

méthyle préparée à partir de 2,75 gr. de métal. Après une nuit à la température du laboratoire, le produit a été hydrolysé et le terpinéol a été isolé et rectifié par distillation:

$$E_{1,8} = 72^{\circ}; d_4^{20} = 0,9346; n_C^{20} = 1,47808; n_D^{20} = 1,48175; n_F^{20} = 1,48870; (n_F - n_C) \times 10^4 = 98,2; \delta = 104,9; RM_D = 47,00 \text{ (calculée } = 47,23); [\alpha]_D^{20} = -28,60^{\circ}; F. = 36,7^{\circ}$$
<sup>1)</sup>.

*Cétones des essences de bois de rose.* — 100 gr. d'une fraction d'essence de bois de rose du Brésil, titrant 17% en cétones (poids moléculaire 152) par oximation, correspondant à 85 kg d'essence brute, ont été traités au moyen du réactif P de *Girard* et *Sandulesco* de la manière habituelle. Il a été obtenu 10,3 gr. d'un mélange de cétones,  $\alpha_D = -20,08^{\circ}$ , qui a été converti en semicarbazones. Par recristallisations dans l'alcool méthylique, il a été isolé 1,1 gr. de semicarbazone de p-méthyl-acétophénone F. 208—209°, identifiée par l'essai de mélange, et 6,5 gr. de semicarbazone de l-tétrahydro- $\Delta_3$ -p-méthyl-acétophénone, F. 157—157,5°, identifiée de la même manière et dont la solution acétique avait un pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -21,98^{\circ}$  ( $c = 4$ ).

#### RÉSUMÉ.

L'huile essentielle de cabreuva (essence des bois de *Myrocarpus frondosus* et de *M. fastigiatus* Allem.) renferme, en faibles proportions, de l'aldéhyde tétrahydro- $\Delta_3$ -p-toluique, de la p-méthyl-acétophénone et de la l-tétrahydro- $\Delta_3$ -p-méthyl-acétophénone. Ces deux cétones ont été identifiées en proportions très faibles dans l'essence de bois de rose du Brésil (*Aniba rosaedora* var. *amazonica* Ducke) et se trouvent vraisemblablement dans l'essence de bois de rose de Cayenne.

Laboratoires de Recherches de *L. Givaudan & Cie, S.A.*,  
Vernier-Genève.

### 11. Gerinnungsstudien auf Grund der Messung der Sol/Gel Umwandlungszeit

von Ch. Wunderly.

(1. XII. 47.)

Die eingehenden Untersuchungen der Teilreaktionen, welche der endgültigen Gerinnung des Blutplasma vorausgehen, haben gezeigt, dass hier ein komplexes Nebeneinander besteht von enzymatischen Prozessen, chemischen Umsetzungen und physikalisch-chemischen Wechselwirkungen. Eine rationelle Bearbeitung dieser Probleme konnte erst einsetzen, nachdem die präparative Forschung Methoden zur Reindarstellung der einzelnen Gerinnungsfaktoren entwickelt hatte. Damit war die Möglichkeit geschaffen, sich in vitro Gerinnungssysteme zusammenzustellen, die so vereinfacht sind, dass der Messvorgang die erstrebenswerte Eindeutigkeit besitzt.

<sup>1)</sup> La valeur  $d_4^{14} = 0,9475$  indiquée par *Fuller* et *Kenyon* (Soc. 125, 2304 (1924)) est anormalement forte.

Als Basis unserer Untersuchungen wählten wir die sog. 2. Stufe der Gerinnung, d. h. die Koagulation von Fibrinogen zu Fibrin unter der Wirkung von Thrombin. Wenn die beiden Gerinnungsfaktoren Fibrinogen und Thrombin in hinreichender Reinheit vorliegen, so ist die Reaktion bei genau definierten, physikalisch-chemischen Gegebenheiten gut reproduzierbar. Sind Prothrombin oder Thrombokinase am Vorgang beteiligt, so ist dies nicht in gleichem Umfange gewährleistet. Als bald wurde das Mengenverhältnis der beiden Komponenten variiert, die Temperaturabhängigkeit dieses Vorganges geprüft, dann der Einfluss von  $\text{Ca}^{++}$ , von diversen Puffersystemen, von lytropen und hydrolytropen Substanzen, sowie einigen Azofarbstoffen gemessen. Die Versuche waren so angeordnet, dass der Einfluss der zugesetzten Substanzen auf Fibrinogen und auf Thrombin gesondert bestimmt wurde. Auf diese Weise wurden einer absichtlich einfach gewählten Grundreaktion komplizierende Faktoren überlagert.

#### Die Messtechnik.

Als Messvorgang dient die Umwandlungszeit, innert welcher der Gerinnungsansatz zum Gel erstarrt. Wie wir zeigen konnten (*Wunderly*<sup>1)</sup>), ist die so gemessene Zeitperiode mindestens fünfmal länger wie bei den Bestimmungen, welche die Bildung des ersten Fibrinfadens als Endpunkt der Zeitmessung wählen; da es sich um einen raschen Vorgang handelt, wird die Messgenauigkeit durch die Verlängerung der Messdauer gesteigert und subjektive Momente praktisch ausgeschaltet. Ein weiterer Vorteil der von uns geschaffenen Apparatur besteht darin, dass sie bis zu 5 Parallelreaktionen gleichzeitig zu messen gestattet. Dadurch sind Resultate stets der Durchschnitt einer Messreihe. Für die Messung wird aus einer Pipette das Fibrinogensol in den Schenkel *a* des gegabelten Röhrchens (Fig. 1) und anschliessend die frischbereitete Thrombinlösung in den Schenkel *b* fliessen gelassen. Beide Komponenten nehmen nun die Temperatur des Wasserthermostaten an, dessen Niveau bis zur gestrichelten Linie reicht. Der Umwälzthermostat mit einer Leistung von 6 l/Min. hält die Badtemperatur von 30° C mit einer Regelgenauigkeit von  $\pm 0,02^\circ \text{C}$  konstant. Nach 3 Min. wird das Röhrchen so um die Achse *c* gekippt, dass der Inhalt von *b* nach *a* hinüberfliesst, wodurch die beiden Komponenten sich zum Gerinnungsansatz vereinigen (s. Abbildung der kompletten Vorrichtung<sup>2)</sup>). Da der Gerinnungsansatz die Glaswand wenig benetzt, ist es notwendig, gleich nach der Beschickung mit Fibrinogensol den Schenkel *a* durch Drehen und Schwenken (unter Vermeidung von Schaumbildung) mit dem Sol gleichmässig und lückenlos zu benetzen. Es ist dies die Voraussetzung dafür, dass später die Fliessbewegung des kompletten Gerinnungsansatzes fehlerlos verfolgt werden kann. Um die Zeit zu messen,

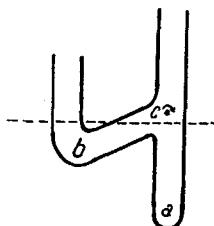


Fig. 1.

<sup>1)</sup> Ch. Wunderly, Experientia III, 257 (1947).

<sup>2)</sup> Ch. Wunderly, Helv. physiol. pharmacol. acta 5, C 38 (1947).

welche zur Sol/Gel-Umwandlung erforderlich ist (S.G.Z.), wird die Stoppuhr ständig in Gang behalten; für das Einkippen wartet man den Zeitpunkt ab, wo die Stoppuhr auf 0 einspielt; auf diese Weise hat man die Hände frei, um durch Drehen der Achse die eingespannten Röhrchen ständig in langsamer Bewegung zu halten. Obwohl die Röhrchen grösstenteils vom Wasser des Thermostat überspült sind, lässt sich der Zeitpunkt der Erstarrung zum Gel sehr genau festlegen. Wenn die Messdauer innerhalb einer Minute liegt, dann sollen die Erstarrungszeiten des Inhaltes von 3 parallel geführten Röhrchen auf 2 Sekunden übereinstimmen. Absichtlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Thrombinkonzentration so gewählt, dass die Sol/Gel-Umwandlung (S.G.Z.) in weniger als einer Minute stattfindet. Die Reproduzierbarkeit von Versuchsreihen liegt unter solchen Verhältnissen bei  $\pm 0,5$  Sekunden.

### Der Messvorgang.

Betrachten wir die beiden Komponenten, deren Reaktion den Messvorgang abgeben, nämlich Fibrinogen und Thrombin, dann ist die Dispersion des Fibrinogensols im Zeitpunkt des Reaktionsbeginnes schwer zu definieren. Denn in gereinigten Fibrinogensolen haben die Fadenmoleküle, welche durchschnittlich 700 Å Länge besitzen (*Oncley, Scatchard und Brown*<sup>1</sup>), stets das Bestreben zur spontanen Denaturation. Je geringer die Globulinreste sind, welche dem Fibrinogenpräparat anhaften, und je salzärmer die Lösung, desto kleiner ist die Stabilität solcher Sole. Somit müssen wir voraussetzen, dass schon vor Reaktionsbeginn im submikroskopischen Größenbereich Molekülordnungsvorgänge einsetzen, welche ähnlich einer Sammelkrystallisation verlaufen. Die Prüfung der Strömungsdoppelbrechung und Viskosität erlaubt diesen Vorgang etwas zu charakterisieren (vgl. *Boehm und Signer*<sup>2</sup>), *Wöhlsch und Clamann*<sup>3</sup>), während Depolarisationsmessungen nicht zum Ziele führten (*Wöhlsch*<sup>4</sup>). Die Längsausrichtung der Hauptvalenzketten führt zu der Bildung einer kolloiden Vorstufe des denaturierten Fibrinogens, nach *Apitz*<sup>5</sup>) Profibrin genannt. Es gelingt durch unvollständige Hitzedenaturation Teile des Fibrinogen in Profibrin überzuführen. Wir möchten annehmen, dass diese Umwandlung langsam auch in der Kälte verläuft und damit die Voraussetzung schafft zur spontanen Denaturation. Im nativen Blutplasma wird die Bildung dieser Vorstufe durch die übrigen Proteine ähnlich gehemmt, wie Thrombin durch Anteile des Albumin inaktiviert wird. Hierzu ist zu bemerken, dass die Bezeichnung Profibrin in diesem Zusammenhang ungenau ist, als es die Vorstufe zum denaturierten Fibrinogen benennen will, während der Ausdruck Fibrin für das Endprodukt der zweiten Phase der Gerinnung des Blutplasma reserviert bleiben sollte. Nachdem es mit chemisch-analytischen Methoden bisher nicht gelingen wollte, charak-

<sup>1)</sup> *J. L. Oncley, G. Scatchard und A. Brown, J. Phys. a. Coll. Chem.* **51**, 184 (1947).

<sup>2)</sup> *G. Boehm und R. Signer, Klin. Wschr.* **1932**, 599.

<sup>3)</sup> *E. Wöhlsch und H. G. Clamann, Z. Biol.* **92**, 462 (1932).

<sup>4)</sup> *E. Wöhlsch, Koll. Z.* **85**, 185 (1938).

<sup>5)</sup> *K. Apitz, Z. exp. Med.* **101**, 552 (1937); **102**, 202 (1937); **105**, 89 (1939).

teristische Unterschiede zwischen denaturiertem Fibrinogen und Fibrin herauszuarbeiten, darf man von der begonnenen Untersuchung mit Roentgenstrahlen eine Differenz der Struktur erwarten (vgl. *Astbury*, 1944<sup>1</sup>)). Für unsere Betrachtung des Messvorganges bleibt wichtig, dass der Lösungszustand des Fibrinogens eine labile Grösse darstellt und dadurch die Definition der Startreaktion erschwert.

Mit dem Zusetzen von Thrombin wird die spontane Denaturierung des Fibrinogens stark beschleunigt. Die Keimbildung verläuft als bimolekulare, homogene Reaktion vorerst langsam und ohne sichtbare Veränderung des Reaktionsgemisches. Das anschliessende Kettenwachstum, das nach *Oster*<sup>2</sup>) als lineare Kondensations-Polymerisation aufzufassen ist, geht viel rascher vor sich. Der Zeitpunkt, wo das Kettenwachstum der Fibrinfäden die Grössenordnung von  $>0,1$  mm erreicht und damit von Auge sichtbar wird, dient der von *Quick*<sup>3</sup>) angegebenen Einstufenmethode als Messwert. Die Durchdringungsstruktur der Fibrinfäden wird rasch stetig dichter, bis die verbleibenden Flüssigkeitsreste in kleinsten Kapillarräumen festgehalten werden. Im Zeitpunkt ihrer Immobilisation hört die Fliessfähigkeit auf und die Sol/Gel-Umwandlung ist vollendet. Das Eintreten des gallertartigen Zustandes bildet den Messwert der von uns entwickelten Methode. Es ist anzunehmen, dass der endgültige Kettenabbruch erst etwas später stattfindet und somit das Kettenwachstum den Zeitpunkt der Gelbildung überdauert. Diese Endphase der Koagulation ist von einer, allerdings kleinen, Trübungszunahme begleitet, welche tyndallmetrisch erfasst werden kann. Jedoch ist nach *Bertrand* und *Quivy* (1946)<sup>4</sup>) für die Trübung der Endphase in erster Linie der Fibrinogengehalt massgeblich und nur in zweiter Linie Änderungen der Fibrinstruktur. Diese Überlagerung verunmöglicht eine genaue Charakterisierung mit optischen Methoden (vgl. *P. Meunier* und *A. Dreyfuss*)<sup>5</sup>).

#### Die Darstellung von Fibrinogen.

Als Gerinnungsferment wurde Thrombin-Roche<sup>6</sup>) verwendet, während das Fibrinogen aus Oxalat-Plasma von Pferd und Rind nach der Methode von *Astrup* und *Darling*<sup>7</sup>) hergestellt wurde. Dazu wird das Oxalatplasma 30 Stunden nach der Blutentnahme zweimal unter Druck durch ein *Seitz*-Filter gepresst, darauf mit einer frischhergestellten und sorgfältig neutralisierten Mischung von Calciumchlorid und Trinatrium-

<sup>1</sup>) *W. T. Astbury*, Proteins, in Colloid Chemistry; J. Alexander 5, 529, New York 1944.

<sup>2</sup>) *G. Oster*, J. Colloid Sci. 2, 291 (1947).

<sup>3</sup>) *A. J. Quick*, The Hemorrhage Diseases. Springfield, U.S.A. 1942, S. 312.

<sup>4</sup>) *J. Bertrand* und *D. Quivy*, Rev. d'Hématol 1, 278 (1946); C. R. Soc. Biol. 138, 212 (1944); 137, 582 (1943).

<sup>5</sup>) *P. Meunier* und *A. Dreyfuss*, Bull. Soc. Chim. Biol. 22, 529 (1940).

<sup>6</sup>) 1 g des Präparates entsprechen 100000 Thrombin-Einheiten nach *Mellanby*; das Präparat wurde von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.*, Basel, in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

<sup>7</sup>) *F. Astrup* und *S. Darling*, Acta Physiol. Scand. 4, 45 (1942).

phosphat behandelt. An dieser Suspension bleibt das restliche Prothrombin adsorbiert, ein Vorgang, den bereits *Bordet* 1920 beschrieben hat. Das sog. *Bordet*-Plasma wird nun abzentrifugiert; 1 Teil davon mit 1,5 Teilen Wasser entsprechend verdünnt und die Mischung auf 2° C abgekühlt. Als bald wird unter Röhren 1 Teil vorgekühltes, gesättigtes Ammoniumsulfat allmählich bei 2° C zufliessen gelassen. Nach 15 Minuten wird das ausgeflockte Protein abzentrifugiert, in ½ Teil NaCl physiol. peptisiert und aus einem Cellophansack bei 2° C gegen eine Lösung von 2% NaCl und 0,1% Na-Oxalat dialysiert. Unter diesen Bedingungen verändert sich das Fibrinogensol, wenigstens äußerlich gesehen, während 10—12 Tagen nicht; *Owren*<sup>1)</sup> nimmt an, dass durch die erhöhte Salzkonzentration das gebildete Profibrin in Lösung gehalten wird. Er zeigte, wie sich während den ersten Tagen nach der Herstellung von Fibrinogen (bei 2° C) allmählich Profibrin bildet und dieses durch Adsorption an 5% Kaolin oder 2% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> entfernt werden kann. Das von uns hergestellte Fibrinogensol zeigte auch nach 10 Tagen keine Gerinnung, wenn man es mit Thrombokinase und CaCl<sub>2</sub> zusammenbrachte; dagegen mussten wir feststellen, dass das Sol schon nach 30 Stunden bei der Benetzung trockener Glasflächen denaturiert wird. Es zeigt sich dies besonders auffällig bei Messungen im *Ostwald*-Viskosimeter, welche deshalb nur innert 20 Stunden nach Herstellung der Lösungen vorgenommen werden konnten. Immer erfolgte die Denaturierung zuerst in der Kapillare, so dass wir annehmen, dass sich während der langsamten Strömung von der Glasoberfläche aus Richtkräfte auf die Proteinstruktur auswirken. Aus den angeführten Gründen legten wir unseren Messungen mit Fibrinogen einen genauen Stundenplan zu Grunde. Die Darstellung aus *Bordet*-Plasma erfolgte am Morgen, über die Mittagspause wurde das Fibrinogensol dialysiert und der Nachmittag diente den Messungen. Schon am darauffolgenden Tag zeigt die S.G.Z. bei sonst gleichen Bedingungen abweichende Werte. Wird hingegen das Fibrinogen nach *Mellanby* durch Fällung mit Essigsäure bei pH 6,2 bereitet, erhält man stabilere Präparate; jedoch zeigte uns die Elektrophorese als Kontrollanalyse (*Wunderly*<sup>1)</sup>), dass das Protein nur zu 71% aus Fibrinogen besteht. Die übrigen mitgefällten Proteine bestehen zu 2/3 aus γ-Globulin und 1/3 aus β-Globulin. Offensichtlich stabilisieren diese Begleitproteine das Fibrinogensol. Wird Fibrinogen mit 8—10 Vol.-% en Äthanol bei —3° und pH 7 gefällt, so ist die Ausbeute bei Rinderplasma 75—80% (*Edsall*)<sup>2)</sup>; durch Abkühlen der ungereinigten Fibrinogenlösung auf 0° bei pH 6 werden die Begleitproteine unlöslich, so dass man ein Fibrinogen von 98% Reinheit herstellen kann.

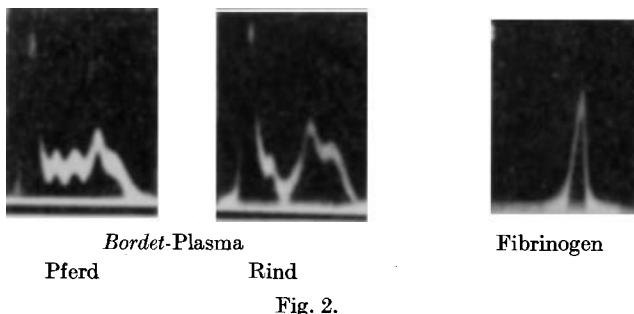


Fig. 2.  
Electrophoresediagramme.

Für die Electrophorese wurden die Tier-Plasma, die aus ihnen gewonnenen *Bordet*-Plasma, sowie das Fibrinogensol gegen *Michaelis*-Puffer mit den Werten pH = 7,9 und  $\mu = 0,1$  bei +2° dialysiert und anschliessend mit 2,5 T. der Pufferlösung verdünnt. Um

<sup>1)</sup> *Paul Owren*, The Coagulation of Blood (Oslo 1947), S. 103 und 133.

<sup>2)</sup> *Ch. Wunderly*, Médecine et Biologie (Liège et Paris 1947), S. 181. — Vgl. *F. Wührmann* und *Ch. Wunderly*, Verh. Schw. Naturf. Ges., Zürich 1946.

<sup>3)</sup> *J. T. Edsall*, Adv. Protein Chem. III, 446 (1947).

eine ausreichende Konzentration zu erlangen, wurde beim Fibrinogensol auf eine Verdünnung verzichtet, dafür das Fibrinogen mit dem Puffer peptisiert. Zur Abbildung gelangen wie üblich die „Descending boundaries“ mit der Wanderungsrichtung von rechts nach links.

**Tabelle 1.**  
Auswertung von Electrophorese-Diagrammen.

	Pferd				Rind				
	Blutplasma		Bordet-Plasma		Blutplasma		Bordet-Plasma		
	rel. %	abs. %	rel. %	abs. %	rel. %	abs. %	rel. %	abs. %	
Albumin . . .	31,8	2,3	36,3	2,3	42,3	2,8	45,5	2,8	
Globulin . .	$\alpha_1$	7,8	0,5	7,3	0,5	5,9	0,4	5,3	0,3
	$\alpha_2$	11,8	0,8	9,7	0,6	10,6	0,7	9,9	0,6
	$\beta_1$	14,9	1,0	14,3	0,9	11,7	0,8	11,1	0,7
	$\beta_2$	7,4	0,5	7,0	0,5				
Fibrinogen $\varphi$ . .	14,7	1,0	14,2	0,9	17,1	1,1	16,4	1,1	
Globulin . .	$\gamma_1$	11,6	0,8	11,2	0,8	5,8	0,3	5,5	0,3
	$\gamma_2$					6,6	0,5	6,9	0,5
		6,9%		6,5%		6,6%		6,3%	

Obige Gehaltsangaben zeigen, wieviel grösser der Fibrinogengehalt der Tierplasma ist, als derjenige des menschlichen Plasma, wo er nur 0,2—0,4 g% erreicht. Deshalb ergeben Tierplasma eine viel bessere Ausbeute an Fibrinogen. Aus Tabelle 1 geht ferner hervor, dass zufolge der Adsorption beim Pferdeplasma die  $\alpha$ -Globuline um 13,4% und die  $\beta$ -Globuline um 4,5% abgenommen haben; beim Rinderplasma ist die Abnahme 11,6% und 5,1%, wobei die Angaben Prozente der relativen Gehalte des Oxalat-Plasmas sind. Vergleichen wir damit die Adsorption, wie wir sie ebenfalls mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Suspension an einem Proteingemisch<sub>[33]</sub> aus Pferdeserum beobachteten (Wunderly<sup>1)</sup>), so erweist sich dieselbe Zunahme der Adsorption in der Reihenfolge  $\beta_1 < \alpha_1 < \alpha_2$ , jedoch sind die adsorbierten Mengen beim Proteingemisch<sub>[33]</sub> viel grösser, nämlich von  $\alpha_1$  17,6%, von  $\alpha_2$  18,3% und von  $\beta_1$  14,3%. Wir sehen darin eine Folge des verminderten Albumingehaltes, der im betreffenden Proteingemisch<sub>[33]</sub> nur 17,9 rel. % ausmacht, und infolgedessen seine schützende und zugleich stabilisierende Funktion nur unvollständig ausüben kann. Denn mehr noch als das native Plasma müssen wir das Proteingemisch<sub>[33]</sub> als polydisperses Mehrkomponentensystem auffassen. Vermöge seiner Eigenschaft Protein-Assoziate zu bilden, fördert Albumin im Plasma die Tendenz zum mono-

<sup>1)</sup> Ch. Wunderly, Helv. **30**, 574 (1947).

dispersen System. Die Auswertung des Fibrinogen-Diagrammes ergab einen Gehalt an Fibrinogen von 97 % und eine Wanderungsgeschwindigkeit  $u = 3,01 \text{ (cm/Sek} \times \text{Volt}) \times 10^5$ .

### Messungen.

#### Die Beziehung zwischen Thrombinkonzentration und Sol/Gel-Umwandlungszeit.

Die bisherigen Untersuchungen der Beziehung zwischen Thrombinkonzentration und (Thrombin)-Gerinnungszeit (siehe Zusammenstellung und Diskussion bei Legler, 1943)<sup>1)</sup> haben erkennen lassen, dass dieser 2. Phase der Blutgerinnung folgende Formulierung zu Grunde liegt:

$$t_t = k \cdot c_t^{-a},$$

wo  $t_t$  die Thrombingerinnungszeit,  $c_t$  die Thrombinkonzentration,  $k$  und  $a$  Konstanten sind. Es war nun zu prüfen, ob die Messwerte, wie sie mit der Sol/Gel-Umwandlung bestimmt werden, ebenfalls diesem Gesetz der Reaktionskinetik gehorchen.

Dazu wurden 10 mg Thrombin in 20 cm<sup>3</sup> NaCl phys. gelöst; somit waren in 0,1 cm<sup>3</sup> der Lösung 50 *Mellanby*-Einheiten enthalten. Durch Verdünnen dieser Stammlösung wurden ferner Thrombinlösungen mit 30, 20 und 10 ME in 0,1 cm<sup>3</sup> bereitgestellt. In den Schenkel *a* der Röhrchen gelangte für die Messreihe 1 je 0,2 cm<sup>3</sup> Fibrinogensol und 0,2 cm<sup>3</sup> *Ringer*-Lösung, für Messreihe 2 je 0,2 cm<sup>3</sup> Fibrinogensol und 0,2 cm<sup>3</sup> 25-proz. Serumalbumin eines salzarmen Präparates<sup>3)</sup>, dessen Reinheit wir mittels der Electrophorese zu 96% ermittelten (s. Wunderly und Wuhrmann, 1947)<sup>3)</sup>; in den Schenkel *b* gelangte je 0,1 cm<sup>3</sup> der verdünnten Thrombinlösungen. Die Kurven der Messreihe 1 (*Ringer*-Lösung) sind in Fig. 3 ausgezogen, diejenigen der Messreihe 2 (Albumin) gestrichelt. Jede Kurve ist durch vier Messpunkte gestützt; für jeden Messpunkt wurden 4 Bestimmungen der S.G.Z. ausgeführt. Die Reproduktionsgenauigkeit ist bei S.G.Z. von über 60 Sekunden etwas erniedrigt, was durch den grösseren Radius der Kreise angedeutet wird. Um die Beziehung zwischen S.G.Z. und Temperatur kennenzulernen, wurden die Messreihen bei 10°, 20°, 30° und 40° durchgeführt.

Die Darstellung auf dem logarithmischen Koordinatennetz der Fig. 3 zeigt deutlich, dass dem Messvorgang das oben verzeichnete Zeitgesetz zu Grunde liegt. Betrachten wir die 4 ausgezogenen Kurven, so besitzen diejenigen bei 10°, 20° und 30° gleiche Exponentialkonstanten  $a$ , denn die 3 Kurven sind ja parallel; erst die Kurve bei 40° weicht beträchtlich davon ab, indem ihr Neigungswinkel zur x-Achse wesentlich grösser geworden ist. Nun zeigen die Versuchsergebnisse von Kugelmass<sup>4)</sup>, welcher die Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen im Temperaturbereich von 4°—35° gemessen hat, wie die Gerinnungszeit um 30° herum am kürzesten ist und bei ca. 33—35° sich wiederum verlangsamt. Unsere Kurve (ausgezogen, Fig. 3) besagt, daß der un-

<sup>1)</sup> R. Legler, Helv. **26**, 1512, 1673 (1943).

<sup>2)</sup> Der Cutter Laboratories (Berkely, Calif., USA.).

<sup>3)</sup> Ch. Wunderly und F. Wuhrmann, Brit. J. Exp. Path. **28**, 286 (1947).

<sup>4)</sup> H. Kugelmass, Arch. int. Physiol. **21**, 139 (1923); vgl. R. Legler, Helv. **26**, 1686 (1943).

verdünnte Gerinnungsansatz mit 50 ME eine S.G.Z. besitzt, die um 0,5 Sekunden kürzer ist wie der entsprechende Wert bei 30°. Dagegen ist die S.G.Z. bei den Thrombinverdünnungen bei 40° verlängert, und zwar um so mehr, als die Verdünnung zunimmt.

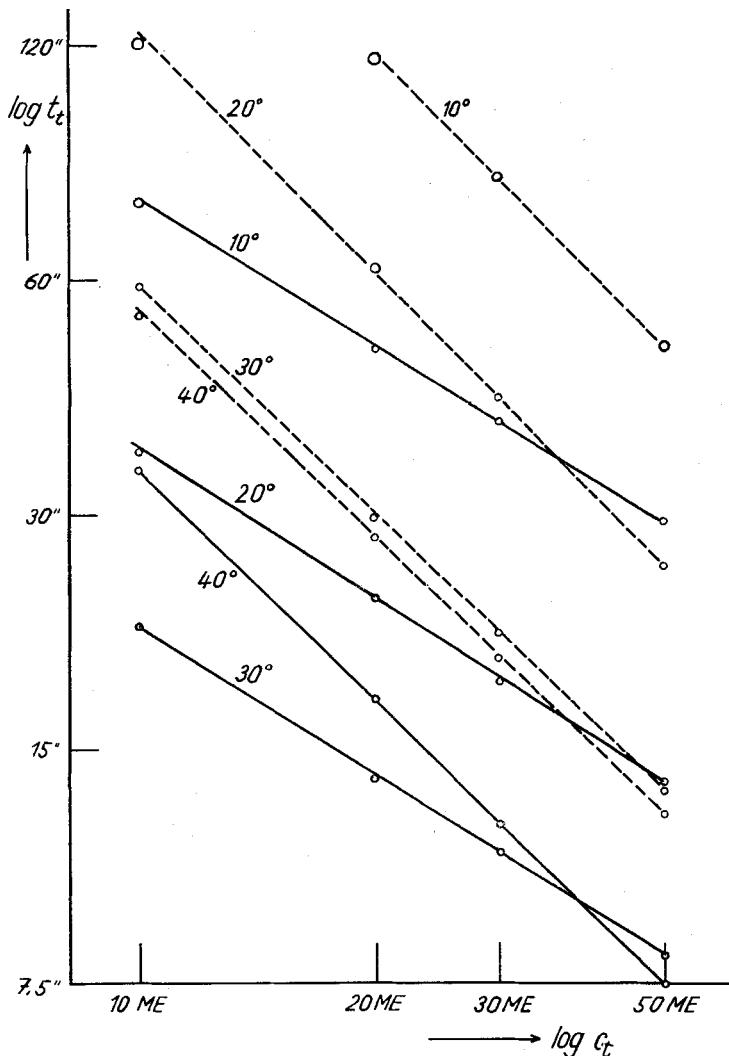


Fig. 3.

Die Abhängigkeit der Sol/Gel-Umwandlungszeit von der Thrombinverdünnung, sowie der Temperatur.

Ausgezogene Kurven: Fibrinogen gelöst in *Ringer-Lösung*.

Gestrichelte Kurven: Fibrinogen gelöst in 25% Albuminsol.

Diese Verlangsamung der Sol/Gel-Transformation wird besonders augenfällig, wenn wir die Temperaturkoeffizienten  $Q_{10}$  berechnen.

Tabelle 2.

Temperatur-intervall	Thrombin-Verdünnung auf					
	30 ME		20 ME		10 ME	
	$t_{(t)}$	$Q_{10}$	$t_{(t)}$	$Q_{10}$	$t_{(t)}$	$Q_{10}$
10°—20°	37 Sek.	2,09	45,0 Sek.	2,09	74,0 Sek.	2,11
20°—30°	18 Sek.	1,80	21,5 Sek.	1,60	35,0 Sek.	1,75
30°—40°	10 Sek.	0,87	13,5 Sek.	0,85	20,1 Sek.	0,61
		11 Sek.	16,0 Sek.		33,0 Sek.	

Im Temperaturintervall von 30—40° werden die  $Q_{10}$ -Werte kleiner wie 1, d. h. negativ. Bei einer Verdünnung des Thrombins auf 30 ME beträgt der Rückgang des  $Q_{10}$ -Wertes von eins, 0,13 Einheiten; bei einer Verdünnung auf 10 ME jedoch schon 0,39 Einheiten.

Bei den Gerinnungsansätzen, welche 10 g% Albumin enthalten, ist der Reaktionsverlauf im ganzen Temperaturintervall verlangsamt. Es ist anzunehmen, dass dies die Folge der erheblich erhöhten Viskosität ist. Auch hier ist der 40°-Wert die kürzeste S.G.Z., jedoch nehmen die 30°- und 40°-Kurven einen parallelen Verlauf. Man erkennt daraus den stabilisierenden Einfluss des Albumins auf den Reaktionsablauf. Noch deutlicher zeigt er sich, wenn wir die Temperaturkoeffizienten vergleichen.

Tabelle 3.

Temperatur-intervall	Versuchsreihe mit:			
	Ringer-Lösung		25-proz. Albuminsol	
	$t_{(t)}$	$Q_{10}$	$t_{(t)}$	$Q_{10}$
10°—20°	29 Sek.	2,23	46 Sek.	1,91
20°—30°	13 Sek.	1,62	24 Sek.	1,84
30°—40°	8 Sek.	1,07	13 Sek.	1,18
	7,5 Sek.		11 Sek.	

Während der Temperaturkoeffizient im Intervall von 10°—30° in den Versuchen mit Ringer-Lösung eine Änderung von 0,61  $Q_{10}$ -Einheiten zeigt, bleibt die Änderung beim Albuminversuch auf 0,07  $Q_{10}$ -Einheiten beschränkt. Es lässt sich denken, dass in diesem Temperaturbereich das Albumin auf das Thrombin eine schützende Funktion ausübt (vgl. Scatchard et al. 1944)<sup>1)</sup>, ähnlich wie es Bayliss und Starlinger<sup>2)</sup> bei Trypsin durch hitzedenaturiertes Ovalbumin oder Pepton beobachteten, und Kleinmann und Stern<sup>3)</sup> bei Kathepsin

<sup>1)</sup> G. Scatchard, et. al., J. Clin. Invest. 83, 445 (1944).

<sup>2)</sup> W. Bayliss und E. Starling, J. Physiol. 30, 601 (1904).

<sup>3)</sup> H. Kleinmann und K. G. Stern, Bioch. Z. 222, 31, 84 (1930).

durch das in den Organextrakten mitgeführte Eigeneiweiss des Ursprungsgewebes. Nachdem unsere  $Q_{10}$ -Werte für die Albuminreihe unter 2 liegen, befinden sie sich eher im Größenbereich der enzymatischen als der chemischen Reaktionen (vgl. *Baldwin*<sup>1)</sup>; so hat *Ege*<sup>2)</sup> für den peptischen Abbau von Edestin  $Q_{10}$ -Werte von 2,0 bei  $10^{\circ}$ – $20^{\circ}$ , 1,8 bei  $20^{\circ}$ – $30^{\circ}$  und 1,6 bei  $30^{\circ}$ – $40^{\circ}$  gefunden.

### Die Wirkung verschiedener Puffersysteme auf die Sol/Gel-Umwandlungszeit.

*Seegers* und *Smith*<sup>3)</sup> haben als optimalen  $p_H$ -Bereich für die 2. Stufe der Blutplasmagerinnung die Werte 7,2–7,5 angegeben. Sie benutzten als Puffer Imidazol/n./10 HCl, der nach *Herbert*<sup>4)</sup> für  $p_H$  7,25 die folgende Zusammensetzung hat: 1,72 g Imidazol + 90 cm<sup>3</sup> n./10 HCl mit Wasser zu 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Pufferlösung ist isotonisch mit Blut. Da uns Imidazol nicht zugänglich war, haben wir die folgenden Puffersysteme durchgemessen:

1. 0,1-n. Essigsäure/0,1-n. Natriumacetat, welches zwar den Nachteil besitzt, nur bis  $p_H$  7 verwendbar zu sein, dagegen noch in 20-facher Verdünnung über eine gute, gleichmässig starke Pufferwirkung verfügt. Im Gerinnungsansatz waren Essigsäure und Natriumacetat 0,01-n.

2. Veronal/Acetat Puffer nach *Michaelis*<sup>5)</sup>. Es ist dem Puffer so viel NaCl zugemischt, dass er die Ionenstärke einer für Blut isotonischen Salzlösung besitzt. Die Pufferwirkung ist um  $p_H$  8 gut, dagegen im  $p_H$ -Bereich 7–5,5 nur mittelmässig.

3. 0,1 mol. Citronensäure/0,2 mol. Dinatriumphosphat nach *Mc Ilvaine*<sup>6)</sup>. Der Puffer enthält Phosphationen und einen verhältnismässig hohen Salzgehalt. Im Gerinnungsansatz ist die Citronensäure 0,025 mol. und das Dinatriumphosphat 0,05 mol.

4.  $\frac{1}{15}$  mol.  $KH_2PO_4$ / $\frac{1}{15}$  mol.  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ . Die Variation der Komponenten ist bei *Kolthoff*<sup>7)</sup> beschrieben; ihre Konzentration im Gerinnungsansatz ist  $\frac{1}{60}$  mol. Die  $p_H$ -Werte wurden mit hochohmiger Glaselektrode kontrolliert. Der Gerinnungsansatz setzte sich zusammen aus 0,2 cm<sup>3</sup> 0,2-proz. Fibrinogensol und 0,1 cm<sup>3</sup> Pufferlösung im Schenkel *a* des gegabelten Röhrchens, sowie 0,1 cm<sup>3</sup> Thrombinlösung im Schenkel *b*, enthaltend 50 Mellanby-Einheiten. Ein Leerversuch bei neutraler Reaktion mit NaCl statt Puffer, hatte die S.G.Z. von 17 Sekunden.

Aus nachstehender Zusammenstellung ergibt sich die bedeutende Verzögerung der S.G.Z. als Folge der Salzwirkung von Phosphationen. Die Gelbildung war hier nicht schlagartig, vielmehr erfolgte die Abnahme der Fliessfähigkeit allmählich während 6–8 Sekunden und war von Auge gut zu verfolgen. Die allmählich gewordene Fibrinstruktur war weitmaschig und bildete weiche Koagula (vgl. *Ferry*

<sup>1)</sup> *E. Baldwin*, Dynamic aspects of Biochemistry, S. 22 (Cambridge 1947).

<sup>2)</sup> *R. Ege*, Z. physiol. Chem. **143**, 159 (1925).

<sup>3)</sup> *W. Seegers* und *H. P. Smith*, Amer. J. Physiol. **137**, 348 (1942).

<sup>4)</sup> *F. K. Herbert*, Biochem. J. **34**, 1554 (1940).

<sup>5)</sup> *L. Michaelis*, J. Biol. Chem. **87**, 33 (1930); Bioch. Z. **234**, 139 (1931).

<sup>6)</sup> *H. McIlvaine*, J. Biol. Chem. **49**, 183 (1921).

<sup>7)</sup> *Kolthoff I. M.*, Säure-Basen-Indikatoren (Berlin 1932).

Tabelle 4.

Bad-temperatur 30°	Puffersystem:			
	1 Essigsäure/ Na-Acetat	2 Veronal/ Acetat	3 Citronen- säure/ Dinatrium- phosphat	4 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 2 H <sub>2</sub> O
$\text{p}_\text{H}$ Sol/Gel-Umwandlungs-Zeiten (S.G.Z.):				
5,3	20 Sek.	4 Min.	52 Min.	
5,6	19 Sek.	1,31 Sek.	39 Min.	47 Min.
6,4	18 Sek.			
6,6			1,3 Sek.	55 Sek.
6,7	17 Sek.	22 Sek.		
7,0	17 Sek.	18 Sek.	47 Sek.	41 Sek.
7,2		17 Sek.	47 Sek.	
7,4		18 Sek.		44 Sek.
7,6		21 Sek.	52 Sek.	53 Sek.

und *Mitarb.*)<sup>1)</sup>). Beim Schütteln liessen dieselben mit Leichtigkeit Flüssigkeit austreten und zogen sich zu kleinen Fibrinklümppchen zusammen. Infolgedessen wurde für die späteren Messungen der Veronal/Acetat-Puffer beibehalten. Dabei ist es für die Routineausführung wichtig, dass die Messdauer der Sol/Gel-Umwandlung im  $\text{p}_\text{H}$ -Bereich 7,0—7,5 als konstant angesehen werden kann. Die Verlängerung der S.G.Z. im sauren Gebiet wird damit erklärt, dass Thrombin bei  $\text{p}_\text{H}$  4,3 sein Flockungsmaximum besitzt, sowie bei  $\text{p}_\text{H}$  3,5 irreversibel inaktiviert wird, was im alkalischen Gebiet erst bei  $\text{p}_\text{H}$  11 stattfindet (*Chargaff*)<sup>2)</sup>.

#### Der Einfluss von Calciumion auf die Sol/Gel-Umwandlungszeit.

Während die Notwendigkeit von Calciumion für das Zustandekommen der ersten Phase der Plasmagerinnung unbestritten ist, wird die Rolle der Calciumionen bei der zweiten Phase verschieden beurteilt. Um hier einen möglichst guten Einblick zu gewinnen, haben wir erst aliquote Mengen von Fibrinogensol mit abgestuften Verdünnungen von  $\text{CaCl}_2$  in NaCl während 15 Minuten bei 18° gehalten (Versuchsreihe 1) und für eine weitere Versuchsreihe 2, ebenso Thrombin für 15 Minuten bei 37°.

Für die Versuche unter 1 wurden im Schenkel *a* 0,2 cm<sup>3</sup> 0,2-proz. Fibrinogensol mit 0,2 cm<sup>3</sup> der  $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}$ -Verdünnungen gemischt; für die Versuche unter 2 im Schenkel *b* des Gerinnungsröhrchens 0,1 cm<sup>3</sup> Thrombinlösung (enthaltend 50 *Mellanby*-Einheiten)

<sup>1)</sup> *J. D. Ferry und P. R. Morrison*, Am. Soc. **69**, 400 (1947); *J. D. Ferry, M. Singer, P. R. Morrison, J. D. Porsche und R. L. Kutz*, Am. Soc. **69**, 409 (1947); *I. R. Morrison*, Am. J. Med. Sci. **211**, 325 (1946).

<sup>2)</sup> *E. Chargaff*, Adv. Enzymology **5**, 43 (1945).

mit  $0,2 \text{ cm}^3$  der  $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}$ -Verdünnungen gemischt und während 15 Minuten auf  $37^\circ$  erwärmt. Nach dem Einkippen hatten die vollständigen Gerinnungsansätze jeweils folgende Zusammensetzung:  $0,2 \text{ cm}^3$  0,15-proz. Fibrinogensol (Pferd)/ $0,2 \text{ cm}^3$   $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}$ -Verdünnungen/- $0,1 \text{ cm}^3$  Thrombinlösung. Der Leerversuch mit  $\text{NaCl}$  statt  $\text{CaCl}_2$  hatte eine S.G.Z. von 41 Sekunden ergeben. Badtemperatur:  $30^\circ$ .

Tabelle 5.

Molarität der zugesetzten $\text{CaCl}_2$ -Lösung	$\text{CaCl}_2$ im Gerinnungs- ansatz mg %	Sol/Gel-Umwandlungszeit	
		Reihe 1	Reihe 2
$1/_{40}$ mol.	112	18 Sek.	12 Sek.
$1/_{120}$ mol.	37	24 Sek.	12 Sek.
$1/_{200}$ mol.	22,4	28 Sek.	13 Sek.
$1/_{300}$ mol.	16,8	33 Sek.	18 Sek.
$1/_{400}$ mol.	11,2	37 Sek.	30 Sek.
Leerversuch . .	—	41 Sek.	41 Sek.

Damit ist gezeigt, dass die zweite Phase der Gerinnung zwar nicht absolut, aber in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit doch wesentlich vom Calciumgehalt des Ansatzes abhängig ist. Der Einfluss des Calcium auf das Thrombin ist grösser als auf das Fibrinogen.

#### Die Beeinflussung der Sol/Gel-Umwandlungszeit durch hydrotrope und lyotrope Substanzen.

Nachdem bereits *Demole*<sup>1)</sup>, *Fischer*<sup>2)</sup> u. a. die Wichtigkeit von  $-\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen für die Verzögerung der Blutgerinnung dargelegt hatten, konnten wir zeigen, dass schon einfach gebaute Substanzen wie  $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{SO}_3\text{Na})_2$  und  $\text{C}_6\text{H}_3(\text{SO}_3\text{Na})_3$  geeignet sind, die S.G.Z. von menschlichem Plasma merklich zu verlängern (*Wunderly*)<sup>3)</sup>. Wir prüften deshalb getrennt den Einfluss obiger Substanzen, sowie von Na-Phenolsulfonat und Na-Salicylat, auf Thrombin und Fibrinogen.

Tabelle 6.

Hydrotrope Substanz im Gerinnungsansatz	Sol/Gel-Umwandlungszeit	
	Reihe 1	Reihe 2
$1/_{25}$ mol. Na-Phenolsulfonat . .	2 Min. 52 Sek.	1 Min. 44 Sek.
$1/_{25}$ mol. Na-Salicylat . . . .	43 Sek.	1 Min. 14 Sek.
$1/_{25}$ mol. $\text{C}_6\text{H}_5(\text{SO}_3\text{Na})$ . . .	16 Sek.	4 Sek.
$1/_{25}$ mol. $\text{C}_6\text{H}_4(\text{SO}_3\text{Na})_2$ . . .	50 Sek.	28 Sek.
$1/_{25}$ mol. $\text{C}_6\text{H}_3(\text{SO}_3\text{Na})_3$ . . .	1 Min. 33 Sek.	47 Sek.
Leerversuch mit $\text{NaCl}$ . . .	17 Sek.	17 Sek.

<sup>1)</sup> *V. Demole* und *M. Reinert*, Arch. exp. Path. Pharm. **158**, 211 (1930).

<sup>2)</sup> *A. Fischer*, Biochem. Z. **240**, 364 (1931).

<sup>3)</sup> *Ch. Wunderly*, Nature **160**, 228 (1947).

Der Gerinnungsansatz hatte die Zusammensetzung:  $0,2 \text{ cm}^3$  0,2% Fibrinogensol +  $0,2 \text{ cm}^3$   $\frac{1}{10}$  mol.-Lösung an hydrotroper Substanz +  $0,1 \text{ cm}^3$  Thrombinlösung (= 50 ME); in Versuchsreihe 1 war das Fibrinogen während 15 Minuten bei  $18^\circ$  mit den hydrotrophen Lösungen in Kontakt, in Reihe 2 das Thrombin während 15 Minuten bei  $37^\circ$ ; Badtemperatur  $30^\circ$ .

Die Wirkung der geprüften Substanzen ist auf Fibrinogen und Thrombin eine recht unterschiedliche. Auf Fibrinogen wirken alle Substanzen — mit Ausnahme des Monosulfonates — verzögernd, auf Thrombin ebenso, jedoch wirkt hier das Monosulfonat sogar beschleunigend. Interessanterweise ist die verzögernde Wirkung des Monosulfonates auch bei der Gerinnung des Blutplasmas am geringsten. Dort wurde eine verzögernde Wirkung in folgender Reihe zunehmend gefunden: Monosulfonat < Salicylat < Disulfonat < Trisulfonat. Somit ist die Verzögerung durch Phenolsulfonat und Salicylat wesentlich grösser, wenn diese Substanzen unmittelbar auf Fibrinogen oder Thrombin, statt auf Oxalatplasma einwirken können. Dagegen bleibt die Reihenfolge in der verzögernden Wirksamkeit von Mono-, Di- und Trisulfonat dieselbe bei Fibrinogen, Thrombin und Plasma.

Wenn wir die Anionen betrachten, wie sie in einer *Hofmeister'schen* Ionenreihe zusammengestellt sind, so finden wir an dem einen Ende der Reihe Anionen wie  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{F}^-$  und  $\text{IO}_3^-$  mit kleinen Ionenradien und entsprechend grossen Wasserhüllen; sie werden von gleichnamig geladenen, hydrophilen Proteinen schwach adsorbiert und wirken dehydrierend. Am anderen Ende der Reihe finden sich Anionen wie  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{I}^-$  und  $\text{NO}_3^-$ , wo die Wasserdipole nur schwach angezogen werden, weil der Abstand des Ionenschwerpunktes von der Ionenoberfläche gross ist; ihre Affinität zu Proteinen ist bedeutend und sie üben auf dieselben eine verflüssigende Wirkung aus. Auf Grund der quantitativen Messung ihrer aussalzenden Wirkung konnten Voet und Buchner<sup>1)</sup> eine Reihe aufstellen, wo jedem Anion, entsprechend seiner lyotropen Nummer, ein Platz zukommt.

Um den Einfluss auf die S.G.Z. kennen zu lernen, wurde für die Messreihe 1 zu  $2,5 \text{ cm}^3$  0,2-proz. Fibrinogensol,  $0,5 \text{ cm}^3$   $\frac{1}{10}$  mol. der Kaliumsalze folgender Anionen  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{IO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  und  $\text{CNS}^-$  für 15 Minuten bei  $20^\circ$  einwirken gelassen. Nach dieser Zeit wurden Viskosität (*Ostwald*-Viskosimeter,  $18^\circ$ ) und die Trübung (Stufenphotometer von Zeiss) gemessen. Zum Gerinnungsansatz wurden je  $0,2 \text{ cm}^3$  dieser Sole mit  $0,2 \text{ cm}^3$  NaCl und  $0,1 \text{ cm}^3$  Thrombinlösung (= 50 ME) in üblicher Weise kombiniert. In Fig. 4 sind die Messpunkte durch ausgezogene Linien verbunden. Für die Messreihe 2 wird erst 1 Teil Thrombinlösung mit 1 Teil der  $\frac{1}{10}$  mol. Kaliumsalze während 15 Minuten bei  $37^\circ$  erwärmt. Der Gerinnungsansatz lautete alsbald:  $0,17 \text{ cm}^3$  0,2-proz. Fibrinogensol/ $0,13 \text{ cm}^3$  NaCl/ $0,2 \text{ cm}^3$  der Mischung von Thrombin und Kaliumsalzen. Diese Zusammensetzung schafft in beiden Messreihen gleiche Konzentrationen an Fibrinogen und Thrombin.

Der Leerversuch ohne lyotrope Substanz besitzt die absichtlich kurz gewählte S.G.Z. von 13,5 Sekunden; damit wird erreicht, dass

<sup>1)</sup> A. Voet und E. H. Buchner, Chem. Reviews **20**, 169 (1937); A. Voet, Trans. Faraday Society **32**, 1301 (1936).

in Messreihe 1 die Einwirkung von lyotroper Substanz auf Thrombin, und ebenso die Messreihe 2 auf Fibrinogen, bescheiden bleibt. Der Verlauf der Trübungskurve (von links nach rechts zu lesen) in Fig. 4

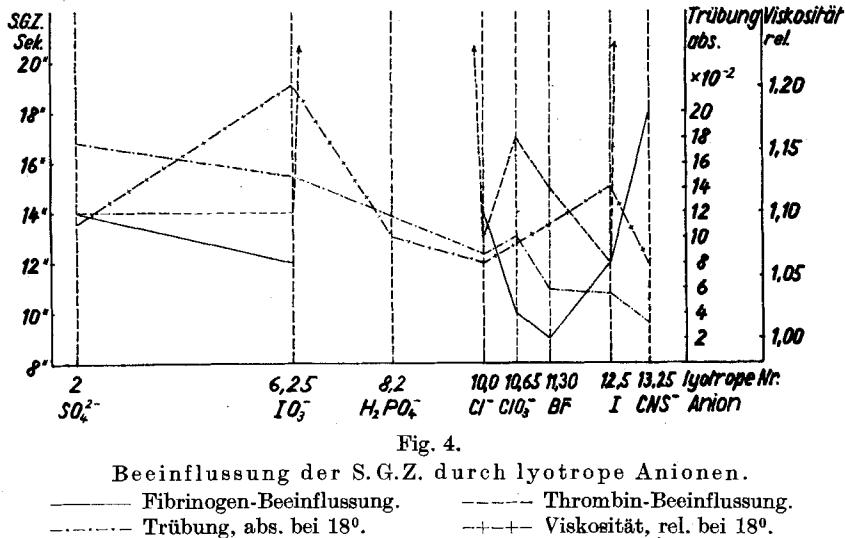


Fig. 4.

Beeinflussung der S.G.Z. durch lyotrope Anionen.

— Fibrinogen-Beeinflussung. - - - Thrombin-Beeinflussung.  
- - - - Trübung, abs. bei 18°. - + - + - Viskosität, rel. bei 18°.

zeigt die gleichmässige Zunahme der Dispersion des Fibrinogensols, wobei einzig  $\text{ClO}_3^-$  etwas aus der Reihe fällt. Weniger einheitlich sind die Ergebnisse der Viskositätsmessung; in Anbetracht der verdünnten Lösungen bleiben die Änderungen der Viskosität ohnehin in bescheidenen Grenzen. Immerhin ist festzustellen, dass zumeist, wenn die Viskosität ansteigt, die entsprechenden S.G.Z. (Fig. 4, ausgezogene Kurve) erniedrigt sind (vgl.  $\text{IO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$  und  $\text{I}^-$ -Werte). Wenn man die Steigerung der Strukturviskosität einer vergrösserten Formanisotropie der Fibrinogenteilchen zuschreibt, dann haben die genannten Anionen die Eigenschaft, die durchschnittliche Länge der Fadenmoleküle zu erhöhen. Den Beweis dafür, dass es sich um eine Längenausdehnung der Teilchen handelt und nicht nur um eine Änderung ihrer Hydratation, sehen wir in der gleichzeitigen Abnahme der Trübung; d. h. die Teilchenzahl nimmt zwar ab, aber der Zuwachs des Einzelteilchens erfolgt anisometrisch und nicht allseitig. Wäre das Teilchenwachstum allseitig, so hätte es eine Zunahme des gestreuten Lichtes zur Folge, dagegen kaum eine Viskositätserhöhung, da das Achsenverhältnis nicht geändert würde. Die beobachtete Erniedrigung der S.G.Z. weist darauf hin, dass das anisometrische Teilchenwachstum eine kolloide Vorstufe der endgültigen Umformung zum Fibrinnetz unter der Wirkung des Thrombins ist. Das letztere wird durch die Salze der Anionenreihe noch stärker beeinflusst wie Fibrinogen (s. Fig. 4, gestrichelte Kurve). Während  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$

zufolge der Blockierung von  $\text{Ca}^{++}$  die S.G.Z. im Fibrinogenversuch auf 41 Minuten verlängert (Leerversuch 13,5 Sekunden), wird das Thrombin so gehemmt, dass überhaupt keine Gerinnung zustande kommt. Darin liegt eine Bestätigung unserer vorerwähnten Versuche mit varierter Calciumkonzentration, wo ebenfalls die Wirkung auf Thrombin grösser gefunden wurde wie auf Fibrinogen. Ähnlich verhält es sich mit CNS'; dort ist die S.G.Z. im Fibrinogenversuch 18 Sekunden, im Thrombinversuch dagegen 3 Minuten 10 Sekunden.

Die erwähnten gerinnungsspezifischen Anomalien machen es unmöglich, die gemessenen Faktoren in eine einfache Korrelation zu bringen, selbst wenn die Abstände der Ordinaten nach Massgabe der lyotropen Eigenschaften der Anionen gestaffelt sind.

### Die Wirkung diverser Farbstoffe auf die Sol/Gel-Umwandlungszeit.

Nach den Untersuchungen von *Huggett*<sup>1)</sup> können Azofarbstoffe beide Phasen der Plasmagerinnung verzögern. Er benutzte für seine Versuche Chlorazol fast pink und Chlorazol sky blue. Da der erstgenannte Farbstoff im Tierversuch nur wenig toxisch ist, benutzen ihn *Kahlson* und *Landby*<sup>2)</sup> (1937), sowie *Modell*<sup>3)</sup> (1939) zu Gerinnungsstudien in vivo. Neuerdings hat *Quivy*<sup>4)</sup> die mathematische Formulierung für die gerinnungsverzögernde Wirkung von Chlorazol fast pink, Toluidinblau und Trypanblau gegeben. Wir haben als weitere Farbstoffe Trypanrot, Benzoblaau, Brillantkresyblau und Evans Blue in den Kreis der Betrachtung gezogen. Wir taten es in der Absicht, den möglichen Zusammenhang zwischen verzögernder Wirkung und Molekulargewicht, Teilchengrösse und Anzahl der Sulfogruppen zu prüfen. Mit Evans Blue haben *Gregersen* und *Gibson*<sup>5)</sup> (1937) eine Technik zur Messung des Blutvolumens entwickelt. *Rawson*<sup>6)</sup> zeigte dann, dass sich Evans Blue insbesondere an Albumin bindet und dies wesentlich stärker wie Niagara Sky Blue und Trypanblau. 1 Mol. Albumin bindet etwa 8—14 Moleküle Evans Blue. Dasselbe ist ein Azofarbstoff der mehrere aromatische Sulfogruppen enthält (s. *Robinson* und *Hodgen*<sup>7)</sup>, *King*<sup>8)</sup> et al., sowie *Walters* et al.<sup>9)</sup>. Von den erwähnten Farbstoffen stellten wir wässrige Lösungen von 100 mg% Gehalt her. Diese Lösungen wurden jeweils für 48 Stunden beiseite gestellt, um eine annähernd gleichmässige Teilchendispersion zu erhalten. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen 1:10 mit NaCl physiol. verdünnt, so dass ihr Gehalt noch 10 mg% beträgt. Wie die Messungen der Mikrodiffusion durch *Benoist* et al.<sup>10)</sup>, *Hanut* et al.<sup>11)</sup>, *Nistler*<sup>12)</sup>, ergeben haben, kann man annehmen, dass die Farbstoffteilchen im Toluidinblau (Oxazinfarbstoff) einen mittleren Radius von

<sup>1)</sup> *St. G. Huggett*, J. Physiol. **80**, 82 (1933); Quart. J. Pharm. **7**, 372 (1934).

<sup>2)</sup> *G. Kahlson* und *E. Landby*, Skand. Arch. Physiol. **77**, 301 (1937).

<sup>3)</sup> *W. Modell*, Science **89**, 349 (1939).

<sup>4)</sup> *D. Quivy*, Evaluation de l'Héparine (Paris 1945).

<sup>5)</sup> *M. I. Gregersen* und *J. G. Gibson*, Amer. J. Physiol. **120**, 494 (1937).

<sup>6)</sup> *R. A. Rawson*, Amer. J. Physiol. **138**, 708 (1943).

<sup>7)</sup> *H. W. Robinson* und *C. G. Hodgen*, J. Biol. Chem. **137**, 239 (1941).

<sup>8)</sup> *B. King*, *K. Cole* und *E. Oppenheimer*, Amer. J. Physiol. **138**, 636 (1942).

<sup>9)</sup> *J. H. Walters*, *R. J. Rossiter* und *H. Lehmann*, Lancet **252**, 244 (1947).

<sup>10)</sup> *H. Benoist*, *V. Golblin* und *W. Kopaczewsky*, Protoplasma (Berl.) **3**, 345 (1928); **5**, 14; **5**, 481 (1929).

<sup>11)</sup> *Ch. Hanut* und *J. F. Fautrez*, Protoplasma **23**, 93 (1935).

<sup>12)</sup> *A. Nistler*, Protoplasma **13** (1931).

0,65 m $\mu$  besitzen, im Brillantkresylblau (Oxazinfarbstoff) von 0,55 m $\mu$  und im Trypanblau (Tolidinfarbstoff) von 0,66 m $\mu$ . Demnach erreichen die Teilchendurchmesser dieser bekannten Vitalfarbstoffe bereits die untere Grenze der kolloiden Dispersion (1 m $\mu$ ), jedoch ist die Teilchengröße beträchtlich abhängig von der Konzentration, der Temperatur und dem Lösungsmittel. Die Farbstoffe unserer 0,01-proz. Farbstofflösungen wurden von Papierrundfiltern (*Schleicher* und *Schüll* 602 extra hart), Cellophan-Säckchen und den Diffusionshülsen obiger Firma restlos zurückgehalten, was mit der Regel übereinstimmt, wonach Moleküle mit 55—70 Atomen schlecht dialysieren und solche mit über 70 Atomen überhaupt nicht (vgl. Höber, 1946)<sup>1)</sup>.

Die Zusammensetzung des Gerinnungsansatzes war die folgende: 0,2 cm<sup>3</sup> 0,2-proz. Fibrinogensol/0,05 cm<sup>3</sup> Veronal/Acetatpuffer vom pH 7,2, 0,2 cm<sup>3</sup> 0,01-proz. Farbstofflösung/0,1 cm<sup>3</sup> Thrombinlösung, enthaltend 50 ME. Im Leerversuch, wo statt Farbstofflösung NaCl zugefügt wurde, war die S.G.Z. 17 Sekunden. Für die Versuchsreihe 2 wurden die Farbstoffe erst an Albumin gebunden, dessen bedeutende Bindefähigkeit von Klotz und Mitarb.<sup>2)</sup> für Methylorange und Azosulfathiazol spektrophotometrisch ermittelt wurde. Dazu wurden 0,8 cm<sup>3</sup> 0,04-proz. Farbstofflösung mit 1 cm<sup>3</sup> 10-proz. Albumin und 0,2 cm<sup>3</sup> Veronal/Acetat-Puffer vom pH 5,7 für 1 Stunde bei 37° gehalten. Als bald wurde 1,2 cm<sup>3</sup> Puffer vom pH 7,2 zugefügt; damit wurde die Lösung 0,01%-ig an Farbstoff. Im Gerinnungsansatz waren 0,2 cm<sup>3</sup> von dieser Albumin/Farbstofflösung/0,2 cm<sup>3</sup> 0,2-proz. Fibrinogenlösung/0,05 cm<sup>3</sup> Veronal/Acetat-Puffer, pH 7,2/0,1 cm<sup>3</sup> Thrombinlösung mit 50 ME.

Tabelle 7.

Badtemperatur 30°, pH 7,2	Mol.-Gew.	Anzahl Atome	Sol/Gel-Umwandlungszeit	
			Reihe 1	Reihe 2
Toluidinblau, bas. . . . .	305	36	23 Sek.	22 Sek.
Brillantkresylblau, bas. . . . .	289	36	17 Sek.	17 Sek.
Trypanrot, sauer, 5-SO <sub>3</sub> H . .	980	82	30 Sek.	31 Sek.
Trypanblau, sauer, 4-SO <sub>3</sub> H . .	936	78	18 Sek.	19 Sek.
Benzoblau, sauer, 2-SO <sub>3</sub> H . .	908	86	20 Sek.	20 Sek.
Evans Blue, sauer . . . . .			*)	21 Sek.
Leerversuch mit NaCl . . . . .	—	—	17 Sek.	17 Sek.

\*) Die S. G. Z. war nicht zu bestimmen, da keine Gelbildung, sondern nur kleiner flockiger Niederschlag.

In der gewählten Konzentration zeigen nur vier Farbstoffe eine verzögernde Wirkung auf die Fibrinogen/Thrombin-Gerinnung, und zwar zunehmend in folgender Reihe: Benzoblau < Evans Blue < Toluidinblau < Trypanrot. Dieses letztere besitzt bezeichnenderweise fünf Sulfogruppen oder einen Schwefelgehalt von 16,3% (Na-Salz des Heparins 13,6% S). Die vorgängige Bindung an Albumin war wirkungslos, ebenso kann aus der Grösse des Mol.-Gew. kein eindeutiger Schluss gezogen werden.

<sup>1)</sup> R. Höber, Physical Chemistry of Cells and Tissues (London 1946), S. 263—265.

<sup>2)</sup> I. M. Klotz, F. M. Walker und R. B. Pivan, Am. Soc. **68**, 1486 (1946); I. M. Klotz, Am. Soc. **68**, 2299 (1946); I. M. Klotz und E. M. Walker, J. Physical Coll. Chem. **51**, 666 (1947).

### Zusammenfassung.

Es wird der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die Gerinnung von Fibrinogen durch Thrombin bestimmt; so die Abhängigkeit von Thrombinverdünnung und Temperatur, die Wirkung verschiedener Puffersysteme, von Calciumion, von hydrotropen und lyotropen Substanzen, ferner von kolloiden Farbstoffsolen.

Als Messwert dient die Bestimmung der Sol/Gel-Umwandlungszeit. Die Versuchsanordnung gestattet die getrennte Messung des Einflusses obiger Faktoren auf Fibrinogen und Thrombin. Es werden die Elektrophorese-Diagramme von *Bordet*-Plasma (Pferd und Rind), sowie von hochgereinigtem Fibrinogen gezeigt.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich.

### 12. Beiträge zum Problem der Ähnlichkeit in der Chemie II

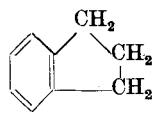
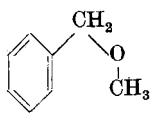
von E. Sorkin, W. Krähenbühl und H. Erlenmeyer.

(3. XII. 47.)

Im Zusammenhang mit der in der vorangegangenen Mitteilung<sup>1)</sup> gegebenen Formulierung des Vitamin-Antivitamin-Problems wird im folgenden über Synthesen berichtet, die unternommen wurden, um neben der durch Isosterie bedingten Verwandtschaft noch zwei weitere Typen von Ähnlichkeitsbeziehungen zur Untersuchung zu bringen.

In beiden Fällen wurden durch die Synthesen Verbindungen gewonnen, die eine strukturchemisch begründete Ähnlichkeit mit dem Thiazolanteil des Vitamin B<sub>1</sub> aufweisen.

Das erste Beispiel ist aus der Ähnlichkeit, die zwischen einer Ring- und der entsprechenden Pseudoringverbindung besteht, hergeleitet. Belegt ist eine solche Verwandtschaftsbeziehung z. B. zwischen dem Verbindungspaar: Benzylmethyläther und Hydrinden. A. W. Stewart und C. L. Wilson<sup>2)</sup> bemerken zur Deutung der ähnlichen Eigenschaften dieser beiden Verbindungen: „If the stereochemical views on the configuration of carbon chains be taken into account, it is possible to see marked general resemblance between the two substances as the following formula I and II will show.“



<sup>1)</sup> Erste Mitteilung siehe H. Erlenmeyer, D. Waldi und E. Sorkin, Helv. 31, 32 (1948).

<sup>2)</sup> Recent Advances in Physical and Inorganic Chemistry, 7. Aufl., 1944, S. 472. Siehe auch Russell und Stewart, Soc. 1929, 2401.