

Zusammenfassung.

Mit Violursäure lassen sich papierchromatographisch getrennte Ionen sichtbar machen, wobei die verschiedenen Farben der Violurate die Durchführung qualitativer Analysen ermöglichen. Versuche ergaben, dass durch planimetrische Auswertung solcher Flecken im Chromatogramm auch quantitative Bestimmungen von Alkali- und Erdalkali-Ionen durchgeführt werden können. An Beispielen wird die Verwendbarkeit der Methode gezeigt.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

17. Polyvinylalkohol-polyschwefelsäureester als Modellsubstanzen für synthetische Heparine

von F. Patat und K. Vogler.

(30. XI. 51.)

1. Problemstellung.

Seit der Beschreibung des ersten synthetischen gerinnungshemmenden Stoffes auf makromolekularer Grundlage, der Polyanehtolsulfosäure durch V. Demole & M. Reinert¹⁾, hat die Bearbeitung synthetischer Anticoagulantien eine starke Ausbreitung erfahren. Insbesondere hat es nach Bekanntwerden der chemischen Natur des Heparins, als der einer Mucoitin-polyschwefelsäure²⁾, nicht an Versuchen gefehlt, heparinähnliche Stoffe zu synthetisieren. In zahlreichen Arbeiten³⁾ wurde über die Synthesen einer grossen Zahl von sulfurierten Polysacchariden und ihrer Eigenschaften berichtet. Alle Anstrengungen wurden dabei auf die Erforschung eines Zusammenhanges zwischen Konstitution und biologischen Eigenschaften verwendet.

Der Erfolg dieser Versuche zur Auffindung eines brauchbaren Produktes war im allgemeinen gering, da viele Präparate, auch wenn ihre gerinnungshemmenden Eigenschaften befriedigten, viel zu toxisch waren. Die Konzeption dieser Arbeiten kam in typischer Weise von der niedermolekularen Chemie her, und man gab sich vorderhand keine Rechen-

¹⁾ Arch. Exp. Path. u. Pharm. **158**, 211 (1930).

²⁾ E. Jorpes, Naturwiss. **23**, 196 (1935).

³⁾ Vgl. z. B.: S. Bergström, Z. physiol. Ch. **238**, 163 (1936); E. Chargaff, F. W. Bancroft & M. Stanley-Brown, J. Biol. Chem. **115**, 155 (1936); P. Karrer, H. Koenig & E. Usteri, Helv. **26**, 1296 (1943); P. Karrer & B. Camerino, *ibid.* **27**, 1422 (1944); T. Astrup & J. Galsmar, Acta physiol. Scand. **8**, 215, 361 (1944); J. Piper, Acta Pharm. et Toxicol. **2**, 138, 317 (1946); K. Maurer & E. Vincke, B. **80**, 179 (1947). — Siehe auch eine Zusammenfassung von K. N. v. Kaulla, Monographien der Medizinischen Klinik, Klinische Fortschritte auf dem Gebiete der Blutgerinnung, S. 41 ff., Urban & Schwarzenberg, Berlin 1949.

schaft darüber, ob und inwieweit neben der Konstitution die Molekelgrösse die biologischen Eigenschaften beeinflussen könnte.

Erst ab 1944 erschienen Arbeiten aus dem *Staudinger'schen* Laboratorium¹⁾, die im Gegensatz zu früher erstmals die Problemstellung auch von der Seite der Molekelgrösse aufgriffen. Es wird darin über die Synthese von Schwefelsäureestern polymerhomologer Reihen von Cellulosen, Polyvinylalkoholen und Glykogenen und über ihre Toxizität und Wirkung in Abhängigkeit von Molekelgrösse und Gestalt berichtet. Es zeigte sich, dass die unverzweigten Fadenmolekeln der Derivate von Cellulosen und Polyvinylalkoholen sehr wirksam sind, während die verzweigten Stärken und kugelförmigen Glykogene Stoffe geben, die die Blutgerinnung weniger oder nicht beeinflussen. Bei den unverzweigten Produkten nimmt die Wirksamkeit mit steigendem Molekulargewicht in geringem Masse ab, die Toxizität zu. Grösste Wirkung und geringste Toxizität fanden sich bei Polymerisationsgraden zwischen 20 und 80.

Demgegenüber steht eine Äusserung von *Ingelman*²⁾, nach welcher die Molekelgrösse nicht für die Toxizität entscheidend ist. Er hat Dextrane mit unterschiedlichem Molekulargewicht sulfuriert, und alle Produkte erwiesen sich gleich toxisch.

*K. Walton*³⁾ berichtet neuerdings über die gute Verträglichkeit eines niedermolekularen Dextran-polyschwefelsäureesters und meint, dass *Ingelman* seinen Molekulargewichts-Bereich zu wenig nach unten ausgedehnt habe.

Bei der Komplexheit der Aufgabenstellung ist diese Verschiedenheit der Ergebnisse nicht überraschend, und sie wird sich wiederholen, sofern nicht für ein hinsichtlich Grösse und Form einheitliches chemisches Versuchsmaterial, das bei der *in vivo*-Prüfung seine Einheitlichkeit behält, gesorgt wird und die pharmakologische bzw. haematologische Prüfung auf möglichst durchsichtige Teste beschränkt bleibt.

Die folgenden Versuche wurden unter Berücksichtigung dieser Forderungen als Modellversuche ausgeführt. Sie sollten zeigen, wie weit allgemeine Eigenschaften Hochpolymerer für die Wirkung des keineswegs einheitlichen „Heparins“⁴⁾ verantwortlich zu machen sind, und sollten darüber hinaus Anhaltspunkte für die Herstellung halbsynthetischer „Heparinoide“ liefern.

2. Herstellung der Polyvinylalkohol-polyschwefelsäureester.

Als Ausgangsprodukt für unsere Versuche wählten wir den in verschiedenen Polymerisationsgraden leicht zugänglichen Polyvinylalkohol (PVA). Von diesem war zu erwarten, dass er im Organismus auch in sulfierter Form fermentativ nicht abgebaut werde und daher die biologischen Befunde nach der Seite der Molekelgrösse kaum verfälschen würde. Zudem ist er relativ leicht fraktionierbar, und über seine Molekulargewichtsbestimmung liegen hinreichende Unterlagen vor⁵⁾ 6).

¹⁾ *K. N. v. Kaulla & E. Husemann*, *Forschung und Fortschritte* **20**, 177 (1944); *E. Husemann, K. N. v. Kaulla & R. Kapesser*, *Z. f. Naturforsch.* **1**, 584 (1946).

²⁾ *Ingelman et al.*, *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi* **24/5** (1946); *Grönwall, Ingelman & Mosimann*, *Läkare fören. förhandl.* **51**, 397 (1945).

³⁾ *K. Walton*, *Lancet* **1951**, 456.

⁴⁾ *R. Marbet & A. Winterstein*, *Helv.* **34**, 2311 (1951).

⁵⁾ *P. J. Flory & F. S. Leutner*, *J. polymer Sci.* **3**, 880 (1948).

⁶⁾ *K. Vogler, K. Dialer & F. Patai*, erscheint demnächst in *Helv.*

Die Aufspaltung des technischen PVA in relativ gut definierte Fraktionen gelingt durch fraktionierte Fällung von wässrigen Lösungen desselben nach dem Schema eines Stammbaumes¹⁾.

Die Einheitlichkeit solcher Fraktionen wurde an einem Beispiel durch Feinfraktionierung nachgeprüft, und es wurde gefunden, dass ein Produkt mit einem Durchschnittsmolekulargewicht (\bar{M}) von 29000 im wesentlichen nur Anteile von ca. 15000—40000 enthält.

Zur Sulfurierung von PVA eignet sich am besten die Methode von *E. Gebauer-Fülnegg*²⁾. Sie besteht in der Einwirkung von Chlorsulfonsäure auf die hochpolymere Verbindung in Gegenwart organischer Basen, z. B. Pyridin. Die Base hat dabei neben der Funktion als Lösungsvermittler auch noch die Aufgabe, die bei der Reaktion auftretende Salzsäure zu binden. Nach unseren Versuchen kann angenommen werden, dass die Sulfurierung von PVA weitgehend polymeranalog verläuft, dass mit anderen Worten der dabei auftretende Abbau, wenn er überhaupt eintritt, vernachlässigbar gering sein muss. Die Viskositätszahlen einer polymerhomologen Reihe unserer sulfurierten Produkte liegen nämlich gegenüber dem Durchschnittspolymerisationsgrad (\bar{P}) in einem Koordinatennetz mit doppeltlogarithmischer Einteilung auf einer Geraden, wenn die Durchschnittspolymerisationsgrade der viskosimetrisch bestimmten PVA-Fraktionen auf die sulfurierten Produkte übertragen werden (vgl. Fig. 1).

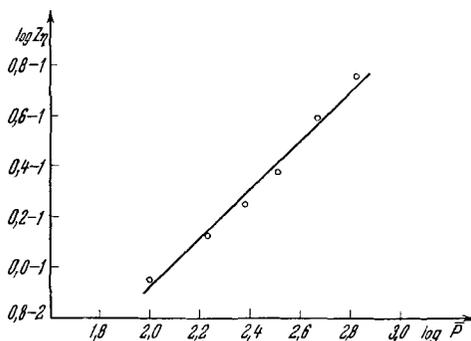


Fig. 1.

3. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Polyvinylalkohol-polyschwefelsäureester.

Die erhaltenen Polyvinylalkohol-polyschwefelsäureester (PVAS) wurden in Form ihrer Natriumsalze chemisch und biologisch untersucht. Diese Natriumsalze können als farblose Pulver erhalten werden und gleichen in vielen Eigenschaften den Heparinen. Mit Toluidin-

¹⁾ K. Vogler, K. Dialer & F. Fatat, erscheint demnächst in *Helv.*

²⁾ B. 61, 2000 (1928), vgl. auch *E. Chargaff et al.*, loc. cit.

blau werden beispielsweise ihre Lösungen violett gefärbt; sie sind durch Barium unter Zusatz von Eisessig fällbar usw.

Die auffälligste Eigenschaft neben ihrer gerinnungshemmenden Wirkung besteht im viskosimetrischen Verhalten ihrer verdünnten wässrigen Lösungen. Die Natriumsalze von PVAS sind ihrer Natur nach lineare Polyelektrolyte, d. h. Fadenmolekeln mit vielen Ladungen längs der Fadenachse. Solche Stoffe zeigen nach *Heidelberger & F. N. Kendall*¹⁾ in Wasser abnormes viskosimetrisches Verhalten, d. h. ihre η_{spez}/c -Werte nehmen mit steigender Verdünnung zu (Fig. 2).

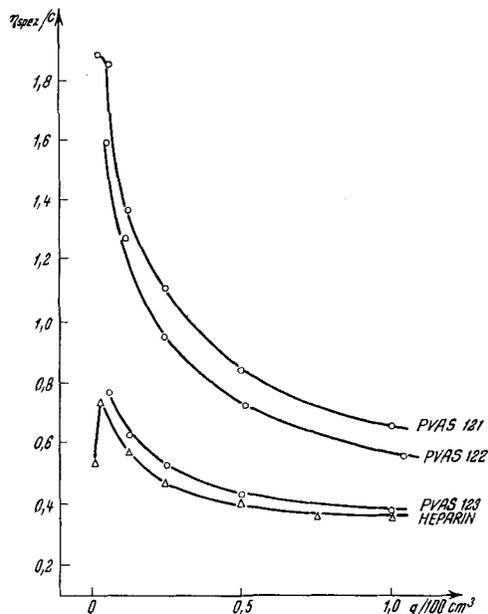


Fig. 2.

Der Viskositätsanstieg ist exponentiell²⁾. Zusatz von Elektrolytlösung, z. B. NaCl, hebt den Effekt vollständig auf, und die Fäden benehmen sich, wie wenn sie ungeladen wären. Die Viskositätsbestimmungen von PVAS wurden daher alle in 0,5-n. NaCl ausgeführt (Fig. 3).

Um über die Beständigkeit und die Art der Verseifung dieser Polyvinylalkohol-polyschwefelsäureester Näheres kennen zu lernen, wurde bei 92° in 0,1-n. H₂SO₄ und in Wasser verseift. Die Zunahme der abgespaltenen Schwefelsäure konnte durch Titration mit NaOH

¹⁾ J. Biol. Chem. **95**, 127 (1932), vgl. auch *R. M. Fuoss et al.*, J. Polymer. Sci. **3**, 246 (1948).

²⁾ Über die Erklärung dieses Viskositätsverhaltens siehe *W. Kuhn, O. Künzle & A. Katchalsky*, Helv. **31**, 1994 (1948).

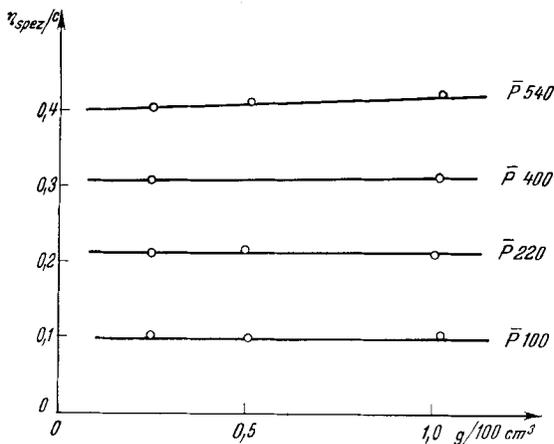


Fig. 3.

erfasst werden. Wie aus Fig. 4 entnommen werden kann, erfolgt die Verseifung nach 2. Ordnung. Die Halbwertszeit der Desulfurierung in Wasser beträgt bei 92° ca. 14 Std. Aus der Neigung der Kurven entnimmt man, dass die Verseifung in 0,1-n. Säure ca. 4mal so rasch abläuft wie diejenige in Wasser.

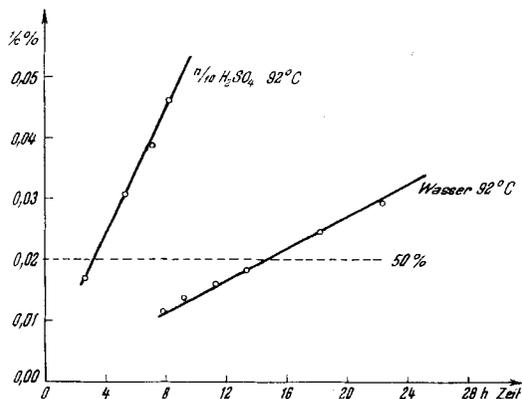


Fig. 4.

4. Zusammenhänge zwischen biologischen Eigenschaften und physikalischen Konstanten von Polyvinylalkoholpolyschwefelsäureestern.

Vorerst wurde der Einfluss des Schwefelgehaltes auf Toxizität und gerinnungshemmende Aktivität bei gleichem Durchschnittspolymerisationsgrad untersucht. Als gerinnungshemmende Aktivität wurde die Antithrombinwirkung in vitro in internationalen Einheiten herangezogen. Das Ergebnis findet sich in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Präparat	\bar{P}	S-Gehalt %	Aktivität in vitro	Toxizität DL ₅₀ ¹⁾ i. v. Maus
5971/16	500	4,9	5 i. E./mg	> 1000 mg/kg
/15	500	10,9	42 i. E./mg	353 mg/kg
/14	500	17,2	66 i. E./mg	128 mg/kg

Wie ersichtlich, ist der S-Gehalt für die gerinnungshemmende Aktivität massgebend, was in der Literatur bereits für Heparin verschiedenen Schwefelgehaltes bekannt war²⁾. Sehr deutlich hängt die Toxizität mit der biologischen Wirksamkeit zusammen, d. h. je aktiver ein Präparat ist, um so toxischer ist es.

In Tab. 2 wird der Zusammenhang von gerinnungshemmender Aktivität und Toxizität bei ungefähr gleichem Sulfurierungsgrad, aber steigendem Durchschnittspolymerisationsgrad dargestellt.

Tabelle 2.

Präparat	\bar{P}	S-Gehalt %	Aktivität in vitro	Toxizität DL ₅₀ i. v. Maus
5971/11	72	19,0	35 i. E./mg	483 mg/kg
144	234	18,8	68 i. E./mg	—
5971/12	315	19,0	77 i. E./mg	200 mg/kg
147	446	19,2	80 i. E./mg	—
5971/13	575	19,0	98 i. E./mg	156 mg/kg
147 B	708	18,5	95 i. E./mg	—
147 C	1120	18,2	95 i. E./mg	—

In Tab. 2 nimmt die gerinnungshemmende Aktivität bis zu einem Polymerisationsgrad von ca. 600 bei gleichbleibendem Schwefelgehalt zu, um nachher konstant zu bleiben. Die Toxizität hängt wiederum empfindlich von der gerinnungshemmenden Aktivität ab und steigt mit steigendem Polymerisationsgrad. In dieser Reihe ist der Sulfurierungsgrad ziemlich hoch, mehr als jede zweite OH-Gruppe der Kette ist mit Schwefelsäure verestert.

Ein ungefähr gleiches Bild ergibt sich aus folgender Zusammenstellung, wobei der Sulfurierungsgrad, ungefähr wie im Heparin, im Mittel 13,5% beträgt (Tab. 3).

Auch nach Tab. 3 beobachtet man eine signifikante Zunahme der gerinnungshemmenden Aktivität mit dem Polymerisationsgrad. Die Toxizität nimmt mit fallendem \bar{P} und fallender Aktivität ab, die Ver-

¹⁾ Über Einzelheiten der Prüfungsmethode siehe eine spätere Arbeit von A. Studer, F. Patat & K. Vogler.

²⁾ E. Jorpes, Heparin in the Treatment of Thrombosis, S. 33, Oxford University Press, London 1946.

träglichkeit entsprechend zu. Präparat 5971/24 und /25 haben den gleichen Polymerisationsgrad, aber verschiedenen Schwefelgehalt, was durch einen Aktivitätsunterschied zum Ausdruck kommt.

Tabelle 3.

Präparat	Z η in 0,5-n. NaCl	\bar{P}	S-Gehalt %	Aktivität in vitro	Toxizität mg/kg i. v. Maus	\bar{M} ber. aus S- Gehalt u. \bar{P}
5971/21	0,570	670	13,9	68 i. E./mg	146	54000
/20	0,395	450	14,1	52 i. E./mg	315	36000
/22	0,240	325	13,3	40 i. E./mg	—	25000
/23	0,180	236	13,4	42 i. E./mg	394	18500
/26	0,135	166	12,6	35 i. E./mg	450	12500
/24	0,085	100	17,2	36 i. E./mg	520	9800
/25	0,090	100	13,5	15 i. E./mg	—	7800

Aus diesen 3 Tab. ist ersichtlich, dass die Toxizität und die gerinnungshemmende Aktivität von PVAS mit steigendem Schwefelgehalt und steigendem Polymerisationsgrad zunimmt. Es ist demzufolge möglich, ein gleich toxisches und gleich wirksames Produkt durch kleineren Polymerisationsgrad und grösseren Schwefelgehalt sowie kleineren Schwefelgehalt und grösseren Polymerisationsgrad zu erhalten. Ein interessantes Bild ergibt sich beispielsweise, wenn man die Produkte, deren Toxizitätswerte mindestens 400 mg/kg und deren Aktivität mindestens 30 i. E. betragen in einem Koordinatensystem einerseits mit \bar{P} als Ordinate, andererseits mit S-Gehalt als Abszisse aufträgt. Solche Produkte liegen in einem Band bestimmter Steigung. Die ausserhalb dieses Bandes liegenden Präparate sind entweder zu toxisch oder zu wenig wirksam (Fig. 5).

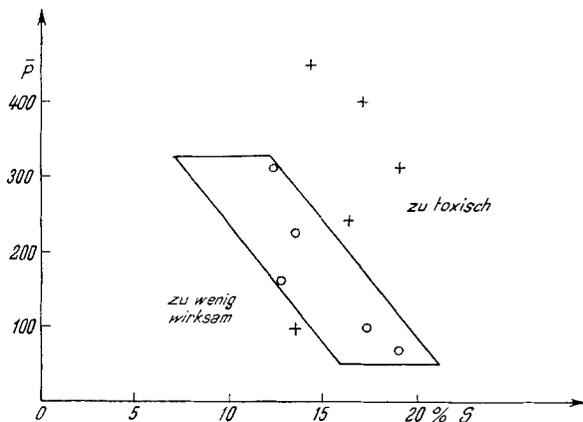


Fig. 5.

Die eben beschriebenen Ergebnisse bezüglich gerinnungshemmender Wirkung und Durchschnittspolymerisationsgrad stehen im Gegensatz zu den Befunden von *E. Husemann et al.*¹⁾, welche zum Schluss kommen, dass in einer polymerhomologen Reihe die Wirksamkeit mit steigendem Molekulargewicht abnehme. Die gerinnungshemmende Wirksamkeit wurde in der zitierten Arbeit durch Messung der Spontangerinnung an Vollblut bestimmt. Dabei wird der Antithrombincharakter einer Substanz global miterfasst, nicht aber aus dem komplexen Gerinnungsphänomen so weit als möglich herausgeschält. Vollblut wird nun ganz allgemein auch durch Zusatz von indifferenten Hochpolymeren mit steigendem Molekulargewicht in steigendem Masse zur Koagulation gebracht. Polymere werden mit steigendem Molekulargewicht bevorzugt in Körperdepots resorbiert. Beide Effekte wirken in der gleichen Richtung und können dadurch die Spontangerinnungszeit entsprechend drücken.

Unsere Versuche sind nach dem Gesagten jedenfalls nicht streng mit denen von *Husemann* und Mitarb. vergleichbar, und unser einfaches Ergebnis, dass die gerinnungshemmende Aktivität (als Antithrombinaktivität bestimmt) von PVAS bei gegebenem Schwefelgehalt mit steigendem Durchschnittspolymerisationsgrad zunimmt, um schliesslich (bei \bar{P} ca. 600) konstant zu werden, besitzt die grössere Wahrscheinlichkeit eines einfacheren Kausalzusammenhanges.

Aus der Literatur ist ferner bekannt, dass synthetische makromolekulare Antikoagulantien die Blutsenkung beschleunigen²⁾. In einem mehr qualitativen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Blutsenkung in einem bestimmten Zeitintervall um so grösser ist, je grösser die angewandte Menge PVAS und je grösser dessen Durchschnittspolymerisationsgrad ist. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Ch. Wunderly*³⁾, welcher die Senkungsgeschwindigkeit zur Abschätzung der Molekelgrösse benützt.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass synthetische Antikoagulantien auf heparinähnlicher Basis Serum und Plasma trüben⁴⁾. Da diese Erscheinung in toxikologischer Hinsicht Bedeutung hat, wurden unsere polymerhomologen PVAS-Präparate auch in dieser Richtung genauer untersucht.

Photometrisch konnten die Verhältnisse quantitativ festgehalten werden, indem die Trübung gegen eine Plasma- oder Serumlösung ohne Antikoagulans gemessen wurde.

Die I_0/I -Werte der Plasmafällung in Abhängigkeit des Polymerisationsgrades und in Abhängigkeit des Schwefelgehaltes sind in

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ *J. Piper*, Acta Physiol. Scand. **9**, 28 (1945).

³⁾ Vierteljahresschrift Naturf. Ges. Zürich **1944**, 70; Exper. **1**, 332 (1945); Nature **156**, 750 (1945).

⁴⁾ *J. Piper*, Acta Pharm. et Toxicol. **2**, 317 (1947).

Tab. 4 festgehalten. Heparin als Vergleichswert zeigt nur eine sehr geringe Trübung.

Sehr deutlich ist auch hier wieder die Abhängigkeit vom Durchschnittspolymerisationsgrad und Schwefelgehalt, d. h. je mehr Schwefel und je grösser der Durchschnittspolymerisationsgrad eines PVAS-Präparates, um so grösser die Trübung. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Polyvinylalkohole mit einem Durchschnittspolymerisationsgrad von 500 ($\bar{M} \sim 23000$) im untersuchten Konzentrationsbereich keine Plasmatrübung verursachten.

Ein vollkommen gleiches Bild bot sich bei der Serumtrübung, wo ebenfalls die gleiche Abhängigkeit von Durchschnittspolymerisationsgrad und Schwefelgehalt festzustellen war. Daraus kann geschlossen werden, dass Fibrinogen nicht die einzig gefällte Komponente darstellt¹⁾.

Tabelle 4.

PVAS (1 mg/cm ³)	2,5cm ³	2,0cm ³	1,5cm ³	1,0cm ³	0,5cm ³	0,25 cm ³	—
NaCl	—	0,5cm ³	1,0cm ³	1,5cm ³	2,0cm ³	2,25 cm ³	2,5cm ³
Plasma	7,5cm ³	7,5cm ³	7,5cm ³	7,5cm ³	7,5cm ³	7,5 cm ³	7,5cm ³
mg/6 Liter (PVAS).	1500	1200	900	600	300	150	—
	log I ₀ /I ³ -Werte für die verschiedenen PVAS						
Heparin \bar{P} 230 ²⁾ 13 % S	0,009	—	0,008	—	0,000	0,000	0,000
PVAS \bar{P} 160, 12,0% S	0,086	0,075	0,075	0,048	0,028	0,013	0,000
PVAS \bar{P} 300, 12,3% S	0,136	0,130	0,130	0,106	0,052	0,015	0,000
PVAS \bar{P} 460, 14,9% S	0,180	0,185	0,170	0,190	0,114	0,072	0,000
PVAS \bar{P} 600, 15,3% S	0,224	0,232	0,227	0,202	0,129	0,048	0,000
PVAS \bar{P} 500, 0 % S	0,005	—	0,000	—	0,000	—	0,000
PVAS \bar{P} 500, 4,9% S	0,021	0,010	0,018	0,005	0,005	—	0,000
PVAS \bar{P} 500, 10,9% S	0,200	0,155	0,127	0,102	0,028	—	0,000
PVAS \bar{P} 500, 17,2% S	0,242	0,258	0,240	0,200	0,044	—	0,000

Experimenteller Teil.

1. Viskositätsmessungen und Molekulargewichtsbestimmungen. Die Viskositätsmessungen wurden mittels *Ostwald*-Viskosimeter mit Durchflusszeiten von ca. 100—200 Sek. durchgeführt. Es wurde im Thermostaten bei 20,0° ± 0,05° gearbeitet. Über die Bestimmung des $Z\eta$ -Wertes der Polyvinylalkoholfractionen und deren Zusammenhang mit dem Polymerisationsgrad bzw. Molekulargewicht orientiert eine nächstfolgende Arbeit. Die Viskositätszahlen wurden für PVA in wässriger Lösung, für PVAS in 0,5-n. NaCl-Lösung bestimmt. Für die Ermittlung des Molekulargewichtes von PVAS wurde der \bar{P} des betreffenden PVA, der zur Sulfurierung verwendet wurde, zugrunde gelegt. Je nach

¹⁾ J. Piper, loc. cit., Seite 323.

²⁾ Der Polymerisationsgrad des Heparins ist auf den monomeren Rest —CHOHCHOH— bezogen, wobei das Molekulargewicht zu 16000 angenommen wurde. Vgl. R. Jensen, O. Snellman & B. Sylven, J. Biol. Chem. **174**, 265 (1948).

³⁾ Die log I₀/I-Werte sind relative Werte und nur untereinander vergleichbar, da sie nicht unabhängig von der Messanordnung sind.

Schwefelgehalt wurde mit einer Zahl zwischen 44 und 146 (vollständig sulfuriertes Produkt, 22% Schwefel) multipliziert, um das Molekulargewicht zu erhalten.

2. Sulfurierungsbeispiel. 5,6 cm³ frisch destillierte Chlorsulfonsäure wurden mit einer Bürette in 35 cm³ gut gekühltes Pyridin eingetragen. Es bildete sich ein halbfestes Salz, welches geschmolzen und in einer Reibschale mit 5 g Polyvinylalkohol eines bestimmten Durchschnittspolymerisationsgrades verrieben wurde. Die Mischung wurde in einen Schliffkolben mit Kühler übergeführt und auf dem Dampfbad 3 Std. erhitzt. Der Polyvinylalkohol ging dabei langsam in Lösung, und es bildete sich ein gelbbrauner homogener Sirup. Dieser wurde mit 25 cm³ Wasser nach dem Abkühlen geröst und diese Lösung in 150 cm³ gerührtes Aceton eingetragen. Die gefällte Masse wurde durch Abd坎antieren isoliert und sogleich in ca. 400 cm³ Wasser aufgenommen. Im Scheidetrichter wurde die Lösung mit 150 cm³ Äther überschichtet und dann mit konzentrierter Natronlauge alkalisch gemacht. Es trat Rotfärbung der Lösung ein. Sie wurde mit Äther ausgeschüttelt, um das meiste Pyridin zu entfernen. Die Lösung des Polyesters wurde nun in einem U-förmigen Pergamentschlauch gegen laufendes Brunnenwasser dialysiert. Nach ca. 24 Std. war die Lösung sulfatfrei. Sie wurde durch ein Faltenfilter gegossen und unter vermindertem Druck auf ca. 30 cm³ eingengt. Diese hochviskose Lösung wurde durch einen Tropftrichter in ca. 500 cm³ Alkohol unter Rühren eingetragen, wobei das Natriumsalz des Esters in faseriger, lockerer Form ausfiel. Nach dem Abpressen des Niederschlages wurde 10 Std. unter 50° im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Ausbeute: 8,6 g, Schwefelgehalt: 15,5%.

Der Schwefelgehalt lässt sich durch Änderung der angewandten Menge Chlorsulfonsäure über einen weiten Bereich variieren.

3. Bestimmung der gerinnungshemmenden Aktivität als Antithrombinaktivität. Die Bestimmung der gerinnungshemmenden Aktivität erfolgte im Prinzip nach der Thrombinmethode von *L. B. Jaques & A. F. Charles*¹⁾.

Die aktivsten Präparate wiesen nach dieser Methode *in vitro* ca. 100 i. E. (Heparin 130 i.E./mg) auf, während die Aktivität *in vivo* schon bei einer Einheitenzahl von ca. 30 i. E. heparingleich war. Die Messresultate können mit einem Fehler von ca. 10% behaftet sein, wobei der Schwankungsbereich mit verschiedenen Plasmen noch grösser sein kann. Vergleichende Messungen polymerhomologer Reihen wurden so weit wie möglich am gleichen Plasma vorgenommen.

4. Verseifung von PVAS. 2 g PVAS mit einem Schwefelgehalt von 16% und \bar{P} von 540 wurden in einem Masskölbchen mit 0,1-n. H₂SO₄ oder mit Wasser auf ein Volumen von 200 cm³ eingestellt. Dann wurde diese 1-proz. Lösung ins Reaktionsgefäss gebracht. Dieses bestand aus einem entfetteten Rundkolben von 200 cm³ Inhalt mit Rückflusskühler und seitlichem Ansatz, durch welchen mittels Gummischlauch (auf den Kühler montiert) die Messproben herausgeblasen wurden. Der Ansatz hatte ebenfalls einen kleinen Gummischlauch, welcher mit einem Quetschhahn unmittelbar nach dem Glasende abgeschlossen wurde. Die Reaktionsmischung wurde auf dem Dampfbad erhitzt. Die im Inneren des Kolbens gemessene Versuchstemperatur betrug 92° ± 2°. Die Messproben wurden mittels Ansatzrohr durch Blasen in ein Kölbchen hineingedrückt und sofort abgekühlt. Die Messproben zu 8 cm³ wurden gegen 0,1-n. Lauge mit Methylrot gegen eine gelbe Vergleichsfarbe titriert. Die Messergebnisse sowohl für 0,1-n.H₂SO₄ als auch für Wasser finden sich in der graphischen Darstellung (Fig. 4). Wie daraus ersichtlich ist, folgen die Verseifungen der Beziehung $1/c = kt + \text{const.}$, d. h. es resultieren Reaktionen 2. Ordnung.

5. Trübungsmessungen. Für die Trübungsmessungen wurden Lösungen von je 7,5 cm³ Rinder-Citrat-Plasma + 2,5 cm³ physiol. NaCl-Lösung hergestellt, welche steigende Mengen PVAS enthielten. Nachdem die Lösungen 10 Min. bei Zimmertemperatur gestanden hatten, wurde im *Hilger*'schen Absorptiometer²⁾ gegen eine entsprechende Plas-

¹⁾ Quart. J. Pharm. **14**, 1 (1941); in der speziell von uns durchgeführten vereinfachten Bestimmung wurde Rinder-Citrat-Plasma verwendet und es wurde bei 37° gearbeitet.

²⁾ *Spekker*, Photoelectric Absorptiometer, *Adam Hilger Ltd.*, London.

malösung ohne Anticoagulans die Extinktion gemessen. Die Schichtdicke betrug 5 mm. Die Messungen wurden so rasch als möglich ausgeführt, um einen Alterungseffekt des Plasmas (Flockung durch zu langes Stehen bei Zimmertemperatur) zu verhindern. Die Messresultate finden sich in Tab. 4.

Die Schwefelanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. Waldmann) ausgeführt.

Summary.

The preparation of fractionated polyvinyl alcohol polysulfuric acid esters (PVAS) is described. Such esters have anticoagulant properties and in view of this are used as model substances of synthetic heparines.

Measurements of viscosities and of some rates of hydrolysis of PVAS are presented.

Fractionated specimens of PVAS of varying degree of polymerization showed a certain relationship between physical constants and biological properties.

The anticoagulant activity and toxicity increase with increasing average degree of polymerization and increasing sulfur content.

An analogous relation is found for the turbidity produced by PVAS in citrated ox plasma.

Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

18. Die Glykoside von *Strophanthus mirabilis Gilg.*

Glykoside und Aglykone, 88. Mitteilung¹⁾

von P. R. O. Bally²⁾, O. Schindler und T. Reichstein.

(I. XII. 51.)

Strophanthus mirabilis Gilg ist eine im trockenen Halbwüstengebiet des nördlichen tropischen Ostafrika heimische Strophanthusart, die nicht schlingt, sondern als Buschform wächst. Sie gehört zu den S.-Arten mit lang ausgebildeten Blütenzipfeln. Im Blütenbau steht sie *S. eminii* nahe, von der sie sich besonders durch die sehr kleinen Blätter unterscheidet. Durch die Bemühungen von Herrn Lt. Col. W. A. Venour erhielt der eine von uns eine kleine Menge reifer Samen, die für eine präparative Analyse nicht ausreichten und daher mit Hilfe der Papierchromatographie untersucht wurden³⁾.

¹⁾ 87. Mitteilung: K. Reyle & T. Reichstein, Helv. **35**, 98 (1952).

²⁾ Botanist, Coryndon Memorial Museum, Nairobi, Kenya Col.

³⁾ Inzwischen ist von Lt. Col. Venour noch eine grössere Menge Samen gesammelt worden, so dass auch eine präparative Untersuchung folgen soll.