

PRÉPARATION DES HORMONES DU LOBE POSTÉRIEUR DE L'HYPOPHYSE DE BOEUF

I. OCYTOCINE

par

HANNS MAIER-HÜSER, HUBERT CLAUSER,
PIERRE FROMAGEOT, ET ROGER PLONGERON

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Paris
et Laboratoires de Recherches des Etablissements Roussel, Paris (France)

Plusieurs méthodes ont déjà été proposées pour la préparation des hormones, ocytocine et vasopressine, du lobe postérieur de l'hypophyse du boeuf¹⁻⁵; mais, pour la plupart, ces méthodes ne fournissent les substances que sous des formes encore loin d'un état de pureté satisfaisant, ou ne les fournissent qu'avec un très faible rendement. L'ocytocine pure est obtenue par DU VIGNEAUD *et al.*⁶ grâce à des fractionnements par contre-courant, exécutés sur une matière première déjà fortement enrichie en hormones, et fournie par l'industrie; la préparation de vasopressine pure par DU VIGNEAUD *et al.*⁷, exécutée à partir de l'hypophyse elle-même, est faite par un procédé qui, sur certains points, met en jeu des opérations dont les principes sont comparables à ceux qui, établis tout à fait indépendamment, ont déjà fait de la part de deux d'entre nous, l'objet d'une brève description⁸. Etant donné l'intérêt des deux hormones du lobe postérieur de l'hypophyse, et le prix de la matière première, il était intéressant de mettre au point des procédés permettant d'obtenir, à partir d'un même lot de matière première, d'une part l'ocytocine et d'autre part la vasopressine, chacune à l'état pur et avec un rendement suffisamment élevé.

Dans le présent travail, nous indiquons un premier procédé qui nous a donné à ce point de vue des résultats tout à fait satisfaisants; le début des opérations est commun aux deux hormones; réservant pour une prochaine publication⁹ la description de la voie conduisant à la vasopressine, nous décrivons ici seulement celle qui conduit à l'obtention d'ocytocine sous une forme qui sans être encore absolument pure est immédiatement utilisable pour être soumise à une purification définitive par distribution à contre-courant.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les dosages physiologiques sont faits: pour l'ocytocine, par la méthode de JUNKMANN⁴ sur l'utérus de cobaye, et pour la vasopressine par la méthode de LANDGREBE *et al.*¹⁰ utilisant la pression sanguine du rat. La caractérisation de l'intermédiine utilise la méthode de ZONDEK¹¹ sur le vairon (*Phoxinus phoxinus*).

Purification des solvants. L'ocytocine et la vasopressine, surtout lorsqu'elles se trouvent sous des états avancés de pureté, sont des substances peu stables; elles sont en particulier sensibles aux

Bibliographie p. 257.

traces de métaux que pourraient apporter des solvants et des réactifs mal purifiés et aux traces de peroxydes que peuvent aussi contenir ces solvants. Il est donc indispensable de n'utiliser que des solvants ou réactifs rigoureusement exempts de toute substance nocive:

L'eau doit n'avoir jamais été en contact avec le cuivre; elle doit, après déminéralisation préalable éventuelle, avoir été distillée dans un appareil ne comportant que du verre Pyrex.

L'acide acétique "cristallisable" est distillé deux fois à la pression ordinaire; en éliminant les résidus de distillation, on obtient un acide acétique exempt de fer.

Le *n*-butanol primaire utilisé ici est du butanol "Melle"**, type S**. Ce butanol est redistillé, juste avant l'emploi, dans une colonne à plateaux, entièrement en verre Pyrex, à pouvoir fractionnant élevé. Le *n*-butanol "Melle"**, ordinaire***, peut-être également utilisé, mais seulement après avoir été purifié de la façon suivante: on agite, pendant 6 heures, 2 litres de *n*-butanol avec 20 g de carbonate de sodium sec finement pulvérisé; on élimine le carbonate de sodium par filtration et on distille dans un appareil tout en verre, muni d'une colonne à pouvoir fractionnant élevé; on obtient les fractions suivantes: tête 150 ml, coeur 1750 ml, queue 100 ml; on élimine les fractions de tête et de queue et on introduit la fraction de coeur dans un ballon rond de 3 litres muni de 3 tubulures; on ajoute 150 g de chaux vive finement pulvérisée et on fait bouillir le tout à reflux, en agitant, pendant 3 heures. On filtre et on distille une nouvelle fois dans l'appareil utilisé précédemment. On élimine la fraction de tête passant en dessous de 116°; la fraction de coeur (116°-118.5°) est distillée une nouvelle fois.

Le *n*-butanol pur (Eb.: 116.5°-117.5° (760 mm Hg)) doit présenter les caractères suivants:

1. On distille 2 litres du solvant dans un appareil entièrement en verre, jusqu'à ce qu'il ne reste plus dans le ballon que 3 à 4 ml de liquide; ce résidu doit rester parfaitement incolore; 1 ml de ce résidu, mélangé à froid à 1 ml d'acide sulfurique concentré, ne doit donner lieu en 30 minutes ni à un trouble ni à une coloration rouge; 2 ml de ce résidu ne doivent pas laisser, après évaporation totale, de résidu sec appréciable (< 1 mg).

2. Le solvant ne doit donner aucune coloration quand on l'agite avec un même volume de KOH à 30%.

3. Le comportement du solvant vis à vis de l'acide sulfurique concentré doit être le suivant: a. Dans un tube à essai on dispose 3 ml de butanol sur 3 ml d'acide sulfurique concentré pur. La surface de séparation des deux liquides doit rester limpide et incolore. b. Le mélange des deux liquides ne doit donner lieu, pendant 4 heures, à la température ordinaire, à aucune coloration, autre qu'une faible coloration jaune citron.

4. Une solution acide d'iode de potassium agitée avec un même volume de *n*-butanol ne doit donner lieu à aucun dégagement d'iode.

5. Une solution neutre de permanganate de potassium, agitée avec un même volume de butanol, ne doit montrer aucune réduction immédiate, à la température ordinaire.

Le butanol secondaire est purifié par le même procédé; le contrôle de sa pureté est fait par les mêmes essais que dans le cas du *n*-butanol primaire. Eb. 98-99.5° (760 mm Hg).

L'alcool octylique secondaire du commerce contient diverses impuretés donnant une coloration rouge foncé par addition d'acide sulfurique concentré. Il contient en outre des substances acides facilement éliminables par lavage à l'eau. L'obtention d'octanol secondaire pur se fait de la façon suivante: Utilisant un appareillage entièrement en verre, on distille sous vide (trompe à eau) 2 litres d'octanol; on élimine la première fraction de 200 ml puis on recueille environ 1600 ml, en s'arrêtant lorsque le liquide recueilli commence à donner avec l'acide sulfurique concentré une coloration nette. En utilisant le même appareil à distiller, on distille 2 litres d'octanol obtenu comme il vient d'être dit, avec 10 g de chaux éteinte en suspension dans l'eau. On élimine la fraction de tête contenant l'eau (environ 150 ml), on filtre le liquide restant dans le ballon, puis on distille le liquide dont on a ainsi éliminé la chaux. On recueille le liquide tant qu'il ne fournit pas de réaction colorée avec l'acide sulfurique. L'octanol ainsi obtenu est parfaitement neutre, et se montre pur vis à vis des différents essais indiqués à propos du *n*-butanol. Eb. 178.5° (760 mm Hg).

L'acétone de synthèse subit le traitement suivant: 5 litres sont distillés en présence de 20 ml d'acide sulfurique concentré; on élimine les premiers 200 ml et on recueille 4.6 litres. Ces derniers sont distillés à nouveau en présence de 30 g de potasse en pastilles. Comme précédemment on élimine la première fraction de 200 ml et on laisse dans le ballon environ 200 ml de résidu. L'acétone ainsi obtenue est neutre; elle ne donne aucune réaction avec le nitrate d'argent (absence d'aldéhydes).

Le chloroforme est purifié de la façon suivante: 3 litres de chloroforme pur du commerce sont lavés 3 fois de suite, chaque fois avec 500 ml d'eau distillée puis avec 500 ml d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. Le chloroforme est ensuite séché par le carbonate de sodium. Le solvant bien sec est distillé: on recueille la fraction passant à 61° (760 mm Hg). Le solvant ainsi purifié est conservé au froid et à l'obscurité.

* Usines de Melle, à Melle (Deux-Sèvres), France.

** Produit de synthèse, spécialement purifié.

*** Produit de synthèse, mais non spécialement purifié. Le *n*-butanol de fermentation est ici inutilisable, quelles que soient les purifications qu'on lui fait subir.

L'éther est tout d'abord lavé par agitation avec une solution diluée de soude, puis avec de l'eau, puis il est agité avec une solution aqueuse de sulfate ferreux que l'on renouvelle jusqu'à ce que aucune oxydation du sulfate ferreux ne se manifeste plus. Il est ensuite séché sur sulfate de soude, puis distillé sur sulfate ferreux sec. On le conserve à l'obscurité sur sulfate ferreux. Il suffit de le filtrer avant de l'utiliser.

Préparation de la silice activée. La silice utilisée dans le présent travail est préparée de la façon suivante: 7.5 litres de silicate de soude, 35 à 37° Bé, limpide, incolore et aussi dépourvu de fer que possible, sont mis en suspension par agitation avec 2.5 litres d'eau distillée. A cette suspension on ajoute, graduellement, sous agitation énergique, une solution aqueuse d'acide acétique à 50 %. On brise les grumeaux qui se forment, puis les blocs, tout en continuant à ajouter l'acide acétique. Au bout d'un certain temps la masse se liquéfie de nouveau; on continue l'agitation pendant une demi-heure, sans ajouter d'acide; le liquide doit rester nettement acide au tournesol. On le décante, puis on lave la masse à trois reprises successives, tout d'abord à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, chaque fois en décantant. Au cours de ces lavages, la silice doit être doucement broyée, par petites quantités, dans un mortier, de façon à obtenir un produit homogène sans grumeaux. On recueille finalement la silice sur bûchner, on la lave une dernière fois et on la sèche 24 heures à 110°. Le produit est passé sur tamis n° 50 (tamis en matière plastique). On obtient ainsi environ 1500 g de silice brute.

1 kg de cette silice est traité à l'ébullition pendant une demi-heure au sein de 10 litres d'une solution aqueuse d'acide acétique à 1 %, sous agitation énergique. Après décantation, on lave trois fois de suite, en décantant chaque fois, chaque fois avec 10 litres d'eau distillée. On filtre ensuite sur bûchner en lavant encore trois fois jusqu'à ce que le filtrat soit neutre au tournesol. On vérifie que la dernière eau de lavage est rigoureusement exempte de fer et d'ions Cl^- . On sèche la silice à 120°, et on la conserve dans des flacons bien bouchés. Immédiatement avant son utilisation, elle est broyée au mortier ou au broyeur à billes, et passée au tamis n° 80 (tamis en matière plastique). 1 g de cette silice agité avec 10 ml d'eau distillée, le tout étant ensuite filtré, doit fournir un filtrat parfaitement limpide et neutre au rouge de méthyle, alors que le résidu humide de cette silice doit être fortement acide vis à vis du même indicateur.

PRÉPARATION DE L'OCYTOCINE

Obtention de l'extrait primaire. Les premières opérations de l'extraction de l'ocytocine et de la vasopressine sont, à quelques variations près, celles indiquées par KAMM¹:

Les lobes postérieurs d'hypophyse de boeuf, soigneusement dégraissés, sont traités par l'acétone avec les précautions habituelles. Les organes desséchés sont finement broyés. 18 g de poudre acétonique ainsi obtenue, contenant environ 1000 U.I./g, sont empâtés, dans un mortier de porcelaine, avec 100 ml d'acide acétique à 0.3 %; le tout est abandonné à la température ordinaire pendant une demi-heure. Au bout de ce temps, on introduit rapidement et en agitant énergiquement, la pâte dans 1100 ml d'acide acétique à 0.3 %, à l'ébullition, et on maintient l'ébullition pendant exactement 3 minutes; on filtre ensuite sous vide, le plus rapidement possible* (bûchner de 22 cm, papier filtre Schleicher et Schüll n° 1117) en recueillant le filtrat dans un récipient entouré de glace. Le résidu de la filtration est rapidement lavé, sur le filtre même, avec 200 ml d'acide acétique à 0.3 %, à l'ébullition. Le résidu de la filtration est ensuite repris et extrait une nouvelle fois par 300 ml d'acide acétique à 0.3 % à l'ébullition, pendant 3 minutes, sous agitation énergique. On filtre sous vide, toujours en refroidissant aussi rapidement que possible le filtrat, et on lave une dernière fois le résidu, sur le filtre même, avec 300 ml d'acide acétique à 0.3 % bouillant. Après ces opérations, le résidu ne contient plus aucune trace des hormones hypophysaires; on l'élimine.

Les divers extraits acétiques sont réunis; ils constituent l'*extrait primaire*. Cet extrait primaire est une solution jaune foncé, pratiquement limpide, et dont le pH est compris entre 3.8 et 4.0. Son volume est d'environ 1800 ml. Il contient 90 à 100% des hormones post-hypophysaires (ocytocine, vasopressine, interméline) présentes dans la matière première. Il est également riche en protéines. Cet extrait primaire peut être conservé, sous toluène, plusieurs semaines à la glacière.

Adsorption sur silice. L'extrait primaire est introduit dans une jarre rotative de

* Dans le cas où l'extrait filtrerait trop lentement, ou dans le cas où le filtrat resterait trouble, on ajouterait avant de filtrer 10 à 15 g d'Hyflo-Supercel, qui, tout en facilitant grandement la filtration, n'adsorbe aucunement les hormones posthypophysaires.

3 litres, placée à la chambre froide; on ajoute successivement 50 g, 50 g et 100 g de silice, en faisant tourner la jarre pendant $1\frac{1}{2}$ h après chaque addition. Cette *première adsorption* sur silice a ainsi une durée totale de $4\frac{1}{2}$ h; l'élution qui la suit doit être exécutée le même jour.

La silice est séparée par filtration sous vide, le filtrat étant recueilli dans une fiole à vide de 3 litres entourée de glace. Après essorage la silice est lavée par 300 ml d'acide acétique à 0.05 % préalablement refroidi. Au cours de ces opérations, l'essorage de la silice ne doit être que modéré; en effet, un essorage trop poussé provoquerait, surtout si la silice devait être abandonnée quelques heures avant son élution, une adsorption trop forte de l'ocytocine; cette dernière ne pourrait plus être récupérée.

L'ensemble filtrat et eaux de lavage du premier adsorbat sur silice contient encore de 10 à 13 % des hormones; on soumet donc le liquide à une *deuxième adsorption* sur de nouvelles quantités de silice, dans les mêmes conditions que précédemment, à cela près que la troisième addition de 100 g de silice n'est pas faite ici. L'ensemble filtrat et eaux de lavage du deuxième adsorbat ne renferme plus que 3 % environ de la quantité initiale des hormones; on l'élimine.

Elution spécifique de l'ocytocine. L'élution de l'ocytocine de la silice se fait par l'acide acétique à 0.5 %, à chaud; l'opération doit être exécutée le plus rapidement possible après l'adsorption*. La silice du premier adsorbat est introduite en agitant énergiquement dans un bécher de 3 litres contenant 1200 ml d'acide acétique à 0.5 %, à l'ébullition; on maintient l'ébullition pendant 4 minutes. On filtre ensuite rapidement sur büchner, sous vide, en recueillant le filtrat dans une fiole entourée de glace. Le contenu du filtre est rapidement lavé, successivement et à chaud, par 300 ml d'acide acétique à 0.5 %, et par 150 ml d'eau distillée (Éluat Ia). Le résidu de silice est repris, puis soumis à une nouvelle élution dans les mêmes conditions que précédemment, à cela près que les quantités de liquides utilisées sont la moitié des précédentes (Éluat Ib). Après ces opérations, le résidu de silice est conservé au froid en attendant d'être soumis à une nouvelle élution, en même temps que la silice du deuxième adsorbat. Les éluats Ia et Ib réunis contiennent de 68 à 75 % de l'ocytocine de l'extrait primaire.

La silice du deuxième adsorbat est soumise à un traitement analogue à celui mis en oeuvre dans le cas de la silice du premier adsorbat, sauf en ce que la quantité d'acide acétique bouillant utilisé pour l'élution est de 600 ml, le temps d'élution de 3 minutes, et le lavage fait avec seulement 150 ml d'acide acétique. L'éluat obtenu (éluat IIa) contient environ 6 % de l'ocytocine de l'extrait primaire. Le résidu de silice du deuxième adsorbat, après cette première élution, est réuni au résidu de silice du premier adsorbat, et l'ensemble est soumis à une dernière élution dans les conditions générales indiquées plus haut, en utilisant 300 ml d'acide acétique à l'ébullition, l'élution durant 4 minutes, et étant suivie d'un premier lavage par 150 ml d'acide acétique bouillant puis d'un second par 150 ml d'eau distillée bouillante. L'ensemble du filtrat (éluat IIb) contient environ 7 % de l'ocytocine initiale. On réunit les éluats Ia, Ib, IIa et IIb. Le liquide résultant (Lr) d'un volume voisin de 3300 ml, renferme ainsi 80 à 85 % de l'ocytocine de la matière première; il ne contient que de faibles quantités de vasopressine et d'interméline; il est complètement débarrassé de toute protéine (aucune précipitation ni par l'acide sulfosalicylique, ni par l'acide trichloracétique).

Les résidus de silice sont mis à part et conservés à -20° ; ils sont utilisés pour

* Le séjour à la chambre froide de l'adsorbat pendant une nuit, par exemple, conduirait à une adsorption trop forte de l'ocytocine, qui ne pourrait plus être récupérée par élution.

l'élu­tion ultérieure de la vasopressine, dont 80 % environ sont restés jusqu'ici adsorbés.

Traitement des éluats. Le liquide L₁ est additionné de 50 mg d' α,α' -dipyridyl (pour complexer Fe^{II})*; il est ensuite concentré jusqu'au quart (800 ml) de son volume. Cette concentration est faite par pulvérisation du liquide (Spray-Verfahren) sous un vide de 1/10 à 1/50 mm Hg, sous courant de CO₂, la température du liquide ne devant pas dépasser 6 à 8°. Le liquide concentré est extrait à l'éther, en continu, pour éliminer la majeure partie de l'acide acétique qu'il contenait encore et le dipyridyl en excès. La phase aqueuse est débarrassée de l'éther par le vide à la température ordinaire; on la concentre ensuite jusqu'à 70 à 100 ml, sous vide poussé, en utilisant l'appareillage précédent. Le liquide ainsi concentré est additionné, trois fois de suite, de 50 ml d'eau distillée, chaque addition étant suivie d'une nouvelle concentration. On obtient ainsi 70 à 100 ml d'un liquide L₂ débarrassé des dernières traces d'éther et d'acide acétique libre.

Le liquide L₂ refroidi au voisinage de 0°, est extrait 3 fois, chaque fois par 50 ml d'octanol secondaire; on élimine ainsi les divers pigments. La phase aqueuse, toujours refroidie, est alors ajustée prudemment à pH 7.6 à 7.8 par l'ammonique à 50 %; l'ocytocine peut alors être extraite par le *n*-butanol primaire.

Extraction de l'ocytocine par le n-butanol. L'ocytocine étant peu stable en solution même très légèrement alcaline, les opérations suivantes doivent être exécutées aussi rapidement que possible et à froid. La solution obtenue précédemment est extraite d'abord 5 fois, chaque fois avec 50 ml de *n*-butanol préalablement saturé d'eau. On réunit ces 5 premiers extraits butanoliques dans un tube de centrifugeuse et on porte le tout à -70° (carboglance + acétone), puis on centrifuge. On sépare ainsi une phase aqueuse congelée, que l'on ajoute à la solution en cours d'extraction. Cette solution est extraite encore 5 fois dans les mêmes conditions. Les 5 derniers extraits butanoliques sont refroidis à -70° et centrifugés comme dans le cas précédent; la phase aqueuse congelée est éliminée. Les extraits butanoliques réunis contiennent la totalité de l'ocytocine du liquide L₂. Ils sont concentrés immédiatement à un volume de 50 ml, cette concentration se faisant sous vide poussé (1/10 à 1/50 mm Hg), sous courant d'azote pur, la température du bain-marie extérieure ne devant pas dépasser 25 à 30°. L'ammoniac se trouve ainsi éliminé. A la solution butanolique ainsi concentrée on ajoute 5 à 6 fois son volume d'octanol, en refroidissant à 0°, et on épuise le tout 6 fois, toujours à froid, chaque fois par 50 ml d'acide acétique à 0.1 %. La totalité de l'ocytocine est ainsi extraite; la phase butanol-octanolique ne contient plus que de petites quantités de vasopressine. La phase aqueuse acétique, dont le pH est de 3.2 à 3.3 est traitée 3 fois, à la température ordinaire, chaque fois avec 50 ml de chloroforme absolument neutre, afin d'éliminer les dernières traces de butanol et d'octanol, et le chloroforme dissous est lui-même éliminé par barbotage d'azote pur, sous le vide de la trompe à eau. Le pH de la solution aqueuse acétique d'ocytocine finalement obtenue est de 3.6 à 3.8.

Cette solution, lyophilisée, donne une poudre encore légèrement jaunâtre, hygroscopique, contenant de 100 à 200 U.I. d'ocytocine, et de 4 à 6 U.I. de vasopressine par mg. Cette poudre, débarrassée de toute protéine, ne contient pas d'intermédiène. La quantité d'ocytocine obtenue sous cette forme est 40 à 45 % de la quantité traitée

* On vérifie que le réactif est en quantité suffisante de la façon suivante: on prélève 20 ml de L₁; on extrait 3 fois chaque fois avec 30 ml de chloroforme, et on évapore les extraits chloroformiques au bain-marie, jusqu'à siccité. On ajoute au résidu 1 ml d'eau, 1 ml d'acide acétique pur et quelques gouttes d'une solution aqueuse de sulfate ferreux. Une coloration rouge indique que le dipyridyl introduit dans L₁ est suffisant pour fixer la totalité de Fe(II) (apporté par la silice, etc.) qui s'y trouvait.

initialement. C'est une telle préparation d'ocytocine, qui, après une nouvelle purification par distribution à contre-courant selon DU VIGNEAUD *et al.*⁶ a été utilisée par PRIVAT DE GARILHE *et al.*¹² dans leur étude sur la présence éventuelle de groupes NH₂ libres dans l'ocytocine.

RÉSUMÉ

La méthode proposée pour la purification de l'ocytocine fait partie d'un ensemble destiné à obtenir, à partir d'un même lot d'hypophyses de boeuf, d'une part l'ocytocine, d'autre part la vasopressine. Ces deux hormones sont extraites à chaud par l'acide acétique dilué, d'une poudre acétonique de lobes postérieurs d'hypophyses, puis elles sont adsorbées sur silice. L'ocytocine est sélectivement éluée par l'acide acétique dilué, à chaud. Elle est purifiée par des extractions successives par le *n*-butanol et par l'acide acétique dilué. La substance obtenue après lyophilisation contient de 100 à 200 U.I. d'ocytocine, et de 4 à 6 U.I. de vasopressine par mg. La quantité d'ocytocine obtenue sous cette forme est 40 à 45 % de la quantité initialement présente dans les glandes. La substance ainsi préparée est suffisamment propre pour pouvoir être immédiatement soumise à une purification définitive par distribution à contre-courant.

SUMMARY

The method proposed for the purification of ocytocine is a part of a technique used for obtaining ocytocine and vasopressin simultaneously from ox hypophyses. The two hormones are extracted, on heating with dilute acetic acid, from an acetonie powder of posterior hypophyses lobes, then they are adsorbed on silica. Ocytocine is selectively eluted by dilute acetic acid on heating. It is purified by successive extractions with *n*-butanol and dilute acetic acid. The substance obtained after lyophilisation contains 100–200 I.U. ocytocine and 4–6 I.U. vasopressin per mg. The quantity of ocytocine obtained in this way is 40–45 % of the quantity initially present in the glands. The substance thus prepared is sufficiently pure to undergo a final purification by countercurrent distribution.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgeschlagene Methode zur Reinigung von Ocytocin ist ein Teil einer Reinigungsmethode, die bestimmt ist ausgehend von Ochsenhypophysen Ocytocin und Vasopressin nebeneinander zu erhalten. Diese zwei Hormone werden in der Hitze aus einem mit Aceton getrockneten Hypophysenhinterlappenpulver mit verdünnter Essigsäure extrahiert und dann an Silica absorbiert. Ocytocin wird mit verdünnter Essigsäure in der Hitze trennscharf eluiert. Es wird durch wiederholte Extraktionen mit *n*-Butanol und verdünnter Essigsäure gereinigt. Die nach der Lyophilisation erhaltene Substanz enthält 100–200 i.E. Ocytocin und 4–6 i.E. Vasopressin pro mg. Die in dieser Form erhaltene Menge Ocytocin beträgt 40–45 % der in den Drüsen ursprünglich vorhandenen Menge. Die so erhaltene Substanz ist genügend rein um mit Hilfe von Gegenstromverteilung sogleich einer endgültigen Reinigung unterworfen zu werden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ O. KAMM, T. B. ALDRICH, I. W. GROTE, L. W. ROWE ET E. P. BUGBEE, *J. Am. Chem. Soc.*, 50 (1928) 573.
- ² M. BOCKMÜHL, F. LINDNER ET O. SCHAUMANN, D.R.P., 550.935 (1932).
- ³ A. M. POTTS ET T. F. GALLAGHER, *J. Biol. Chem.*, 154 (1944) 349.
- ⁴ K. JUNKMANN, in ABDERHALDEN, *Hdb. Biol. Arbeitsmeth.*, Abt V, Teil 3 B (1935) 1027.
- ⁵ H. MAIER-HÜSER ET K. JUNKMANN, D.R.P. 726.637 (1942).
- ⁶ A. H. LIVERMORE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 365.
- ⁷ R. A. TURNER, J. G. PIERCE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 21.
- ⁸ P. FROMAGEOT ET H. MAIER-HÜSER, *Compt. rend.*, 232 (1951) 2367.
- ⁹ P. FROMAGEOT, R. ACHER, H. CLAUSER ET H. MAIER-HÜSER, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- ¹⁰ F. W. LANDGREBE, M. H. F. MACAULAY ET H. WARING, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, B*, 62 (1946) 202.
- ¹¹ B. ZONDEK ET H. KROHN, *Klin. Wochschr.*, 1932 I, 405.
- ¹² M. PRIVAT DE GARILHE, H. MAIER-HÜSER ET CL. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 471.

Reçu le 1 Septembre, 1952