

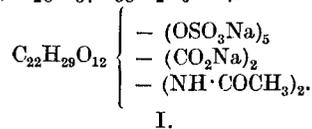
30. Erich Vincke: Über ein neodymhaltiges Heparin.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.]

(Eingegangen am 17. August 1946.)

Es wird über die Darstellung eines neodymhaltigen Heparins berichtet. Die Prüfung der physiologischen Eigenschaften zeigte, daß die Wirkung auf Blutgerinnung und Blutdruck sowie die Toxicität weitgehend derjenigen des üblichen Handels-Heparins entsprechen.

Das Heparin stellt ein Gemisch schwefelhaltiger Mucopolysaccharide dar, deren Gerüst nach unseren bisherigen Kenntnissen aus äquivalenten Mengen *N*-Acetyl-glucosamin und Glucuronsäure aufgebaut ist. Die wirksamsten Präparate, die z. B. E. Jorpes erhielt, haben eine Zusammensetzung, die ungefähr der einer Mucoitin-trischwefelsäure entspricht¹⁾. Die üblichen Handelspräparate sind meistens Gemische der Natriumsalze derartiger Ester, wie sie auch im Organismus vorliegen dürften. Infolgedessen läßt sich keine eindeutige Formel für das Heparin angeben; unter diesem Gesichtspunkt muß wohl auch eine Angabe von M. Reinert und A. Winterstein²⁾ verstanden werden, welche die Formel I, $C_{28}H_{37}O_{38}N_2S_5Na_7$, diskutieren.



Im Heparin liegt ein Stoff vor, in dem das Anion die blutgerinnungshemmende Wirkung allein ausübt, da das Natrium eine solche Eigenschaft nicht besitzt. Es wurde nun versucht, ein Heparin darzustellen, in welchem neben dem Anion auch das Kation die Blutgerinnung hemmt. Eine Möglichkeit zur Darstellung einer solchen nur aus blutgerinnungshemmenden Komponenten bestehenden Verbindung besteht z. B. darin, daß man in der Heparinmolekel das Natrium durch ein seltenes Erdmetall ersetzt. Ein Neodymheparinat beispielsweise könnte dann unter Voraussetzung der Verwendbarkeit von Formel I etwa die durchschnittliche Zusammensetzung $C_{28}H_{37}O_{38}N_2S_5NaNd_2$ (II) haben.

Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, welche die Darstellung eines neodymhaltigen Heparins zum Gegenstand hatten. Sie wurde durch Umsetzung von Heparin mit Neodymacetat in schwach essigsaurer Lösung versucht, wobei das Natriumacetat aus dem Rückstand durch Extraktion mit absolutem Alkohol entfernt wurde. Die weitere Reinigung erfolgte durch Dialyse gegen destilliertes Wasser.

Die dabei erhaltenen Produkte haben einen Neodymgehalt von durchschnittlich 18% und enthalten etwa 2% Stickstoff sowie 10.3% Schwefel. Wir möchten zwar keinesfalls der angegebenen Formel II irgendeine größere Genauigkeit zubilligen, aber es sei zum Vergleich darauf hingewiesen, daß sich aus ihr 19.5% Neodym, 1.9% Stickstoff und 10.8% Schwefel berechnen.

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 278, 7 [1943].

²⁾ Arch. internat. Pharmacodyn. 62, 47 [1939].

Die wäßrige Lösung eines solchen gereinigten Präparates gibt auf Ammoniakzusatz keine Fällung; diese erfolgt erst nach Zusatz von Ammoniumoxalat zur ammoniakalischen Lösung. Hierbei ist praktisch alles Neodym fällbar. Da aus der Lösung eines Gemisches von Heparin und Neodymacetat das Neodym schon mit Ammoniak allein (als Hydroxyd) gefällt wird, konnte bereits vermutet werden, daß es sich bei der dargestellten Verbindung nicht um ein einfaches Gemisch von Heparin und Neodymacetat handelt.

Da aber hierdurch noch nicht in völlig einwandfreier Weise der Nachweis geführt erschien, daß das schließlich erhaltene Produkt ein Heparin ist, in dem das Natrium soweit als möglich durch Neodym ersetzt wurde, wurde das Verhalten der wäßrigen Lösungen in Ultrafiltrationsversuchen geprüft. Dabei zeigte sich, daß die physiologisch unwirksamen, heparinfreien Ultrafiltrate höchstens Spuren von Neodym enthielten. Hieraus und aus den analytischen Daten ergibt sich also, daß man mit dem beschriebenen Verfahren ein neodymhaltiges Heparin darstellen kann, welches Neodym in fester Bindung und in Lösung als echten Bestandteil der Micelle enthält.

Bezüglich der physiologischen Eigenschaften des erhaltenen Präparates zeigte sich, daß die Wirkung auf Blutgerinnung und Blutdruck sowie die Toxizität weitgehend derjenigen des üblichen Handels-Heparins entsprechen.

Beschreibung der Versuche.

Als Heparin wurde das Präparat „Vetren für Tierversuche“ der Chem. Fabrik Promonta, Hamburg, benutzt. Dabei ergab sich, daß verschiedene Heparin-Chargen dieser Herkunft schon an sich mit Neodymacetat in wäßr. Lösung schwer lösliche, z. Tl. erhebliche Niederschläge bildeten.

Z. B. wurden 1.983 g Heparin in 100 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm 10-proz. Neodymacetat-Lösung versetzt. Der flockige Niederschlag wurde abfiltriert und bei 105° getrocknet. Gew. des Rückstandes 0.5211 g; Asche 25.9%; Nd³ 19.1%; N 12.6%⁴).

Da das wasserfreie Heparin etwa 2.5% N enthält, kann es sich wohl kaum um ein schwerlösliches Neodymheparinat handeln. Nach dem Ergebnis der Analyse dürfte der Niederschlag vielmehr aus einer Fällung von eiweiß- oder polypeptidartigen Stoffen durch Neodym bestehen in Übereinstimmung mit der eiweißfällenden Eigenschaft seltener Erden.

Zur Darstellung des Neodymheparinats wurde ein „Vetren“-Präparat verwendet, dessen Lösung auf Zusatz von Neodymacetat keine Fällung zeigte.

So wurden z. B. 5 g „Vetren“ mit 2.55 g Neodymacetat in 75 ccm Wasser gelöst. Nach Zusatz von 1 ccm 2*n* Essigsäure zur völlig klaren Lösung wurde auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und der Rückstand 3 mal mit absol. Alkohol ausgekocht. Der Rückstand wurde über Nacht im Vak. über Diphosphorpentoxyd (P₂O₅) getrocknet. Ausb.: 6.08 g; Nd 15,1%.

5.00 g dieses Niederschlages wurden in 200 ccm redest. Wasser ($\kappa_{25}^{\circ} = 7.0 \times 10^{-6}$) gelöst und im Cellophanschlauch 210 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert⁵). Eine Übersicht der Leitfähigkeitswerte von Lösung und Außenflüssigkeit gibt die Tafel 1.

³) Der Neodymgehalt wurde stets durch Fällen der schwach salzsauren Aschelösung als Oxalat und Überführen in Oxyd bestimmt. ⁴) Mikro-Kjeldahl-Verfahren.

⁵) Der verwendete Cellophanschlauch war gegen Neodymacetat sehr gut durchlässig: 0.124 g Neodymacetat wurden in 100 ccm Wasser gelöst und in ihm 43 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert. Der Neodymgehalt der Innen- und Außenflüssigkeit betrug dann 23.8 bzw. 23.1 mg%.

Tafel 1. Änderung der Leitfähigkeit während der Dialyse.

Datum	%Außenflüssigkeit	%Lösg. $\times 10^{-4}$	Wasserwechsel
23. 1. 45 16h	—	50.90	—
24. 1. 45 15h	4.90×10^{-4}	15.71	anschließend
25. 1. 45 16h	1.61×10^{-4}	5.82	„
26. 1. 45 16h	4.10×10^{-5}	4.64	„
27. 1. 45 12h	1.20×10^{-5}	4.21	„
29. 1. 45 10h	1.36×10^{-5}	3.74	„
30. 1. 45 10h	9.6×10^{-6}	3.50	31. 1. 9h
1. 2. 45 10h	9.0×10^{-6}	3.16	Versuch abgebrochen

Die im Cellophanschlauch enthaltene Lösung wurde dann auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde 3 mal mit absol. Alkohol ausgekocht und über Nacht im Vak. über Diphosphorpentoxyd (P_2O_5) getrocknet. Es hinterließ ein brauner, in Wasser mit opalescentem Schimmer leicht löslicher Rückstand. Ausb. 3.55 g. Asche 23.8%; Nd 17.9%; N 2.2% (Präparat 1). Aus der wäßr. Lösung war durch Zusatz von Ammoniak und Ammoniumoxalat praktisch alles Neodym fällbar. Bei 3 derart durchgeführten Analysen wurden im Mittel 16.3% Neodym gefunden.

Zu ähnlichen Analysendaten gelangte man auch bei weiteren Versuchen, in der geschilderten Weise erhaltene Rohprodukte durch Dialyse zu reinigen. So erhielt man nach 18-tägiger Dialyse einer Lösung von 1.609 g eines erneut dargestellten Rohproduktes in 200 ccm Wasser einen Rückstand von 1.09 g, der nach der oben geschilderten Behandlung folgende Analysendaten aufwies: Asche 24.3%; Nd 17.6%; N 2.0% (Präparat 2).

Bei zwei weiteren durch 7- bzw. 8-tägige Dialyse gereinigten und entsprechend weiterbehandelten Präparaten (Präparat 3: Asche 26.3%, Nd 16.9%; Präparat 4: Asche 26.1%, Nd 18.0%) wurde auch der S-Gehalt bestimmt. Dies geschah durch 30 Min. langes Kochen des Präparates in 12.5-proz. Salzsäure unter Rückfluß, Zerstörung der organ. Substanz durch Zusatz einiger Tropfen 30-proz. Salpetersäure und Fällung der verd. Lösung mit 0.1 n $BaCl_2$. Präparat 3: 10.24% S; Präparat 4: 10.42% S.

Die Ultrafiltrationsversuche wurden mit dem Einheitshochdruckapparat der Membranfiltergesellschaft Göttingen bei 40–80 atü durchgeführt. Als Gas wurde Stickstoff benutzt, die Filter waren Ultrafeinfilter „fein“ oder „feinst“.

Die verwendeten Filter waren für Neodymacetat vollkommen durchlässig; eine 1-proz. Neodymacetat-Lösung von der spezif. Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 2.767 \times 10^{-3}$ ergab ein Ultrafiltrat mit der Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 2.768 \times 10^{-3}$.

Bei Anwendung einer 0.68-proz. Lösung von Neodymheparinat (Präparat 1) von der spezif. Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 0.392 \times 10^{-3}$ erhielt man ein Ultrafiltrat von der Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 0.180 \times 10^{-3}$. Das Ultrafiltrat hinterließ beim Eindampfen einen Rückstand von 0.048%. Die Rückstände von 5 und 10 ccm Ultrafiltrat enthielten nur Spuren Neodym. Das Ultrafiltrat erwies sich bis zu 2 Stdn. nach der Injektion als ohne Einfluß auf die Blutgerinnung, als es 3 Kaninchen von 2.4–2.7 kg Gewicht in Mengen von 2–4 ccm/kg Körpergewicht intravenös injiziert wurde.

Eine 0.17-proz. Lösung von Präparat 2 mit der Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 0.154 \times 10^{-3}$ ergab ein Ultrafiltrat mit der Leitfähigkeit $\kappa_{25^\circ} = 0.065 \times 10^{-3}$, das neodymfrei war und einen Abdampfdruckstand von 0.004% besaß. 2 ccm Ultrafiltrat/kg Körpergew. waren bei einem Kaninchen von 2.4 kg bei intravenöser Injektion ohne Wirkung auf die Blutgerinnung.

Bei der Prüfung der blutgerinnungshemmenden Wirkung der erhaltenen Produkte war die Versuchsmethodik zur Bestimmung der Blutgerinnungszeit und der Gerinnungszeit des Oxalatplasmas dieselbe, wie sie in früheren Veröffentlichungen^{6) 7)} beschrieben worden ist (Tafel 2).

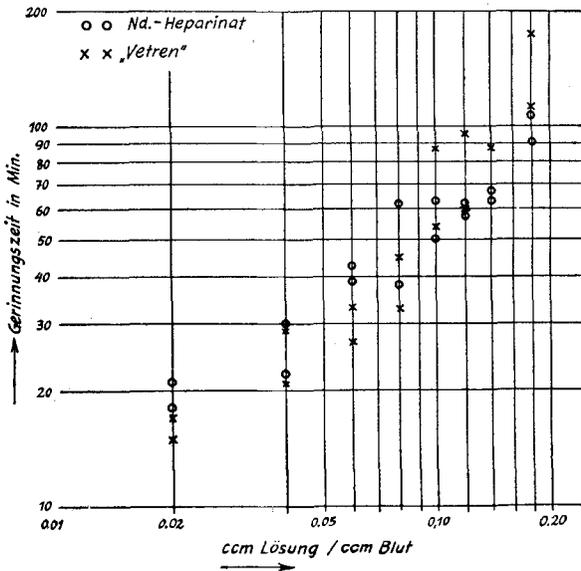
⁶⁾ E. Vincke u. H. A. Oelkers, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **187**, 594 [1937].

⁷⁾ E. Vincke, Ztschr. physiol. Chem. **272**, 65 [1941].

Die Werte der Tafel 2 zeigen, daß auch ein neodymhaltiges Heparin die Blutgerinnungszeit qualitativ in derselben Weise erhöht wie gewöhnliches Heparin, indem sie sofort nach der Injektion sehr stark ansteigt und die Wirkung bei kleinen Dosen bald wieder nachläßt. Derartige Dosen des Neodymheparinats sind auch ohne Einfluß auf den Prothrombingehalt des Blutes. Größere Dosen (Vers. 8 und 11) erhöhen im Maximum der Wirkung die Prothrombinzeit beträchtlich, eine Tatsache, wie sie auch von hohen Dosen des Heparins selbst bekannt ist⁷⁾.

Außerdem wurden noch einige Versuche zur Prüfung der blutgerinnungshemmenden Wirkung in vitro unternommen. Hierbei wurden je 2 Lösungen, die je 5.0 mg Neodymheparinat oder „Vetren“ in 100 ccm physiol. Kochsalzlösung enthielten, miteinander verglichen⁸⁾.

Die Auswertung erfolgte an Kaninchenblut. Die Gerinnungszeit wurde in nicht paraffinierten Röhrchen bei 37° bestimmt. Alle Ansätze enthielten 2 ccm Blut, die zu prüfende Lösung und soviel physiol. Kochsalzlösung, daß das Gesamtvolumen 2.5 ccm betrug.



Abbild. 1. Wirkung des Neodymheparinats und des Heparins auf die Blutgerinnung in vitro.

Die Ergebnisse zeigt die Abbild. 1. Wenn man die unvermeidlichen physiol. Schwankungen der Gerinnungswerte berücksichtigt, kann gesagt werden, daß in vitro beide Verbindungen gleich stark hemmend wirken. Es ist leicht erklärlich, daß der bei der gewählten Konzentration geringe Neodymgehalt des erstgenannten Präparates in vitro die Wirkung des Heparins selbst nicht verstärkt, da eine Blutgerinnungshemmung durch seltene Erden in vitro erst bei relativ hohen Konzentrationen eintritt⁸⁾.

An weiteren physiol. Eigenschaften wurde noch die Blutdruckwirkung des erhaltenen Produktes untersucht. Bei der Prüfung an 3 Katzen in der üblichen Weise ergab sich, daß unmittelbar nach der Injektion der Blutdruck ziemlich stark absinkt⁹⁾.

⁸⁾ Für die liebenswürdige Mitteilung dieses Auswertungsverfahrens danken wir Hrn. Dr. Detzel, Hamburg, verbindlichst.

⁹⁾ Anm. d. Redaktion: Die vom Autor zur Wiedergabe bestimmten Blutdruckkurven konnten aus technischen Gründen nicht aufgenommen werden.

Tafel 2. Wirkung des Neodymheparinats und des Heparins auf die Blutgerinnung in vivo.

Ver- suchs- Nr.	Nr. des Tieres	Gew. des Tieres in kg	mg injiz. Nd-heparinat/ kg Körpergew.	Blut- entnahme nach	Blutgerin- nungszeit in Min. bei 25°	Gerinnungszeit d. Oxalatplas- mas n. Quiek in Sek. bei 40°.
1	56	3.45	2.0	0'	4	—*)
				30'	34	—
				1h	13	—
				2h	9	—
2	33	3.50	2.0	0'	5	—
				30'	23	—
				1h	15	—
				2h	8	—
3	62	2.65	3.0	6h	6	—
				0'	5	—
				30'	>300	—
				1h	40	—
4	59	2.50	3.0	2h	20	—
				4h	15	—
				6h	8	—
				0'	4	12
5	73	3.30	5.0	30'	12	12
				1h	9	12
				2h	10	12
				4h	8	12
6	1	2.60	5.0	6h	7	—
				0'	5	—
				30'	>240	—
				1h	94	—
7	61	3.65	5.0	2h	67	—
				4h	18	—
				0'	4	—
				30'	>240	—
8	73	3.30	20.0	1h	120	—
				2h	30	—
				6h	7	—
				0'	5	12
9	73	3.00	20.0	30'	>240	14
				1h	59	13
				2h	26	13
				4h	7	13
10	73	3.30	20.0	0'	5	8
				5'	>240	56
				30'	>180	26
				1h	>180	21
11	73	3.00	20.0	2h	>120	13
				0'	—	8
				5'	—	37
				30'	—	21
12	73	3.00	20.0	1h	—	20
				2h	—	15

Tafel 2, Fortsetzung.

Ver- suchs- Nr.	Nr. des Tieres	Gew. des Tieres in kg	mg injiz. Nd-heparinat/ kgKörpergew.	Blut- entnahme nach	Blutgerin- nungszeit in Min. bei 25°	Gerinnungszeit d. Oxalatplas- mas n. Quick in Sek. bei 40°:
10	73	3.10	20.0	0'	—	9
				5'	—	28
				30'	—	24
				1h	—	18
				2h	—	14
11	62	2.85	20.0	0'	5	9
				5'	> 360	> 800
				30'	> 300	45
				1h	> 300	21
				2h	> 240	17

*) — bedeutet, daß kein Versuch gemacht wurde.

Dann findet aber schnelle Erholung statt. Zu nachhaltigen Veränderungen des Blutdruckes kommt es nicht. Diese Art der Wirkung ist auf die Heparinkomponente zurückzuführen. Wie ein Vergleich mit „Vetren“ ergab, wurde durch das zur Darstellung des Neodymheparinats verwendete Präparat der Blutdruck genau in derselben Weise beeinflusst.

Zum Schluß seien noch einige orientierende Versuche zur Bestimmung der Toxizität angeführt⁹⁾.

Für diese Versuche wurden Mäuse im Gewicht von durchschnittlich 18–20 g verwendet, denen das Neodymheparinat subcutan als 1-proz. Lösung injiziert wurde.

Bei Versuchen an 29 Tieren wurde als geringste letale Dosis (LD_{50} = Tod von 50% der Versuchstiere) 0.40 g/kg Körpergewicht gefunden. Bei vielen der Tiere wurden ausgedehnte Hämatome unter der Haut und in Körperhöhlen gefunden; offenbar gingen die Tiere an diesen Blutungen zugrunde. Die genannte Dosis entspricht etwa derjenigen, die auch für das benutzte Heparin-Präparat selbst bei subcutaner Applikation als tödlich wirkend gefunden wurde: In Versuchen an 22 Mäusen wurde LD_{50} zu 0.35 g/kg Körpergewicht bestimmt.

31. Horst Böhme und Günther Wolff: Das Absorptionsspektrum des Acetyl-bis-methylsulfonyl-methans. Ein Beitrag zur Kenntnis der Gültigkeitsgrenzen der Enolreaktionen bei sulfonylhaltigen Verbindungen.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem, und dem Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Marburg/Lahn.]
(Eingegangen am 8. August 1946.)

Die Frage der Konstitution der Acyl-bis-alkylsulfonyl-methane konnte bisher mit chemischen Mitteln nicht entschieden werden. Durch Messung der Ultraviolett-Absorption wird jetzt das Vorliegen der Ketoform wahrscheinlich gemacht.

Bei der Entscheidung der Frage, ob Acetyl-bis-methylsulfonyl-methan, der kürzlich erstmals dargestellte¹⁾ einfachste Vertreter der Acyl-bis-alkylsulfonyl-methane, in der Keto- oder der Enolform (I bzw. II) vorliegt, er-

⁹⁾ Es sei betont, daß das Heparin selbst als körpereigener Stoff keine toxischen Wirkungen im eigentlichen Sinne des Wortes besitzt, sondern daß die tödliche Wirkung hoher Dosen auf den durch das Heparin verursachten Blutungen beruht.

¹⁾ H. Böhme u. H. D. Huang, Arch. Pharmaz. 282, 9 [1944].