

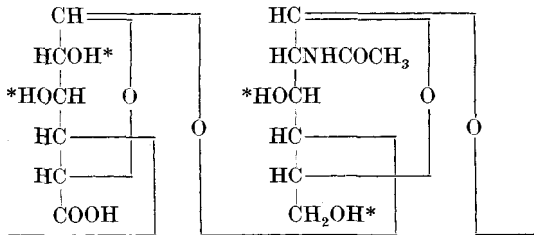
130. Zur Kenntnis blutgerinnungshemmender Polysaccharid-poly-schwefelsäure-ester und ähnlicher Verbindungen

von P. Karrer, H. Koenig und E. Usteri.

(4. VI. 43.)

Unter den Stoffen, welche die Blutgerinnung beeinflussen, hat das Heparin in neuerer Zeit besonderes physiologisches und klinisches Interesse gefunden. Die Verbindung wurde vor 25 Jahren von *Howell* und *Holt*¹⁾ in der Hundeleber entdeckt und 1928 von *Howell*²⁾ als ein Glucuronsäurederivat erkannt. *Charles* und *Scott*³⁾ bestätigten die Anwesenheit einer Uronsäure im Heparin und wiesen in ihren Präparaten etwa 2% Stickstoff nach. Dieser Stickstoffgehalt erfuhr aber erst durch Arbeiten von *Jorpes*⁴⁾ und *Jorpes* und *Bergström*⁵⁾ seine volle Aufklärung. Den genannten Forschern gelang es, aus hochgereinigten Heparinpräparaten durch saure Hydrolyse Glucosamin abzuspalten; ferner zeigten sie, dass beim Kochen des Heparins mit Säuren Kohlendioxyd abgespalten wird, was für das Vorkommen einer Uronsäure in der Verbindung spricht; letztere wurde bis heute allerdings nicht isoliert. Da bei der oxydativen Hydrolyse des Heparins mit Salpetersäure keine Schleimsäure gefasst werden konnte, wird von *Jorpes* und *Bergström*⁵⁾ angenommen, dass es sich bei der Uronsäure um Glucuron-, nicht Galakturonsäure handelt. Besonders wichtig war schliesslich die Erkenntnis, dass Heparin ein Polyschwefelsäure-ester des aus acetyliertem Glucosamin und vermutlich Glucuronsäure aufgebauten Polysaccharids ist und daher mit der Mucoitin-schwefelsäure von *Levene*⁶⁾ Verwandtschaft besitzt.

Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen kann daher die kleinste Einheit der Heparinmolekel durch das folgende Bild ausgedrückt werden, in welchem die mit einem * versehenen Hydroxyle vollständig oder grösstenteils durch Schwefelsäurereste verestert sind:



1) Am. J. Physiol. **47**, 328 (1918).

2) John Hopkins Hosp. Bull. **42**, 199 (1928).

3) J. Biol. Chem. **102**, 425 (1933).

4) Biochem. J. **29**, 1817 (1935).

5) Z. physiol. Ch. **244**, 253 (1936).

6) J. Biol. Chem. **25**, 511 (1916).

Die Reinigung des Heparins erfolgt in der letzten Stufe über das schwer lösliche Barium- und schwer lösliche Brucinsalz. So gereinigte Präparate werden sowohl von *Charles* und *Scott*¹⁾, von *Jorpes*²⁾ sowie von *Charles* und *Todd*³⁾ für einheitlich gehalten. Für das wasserfreie Calciumsalz des Heparins fand *Jorpes* 12,18% S, 2,24% N und 11,04% Ca.

Neuerdings⁴⁾ haben *E. Jorpes* sowie *Jaques*, *Waters* und *Charles* aber nachgewiesen, dass Heparine, die aus verschiedenen Organen und aus verschiedenen Tierarten stammen, Unterschiede im Schwefelgehalt und, auch bei gleichem Schwefelgehalt, Differenzen in der Wirksamkeit zeigen, also offensichtlich doch nicht einheitlich sind.

Bei der schwierigen Zugänglichkeit des Heparins, die für eine grössere klinische Verwendung prohibitiv wirkt, lagen Versuche nahe, auf synthetischem Weg Präparate zu gewinnen, die ähnlich wie Heparin das Prothrombin des Blutes blockieren und damit gerinnungshemmend wirken. Solche, die Blutgerinnung hemmende, künstliche Substanzen wurden in verschiedenen Verbindungsgruppen gefunden.

Schon vor der Abklärung der Konstitution des Heparins hatten *Demole* und *Reinert*⁵⁾ in Präparaten von Ligninsulfosäure und in solchen von Poly-anetholsulfosäure sehr aktive blutgerinnungshemmende Stoffe aufgefunden, von denen letzteres unter der Bezeichnung Liquoid-Roche Verwendung zu physiologischen Versuchen findet. Auch Germanin, Salvarsan, Neosalvarsan hemmen die Gerinnbarkeit des Blutes. Bei allen diesen Stoffen liegen aber die wirksamen und toxischen Dosen so nahe beisammen, dass diese Präparate für klinische Zwecke nicht in Frage kommen. Nachdem Heparin als Polysaccharid-polyschwefelsäure-ester erkannt worden war, haben *S. Bergström*⁶⁾ einerseits, *E. Chargaff* und *F. W. Bancroft*⁷⁾ andererseits eine Reihe von Polyschwefelsäure-estern anderer Polysaccharide dargestellt und auf gerinnungshemmende Eigenschaften geprüft. Hierbei stellten sie fest, dass den Schwefelsäure-estern von Mono- und Disacchariden keine Wirksamkeit zukommt, während die Polyschwefelsäure-ester der Polysaccharide mehr oder weniger stark wirksam waren. Die besten synthetischen Präparate, z. B. Cellulose-trischwefelsäure-ester, Pektin-polyschwefelsäure-ester, Chitin-dischwefelsäure-ester und Chondroitin-polyschwefelsäure-ester erwiesen sich ca. 6—12 mal weniger gerinnungshemmend als Heparin, während bei Stärke-trischwefelsäu-

¹⁾ Biochem. J. **30**, 1927 (1936).

²⁾ *E. J. Jorpes*, Heparin, S. 14 (Oxford University Press, London 1939).

³⁾ Biochem. J. **34**, 112 (1940).

⁴⁾ Biochem. J. **36**, 203 (1942) — *L. B. Jaques, E. T. Waters, A. F. Charles*, J. Biol. Chem. **144**, 229 (1942).

⁵⁾ Arch. exptl. Path. Pharmacol. **158**, 211 (1930).

⁶⁾ Naturw. **23**, 706 (1935); Z. physiol. Ch. **238**, 163 (1936).

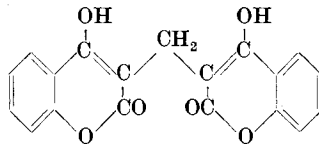
⁷⁾ J. Biol. Chem. **115**, 149, 155 (1936).

reester, Glykogen-trischwefelsäure-ester, Hefenucleinsäure-schwefelsäure-ester, dem Polyschwefelsäure-ester aus arabischem Gummi u. a. m. die Wirksamkeit etwa in der Grössenordnung von nur 5—1 % derjenigen des Heparins lag.

Trotz dieser z. T. recht geringen gerinnungshemmenden Wirkung erwiesen sich die meisten der synthetischen Verbindungen sehr toxisch. Nur die Chondroitin-polyschwefelsäure machte hier eine Ausnahme, indem z. B. 200 mg pro kg Kaninchen ohne Nebenwirkung oder histologisch feststellbare Nachteile ertragen worden sein sollen¹⁾. Dagegen wurde Cellulose-trischwefelsäure-ester „sehr toxisch“ befunden²⁾; genaue Angaben über die verträglichen Dosen sind nicht publiziert, dagegen geht aus der Mitteilung hervor, dass auch kleine Dosen zu Blutungen in inneren Organen führen. Eine praktische Anwendung dieser Verbindungen ist daher ausgeschlossen.

Bei dieser Sachlage erwecken zwei Farbstoffe, die in neuester Zeit als beträchtlich gerinnungshemmend und wenig toxisch erkannt worden sind, einiges Interesse. Es sind dies das Chicagoblau 6 B, das in der englischen Sprache die Bezeichnung Chlorazol sky blue F.P.S. führt (Natriumsalz der Dimethyl-diphenyl-disazo-bis-8-amino-1-naphtol-5,7-disulfosäure), und Benzoechtrosa (Chlorazol Fast Pink BKS Nr. 353 = Natriumsalz der 3,5-Disulfo-diphenylharnstoff-4,4'-disazo-bis-2-amino-8-naphtol-6-sulfonsäure)³⁾. Diese Verbindungen werden von Ratten in Dosen von 300—500 mg pro kg bei intravenöser Injektion noch vertragen (Heparinverträglichkeit 1000 mg pro kg), während ihre Wirksamkeit ca. 10—15mal geringer als diejenige des Heparins ist⁴⁾. Wegen ihres Farbstoffcharakters kommen sie indessen für klinische Zwecke nicht in Frage.

In neuester Zeit ist von *Karl Paul Link* und Mitarbeitern⁵⁾ eine neue Gruppe blutgerinnungshemmender Verbindungen aufgefunden worden, indem der Antikoagulationsfaktor aus einer Kleeart, die bei Tieren die sog. „sweet clover disease“ erzeugt, als das 3,3'-Methylen-4,4'-dioxo-dicumarin



¹⁾ Z. physiol. Ch. **238**, 166 (1936).

²⁾ Bergström, Z. physiol. Ch. **238**, 163 (1936). — *Jorpes*, Heparin, S. 49.

³⁾ Huggett und Silman, J. Physiol. **74**, 74. 9 P. (1932). — Huggett und Rowe, J. Physiol. **78**, Proc. 25 (1933).

⁴⁾ Kahlson und Landby, Skand. Arch. Physiol. **77**, 301 (1937). — Bergström, *Jorpes* und Wilander, Skand. Arch. Physiol. **76**, 175 (1937). — Huggett, Biochem. J. **36**, 6 (1942).

⁵⁾ J. Biol. Chem. **138**, 513, 529 (1941); **142**, 941 (1942).

erkannt worden ist. Diese Verbindung — ein synthetisch schon vor Jahren hergestellter Stoff¹⁾ — unterscheidet sich in der Art ihrer Wirksamkeit wesentlich vom Heparin und ähnlichen Substanzen. Während die Heparinwirkung bereits kurz nach der Injektion (innerhalb der ersten Stunde) mit maximaler Stärke einsetzt, dann aber innerhalb 3—4 Stunden auf 0 zurückfällt, stellt sich nach Verabreichung von 3,3'-Methylen-4,4'-dioxy-dicumarin die blutgerinnungshemmende Wirkung erst nach 2—3 Tagen ein, hält dann aber während einiger Tage an.

Die referierten Untersuchungen zeigen, dass sich blutgerinnungshemmende Verbindungen in verschiedenen Gruppen finden lassen, dass aber die meisten dieser künstlich dargestellten Substanzen wegen ihrer hohen Toxicität oder Farbstoffnatur für die Behandlung menschlicher Erkrankungen ausscheiden. Wir haben uns darum die Aufgabe gestellt, die Abhängigkeit der hohen Toxicität solcher Präparate von ihrer Konstitution, ferner die Voraussetzungen für befriedigende antikoagulierende Wirkung etwas mehr abzuklären. Ein brauchbares Ersatzpräparat für das in grösseren Mengen sehr schwer zugängliche Heparin wäre auch für klinische Zwecke erwünscht.

Unsere Untersuchungen betreffen saure Ester von Polysacchariden und Polysaccharid-sulfonsäuren. Zuerst stellten wir durch Einwirkung von Phosphoroxchlorid auf Stärke, „Trihexosan“, Chitosan und Gelatine saure Phosphorsäure-ester dieser Verbindungen her; deren Phosphorgehalt lag etwa zwischen 9 und 24%. Keine dieser Verbindungen zeigte indessen eine nennenswerte blutgerinnungshemmende Wirkung. Verglichen mit Heparin wurden folgende Wirksamkeiten gemessen.

Heparin	Wirksamkeit ²⁾	E/g	550000	Dosis tolerata pro kg	1,0 g
Stärke-phosphorsäure-ester (8,8% P)	„	E/g	900	Dosis tolerata pro kg	0,25 g
Chitosan-phosphorsäure-ester (24,4% P)	„	E/g	150		
Gelatine-phosphorsäure-ester	„	E/g	100		

Chargaff, *Bancroft* und *Stanley-Brown*³⁾ haben früher einen Cellulose-phosphorsäure-ester dargestellt und erwähnen kurz, dass er ebenfalls sehr wenig gerinnungshemmend wirkte.

Worauf die geringe Wirksamkeit der phosphorylierten Polysaccharide zurückgeht, ist eine offene Frage. Wir haben das Verhalten des Stärke-phosphorsäure-esters gegen rohe Malzdiastase untersucht (vgl. experimenteller Teil) und festgestellt, dass die Verbindung durch das Ferment schnell hydrolysiert wird und dass dabei durch eine Phosphatase auch die Phosphorsäuregruppen bis zu ca. 90% abge-

¹⁾ *Anschtz* und *Fresenius*, B. **36**, 465 (1903); A. **367**, 212 (1909).

²⁾ Die zu diesen Messungen verwendete Antikoagulationseinheit E ist folgendermassen definiert: 1 E ist diejenige Heparinmenge, die notwendig ist, um 1 cm³ Citratplasma des Rindes während 4 Stunden bei 37° ungeronnen zu halten. (Vgl. *Reinert* und *Winterstein*, Arch. intern. Pharmacodynamie **62**, 50 (1939).)

³⁾ J. Biol. Chem. **115**, 155 (1936).

spalten werden. Vergleichsversuche zeigten, dass die Verzuckerung des Stärke-phosphorsäure-esters durch das Ferment etwas langsamer als diejenige der Stärke verläuft. Wirksam sind ferner die Fermente aus dem Hepato-pankreassaft der Weinbergschnecke. Auch durch 2-stündiges Kochen des Esters mit 10-proz. Salzsäure tritt weitgehende Hydrolyse und Abspaltung der Phosphatreste ein.

Der Trihexosan-phosphorsäure-ester erwies sich dagegen gegenüber der Malzdiastase widerstandsfähiger und wurde nur in geringem Masse hydrolytisch gespalten.

Da auf Grund der geschilderten Versuchsergebnisse eine weitere Bearbeitung der Phosphorsäure-ester wenig Erfolg versprach, wandten wir uns wieder den Polysaccharid-schwefelsäure-estern zu. Deren Herstellung erfolgte in bekannter Weise durch Einwirkung von Chlorsulfonsäure auf das in Pyridin suspendierte Kohlenhydrat. Um eine Depolymerisation des letztern so weit wie möglich zu vermeiden, arbeiteten wir aber im allgemeinen bei tieferen Temperaturen als die Autoren, die sich früher mit der Herstellung solcher Verbindungen beschäftigten. Gewisse quantitative Unterschiede gegenüber früheren Angaben scheinen auf diese Abänderung der Arbeitsbedingungen zurückzugehen.

Blutgerinnungshemmende Wirkung und Toxicität der hergestellten Präparate waren folgende:

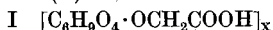
Lävoglucosan-schwefelsäure-ester (20,5% S)	Wirksamkeit E/g	240.	Dosis tol. pro kg	—
Trihexosan-schwefelsäure-ester (16,9% S)	„ E/g	30000.	„ „ „ „	0,4 g ¹⁾
Chitin-schwefelsäure-ester (14,5% S)	„ E/g	37000.	„ „ „ „	—
Chondroitinschwefelsäure-schwefelsäure-ester (14,1% S)	„ E/8	85000.	„ „ „ „	0,25 g ¹⁾
Cellulose-schwefelsäure-ester (18,9% S)	„ E/g	126000.	„ „ „ „	0,02 g ¹⁾
Rübenpektin-schwefelsäure-ester . .	„ E/g	170000.	„ „ „ „	0,10 g ¹⁾

Es zeigt sich zunächst, dass der Schwefelsäure-ester des niedrig molekularen Lävoglucosans keine nennenswerte gerinnungshemmende Eigenschaften besitzt; hochmolekularer Zustand solcher Schwefelsäure-ester scheint demnach eine Voraussetzung für stärkere Beeinflussung der Koagulationsfähigkeit des Blutes zu sein. Von den anderen dargestellten Estern zeichnen sich neben dem Pektinschwefelsäure-ester der Chondroitinschwefelsäure-schwefelsäure-ester und der Cellulose-schwefelsäure-ester durch gute Wirksamkeit aus; ersterer ist etwa 5—6mal, letzterer nur 4mal schwächer wirksam als Heparin. Während jedoch der Chondroitinschwefelsäure-schwefelsäure-ester re-

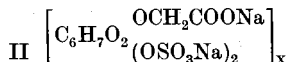
¹⁾ Die Toxicitätsbestimmungen der Polysaccharid-polyschwefelsäure-ester streuen sehr erheblich; offenbar spielen individuelle Unterschiede der Tiere bei der Verträglichkeit der Präparate eine grosse Rolle. Um ein zuverlässiges Urteil über die Giftigkeit dieser Substanzen zu gewinnen, sind daher sehr zahlreiche Toxicitätsbestimmungen unerlässlich.

lativ ungiftig ist (die verträgliche Dosis entspricht ungefähr $\frac{1}{4}$ derjenigen des Heparins), handelt es sich beim Cellulose-trischwefelsäure-ester um einen sehr toxischen Stoff, der aus diesem Grunde für eine praktische Anwendung ausscheidet.

Man kann nun vermuten, dass die viel grössere Giftigkeit des Cellulose-schwefelsäure-esters gegenüber dem Chondroitinschwefelsäure-schwefelsäure-ester darauf beruht, dass letzterer zahlreiche nicht abspaltbare Carboxylgruppen enthält, während im Cellulose-schwefelsäure-ester nur esterartig gebundene Säurereste vorkommen. Wie der Abbau solcher Verbindungen im Organismus erfolgt, ist unbekannt. Es wäre immerhin denkbar, dass beim Verlust der esterartig gebundenen Schwefelsäuregruppen aus der Celluloseverbindung das Polysaccharid ausfällt und daher toxisch wirkt, während das durch Verseifung aus Chondroitin-schwefelsäure hervorgehende Chondroitin dank seiner Carboxylgruppen als Salz gelöst bleibt und daher leichter ausgeschieden wird. Zur Prüfung dieses Gedankens stellten wir den Cellulose-glykolsäureäther (I)



her und daraus mittels Chlorsulfonsäure das Natriumsalz des Schwefelsäure-esters (II)



Unsere Erwartung fand sich bestätigt. Die Dosis tolerata des Cellulose-glykolsäureäthers lag bei ca. 0,5 g pro kg Körpergewicht, war somit nur ca. um die Hälfte kleiner als diejenige des Heparins. Die Substanz war 25mal weniger toxisch als der Cellulose-poly-schwefelsäure-ester. Dagegen erwies sich die Blut-gerinnungshemmende Wirkung ganz ungenügend (ca. 60 E/g). Durch Veresterung der Verbindung mit Schwefelsäure wurde aber ein Schwefelsäure-ester (Formel II) von hoher Wirksamkeit erhalten; seine Toxicität ist zwar etwas höher als diejenige des Cellulose-glykolsäureäthers selbst, in dessen immer noch 10mal geringer als diejenige des Cellulose-poly-schwefelsäure-esters:

Cellulose-glykolsäureäther	Wirksamkeit E/g	60.	Dosis tol. pro kg 0,5 g
Cellulose-glykolsäureäther-schwefelsäure-ester (13,5% S)	Wirksamkeit E/g	100000.	Dosis tol. pro kg 0,2 g

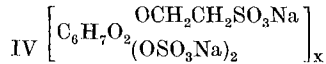
Nach diesen Erfahrungen schien es wünschenswert, auch ein Cellulosederivat zu prüfen, welches statt einer Carboxylgruppe einen nicht abspaltbaren Sulfonsäurerest zur Löslichkeitserhöhung enthält. Geeignet schien uns dafür ein Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther



der sich durch Einwirkung von β -bromäthansulfonsaurem Natrium auf Cellulose in Natronlauge darstellen liess. In Übereinstimmung mit unserer Erwartung war die Verbindung sehr wenig giftig; 1 g pro kg Tiergewicht wurde ohne Nachteile ertragen, das ist die gleiche Menge

wie beim Heparin. Dagegen erwies sich auch diese Verbindung, wie der Cellulose-glykolsäureäther, auf die Blutgerinnungsfähigkeit wenig wirksam (ca. 150 E/g). Dasselbe trifft für einen analogen Chondroitinschwefelsäure-äthansulfonsäure-äther mit 11,0% Schwefelgehalt zu (für $[C_{12}H_{13}O_{10}NNa(COCH_3)(SO_3Na)(CH_2CH_2SO_3Na)]_x$ berechnen sich 10,1% S).

Durch Veresterung mittels Chlorsulfonsäure haben wir schliesslich den sauren Schwefelsäure-ester des Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äthers hergestellt:



Durch die Veresterung des Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äthers (III) mit Schwefelsäure zum Schwefelsäure-ester IV schnellte die Blutgerinnungshemmende Wirkung wieder schlagartig in die Höhe und erreichte bei einer Wirksamkeit von 80000 E/g ca. $\frac{1}{7}$ derjenigen der Heparinwirkung. Allerdings nahm auch die Toxicität wieder etwas zu, indem 0,5 g pro kg bei der Maus toxisch wirkten, 0,2 g pro kg symptomlos vertragen wurden:

Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther	Wirksamkeit E/g	150.	Dosis tol. pro kg	1 g
Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther- schwefelsäure-ester (17,2% S) . .	Wirksamkeit E/g	80000.	Dosis tol. pro kg	0,2 g
Chondroitinschwefelsäure-äthansulfon- säure-äther	Wirksamkeit E/g	175.		

Aus diesen Versuchsergebnissen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

1) Phosphorsäure-ester von Polysacchariden, ferner ätherartige Derivate von Polysacchariden mit Carboxylgruppen (Typus Cellulose-glykolsäureäther) oder Sulfonsäureresten (Typus Cellulose- β -oxyäthansulfonsäureäther) besitzen keine nennenswerten Blutgerinnungshemmende Eigenschaften.

2) Ebenfalls fast wirkungslos erweisen sich Polyschwefelsäure-ester nieder molekularer Kohlenhydrate (Typus Lävoglucosan-polyschwefelsäure-ester).

3) Verhältnismässig starke Wirkung auf die Blutgerinnung besitzen die sauren Polyschwefelsäure-ester mehrerer Polysaccharide, insbesondere diejenigen der Chondroitinschwefelsäure und der Cellulose. Die Polyschwefelsäure-ester der Cellulose sind jedoch sehr giftig.

4) Durch Einführung von Carboxyl- oder Sulfonsäuregruppen, die infolge ihrer Stellung an C-Atomen nicht abspaltbar sind, in solche Cellulose-polyschwefelsäure-ester tritt eine beträchtliche Toxicitätsabnahme ein, während die Wirkung auf die Blutgerinnung ungefähr dieselbe bleibt wie diejenige der Cellulose-polyschwefelsäure-ester.

Chondroitinschwefelsäure-polyschwefelsäure-ester, Cellulose-glykolsäure-äther-polyschwefelsäure-ester und Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-polyschwefelsäure-ester besitzen von den bisher bekannt gewordenen, künstlich hergestellten Blutgerinnungshemmenden Stoffen

vom Heparintypus anscheinend die günstigsten Quotienten von wirksamer Dosis zu toxischer Dosis. Verglichen mit Heparin ist aber die Wirkung 4—6mal kleiner, die Giftigkeit 3—4mal grösser. Enthält Heparin in der pro kg Tiergewicht erträglichen Dosis (1 g) 500 000—550 000 gerinnungshemmende Einheiten, so wären in den genannten, künstlich erzeugten Präparaten in der pro kg ertragenen Menge (0,20—0,30 g) nur ca. 20 000—30 000 E. enthalten.

Für die Leistungsfähigkeit der Präparate sind indessen nicht nur Toxicität und Wirkungsstärke massgebend, sondern auch die Wirkungsdauer, da hierdurch die Zahl der für die Aufrechterhaltung der Ungerinnbarkeit des Blutes notwendigen Injektionen bzw. Substanzmengen bestimmt wird. In dieser Hinsicht liegen die Verhältnisse bei den künstlich dargestellten Polysaccharid-schwefelsäure-estern günstiger als beim Heparin.

Nach Versuchen, die im pharmakologischen Laboratorium von *F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.* in Basel ausgeführt worden sind, ergibt sich folgendes Bild über die Dauer der Blutgerinnungshemmenden Wirkung:

1. Chondroitinschwefelsäure-polyschwefelsäure-ester.

I. Kaninchen Nr. 854, Gewicht 1,35 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 4 Minuten.

11^h: Injektion von 100 mg/kg = 135 mg in 5 cm³ physiol. Kochsalzlösung

12^h: 1. Blutentnahme. Blut nach 24 Stunden ungeronnen

13.50^h: 2. „ „ „ 24 „ „

16^h: 3. „ „ „ 24 „ „

folgender Tag:

10.35^h: 4. „ „ 31 Minuten geronnen.

II. Kaninchen Nr. 862. Gewicht 1,33 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 6 Minuten.

10.50^h: Injektion von 20 mg/kg = 26,6 mg in 5 cm³ physiol. Kochsalzlösung

11.50^h: 1. Blutentnahme. Blut gerinnt nach 4.10 Stunden

13.50^h: 2. „ „ „ „ 2.50 Stunden

15.50^h: 3. „ „ „ „ 9 Minuten

folgender Tag:

9.30^h: 4. „ „ „ „ 8 Minuten

9.35^h: Zweite Injektion von 20 mg/kg.

10.35^h: 5. Blutentnahme. Blut gerinnt nach 5.45 Stunden

11.30^h: 6. „ „ „ „ 3.45 Stunden

13.35^h: 7. „ „ „ „ 30 Minuten

15.35^h: 8. „ „ „ „ 9 Minuten

folgender Tag:

9.05^h: 9. „ „ „ „ 6 Minuten

9.10^h: Dritte Injektion von 20 mg/kg.

10.15^h: 10. Blutentnahme. Blut gerinnt nach 24—48 Stunden

11.15^h: 11. „ „ „ „ 24—48 Stunden

12.00^h: 12. „ „ „ „ 3.30 Stunden

2. Heparin.

Kaninchen Nr. 677. Gewicht 1,47 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 8 Minuten.

10.50^h: Injektion von 3,2 mg Heparin (= 1600 E/kg) entsprechend 20 mg Chondroitinschwefelsäure-polyschwefelsäure-ester (= 1600 E/kg)

11.50 ^h :	1.	Blutentnahme.	Blut gerinnt nach	50 Minuten
13.50 ^h :	2.	„	„	7 Minuten
15.50 ^h :	3.	„	„	8 Minuten
folgender Tag:				
9.30 ^h :	4.	„	„	6 Minuten
9.35 ^h : Zweite Injektion von 3,2 mg/kg.				
10.35 ^h :	5.	Blutentnahme.	Blut gerinnt nach	45 Minuten
11.35 ^h :	6.	„	„	8 Minuten
13.35 ^h :	7.	„	„	7 Minuten
folgender Tag:				
9.00 ^h :	8.	„	„	6 Minuten
9.05 ^h : Dritte Injektion von 3,2 mg/kg.				
10.05 ^h :	9.	Blutentnahme.	Blut gerinnt nach	40 Minuten
11.05 ^h :	10.	„	„	10 Minuten
12.05 ^h :	11.	„	„	6 Minuten

3. Natriumsalz des Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäure-esters.

I. Kaninchen Nr. 300. Gewicht 2,25 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 10 Minuten.

9.55 ^h : Injektion von 20 mg/kg = 45 mg in 5 cm ³ physiol. Kochsalzlösung.				
10.35 ^h :	1.	Blutentnahme.	Blut nach 24 Stunden	ungeronnen
11.35 ^h :	2.	„	„	24 „ ungeronnen
13.35 ^h :	3.	„	„	24 „ halbgeronnen
15.35 ^h :	4.	„	„	24 „ halbgeronnen
16.35 ^h :	5.	„	„	22 „ geronnen

folgender Tag:

9.10 ^h : 6. Blutentnahme. Blut nach 6 Minuten geronnen				
9.15 ^h : Zweite Injektion von 20 mg/kg.				
10.15 ^h :	7.	Blutentnahme.	Blut nach 24 Stunden	ungeronnen
11.15 ^h :	8.	„	„	24 „ „
12.15 ^h :	9.	„	„	24 „ „
14.15 ^h :	10.	„	„	24 „ „
15.00 ^h :	11.	„	„	24 „ „
16.00 ^h :	12.	„	„	24 „ „

II. Kaninchen Nr. 303. Gewicht 2,3 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 7 Minuten.

9.20 ^h : Injektion von 10 mg/kg = 23 mg in 5 cm ³ physiol. Kochsalzlösung.				
10.20 ^h :	1.	Blutentnahme.	Blut nach 24 Stunden	ungeronnen
11.20 ^h :	2.	„	„	24 „ „
13.20 ^h :	3.	„	„	24 „ „
14.20 ^h :	4.	„	zwischen 3—15 Stunden	geronnen
16.20 ^h :	6.	„	zwischen 40 Minuten—15 Stunden	geronnen

folgender Tag:

9.05 ^h : 7. „ „ nach 6 Minuten geronnen				
9.07 ^h : Zweite Injektion von 10 mg/kg				
10.05 ^h :	8.	Blutentnahme.	Blut nach 24 Stunden	ungeronnen
12.05 ^h :	9.	„	nach 24 Stunden	halbgeronnen
14.05 ^h :	10.	„	zwischen 3—14 Stunden	geronnen
16.05 ^h :	11.	„	zwischen 1—14 Stunden	geronnen

4. Natriumsalz des Cellulose- β -oxyäthansulfonsäureäther-schwefelsäure-esters.

I. Kaninchen Nr. 382. Gewicht 2,75 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 6 Minuten.

9.05 ^h : Injektion von 20 mg/kg = 55 mg in 5 cm ³ physiol. Kochsalzlösung.				
10.05 ^h :	1.	Blutentnahme.	Blut nach 24 Stunden	ungeronnen

11.05^h: 2. Blutentnahme. Blut nach 24 Stunden ungeronnen
 12.05^h: 3. „ „ „ 24 „ „
 14.05^h: 4. „ „ „ 24 „ „
 15.05^h: 5. „ „ „ 24 „ „
 16.05^h: 6. „ „ „ 24 „ halbgeronnen

folgender Tag:

10.25^h: 7. „ „ „ 9 Minuten geronnen
 10.27^h: Zweite Injektion von 20 mg/kg.
 11.25^h: 8. Blutentnahme. Blut nach 24 Stunden ungeronnen
 13.25^h: 9. „ „ „ 24 „ „
 15.25^h: 10. „ „ „ 24 „ „
 16.25^h: 11. „ „ „ 24 „ „

folgender Tag:

9.15^h: 12. Blutentnahme. Blut nach 7 Minuten geronnen
 9.17^h: Dritte Injektion von 20 mg/kg.
 10.15^h: 13. Blutentnahme. Blut nach 24 Stunden ungeronnen
 11.15^h: 14. „ „ „ 24 „ „
 13.15^h: 15. „ „ „ 24 „ „
 14.15^h: 16. „ „ „ 24 „ halbgeronnen
 15.15^h: 17. „ „ „ 24 „ „
 16.15^h: 18. „ „ „ 24 „ „

II. Kaninchen Nr. 304. Gewicht 2,75 kg. Normale Gerinnungszeit des Blutes 10 Minuten.

9.25^h: Injektion von 10 mg/kg = 28 mg in 5 cm³ physiol. Kochsalzlösung.
 10.25^h: 1. Blutentnahme. Blut nach 24 Stunden ungeronnen
 11.25^h: 2. „ „ „ 24 „ „
 13.25^h: 3. „ „ „ 24 „ halbgeronnen
 14.25^h: 4. „ „ „ zwischen 3—15 Stunden geronnen
 15.25^h: 5. „ „ „ 2—15 „ „
 16.25^h: 6. „ „ „ ½—15 „ „

Weitere Tierversuche zeigten, dass bei Verabreichung gleicher Gewichtsmengen Heparin einerseits, Cellulose-glykolsäure-äther-polyschwefelsäure-ester oder Cellulose-β-oxyäthansulfonsäureäther-schwefelsäure-ester andererseits bezüglich Gerinnungshemmung nur der Momentaneffekt beim Heparin grösser ist, während in der Dauerwirkung die synthetischen Präparate Heparin übertreffen. Dies geht z. B. aus der folgenden Zusammenstellung hervor, in welcher die Gerinnungszeiten des Blutes nach Heparinzusatz bzw. nach Zusatz von Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäure-ester einander gegenübergestellt sind:

	mg/kg	vor der Injektion	Gerinnungszeit der Blutproben entnommen nach					
			1 ^h	2 ^h	3 ^h	4 ^h	5 ^h	6 ^h
Heparin	5	6'	71'	42'	—	—	6'	—
	10	7'	8 ^h	90'	—	—	9'	—
Cellulose-glykolsäure-äther-polyschwefelsäure-ester . . .	5	7'	5 ^h	70'	15'	—	10'	7'
	10	8'	24 ^h	24 ^h	5 ^h	—	9'	8'

Noch schärfer traten die Unterschiede in der Dauerwirkung der beiden Präparate hervor, wenn das Gerinnungsvermögen der Blutproben nicht durch Ermittlung der Momentangerinnungszeit, sondern nach der Methode von *Quick* bestimmt wurde, nach welcher das im Plasma vorhandene Heparin mit einer Thrombinlösung bekannten Gehaltes austitriert wird. Da der hohe Momentaneffekt des Heparins bei geringer Dauerwirkung eher unerwünscht und nachteilig ist, sind den synthetischen Produkten mit ihrer gleichmässigeren Dauerwirkung gewisse Vorteile nicht abzusprechen.

Klinische Versuche mit den synthetischen Verbindungen sind z. Zt. im Gang.

Wie wir bereits erwähnt haben, sind in neuester Zeit von mehreren Forschern aus verschiedenen Tierarten und verschiedenen Organen Heparinpräparate isoliert worden, die sich bei gleicher analytischer Zusammensetzung und insbesondere gleichem Schwefelgehalt in ihrer Wirksamkeit wesentlich unterscheiden. Es ist dabei die Vermutung geäussert worden, dass die grossen Differenzen in der Wirksamkeit durch verschieden hohen Polymerisationsgrad bedingt sein könnten. Diese Frage liesse sich zweifellos durch Viskositätsbestimmungen der verschiedenen Heparine beantworten. Leider waren wir bisher nicht in der Lage, Heparine verschiedener Herkunft zu vergleichen.

Dagegen haben wir eine Reihe von Viskositätsmessungen an den synthetischen Präparaten durchgeführt. Verglichen wurden 1-proz. wässrige Lösungen folgender Verbindungen:

- 1) Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäure-ester (Natriumsalz), aus nicht umgefällter Cellulose hergestellt.
- 2) Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäure-ester (Natriumsalz), aus umgefällter Cellulose erhalten.
- 3) Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-polyschwefelsäure-ester (Natriumsalz): zwei Präparate mit 13,7 bzw. 17,2 % S-Gehalt.
- 4) Chondroitinschwefelsäure-polyschwefelsäure-ester (Natriumsalz).
- 5) Heparin (Liquemin Roche).

Aus den nachstehend aufgeführten Versuchsergebnissen geht hervor, dass der Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäure-ester, der aus nicht umgefällter Cellulose hergestellt worden war, eine höhere Viskosität besitzt als das Präparat, das aus umgefällter Cellulose gewonnen wurde. Das dürfte darauf beruhen, dass durch das Umfällen der Cellulose ein teilweiser Abbau eintritt. Trotzdem unterscheiden sich die beiden Präparate von Cellulose-glykolsäure-äther-polyschwefelsäure-ester in ihrer Toxizität und gerinnungshemmenden Wirkung nicht wesentlich.

Die Viskosität des Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-polyschwefelsäure-esters, der aus umgefällter Cellulose hergestellt wurde, liegt

etwas tiefer als diejenige der Glykolsäure-Verbindung. Es scheint aus den gemessenen zwei Präparaten hervorzugehen, dass mit Zunahme der Sulfonsäurereste in den Präparaten die Viskosität sinkt, was ebenfalls leicht verständlich ist.

Die Viskositäten von Chondroitin-schwefelsäure-polyschwefelsäure-ester und Heparin liegen nahe beisammen. Die beträchtlichen Unterschiede in der Wirkungsweise und in der Toxicität der beiden Verbindungen können also sicher nicht durch Unterschiede in der Viskosität bzw. Molekulargrösse bedingt sein, sondern müssen auf verschiedene strukturelle Einflüsse zurückgeführt werden.

Viskositätsmessungen.

Einwagen je 0,1000 g. gelöst in 10 cm³ Wasser.
Die Messungen wurden ausgeführt bei 20,0^o—21,0^o
 η in dyn. sec. cm.²

Wasser	Cellulose-glykolsäure-äther-polyschwefelsäure-ester			Cellulose- β -oxy-äthansulfonsäure-polyschwefelsäure-ester		Chondroitin-schwefelsäure-poly-schwefelsäure-ester	Heparin
	aus nicht umgefällter Cellulose	aus umgefällter Cellulose	aus umgefällter Cellulose	aus umgefällter Cellulose			
0,001005	S = 11,0% 0,01045	S = 10,8% 0,01055	S = 11,1% 0,00690	S = 13,7% 0,00426	S = 17,2% 0,00210	S = 11,5% 0,00147	0,001189

Der chemischen Fabrik *F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.* danken wir bestens für die Prüfung der vorbeschriebenen Verbindungen auf blutgerinnungshemmende Wirkung.

Experimenteller Teil.

Darstellung phosphorylierter Stärke.

Zu 75 cm³ trockenem Pyridin lässt man unter Rühren und Kühlen mit Eis-Kochsalzmischung 25 cm³ Phosphoroxylechlorid zutropfen. Nach dem Abklingen der heftigen Reaktion werden bei 0^o 5 g „lösliche“, über Phosphorperoxyd gut getrocknete Stärke in Portionen zugesetzt. Unter ständigem Rühren und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit erwärmt man die Reaktionsmasse während 5 bis 6 Stunden auf 40^o (in einigen Versuchen auf 55^o). Dabei löst sich die Stärke allmählich auf und die Reaktionsmischung färbt sich dunkler. Nach dem Abkühlen wird sie durch Zugabe von wenig Eis zersetzt. Man zentrifugiert hierauf geringe Anteile unlöslicher Substanz ab und vermischt die klare Lösung mit der fünffachen Menge Alkohol. Dadurch wird eine zähflüssige Masse ausgefällt, die man durch Zentrifugieren von der überstehenden Flüssigkeit abtrennt. Dann löst man sie in wenig Wasser, macht diese Lösung durch Zusatz von Natronlauge alkalisch und fällt anschliessend das Natriumsalz der phosphorylierten Stärke, zusammen mit etwas Natriumphosphat, durch Alkoholzusatz

aus. Durch mehrtägige Dialyse in Pergamenthülsen werden die beiden Anteile getrennt, das Natriumsalz der phosphorylierten Stärke wird durch Alkohol aus der wässrigen Lösung erneut ausgefällt, abzentrifugiert, mit Alkohol, hierauf mit Äther gewaschen und bei 60° im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 2,6—3,0 g Natriumsalz des Stärke-phosphorsäure-esters. Der Phosphorgehalt verschiedener Präparate schwankte zwischen 9,4—11,5 %.

Für einen „Monoester“ $[C_6H_9O_5 \cdot PO_3Na_2]_x$ berechnen sich 10,8% Phosphor, für einen „Diester“ $[C_6H_8O_5(PO_3Na_2)_2]_x$ 15,1%.

Die Präparate sind frei von anorganischen Phosphorverbindungen und besitzen gegenüber *Fehling'scher* Lösung nur äusserst schwaches Reduktionsvermögen.

Darstellung phosphorylierter Amylose.

Amylose stellten wir aus Maisstärke nach den Angaben von *K. H. Meyer* und Mitarbeitern¹⁾ her. Die Veresterung des Präparates mit Phosphoroxychlorid erfolgte in gleicher Weise wie diejenige der Stärke. Das gewonnene Präparat von phosphorylierter Amylose enthielt 18,0% Phosphor.

Darstellung von Phosphorsäure-estern depolymerisierter Stärke, des sog. „Trihexosans“.

Als Ausgangsmaterial diente das nach *A. Pictet* und *R. Jahn*²⁾ aus Stärke dargestellte sog. „Trihexosan“. 2 g Substanz wurden in 45 cm³ Pyridin und 15 cm³ Phosphoroxychlorid bei 40° in gleicher Weise wie die Stärke verestert. Reaktionszeit: 5 Stunden.

Das durch Dialyse gereinigte Natriumsalz des „Trihexosan-phosphorsäure-esters“ enthielt 10,8% Phosphor.

Darstellung phosphorylierten Chitosans.

3 g Chitosan wurden in einer Mischung von 45 cm³ Pyridin und 15 cm³ Phosphoroxychlorid bei 40° während 5 Stunden phosphoryliert. Aufarbeitung der Reaktionslösung wie im ersten Beispiel.

Das durch Dialyse gereinigte Natriumsalz reduzierte *Fehling'sche* Lösung nicht.

Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf Gelatine.

In eine aus 40 cm³ trockenem Pyridin und 15 cm³ Phosphoroxychlorid in der Kälte bereitete Lösung werden 3 g Gelatinepulver eingetragen. Es wird 4 Stunden bei 40° gerührt, durch Eis zersetzt, unlösliche Reste abzentrifugiert und die klare Lösung mit Alkohol versetzt. Hierbei fällt die phosphorylierte Gelatine aus. Nach dem Umlösen aus Wasser-Alkohol und Trocknen mit Alkohol und Äther enthielt das Präparat 8,7% organisch gebundenen Phosphor.

¹⁾ Helv. **23**, 854, 875 (1940).

²⁾ Helv. **5**, 640 (1922).

Schwefelsäure-ester der Cellulose.

In die stark gekühlte Mischung von 30 cm³ Pyridin und 7 cm³ Chlorsulfonsäure werden 3 g trockene, pulverisierte, aus Kupfer(II)-tetramminhydroxyd umgefällte¹⁾ Cellulose unter Rühren eingetragen. Dann erwärmt man die Reaktionsmasse während 5 Stunden unter Rühren auf 60°, läßt 12 Stunden stehen, giesst hierauf auf Eis und trennt unlösliche Anteile durch Zentrifugieren von der wässrigen Lösung. Aus dieser kann der gebildete Cellulose-schwefelsäure-ester durch Alkoholzusatz ausgefällt werden. Er wird abgenutscht, mit Alkohol ausgewaschen, wieder in Wasser gelöst, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und der Dialyse unterworfen. Ist die Lösung frei von Sulfationen, so wird sie etwas konzentriert und das Natriumsalz des Cellulose-schwefelsäure-esters mit Alkohol gefällt. Man läßt es zuerst unter Alkohol, später unter Äther stehen, trocknet hierauf im Vakuum und erhält die Verbindung so in Form eines farblosen, lockeren, in Wasser leicht löslichen Pulvers.

Schwefelgehalt bei Präparaten verschiedener Darstellung 18,9 bis 20,4 %.

Dieser entspricht annähernd dem Schwefelgehalt des Natriumsalzes des Cellulose-trisulfonsäure-esters [C₆H₇O₅(SO₃Na)₃], für welches sich 20,5% Schwefel berechnen.

Schwefelsäure-ester des „Trihexosans“.

Die Veresterung von 2 g Trihexosan geschah mit 7 cm³ Chlorsulfonsäure in 30 cm³ Pyridin bei 90°. Reaktionsdauer 45 Minuten. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgte wie im vorhergehenden Beispiel.

Schwefelgehalt des Präparates (Natriumsalz) 17,0 %.

Sulfuriertes Chitin.

3 g gepulvertes Chitin wurden während 5 Stunden in einem Gemisch von 30 cm³ Pyridin und 7 g Chlorsulfonsäure sulfuriert. Aufarbeitung der Reaktionsmischung wie in den früheren Beispielen.

Schwefelgehalt des sulfurierten Chitins (Natriumsalz) 14,4 %.

Sulfurierte Chondroitinschwefelsäure.

In ein in der Kälte bereitetes Gemisch von 30 g Pyridin und 7 cm³ Chlorsulfonsäure trägt man 3 g trockene, pulverförmige Chondroitinschwefelsäure ein, rührt 5 Stunden bei 60°, zersetzt hierauf die Reaktionsmasse mit wenig Eis, trennt unlösliche Anteile von der wässrigen Lösung und fällt aus letzterer durch Zusatz von Alkohol die sulfurierte Chondroitinschwefelsäure aus. Diese wird dann erneut in Wasser gelöst, mit Natronlauge neutralisiert, die Lösung bis zur Entfernung aller Sulfationen dialysiert und die Verbindung durch Alkohol schliesslich wieder gefällt.

¹⁾ P. Karrer, H. Illing, Koll. Z., Ergänzb. 36, 91 (1925).

Präparate dieser Darstellung zeigten einen etwas wechselnden Schwefelgehalt, der meistens zwischen 8,5 und 11,5 % lag. Durch eine Nachsulfurierung wurden Präparate mit den tieferen Schwefelwerten vollständig verestert. Schliesslich reinigten wir die Verbindung durch Überführung in das Bariumsalz. Die unvollständig durch Schwefelsäure veresterten Chondroitinschwefelsäurefraktionen liefern in Wasser leicht lösliche Bariumsalze, während das Bariumsalz der vollständig veresterten Verbindung in kaltem Wasser schwer löslich ist und sich durch Umlösen aus heissem Wasser reinigen lässt¹⁾.

Analyse des schwer löslichen Bariumsalzes: S-Gehalt 10,8%. Durch Umsetzung des Bariumsalzes mit Natriumsulfat erhält man das in Wasser leicht lösliche Natriumsalz, welches 13,7% Schwefel besitzt. Für einen „Trischwefelsäure-ester“



berechnet sich der Schwefelgehalt zu 13,6%.

Schwefelsäure-ester des Lävoglucosans.

Die Veresterung des Lävoglucosans mit Chlorsulfonsäure erfolgte in üblicher Weise bei 45°. Das mit Alkohol umgefällte Natriumsalz war frei von Sulfationen und besass einen Schwefelgehalt von 17,6%. (Berechnet für Trischwefelsäure-ester-natrium: S-Gehalt 20,5%.)

Schwefelsäure-ester von Cellulose-glykolsäureäther.

Durch Umsatz von Cellulose mit Chloressigsäure in starker Natronlauge erhält man nach *J. K. Chowdhury*²⁾ Cellulose-glykolsäureäther. Wir haben zu unseren Versuchen Präparate gewählt, die auf 6 C-Atome in der Cellulosemolekel ungefähr eine verätherte Hydroxylgruppe enthalten, also ungefähr der Formel



entsprechen. Sie wurden nach den Angaben von *Chowdhury* erhalten, wobei wir teils von Watte, teils von umgefällter Cellulose ausgingen.

Zur Veresterung wurden 3 g des Präparates in 30 cm³ Pyridin mit 7 cm³ Chlorsulfonsäure während 5 Stunden bei 85° gerührt. Bei der Zersetzung mit Eis bildete sich eine in Wasser lösliche und eine wenig lösliche Fraktion. Aus der wässerigen Lösung wurde der Schwefelsäure-ester durch Alkoholzusatz gefällt, hierauf erneut in Wasser gelöst, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert, das Natriumsalz durch Alkohol abgeschieden, durch Dialyse gereinigt und schliesslich aus der konzentrierten wässerigen Lösung durch Alkoholzusatz zurückgewonnen.

Der Schwefelgehalt dieses Präparates betrug 11,0%. In einem Fall gelang es, durch eine zweite Veresterung mit Chlorsulfonsäure in Pyridin bei 85° den Schwefelgehalt auf 14,5° zu erhöhen. Das Maximum des erreichbaren Sulfonsäuregruppen-Gehaltes hängt davon

¹⁾ Vgl. hierzu die ähnlichen Beobachtungen von *E. Jorpes* und *S. Bergström*, *J. Biol. Chem.* **118**, 455 (1937).

²⁾ *Bioch. Z.* **148**, 76 (1924).

ab, wie hoch der Prozentsatz der in die Cellulose eingeführten Glykolsäurereste ist.

Auch die in Wasser wenig lösliche, oben erwähnte Fraktion des Reaktionsproduktes besteht aus Schwefelsäure-estern des Celluloseglykoläthers. Sie löst sich in überschüssiger Natronlauge; aus dieser Lösung fällt Alkohol das Natriumsalz des Esters aus, das nunmehr in Wasser löslich ist. Schwefelgehalt 5,6%. Durch Wiederholung der Veresterung können auch aus diesem Präparat Natriumsalze von Schwefelestern mit 14% Schwefel erhalten werden.

Für einen Ester der Formel $[C_6H_7O_2 \cdot (OCH_2COOH) (OSO_3Na)_2]_x$ berechnet sich der Schwefelgehalt zu 14,3%.

Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther.

5 g umgefällte, trockene, gepulverte Cellulose werden mit 40 cm³ 40-proz. wässriger Natronlauge 2 Stunden stehen gelassen. Hierauf rührt man 50 g β -bromäthansulfonsaures Natrium ein und erhitzt 3 Stunden auf dem Wasserbad. Dabei färbt sich die Lösung dunkel. Nach 24 Stunden fällt man das Reaktionsprodukt durch Alkoholzusatz aus, zentrifugiert es ab, löst es in wenig Wasser auf und fällt aus dieser Lösung nach dem Abzentrifugieren geringer unlöslicher Anteile das Natriumsalz des Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äthers durch Alkoholzusatz wieder aus. Dieselbe Reinigung durch Umfällung wurde wiederholt. Durch eintägige Dialyse der wässrigen Lösung des Präparates und nachheriges Ausfällen durch Alkohol konnte die bräunliche Farbe des Produktes wesentlich aufgehellt werden. Die Verbindung wurde durch Auskochen mit Alkohol und Äther von Wasser befreit. Ausbeute 2,3 g. Schwefelgehalt 7,6%.

Eine nochmalige Behandlung des Produktes mit bromäthansulfonsaurem Natrium erhöhte den Schwefelgehalt nur auf 8,8%.

Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther-polyschwefelsäure-ester.

In eine stark gekühlte Mischung von 60 cm³ trockenem Pyridin und 14 cm³ Chlorsulfonsäure werden 6 g Cellulose- β -oxyäthansulfonsäure-äther (Herstellung vorstehend) unter Rühren eingetragen. Hierauf erhitzt man unter ständigem Rühren die Reaktionsmasse während 5 Stunden auf 85°, lässt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und giesst auf Eis. Hierbei löst sich der grösste Teil des Cellulosederivates auf. Nach dem Abfiltrieren geringer Mengen eines unlöslichen Niederschlages setzt man zum wässrigen Filtrat Alkohol, wodurch der Cellulose-oxyäthansulfonsäureäther-polyschwefelsäure-ester ausgefällt wird. Man nutsch ab, löst den Niederschlag in wenig Wasser, neutralisiert durch Zusatz von Natronlauge und fällt das Natriumsalz durch Alkoholzusatz aus der wässrigen Lösung aus. Das abgenutschte Natriumsalz wird hierauf zwecks Entwässerung 12 Stunden

unter Alkohol liegen gelassen, dann in Äther eingelegt und schliesslich getrocknet.

Das Präparat enthielt nur organisch gebundenen Schwefel. Dessen Gehalt betrug in der getrockneten Verbindung 17,2%.

Chondroitinschwefelsäure- β -oxyäthansulfonsäure-äther.

Zur Verätherung der Chondroitinschwefelsäure wurden 5 g der Verbindung 2 Stunden in 40 cm³ 40-proz. Natronlauge eingelegt, wobei Lösung eintrat und hierauf mit 50 g bromäthansulfonsäurem Natrium 2 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung färbte sich dabei dunkel. Die Aufarbeitung der Reaktionsmasse erfolgte in gleicher Art wie bei der Verätherung der Cellulose mit Bromäthansulfonsäure.

Die Ausbeute betrug 2,8 g. Schwefelgehalt 11,0%.

Enzymatischer Abbau des Stärke-phosphorsäure-esters.

Als Enzympräparat verwendeten wir eine aus Malz dargestellte Diastaselösung¹⁾. Die Pufferung erfolgte durch Acetatpuffer ($p_H = 5,5^2$). Der hydrolytische Abbau des Stärke-phosphorsäure-esters wurde durch Bestimmung des Reduktionsvermögens mit *Fehling'scher* Lösung nach *Bertrand*³⁾ verfolgt. Die durch fermentativen Abbau freigesetzte Phosphorsäure haben wir kolorimetrisch mit Molybdän-säure-hydrochinon-Lösung nach *Bell* und *Doisy*⁴⁾ bestimmt.

Vergleichende Versuche zeigten, dass die Hydrolyse der Stärke schneller als diejenige des Stärke-phosphorsäure-esters verläuft.

Beispiel: Je 0,3 g Substanz in 25 cm³ Wasser und 10 cm³ Acetatpuffer gelöst, mit 1 cm³ verdünnter Diastaselösung versetzt und bei 37° gehalten, ergaben Reduktionswerte, die, in Maltosereduktionsvermögen ausgedrückt, folgenden Mengen Maltose entsprachen:

Zeit in Std.	mg gebildete Maltose		mg gebildete Maltose aus Stärke. Gemessene Reduktionsvermögen reduziert (vgl. unten)
	aus Stärke	aus Stärkephosphorsäure mit 9,4% P-Gehalt	
0	33,0	17,2	17,2
½	92,6	52,2	54,2
1	150,5	57,3	90,2
2	176,9	71,3	106,5
4	187,1	75,3	112,9
8	201,9	83,2	122,1
24	248,7	99,0	151,1

¹⁾ Darstellung vgl. *H. v. Euler*, Z. physiol. Ch. **112**, 193 (1921); *Th. Posternack*, Helv. **18**, 1351 (1935).

²⁾ Darstellung vgl. *L. Michaelis*, *Abderhalden's Biochem. Arbeitsmeth.* III, 1337 (1910).

³⁾ Bl. [3] **35**, 1285 (1906).

⁴⁾ J. Biol. Chem. **44**, 55 (1920).

Bei Vergleichung der Abbaugeschwindigkeit der Stärke und des Stärke-phosphorsäure-esters ist zu berücksichtigen, dass letzterer zu 38 % aus Phosphorsäureresten besteht; diese sind bei der Vergleichung der Reduktionsvermögen in Abzug zu bringen. Dies ist in der letzten Kolonne vorstehender Tabelle dadurch erreicht worden, dass man die gemessenen Werte des Stärkereduktionsvermögens prozentual reduzierte und die reduzierten Werte ausserdem auf die gleiche Anfangsreduktion brachte.

Bei Berücksichtigung dieser Umstände zeigt sich, dass der Abbau des Stärke-phosphorsäure-esters durch Diastase im Anfang wenig hinter der Schnelligkeit des Abbaus der Stärke zurücksteht¹⁾. Mit fortschreitender Hydrolyse fällt er stärker zurück.

Parallel der enzymatischen Hydrolyse des Stärke-phosphorsäure-esters wird durch das Diastasepräparat auch die Hauptmenge der Phosphorsäuregruppen hydrolytisch eliminiert. So waren aus 20 mg Substanz durch 2 cm³ Fermentlösung nach 18 Stunden 89 % des Gesamtposphors als Phosphat abgespalten worden.

Säurehydrolyse des Stärke-phosphorsäure-esters.

Nach 2-stündigem Kochen des Stärke-phosphorsäure-esters mit 10-proz. Salzsäure betrug das Reduktionsvermögen 81,3 % desjenigen, welches einem 100-proz. Abbau des Esters zu Glucose entsprechen hätte. Zugleich waren 89 % der total gebundenen Phosphorsäure als anorganisches Phosphat abgespalten worden.

Enzymatischer Abbau des Stärke-schwefelsäure-esters durch Malzdiastase.

Ansatz: 0,3 g Stärke-schwefelsäure-ester (Schwefelgehalt 12,96%) in 25 cm³ Wasser und 5 cm³ Pufferlösung gelöst und mit 1 cm³ verdünnter Diastaselösung vermengt. Temperatur 37°. Die Reduktionswerte sind in Maltose-Reduktionsvermögen ausgedrückt.

Zeit in Std.	mg gebildete Maltose	
	aus Stärke	aus Stärke-schwefelsäure-ester
0	20,7	7,5
½	86,7	12,8
1	153,7	21,7
2	161,0	21,7
4	175,5	25,6
24	205,0	47,3
48	250,3	73,0

¹⁾ Voraussetzung für diese Schlussfolgerung ist allerdings die unbewiesene Annahme, dass die Hydrolysenprodukte der Stärke und die phosphorsäurehaltigen Abbauprodukte der phosphorylierten Stärke ungefähr gleiches Reduktionsvermögen haben.

Auch Stärke-schwefelsäure-ester wird somit durch Diastase-lösung verzuckert, aber mit einer gegenüber Stärke verminderten Schnelligkeit.

Zweistündiges Kochen des Schwefelsäure-esters mit n. Salzsäure ergab eine Zuckerlösung, deren Reduktionsvermögen 84 % gebildeter Glucose entsprach. Gleichzeitig wurden dabei 94,8 % der vorhandenen Schwefelsäurereste abgespalten (Fällung mit Bariumchlorid in salzsaurer, warmer Lösung, da das Bariumsalz des Stärke-schwefelsäure-esters in kaltem Wasser nur mässig löslich ist).

Vergleichender Abbau von Stärke und Trihexosan-phosphorsäure durch Malzdiastase.

Ansätze: je 0,3 g Substanz in 25 cm³ Wasser und 10 cm³ Pufferlösung, 1 cm³ Diastaselösung. Temperatur 37°. Reduktionsvermögen ausgedrückt als Glucosereduktionsvermögen.

Zeit in Std.	mg gebildete Glucose	
	aus Stärke	aus Trihexosan-phosphorsäure-ester
1	50,2	3,8
2	81,7	7,6
4	84,6	—
24	94,3	9,8

Die Hydrolyse des Trihexosan-phosphorsäure-esters durch Malzdiastase ist somit sehr gering.

Vergleichende Abbauversuche von Stärke, Stärke-schwefelsäure-ester und Cellulose-schwefelsäure-ester durch Schneckenenzym.

Das „Schneckenenzym“ bestand aus dem unverdünnten Hepatpankreas-saft der Weinbergschnecke.

Ansätze: je 0,3 g Substanz in 20 cm³ Wasser und 10 cm³ Acetatpuffer (p_H = 5,5) gelöst, mit 0,25 cm³ Enzymflüssigkeit versetzt. Temperatur 37°. — Das Reduktionsvermögen der fermentierten Lösungen ist in Glucose-Reduktionsvermögen ausgedrückt:

Zeit in Std.	mg gebildete Glucose		
	aus Stärke	aus Stärke-schwefelsäure-ester	aus Cellulose-schwefelsäure-ester
2	66,7	12,4	0
6	126,9	17,7	0
24	244,5	32,4	4,3

Der Abbau des Stärke-schwefelsäure-esters gegenüber demjenigen der Stärke erscheint stark herabgesetzt; derjenige des Cellu-

lose-schwefelsäure-esters ist unter den gewählten Bedingungen unbedeutend.

Die Prüfung auf hydrolytische Freisetzung von Schwefelsäure aus dem Stärke-schwefelsäure-ester und Cellulose-schwefelsäure-ester durch Schneckenenzym geschah unter folgenden Bedingungen:

Je 0,1 g Substanz in 5 cm³ Wasser und 1 cm³ Puffer gelöst, 3 cm³ Fermentflüssigkeit zugesetzt, 5 Tage bei 37° aufbewahrt (Toluolzusatz). Hierauf Dialyse während 72 Stunden unter Erneuerung des Dialysat-Wassers nach je 24 Stunden. Nach dem Eindampfen der vereinigten Dialysat-Flüssigkeiten Bestimmung der abgespaltenen Schwefelsäure als Bariumsulfat.

Unter diesen Bedingungen wurden weder aus Stärke-schwefelsäure-ester noch aus Cellulose-schwefelsäure-ester merkliche Mengen Schwefelsäure in Freiheit gesetzt.

Vergleichende Abbauversuche von Cellulose-schwefelsäure-ester, Chondroitinschwefelsäure und sulfurierter Chondroitinschwefelsäure durch Schneckenenzym.

Der hydrolytische Abbau der genannten drei Verbindungen durch das Schneckenferment ist ausserordentlich gering; am meisten reduzierende Gruppen werden noch aus Chondroitinschwefelsäure in Freiheit gesetzt.

Die Ansätze enthielten je 0,1 g Substanz in 5 cm³ Wasser und 1 cm³ Acetatpuffer, ferner 3 cm³ Schneckenenzym (Toluol). Das Reduktionsvermögen der Lösungen, als Mass des hydrolytischen Abbaus, ist in Glucose-Reduktionsvermögen ausgedrückt:

Zeit in Stunden	mg Glucose aus		
	Cellulose-schwefelsäure-ester	Chondroitinschwefelsäure	Sulfurierter Chondroitinschwefelsäure
70	—	14,0	—
90	6,5	—	2,2
147	—	15,1	—
167	7,7	—	3,1

Abbauversuche mit Serum und Erythrocytenflüssigkeit von Ochsenblut.

Der Schwefelsäure-ester der Cellulose wurde auf Abbaufähigkeit durch Serum und Erythrocytenflüssigkeit aus Ochsenblut geprüft. Schwefelsäuregruppen wurden weder durch die eine noch durch die andere Fermentlösung abgespalten. Das Serum bewirkte sehr geringen hydrolytischen Abbau, nachweisbar durch das schwache Reduktionsvermögen; mit der Erythrocytenflüssigkeit konnte auch keine Hydrolyse des Cellulose-schwefelsäure-esters nachgewiesen werden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.