

Vergleich auch die bisher bekannten Di-n-alkyl-, n-Alkyl/Benzyl- und n-Alkyl/Cyclohexylderivate angeführt sind. Die Reihenfolge richtet sich dabei innerhalb jeder Gruppe ungefähr nach dem zunehmenden Gelbstich der geseiften Färbungen.

Die Analysen wurden von unserer analytischen Abteilung unter Leitung von Herrn Dr. G. Oesterheld durchgeführt.

Wissenschaftliche Laboratorien der Gesellschaft
für Chemische Industrie in Basel,
Farbstoffabteilung.

XXII. Untersuchungen über einige chemische und physiologische Eigenschaften der gonadotropen Wirkstoffe

von F. Benz.

(27. X. 41.)

Die Forschungen der vergangenen zwei Jahrzehnte und insbesondere die Untersuchungen aus jüngster Zeit haben unsere Kenntnisse über Chemie und Physiologie der Wirkstoffe der innersekretorischen Drüsen in erstaunlichem Masse erweitert, und es kann heute zumindestens die chemische Erforschung einer Reihe von wichtigen Hormonen in grundlegender Hinsicht als abgeklärt gelten. Das gleiche lässt sich nicht von den Wirkungen und ihren stofflichen Grundlagen des kleinen, aber äusserst wichtigen Hirnanhangs behaupten, der durch seine innersekretorische Tätigkeit nahezu alle physiologischen Vorgänge des Wirbeltierorganismus beeinflusst. Es ist zwar in letzter Zeit unser Wissen über die Hypophyse und ihre Funktionen durch eine ausserordentlich grosse Anzahl von Untersuchungen, meist physiologischer Art, die in einem umfangreichen Schrifttum ihren Niederschlag gefunden haben, bedeutend erweitert worden; dennoch besteht kein Zweifel über die Tatsache, dass auch heute noch eine Reihe von grundsätzlichen Problemen nicht annähernd einer Lösung entgegengeführt sind, ja, es werden noch immer über eine Vielzahl von entscheidenden Fragen einander widersprechende Auffassungen vertreten. Es gilt sogar für manche Fälle, dass mit fortschreitender Forschung wohl eine Fülle von neuen Erscheinungen bekannt geworden, deren ungezwungene Deutung aber mit Schwierigkeiten verbunden ist, dass ferner Beobachtungen gemacht wurden, die nicht immer mit den bereits vorhandenen, als gesichert geltenden Erkenntnissen in Übereinstimmung zu bringen sind. Das trifft besonders für die Untersuchungen über die Wirk-

stoffe des sogenannten Vorderlappens des Gehirnanhangs zu, Wirkstoffe, die seit einiger Zeit immer mehr in den Mittelpunkt der Hormonforschung rücken.

Eine der Ursachen für diese, zum Teil recht verworrene Lage der Hypophysenvorderlappen-Hormonforschung ist die, dass die physiologischen Wirkungen dieser Stoffe, zufolge der besonderen Stellung der Drüse im endokrinen System, zumeist aussergewöhnlich zusammengesetzter Art sind. Dies zeigt sich darin, dass ausser der Hauptwirkung eines bestimmten Vorderlappenpräparates in der Regel noch Nebenwirkungen auftreten und dass feriner stets Rück- und Wechselwirkungen der angeregten Gewebesysteme festzustellen sind. Dazu kommt der Umstand, dass es zufolge der proteinartigen Natur dieser Wirkstoffe und ihrer damit zusammenhängenden grossen Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenartigsten Einflüssen bis jetzt nicht gelungen ist, auch nur einen einzigen aus der stattlichen Anzahl der beschriebenen Vorderlappenwirkstoffe in reiner Form darzustellen.

Man kann heute zwei grosse Gruppen von Vorderlappenwirkstoffen unterscheiden: die Stoffwechselwirkstoffe und die glandotropen Hormone. Jene üben ihren Einfluss unmittelbar auf Wachstum und Stoffwechselvorgänge aus, diese wirken mittelbar, durch Anregung anderer Drüsen, deren Zellen dadurch gleichfalls zur Bildung und Abgabe von Hormonen, doch anderer Art, veranlasst werden. Zur Gruppe der glandotrop wirksamen Hormone gehören auch die gonadotropen Wirkstoffe, mit deren Untersuchung wir uns seit einiger Zeit beschäftigen.

Es sind viele Stoffe bekannt, die gonadotrope Wirkungen auslösen, je nach ihrer Herkunft weisen sie in dieser Hinsicht grundsätzliche Unterschiede auf, doch soll darauf erst später eingegangen werden. Ganz allgemein können die physiologischen Eigenschaften gonadotroper Wirkstoffe, die übrigens nicht geschlechtsspezifisch sind, in folgender Weise beschrieben werden: Einwirkung auf die männlichen und die weiblichen Keimdrüsen im Sinne einer Reifung derselben; das bedeutet also beim weiblichen Wirbeltier bzw. bei der Frau Wachstum und Reifung der Follikel, Follikelsprung, Ovulation und Umwandlung der geplatzten Follikel in Corpora lutea. Diese, nur unter dem Einfluss der gonadotropen Wirkstoffe vor sich gehende Entwicklung des Ovariums zeitigt dann als Folge der in den Follikel- und Gelbkörperzellen angeregten Sexualhormonbildung die bekannten abgeleiteten Erscheinungen: Auf- und Abbau der Scheidenschleimhaut, verbunden mit Brunst, Uteruswachstum, Sekretbildung in der Uterushöhle, charakteristische Veränderungen im Endometrium und, mit diesen Vorgängen zusammenhängend, die Änderungen an den sekundären Geschlechtsmerkmalen, Erscheinungen also, die den Geschlechtscyclus bedingen.

Die männlichen Keimdrüsen werden gleichfalls durch die gonadotropen Wirkstoffe stimuliert. Diese veranlassen dort einmal die Reifung des germinativen Hodengewebes und bewirken die Spermogenese, ferner üben sie ihren Einfluss auch auf das Zwischengewebe aus, wodurch die *Leydig'schen* Zellen zur Bildung der männlichen Keimdrüsenhormone angeregt werden, wonach dann das Wachstum der Samenblasen und der andern Anhangsorgane einsetzt.

Nicht alle Versuchstiere, die mit gonadotropen Wirkstoffen behandelt werden, reagieren auf diese entsprechend dem eben angeführten, allgemeinen Schema; warmblütige Tiere verhalten sich anders als Kaltblütler, Vögel werden anders beeinflusst als Säugetiere; aber auch bei nahe verwandten Tierarten, ja sogar zwischen den einzelnen Rassen können weitgehende Unterschiede in der Reaktionsweise auftreten. Begreiflich ist auch, dass sich die Vertreter von Tierarten mit vollem Genitalcyclus andersartig verhalten als solche, die nur oestrischen Cyclus aufweisen. Der geschlechtliche Reifezustand eines Versuchstieres ist gleichfalls von ausschlaggebender Bedeutung für seine Reaktionsfähigkeit; das unreife oder das senile Tier spricht auf die Zufuhr von gonadotropen Extrakten in verschiedener Weise an als das erwachsene, geschlechtsreife Wesen. Der Funktion der eigenen Hypophyse des Versuchstieres muss ganz besondere Beachtung bei der Beurteilung der Wirksamkeit von gonadenstimulierenden Stoffen geschenkt werden; Erscheinungen, die am hypophysektomierten Tier zu beobachten sind, sind nicht gleichartig wie jene, die mit demselben Präparat am Normaltier hervorgerufen werden.

Neben diese, die gonadotrope Wirksamkeit bestimmenden Umstände, treten noch eine ganze Reihe nicht minder wichtiger Einflüsse, die bei der Auswertung des Wirkungsbildes wohl zu beachten sind. Dieses ist nämlich nicht nur von der Menge des angewendeten Extraks und der Dauer der Behandlung abhängig, es wird auch durch die Dosierungsweise und durch die Art der Anwendung sowohl grössenmässig als auch qualitativ beeinflusst. Es ist durchaus nicht gleichgültig, ob eine bestimmte Extraktmenge auf einmal oder in unterteilter Dosierung zugeführt wird; die Anwendung verschiedener Injektionsformen für ein und dasselbe Präparat führt stets zu unterschiedlichen, oft sogar zu recht sonderbaren Wirkungsergebnissen. So kann zum Beispiel die bei subcutaner Darreichung erzielbare gonadotrope Wirkung eines bestimmten Vorderlappenextraktes durch gleichzeitige intraperitoneale Injektion der gleichen Hormonlösung vollständig aufgehoben werden (sog. Antagonismus). Die gonadenstimulierende Eigenschaft zweier in ihrer Wirkungsweise verschiedenen gonadotropen Stoffe wird unter Umständen durch gleichzeitige Darreichung beider um ein Vielfaches der Einzelwirkung gesteigert (Synergismus von Schwangerenharn- und

Hypophysenpräparaten). Aber auch Substanzen, die, für sich allein gegeben, keinerlei Einfluss auf die Gonaden ausüben, wie z. B. gewisse Proteine und Schwermetallsalze, können zusammen mit bestimmten gonadenstimulierenden Wirkstoffen diese in ihrer Wirkung ausserordentlich verstärken (Aktivierung, wahrscheinlich zum grössten Teil durch Resorptionsverzögerung bedingt). Der zuletzt angeführten Erscheinung der Aktivierung muss bei der Auswertung dieser Gruppe von gonadotropen Wirkstoffen besondere Beachtung geschenkt werden. Alle die erwähnten Begleitumstände machen es übrigens begreiflich, dass ein einwandfreier Vergleich der physiologischen Wirkungen gonadotroper Extrakte nur bei Einhaltung absolut gleicher Versuchsbedingungen möglich ist.

Wie bereits erwähnt, sind mehrere Stoffe bekannt, die die Eigenschaft haben, die Gonaden anzuregen. Man kann diese nach ihrer Herkunft in solche hypophysären und solche chorialen Ursprungs einteilen. Die einzelnen Vertreter dieser beiden Gruppen weisen in ihrer physiologischen Wirkung grundsätzliche Unterschiede auf.

Die in der Hypophyse gebildeten gonadotropen Hormone gelangen von ihrem Bildungsort über die Blutbahn zu den Erfolgsorganen, sie werden aber zum Teil auch im Harn ausgeschieden, beim normalen geschlechtstüchtigen Menschen allerdings nur in sehr geringen Mengen; es kann hingegen die Ausscheidung bei verschiedenen Formen von behinderter Keimdrüsensfunktion bedeutend erhöht sein. Die gonadotropen Vorderlappenhormone bewirken die Reifung und die volle Funktion der Keimdrüsen der Wirbeltiere beiderlei Geschlechts. Bei infantilen Tieren verursachen sie die vorzeitige Entwicklung der Geschlechtsfunktionen, bei senilen und hypophysektomierten Tieren erfolgt unter ihrem Einfluss die Wiederherstellung der erloschenen Keimdrüsentätigkeit. Die Frage, ob die Follikelstimulierung (Wachstum der Primordialfollikel bis zur Bildung sprungreifer Follikel) und die Luteinisierung (Umwandlung der Granulosa- und der Thecazellen der geplatzten Follikel in Luteinzellen — Bildung des Gelbkörpers), bzw. beim männlichen Tier die Reifung der Keimzellen, die Spermatogenese und die Entwicklung des Zwischenzellgewebes — zwei verschiedene Phasen der Keimdrüsensentwicklung, die sich nicht nur im histologischen Bild voneinander unterscheiden lassen, sondern denen auch eigene Funktionen entsprechen — durch zwei besondere gonadotrope Vorderlappenhormone, das follikelstimulierende und das luteinisierende Hormon, bedingt sind, ist heute noch sehr umstritten. Es ist aber eine feststehende Tatsache, dass die follikelstimulierende und die luteinisierende Wirkung gonadotroper Stoffe verschiedener Herkunft nicht gleich stark sind, bei dem einen Extrakt überwiegt diese, bei einem andern jene. Es verhalten sich besonders die Vorderlappenextrakte der Drüsen verschiedener Tierarten in dieser Hinsicht sehr

unterschiedlich; bei Pferde-Hypophysenextrakten ist z. B. die follikelstimulierende Eigenschaft sehr ausgeprägt, mit Schafs-Hypophysenpräparaten hingegen kann eine ausgesprochene Luteinisierung erzielt werden. In diesem Sinne darf von einer Artspezifität der Hypophysenwirkstoffe gesprochen werden.

Gonadotrope Wirkstoffe chorialen Ursprungs sind das Prolan und der Wirkstoff aus dem Blute trächtiger Stuten. Prolan, dessen Bildungsstätte die Chorionzellen der Placenta sind, wird während den ersten Schwangerschaftsmonaten der Frau in grossen Mengen mit dem Harn ausgeschieden. Es ist in seinen gonadenstimulierenden Eigenschaften grundverschieden von den gonadotropen Hormonen hypophysärer Herkunft. Prolan hat z. B., im Gegensatz zu diesen, keinen Einfluss auf die Hodenreifung von Vögeln; man kann auch mit Schwangerenharnpräparaten sowohl beim hypophysektomierten weiblichen Nager als auch beim normalen Affen kein Folikelwachstum anregen, während das mit Hypophysenextrakten möglich ist. Die normale infantile Ratte aber reagiert viel empfindlicher auf Prolan, denn auf Vorderlappenhormon; für die Maus trifft das Gegenteil zu. Die Wirkung von Schwangerenharnpräparaten lässt sich auch nicht durch gleichzeitige Injektion von für sich allein unwirksamen Verstärkersubstanzen aktivieren, was mit Hypophysenextrakten möglich ist.

Diese Eigenschaft der Nichtaktivierbarkeit teilt das Prolan mit dem andern gonadotropen Wirkstoff chorialen Ursprungs, der sich aus dem Serum trächtiger Stuten gewinnen lässt. Obwohl dieser Stoff sehr wahrscheinlich das Endometrium und das Choriongewebe zum Bildungsort hat, gleicht er in seinen physiologischen Eigenschaften sonst den Hypophysenhormonen, da sich mit ihm sämtliche Vorderlappenwirkungen erzielen lassen. Stutenblutextrakte wirken auch am hypophysektomierten Tier und bei männlichen Vögeln.

Sowohl vom Prolan des Schwangerenharns als auch vom Stuten-serumwirkstoff sind von der 3. Internationalen Konferenz für die Standardisierung von Hormonen Standardpräparate herausgegeben worden, von denen bestimmte Gewichtsmengen der internationalen Einheit entsprechen.

Da die Reifung und die Entwicklung der Keimdrüse unter dem Einfluss der gonadotropen Wirkstoffe nicht nur von histologischen Änderungen, sondern auch von einer mit steigender Dosis grösser werdenden Gewichtszunahme der Organe begleitet sind, wird es möglich, die gonadotrope Wirkung durch Bestimmung der Organ-gewichte zu messen. Die nachstehenden Abbildungen von Dosis-Wirkungskurven zeigen deutlich, wie sich die Organgewichte (Ovarien, Uterus) mit grösser werdender Dosierung für die verschiedenen Arten von gonadotropen Wirkstoffen in charakteristischer Weise ändern. Es ist meist nicht schwer, an Hand eines solchen Wirkungsbildes

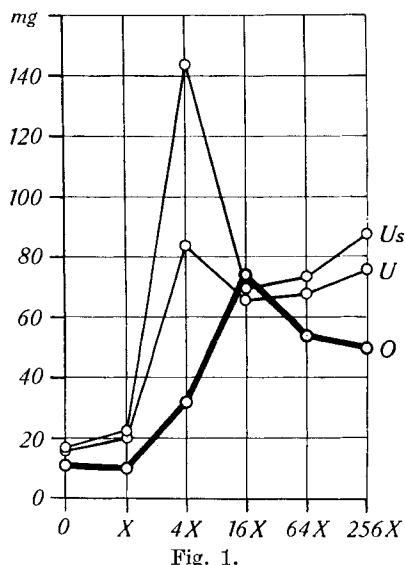
die Herkunft des verwendeten Extrakts festzustellen, zumal wenn man die Uterusgewichte in Beziehung zu den Ovargewichten setzt.

Zu den Versuchen¹⁾ wurden infantile Rattenweibchen in Gruppen von je fünf Tieren je Dosierung, mit einem Körpergewicht von 20—25 g (21 Tage alt), verwendet, die während drei aufeinanderfolgenden Tagen, je zweimal im Tag, mit der Extraktlösung gespritzt wurden. Nach 72 Stunden, von Beginn des Versuches an gerechnet, wurden die Tiere getötet, die Organfrischgewichte bestimmt und die Durchschnittswerte je Tier und je Dosis berechnet.

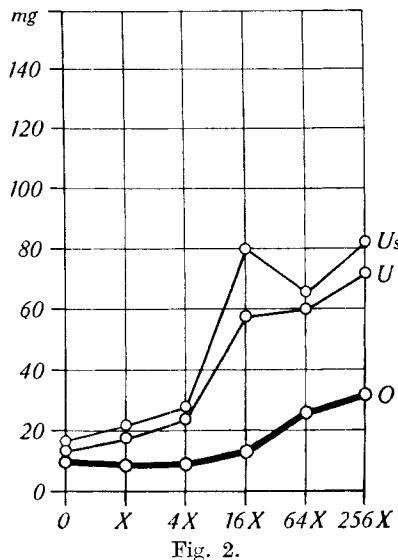
Die zugeführten gonadotrop wirksamen Präparate, wässrige Auszüge, waren vor der Anwendung von der Hauptmenge der mit-extrahierten unwirksamen Begleitproteinen befreit worden. Charakteristisch für das Wirkungsbild der einzelnen Wirkstoffarten ist:

Pferde-Hypophysenextrakt (Fig. 1): Mit zunehmender Dosis rasch ansteigende Ovarien- und Uterusgewichte; starke Sekretbildung.

Schafs-Hypophysenextrakt (Fig. 2): Mäßige Zunahme der Organgewichte; auch bei hohen Dosierungen wenig Sekret in der Uterushöhle. (Ähnliche Kurvenbilder werden mit Extrakten aus Schweine- und Rinder-Hypophysen erhalten.)



Pferde-Hypophysenextrakt.



Schafs-Hypophysenextrakt.

¹⁾ Die Auswertungen wurden in der biologischen Abteilung der *Gesellschaft für chemische Industrie* unter der Leitung von Dr. R. Meier und Prof. Dr. W. Schuler durchgeführt.

Schwangerenharn-Wirkstoff (Prolan) (Fig. 3): Die Ovariengewichte nehmen mit steigender Dosierung nur langsam zu und erreichen keine hohen Werte; die Uterusgewichte dagegen, wachsen viel rascher und auch stärker an, unter Bildung von bedeutenden Mengen Sekret.

Stuten-Serumextrakt (Fig. 4): Ähnliches Wirkungsbild wie mit Pferde-Hypophysenextrakt, die Organgewichte erreichen aber wesentlich höhere Werte.

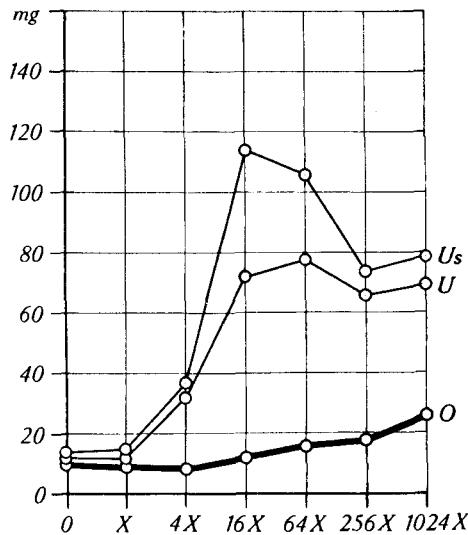


Fig. 3.
Schwangerenharn-Wirkstoff.

Die gonadotropen Wirkstoffe zeigen in physikalischer und in chemischer Hinsicht das charakteristische Verhalten von Proteinen. Es sind aber bei den einzelnen Arten der gonadenstimulierenden Stoffe in den physikalischen und in den allgemein chemischen Eigenschaften (Löslichkeit, isoelektrischer Punkt, Eiweissreaktionen usw.) keine grossen Unterschiede zu beobachten, doch soll hierauf nicht weiter eingegangen werden.

In der Elementarzusammensetzung weisen die gonadenanregenden Substanzen eine Ähnlichkeit mit den Albuminen auf; die einzelnen Vertreter verschiedenen Ursprungs unterscheiden sich darin auch nicht wesentlich voneinander, wie aus der beigegebenen Zusammenstellung zu entnehmen ist. Die in der Tabelle I aufgenommenen Werte¹⁾ beziehen sich zwar nicht auf höchstgereinigte Extrakte, wohl aber geben sie die Zusammensetzung von Präparaten wieder, die nach ähnlichen Verfahren hergestellt worden sind und

¹⁾ Die Analysen sind in unserer mikroanalytischen Abteilung von Dr. H. Gysel ausgeführt worden.

die auf gleicher Reinigungsstufe stehen. Ein geringer Aschegehalt (1—2 Prozent) ist bei der Berechnung der Werte nicht berücksichtigt worden, ebenso hat der Schwefelgehalt einzelner Präparate (etwa 1 Prozent) keine Aufnahme in der Tabelle gefunden.

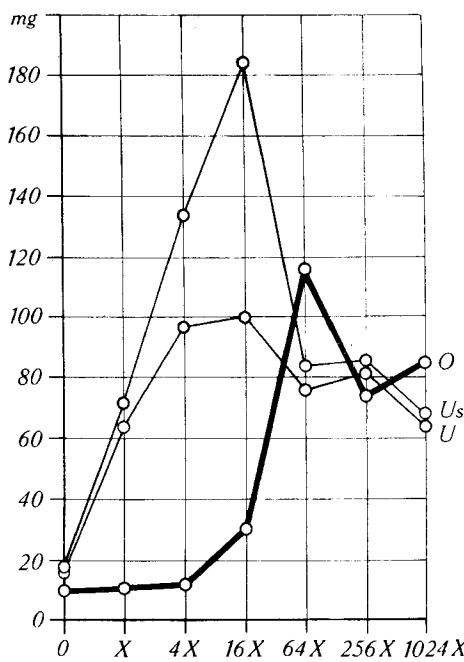


Fig. 4.
Stuten-Serumextrakt.

(In den Figuren sind auf der Abszisse die Dosierung der Präparate und auf der Ordinate die durchschnittlichen Organgewichte aufgetragen. O = Ovarien; Us = Uterus mit Sekret; U = Uterus ohne Sekret.)

Tabelle I.

Bezeichnung des Präparates	Herkunft	% C	% H	% N	% Kohlen- hydrat
243 b	Pferdehypophysen	49,9	8,1	13,9	4,7
78	Schafshypophysen	51,0	7,8	15,3	3,7
175 b	Schweinehypophysen	47,4	6,7	14,5	2,8
168 b	Schwangerenharn	51,1	7,2	13,1	16,0
208 b	Stutenserum	48,1	7,5	11,5	5,7

Ein Umstand, der sowohl die Anreicherung als auch die chemische Bearbeitung der gonadotropen Wirkstoffe in ausserordentlichem Masse erschwert, ist die ungewöhnliche Empfindlichkeit dieser Substanzen gegenüber den verschiedenartigsten Einflüssen. Durch alle

hydrolysierten Mittel (Säuren, Alkalien, proteolytische Fermente) werden sie leicht zerstört; auch zahlreiche andere Reagenzien bewirken schon nach kurzer Einwirkung die vollständige Vernichtung der biologischen Wirksamkeit. Die geringe Beständigkeit der gonaden-anregenden Präparate in gelöstem Zustand, auch bei niedrigeren Temperaturen, wirkt sich bei deren Bearbeitung in recht unangenehmer Weise aus. Wir haben dieses Verhalten am Beispiel eines Pferde-Hypophysenextraktes in den nachstehenden Tabellen II und III zusammengestellt. Die Änderung der gonadotropen Wirksamkeit bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration und die Beständigkeit in wässriger Lösung bei 37° und bei 60° wurde mit unserem biologischen Prüfungsverfahren durch Bestimmung der Ovarienfeuchtgewichte verfolgt.

Tabelle II.

Änderung der gonadotropen Wirksamkeit eines Pferde-Hypophysenpräparates nach 24-stündigem Stehen bei 0° bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Dosierung mg	pH	Ovarien- gewichte
0,1	3	10,2
0,1	4	20,0
0,1	5	28,0
0,1	7	30,6
0,1	9	30,6
0,1	11	23,4
0		9,5

Tabelle III.

Verhalten eines Pferde-Hypophysenpräparates in wässriger, salzfreier Lösung bei 37° und bei 60° und bei verschiedenen Einwirkungszeiten.

Dosierung mg	Temperatur	Zeit	Ovarien- gewicht
0,1	37°	0 Tage	29,6
0,1	37°	1 „	12,2
0,1	37°	3 „	8,6
0,1	37°	6 „	6,2
0,1	60°	15 Min.	18,2
0,1	60°	30 „	13,0
0,1	60°	60 „	11,8
0,1	60°	120 „	9,0

In dem Bestreben, unsere Untersuchungen über die gonadotropen Wirkstoffe, besonders aber die Anreicherung derselben, möglichst unabhängig von dem zeitraubenden und kostspieligen biologischen Prüfungsverfahren zu machen, waren wir bemüht, Unterschiede im

chemischen Verhalten der gereinigten Präparate, den biologisch weniger wirksamen Fraktionen und den unwirksamen Begleitproteinen ausfindig zu machen. Dabei beobachteten wir vor einiger Zeit, dass sämtliche unsere gonadotrop wirksamen Hypophysen- und Schwangerenharnextrakte eine ausgesprochen starke Reaktion nach *Molisch* ergaben, im Gegensatz zu den unwirksamen Proteinen und den andersartig wirkenden Vorderlappenhormonen (*Thyreotropes Hormon, Prolactin*). Diese Farbreaktion war umso ausgeprägter, je wirksamer sich das Präparat im Tierversuch erwies. Ein von *M. Sørensen* und *G. Haugaard*¹⁾ ausgearbeitetes, kolorimetrisches Verfahren setzte uns in den Stand, sowohl die Menge als auch die Art des Zuckeranteils mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen. Wir konnten damals das Vorkommen von beträchtlichen Mengen Mannose oder von Galaktose in unsren Hypophysen- bzw. Schwangerenharnpräparaten feststellen²⁾. Zahlreiche und verschiedenartige Versuche, den kohlenhydrathaltigen Stoff von der wirksamen Substanz zu trennen, verließen ohne Erfolg. Wir vermuteten daher, dass der polysaccharidartige Bestandteil der Extrakte in unmittelbarer Beziehung zu den gonadenanregenden Stoffen stehe, diese also ihrer chemischen Natur nach als Glykoproteine aufzufassen seien.

Das Vorkommen von Mannose und von Galaktose als Bestandteile von Proteinen ist durch die Arbeiten von *Sørensen* und *Haugaard* und durch frühere Untersuchungen bereits bekannt, überraschend ist aber der von uns festgestellte hohe Gehalt der Kohlenhydrate in den gonadotropen Stoffen. Dieser übertrifft den Zuckergehalt der bis jetzt dargestellten Glykoproteine um ein Vielfaches.

Unsere Beobachtung ist später von verschiedener Seite bestätigt worden³⁾. *Gurin* und Mitarbeiter ist auch die Reindarstellung von Galaktose aus Hydrolysaten gonadotroper Schwangerenharnpräparate gelungen. Einige dieser Forscher haben auch den Gehalt an Hexosamin in solchen Extrakten bestimmt.

Wir haben in der Folge zahlreiche gonadotrop wirksame Präparate verschiedenen Ursprungs und verschiedener Herstellungsart mit dem erwähnten kolorimetrischen Bestimmungsverfahren auf ihren Kohlenhydratgehalt geprüft. Fast stets hat es sich bestätigt, dass der Zuckeranteil eines Extraks umso grösser war, je höher dessen Wirksamkeit im Tierversuch befunden wurde. Die Tatsache, dass man gelegentlich dennoch auf Fraktionen stösst, für die diese

¹⁾ *Bioch. Z.* **260**, 247 (1933).

²⁾ *M. Hartmann* und *F. Benz*, *Nature*, **142**, 115 (1938).

³⁾ *G. Fleischer*, *F. Schwenk* und *K. Meyer*, *Nature* **142**, 835 (1938); *W. H. McShan* und *R. K. Meyer*, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **40**, 701 (1939); *H. M. Evans*, *H. Fraenkel-Conrat*, *M. E. Simpson* und *C. H. Li*, *Science* **89**, 249 (1939); *S. Gurin*, *C. Bachman* und *D. W. Wilson*, *J. Biol. Chem.* **133**, 467 (1940).

Regel keine Gültigkeit besitzt, dass ferner öfters die biologische Wirksamkeit nicht im gleichen Masse wie der Kohlenhydratgehalt ansteigt und dass in manchen Fällen im Verlaufe der Reinigung nur eine Zunahme des Zuckergehaltes, nicht aber der Wirksamkeit zu beobachten ist, wird verständlich, wenn man die Möglichkeit der leichten Zerstörbarkeit dieser ausserordentlich empfindlichen Stoffe während ihrer Anreicherung in Berücksichtigung zieht. Die Anwesenheit von biologisch unwirksamen Glykoproteinen auch in den höchstgereinigten Präparaten, die sich in physikalischer und in chemischer Hinsicht gleich verhalten wie die Wirkstoffe, wird übrigens durch unsere Untersuchungen nicht ausgeschlossen.

Die Auffassung der gonadotropen Substanzen als Stoffe von glykoproteinartiger Natur macht es begreiflich, dass deren Krystallisation noch nicht gelungen ist, war doch bis heute Versuchen, andere Glykoproteine, die einen wesentlich geringern Zuckeranteil in der Molekel aufweisen, in krystallisierter Form zu gewinnen, ebenfalls kein Erfolg beschieden.

Obwohl der Glykoproteincharakter aller gonadotropen Stoffe durch eine grosse Zahl von Untersuchungen sehr wahrscheinlich gemacht worden ist, bedarf diese Anschauung noch des Beweises. Dieser dürfte wahrscheinlich erst dann geliefert werden können, wenn es einmal gelungen ist, einen der Wirkstoffe in reiner, einheitlicher Form darzustellen. Wir sind bis jetzt noch darauf angewiesen, diese Ansicht mit der Feststellung der engen Beziehungen zwischen Zuckergehalt und Wirksamkeit zu begründen.

Wir waren allerdings schon wiederholt in der Lage, unsere Auffassung durch entsprechende Versuchsergebnisse zu stützen. Es kann in diesem Zusammenhang auf das Resultat eines Überführungsversuches hingewiesen werden, der mit einem unter schonendsten Bedingungen hergestellten Sehafs-Hypophysenextrakt unternommen worden ist. Wir haben dabei das in 0,02-molarem Phosphatpuffer (p_{H} 7,5) aufgelöste Präparat solange bei tiefer Temperatur (+ 3°) und unter gleichbleibenden elektrischen Bedingungen (5 mA; 55 V) im Elektrophoreseapparat nach *Theorell* wandern lassen, bis die Anwesenheit von Eiweisstoffen in der, der Anode am nächsten gelegenen Zelle des U-Rohres nachzuweisen war (5 h.). Der Inhalt der einzelnen Zellen wurde hierauf herausgespült, in aliquoten Anteilen der Mannosegehalt kolorimetrisch bestimmt und zugleich die biologische Wirksamkeit der Lösungen im Rattenversuch geprüft. Wie Fig. 5 zeigt, verlaufen die Durchschnittsganggewichte der behandelten Tiere und der Kohlenhydratgehalt in überraschend guter Übereinstimmung parallel.

Die Frage, ob der Kohlenhydratanteil die sog. prosthetische Gruppe der gonadotropen Wirkstoffe darstellt, war, nachdem in

letzter Zeit die biologische Bedeutung von polysaccharidähnlichen Stoffen (Blutgruppenspezifische Substanzen, Polysaccharidantigene der pathogenen Bakterien) erkannt worden ist, nicht von der Hand zu weisen.

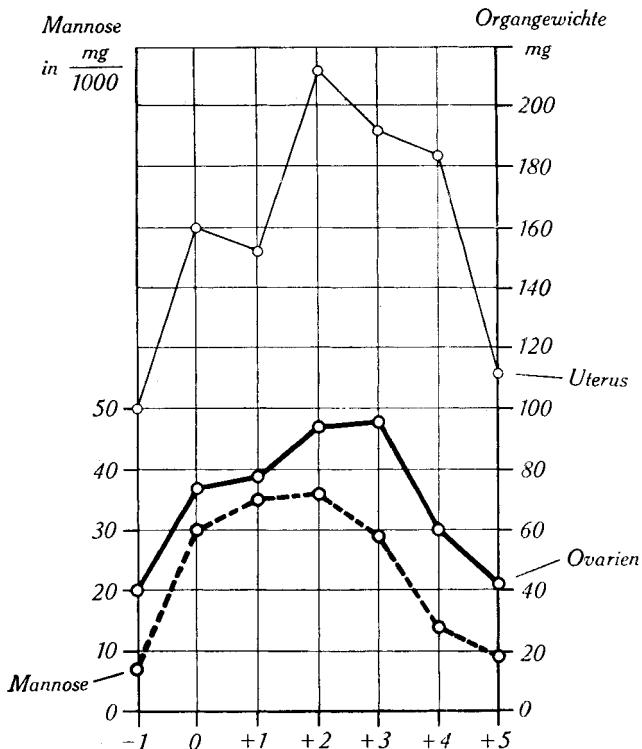


Fig. 5.

Beziehung von Kohlenhydratgehalt und biologischer Wirksamkeit eines gonadotropen Extraktes aus Schafshypophysen.

(In der Figur ist auf der Abszisse die Bezeichnung aufeinanderfolgender Zellen des U-Rohres, beginnend auf der Kathodenseite (Zelle - 1) und endend mit der der Anode am nächsten gelegenen Zelle (+ 5), eingetragen; Zelle 0 = U-förmig gebogenes Rohrstück.)

Wir haben daher in einer grösseren Untersuchungsreihe das Verhalten des Polysaccharidanteils solcher Präparate bei der Zerstörung ihrer Wirksamkeit mit Hilfe des kolorimetrischen Verfahrens einer eingehenden Prüfung unterzogen. Die Versuchsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass die Lösungen der Extrakte nur gerade so lange dem die Wirksamkeit vernichtenden Einfluss ausgesetzt waren, bis sie vollständig unwirksam geworden waren. Als Ergebnis dieser Versuche wurde ermittelt, dass die Einwirkung von erhöhter Temperatur, die Behandlung mit starker Säure, mit Jod und mit Oxydationsmitteln (Kaliumpermanganat, Wasserstoffperoxyd) keine Ver-

minderung des Kohlenhydratgehaltes bewirkten und, soweit sich dies mit dem kolorimetrischen Verfahren feststellen lässt, auch keine chemischen Veränderungen des Zuckeranteils der verwendeten Präparate zur Folge hatten. Es lässt sich in Oxydationsversuchen im Gegenteil zeigen, dass gerade die Polysaccharidgruppierung der beständigeren Teil dieser Glykoproteine ist.

Die ungleiche Wirkungsart der gonadotropen Substanzen liess die Vermutung aufkommen, dass der Kohlenhydratanteil der gonadenstimulierenden Stoffe verschiedener Herkunft nicht gleicher Art ist, wie das bereits für den Schwangerenharn- und den Schafshypophysenwirkstoff bewiesen wurde. Die Untersuchung von gereinigten Extrakten aus Pferde- und Schweinehypophysen hat aber ergeben, dass auch in diesen Präparaten Mannose als Zuckerbestandteil enthalten ist und es ist bei gleich gereinigten Präparaten der Gehalt nicht wesentlich verschieden (vgl. Tab. I). Der Wirkstoff aus dem Serum trächtiger Stuten, der, wie der Schwangerenharnwirkstoff, wahrscheinlich chorialen Ursprungs ist, enthält vermutlich ebenfalls Mannose, doch muss in diesem Falle das Ergebnis durch eine nochmalige Untersuchung mit mehr Material gesichert werden.

Wissenschaftliche Laboratorien der Gesellschaft
für chemische Industrie in Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

XXIII. Grignard-Reaktionen mit Halogen-alkyl-aminen

von A. Marxer.

(27. X. 41.)

Bei dem grossen Anwendungsgebiet, welches die *Grignard*-Reaktion gefunden hat, scheint es auffällig, dass die Herstellung von Magnesium-Verbindungen der zum Teil leicht zugänglichen Halogen-alkylamine bisher noch nicht beschrieben worden ist. In der Tat überzeugten wir uns davon, dass sich z. B. 2-Chlor-äthyl-N-diäthylamin der Formel I mit Magnesium unter den üblichen Bedingungen nicht umsetzt. Trotzdem schien der Einbezug der Halogenalkylamine in den Bereich der *Grignard*-Reaktion interessant genug, um eingehendere Versuche zu unternehmen.

Es bestand die Möglichkeit, dass die Nachbarschaft der elektropositiven Aminogruppe zum elektronegativen Halogen im vorliegenden Falle störend wirken könnte. Es wurden daher auch solche Halogenalkylamine geprüft, in denen Halogen und Aminogruppe weiter auseinander lagen. Die Umsetzungsversuche mit 3-Chlor-