

### Zusammenfassung.

Durch Kultur des *Penicillium*-stammes 889 auf einer Nährösung, die als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Rhamnose enthielt, wurde ein Enzym gebildet, das Proscillarin A in das bisher unzugängliche primäre Aglykon Scillarenin und Rhamnose spaltet. Durch Oxydation der im Scillarenin erhaltenen Hydroxylgruppe an C3 konnte ein  $\alpha, \beta$ -ungesättigtes Keton gewonnen werden, das sich als identisch erwies mit dem Anhydro-telocinobufagon, einem Abbauprodukt des Krötengiftes Telocinobufagin. Da in beiden Präparaten der doppelt ungesättigte sechsgliedrige Lactonring unversehrt geblieben ist, so beweist ihre Identität, dass Scillaglykoside und Krötengifte dieselbe Lactonseitenkette besitzen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium „Sandoz“, Basel.

### 285. Probleme der Blutgerinnung.

4. Mitteilung<sup>1)</sup>.

#### **$\beta$ -Heparin, ein neuer, blutgerinnungshemmender Mucoitinschwefelsäureester**

von R. Marbet und A. Winterstein.

(13. X. 51.)

Bei der Fabrikation von Heparin aus Rinderlungen sind uns in beträchtlicher Menge Nebenprodukte angefallen, die ihrer chemischen Natur nach — ebenso wie Heparin selber — als Mucoitinschwefelsäureester anzusprechen sind. Ihrem physiologischen Verhalten nach unterscheiden sich diese Nebenprodukte vom Heparin durch ihre sehr viel geringere blutgerinnungshemmende Wirkung. Während reinstes Heparin aus Rindslungen (d. h. der Mucoitin-trischwefelsäureester) eine Wirksamkeit von 130 i. E./mg besitzt, weist das Gemisch der Nebenprodukte nur einen Titer von 3 bis 5 i. E./mg auf.

Die nähere Untersuchung dieser Nebenprodukte erscheint sowohl theoretisch als auch praktisch von Interesse. Sie stellen ein ideales Ausgangsmaterial für die Erforschung der Mucopolysaccharide dar, die als integrierende Bestandteile der Grundsubstanzen des Mesenchyms eine wichtige Rolle im Rheumaproblem spielen<sup>2)</sup>. Ferner scheint es denkbar, dass in diesen Nebenfraktionen Zwischenstufen

<sup>1)</sup> 3. Mitteilung, siehe *Helv. physiol. pharmacol. acta* 9, 24 (1951).

<sup>2)</sup> Siehe hiezu *R. Marbet & A. Winterstein, Exper.* 1951 im Druck.

der biologischen Heparinsynthese enthalten sind, die sich besonders gut für die Partialsynthese von Anticoagulantien eignen würden<sup>1)</sup>.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, die Nebenprodukte in reiner Form darzustellen und zu untersuchen, in welchen Beziehungen sie zum Heparin stehen.

Die Fraktionierung zeigte zunächst, dass es sich um ein Sammelsurium verschiedenster Mucopolysaccharide handelt, von denen der grösste Teil sulfiert, ein kleinerer Teil unsulfiert ist. Bis jetzt ist uns die Abtrennung von drei einheitlichen wohldefinierten Verbindungen gelungen. Die eine davon konnten wir auf Grund ihrer chemischen und physiologischen Eigenschaften (keine blutgerinnungshemmende Wirkung) als Knorpel-Chondroitinschwefelsäure, d. h. Chondroitinschwefelsäure A nach *Karl Meyer*<sup>2)</sup> identifizieren. Eine zweite Substanz erwies sich als eine schwefelfreie Hexuronsäure-Aminozuckerverbindung, die sich gegenüber der Chondroitinschwefelsäure durch hohe Viskosität auszeichnet. Diese Substanz ist linksdrehend ( $-40^\circ$ ). Ob es sich dabei um eine Vorstufe der Chondroitinschwefelsäure oder um eine Art Hyaluronsäure handelt, wird die nähere Untersuchung ergeben.

Eine Chondroitinschwefelsäure besonderer Art lässt sich aus dem Gemisch der Nebenprodukte in Form ihres in verdünntem Methanol unlöslichen Zinksalzes abtrennen. Diese Substanz zeigt im Gegensatz zu den bisher bekannten Chondroitinschwefelsäuren eine ausgeprägte blutgerinnungshemmende Wirkung von 36 i.E./mg. Bezuglich der biologischen Wirksamkeit ist diese Verbindung zu den Heparinen zu zählen, während sie, wie die nachfolgenden Befunde zeigen, bezüglich der chemischen Natur zu den Chondroitinschwefelsäuren zu rechnen ist.

Dieses neue Anticoagulans bezeichnen wir als  $\beta$ -Heparin.

Zur Nomenklatur: Die Bezeichnung „Heparin“ wurde 1918 von *Howell & Holt*<sup>3)</sup> für das von *McLean* 1916<sup>4)</sup> aus Hundeleber isolierte physiologische gerinnungshemmende Agens eingeführt. In der Folge zeigte sich, dass in der Natur nicht nur ein Heparin vor kommt, dass also der Begriff „Heparin“ nicht eng umrissen ist. *L. B. Jaques*<sup>5)</sup> hat z. B. gezeigt, dass bezüglich der biologischen Wirksamkeit grosse Unterschiede zwischen den Heparinen verschiedener Tierarten bestehen. Für reinstes Bariumheparinat aus Hundeleber findet er eine Aktivität von 240 i.E./mg, für das Bariumheparinat aus Schafslunge eine solche von 23 i.E./mg. Die Verhältnisse komplizieren sich noch durch die von *Jorpes*<sup>6)</sup> gemachten Feststellungen, wonach ein Heparin aus einer gegebenen Tierart nicht eine einheitliche Verbindung, sondern ein Gemisch von Mucoitinmono-, di-, und trischwefelsäureestern darstellt.

<sup>1)</sup> Wie wir a. a. O. ausführlich darlegen werden, führt die Sulfierung dieser Produkte zu Anticoagulantien, deren Aktivität zum Teil höher liegt als diejenige des internationalen Heparinstandards. (Das Verfahren ist zum Patent angemeldet.)

<sup>2)</sup> *Karl Meyer & M. M. Rapport*, Science **113**, 596 (1951).

<sup>3)</sup> *W. H. Howell & E. Holt*, Am. J. Physiol. **47**, 328 (1918).

<sup>4)</sup> *J. McLean*, Am. J. Physiol. **41**, 250 (1916).

<sup>5)</sup> *L. B. Jaques, E. T. Waters & A. F. Charles*, J. Biol. Chem. **144**, 229 (1942).

<sup>6)</sup> *J. E. Jorpes & S. Gardell*, J. Biol. Chem. **176**, 267 (1948).

Wie wir in unserer dritten Mitteilung<sup>1)</sup> zeigten, erscheint nach parenteraler Verabreichung von Heparin eine beträchtliche Menge von Anticoagulans im Urin. Dieses unterscheidet sich vom applizierten Heparin durch ein wesentlich kleineres Molekulargewicht und geringere Aktivität. Für das aus dem Urin ausgeschiedene Heparin haben Best & Jaques<sup>2)</sup> die Bezeichnung „Uroheparin“ vorgeschlagen.

Das von uns neu aufgefundene Anticoagulans bezeichnen wir als  $\beta$ -Heparin, weil es offenbar  $\beta$ -glukosidische Bindungen besitzt ( $[\alpha]_D = -60^\circ$ ). Für den Heparin-trischwefelsäureester aus Rindslungen, der praktisch mit dem internationalen Heparinstandard identisch ist, wählen wir die Bezeichnung  $\alpha$ -Heparin, da es sich hier um eine Verbindung mit  $\alpha$ -glukosidischen Bindungen handelt ( $[\alpha]_D = +50^\circ$ ).

Die Abtrennung des  $\beta$ -Heparins von den anderen Mucoitinschwefelsäureestern gelang uns auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit der Zink- und Cadmiumsalze des  $\beta$ -Heparins einerseits und des  $\alpha$ -Heparins, sowie der Chondroitinschwefelsäure andererseits. Die Isolierung geschieht im Prinzip in der Weise, dass das  $\beta$ -Heparin aus 45-proz. methylalkoholischer Lösung als Zinksalz niedergeschlagen wird, während  $\alpha$ -Heparin, Chondroitinschwefelsäure und andere Mucoitinschwefelsäureester in Lösung bleiben.

Seiner elementaren Zusammensetzung nach entspricht das  $\beta$ -Heparin der Summenformel  $(C_{14}H_{19}O_{14}NSNa_2)_x$ . Vom  $\alpha$ -Heparin unterscheidet es sich also zunächst dadurch, dass es nicht drei, sondern nur eine Sulfogruppe enthält. Die Summenformel stimmt mit derjenigen der Chondroitinschwefelsäure überein<sup>3)</sup>.

Als Bausteine enthält das  $\beta$ -Heparin Uronsäure, Galaktosamin (Chondrosamin)<sup>4)</sup>, Schwefelsäure und Essigsäure in äquimolarem Verhältnis. Auch hierin lässt sich  $\beta$ -Heparin von der Chondroitinschwefelsäure nicht unterscheiden; es handelt sich somit in beiden Fällen um Mucoitinmonoschwefelsäureester.

Die Toluidinblaureaktion (Metachromasie) fällt bei  $\beta$ -Heparin und Chondroitinschwefelsäure genau gleich aus.

Beachtlich ist die Tatsache, dass  $\beta$ -Heparin im Gegensatz zu  $\alpha$ -Heparin, als Aminozucker nicht Glucosamin, sondern Galaktosamin enthält. Das neue blutgerinnungshemmende Agens gehört somit in die Galaktosaminreihe.

Gemäss den Untersuchungen von Jorpes und Mitarb.<sup>5)</sup> Wolfrom und Mitarb.<sup>6)</sup> sowie von Meyer & Schwartz<sup>7)</sup> ist beim Heparin —

<sup>1)</sup> 3. Mitteilung, siehe Helv. physiol. pharmacol. acta **9**, 24 (1951).

<sup>2)</sup> C. H. Best & L. B. Jaques, Ann. of the New York Acad. of Sci. **49**, 501 (1948).

<sup>3)</sup> K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

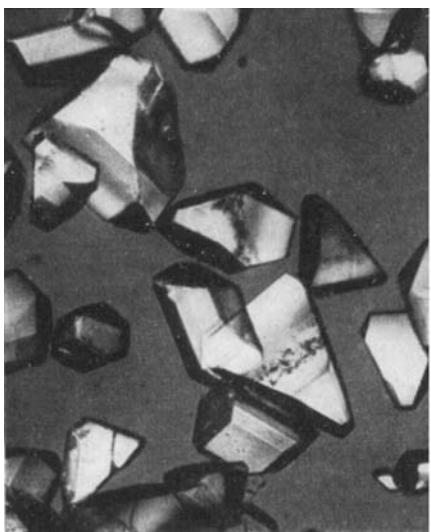
<sup>4)</sup> Die Isolierung von Galaktosamin aus derartigen Verbindungen bereitet bekanntlich gewisse Schwierigkeiten (siehe z. B. J. E. Jorpes & S. Gardell, J. Biol. Chem. **176**, 271 [1948]). Unter Einschaltung einer kleinen Modifikation gelangten wir schliesslich nach dem von Karrer & Mayer (Helv. **20**, 407 [1937]) beschriebenen Verfahren in guter Ausbeute zu reinem Galaktosamin.

<sup>5)</sup> J. E. Jorpes, H. Boström & V. Mutt, J. Biol. Chem. **183**, 607 (1950).

<sup>6)</sup> M. L. Wolfrom, D. I. Wiesblatt, J. V. Karabinos, W. H. McNeely & J. McLean, Am. Soc. **65**, 2077 (1943).

<sup>7)</sup> K. H. Meyer & D. E. Schwartz, Helv. **33**, 1651 (1950).

im Gegensatz zu früheren Auffassungen — die Aminogruppe nicht acetyliert, sondern sulfiert. Die hohe Aktivität der Heparin-trischwefelsäure scheint, wie der Arbeit von *Jorpes* und Mitarb. zu entnehmen ist, auf die  $\text{NH}\cdot\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe zurückzuführen zu sein.



Glucosamin, HCl aus  $\alpha$ -Heparin  
(Vergr. 40:1).



Galaktosamin, HCl aus  $\beta$ -Heparin  
(Vergr. 140:1).

Für das  $\beta$ -Heparin konnten wir hingegen folgendes feststellen: Die Aminostickstoffbestimmung nach *Van Slyke* fällt negativ aus; die Aminogruppe ist somit nicht frei. Die Acetylbestimmung ergab, berechnet für eine Acetylgruppe, den nahezu theoretischen Wert von 8,87 %. O-Acetyl ist nicht vorhanden.

$\beta$ -Heparin unterscheidet sich von  $\alpha$ -Heparin also auch dadurch, dass die Aminogruppe nicht sulfiert, sondern acetyliert ist.

Chondroitinschwefelsäure enthält ebenfalls eine acetylierte Aminogruppe<sup>1)</sup>, unterscheidet sich also diesbezüglich nicht von  $\beta$ -Heparin.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen  $\beta$ -Heparin einerseits und  $\alpha$ -Heparin sowie Chondroitinschwefelsäure andererseits besteht in der optischen Aktivität. Der Heparin-trischwefelsäureester ist rechtsdrehend ( $[\alpha]_D = + 50^\circ$ )<sup>2)</sup>, Chondroitinschwefelsäure linksdrehend ( $[\alpha]_D = -30^\circ$ ), während  $\beta$ -Heparin eine Drehung von  $-60^\circ$  aufweist.

Von der Chondroitinschwefelsäure unterscheidet sich das  $\beta$ -Heparin somit ausser der verschiedenen Löslichkeit der Zink-, bzw. Cadmiumsalze vor allem durch die physiologische Wirkung und die optische Aktivität.

<sup>1)</sup> K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

<sup>2)</sup> Siehe z. B. L. B. Jaques, E. T. Waters & A. F. Charles, J. Biol. Chem. **144**, 229 (1942).

*Chargaff* und Mitarb.<sup>1)</sup> haben die These aufgestellt, dass die blutgerinnungshemmende Wirkung derartiger Stoffe abhängig ist vom Sulfierungsgrad und vom Molekulargewicht. Dass der Schwefelgehalt für den Fall der Heparine eine massgebliche Rolle spielt, ist schon verschiedentlich nachgewiesen worden (siehe z. B. *Jorpes & Gardell*<sup>2)</sup>). Über die Beziehung zwischen Molekulargewicht und Aktivität haben wir bei der Untersuchung des sogenannten Uroheparins<sup>3)</sup> einige Anhaltspunkte gewonnen. Prinzipiell ergibt sich, dass mit fallendem Molekulargewicht, bzw. sinkender Viskosität die Aktivität abfällt.

Für das  $\beta$ -Heparin fanden wir folgende Viskosität:

Lösungsmittel .	0,5-n. NaCl	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Konzentration .	0,5%	1,0%	2,0%	3,0%
Z $\eta$ . . . . .	0,274	0,511	0,477	0,439

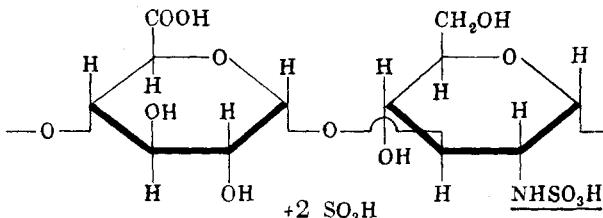
Vergleichsweise untersuchten wir unter den gleichen Bedingungen ein besonders reines Chondroitinschwefelsäurepräparat ( $[\alpha]_D = -32,5^\circ$ ), für welches wir folgende Werte fanden:

Lösungsmittel .	0,5-n. NaCl	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Konzentration .	0,5%	1%	2%	3%
Z $\eta$ . . . . .	0,464	1,125	1,052	1,115

Unter der Voraussetzung, dass auch in diesem Falle die *Staudinger'sche* Beziehung<sup>4)</sup> zwischen Molekulargewicht und Viskosität ihre Geltung hat, ergäbe sich für  $\beta$ -Heparin ein Molekulargewicht, welches nur etwa halb so gross ist als dasjenige der Chondroitinschwefelsäure, für welche *Meyer* und Mitarb.<sup>5)</sup> einen Wert von 27 000—32 900 angeben.  $\beta$ -Heparin würde sich darnach nur wenig von  $\alpha$ -Heparin unterscheiden, dessen Molekulargewicht mit 16 000 angegeben wird<sup>6)</sup>.

Worauf die Tatsache zurückzuführen ist, dass Chondroitinschwefelsäure im Gegensatz zu  $\beta$ -Heparin praktisch keine gerinnungshemmende Wirkung besitzt, können wir zur Zeit noch nicht erklären.

Nach den neuesten Untersuchungen von *Wolfstrom*<sup>7)</sup> sind die Bausteine des Heparins, nämlich Glucosamin und Glucuronsäure, folgendermassen miteinander verknüpft:



<sup>1)</sup> E. Chargaff, F. W. Bancroft & M. Stanley-Brown, J. Biol. Chem. **115**, 165 (1936).

<sup>2)</sup> J. E. Jorpes & S. Gardell, J. Biol. Chem. **176**, 267 (1948).

<sup>3)</sup> 3. Mitteilung, siehe Helv. physiol. pharmacol. acta **9**, 24 (1951).

<sup>4)</sup> H. Staudinger, Die hochpolymeren Verbindungen, Berlin 1932.

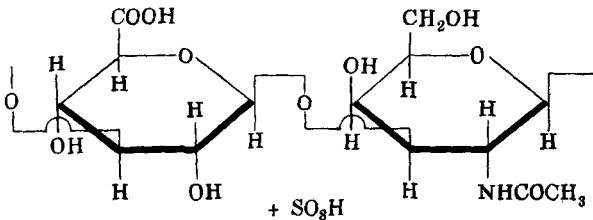
<sup>5)</sup> K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

<sup>6)</sup> R. Jensen, O. Snellmann & B. Sylvén, J. Biol. Chem. **174**, 265 (1948).

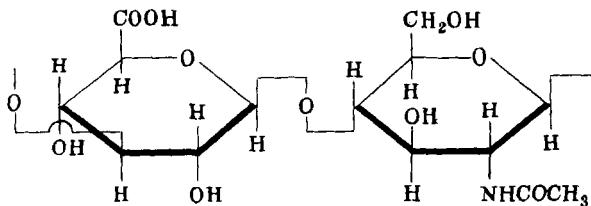
<sup>7)</sup> M. L. Wolfstrom, R. Montgomery, J. V. Karabinos & P. Rathgeb, Am. Soc. **72**, 5796 (1950).

Die Lage der 3 Sulfogruppen für einen Heparin-trischwefelsäure-ester ist noch nicht festgelegt, sicher steht nur, dass die Aminogruppe sulfuryliert<sup>1)</sup> und nicht, wie bei ähnlichen Verbindungen, z. B. Chondroitinschwefelsäure und Hyaluronsäure, acetyliert ist.

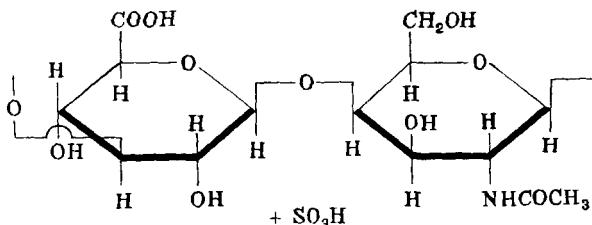
Obiges Formelbild steht in enger Beziehung zu der von Meyer, Odier & Siegrist<sup>2)</sup> für die Chondroitinschwefelsäure aufgestellten Strukturformel,



sowie der von Meyer & Fellig<sup>3)</sup> für die Hyaluronsäure aufgestellten Formel.



Auf Grund der stark negativen Drehung, die auf  $\beta$ -glukosidische Bindungen hindeutet, lässt sich für das  $\beta$ -Heparin in Analogie zu obigen Formelbildern folgende Grundformel zur Diskussion stellen:



### Besprechung der Ergebnisse.

Die Zusammenstellung der physikalischen und chemischen Untersuchungsergebnisse für das  $\beta$ -Heparin ergibt folgendes Bild:

<sup>1)</sup> K. H. Meyer & D. E. Schwartz, Helv. **33**, 1651 (1950).

<sup>2)</sup> K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

<sup>3)</sup> K. H. Meyer & J. Fellig, Exper. **6**, 186 (1950).

$C_{14}H_{19}O_{14}NSNa_2$	Berechnet %	Gefunden %
C . . . . .	33,40	33,18
H . . . . .	3,80	3,66
N ( <i>Dumas</i> ) . . . . .	2,70	2,95
N ( <i>Van Slyke</i> ) . . . . .	0,00	0,00
S ( <i>Carius</i> ) . . . . .	6,37	6,28
S (durch Säurehydrolyse) . . . . .	6,37	5,85
N-Acetyl als $CO \cdot CH_3$ . . . . .	8,55	8,87
O-Acetyl ( <i>Kunz</i> ) . . . . .	0,00	0,00
Na (als Abrauchrückstand) . . . . .	9,14	8,91
Na (als Na-Zn-Uranylacetatsalz) . . . . .	9,14	9,10
Galaktosamin, HCl (präparativ isoliert) . . . . .	42,8	30,5
Uronsäure ( <i>Tollens</i> ) . . . . .	38,5	38,1

Die nähere Untersuchung und die vergleichenden Betrachtungen mit ähnlichen Verbindungen führten zur Erkenntnis, dass das  $\beta$ -Heparin bezüglich seiner biologischen Wirksamkeit dem  $\alpha$ -Heparin ähnelt, während es bezüglich der chemischen Natur eher der Chondroitinschwefelsäure an die Seite zu stellen ist.

Die vergleichenden Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

	$\beta$ -Heparin aus Rinds- lungen	Chondroitin- schwefelsäure aus Knorpel	Hyaluron- säure aus Nabelschnur	$\alpha$ -Heparin aus Rinds- lungen
Aminozucker .	Galaktosamin	Galaktosamin	Glucosamin	Glucosamin
Amino-N. . .	acetyliert	acetyliert	acetyliert	sulfiert
Glukosidische Bindung . .	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$
$[\alpha]_D^{20}$ . . . .	$-60^0$	$-30^0$	$-60^0$	$+50^0$
Sulfogruppen .	1	1	0	3
Gerinnungs- hemmung .	36 i.E./mg	0	0	130 i.E./mg

### Experimenteller Teil.

Isolierung von  $\beta$ -Heparin. Das folgende Schema (S. 2318) gibt einen Überblick über den Weg zur Isolierung und Reinigung von  $\beta$ -Heparin.

1. Stufe: 1 kg des Mucoitinschwefelsäuregemisches wie es aus der Mutterlauge der Heparinherstellung durch Fällen mit Alkohol isoliert werden kann, wird in 11 l 10-proz. Zinkchlorid gelöst und die Lösung mit 9 l Methanol versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und zweimal mit einer Lösung von 5% Zinkchlorid in 45-proz. Methanol ausgewaschen. Der ausgewaschene Rückstand wird mit Methanol und Äther getrocknet.

Ausbeute: 100 g Fraktion A; Aktivität: 20 i.E./mg;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-25^0$

### Tabelle

*1. Stufe:* Behandlung der Heparinnebenprodukte mit Zinkchlorid in 45% Methanol. Reste von  $\alpha$ -Heparin sowie deren Mono- und Disulfosäuren – Chondroitinschwefelsäuren etc. bleiben grösstenteils in Lösung.

$\downarrow$  Überführung des schwerlöslichen Zinksalzes mittels Soda in das Natriumsalz

Faktion A

$[\alpha]_D = -25^\circ$

*2. Stufe:* Fällung mit Bariumacetat in 35-proz. Essigsäure.  $\beta$ -Heparin wird ausgefällt; Chondroitinschwefelsäuren etc. bleiben in Lösung.

$\downarrow$  Überführung des schwerlöslichen Bariumsalzes mittels Soda in das Natriumsalz

Faktion B

$[\alpha]_D = -32^\circ$

*3. Stufe:* Fällung als schwerlösliches Zinksalz in 45-proz. Methanol.

$\downarrow$

Faktion C

$[\alpha]_D = -51^\circ$

*4. Stufe:* Fällung mit Bariumacetat in 25-proz. Essigsäure.

$\downarrow$

Zerlegung mittels Soda

Faktion D =  $\beta$ -Heparin

$[\alpha]_D = -60^\circ$

*2. Stufe:* 100 g Fraktion A werden in 1,8 l Wasser gelöst und mit 600 cm<sup>3</sup> Eisessig versetzt. Dazu gibt man eine 80° warme Lösung von 240 g Bariumacetat in 2,4 l 25-proz. Essigsäure. Es fällt ein schwerlösliches Bariumsalz aus, das abzentrifugiert und zweimal mit einer Lösung von 5% Bariumacetat in 25-proz. Essigsäure ausgewaschen wird. Nun homogenisiert man den Niederschlag mit 1 l Wasser und versetzt mit 1 l 10-proz. Soda-Lösung. Das ausgeschiedene Bariumcarbonat wird abgenutscht, 2mal mit wenig 5-proz. Soda-Lösung ausgewaschen und das Filtrat mit Essigsäure auf pH 6 gestellt. Durch Zusatz von 3 l Methanol erhält man ein noch etwas  $\alpha$ -heparinhaltiges  $\beta$ -Heparin, welches in üblicher Weise mit Alkohol und Äther getrocknet wird.

Ausbeute: 30 g Fraktion B; Aktivität: 50 i.E./mg;  $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$

*3. Stufe:* 30 g Fraktion B werden in 6,2 l einer 10-proz. Zinkchloridlösung gelöst und unter starkem Rühren mit 5 l Methanol versetzt. Das Zinksalz des  $\beta$ -Heparins fällt als voluminöser Niederschlag aus. Man zentrifugiert ab, wäscht den Rückstand so oft mit einer Lösung von 5% Zinkchlorid in 45-proz. Methanol aus, bis eine Probe der Waschlösung beim Versetzen mit dem gleichen Volumen Methanol keine Fällung mehr gibt (Abwesenheit von  $\alpha$ -Heparin). Hierauf trocknet man mit Alkohol und Äther.

Ausbeute: 25 g Fraktion C; Aktivität: 31 i.E./mg;  $[\alpha]_D^{20} = -51^\circ$ .

*4. Stufe:* 25 g Fraktion C werden in 600 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, die Lösung mit 200 cm<sup>3</sup> Eisessig versetzt und das  $\beta$ -Heparin durch Zugabe von 800 cm<sup>3</sup> einer 80° warmen Lösung von 10% Bariumacetat in 25-proz. Essigsäure gefällt. Das Bariumsalz wird abzentrifugiert und so oft mit einer Lösung von 5% Bariumacetat in 25-proz. Essigsäure ausgewaschen, bis eine Probe der Waschlösung beim Versetzen mit dem gleichen Volumen Methanol keine Fällung mehr gibt (Abwesenheit von Chondroitinschwefelsäure). Das vollständig ausgewaschene Bariumsalz des  $\beta$ -Heparins wird mit 250 cm<sup>3</sup> Wasser homogenisiert und mit 250 cm<sup>3</sup> 10-proz. Soda-Lösung versetzt. Durch Nutschen trennt man das Bariumcarbonat ab und fällt aus der auf pH 6 eingestellten Lösung das Natriumsalz des  $\beta$ -Heparins mit 600 cm<sup>3</sup> Methanol aus.

Ausbeute: 20 g Fraktion D; Aktivität: 36 i.E./mg

5,196 mg Substanz gaben 5,380 mg CO<sub>2</sub> und 2,219 mg H<sub>2</sub>O  
 13,220 mg Substanz gaben 0,296 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (22°, 737 mm)  
 19,500 mg Substanz gaben 7,600 mg BaSO<sub>4</sub>  
 31,470 mg Substanz gaben 7,376 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 36,040 mg Substanz gaben 186,760 mg Na-Zn-uranylacetat  
 36,040 mg Substanz gaben beim Trocknen bei 65° und 0,02 mm während 85 Std. einen Gewichtsverlust von 5,342 mg

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>14</sub>NSNa<sub>2</sub> Ber. C 33,44 H 3,80 N 2,70 S 6,37 Na 9,15%  
 Gef. „ 33,18 „ 3,66 „ 2,95 „ 6,28 „ 8,91; 9,10%

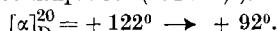
Optische Aktivität: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -60° (c = 2,20 in Wasser)

Aminostickstoff nach *Van Slyke*: Ber. 0,0 Gef. 0,00%

Galaktosamin aus β-Heparin. 10 g β-Heparin werden in 200 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, mit 100 cm<sup>3</sup> Methanol versetzt und aus dieser Lösung das β-Heparin durch Zusatz einer Lösung von 20 g Bariumacetat in 200 cm<sup>3</sup> 33-proz. Methanol ausgefällt. Man wäscht das überschüssige Bariumacetat mit 50-proz. Methanol vollständig aus und trocknet in üblicher Weise mit Alkohol und Äther.

Das Bariumsalz wird in 200 cm<sup>3</sup> 25-proz. Salzsäure gelöst und während 12 Std. am Rückfluss gekocht. Nun versetzt man die dunkel gefärbte Lösung mit 0,5 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure, verröhrt mit 5 g Entfärbungskohle und nutscht ab. Der Rückstand wird 2 mal mit Wasser ausgewaschen und die klare, schwach gelb gefärbte Lösung im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft. Man nimmt in 100 cm<sup>3</sup> Methanol auf, filtriert von etwas ungelösten Anteilen ab und versetzt mit Äther bis zum Auftreten der ersten Trübung. Innert wenigen Std. kristallisiert Galaktosamin-hydrochlorid aus. Durch weitere portionenweise Ätherzugabe kann der Niederschlag verstärkt werden. Ausbeute: 2,6 g.

Durch Eindampfen der Mutterlauge, Lösen in Methanol und Versetzen mit Äther lassen sich weitere 0,45 g isolieren. Totalausbeute: 3,05 g = 71% der Theorie. Umkristallisieren aus Methanol-Äther: Smp. 180° (u. Zers.).<sup>1)</sup> Das Präparat ist mutarotierend:



Zur Analyse wurde 48 Std. im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

23,300 mg Substanz gaben 15,246 mg AgCl  
 7,014 mg Substanz gaben 0,410 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (23,5°, 726 mm)

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>NCl Ber. Cl. 16,45 N 6,49% Gef. Cl 16,19 N 6,43%

*Kristallographische Angaben:* Herrn Dr. Waldmann, Basel, verdanken wir folgende Angaben zu den von ihm gemachten Kristallaufnahmen:

1. *Glucosamin, HCl.* Grobe Kristalle aus Wasser, stellen die reine α-Form dar (Isomerie an C<sub>1</sub>). Lichtbrechung n<sub>α</sub> = 1,561, n<sub>γ</sub> = 1,566. Doppelbrechung extrem niedrig, möglicherweise sehr hohe optische Aktivität des Kristalles. Symmetrie monoklin.<sup>2)</sup>

2. *Galaktosamin, HCl.* Aus alkohol. HCl. Rosetten aus mehr oder weniger breiten Kristallnadeln. Definierte Kristallformen nicht erkennbar. Lichtbrechung n<sub>α</sub> = 1,527, n<sub>γ</sub> = 1,561. Doppelbrechung viel höher als beim Glucosamin, HCl. Die niedrigere Lichtbrechung verläuft in der Nadelachse.

*p-Methoxy-benzalaminogalaktose:* Zur weiteren Charakterisierung des Aminozuckers haben wir die Schiff'sche Base mit Anisaldehyd hergestellt:

1 g Galaktosamin aus β-Heparin wird in 4,5 cm<sup>3</sup> 1-n. Natronlauge gelöst, mit 0,7 cm<sup>3</sup> Anisaldehyd versetzt und 1 Std. geschüttelt. Die Lösung erstarrt zu einem Kristallbrei. Man nutscht ab und wäscht mit Wasser, Alkohol und Äther. Ausbeute: 80% der Theorie. Zur Reinigung wird in Pyridin gelöst und mit Äther gefällt: Smp. 150° (u. Zers.).

Für p-Methoxy-benzalglucosamin, welches nach *Bergmann & Zervas*<sup>3)</sup> bei 166° (korrig.) schmilzt, fanden wir einen Smp. von 164° (u. Zers.). Eine Mischprobe der beiden Präparate ergab einen Smp. von 139—142°.

<sup>1)</sup> Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

<sup>2)</sup> P. Groth, Chemische Krystallographie 3, 440.

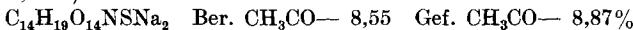
<sup>3)</sup> M. Bergmann & L. Zervas, B. 64, 975 (1931).

*Uronsäure:* Qualitativer Nachweis: Eine 5-proz. Lösung von  $\beta$ -Heparin in 18-proz. Salzsäure gibt beim Erwärmen mit Naphthoresorcin die für Uronsäuren charakteristische blauviolette Färbung (*Tollens*<sup>1)</sup>.

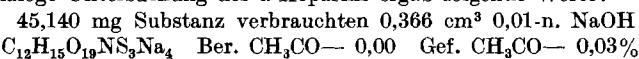
Quantitativer Nachweis: 5,0 g über  $P_2O_5$  getrocknetes  $\beta$ -Heparin werden mit 100 cm<sup>3</sup> 18-proz. Salzsäure 6 Std. in der von *Tollens & Lefèvre*<sup>2)</sup> beschriebenen Apparatur gekocht. Das freigesetzte Kohlendioxyd wird in 5 cm<sup>3</sup> 50-proz. Kalilauge aufgefangen. Nach Beendigung der Reaktion wird die Lauge mit 3 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und das Carbonat durch Zusatz von 100 cm<sup>3</sup> gesättigter Bariumhydroxydlösung ausgefällt. Das Bariumcarbonat wird abgenutscht, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Ausbeute: 1,94 g entspr. 99% der Theorie.

*Sulfosäurenachweis:* Die beim vorigen Versuch im Reaktionsgefäß zurückbleibende salzaure Lösung wird durch Kohle filtriert, die Kohle zweimal mit Wasser ausgewaschen und die Lösung mit überschüssigem Bariumacetat versetzt. Das ausgefällte Bariumsulfat wird in üblicher Weise isoliert. Ausbeute: 2,15 g entspr. 92% der Theorie.

*N-Acetylbestimmung:* Die Acetylbestimmung wurde in der von *Viditz*<sup>3)</sup> beschriebenen Apparatur durchgeführt, wobei für die Verseifung statt Phosphorwolframsäure p-Toluolsulfosäure verwendet wurde. 0,5 cm<sup>3</sup> einer ca. 6-proz. Lösung von  $\beta$ -Heparin werden mit 1 cm<sup>3</sup> einer 25-proz. Lösung von Toluolsulfosäure erwärmt, die Säure durch Zusatz von 0,5 cm<sup>3</sup> 1-n. NaOH abgestumpft und die gebildete Essigsäure abdestilliert. 31,470 mg Substanz (H<sub>2</sub>O-Gehalt 14,82%) verbrauchten 5,540 cm<sup>3</sup> 0,01-n. NaOH (Faktor der Lauge = 0,9968)

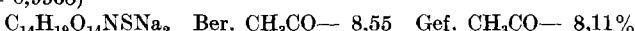


Die analoge Untersuchung des  $\alpha$ -Heparins ergab folgende Werte:



Um auch die Möglichkeit auszuschliessen, dass die gefundene Essigsäure von eventuell beigemengtem Natriumacetat herrührt, haben wir  $\beta$ -Heparin mit kochsalzhaltigem Methanol umgefällt und folgende Werte gefunden:

43,980 mg Substanz (H<sub>2</sub>O-Gehalt 15,25%) verbrauchten 7,02 cm<sup>3</sup> 0,01-n. NaOH (Faktor der Lauge = 0,9968)



*O-Acetylbestimmung:* O-Acetyl konnte nach der Methode von *Kunz & Hudson*<sup>4)</sup> nicht nachgewiesen werden, wie dies bei der Alkalibeständigkeit von  $\beta$ -Heparin zu erwarten ist.

*Aktivitätsbestimmung:* Für die Bestimmung der biologischen Wirksamkeit unserer Präparate benützen wir die von *Studer & Winterstein*<sup>5)</sup> ausgearbeitete Methodik.

*Viskositätsbestimmung:* Die Viskositätsbestimmungen führten wir mit einem Viskosimeter nach *Ostwald* durch (Kapillardicke 0,4 mm, Kapillarlänge 120 mm). Dabei bestimmten wir die Durchfluszeiten von 3,5 cm<sup>3</sup> Lösung bei 25,0°.

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

### Zusammenfassung.

Aus den Nebenprodukten der Heparinherstellung konnte eine bis jetzt noch nicht beschriebene blutgerinnungshemmend wirkende Substanz isoliert werden, die wir als  $\beta$ -Heparin bezeichnen. Sie unterscheidet sich vom bekannten Heparin vor allem dadurch, dass sie als Aminozucker nicht Glucosamin, sondern Galaktosamin enthält.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien  
der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel.

<sup>1)</sup> *B. Tollens*, *B. 41*, 1788 (1908).

<sup>2)</sup> *K. U. Lefèvre & B. Tollens*, *B. 40*, 4513 (1907).

<sup>3)</sup> *F. v. Viditz*, *Mikroch. I*, 326 (1937).

<sup>4)</sup> *A. Kunz & C. S. Hudson*, *Am. Soc. 48*, 1982 (1926).

<sup>5)</sup> *A. Studer & A. Winterstein*, *Helv. physiol. pharmacol. acta 9*, 6 (1951).