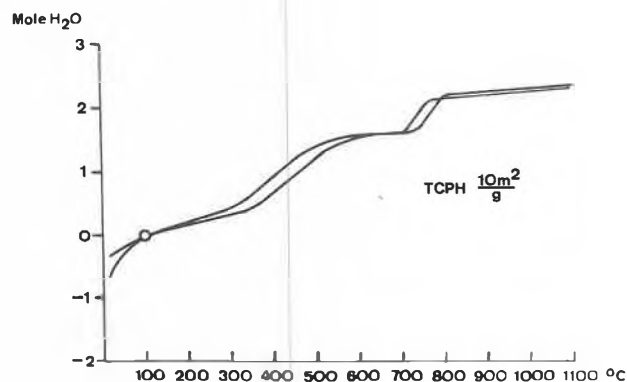


Fig. 3

La fig.3 concerne deux préparations à cristaux plus gros ($d_c \approx 2000 \text{ Å}$) de TCPH ($\text{Ca/P} = 1,95$); aux basses températures surtout, les courbes sont plus nettes; un saut prolongé correspondant au départ de $1,5 \text{ H}_2\text{O}$ apparaît. Le saut entre 700 et 750°C est très brusque.

La fig.4 concerne quelques microcristaux ($d_c \approx 300 \text{ Å}$) dont le rapport Ca/P est bas ($1,78 \pm 0,05$). Les courbes de TG et de DTA se distinguent déjà des précédentes

dès 300°C, avec un saut assez net qui apparaît entre 400 et 500°C et correspond à $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Au-dessus de 500°C, l'élimination d'eau se ralentit, mais atteint $1\text{H}_2\text{O}$ jusqu'à 1000°C, contrairement à HYAP, et à TCPH (saut brusque excepté).

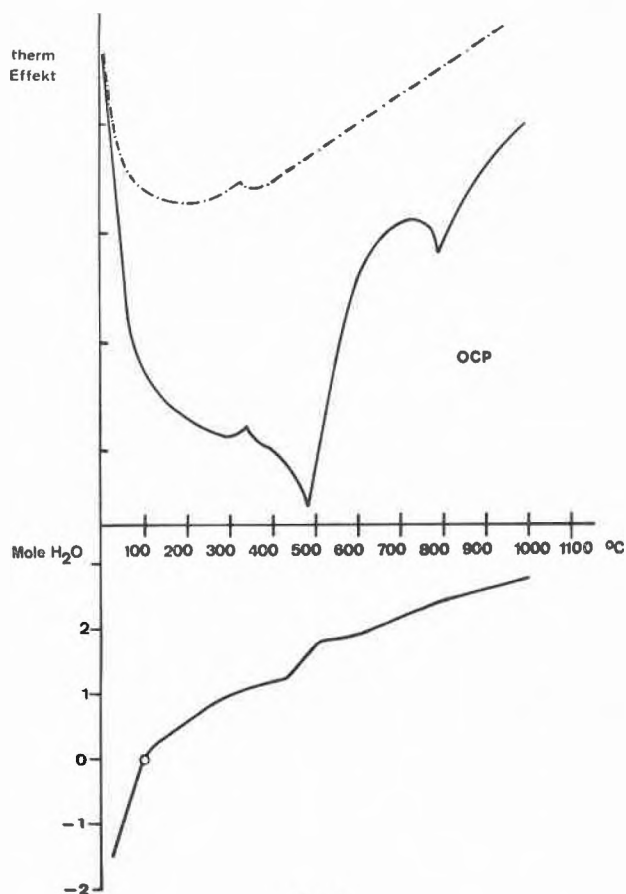


Fig. 4

Ces données expérimentales montrent:

1. Jusqu'à 100°C, 1 à 2 H_2O sont éliminés rapidement pour les microcristaux, et seulement $\sim \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ pour les cristaux plus gros: il s'agit d'eau adsorbée.

2. De 100 à 300°C, les microcristaux dégagent encore rapidement $\sim 1\text{H}_2\text{O}$, alors que les plus gros n'en donnent que très peu; c'est encore de l'eau adsorbée.
3. De 300 à 700°C, les microcristaux perdent un peu moins d'une molécule d'eau, de même que les plus gros. Il semble qu'il s'agisse d'eau de constitution et pourrait correspondre à la formation de pyrophosphate dans le cas de TCPH.
4. Pour TCPH, le $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ qui se dégage entre 700 et 750°C est certainement de l'eau de constitution, car le diagramme de diffraction aux rayons X change, la structure est hexagonale avant le saut et au contraire rhomboédrique après: il se forme du phosphate tricalcique anhydre β (TCPB). Au-dessus de 750°C, la perte de poids est très faible.
5. Pour HYAP, dès 700°C, la perte de poids est lente, mais aucune transformation chimique n'est révélée par un changement de diagramme de diffraction; contrairement au cas de TCPH, à 1000°C, la structure est toujours hexagonale.
6. Pour les microcristaux aux rapports Ca/P inférieurs à 1,85, les courbes de DTA et de TG sont différentes de celles obtenues pour HYAP et TCPH, malgré l'identité de structure aux rayons X.

4. Conclusions

La méthode thermique présente l'avantage de permettre de distinguer entre différentes variétés de préparations microcristallines de phosphates calciques de l'os, ce que confirment les diagrammes à rayons X faits à haute température.

Pour formuler un mécanisme, d'autres investigations plus poussées sont encore nécessaires.

Ce travail n'a été possible que grâce aux subventions du Fonds National de la Recherche Scientifique que nous remercions vivement pour son aide.

P. LERCH et C. VUILLEUMIER

Laboratoire de Radiochimie de l'Institut de Chimie Anorganique, Université de Berne

Darstellung von substituierten 2-Pyrazolinen durch Addition von β -Lactonen an Azine*

β -Propiolacton reagiert mit konjugierten Dienen nach Art der Diels-Alder-Addition¹. Bei der Übertragung dieser Reaktion auf Azine erwarteten wir Perhydropyrazolino[1,2-a]pyrazol-dicarbonsäuren, in Analogie

zur Addition von Maleinimiden² und Maleinanhidrid³ an Benzaldazine.

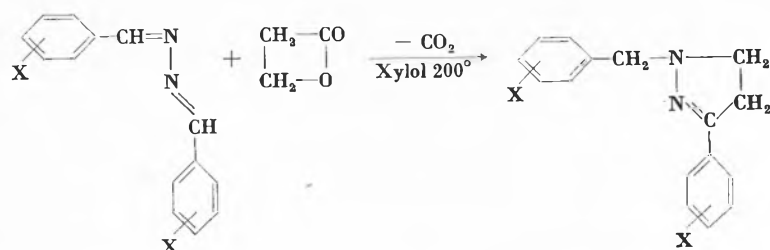
Überraschenderweise gab die Umsetzung von Benzaldazin und kernsubstituierten Benzaldazinen mit β -

* Vorgetragen auf der Versammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 10. Oktober 1964 in Zürich.

¹ T. L. GRESHAM, J. E. JANSEN und F. X. WERBER, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 609.

² T. WAGNER-JAUREGG und L. ZIRNGIBL; eine Kurze Mitteilung darüber erscheint demnächst in dieser Zeitschrift.

³ Zusammenfassung: W. L. MOSBY, *Heterocyclic Systems with Bridgehead Nitrogen*, Part 1, p. 216 (New York 1961).



X =	Ausbeute in % der Theorie	Smp. unkorrigiert	Umkristallisiert aus
H	37	94,5–96 °	<i>i</i> -PrOH
<i>p</i> -Cl	15	106–108 °	CH ₃ OH
<i>p</i> -CH ₃ O	30	119–120,5 °	Cyclohexan
<i>o</i> -NO ₂	16	109,5–110 °	<i>i</i> -PrOH
H Hydrochlorid	86,5	155,5–95 °	<i>i</i> -PrOH

Propiolacton unter den für die Reaktion mit Dienen üblichen Bedingungen, nämlich Erhitzen in Xylol im Rohr auf 200°, Addukte, welche Anlagerungsprodukte einer Äthylengruppe an die betreffenden Azine darstellen, nämlich 1-Benzyl-3-phenyl-2-pyrazoline⁴.

Die angenommene Struktur stützt sich auf das IR-Spektrum, die chemischen Eigenschaften, und für die unsubstituierte Grundsubstanz (X = H), den Identitätsnachweis mit einem Präparat, das in unseren Laboratorien bereits früher durch Pyrolyse des verseiften Additionsproduktes von Acrylester an Benzaldazin erhalten worden war⁵. Dieser Strukturbeweis wurde erhärtet

durch die Identität mit einem aus Benzylsydnon dargestellten Produkt⁶.

Die neue Methode liefert nur mäßig gute Ausbeuten, doch ist dabei zu bedenken, daß auch für die Darstellung der 1-Benzyl-3-phenyl-2-pyrazoline aus Aminosäuren über Sydnone als fünfstufiger Synthese das gleiche gilt⁶.

Die erhaltenen 2-Pyrazoline sind einsäurige Basen; ihre Salze lassen sich leicht kristallin erhalten, sind aber schwer in Wasser löslich. Wir versuchten, unser unsubstituiertes Produkt (X = H) zu hydrieren, was aber weder katalytisch noch mit Lithiumalanat gelang, selbst nicht in siedendem Dioxan. Bei Behandlung mit Wasserstoff in Acetanhydrid am Pd-Kohle-Kontakt wurde nur die Benzylgruppe gegen Acetyl ausgetauscht. Das in 83,9% der Theorie erhaltene 1-Acetyl-3-phenyl-2-pyrazolin (Smp. 131 bis 133,5°; aus Cyclohexan) ist bereits durch Isomerisierung von 3-Phenyl-5-pyrazolin und darauffolgende Acetylierung hergestellt worden⁷.

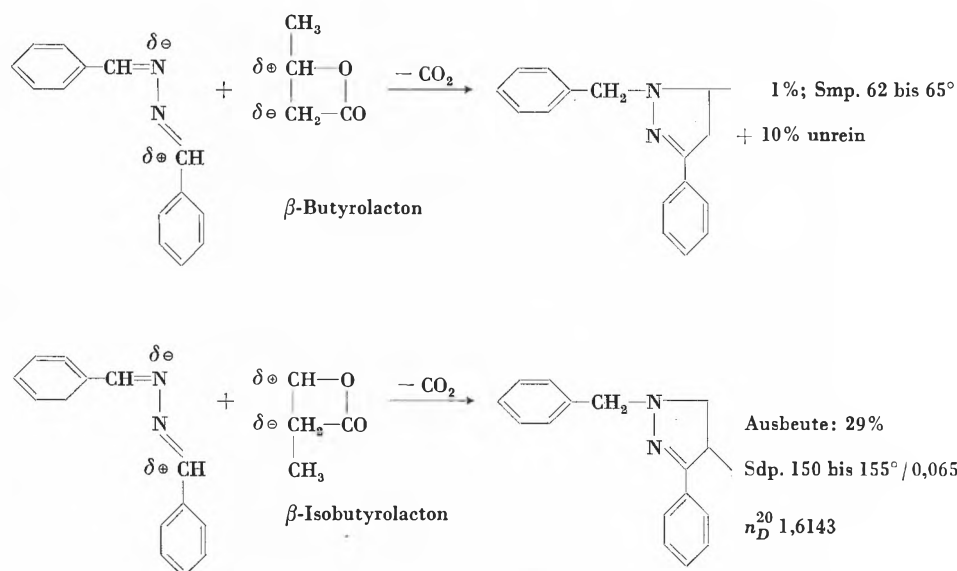
Bei der Anlagerung substituierter β -Lactone an Benzaldazin war die Reaktionsfähigkeit deutlich von der Stellung des Substituenten abhängig. β -Butyrolacton lieferte mit nur 1% Ausbeute reines Methyl-benzyl-phenyl-pyrazolin, neben weiteren 10% eines mit einer sauerstoffhaltigen Substanz verunreinigten Produktes. Das Iso- β -butyrolacton gab dagegen das isomere trisubstituierte Pyrazolin in 29prozentiger Ausbeute; ein sauerstoffhaltiges Nebenprodukt konnte leicht durch Säulenchromatographie abgetrennt werden.

⁴ Schweizerische Patentanmeldung der Siegfried AG vom 26. Mai 1964, Erfinder: T. WAGNER-JAUREGG und L. ZIRNGIBL.

⁵ M. HÄRING und T. WAGNER-JAUREGG, *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 852.

⁶ R. HUISGEN, H. GOTTHARDT, R. GRASHEY und R. SCHMIDT, *Angew. Chem.* 74 (1962) 30. Wir danken Herrn Professor HUISGEN für die Überlassung des Vergleichspräparats.

⁷ I. I. GRANDBERG, *Zhurn. Obsh. Khim.* 31 (1961) 2793; *Chem. Abstr.* 56 (1962) 7299a.



Diese Daten lassen sich damit vereinbaren, daß beim β -Isobutyrolacton die Polarisierung im Sinne einer erhöhten negativen Ladung am α -C durch den induktiven Effekt des Methyls erleichtert wird und ebendieses α -C sich in einem nucleophilen Angriff an das positiviertete Kohlenstoffatom des Benzaldazin anlagert. Diese Polarisierung ist beim β -Butyrolacton durch den induktiven Effekt der β -Methylgruppe abgeschwächt, was die Anlagerung erschwert. Daneben spielt wahrscheinlich die sterische Hinderung durch die Methylgruppe bei der Addition bezüglich der Ausbeute eine Rolle.

Die angenommene Stellungsuordnung der Methylgruppe in unseren trisubstituierten Pyrazolinen bedarf allerdings noch der Erhärtung durch eine unabhängige Synthese.

Die hier mitgeteilten Reaktionen stellen unseres Wissens die ersten Additionen von Dienophilen an Azine in deren 1,3-Stellung dar.

L. ZIRNGIBL und T. WAGNER-JAUREGG
Forschungsabteilung der Siegfried AG, Zofingen