

eine Einzelbestimmung herauspipettiert wurden. Von zwei derartigen Proben bestimmte man das genaue Gewicht, um auf die Einwaage umrechnen zu können. Die Lösungen wurden bei den 25°-Versuchen in Schliffkolben im Thermostaten aufbewahrt (Temperaturkonstanz $\pm 0,02^\circ$); bei den bei höheren Temperaturen durchgeführten Messungen befanden sich die Proben in zugeschmolzenen Röhren aus Jenaer Fiolaxglas, die im Thermostaten oder siedenden Wasserbad erhitzt wurden. Nach Herausnehmen bzw. der Entnahme aus dem Schliffkolben wurde stets in Eiswasser abgeschreckt.

Die Bestimmung des im Verlauf der Hydrolyse gebildeten Halogenwasserstoffes erfolgte durch Titration mit 0,1-n. alkohol. Kalilauge gegen Rosolsäure als Indikator. Lediglich beim Triphenyl-chlormethan wurde zur Titration eine 0,1-n. Lösung von

Triäthylamin (Sdp. 89°) in Dioxan verwendet (Dimethylaminoazobenzol als Indikator)².

Die Berechnung der Konstanten erfolgte nach der Formel

$$k_I = \frac{\log a_0 - \log a_t}{0,4343 \cdot t}$$

Als Anfangswert diente im allgemeinen der erste Titrationswert, ausnahmsweise bei sehr langsam verlaufenden Hydrolysen auch der Zeitpunkt des Zusammengelagens von Chlorid und Wasser.

Aus der großen Zahl der Messungen¹¹ sollen hier nur vier Beispiele herausgegriffen werden, die neben der Anlage der Versuche zeigen sollen, daß die angegebenen Werte von befriedigender Konstanz sind.

¹¹ Diplomarbeit H.-J. Hennig, Berlin 1945.

Über blutgerinnungshemmende Substanzen¹

Von E. HUSEMANN, K. N. von KAULLA und R. KAPPESSE

Aus der Forschungsabteilung für makromolekulare Chemie des Chemischen Laboratoriums und der Chirurgischen Klinik der Universität Freiburg/Br.

(Z. Naturforsch. 1, 581—591 [1946]; eingegangen am 5. August 1946)

Es wurden Schwefelsäureester polymerhomologer Reihen von Cellulosen, Polyvinylalkoholen, Stärken und Glykogenen hergestellt und auf ihre dem Heparin ähnliche blutgerinnungshemmende Wirksamkeit sowie ihre Toxizität untersucht, um den Einfluß von Molekülgestalt und Molekülgroße zu studieren. Es ergab sich, daß die unverzweigten Cellulosen und Polyvinylalkohole sehr wirksam sind, während die verzweigten Stärken und kugeligen Glykogene die Blutgerinnung wesentlich weniger, z. Tl. gar nicht hemmen. Bei den unverzweigten Produkten nimmt die Wirksamkeit mit steigendem Molekulargewicht in geringem Maße ab, die Toxizität ganz erheblich zu. Größte Wirksamkeit und geringste Toxizität fanden sich bei Fadenmolekülen mit Polymerisationsgraden zwischen etwa 20 und 80.

Im Xylanschwefelsäureester wurde eine sehr wirksame und nahezu untoxische Substanz gefunden, die bereits klinisch mit Erfolg bei akuter Thrombose verwandt werden konnte.

Man kennt eine Reihe von Substanzen, die den komplexen und noch nicht in allen Einzelheiten geklärten Vorgang der Blutgerinnung hemmen bzw. ganz verhindern. Die Kenntnis derartiger Stoffe und ihrer Wirkung ist von erheblicher Bedeutung, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, postoperativen Thrombosen und Embolien vorzubeugen². Bisher sind nur zwei chemisch und in der Art ihrer Wirkung sehr verschiedenartige Stoffe mit Erfolg in die Therapie eingeführt worden, das Heparin, ein glucosaminhaltiges, mit Schwefel-

säure verestertes Polysaccharid³, das aus Tierlebern gewonnen wird, und das 3,3'-Methylen-dihydroxycumarin.

Mehrfach ist versucht worden, das Heparin, das nur schwierig in größeren Mengen zugänglich ist, durch andere Polysaccharid-Schwefelsäureester zu ersetzen. Bei den ausgedehnten Untersuchungen von Bergström⁴ sowie Karrer und Mitarbeitern⁵ zeigte sich, daß die Schwefelsäureester von Cellulose, Pektin, Chitin und Chondroitin

¹ 320. Mitteilg. über makromolekulare Verbindungen, 319. Mitteilg. vergl. E. Husemann, Zbl. Chem. 22, 132 [1944].

² Vergl. z. B. bei K. N. v. Kaulla, Münch. med. Wschr. 1941, 931; 1943, 399.

³ Jorpes, Heparin, its chemistry, physiology and application in medicine, Oxford 1939.

⁴ Bergström, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 238, 163 [1936].

⁵ P. Karrer, H. König u. Usteri, Helv. chim. Acta 26, 1296 [1943].



tinschweifelsäure im gleichen Sinn wirken, während die entsprechenden Derivate von Stärke und Glykogen die Blutgerinnung wesentlich weniger beeinflussen. Die wirksamen Präparate ebenso wie die Polyanetholsulfosäure⁶ sind jedoch sehr toxisch, so daß eine therapeutische Verwendung nicht in Frage kommt.

Bei allen Untersuchungen wurden weder die Molekulargewichte der Präparate bestimmt, noch berücksichtigt, daß die Polysaccharide nach H. Staudinger und E. Husemann⁷ sich wesentlich in der Gestalt ihrer Moleküle unterscheiden; so besitzt z. B. die Cellulose langgestreckte Fadenmoleküle, die Stärke verzweigte, aber doch längliche Moleküle, und das Glykogen sehr stark verzweigte Kugelmoleküle. Deshalb wurde die Abhängigkeit der Wirksamkeit und Toxizität von der Größe und Gestalt der Moleküle systematisch untersucht, um festzustellen, in welchem Bereich optimale Eigenschaften zu erwarten sind. Durch solche Untersuchungen können auch unsere Kenntnisse über den Mechanismus der Blutgerinnung wesentlich erweitert werden.

I. Die Abhängigkeit der Wirksamkeit und Toxizität von der Molekülgröße

Die Abhängigkeit der Wirksamkeit und der Toxizität der Ester von der Molekülgröße lässt sich am besten durch Untersuchung von polymerhomologen Reihen prüfen, da bei gleichbleibender chemischer Zusammensetzung nur der Polymerisationsgrad variiert wird.

Wir stellten daher zunächst *Cellulose-Schweifelsäureester* verschiedenen Abbaugrades her und bestimmten die Wirksamkeit der Präparate *in vivo* und *in vitro* sowie die Toxizität gegenüber Kaninchen. Zur exakten Bestimmung des Polymerisationsgrades wurden von allen Produkten Viscositätsmessungen in 0,5-*n*. Kochsalzlösung durchgeführt. Die Z_η -Werte zeigt Tab. 1.

Sie wurden aus den η_{sp}/c -Werten nach der von G. V. Schulz⁸ aufgestellten Formel:

$$Z_\eta = \frac{\eta_{sp}/c}{1 + K_\eta \cdot \eta_{sp}}$$

berechnet. K_η beträgt 0,28.

⁶ v. Hoffmann-La Roche, Basel, als „Liquoid Roche“ im Handel.

⁷ Liebigs Ann. Chem. 527, 234 [1937]; 530, 1 [1937].

⁸ G. V. Schulz u. F. Blaschke, J. prakt. Chem. 158, 130 [1941].

Nr.	Konz. in g/l	η_{sp}	η_{sp}/c	Z_η	DP
C ₂	6,64	0,178	0,0268	0,0256	42
C ₃	3,32	0,102	0,0307	0,0298	49
C ₄	2,16	0,150	0,0694	0,0665	119
C ₅	2,07	0,175	0,0844	0,0881	132
C ₆	1,69	0,570	0,337	0,290	473
C ₈	0,83	0,390	0,470	0,424	692

Tab. 1. Z_η -Werte von polymerhomologen Cellulose-Schweifelsäureestern in 0,5-*n*. NaCl (DP = durchschnittl. Polymerisationsgrad).

Zur Bestimmung der K_m -Konstante des Staudingerschen Viscositätsgesetzes⁹

$$Z_\eta = K_m \cdot P,$$

die zur Berechnung der Molekulargewichte aus den Viscositätsdaten notwendig ist, wurden an den Präparaten C₅ und C₆ osmotische Messungen im gleichen Lösungsmittel durchgeführt unter Verwendung der von G. V. Schulz¹⁰ konstruierten osmotischen Zellen. Das Molekulargewicht ermittelten wir aus den p/c -Werten durch graphische Extrapolation nach dem van't Hoff'schen Gesetz. Die Messungen zeigt Tab. 2.

Nr.	Konz. in g/l	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	lim p/c	Mol.-Gew.
C ₅	4,145	1,35	0,326	0,328	75 000
	8,29	2,66	0,321		
	12,44	3,87	0,311		
C ₆	4,235	0,677	0,160	0,112	220 000
	8,47	1,74	0,206		
	12,71	3,28	0,258		

Tab. 2. Osmotische Molekulargewichtsbestimmungen an Cellulose-Schweifelsäureestern in 0,5-*n*. NaCl.

Die aus diesen Daten ermittelten K_m -Konstanten (vergl. Tab. 3) stimmen nicht sehr gut miteinander überein, da beim Präparat C₅ vermutlich eine geringe Diffusion durch die Membran stattgefunden hat, wie aus dem Absinken der p/c -Werte hervorgeht. Den Polymerisationsgradberechnungen (Tab. 1, letzte Spalte) wurde daher der Wert von $6,2 \cdot 10^{-4}$ zugrunde gelegt.

Die Wirksamkeit und Toxizität dieser Präparate¹¹, die im Versuchsteil näher charakterisiert

⁹ H. Staudinger, Organische Kolloidchemie, 2. Aufl. Braunschweig 1941.

¹⁰ Z. physik. Chem. Abt. A 176, 317 [1936].

¹¹ Über die Durchführung der Bestimmung von Wirksamkeit und Toxizität vergl. K. N. v. Kaulla, Klin. Wschr. 1943, Nr. 10; Z. exper. Med. im Druck.

Nr.	Z_η	DP	$K_m \cdot 10^4$
C_5	0,0811	160	5,07
C_6	0,290	468	6,20

Tab. 3. K_m -Konstanten der Cellulose-Schwefelsäureester in 0,5-n. NaCl.

werden, angegeben in der Zunahme der Blutgerinnungszeit und der dosis letalis bei intravenöser Injektion am Kaninchen, zeigt Tab. 4. Wie man sieht, nimmt die Wirksamkeit mit steigendem Molekulargewicht in geringem Maße ab, während die Toxizität erheblich ansteigt.

Nr.	DP	Mol.-Gew.	Zunahme der Blutgerinnungszeit bei einer Konz. von 12,5 γ/ml	Dosis letalis
C_7	692	322000	288%	3 mg
C_6	473	220000	—	—
C_5	132	75000	400%	30-40 mg
C_4	119	56000	—	—
C_3	45	21000	733%	≥ 60 mg
C_2	42	20000	—	—

Tab. 4. Abhängigkeit der Wirksamkeit und der Toxizität von Cellulose-Schwefelsäureestern vom Molekulargewicht.

Um zu prüfen, ob hier ein allgemeiner Tatbestand vorliegt, untersuchten wir in ähnlicher Weise eine polymerhomologe Reihe von *Polyvinylalkohol-Schwefelsäureestern*¹², die aus technischen Polyvinylalkoholen hergestellt worden waren. Wie bei den Cellulosesäureestern wurden auch bei diesen Produkten Viscositätsmessungen in 0,5-n. NaCl durchgeführt (vergl. Tab. 5) und zur Bestimmung des K_m -Wertes das höchstmolekulare Präparat PV_3 osmotisch gemessen (vergl. Tab. 6).

Nr.	Konz. in g/l	η_{sp}	η_{sp}/c	Z_η	DP
PV_1	3,698	0,140	0,0379	0,0356	294
PV_2	1,882	0,120	0,0654	0,0632	522
PV_3	1,313	0,157	0,1196	0,1144	945

Tab. 5. Viscositätsmessungen an Polyvinylalkohol-Schwefelsäureestern in 0,5-n. NaCl.

¹² Chargaff, Bancroft u. Stanly-Brown, J. biol. Chemistry 115, 155 [1936].

Nr.	Konz. in g/l	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	lim p/c	Mol.-Gew.
PVS_3	4,32 8,64	1,06 2,70	0,245 0,313	0,178	138200

Tab. 6. Osmotische Molekulargewichtsbestimmung an einem Polyvinylalkohol-Schwefelsäureester in 0,5-n. NaCl.

Die K_m -Konstante berechnet sich zu $1,24 \cdot 10^{-4}$. Mit diesem Wert wurden die Polymerisationsgrade der Tab. 5 ermittelt.

Auch diese Polyvinylalkohol-Schwefelsäureester wurden auf ihre Wirksamkeit und Toxizität geprüft. Wie Tab. 7 zeigt, nimmt auch in dieser polymerhomologen Reihe die Wirksamkeit mit steigendem Molekulargewicht ab, während die Toxizität erheblich ansteigt.

Nr.	DP	Mol.-Gew.	Zunahme der Blutgerinnungszeit bei einer Konz. von 12,5 γ/ml	Dosis letalis
PVS_3	945	138200	443%	30 mg
PVS_2	322	76500	493%	—
PVS_1	294	43000	510%	≥ 30 mg

Tab. 7. Abhängigkeit der Wirksamkeit und der Toxizität von Polyvinylalkohol-Schwefelsäureestern vom Molekulargewicht.

II. Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Molekülgestalt

Zur Prüfung dieser Frage eignen sich besonders Stärke und Glykogen, die nach H. Staudinger und E. Husemann⁷ verzweigte Struktur besitzen. Die Glykogenmoleküle sind sogar infolge starker Verzweigung kugelig. Es wurden daher *Schwefelsäureester* von *Stärken* und *Glykogenen* verschiedenen Polymerisationsgrades sowie den Stärkebestandteilen *Amylose* und *Amylopektin*, die sich möglicherweise im Verzweigungsgrad unterscheiden, hergestellt, charakterisiert und auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden viscosimetrische und osmotische Messungen durchgeführt (Tab. 8 und 9).

Da für Kugelmoleküle das Staudingersche Viscositätsgesetz nicht gilt, konnten die Molekulargewichte der Glykogene nicht mit Hilfe der Viscositätsmessungen ermittelt werden. Mit der

Nr.	Substanz	Konz. g/l	η_{sp}	η_{sp}/c	Z_η	DP
St ₁	Glykogen, 4 1/2 min mit HCl abgebaut	12,76	0,083	0,00651	0,00636	ca. 50
St ₂	Glykogen, hochmolekular	12,76	0,079	0,00620	0,00606	727
St ₃	Stärke, 4 min mit HCl abgebaut	26,73	0,113	0,00423	0,00410	29
St ₄	Amylopektin, 2 min mit HCl abgebaut	6,76	0,173	0,0256	0,0245	172
St ₅	Amylose	13,05	0,468	0,0359	0,0317	224

Tab. 8. Viscositätsmessungen an Stärke- und Glykogen-Schwefelsäureestern in 0,5-n. NaCl.

osmotischen Methode ließ sich nur das Molekulargewicht des höheren Glykogens bestimmen. Der Polymerisationsgrad von St₁ wird annähernd 50 betragen.

Die K_m -Konstante der Stärke-Schwefelsäureester wurde durch osmotische Messungen an dem Amylosederivat St₅ ermittelt, da die Präparate St₃ und St₄ wegen starken Abbaus nicht osmotisch gemessen werden konnten. Die Werte in der letzten Spalte der Tab. 8 sind daher nur annähernd richtig. Aus dem Polymerisationsgrad von 224 und dem

Z_η -Wert des Amylose-Schwefelsäureesters errechnet sich eine K_m -Konstante von $1,42 \cdot 10^{-4}$.

Die Produkte St₁ bis St₅ wurden in vitro und in vivo auf ihre blutgerinnungshemmende Wirkung geprüft. Wie Tab. 11 zeigt, besitzen verzweigte Moleküle nur geringe und Kugelmoleküle fast keine Wirksamkeit. Erstaunlicherweise unterscheiden sich Amylose und Amylopektin trotz annähernd gleicher Polymerisationsgrade nur sehr wenig, obwohl eine größere Wirksamkeit des Amylose-Schwefelsäureesters hätte erwartet werden sollen, da er vermutlich weniger verzweigt ist.

Konz. g/l	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	Mol.-Gew.
10	0,77	0,77	320000
20	1,35	0,68	360000
			340000

Tab. 9. Osmotische Molekulargewichtsbestimmung an Glykogen-Schwefelsäureester in 0,5-n. NaCl.

Konz. g/l	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	lim p/c	Mol.-Gew.
4,35	1,015	0,234	0,234	105100
8,70	2,03	0,234	0,234	105100

Tab. 10. Osmotische Molekulargewichtsbestimmung an Amylose-Schwefelsäureester St₅ in 0,5-n. NaCl.

III. Xylan-Schwefelsäureester als blutgerinnungshemmende Substanz

Da sich in den bisherigen Untersuchungen gezeigt hatte, daß die Schwefelsäureester von unverzweigten Fadenmolekülen in einem Bereich der Polymerisationsgrade zwischen etwa 10 und 80 die Blutgerinnung hemmen bei mäßiger Toxizität, wurden weitere Polysaccharide untersucht mit dem Ziel, ein therapeutisch verwendbares Präparat zu finden. Als besonders geeignet erwies sich das Xylan¹³, ein im Holz enthaltenes Pento-

¹³ Vergl. E. Husemann, J. prakt. Chem. 155, 13 [1940].

Nr.	Präparat	Molekülgestalt	DP	Zunahme der Blutgerinnungszeit bei einer Konzentration von 7,5 γ/ml
St ₂	Glykogen	Kugelmolekül	727	— 12 %
St ₁	Glykogen	„	ca. 50	+ 41 %
St ₃	Stärke	Fadenmolekül m.V.	29	+ 88 %
St ₄	Amylopektin	„	172	83 %
St ₅	Amylose	wahrscheinlich Fadenmolekül	224	83 %
C ₃	Cellulose	Fadenmolekül	45	170 %
X ₃	Xylan	„	42	218 %

Tab. 11. Abhängigkeit der Wirksamkeit von Polysaccharid-Schwefelsäureestern von der Molekülgestalt.

san vom Polymerisationsgrad 150 nach hydrolytischem Abbau mit Kalumbisulfatlösung. Die Toxizität der Präparate ist sehr gering, vielleicht weil das Xylan selbst wasserlöslich ist, so daß bei einer Verseifung des Esters im Organismus keine unlöslichen Produkte entstehen. Die Wirksamkeit entspricht annähernd der des Heparins. Die Xylane wurden mit Kalumbisulfatlösung verschieden lange abgebaut und verestert. Da infolge der geringen Molekulargewichte osmotische Messungen nicht möglich waren, bestimmten wir die Molekulargewichte durch Viscositätsmessungen (vergl. Tab. 12) unter Verwendung der bei der Cellulose ermittelten K_m -Konstante von $6,2 \cdot 10^{-4}$.

Nr.	Konz. in g/l	η_{sp}	η_{sp}/c	Z_η	DP
XY ₁	4,055	0,133	0,0328	0,0316	52
XY ₂	8,92	0,189	0,0212	0,0201	33
XY ₃	8,61	0,152	0,0176	0,0169	28
XY ₄	12,64	0,195	0,0154	0,0146	24
XY ₅	12,52	0,183	0,0146	0,0138	23

Tab. 12. Viscositätsmessungen an Xylan-Schwefelsäureestern in 0,5-n. NaCl. $K_m = 6,2 \cdot 10^{-4}$.

Die Wirksamkeit der Xylanschwefelsäureester entspricht etwa derjenigen des Heparins, wie

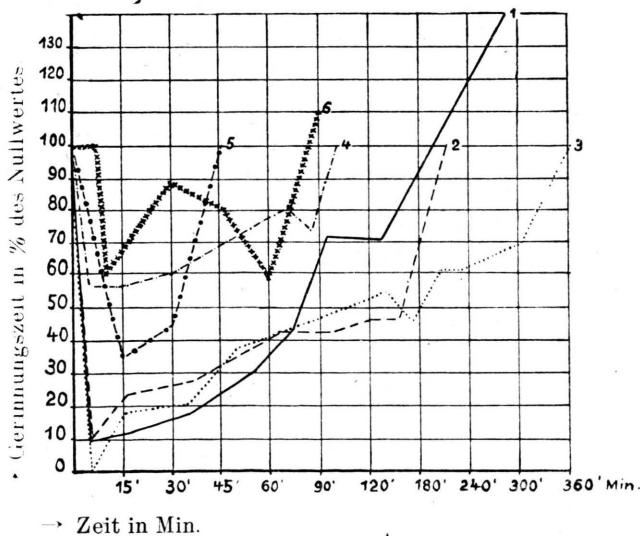


Abb. 1. Vergleich der gerinnungshemmenden Wirksamkeit verschiedener Schwefelsäureester mit der von Heparin. 1 Heparin, 2 Xylanester, 3 Xylanester, 4 Celluloseester, 5 sulf. Polyvinylalkohol, 6 Glykogenester.

Abb. 1 zeigt. Die Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad ist nicht so ausgesprochen, da infolge des geringen Ausgangswertes von 150 die Variationsbreite nicht so groß ist. Am günstigsten sind Präparate mit Polymerisationsgraden zwischen 20 und 30.

Die Toxizität der Präparate ist erfreulich gering. Tägliche Injektionen von 15 mg pro kg, dem fünffachen der therapeutischen Dosis, beeinflussen die Tiere nicht ungünstig. Unmittelbar nach der Injektion kommt es zu einem Leukozytenanstieg, der rasch wieder abklingt, gelegentlich zu kurzdauernden Temperatursteigerungen von 1°. Das übrige Blutbild ist unverändert, ebenso der Cholesterinspiegel und der seiner Komponenten. Der Blutzuckergehalt steigt gelegentlich kurze Zeit an. Die Präparate wurden bereits bei akuter Thrombose mit klinischem Erfolg angewandt.

Von besonderer Bedeutung für die Wirksamkeit der Präparate erwies sich ihr Reinheitsgrad. So besaßen z. B. einige Präparate, die probeweise aus einem nach einem abgekürzten Verfahren gewonnenen Xylan hergestellt worden waren, eine wesentlich geringere Wirksamkeit als die in Tab. 11 angeführten Substanzen.

V. Beständigkeitsprüfungen an Xylan-Schwefelsäureestern

Da die Xylan-Schwefelsäureester zu den intravenösen Injektionen in wässriger Lösung verwendet werden müssen, war es nötig, ihre Beständigkeit zu studieren. Zu diesem Zweck wurden die Verseifungsgeschwindigkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln geprüft. Je 0,1 g lufttrockene Substanz wurde in 10 ccm Wasser bzw. 10 ccm n/10-HCl gelöst und nach verschiedenen Zeiten mit n/10-Natronlauge titriert.

Zur Berechnung des Anteils der verseiften Substanz wurde der Feuchtigkeitsgehalt (18,9%) des Präparates berücksichtigt. Tab. 13 zeigt, daß die Xylan-Schwefelsäureester relativ schwer verseifbar sind, also ohne Gefahr längere Zeit in wässriger Lösung aufgehoben werden können. Auch bei Versuchen, Xylan-Schwefelsäureester mit methylalkoholischer Natronlauge bzw. mit Natriummethylat bei 50° unter Stickstoff zu verseifen, zeigte sich, daß die Schwefelsäureester sehr beständig sind und sich nicht quantitativ spalten lassen.

Verseifungs-mittel	Temp.	Zeit	ccm verbr. n/10-NaOH	% ver-seifte Substanz
H_2O	20°	5 Tage	0,02	0
		10 Tage	0,02	0
		15 Tage	0,02	0
H_2O	100°	1 Stde.	0,02	0
		6 Stdn.	0,02	0
		24 Stdn.	0,02	0
		8 Tage	3,4	70,4
$n/10-HCl$	20°	12 Stdn.	10,0	0
		24 Stdn.	10,0	0
$n/10-HCl$	100°	8 Tage	10,4	8,3
		20 Tage	10,8	16,7
		15 Min.	11,15	23,8
		30 Min.	11,50	31,1
		60 Min.	12,00	41,4
		8 Stdn.	13,4	70,4
		23 Stdn.	13,7	71,9

Tab. 13. Prüfung der Verseifungsgeschwindigkeit eines Xylan-Schwefelsäureesters.

Beschreibung der Versuche

1. Herstellung der Polysaccharide

a) Abgebauter Cellulosen

Zur Herstellung von Cellulosen verschiedenen Polymerisationsgrades wurden je 3 g gereinigte Baumwolle in 800 ccm Schweizers Reagens, das 12 g Kupferhydroxyd enthielt, gelöst und durch abwechselndes Einleiten von Luft und darauffolgendes Schütteln oxydativ abgebaut. Durch Viscositätsmessungen wurde der Abbau verfolgt. Die Isolierung der Cellulose erfolgte durch Eingießen der Lösung in 2 l einer Mischung aus 5-proz. Seignettesalzlösung und Methanol. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, durch ausgiebiges Waschen mit Seignettesalzlösung und Methanol gereinigt und im Mörser mit Äther verrieben. Man erhält so sehr reaktionsfähige Pulver.

b) Stärke und Glykogen

Der Abbau von Stärke und Glykogen erfolgte durch Erhitzen in $n-HCl$ im Wasserbad unter ständigem Umschütteln⁸. Zur Isolierung wurde in das 4-fache Vol. Methanol eingegossen, abzentrifugiert, mit Methanol ausgiebig gewaschen und im Äther verrieben und getrocknet.

c) Xylan

Zur Herstellung von Xylan wurden 200 g Buchenholzmehl, das mit Benzolacetongemisch extrahiert worden war, unter Rühren mit 0,2-proz. Natronlauge behandelt. Die Lösung wurde abgesaugt und der Rückstand in 1 l 8-proz. Natronlauge gegeben. Nach 2-tägigem Schütteln wurde abfiltriert; die klare Lösung in 6 l Methanol eingegossen und mit Essigsäure neutralisiert. Das ausfallende, bräunlich gefärbte Xylan wurde durch mehrstündigiges Behandeln mit 0,2-proz.

Chlordioxydlösung gebleicht, mit Methanol und Äther gewaschen und im Mörser verrieben. Zur Herstellung eines besonders gereinigten Produktes wurde eine Fraktionierung durchgeführt. Man löste das Rohprodukt in 1 l 6-proz. Natronlauge, zentrifugierte von geringen Verunreinigungen ab und versetzte die klare Lösung mit Methanol bis zur schwachen Trübung. Der nach eintägigem Stehenlassen ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Diese Frakt. 1 enthielt die höchstmolekularen Anteile und Celluloseanteile. Sie wurde verworfen. Die klare Lösung wurde erneut mit Methanol versetzt, bis eine starke, bleibende Trübung auftrat. Durch Zentrifugieren ergab sich Frakt. 2, die Hauptmenge der Substanz. Sie wurde erneut in Natronlauge gelöst, zentrifugiert und durch Eingießen in Methanol ausgefällt. Die Ausbeute in diesem extrem gereinigten Produkt betrug etwa 12 g. Bei weiteren Versuchen zeigte sich, daß die zeitraubende Umfällung unterbleiben kann, wenn die Bleiche mit Chlordioxyd länger ausgedehnt wird.

Um eine polymerhomologe Reihe von Xylanen herzustellen, wurden 4 g der Substanz bei 60° mit 7-proz. Kaliumbisulfatlösung während verschiedener Zeiten behandelt. Nach 24, 48 usw. Stdn. wurde abgesaugt, mit essigsäurehaltigem Wasser-Methanol und Äther gewaschen und im Mörser verrieben.

Die Substanzen wurden ohne weitere Trocknung mit Chlorsulfonsäure verestert, da sie in diesem Zustand besonders reaktionsfähig sind.

2. Herstellung der Schwefelsäureester

Die Veresterung der Polysaccharide und der Polyvinylalkohole erfolgte entsprechend der von Bergström⁵ und Karrer⁶ angegebenen Vorschrift durch Behandeln mit Pyridin-Chlorsulfonsäure bei 60—100° und dauerndem Rühren. Die Reaktionsdauer war abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der Substanzen; als besonders reaktionsfähig erwiesen sich die mit Äther im Mörser verriebenen Pulver von umgefallten Cellulosen und Xylanen. Über die genauen Mengenverhältnisse, die Reaktionstemperatur und die Dauer der Veresterung geben die Tab. 14—17 Auskunft.

Die Cellulosepräparate C₅, C₆ und C₇ wurden aus nicht umgefallter gereinigter Baumwolle durch ver-

Zu- gesetzte Substanz in mg	Gerinnungszeit (Nullwert: 2,41 Min.)
0,01	mehr als 2 Stdn.
0,005	mehr als 2 Stdn.
0,002	13 Min.
0,001	7 Min.
0,0005	5 Min.
0,0001	3 Min.
0,00005	2,15 Min.
0,00001	2,15 Min.

Tab. 14. Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der zugesetzten Menge Xylan-Schwefelsäureester.

Nr.	Substanz	Menge Pyridin (P) + Chlorsulfonsre. (C)	g Cell.	Sulfurier- dauer in Stdn.	Sulf.- Temp.	S-Geh. in %
C ₁	Biosan	20 ccm P + 5 ccm C	2,5	5	60°	18,5
C ₂	Baumwoll- Cellulose 173 Stdn. mit 19000 ccm Luft gesch.	60 ccm P + 14 ccm C	3	4	60°	17-18
C ₃	Baumwoll- Cellulose 37 Stdn. mit 19000 ccm Luft gesch.	60 ccm P + 14 ccm C	3	6 1/2, gerührt, 14 ohne Rührung	60°	17-18
C ₄	Baumwoll- Cellulose aus Schw. Reag. umgef.	120 ccm P + 28 ccm C	3	7 1/2 gerührt, 14	60°	17-18
C ₅	Baumwoll- Cellulose nat.	120 ccm P + 14 ccm C	3	16 ger. 60	95° 80°	19,2
C ₆	Baumwoll- Cellulose nativ	120 ccm P + 7 ccm C	2	4 1/2 ger. 2	80° 90°	17,1
C ₇	Baumwoll- Cellulose nativ	70 ccm P + 7 ccm C	2	1 1/2 ger. 2	60° 80°	17,1

Tab. 15. Charakterisierung der Cellulose-Schwefelsäureester.

Prä- parat	Menge Pyridin (P) + Chlor- sulfonsäure (C) für je 3,5 g	Sulfurier- dauer in Stdn.	Sulfurier- tempera- tur	Schwefel- gehalt % S
PVS ₁	60 ccm P + 14 ccm C	4	100°	20,12
PVS ₂	60 ccm P + 14 ccm C	2	100°	18,42
PVS ₃	60 ccm P + 14 ccm C von den Aus- fällen weitere 20 ccm P zugefügt	6 1/2 ger. 5 ger. 14 ohne Röhrg.	60° 80° 60°	

Tab. 16. Charakterisierung der Polyvinylalkohol-
Schwefelsäureester.

schieden lange Sulfurierung erhalten. Bei diesen Produkten entstand keine klare Lösung, sondern eine klebrige braune Masse, die zur Weiterverarbeitung in wenig Wasser gelöst werden mußte. Die übrigen Präparate lieferten nach der Veresterung braune, viscose Lösungen, aus denen sich die Ester durch Eingießen in 1 l Methanol isolieren ließen. Sie wurden mit Methanol und Aceton gewaschen und getrocknet.

Zur Überführung der Pyridinsalze in Natriumsalze wurden die Ester in 2-4 ccm Wasser gelöst und mit verd. Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reak-

tion erkennbar am Farbumschlag von Gelbbräun in Tiefrot, versetzt. Dann goß man die Lösung in Methanol, wusch mit Methanol und Aceton und verrieb bis zum Verschwinden des Acetongeruches.

Zur vollständigen Entfernung des Pyridins mußte die Umfällung aus schwach alkalischer Lösung wiederholt werden; die gelbbraune Farbe ließ sich durch kurze Behandlung mit Chlordioxyd zum Verschwinden bringen.

Die Bestimmung des Schwefels erfolgte nach einem von K. Bürger¹⁵ angegebenen Verfahren durch Reduktion der SO₃Na-Gruppe mit metallischem Kalium. In den Tab. 14-16 sind die so bestimmten Schwefelgehalte zusammengestellt.

Zur Wasserbestimmung der sehr hygroskopischen Substanzen wurden die Präparate bei 60° im Hochvakuum über P₂O₅ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Viscositätsmessungen erfolgten wie üblich bei 20° im Ostwaldschen Viscosimeter, die osmotischen Messungen in den von G. V. Schulz¹¹ konstruierten osmotischen Zellen bei 27°.

Bestimmung der Wirksamkeit: 0,1 ccm einer Mischung aus 0,8 ccm Menschenblut + 0,2 ccm einer 3,8-proz. Natriumcitratlösung wurde mit 0,2 ccm dest. Wasser, in dem die zu testende Substanz gelöst war, versetzt, 1 Min. im Thermostaten von 38° erwärmt und schnell mit 0,1 ccm einer vorgewärmten 0,5-proz. CaCl₂-Lösung versetzt. Beim Zugeben der Lösung wurde die Stopp-

¹⁵ Chemie 57, 25 [1944].

Präparat	Substanz	Menge Pyridin (P) + Chlorsulfon- säure (C)	g Sub- stan- z	Sulfurier- Dauer in Stdn.	Sulfurier- Temp.	% S
St ₁	Glykogen, 4 $\frac{1}{2}$ Min. mit HCl abgebaut	24 ccm P + 5,5 ccm C	2,5	3 $\frac{1}{2}$	100°	17,3
St ₂	Glykogen hochmolekular	24 ccm P + 5,5 ccm C	1,5	7	100°	17,2
St ₃	Stärke, 4 Min. mit HCl abge- baut	60 ccm P + 14 ccm C	3	5	100°	17,9
St ₄	Amylopektin	120 ccm P + 28 ccm C	3	9 und 14 ohne Rühring	100° 60°	17,6
St ₅	Amylose	60 ccm P + 14 ccm C	3	6	100°	17,6

Tab. 17. Charakterisierung der Glykogen- und Stärke-Schwefelsäureester.

Präparat	Substanz	Menge Pyridin (P) + Chlorsulfonsre. (C)	g Xylan	Sulfurier- Dauer in Stdn.	Sulfurier- Temp.	Schwefel- gehalt % S
XY ₁	Xylan, unabgebaut	60 ccm P + 14 ccm C	3,5	2	60°	16,3
XY ₂	Xylan, 24 Stdn. abgebaut	60 ccm P + 14 ccm C	3	4	60°	17,4
XY ₃	Xylan, 48 Stdn. abgebaut	40 ccm P + 9,4 ccm C	3	5	60°	17,5
XY ₄	Xylan, 120 Stdn. abgebaut	30 ccm P + 7 ccm C	3	4 $\frac{1}{2}$ gerührt 13 ohne Rühring	60°	17,3
XY ₅	Xylan, 240 Stdn. abgebaut	30 ccm P + 7 ccm C	3	2	60°	17,1

Tab. 18. Charakterisierung der Xylan-Schwefelsäureester.

uhr in Gang gesetzt. Sobald die ersten Zeichen der Gerinnung zu sehen waren, wurde abgestoppt.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit *in vivo* wurde die Lösung in die eine Ohrvene eines Kaninchens injiziert und das Blut nach bestimmten Zeiten der anderen Ohrvene entnommen und, wie oben beschrieben, geprüft.

Zur Berechnung wurde der Nullwert ohne Zugabe einer gerinnungshemmenden Substanz bestimmt und berechnet, um wieviel Prozent dieser Nullwert überschritten wurde.

In Tab. 14 wird als Beispiel die Gerinnungszeit in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Xylan-Schwefelsäureester angegeben.