

Werk

Label: Periodical issue

Jahr: 1931

PURL: https://resolver.sub.uni-goettingen.de/purl?251726223_1931_0002|log4

Kontakt/Contact

[Digizeitschriften e.V.](#)
SUB Göttingen
Platz der Göttinger Sieben 1
37073 Göttingen

✉ info@digizeitschriften.de

ABHANDLUNGEN
DER GESELLSCHAFT DER WISSENSCHAFTEN ZU GÖTTINGEN
MATHEMATISCH-PHYSIKALISCHE KLASSE. III. FOLGE, HEFT 2

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER
DAS WEIBLICHE SEXUALHORMON
(FOLLIKEL- ODER BRUNSTHORMON)

MIT 7 TAFELN UND 2 TEXTABBILDUNGEN

VON

ADOLF BUTENANDT



BERLIN
WEIDMANNSCHE BUCHHANDLUNG
1931



Vorgelegt von A. WINDAUS in der Sitzung am 20. Dezember 1929.



Druck der Dieterichschen Universitäts-Buchdruckerei (W. Fr. Kaestner) in Göttingen.

Die vorliegende Abhandlung ist eine Zusammenfassung von Arbeitsergebnissen auf dem Gebiet des weiblichen Sexualhormons unter besonderer Berücksichtigung des chemischen Forschungszweiges; sie enthält neben einer historischen Übersicht in erster Linie die — in vielen wesentlichen Folgerungen bereits veröffentlichten — Ergebnisse eigener Arbeiten, welche von Januar 1928 bis Dezember 1930 gemeinsam mit Fräulein E. VON ZIEGNER im Allgemeinen Chemischen Universitätslaboratorium zu Göttingen durchgeführt wurden.

Es sei mir gestattet, Herrn Professor Dr. A. WINDAUS-Göttingen und Herrn Professor Dr. W. SCHOELLER-Berlin herzlich für das Interesse zu danken, mit dem sie meine Untersuchungen stets sehr gefördert haben.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft) und die SCHERING-KAHLBAUM A.-G., Berlin haben die Durchführung der chemischen und biologischen Versuchsreihen durch eine weitgehende Unterstützung ermöglicht; es sei dafür auch an dieser Stelle verbindlichst gedankt.

Göttingen, Allgem. Chem. Univ.-Labor., Dezember 1930.



Einteilung.

	Seite
Einleitung	1
I. Teil	2
Über die Ausfallserscheinungen am lebenden weiblichen Organismus nach Extirpation der Ovarien	3
Transplantationsversuche weiblicher Keimdrüsen und über die Behebung der Ausfallserscheinungen durch Wiedereinpflanzen von Ovarien	4
Über die Behebung von Ausfallserscheinungen durch Injektion von Ova- rialextrakten	5
Über quantitative Erkennungsreaktionen des Hormons	6
1. Der Uteruswachstumstest	7
2. Der Chromtest von BLOTEVOGEL, DOHRN und POLL	7
3. Der Brunst-Zyklus-Test von ALLEN und DOISY	8
Über die Technik des ALLEN-DOISY-Testes	10
Über die Produktionsstätten des Follikelhormons und über seine physio- logischen und pharmakologischen Eigenschaften	13
II. Teil	17
Ovarien- und Plazentaextrakte als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des weiblichen Sexualhormons	18
Eigene Versuche über das Verhalten von Plazentaölen	20
Das Verhalten von Plazentaextrakten bei der Behandlung mit Salzsäure	20
Das Verhalten von Plazentaextrakten bei der Behandlung mit Alkali	22
Über die Anwendung kombinierter Säure- und Alkalibehandlung zur Reinigung von Plazentaröhlen	24
Das Verhalten von Plazentaextrakten bei Entmischungsmethoden mit Lösungsmitteln	26
Einige Versuche an Plazentaextrakten mit Adsorptions- und Fällungsmethoden	27
Die bisherigen Ergebnisse der Plazentabearbeitung	28
Follikelflüssigkeit als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des weib- lichen Sexualhormons	29
Schwangerenharn als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des Fol- likelhormons	31
Eigene Versuche zur Hormonanreicherung mit einem Schwan- gerenharn-Rohöl als Ausgangsmaterial	31
Entmischungsversuche mit Lösungsmitteln	32
Die Verteilung des Hormons zwischen Äther und Alkali und die Beeinflussung des Verteilungsverhältnisses durch saure und alkalische Hydrolyse	34

VI	Einteilung.	Seite
	Adsorptions- und Fällungsversuche an Hormonölen aus Schwangerenarn	37
III. Teil		40
	Eigene Methodik der Reindarstellung des Follikelhormons aus Schwangerenarn	40
	Reinigungsstufe I: Entmischung mit wäßrigem Alkohol-Petroläther	41
	Reinigungsstufe II: Entmischung mit wäßrigem Alkohol-Benzol	42
	Reinigungsstufe III: Die weitere Reinigung des Hormons unter Ausnutzung seines Verhaltens gegen Alkali und Säure	44
	Reinigungsstufe IV: Die Destillation höchst gereinigter Öle im Hochvakuum	45
	Reinigungsstufe V: Die Reinigung der Rohkrystallisate	46
	Die Methodik der Hormondarstellung aus Schwangerenarn nach E. A. DOISY	47
	Die Darstellung krystallinischen Sexualhormons aus Schwangerenarn nach E. LAQUEUR	49
	Über physikalische Eigenschaften des krystallisierten Follikelhormons	50
	Über physiologische Eigenschaften des krystallisierten Follikelhormons	52
	Auswertung des krystallisierten Hormons in Versuchsreihen mit einmaliger Injektion	53
	Auswertung des krystallisierten Hormons in Versuchsreihen mit protrahierter Injektionstechnik	53
	Über weitere physiologische Merkmale des krystallisierten Follikelhormons	55
	Über die Haltbarkeit des Hormons	55
	Über die Chemie des Follikelhormons	56
	Die Ermittlung der Molekularformel	57
	Der Alkoholcharakter des Follikelhormons	57
	1. Der physiologische Nachweis einer Hydroxylgruppe und über die physiologische Wirkung von Hormonestern	57
	2. Der Nachweis der Hydroxylgruppe durch die Darstellung und Untersuchung krystallisierter Ester	60
	Der Keton- und Säurecharakter des Follikelhormons	62
	Über die Hydrierung des Hormons	64
	Über die Darstellung eines zweiten physiologisch wirksamen Hormonkrystallisates aus Schwangerenarn durch G. F. MARRIAN	65
	Über die Eigenschaften des von MARRIAN isolierten Hormonpräparates	66
	Über die Beziehung des von MARRIAN isolierten Stoffes zu den Hormonpräparaten von DOISY und BUTENANDT	69
	Die Überführung des MARRIAN-Krystallisates $C_{18}H_{24}O_3$ in das krystallisierte Follikelhormon $C_{18}H_{22}O_2$	72
	Die Konstitution des Follikelhormons	74
	Zur Nomenklatur	74
Tabellen		76
Literaturverzeichnis		89
Tafeln		95

Vor einem Jahr ist als erstes Sexualhormon das Follikelhormon der Frau in chemisch reinem, krystallisierten Zustand isoliert worden. Mit diesem Ergebnis wurde ein Ziel erreicht, das in vielseitiger dreißigjähriger Forschertätigkeit vorbereitet und angestrebt worden ist.

In bezug auf die verschiedenen Problemstellungen, die bei der Bearbeitung eines Hormons auftreten, hat mit der Reindarstellung des weiblichen Sexualhormons ein Arbeitsabschnitt, in welchem in erster Linie physiologisch-medizinische Fragen zu beantworten waren, seinen Abschluß gefunden; man steht heute im Beginn eines zweiten Forschungsabschnittes, der nunmehr durch die chemische Untersuchung des Hormons, durch Versuche zur Konstitutionsermittlung und Synthese dieses Naturstoffes gekennzeichnet sein wird.

Die vorliegende Arbeit soll eine kurze Darlegung unserer gegenwärtigen Kenntnisse über das Follikelhormon darstellen, sie faßt in ihrem ersten Teil die wesentlichen Ergebnisse des „medizinischen“ Forschungsabschnittes zusammen und zeigt damit den Weg, der die Isolierung des Hormons vorbereitete; im zweiten Teil werden diejenigen chemischen Experimente erörtert, die zum Zweck der Reindarstellung des Hormons durchgeführt wurden, und die eine Methode seiner Gewinnung kennen lehrten; den Inhalt eines dritten Teiles nimmt die Beschreibung der Hormonisolierung und die Besprechung des reinen Hormons und des gegenwärtigen Standes seiner chemischen Konstitutionsermittlung ein.

I.

Die Lehre, daß in der Reihe der Wirbeltiere die Geschlechtsdrüsen neben der Produktion der Keimzellen eine zweite Aufgabe erfüllen, daß sie für normale Entwicklung, für Wachstum und Funktion der Genitalorgane, sowie für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale sorgen, hat schon in der Mitte des vorigen Jahrhunderts ihre Anfänge.

Sie ging aus von Experimenten BERTHOLDS in Göttingen (1849), der erstmalig im Tierversuch zeigte, daß die nach Kastration von Hähnchen einsetzenden Ausfallserscheinungen durch Wiedereinpflanzung von Hoden zu beheben sind. Diese Versuche waren grundlegend für die Lehre von der inneren Sekretion, die erst 40 Jahre später nach den Arbeiten von BROWN SÉQUARD (1889) Beachtung fand; ihnen folgten dann eine große Reihe von Versuchen, durch Transplantationen männlicher Keimdrüsen Aufschluß über die neuartigen Fragestellungen zu erlangen.

Entsprechende Versuche an der weiblichen Keimdrüse sind wesentlich später begonnen worden. Nachdem im Jahre 1895 MORRIS die Transplantation eines Ovariums an einer Frau durchgeführt hatte, begann mit den Arbeiten von KNAUER und HALBAN um 1900 die eigentliche experimentelle Inangriffnahme des Problems im Tierversuch.

Um Klarheit über die Aufgaben einer Drüse im Organismus zu erhalten, hat man zunächst die Ausfallserscheinungen nach Extirpation, sodann ihre Behebung durch Wiedereinpflanzen des betreffenden Organs zu studieren. Sind auf diesem Wege die Aufgaben der Drüse experimentell festgestellt, so ergibt sich als zweite Fragestellung diejenige nach der Art, wie die Organleistung erfüllt wird. Transplantationsversuche der Drüsen und der Versuch, Ausfallserscheinungen durch Injektion der Organextrakte zu vermeiden oder zu beheben, entscheiden hier über das Wesen, wie ein Organ die ihm zufallende Aufgabe löst.

Über die Ausfallserscheinungen am lebenden weiblichen Organismus nach Extirpation der Ovarien.

Während es nach den bisher vorliegenden Experimenten den Anschein hat, daß in der Reihe der Wirbellosen die Beeinflussung der Körperbildung und des psychischen Verhaltens durch die weibliche Keimdrüse nur eine sehr geringe ist¹⁾, konnte eine solche Leistung des Ovariums in der Reihe der Wirbeltiere in fast allen Tierklassen wahrscheinlich gemacht oder experimentell sichergestellt werden²⁾.

Bei den Wirbeltieren beobachtet man nach völliger Kastration weiblicher Tiere eine Atrophie ihrer Genitalorgane, bei den Säugetieren insbesondere einen starken Rückgang des Wachstums an Uterus, Vagina und Brustdrüse. Alle zyklischen Vorgänge an den Genitalorganen (Brunst- und Menstruationserscheinungen) hören auf, der Geschlechtstrieb erlischt zumeist, die Tiere werden träge, sie „altern“ und werden von den Männchen nicht mehr beachtet. Da an Wirbeltieren nach einer Kastration auch die sekundären Geschlechtscharaktere wenig oder garnicht zur Entwicklung gelangen, treten bemerkenswerte Änderungen in Gestalt, Aussehen und Gebaren der Tiere ein; so ist z. B. die Körpergestalt kastrierter Hühner eine vom normalen Tier sehr verschiedene („neutraler Kapaumentyp“), Sporen und Gefieder nehmen fast männliche Formen an, während Bartlappen und Kamm sehr geringes Wachstum zeigen (PÉZARD 1914); auch ist bekannt, daß man bei vielen horntragenden Sängern die Ausbildung der Gehörne zu unterdrücken imstande ist.

Der Einfluß der Kastration auf den Grundumsatz und Stickstoffstoffwechsel ist zwar vielseitig studiert worden³⁾, jedoch sind die Ergebnisse umstritten; vielleicht tritt nach Kastration eine sehr geringe Erniedrigung des Grundumsatzes ein.

1) Literatur s. bei HARMS, J. W., Körper und Keimzellen, Berlin 1926. — In neuerer Zeit hat nur LOEWE über einen qualitativen, aber nicht gesicherten Nachweis des weiblichen Sexualhormons in einigen Würmern berichtet (1929).

2) FELLNER (1925) wies durch Wachstumswirkung an Uterus und Mamma das Vorkommen des weiblichen Sexualhormons in den Eiern von Hühnern und Fischen nach; SERENI, ENRICO und RIVKA bestätigten das Vorkommen in Fisch-eiern, während LOEWE (1929) mit Sicherheit im weiblichen Frosch (*Rana temporaria*), also in einem Amphibium, Brunsthormon nachzuweisen vermochte.

3) Literatur siehe bei TRENDELENBURG, P., Die Hormone, Bd. 1, Berlin 1929.

Transplantationsversuche weiblicher Keimdrüsen und über die Behebung der Ausfallserscheinungen durch Wiedereinpflanzen von Ovarien.

Allgemein sind die Feststellungen gültig, daß man den größten Teil der geschilderten Ausfallserscheinungen durch Transplantation der Keimdrüsen vermeiden, oder im kastrierten Tier durch Wiedereinpflanzen der Ovarien beheben kann.

An Kaltblütern (Tritonen) sind zwar eine Reihe entsprechender Versuche mit Erfolg angestellt worden (HARMS 1913), die größten und bedeutendsten Arbeiten innerhalb dieser Fragestellung sind aber an Vögeln und Säugetieren durchgeführt; in ihren Ergebnissen haben wir die ersten Beweise für die hormonale Tätigkeit der Ovarien zu erblicken.

Der neutrale Kapaunentyp ist durch Einpflanzen von lebenden Ovarien wieder zur normalen Form umwandelbar, der Kamm wächst, Sporen und Gefieder bilden sich zur Norm zurück. In diesen, wohl zuerst von GUTHRIE (1907) und später von PÉZARD ausgeführten Versuchen erblicken wir das Seitenstück zu den ersten experimentellen Arbeiten von BERTHOLD (1849) am männlichen Tier.

Mit den wichtigen Arbeiten von KNAUER und HALBAN (1900), die später von LIPSCHÜTZ, STEINACH u. a. fortgesetzt wurden, begann die eigentliche experimentelle Forschung am Säugetier. Die nach Transplantation von Ovarien an Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten beobachtete Behebung von Ausfallserscheinungen stellte seinerzeit den ersten exakten Beweis für die Bedeutung der Keimdrüse und für ihre hormonale Tätigkeit dar: Tuben, Gebärmutter und Scheide wachsen wieder normal unter Wirkung des Implantates, die Geschlechtszyklen stellen sich wieder ein und das geschlechtliche Verhalten der Tiere kehrt zur Norm zurück; ihre Trägheit und die „künstliche Alterung“ verschwinden.

Diese Versuchsreihen sind später nach zwei Seiten erweitert worden: an jugendlichen Tieren vermochte man vor eingetretener Geschlechtsreife durch Implantation reifer Ovarien frühzeitig Brunst zu erzeugen und das Wachstum der Genitalorgane zu fördern; andererseits sind senile Tiere, deren Geschlechtsfunktion erloschen ist und welche deshalb im wesentlichen die Ausfallserscheinungen einer Kastration zeigen, durch Implantation von reifen Ovarien zu „verjüngen“, jedenfalls ist in ihrem Aussehen und in ihren Geschlechtsinstinkten ein deutlicher Einfluß des Implantates spürbar (E. STEINACH, KOLB, PETTINARI u. a.).

Über die Behebung von Ausfallserscheinungen durch Injektion von Ovarialextrakten.

Durch die Ergebnisse der Transplantationsversuche war bereits mit Sicherheit gezeigt, daß die dem Ovarium zuerkannten Aufgaben von diesem nicht auf dem Wege der nervösen Korrelation, durch Wirkung über Nervenbahnen, gelöst werden. Der einwandfreie Beweis für die innersekretorische Tätigkeit der Keimdrüse war aber nur erbracht, wenn es gelang, die durch Implantation des Ovariums gewonnenen Ergebnisse auch durch Injektion von Ovarialextrakten (gewonnen aus den Ovarien größerer Säugetiere) zu erzielen. Die Bedeutung dieser Aufgabe ist sofort erkannt (JENTZER und BEUTNER 1900, BUCURA 1907), ihre einwandfreie Lösung erfolgte aber erst einige Jahre nach den erfolgreichen Arbeiten von KNAUER und HALBAN. So erzeugten MARSHALL und JOLLY (1906) durch Ovarialextrakt Brunst an einer Hündin; ADLER, SCHICKELE (1912) und ASCHNER (1913) wiesen auf die nach Injektion von Ovarialextrakt auftretende Hyperämisierung von Uterus und Vagina hin, und in den Arbeiten von FELLNER, ISCOVESCO und OKINTSCHITZ (1914) ist die wichtige Beobachtung gemacht, daß Ovarialextrakte das Wachstum der Genitalorgane, insbesondere von Uterus, Vagina und Brustdrüse⁴⁾ stark erhöhen. Sie arbeiteten mit jungen Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen und vermochten an kastrierten Tieren nicht nur die Atrophie der Genitalorgane aufzuheben, sondern diese zu einem Größenwachstum anzuregen, welches die Norm weit übertraf. E. STEINACH untersuchte Extrakte auf ihre Wirkung am senilen Rattenweibchen und bestätigte auch hier die Erfahrungen der Drüsenimplantation⁵⁾.

Da auch die Geschlechtsinstinkte der behandelten Tiere zur Norm zurückkehren, ist mit der gesamten Untersuchungsfolge, welche später vielseitig nachgeprüft, bestätigt und erweitert wurde (HERRMANN, SEITZ, FRANK, SCHRÖDER u. a.), sichergestellt, daß alle

4) Der Einfluß des Follikelhormons auf die Milchsekretion ist noch heute umstritten; es darf angenommen werden, daß sie einer anderen — vielleicht fötalen — Hormonwirkung unterliegt (STARLING und FOA).

5) LOEWE hat 1926 über den Einfluß von Extrakten auf Vögel berichtet; ganz kürzlich sind interessante Arbeiten von JUHN und GUSTAVSON und von E. LAQUEUR über den Einfluß des weiblichen Sexualhormons auf Hühner, Hähne und Kapaune erschienen, in denen besonders die Beeinflussung des Federwachstums unter Hormonwirkung besprochen wird; E. LAQUEUR und Mitarbeiter vermochten durch gleichzeitige Gaben von männlichem und weiblichem Hormon echten Gynandromorphismus zu erzielen.

erkannten Aufgaben der weiblichen Keimdrüse — naturgemäß mit Ausnahme der Produktion von Eizellen — auch durch Injektion von Ovarialextrakten auszulösen sind.

Über die Wirkung von Hormonextrakten auf Uterus, Vagina, Brustdrüse, sowie auf senile Ratten sollen die beigefügten Bilder auf den Tafeln I—IV ein anschauliches Bild vermitteln.

Die geschilderten Arbeitsergebnisse erbrachten den Beweis, daß im Ovarium zur Lösung seiner vielseitigen Aufgaben eine chemische Substanz, ein Sexualhormon, erzeugt wird, dessen physiologische, pharmakologische und chemische Eigenschaften nunmehr zum Gegenstand der Forschung wurden.

Über quantitative Erkennungsreaktionen des Hormons.

Für die exakte physiologische und pharmakologische Analyse eines Stoffes ist seine Darstellung in weit gereinigter Form, für die chemische Bearbeitung seine vollständige Isolierung und Reindarstellung unerlässlich. Um eine Erfolg versprechende Anreicherung eines Hormons in Rohextrakten und seine Trennung von Begleitstoffen durchführen zu können, bedarf es einer quantitativ auszugestaltenden Erkennungsreaktion, eines Testes. Der Bearbeiter des Problems hat an einen Test die Anforderung seiner Eindeutigkeit, seiner Spezifität, und die einer einigermaßen handlichen Durchführbarkeit zu stellen.

Für das weibliche Sexualhormon gibt es bisher keine chemische oder physikalische Nachweisreaktion, sondern man ist an die Durchführung eines physiologischen Testes gebunden. Grundsätzlich kann man jede spezifische physiologische Wirksamkeit eines Stoffes für seinen Nachweis heranziehen, sofern diese sich quantitativ messen läßt. Zwei seiner physiologischen Wirkungen haben in erster Linie als Testreaktion für das Follikelhormon Verwendung gefunden: die Wachstumswirkung auf die Genitalorgane, insbesondere den Uterus, und die Beeinflussung der zyklischen Genitalvorgänge des weiblichen Organismus; als spezielle Nachweisreaktion, die besonders exakte quantitative Resultate liefern soll, aber für die chemische Bearbeitung des Hormonproblems ohne praktische Bedeutung geblieben ist, wurde als dritter Test die Vermehrung chromaffiner Zellen im Ganglion cervicale uteri vorgeschlagen („Chromtest“).

1. Der Uteruswachstumstest.

Der Uteruswachstumstest hat als erste Nachweisreaktion des weiblichen Sexualhormons den weitaus meisten älteren Arbeiten (1900—1923) zugrunde gelegen. Entweder wurde der nach einer Kastration atrophierte Uterus durch Injektion wirksamer Extrakte wieder zu normalem (auch ungewöhnlich starkem) oder aber der noch nicht entwickelte Uterus juveniler Tiere zu vorzeitigem Größenwachstum angeregt. Gemeinsam mit histologischen Schnittuntersuchungen an Uterus und Vagina und einer Verfolgung hyperämischer Erscheinungen an der Brustdrüse wurden dann die Größenverhältnisse der Genitalorgane behandelter Tiere mit denen unbehandelter Kontrolltiere verglichen. (Vergl. hierzu besonders die Bilder auf Tafel I.)

Der Uteruswachstumstest war nicht ausreichend, um einer erfolgreichen systematischen Reinigung der Hormonextrakte zu dienen. Seine Spezifität wurde — vielleicht zu Unrecht — bestritten, vor allem aber fehlten ihm die genauen, quantitativ durchführbaren Vergleichsgrundlagen.

2. Der „Chromtest“ von BLOTEVOGEL, DOHRN und POLL.

Der Chromtest trägt den Charakter eines besonders fein abstufbaren, quantitativen Testes. Er beruht auf der experimentell gefundenen Tatsache, daß im Ganglion cervicale uteri zur Zeit größeren Hormonreichtums des weiblichen Organismus (besonders also in der Gravidität) ein mit dem Hormonspiegel parallel gehendes Zunehmen der chrombraunen Zellelemente gegenüber dem nervösen Anteil des Ganglions zu beobachten ist. Diese Erscheinung ist rein lokal auf das Ganglion cervicale uteri beschränkt, ihre Abhängigkeit von der Anwesenheit des Sexualhormons konnte sichergestellt werden; an der kastrierten Maus sinkt der Gehalt der chrombraunen Zellen von der Norm ($2,5\% \pm 0,24$) auf einen Wert unter 1% herab, durch Hormongaben ist der Prozentgehalt an chrombraunen Elementen direkt proportional der verabreichten Dosis zu erhöhen.

Diese Erscheinungen werden für einen quantitativen Test folgendermaßen nutzbar gemacht: „Bei Anwendung der Formel: x mg einer zu untersuchenden Substanz reichen hin, um innerhalb von t Stunden das Zahlenverhältnis des p ten Schwangerschaftstages herbeizuführen, hat man die Möglichkeit, durch Einsetzen der betreffenden Zahlenwerte pharmoko-dynamisch jeden Saft und jeden

Stoff auf seine Wirksamkeit auf das Genitalsystem im hormonalen Sinne zu untersuchen⁶⁾.

Der Chromtest, der für manche exakt quantitativen Versuche von großer Bedeutung sein mag, hat für die systematische Auswertung von Hormonölen zum Zweck der Reindarstellung des Follikelhormons keine Bedeutung erlangt, da der etwas ältere Brunst-Zyklus-Test nach ALLEN und DOISY allen Anforderungen der Praxis in vollstem Umfange gerecht wurde. Da dieser Test für die Bearbeitung des Hormonproblems von besonderer Bedeutung wurde, sollen seine Grundlagen ausführlicher erörtert werden.

3. Der Brunst-Zyklus-Test nach ALLEN und DOISY.

Es wurde bereits erwähnt (Seite 3 u. 5), daß auch die zyklischen Vorgänge am weiblichen Genitalapparat, wie die Erscheinungen der tierischen Brunst und die der Menstruation der Frau, hormonal bedingt sind. An der Gesamtheit der zyklischen Erscheinungen ist nach neueren Arbeiten nicht nur das Follikelhormon beteiligt; man vermag verschiedene Phasen der Geschlechtszyklen zu unterscheiden, die durch mehrere Hormone beherrscht werden; eine dieser Phasen verläuft in Abhängigkeit vom Follikelhormon.

Die Geschlechtszyklen sind histologisch im allgemeinen durch einen parallel mit der Eireifung stattfindenden Aufbau und Wiederabbau der Gebärmutter Schleimhaut gekennzeichnet. Das erste Dickenwachstum des Endometriums, die „Proliferationsphase“, verläuft gleichzeitig mit der Entwicklung der GRAAFSchen Follikel unter Wirkung des im Follikel gebildeten weiblichen Sexualhormons, dem hierdurch neben dem Einfluß auf die Ausbildung und das Wachstum der Genitalorgane eine besondere Aufgabe zufällt. Wenn das Ei gereift ist und nach dem Follikelsprung in die Uterustube wandert, bildet sich aus dem Follikelrest das Corpus luteum, welches nunmehr zur Bildungsstätte eines zweiten weiblichen Sexualhormons wird, unter dessen Wirkung ein Umbau des Endometriums erfolgt („Sekretionsphase“⁷⁾).

6) Zitiert nach BLOTEVOGEL, DOHN und POLL, Med. Klin. 1926, Nr. 35.

7) Die Erkenntnis der Funktion des Corpus luteum als Bildungsstätte eines zweiten weiblichen Sexualhormons ist neueren Datums; man betrachtete den gelben Körper lange Zeit ebenfalls als Ursprungsstätte des Follikelhormons und benutzte Corpora lutea als Ausgangsmaterial für dessen Darstellung (ISCOVESCO, SEITZ, FELLNER, FRANK u. a.), während von anderer Seite (OKINTSCHITZ, BROUHA, PARKES u. a.) das Vorhandensein von Follikelhormon im Corpus luteum angezweifelt wurde. Durch systematische Arbeit hat man die Funktion des Corpus luteum erst allmählich klären können (L. FRÄNKEL, R. SCHRÖDER, LOEB, WIESNER, BENCAN u. a.); bahnbrechend für die Idee, daß im Corpus luteum ein zweites

Dieser Prozeß ist als Vorbereitung einer zu erwartenden Schwangerschaft zu deuten, die geschilderte Umbildung der Uterusschleimhaut erfolgt zur Aufnahme eines befruchteten Eies. Findet keine Befruchtung statt, so stirbt das Ei ab, das Corpus-luteum-Gewebe bricht zusammen, und die aufgebaute Uterusschleimhaut wird abgestoßen (Menstruation). Mit der Ausbildung eines neuen Follikels wiederholen sich diese Vorgänge. Follikelreifung, Ausbildung und Rückbildung des Corpus luteum sind wahrscheinlich ihrerseits durch hormonale Reize bedingt, die wohl von der Hypophyse oder auch vom Ei selbst ausgehen (ZONDEK, KNAUS u. a.).

Die Geschlechtszyklen verlaufen in einzelnen Tierklassen unterschiedlich und innerhalb verschiedener Zeiträume, sie sind aber doch in wesentlichen Phasen vergleichbar.

Für die Bearbeitung des Follikelhormons ist es von besonderer Bedeutung geworden, daß STOCKARD und PAPANICOLAOU (1917) eingehend den Geschlechtszyklus am Nagetier studierten; sie verwandten Meerschweinchen, während LONG und EVANS (1922) die Verhältnisse an der Ratte untersuchten. Es konnte durch diese Arbeiten gezeigt werden, daß der unter Wirkung des Follikelhormons erfolgende Aufbau der Uterusschleimhaut sich am lebenden Nagetier durch eine einfache mikroskopische Untersuchung der Zellen aus dem Vaginallumen verfolgen läßt; diese ändern sich mit dem Aufbau des Endometriums in charakteristischer Weise. Da dieser periodische Vorgang, der bei den kleinen Nagern 5—7 Tage währt, in direkter Abhängigkeit von der Gegenwart und der Menge des vorhandenen Hormons steht, aufhört, wenn kein Hormon zugegen ist, also auch wenn das Ovarium entfernt wird, und andererseits am kastrierten Tier durch Injektion von wirksamer Substanz in vollem Umfang wieder hervorgerufen wird, konnten ALLEN und DOISY (1923) auf diesen Erkenntnissen einen brauchbaren Test zum Nachweis des Follikelhormons aufbauen.

Als Versuchsobjekt benutzt man kastrierte weibliche Mäuse oder Ratten. Der Vaginalausstrich solcher Tiere zeigt nach geeigneter Färbung im mikroskopischen Bild dauernd sogenanntes „Ruhestadium“, das durch Vorherrschen von Leukozyten gekennzeichnet ist (Bild 14, Tafel V).

Wird Ovarialhormon injiziert (oder per os verabreicht), so

weibliches Sexualhormon produziert wird, wurde besonders die französische Schule (COURRIER, CHAMPY, GLEY, JOUBLOT, BROUHA u. a.), aber experimentell gesichert wurde das Vorhandensein des Corpus-luteum-Hormons erst in neuester Zeit, vor allem durch CORNER und ALLEN, deren Arbeit nunmehr vielseitig bestätigt und erweitert wurde (KNAUS, CLAUBERG u. a.).

treten die zyklischen Veränderungen wieder ein, es findet Proliferation der Uterusschleimhaut statt, und man beobachtet ein Wachstum der Epithellage in der Vagina. Im Stadium des „Proöstrus“ zeigt das mikroskopische Abstrichbild keine Leukozyten mehr, sondern kernhaltige Epithelzellen (Bild 15, Tafel V).

Aus diesem Stadium entwickelt sich dann das Brunststadium, der „Östrus“. Die obere Epithellage der Vagina verhornt, das mikroskopische Bild zeigt kernlose Schollen („Schollenstadium“, Bild 16, Tafel V).

Das Abklingen des Zyklus zum Ruhestadium überschreitet den „Metöstrus“, gekennzeichnet durch das Nebeneinander von Schollen, Leukozyten und Epithelzellen im Abstrichbild (Bild 17, Tafel V).

Die Bilder gleichen ganz denen von normalen, unkastrierten Mäusen, bei denen sich dieser Zyklus regelmäßig wiederholt, während er bei kastrierten Tieren nach einer Injektion zum Ruhestadium zurückkehrt und sie für weitere Versuche brauchbar macht.

Diejenige Substanzmenge an Hormon, die bei weiblichen kastrierten Mäusen nach subkutaner Injektion gerade ausreichend ist, damit innerhalb von 2—3 Tagen im Vaginalausstrich das Schollenstadium erreicht wird, bezeichnet man als eine „Mäuseinheit“ (ME), bei Verwendung von Ratten spricht man entsprechend von „Ratteneinheit“ (RE); 1 RE enthält durchschnittlich 4 ME.

Der ALLEN-DOISY-Test hat sich bei der neueren Bearbeitung des weiblichen Sexualhormons ausgezeichnet bewährt, er wurde zur Grundlage für erfolgreiche Anreicherung und Reindarstellung des Hormons und somit für jede physiologische, pharmakologische und chemische Erkenntnis der Folgezeit.

Über die Technik des Allen-Doisy-Testes⁸⁾.

Entsprechend der Wichtigkeit für die wissenschaftliche Untersuchung des Hormons, für die Auswertung pharmazeutischer Präparate und für die praktisch-medizinische Dosierung, sind die physiologischen Grundlagen des ALLEN-DOISY-Testes, seine Fehlerquellen und die Art seiner technischen Handhabung Gegenstand vielseitiger, umfangreicher Arbeiten geworden (ALLEN, DOISY und Mitarbeiter, E. LAQUEUR, A. LIPSCHÜTZ, S. LOEWE, COWARD und BURN, E. C. DODDS, G. F. MARRIAN und A. S. PARKES u. a.). Obwohl diese Arbeiten in ihren wesentlichen Ergebnissen übereinstimmen, hat

8) AUS A. BUTENANDT und E. v. ZIEGNER, „Über die physiologische Wirksamkeit des kristallisierten weiblichen Sexualhormons im ALLEN-DOISY-Test“. HOPPE-SEYLER'S Z. f. physiol. Chemie 188, Heft 1—2, Seite 1 (1930).

man sich bislang nicht auf eine einheitlich festgelegte Technik geeinigt.

Die ursprünglich vorgeschlagene Methode zur Auswertung hormonhaltiger Präparate besteht darin, daß man einer Reihe von Tieren die auf ihre Wirkung zu prüfende Substanz in steigender Dosierung zuführt, und diejenige Substanzmenge als Einheit anspricht, welche gerade ausreichend ist, um in der Scheide die typische Brunstreaktion auszulösen.

Es ist vielseitig übereinstimmend festgestellt worden, daß der Einfluß von individuellen Schwankungen der Versuchstiere entweder ein sehr geringer ist, oder durch geeignete Methodik weitgehend vermieden werden kann. Die Größe einer Einheit ist aber in sehr weitem Maße abhängig von 3 wesentlichen technischen Handhabungen:

1. Von der Art des mikroskopischen Abstrichbildes, das einer Grenzosis zugeordnet wird, z. B. ob „Vollöstrus“ (ALLEN und DOISY, ZONDEK, DODDS, COWARD und BURN, MARRIAN und PARKES) oder „Verschwinden der Leukozyten“ (LAQUEUR, LOEWE) im Abstrichbild gefordert wird;

2. von der Anzahl der Tiere, die zu einer Auswertung verwandt werden und von der Forderung, wieviel % der Versuchstiere positive Reaktion zeigen müssen;

3. von der Art der Injektionstechnik.

Die Eichung der Präparate auf Vollbrunst (Schollenstadium) ist das weitgehendste, aber sicherste Verfahren. — Die Zahl der Versuchstiere soll nach LAQUEUR mindestens 12 pro Auswertung, 3 pro Dosis betragen, damit dürfte die unterste Grenze des Erlaubten gekennzeichnet sein; positive Reaktion wird von den Autoren unterschiedlich an 50—75 % der Versuchstiere gefordert.

Von großer Bedeutung ist die Art der Injektionstechnik. Schon ALLEN und DOISY haben darauf hingewiesen, daß man bei Verteilung der injizierten Hormonmenge auf mehrere Einzelgaben mit einer wesentlich geringeren Gesamtmenge die gleiche Wirkung erzielt, wie bei Zuführung in einmaliger Injektion. Auswertungsergebnisse, die durch Injektion in einmaliger Dosis ermittelt sind, ergeben zumeist Wirksamkeitszahlen, die um ein Vielfaches kleiner sind, als die mit protrahierter Technik ermittelten. Die Unterschiede in den Resultaten sind bedingt durch die verschieden große Geschwindigkeit, mit der die Resorption des Hormons im Organismus erfolgt, sie sind daher abhängig von der Anzahl der Injektionen, von der Zeit, über die sie verteilt werden, vom verwendeten Lösungsmittel (Wasser oder Öl), vor allem aber von der Reinheit des in-

jizierten Hormons. Viele Bearbeiter des weiblichen Sexualhormons haben sich einer protrahierten Injektionstechnik bedient, andere grundsätzlich nur in einmaliger Dosis injiziert. Häufigkeit und Zeitdauer der Darreichung und die übrigen Kriterien der Wirksamkeit sind von den verschiedenen Autoren so unterschiedlich verwendet, daß ein direkter Vergleich ihrer erzielten Reinheitsgrade nach den ermittelten Wirksamkeiten nicht immer möglich ist.

BUTENANDT und VON ZIEGNER bedienten sich bei ihren Anreicherungsversuchen, die zur Reindarstellung des Hormons führten, ausschließlich der einfachsten Methodik, nachdem ihre Brauchbarkeit erwiesen war: Die auszuwertende Fraktion wurde in Sesamöllösung in einmaliger Dosis subkutan injiziert; die Prüfung erfolgte auf Vollbrunst bei 75—80 % der Versuchstiere.

Technik: Zur Kastration werden nur ausgesuchte weiße Mäuse (10—15 Wochen alt, etwa 20 g schwer) verwandt. Die Kastration erfolgt vom Rücken aus, es werden die Ovarien und ein Teil der Uterushörner entfernt. Vom 8. Tage nach der Kastration an werden täglich einmal Kontrollabstriche mit einer Platinöse gemacht. Die Färbung der Abstriche erfolgt nach ROMANOWSKY-GIEMSA. 3—4 Wochen nach der Kastration wird allen Tieren, welche konstant Ruhestadium zeigten, eine Testlösung bekannten Gehaltes injiziert, nicht reagierende Tiere erhalten 14 Tage später eine gleiche Dosis; auf beide Testversuche nicht genügend ansprechende Tiere werden nicht mehr verwendet. Zuverlässig reagierende Tiere werden 6 Wochen nach der Kastration in die Versuchsreihen eingeordnet. Um den Einfluß der Kastrationsdauer auf die Reaktionsbereitschaft der Tiere auszuschließen, wird in regelmäßigem Abstand von 14 Tagen möglichst eine wirksame Dosis verabreicht. Die Tiere, denen 4 Wochen lang keine ausreichende Dosis zugeführt wurde, werden vor weiterer Verwendung einer „Überdosierungskur“ unterworfen. —

Die zu prüfende Substanz wird in alkoholischer Lösung in 50° warmes Sesamöl eingebracht, die geringen Spuren des im Öl gelöst verbleibenden Alkohols schaden nicht. Injiziert werden einmalig 0,1—0,2 ccm; die Menge des injizierten Öls, also der Grad der Verdünnung, ist ohne Einfluß. Scheidenabstriche werden von sämtlichen Tieren einmal täglich, in der Zeit von 36—90 Stunden nach einer Injektion zweimal täglich im Abstände von 12 Stunden vorgenommen. Geprüft wird auf Vollbrunst, das Schollenstadium erscheint bei richtiger Dosierung etwa 40—60 Stunden nach der Injektion. Ein Schollenstadium mit wenigen Epithelzellen wird noch als positiv bezeichnet. Für eine Auswertung werden pro Dosis

mindestens 5—6 Tiere verwandt, bei genauerer Auswertung etwa 12. 75—80% der Versuchstiere müssen positive Wirkung zeigen, damit die injizierte Dosis als Einheit angesprochen wird.

Eine solche Technik vermittelt nicht die Kenntnis des Maximalwertes einer Wirksamkeit, doch erwies sie sich in ihrer einfachen Handhabung als absolut zuverlässiger Führer, um erzielte Anreicherungen zu erkennen; für die chemische Bearbeitung des Hormonproblems sind die „absoluten“ Gehaltszahlen an wirksamer Substanz von geringerem Interesse, als leicht zu ermittelnde, praktisch vergleichbare Maßzahlen. Daß die einfachste Methode zuverlässig ist, haben Erfahrungen an fast 2000-Versuchen mit einem Tiermaterial von 1000 Stück gezeigt und ist durch die Reindarstellung des Hormons erwiesen.

Über die Produktionsstätten des Follikelhormons und über seine physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften.

Mit dem ALLEN-DOISY-Test setzte eine ganz neue Entwicklung in der Bearbeitung des Follikelhormons ein; fast alle gesicherten Ergebnisse über die Bildungsstätten des Hormons, über seine physiologischen Aufgaben und pharmakologischen Eigenschaften sind erst durch Anwendung des neuen Testes erzielt worden, überdies wurde er zur Grundlage für klinisch-therapeutische Verwendung von dosierbaren Hormonpräparaten; daß mit seiner Auffindung außerdem die erste Voraussetzung für eine exakte chemische Bearbeitung erfüllt wurde, ist schon betont worden.

Erst nach der Einführung des ALLEN-DOISY-Testes konnte mit Sicherheit erwiesen werden, daß es sich bei dem betrachteten weiblichen Sexualhormon um das im Follikel erzeugte Hormon handelt. Die quantitative physiologische Auswertung einzelner Gewebsteile des Eierstocks führte einwandfrei zur Feststellung, daß im Follikelinhalt der größte Hormonanteil zu finden ist (FRANK (1922), ALLEN und DOISY (1923), LAQUEUR (1925) u. a.); außerdem ist durch die lange bekannten Erscheinungen der Dauerbrunst bei persistierendem Follikel und der Parallelität von Eireifung und Brunstzyklus bei den Säugetieren, die nur jahreszeitliche Brunstzyklen zeigen, weitgehend gesichert, daß das Zyklushormon in erster Linie dem Follikel entstammt. Allerdings ist auf Grund einiger Befunde nach Schädigung der Follikelreifung durch Röntgenstrahlen ein Teilhaben des interstitiellen Gewebes im Ovarium an der Hormon-

sekretion nicht ganz auszuschließen, da eine Zerstörung des Follikelapparates allein nicht immer Kastrationsatrophie zur Folge hat (HALBERSTÄDTER (1905), BOUIN (1906), PARKES (1926), VON SCHUBERT (1927) u. a.).

Die physiologische Aufgabe des Follikelhormons ist durch die früher gekennzeichneten Versuche klargelegt: es bewirkt normale Ausbildung und normales Wachstum der Genitalorgane und beeinflusst die sekundären Geschlechtsmerkmale, einschließlich vieler psychischer Erscheinungen; als spezielle Aufgabe fällt ihm die Ausbildung der Proliferationsphase im zyklischen Aufbau der Uterusschleimhaut zu.

In der Schwangerschaft scheint das Follikelhormon eine besonders bedeutsame Aufgabe zu erfüllen, die im stark gesteigerten Größenwachstum der Genitalorgane zum Ausdruck kommt. Während dieser Zeit findet eine beträchtliche Steigerung der Hormonproduktion statt. Da während der Gravidität eine Neubildung von Follikeln nicht erfolgt, übernimmt in diesem Zeitraum die Plazenta die Hormonproduktion. Die ursprünglich (auf Grund klinischer Befunde) von HALBAN (1905) erkannte innersekretorische Tätigkeit der Plazenta ist gegenwärtig als gesichert anzusehen. Zwar ist die Zahl der von ihr bereiteten Hormone noch nicht bekannt, jedoch gilt als erwiesen, daß in ihr eine zweite Produktionsstätte des Follikelhormons vorliegt. Nach den Arbeiten von FELS soll im zweiten Monat der Schwangerschaft noch kein Follikelhormon in der Plazenta nachweisbar sein, in späteren Stadien ist sein Vorhandensein von allen Bearbeitern erwiesen (FELLNER (1913), ALLEN und DOISY (1924) u. a.). In 1 kg Plazenta sind etwa 500 bis 1000 ME an Follikelhormon vorhanden, dieser große Hormonreichtum der Plazenta führte dazu, ihre Extrakte als höchstwirksames Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des Hormons heranzuziehen.

Für die weitere Entwicklung der Untersuchungen ist die Feststellung von Bedeutung gewesen, daß während der Schwangerschaft ein beträchtlicher Überschuß an Follikelhormon im Harn zur Ausscheidung kommt. LOEWE (1925) hatte schon gezeigt, daß außer im Blut der normalen Frau auch im Harn Follikelhormon nachweisbar ist. Sowohl im Blut wie auch im Harn der Frau findet man eine ausgesprochene Abhängigkeit des Hormongehaltes vom normalen Zyklus (LOEWE, FRANK, SIEBKE); der Hormonspiegel des Blutes ist etwa am 3. Tage vor dem Eintritt der Menstruation am größten, während er im ersten Teil des Zyklus auffallend niedrig ist. Im Harn findet man vor und während der Menstruation wenig Hormon, viel dagegen in der Mitte des Intermenstrums. Während

der Schwangerschaft ist der Hormonspiegel im Blute erhöht (FRANK, FELS, ASCHHEIM), die stark gesteigerte Hormonausscheidung im Harn der schwangeren Frau entdeckten B. ZONDEK und S. ASCHHEIM (1927); sie machten damit eine Beobachtung, die der chemischen Erforschung des Follikelhormons ein neues Ausgangsmaterial darbot.

Von besonderem biologischen Interesse sind die Feststellungen gewesen, daß auch im Hoden und im Harn des erwachsenen Mannes ein Stoff nachweisbar ist, der im ALLEN-DOISY-Test Brunstreaktion auszulösen vermag (FELLNER (1921), DOHRN, ZONDEK (1927), LOEWE, LAQUEUR, BROUHA (1928) u. a.). In 1 kg Hoden finden sich etwa 30 ME, in 1 l Harn 100—200 ME an wirksamer Substanz (E. LAQUEUR; PARKES).

Bemerkenswerterweise haben LOEWE, sowie DOHRN (1926), später auch GLIMM und WADEHN zeigen können, daß man aus pflanzlichen Keimlingen, aus weiblichen Blüten, Hefe, Mehl, Kartoffeln und vielen Pflanzenölen im unverseifbaren Anteil Stoffe mit sexualhormonartiger Wirksamkeit anreichert darstellen kann. Über ihre Beziehungen zum Follikelhormon der Frau ist gegenwärtig noch nichts bekannt, ebenfalls ist die Beziehung dieser Stoffe zum Antisterilitäts-Vitamin E (EVANS und BURR) nicht geklärt (BISCEGLIE, DINGEMANSE). Der biologischen Forschung und der chemischen Analyse ist nach dieser Richtung hin ein interessantes Feld geöffnet.

Die physiologische und pharmakologische Analyse hochgereinigter und mit Hilfe des ALLEN-DOISY-Testes standardisierter Hormonextrakte hat über die bisher geschilderten Eigenschaften des Stoffes hinaus zur Erkenntnis geführt, daß dem Follikelhormon als Antagonisten des männlichen Sexualhormons „antimaskuline“ Wirkungen zukommen. Durch Behandlung eines juvenilen männlichen Tieres mit weiblichem Sexualhormon vermag man die Ausbildung seiner Genitalorgane zu unterdrücken, geschlechtsreife männliche Tiere können durch große Hormongaben sterilisiert werden, während gleichzeitig ein Größenwachstum ihrer Zitzen zu beobachten ist (HERRMANN (1920), FELLNER (1921), STEINACH, LAQUEUR (1926), BEUTHNER und FELS (1928) u. a.).

Auf Herz, Blutdruck, Atmung, Stoffwechsel und auf die Uterusbewegung haben gereinigte Hormonpräparate keinen Einfluß, sie scheinen auch bei hoher Überdosierung frei von jeder Giftwirkung zu sein (LAQUEUR, DOISY (1927) u. a.).

Die Kenntnisse der physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des weiblichen Sexualhormons haben dazu geführt, standardisierte Hormonpräparate in die therapeutische Praxis ein-

zuführen; sie finden Verwendung zur Behebung von Ausfallserscheinungen, die als Folge einer Hypofunktion des Ovariums eintreten, zur Behandlung von vegetativer oder generativer ovarieller Insuffizienz und klimakterischer Störungen (FRAENKEL, SIEBKE u. a.). Die Darreichung der Hormonpräparate kann durch subkutane Injektion geschehen, da jedoch die früher noch umstrittene Wirksamkeit des Hormons per os durch die ausführlichen Arbeiten von SCHOELLER, DOHRN und HOHLWEG (1930) sichergestellt ist, erscheint auch die perorale Darreichung zweifellos möglich.

Für eine Erfolg versprechende Therapie sind genaue Hormonbilanzmessungen in Abhängigkeit vom Zyklus notwendig, eine Aufgabe, der sich SIEBKE in letzter Zeit mit viel Erfolg zugewandt hat. Zum anderen erscheint nach neueren Ergebnissen in vielen Fällen eine kombinierte Therapie mit den Hormonen des Corpus luteum und der Hypophyse unerlässlich; die wissenschaftlichen Grundlagen der hormonalen Therapie sind in dieser Hinsicht noch nicht geklärt. —

II.

Die chemische Seite des Problems, die Frage nach der Zusammensetzung und der Konstitution des Follikelhormons, konnte erst viel später mit Aussicht auf Erfolg in Angriff genommen werden, denn zu ihrer Bearbeitung war die Klärung der medizinischen Grundlagen erforderlich, weil diese erst die Voraussetzungen für eine chemische Inangriffnahme des Problems lieferten.

Während gegenwärtig wesentliche physiologische Fragestellungen über Bedeutung und Funktion des weiblichen Sexualhormons abschließend vermittelt werden können, während die biologische Forschung sich bereits bevorzugt dem Studium der übrigen Sexualhormone zuwendet und nach ihren Zusammenhängen im physiologischen Geschehen fragt, ist die chemische Bearbeitung des Follikelhormons noch in ihren ersten Anfängen.

Das hat seine Ursache darin, daß sie erst wesentlich später ihren Anfang nehmen mußte, und daß jede chemische Erkenntnis — im Gegensatz zu allen physiologisch-pharmakologischen — an die Untersuchung eines reinen, einheitlich krystallisierten Stoffes gebunden ist, also die Isolierung und Reindarstellung des wirksamen Prinzips zur unbedingten Voraussetzung hat. Zum dritten sind — selbst bei Erfüllung dieser Forderung — die für eine chemische Untersuchung benötigten Stoffmengen eines so kostbaren Naturproduktes zumeist sehr schwer in ausreichender Menge beschaffbar.

Naturgemäß haben die medizinisch-physiologischen Arbeiten, zu deren Durchführung man die Herstellung wirksamer Extrakte benötigte, bereits eine chemische Bearbeitung des Hormonproblems eingeleitet, da man eine weitgehende Anreicherung des wirksamen Prinzips und seine Trennung von unwirksamen Begleitstoffen anstrebte und zu diesem Zweck entsprechende Trennungs- und Reinigungsmethoden systematisch ausarbeitete. Die erzielten Fortschritte solcher Reinigungsverfahren lagen aber in erster Linie

darin, daß man lernte, spezifische Wirkungen des Hormons von denen unerwünschter Begleitstoffe zu trennen, um somit seine physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften mit größerer Sicherheit zu präzisieren.

Alle rein chemischen Erkenntnisse hingegen, die an diesen unreinen Extrakten gewonnen wurden, mußten dadurch unsicher oder wertlos werden, daß man nichts darüber aussagen konnte, wieviel Hormon tatsächlich in den Präparaten vorhanden war. Waren auch die wesentlichen Feststellungen, daß das Hormon beständig ist gegen Alkali, Säuren und gegen Temperatursteigerungen, von Bedeutung, so waren doch alle anderen Aussagen mehr oder weniger zweifelhaft; die durch ausgeführte Analysen und dargestellte „Derivate“ von sehr unreinen Präparaten ermittelten Formeln für das Hormon gehören in das Gebiet der Spekulation, der in der Literatur durch Jahre geführte Kampf über die Wasser- oder Lipoidlöslichkeit oder über den Stickstoffgehalt des Hormons konnte vom chemischen Standpunkt aus niemals die Bedeutung haben, die man ihm beilegte, solange nicht eine Isolierung des reinen Stoffes erfolgt war. Ebenso ist über die chemischen Beziehungen des Hormons zu anderen Stoffklassen erst nach Aufstellung einer Molekularformel sichere Aussage zu machen.

Eine systematische chemische Bearbeitung mit dem ersten Ziel der Isolierung des reinen, einheitlich kristallisierten Hormons erforderte in erster Linie zwei Voraussetzungen: 1. einen quantitativen Test, der über die erzielten Reinigungs- und Anreicherungs-effekte sichere Auskunft zu geben vermochte, 2. ein zugängliches Ausgangsmaterial zur Darstellung des Hormons.

Als Test war in der Scheiden-Brunst-Reaktion nach ALLEN und DOISY ein brauchbarer Führer geschaffen, als Ausgangsmaterial kamen auf Grund der erörterten Ergebnisse physiologischer Prüfungen in erster Linie Ovarien- und Plazentaextrakte, Follikelflüssigkeit und — seit 1927 — Schwangerenharn in Frage.

Ovarien- und Plazentaextrakte als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des weiblichen Sexualhormons.

Die ersten Bearbeiter (ADLER, ISCOVESCO (1912) u. a.) benutzten zur Herstellung wirksamer Extrakte naturgemäß Ovarien, die nach unserem heutigen Wissen pro kg etwa 200 ME an Hormon enthalten (DOISY, PARKES). Nachdem der sehr viel größere Hormonreichtum der Plazenta (s. Seite 14) erkannt wurde (FELLNER (1913),

ALLEN und DOISY (1924), PARKES (1927) u. a.), ist Plazentaextrakt als Ausgangsmaterial bevorzugt worden⁹⁾.

FELLNER (1913), ASCHNER, SCHICKELE, SEITZ, OKINTSCHITZ (1914) u. a. benutzten für ihre Versuche wäßrige Auszüge, teilweise unter Zusatz von Glycerin oder Kochsalz. ISCOVESCO (1912) zeigte als erster, daß man den Organen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln größere Anteile an Hormon entziehen, durch aufeinanderfolgende Anwendung verschiedener Lösungsmittel eine große Zahl von unwirksamen Lipoidfraktionen abtrennen und auf diese Weise zu gereinigten Hormonextrakten gelangen konnte.

Von zahlreichen älteren Arbeiten (vor 1920), die auf diesen Erkenntnissen beruhen, enthält die Untersuchung von HERRMANN (1915) die ausführlichste Darlegung eines Verfahrens zur Gewinnung eines wirksamen, gereinigten Plazentaextraktes. Seine Methodik ist in vielfacher Variation durch Jahre von einer großen Zahl von anderen Bearbeitern angewendet und weiter vervollkommnet worden (FRANK (1917), FRÄNKEL (1923), DOISY (1924), DODDS, GLIMM, ZONDEK, LAQUEUR, FAUST, STEINACH (1925), HARTMANN und ISLER (1926) u. a.). Im wesentlichen bestand diese Methode darin, die getrockneten und gemahlten Gewebe mit Äther oder Alkohol zu extrahieren, die Phosphatide mit Azeton abzutrennen, Cholesterin und andere Begleitstoffe auszufrieren und die durch kalten Alkohol extrahierbaren wirksamen Anteile durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum weiter zu reinigen.

Da den älteren Arbeiten (vor 1923) zunächst nur der Uteruswachstumstest für die Eichung der Hormonpräparate zur Verfügung stand, so ist eine vergleichende Kritik erzielter Reinheitsgrade nicht durchzuführen; nach unserem heutigen Wissen kann die Wirksamkeit der bereiteten Öle — gemessen an der Wirksamkeit des reinen Stoffes — keine sehr hohe gewesen sein.

In bezug auf die Reindarstellung des Follikelhormons sind alle umfangreichen Arbeiten mit Organextrakten nicht sehr erfolgreich gewesen; die vorhandenen Verunreinigungen und die vielen neutralen Begleitstoffe erschweren die Isolierung des Hormons aus Ovarien- und Plazentaextrakten so sehr, daß sie bis zum gegenwärtigen Augenblick nicht möglich gewesen ist¹⁰⁾.

9) Von der häufigen Verwendung der Corpora lutea als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des Follikelhormons (ADLER 1912, FELLNER 1913, HERRMANN, FRANK 1915 u. a.) sei hier im Hinblick auf die Ergebnisse neuerer Arbeiten über das Corpus luteum nicht eingegangen. Vergl. darüber Seite 8, Anmerkung 7.

10) Kürzlich hat COLLIP über die Isolierung und Reindarstellung eines kristallisierten Hormons aus Plazenta berichtet, welches eine stimulierende Wirkung

Zur Sicherung der Identität der Hormone aus Plazenta, Follikel und aus Schwangerenharn ist die Bearbeitung der entsprechenden Organextrakte auch heute noch nicht ohne Bedeutung, andererseits waren für die Ausarbeitung einer Methodik zur Reindarstellung des Hormons aus Schwangerenharn die bei der Plazentabearbeitung gewonnenen Erfahrungen verwertbar. Unter diesen beiden Gesichtspunkten seien einige eigene Versuchsreihen über das Verhalten von Plazentaölen hier wiedergegeben.

Eigene Versuche über das Verhalten von Plazentaölen.

Von Januar 1928 bis Februar 1929 wurden — fußend auf den Erfahrungen der genannten Autoren — Plazentaextrakte systematischen Anreicherungsversuchen unterworfen. Als Ausgangsmaterial dienten mit organischen Lösungsmitteln gewonnene und mit Azeton von Phosphatiden und Cholesterin befreite Extrakte von Rinderplazenta, welche einer sehr vorsichtigen alkalischen Behandlung unterzogen waren¹¹⁾. Sie enthielten durchschnittlich 25 000 ME pro Gramm.

Insgesamt wurden 235 Serienversuche an diesen Plazentaextrakten durchgeführt, die in ihren Anreicherungsresultaten durch quantitative physiologische Auswertungen der dargestellten Chargen verfolgt wurden. Eine Anreicherung über die von anderen Autoren mit Plazentaextrakt erzielten Reinheitsgrade hinaus wurde nicht erzielt; die wirksamsten Fraktionen enthielten nur 350—400 000 ME pro Gramm.

Methodisch wurde in erster Linie das Verhalten der Hormonöle unter dem Einfluß von Säuren und Alkalien, an höher wirksamen Ölen ihre Verteilung bei Entmischungsmethoden mit Lösungsmitteln und ihr Verhalten gegen Adsorptions- und Fällungsmittel studiert. Aus dem vorliegenden Versuchsmaterial sollen einige Ergebnisse zusammenfassend besprochen werden.

Das Verhalten von Plazentaextrakten bei der Behandlung mit Salzsäure.

Es wurde das Verhalten von Plazentaölen gegen alkoholisch-wäßrige Salzsäure wechselnder Konzentration bei verschiedenen

auf das Ovarium entfalten soll; dieses Hormon ist aber sicher nicht identisch mit dem Brunsthormon. Eine physikalische und chemische Charakterisierung von COLLIPS Präparaten, durch welche ihre Reinheit und ihre kristalline Struktur gesichert würde, ist bisher nicht erfolgt.

11) Das Ausgangsmaterial wurde mir von der SCHERING-KAHLBAUM A-G, Berlin zur Verfügung gestellt.

Temperaturen untersucht. Das Hormon erwies sich nach dem Ergebnis physiologischer Prüfungen stabil gegen Salzsäurebehandlung, selbst eine Einwirkung von 20%iger Salzsäure über 5 Stunden bei 100° C, sowie von verdünnter Salzsäure bei 150° über 1 Stunde beeinträchtigt die Wirksamkeit kaum.

Aus dem mit Wasser verdünnten salzsauren Hydrolysat ist das Hormon stets mit Äther zu extrahieren: im Gegensatz zu den Angaben von DODDS und seinen Mitarbeitern zeigt es keine basischen Eigenschaften; die ätherische Lösung enthielt stets ein Öl von wesentlich stärkerer Wirksamkeit als das Ausgangsmaterial, es war zumeist eine Anreicherung um 80—100% zu erzielen.

Es liegen die Erfahrungen von 88 Parallelversuchen mit ihren quantitativen physiologischen Auswertungen vor. Als Beispiele seien angeführt:

Versuch Nr. 9 vom 13. IV. 1928.

6 g Hormonrohöl aus Plazenta von der Wirksamkeit 25 000 ME pro Gramm (vergl. Tabelle I) wurden mit 70 ccm 3%iger alkoholisch-wässriger Salzsäure 5 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt; nach dem Zusatz von 200 ccm Wasser wurde die Reaktionslösung ausgeäthert, die ätherische Lösung (9 a) gewaschen, getrocknet und abdestilliert. Es hinterblieben 2,17 g (= 36%) Öl. Die ausgeätherte salzsaure Lösung hinterließ nach dem Abdestillieren im Vakuum 3,46 g Öl (Charge 9 b).

Die Auswertung der Charge 9 a ergab (nach Tabelle II) eine Wirksamkeit von 75 000 ME pro Gramm.

Die Charge 9 b war auch mit 0,25 mg an Ratten ohne Wirkung.

Versuch Nr. 10 vom 14. IV. 1928.

3,6 g Hormonöl von der Wirksamkeit 25 000 ME pro Gramm (vergl. Tabelle I) wurden mit 60 ccm 20%iger wässrig-alkoholischer Salzsäure 5 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und nach der bei Versuch 9 angegebenen Weise aufgearbeitet. In der ätherlöslichen Phase (10 a) fanden sich 1,2 g Öl von der ungefähren Wirksamkeit 75 000 ME pro Gramm (s. Tabelle II).

Versuch Nr. 61 vom 3. VII. 1928.

0,3 g Hormonrohöl von der Wirksamkeit 25 000 ME pro Gramm (vergl. Tabelle I) wurden mit 3 ccm Alkohol und 3 ccm 2 n wässriger Salzsäure 1 Stunde im Bombenrohr auf 150° erhitzt. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung erfolgte wie im Versuch 9. In der ätherlöslichen Charge 61 a fanden sich 63,8 mg (= 21%) des Öls von der physiologischen Wirksamkeit 70 000 ME pro Gramm (s. Tabelle II).

Die salzsaure Lösung (61 b) hinterließ nach dem Eindampfen im Vakuum ein dunkles Öl, das auch mit 0,6 mg an Ratten ohne Wirkung war.

Das Verhalten von Plazentaextrakten bei der Behandlung mit Alkali.

Es wurde das Verhalten von Plazentaölen gegen alkalische Verseifung unter verschiedenen Bedingungen studiert. Bei der Behandlung mit konzentriertem Ammoniak, mit alkoholischer oder wäßriger Barytlösung, mit Kalilauge wechselnder Konzentration, sowie bei der Behandlung mit Natriumäthylat bei 100° ist eine Zerstörung der Hormonwirksamkeit fast niemals beobachtet worden. Neben der Beständigkeit des Hormons gegen Alkali trat als wesentliches neues Merkmal in Erscheinung, daß sich aus alkalischer Reaktionslösung nur ein Teil des Hormons wieder ausschütteln läßt. Erst nach dem Ansäuern der alkalischen Lösung ist der Rest vollständig mit Äther zu extrahieren; andrerseits ist die aus der alkalischen Lösung gewonnene Fraktion aus ätherischer Lösung nur bei sehr lange andauerndem Ausschütteln wieder mit Alkali extrahierbar. Die Verteilung des Hormons bei alkalischer Behandlung zwischen wäßrigem Alkali und Äther war quantitativ stets unterschiedlich, im allgemeinen waren 35—50% des Hormons direkt mit Äther ausschüttelbar. Der erzielte Reinigungseffekt erwies sich abhängig vom Ausgangsmaterial und dessen Vorbehandlung, sowie von der Art der Verteilung. Die durchgeführten Versuchsreihen waren insofern von Bedeutung, als sie erstmalig einen schwach sauren Charakter des Follikelhormons andeuteten.

Es liegen die Erfahrungen von 49 Parallelversuchen mit ihren quantitativen physiologischen Auswertungen vor; als Beispiele seien angeführt:

Versuch Nr. 30 vom 7. VI. 1928.

0,5 g Hormonöl aus Plazenta von der Wirksamkeit 25 000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden mit 20 ccm Alkohol und 15 ccm einer gesättigten wäßrigen Baryumhydroxydlösung 5 Stunden auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Die mit Wasser versetzte Reaktionslösung wurde mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung (30 a) gewaschen, getrocknet und abdestilliert. Es hinterblieben 264 mg (= 53%) Öl, das nach der physiologischen Auswertung (s. Tabelle III) eine Wirksamkeit von 40 000 ME pro Gramm zeigte. — Hormonausbeute: 85%.

Der mit Äther extrahierten Reaktionslösung wurden nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure nur 40 mg Öl mit Äther entzogen, dessen physiologische Wirksamkeit noch unter 17000 ME pro Gramm lag (Charge 30 b auf Tabelle III).

Versuch Nr. 11 vom 18. IV. 1928.

1,5 g Hormonrohöl aus Plazenta von der Wirksamkeit 25000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden in 30 ccm Alkohol gelöst, mit 30 ccm 10%iger wäßriger Kalilauge versetzt und 8 Stunden auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Der mit Wasser verdünnten alkalischen Lösung ließen sich 797 mg (= 53%) mit Äther entziehen (Charge 11 a). Nach dem Ansäuern der Reaktionslösung waren weitere 109 mg (= 15%) ätherlöslich (Charge 11 b). Die Auswertung ergab, daß die Wirksamkeit der Fraktion 11 a bei etwa 40000 ME, die der Fraktion 11 b bei etwa 70000 ME pro Gramm lag (s. Tabelle III).

Versuch Nr. 62 vom 4. VII. 1928.

170 mg eines Plazentaöles (Charge 49 a) von der Wirksamkeit 100000 ME pro Gramm (s. Tabelle III) wurden in 17 ccm Alkohol gelöst, mit 3 ccm 25%iger wäßriger Kalilauge versetzt und 5 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Die Aufarbeitung geschah nach der im Versuch 11 angegebenen Weise. Die ätherlösliche Charge (62 a) bestand aus 79 mg (= 47%) eines Öles von der Wirksamkeit 160000 ME pro Gramm, die alkalilösliche Charge (62 b) aus 63 mg (= 38%) eines Öles von der Wirksamkeit 33000 ME pro Gramm. Die physiologischen Auswertungen sind in Tabelle III enthalten.

Versuch Nr. 79 vom 16. VII. 1928.

56 mg Hormonöl (Charge 62 a) von der Wirksamkeit 160000 ME pro Gramm (s. Tabelle III) wurden in 25 ccm Alkohol gelöst, auf dem Wasserbad erwärmt und allmählich mit reinem Natrium in kleinen Anteilen versetzt, bis das Natriumäthylat anfang sich auszuscheiden. Die Natriumäthylatlösung wurde eine weitere Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die mit Wasser versetzte Reaktionslösung nach der unter Versuch 11 angegebenen Weise aufgearbeitet. Es wurden der alkalischen Lösung 45,6 mg Öl (Charge 79 a) entzogen, nach dem Ansäuern waren weitere 12 mg ätherlöslich (Charge 79 b). Die physiologische Auswertung ergab für die Fraktion 79 a eine Wirksamkeit von 35000 ME pro Gramm, für die Fraktion 79 b eine solche von etwa 40000 ME pro Gramm (s. Tabelle III). —

Die Zerstörung beträchtlicher Hormonmengen in diesem Versuch ist nach dem Ergebnis von Parallelversuchen wahrscheinlich auf die Reduktionswirkung des Äthylats zurückzuführen.

Versuch Nr. 89 vom 20. VII. 1928.

510 mg Hormonrohöl der Wirksamkeit 25000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden mit 20 ccm alkoholischer gesättigter Natriumäthylatlösung 1 Stunde in einem siedendem Wasserbad erhitzt. Die erkaltete und mit Wasser versetzte Reaktionslösung wurde nach der unter Versuch 11 angegebenen Weise aufgearbeitet. Der alkalischen Lösung konnten 154 mg Hormonöl mit Äther entzogen werden, nach dem Ansäuern waren weitere 16 mg zu extrahieren. Sowohl die ätherlösliche Charge 89 a, als auch die im Alkali verbliebene Fraktion 89 b zeigten im physiologischen Versuch eine ungefähre Wirksamkeit von 75000 ME pro Gramm (s. Tabelle III). Die Hormonausbeute belief sich also insgesamt auf etwa 100 %.

Versuch Nr. 106 vom 26. XI. 1928.

620 mg eines Hormonrohöles aus Plazenta von der Wirksamkeit 25000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden in 20 ccm Alkohol gelöst und unter Durchleiten von Ammoniakgas 2 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die mit Wasser versetzte Lösung wurde ausgeäthert, nach dem Waschen, Trocknen und Verdampfen der ätherischen Lösung hinterblieben 154 mg Öl (Charge 106 a), die nach dem Ergebnis der physiologischen Auswertung nur 40000 ME pro Gramm enthielten. Der Rest an wirksamer Substanz befand sich in der ammoniakalischen Lösung, der also nur etwa 40% des Hormons mit Äther zu entziehen waren. Die Auswertung der Charge 106 a findet sich in der Tabelle III.

Über die Anwendung kombinierter Säure- und Alkalibehandlung zur Reinigung von Plazenta-Rohölen.

Da durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure in der oben geschilderten Weise das Hormon in der ätherlöslichen Fraktion angereichert wurde, andererseits — trotz der Verteilung des Hormons zwischen wäßrigem Alkali und Äther — auch mit alkalischer Behandlung der Hormonöle in vielen Fällen Anreicherungs-effekte erzielt waren, wurden in einer größeren Versuchsreihe die aufeinanderfolgende Behandlung von Plazenta-Rohölen mit Säure und Alkali untersucht. Es zeigte sich in vielen Fällen, daß die erzielten Reinigungseffekte sich summierten und durch nachfolgendes Erwärmen der mit Salzsäure und Alkali bereits be-

handelten Lösung mit verdünnter Salzsäure nochmals erhöht werden konnten.

Besondere Aufmerksamkeit erregte dabei die stets zu beobachtende Erscheinung, daß durch Erwärmen mit Salzsäure die alkalilöslichen Hormonanteile sich zugunsten der ätherlöslichen vermindern ließen. Das Verhalten des Hormons schien in vielen Fällen darauf hinzudeuten, daß es in einer alkalilöslichen und einer neutralen Form zu existieren vermag, also ein Verhalten zeigt, das etwa dem eines Laktons ähnelt.

Über die kombinierte Anwendung einer sauren und alkalischen Hydrolyse von Plazentaölen liegen 43 Parallelversuche mit ihren quantitativen Auswertungen vor. Als Beispiele seien angeführt:

Versuche Nr. 16, 17, 18 vom 1., 2. und 3. V. 1928.

450 mg eines Hormonrohöles aus Plazenta von der Wirksamkeit 25000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden mit 10 ccm Alkohol und 4 ccm konzentrierter Salzsäure 5 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Verdünnen der Reaktionslösung mit Wasser wurde dieser die Charge 16 a (229 mg = 50%) mit Äther entzogen.

Die erhaltene Fraktion (16 a) wurde direkt mit 10 ccm Alkohol und 10 ccm 25 %iger wäßriger Kalilauge auf dem Wasserbad 5 Stunden hydrolysiert, mit Wasser verdünnt und ausgeäthert. Die ätherlöslichen Anteile (Charge 17 a) betragen 74,2 mg (= 33%), ihre physiologische Wirksamkeit belief sich auf etwa 150000 ME pro Gramm (s. Tabelle IV). — Die nach dem Ansäuern der Reaktionslösung mit Äther extrahierbare Charge 17 b enthielt 61 mg Hormonöl der Wirksamkeit 45000 ME pro Gramm (s. Tabelle IV).

Die Fraktion 17 a wurde in 5 ccm Alkohol gelöst und mit 2 ccm konzentrierter Salzsäure 5 Stunden erwärmt; aus der mit Wasser versetzten Lösung ließen sich 18,6 mg Öl mit Äther extrahieren. Diese Charge (18 a) besaß nach der physiologischen Auswertung eine Wirksamkeit von 350000 ME pro Gramm (s. Tabelle IV).

Versuche Nr. 26, 28, 29 vom 21., 22. und 23. V. 1928.

800 mg Hormonrohöl aus Plazenta von der Wirksamkeit 25000 ME pro Gramm (s. Tabelle I) wurden in 20 ccm Alkohol gelöst und nach Zusatz von 8 ccm konzentrierter Salzsäure 5 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Die ätherlösliche Charge 26 a (400 mg) wurde in 15 ccm Alkohol gelöst, mit 15 ccm 25 %iger wäßriger Kalilauge versetzt und 1 Stunde erwärmt. Die Aufarbeitung der alkalischen Reaktionslösung nach der im vorangehenden Versuch

angegebenen Weise lieferte 58,6 mg einer ätherlöslichen Fraktion (28 a) und 144 mg an alkalilöslichen Anteilen (28 b).

Die physiologische Auswertung (s. Tabelle IV) ergab für die Charge 28 a eine ungefähre Wirksamkeit von 150 000 ME pro Gramm, für die Charge 28 b eine solche von 70 000 ME pro Gramm.

Die Fraktion 28 a wurde nach der unter Versuch 18 angegebenen Weise nochmals mit Salzsäure behandelt, sie lieferte 42 mg eines ätherlöslichen Öls (29 a) von der physiologischen Wirksamkeit 250 000 ME pro Gramm (s. Tabelle IV).

Das Verhalten von Plazentaextrakten bei Entmischungsmethoden mit Lösungsmitteln.

Um die mit Hilfe der sauren und alkalischen Hydrolyse erzielten Reinheitsgrade der Hormonöle weiter zu erhöhen, wurde in einer Reihe von Versuchen ermittelt, wie sich Hormonöle zwischen 2—3 begrenzt mischbaren Lösungsmitteln verteilen. Art und Konzentration der angewandten Lösungsmittel wurden zur Auffindung optimaler Bedingungen vielfach variiert. An Lösungsmitteln haben vor allem Wasser, Äther, Methylalkohol, Äthylalkohol, Butylalkohol, Eisessig, Essigester, Azeton, Petroläther, Hexan und Benzol Verwendung gefunden. In erster Linie wurde die von E. A. Doisy und seinen Mitarbeitern an Follikelflüssigkeit erprobte Methode der Entmischung mit wäßrigem Alkohol und Petroläther verfolgt und dabei festgestellt, daß das Hormon in der alkoholischen Phase verbleibt und von vielen petrolätherlöslichen Begleitstoffen getrennt werden kann. Auf diese Weise wurden gute Anreicherungs-effekte erzielt.

Gewisse Erfolge wurden mit gleichartiger Methodik bei der Verteilung von Hormonölen zwischen wäßrigem Eisessig und Äther, wäßrigem Alkohol und Benzol, oder bei Entmischung einer wäßrig-alkoholischen Hormonlösung mit einem Gemisch von Essigester und Petroläther erzielt.

Es liegen über die zuletzt angeführten Trennungsmethoden 68 Parallelversuche mit ihren quantitativen Auswertungen vor; einige Beispiele seien angeführt:

Versuch Nr. 206 vom 11. XII. 1928.

Entmischung mit wäßrigem Alkohol-Petroläther: 250 mg eines Plazentaöls (Charge 183 a) von der physiologischen Wirksamkeit 90 000 ME pro Gramm (s. Tabelle V) wurden in 50 ccm Methylalkohol gelöst und unter Schütteln mit 150 ccm 50%igem Methylalkohol in 3 Anteilen versetzt. Nach jedesmaligem Zusatz

wurde die Lösung mit hochsiedendem Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge wurden nochmals mit 50%igem Methylalkohol gewaschen. Der verdünnten alkoholischen Phase konnten mit Äther 80 mg Hormonöl entzogen werden (Charge 206 a), die nach ihrer physiologischen Auswertung (s. Tabelle V) eine Wirksamkeit von 250000 ME pro Gramm zeigten. Das entspricht einer fast quantitativen Hormonausbeute.

Versuch Nr. 151 vom 22. XI. 1928.

Entmischung mit wäßrigem Eisessig-Äther: 205 mg eines Plazentaöles (Charge 123 a) von der ungefähren Wirksamkeit 20000 ME pro Gramm (s. Tabelle V) wurden mit 10 ccm Eisessig einige Zeit auf dem Wasserbad erwärmt und nach dem Zusatz von 100 ccm Wasser zweimal mit 40 ccm Äther ausgeschüttelt. Der gründlich mit Wasser gewaschene Ätherauszug hinterließ nach dem Trocknen und Abdestillieren des Lösungsmittels 22 mg Hormonöl (Charge 151 a) von einem physiologischen Wirkungswert 180000 ME pro Gramm (s. Tabelle V). Die Hormonausbeute war also annähernd quantitativ.

Versuch Nr. Pl. 16 vom 15. XI. 1929.

Entmischung mit wäßrigem Alkohol-Essigester-Petroläther: 1,76 g eines Hormonöles aus Plazenta (Charge Pl. 8a) von der physiologischen Wirksamkeit 90000 ME pro Gramm (s. Tabelle V) wurden in 15 ccm Alkohol gelöst, mit 35 ccm Wasser versetzt und mit 25 ccm Essigester durchgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde nach dem Abtrennen der alkoholisch-wäßrigen Phase mit 70 ccm 30%igem Methylalkohol und mit 30 ccm hochsiedendem Petroläther versetzt und durchgeschüttelt. In der Essigester-Petroläther-Phase befanden sich 1,31 g Hormonöl (Charge Pl. 16a) von der physiologischen Wirksamkeit 120000 ME pro Gramm (s. Tabelle V).

Einige Versuche an Plazentaextrakten mit Adsorptions- und Fällungsmethoden.

Eine Reihe von Adsorptions- und Fällungsversuchen an Plazentaölen wurden durchgeführt, unter denen Adsorptionen mit Kohle, Aluminium- und Eisenhydroxyd und Fällungen mit Digitonin, Pikrinsäure und vielen Schwermetallsalzen erwähnt seien. Keine der verwendeten Methoden hat irgendwelche Erfolge in bezug auf die Reinigung der Öle gezeitigt, es soll daher eine nähere Besprechung der vorliegenden Experimente unterbleiben. Zumeist teilte sich das Hormon ohne Reinigungseffekt zwischen

Lösung und Fällungsmittel, insbesondere zeigten die Versuchsergebnisse stets eine deutlich in Erscheinung tretende Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und dessen Vorbehandlung.

Kohle erwies sich als sehr gutes Adsorbens, jedoch ließ sich das Hormon nur äußerst schwer wieder eluieren.

Mit gutem Erfolg ist lediglich die Behandlung von ätherischen Hormonlösungen mit Aluminium-Amalgam angewendet worden. Gegen Reduktion mit Aluminium-Amalgam erwies sich das Hormon in den vorliegenden Reinheitsgraden beständig; neben einer weitgehenden Entfärbung der Lösungen wurde eine Adsorption von 30—50% der Begleitstoffe durch das zersetzte Amalgam erzielt. Da das Hormon stets unverändert in der ätherischen Lösung verblieb und somit leicht von dem Niederschlag getrennt werden konnte, kann diese Methode vielleicht zu Reinigungszwecken Verwendung finden; es liegen jedoch über die Anwendung von Aluminium-Amalgam zum Zweck der Hormonanreicherung in Plazentaölen nur 8 Versuche mit ihren physiologischen Auswertungen vor. Als Beispiel sei angeführt:

Versuch Nr: 87 vom 20. VII. 1928.

388 mg einer Hormonlösung (Charge 84a) von der physiologischen Wirksamkeit 75000 ME pro Gramm (s. Tabelle V) wurden in 5 ccm Alkohol gelöst, mit 150 ccm Äther und einigen Tropfen Wasser versetzt und 12 Stunden unter häufigem Umschütteln mit frisch bereitetem Aluminium-Amalgam behandelt. Nachdem die ätherische Lösung vom Niederschlag getrennt worden war, wurde sie gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet; nach dem Verdampfen des Lösungsmittels hinterblieben 172 mg eines wenig gefärbten Öls (Charge 87a) von der physiologischen Wirksamkeit 175000 ME pro Gramm (s. Tabelle V). Die Hormonausbeute war also annähernd quantitativ.

Die bisherigen Ergebnisse der Plazentabearbeitung lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß mit diesem Ausgangsmaterial ein entscheidender Fortschritt in bezug auf die Reindarstellung des Hormons nicht erzielt werden konnte, trotzdem eine Reihe zu diesem Zweck bisher nicht verwendeter Methoden herangezogen wurden. Dennoch haben die vorliegenden Versuche in vieler Hinsicht auf die weitere Bearbeitung des Hormons fördernd gewirkt. Rein empirisch ist das Verhalten der wirksamen Substanz bei der Verteilung zwischen Lösungsmitteln verfolgt, Methoden, mit denen sich später eine weitgehende Reinigung von

Hormonölen aus Schwangerenharn durchführen ließ. Die systematische Anwendung von saurer und alkalischer Behandlung ließ schon an den Plazenta-Rohölen das einem Laktone ähnelnde Verhalten erkennen, auf dem die wesentlichsten weiteren auf Schwangerenharnöle angewendeten Reinigungsmethoden beruhen.

Eine Reihe von weiteren Versuchen, die darauf hinzielten, schon an Rohölen etwas über die chemischen Reaktionsweisen des Hormons experimentell festzustellen, sollen nur in ihren Ergebnissen angedeutet werden, da sie im wesentlichen nur Bestätigungen der von anderer Seite (FRANK, DOISY, LAQUEUR, ZONDEK, DICKENS und DODDS) ermittelten Erkenntnisse darstellen. Außer der aus den Versuchsberichten hervorgehenden Beständigkeit des Hormons gegen Einwirkung von Säuren und Alkalien, gegen Temperaturerhöhung und gelinde Reduktion, wurde erkannt, daß es mit Digitonin nicht fällbar ist und keine charakteristischen Farbreaktionen zeigt. Gegen Oxydation, insbesondere auch gegen Belichtung in Gegenwart von Luft¹²⁾ ist es unbeständig. In manchen Fällen verloren gereinigte Hormonöle auch ihre Wirksamkeit bei energischer Behandlung mit Natrium und Alkohol (s. Versuch Nr. 79, Seite 23), Versuchsreihen, in denen der erste Hinweis auf reduzierbare Atomgruppen im Follikelhormon vorlag.

Follikelflüssigkeit als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des weiblichen Sexualhormons.

Wesentlich bessere Erfolge in bezug auf die Anreicherung und Reinigung des weiblichen Sexualhormons als mit Plazentaextrakt sind mit Follikelflüssigkeit als Ausgangsmaterial erzielt worden. Nach E. LAQUEUR enthält Follikelflüssigkeit 600—1200 ME pro kg, E. A. DOISY ermittelte ihren Gehalt zu 900 RE pro kg. Bis zum gegenwärtigen Augenblick ist eine Reindarstellung des Hormons aus diesem Ausgangsmaterial ebenfalls noch nicht möglich gewesen.

Schon vor 1923 hatten einige Autoren auf das Vorhandensein von Hormon im Follikel hingewiesen (BUCURA 1908, WINTZ 1920, FRANK 1922), in der bedeutsamen Arbeit von ALLEN und DOISY (1923) „An Ovarian Hormone“ wurde der Reichtum der Follikelflüssigkeit an Brunsthormon gemeinsam mit den ersten Ergebnissen über den neuen Zyklustest ausführlicher erörtert.

12) Bei Ausschluß von Sauerstoff behalten Hormonöle auch bei längerer Belichtung mit Sonnenlicht ihre ursprüngliche Wirksamkeit.

Seit 1924 sind es neben den schon in früherem Zusammenhang genannten Autoren in erster Linie E. A. DOISY, B. ZONDEK und E. LAQUEUR mit ihren Mitarbeitern, welche aus Follikelflüssigkeit hochgereinigte Präparate haben darstellen können.

Die Methoden von E. A. DOISY ähneln in ihren ersten Phasen der Aufarbeitungsvorschrift für Plazentaextrakte: Die Follikelflüssigkeit wird mit Alkohol extrahiert, die Phosphatide werden mit Azeton gefällt, durch Umlösen und Ausfrieren aus Alkohol und Äther und durch eine anschließende Digitoninfällung werden Glyceride und Cholesterin entfernt. Saure Bestandteile werden mit verdünntem Alkali abgetrennt, der wichtigste Schritt der Reinigung wird anschließend mit der hier erstmalig systematisch verwendeten Verteilung der Öle zwischen verdünntem Alkohol und Petroläther erzielt. Bis zum Jahre 1928 wurden Präparate erhalten, welche in 0,001 mg 1 RE enthielten.

B. ZONDEK, sowie E. LAQUEUR gingen von der Arbeitshypothese aus, daß dem Follikelhormon kein Lipoidcharakter zukomme, sondern daß es sich um einen in Wasser leicht löslichen Stoff handle. Ihre Darstellungsvorschriften sind durch eingehende experimentelle Angaben nicht belegt worden. LAQUEUR brachte zur Reinigung ein sogen. „Wasserverfahren“ zur Anwendung. Als wichtigstes Problem wird die „Befreiung des Hormons von Proteinen“ angesprochen. Fällungen der mit Kochsalzlösung versetzten Follikelflüssigkeit mit kolloidalem Eisen, Verwendung von Kohle als Adsorbens für das Hormon mit anschließender Elution mit Phenol und die Anwendung von organischen Lösungsmitteln (wie Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol und Petroläther) werden erwähnt. — B. ZONDEK verwendete neben den üblichen Lösungsmittel-trennungen die Behandlung der Extrakte mit schwachen Alkalien und mit Säuren. Die von diesen Bearbeitern dargestellten Präparate enthielten bis zum Jahre 1928 bereits einige Millionen ME pro Gramm.

Diese sehr hohen Reinheitsgrade haben in erster Linie dazu geführt, über die Eigenschaften des Follikelhormons Aussagen zu machen, soweit es an unreinen Präparaten überhaupt möglich war. Die wichtigsten Erkenntnisse über die Beständigkeit, die Zusammensetzung und über die Reaktionen des Hormons sind bereits im voraufgehenden Abschnitt besprochen und einer Kritik unterzogen worden; der bedeutendste Fortschritt, der mit Hilfe der erzielten Reinheitsgrade erreicht wurde, darf aber auf physiologischem und pharmakologischem Gebiete gesucht werden.

Schwangerenharn als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung des Follikelhormons.

Die Entdeckung von B. ZONDEK und ASCHEIM (1927), daß im Schwangerenharn große Hormonmengen (5—10 ME pro ccm) zur Ausscheidung gelangen, ist für die Bearbeitung des weiblichen Sexualhormons von derselben Bedeutung geworden, wie der Scheidenbrunsttest nach ALLEN und DOISY. Schwangerenharn ist als Ausgangsmaterial für die Untersuchung des Follikelhormons von vielen Seiten herangezogen worden; B. ZONDEK, SLOTTA (1927), E. A. DOISY und VELER (1928), GLIMM und WADEHN (1929), MARRIAN und PARKES (1929), BUTENANDT (1929), WIELAND, STRAUB, DORFMÜLLER (1929) haben sich für die Untersuchung des Ovarialhormons dieses Ausgangsmaterials bedient.

Die zur Darstellung eines an Hormon angereicherten Öles aus Schwangerenharn verwendeten Methoden beruhen in ihren Grundzügen auf den Angaben von B. ZONDEK, welcher mit seinen Mitarbeitern ein Verfahren ausarbeitete, mit dessen Hilfe man das im Schwangerenharn vorhandene Hormon in konzentrierter Form erfaßt. Im Prinzip handelt es sich darum, das Hormon mit Äther oder anderen organischen Lösungsmitteln aus dem angesäuerten Harn zu extrahieren und durch vorsichtige Behandlung mit Alkali saure Bestandteile zu entfernen. Es gelingt durch Anwendung solcher Methodik leicht, ein Rohöl darzustellen, das in 1 g durchschnittlich 30 000 ME enthält. — Das auf diese Weise aus Schwangerenharn darstellbare Rohöl ist von den erwähnten Bearbeitern in verschiedener Weise der weiteren Fraktionierung unterworfen worden.

Eigene Versuche zur Hormonanreicherung mit einem Schwangerenharn-Rohöl als Ausgangsmaterial.

In der Technik sind Arbeitsgänge ausgearbeitet worden, ein Öl der Reinigungsstufe 30—40 000 ME pro Gramm in größerem Maße zu gewinnen. Ein entsprechendes technisches Rohöl — dargestellt von der SCHERING-KAHLBAUM A-G., Berlin — war Ausgangsmaterial für meine Untersuchungen. Dieses „Schwangerenharn-Rohöl“ stellt einen dunkelrotbraunen Syrup dar, der in Alkohol und Azeton leicht löslich ist und Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel enthält. Als Beispiel für eine physiologische Auswertung eines solchen Rohöls ist in Tabelle VI die Injektionsreihe des Präparates H 15 wiedergegeben.

Mit diesem Schwangerenharn-Rohöl wurden — fußend auf den geschilderten Erfahrungen an Plazentaölen — systematisch Ver-

suche zur Anreicherung des wirksamen Prinzips durchgeführt. Die Ergebnisse der gesamten Versuchsreihen ließen einen Weg zur Reindarstellung des Follikelhormons erkennen. Unter diesem Gesichtspunkt seien — in derselben Weise, wie bei der Besprechung der Plazentabearbeitung — die durchgeführten Experimente an Beispielen erläutert. Insgesamt wurden 1090 Serienversuche, die eine quantitative physiologische Auswertung von etwa 2000 Hormonchargen im ALLEN-DOISY-Test bedingt haben, durchgeführt.

Entmischungsversuche mit Lösungsmitteln.

Um aus dem Rohöl die größten Anteile an Begleitstoffen zu entfernen, wurden zunächst diejenigen Entmischungsmethoden angewendet, die sich bei der Plazentabearbeitung als vorteilhaft erwiesen hatten.

Es hat sich gezeigt, daß die Entmischungsmethode mit Petroläther und verdünntem Alkohol nach der für Plazentaextrakte ausgearbeiteten Vorschrift sich in ihrer Anwendung auf Schwangerenharn-Rohöle ausnahmslos bewährt hat.

Von vielen weiterhin versuchten Lösungsmitteltrennungen nach der Art, wie sie oben geschildert wurden (vergl. darüber Seite 26), hat sich nur eine Entmischungsmethode als sehr vorteilhaft erwiesen: die Trennung zwischen verdünntem Alkohol und Benzol. Das Hormon ist in 60%igem Alkohol weit schwerer löslich als in Benzol, es läßt sich daher aus einer Lösung in 60%igem Alkohol mit Benzol weitgehend angereichert ausschütteln; bei dieser Alkoholkonzentration liegt das günstigste Verhältnis zwischen Reinigungseffekt und Hormonausbeute.

Diese beiden Lösungsmitteltrennungen (verdünnter Alkohol-Petroläther und verdünnter Alkohol-Benzol) finden bei der Reindarstellung des Follikelhormons aus Schwangerenharn nach dem im nächsten Abschnitt dieser Abhandlung geschilderten Verfahren stets Verwendung. Entsprechende Beispiele über die zweckmäßigste Anwendung der Methoden werden bei der Besprechung des Aufarbeitungsganges (Seite 41—43) angeführt werden. Hier seien nur einige Beispiele über die Ermittlung günstigster Konzentrationsbedingungen im Fall der Benzoltrennung gegeben:

Versuch Nr. 340 vom 7. VI. 1929.

151 mg Hormonöl (Charge 304 a) von der Wirksamkeit 200 000 ME pro Gramm (s. Tabelle VII) wurden in 20 ccm Äthylalkohol gelöst, unter Schütteln mit 20 ccm Wasser in 3 Anteilen versetzt und wiederholt mit 20 ccm Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolphasen wurden nochmals mit 50%igem Alkohol gewaschen,

die alkoholisch-wäßrige Phase wurde nach dem Abtrennen mit der ursprünglichen Lösung vereinigt (340b). Die Benzolextrakte wurden gemeinsam mit 70%igem Methylalkohol ausgeschüttelt, bis dieser sich nicht mehr nennenswert anfärbte. Die vereinigten 70%igen alkoholischen Auszüge wurden mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert (340c). Die im Benzol verbleibenden Anteile (340a) wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und getrocknet.

Es wurden isoliert: Fraktion 340a (Benzolphase) = 63,2 mg, Fraktion 340b (löslich in 50%igem Alkohol) = 16,6 mg, Fraktion 340c (löslich in 70%igem Alkohol) = 44,2 mg.

Die physiologische Auswertung ergab, daß die Charge 340b frei von wirksamer Substanz war; in der Charge 340a fanden sich 70% des Hormons in einem Öl von der Wirksamkeit 350 000 ME pro Gramm, in der Charge 340c 30% des Hormons in einem Öl von der Wirksamkeit 200 000 ME pro Gramm. Die Auswertungen dieses Versuches sind aus Tabelle VII ersichtlich.

Versuch Nr. 341 vom 7. VI. 1929.

378 mg Hormonöl (Charge 291a) von der Wirksamkeit 180 000 ME pro Gramm (s. Tabelle VII) wurden in einem Kontrollversuch nach den eben skizzierten Angaben zwischen Benzol und 50%igem, sowie 70%igem Alkohol verteilt.

Es wurden isoliert: Fraktion 341a (Benzolphase) = 102 mg, Fraktion 341b (löslich in 50%igem Alkohol) = 51,6 mg, Fraktion 341c (löslich in 70%igem Alkohol) = 132 mg.

Die physiologische Auswertung ergab, daß die Charge 341b wiederum frei von Hormon war; in der Charge 341a fanden sich 65% des Hormons in einem Öl von der Wirksamkeit 400 000 ME pro Gramm, in der Charge 341c 35% des Hormons in einem Öl von der Wirksamkeit 200 000 ME pro Gramm. Die Auswertungen sind in Tabelle VII enthalten.

Versuch Nr. 343 vom 7. VI. 1929.

380 mg Hormonöl der Wirksamkeit 180 000 ME pro Gramm (Charge 293 auf Tabelle VII) wurden in 20 ccm Äthylalkohol gelöst, unter Schütteln mit 12 ccm Wasser versetzt und wiederholt mit etwa 20 ccm Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolphasen wurden sehr häufig mit 60%igem Methylalkohol gewaschen. Nach dem Trocknen der Benzollösung mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, es hinterblieben 152 mg Öl (Charge 343a) von der physiologischen Wirksamkeit 450 000 ME pro Gramm. Unter den vorliegenden Bedingungen war die Hormon- ausbeute annähernd quantitativ (vergl. aber Seite 43 oben).

Die Verteilung des Hormons zwischen Äther und Alkali
und die Beeinflussung des Verteilungsverhältnisses
durch saure und alkalische Hydrolyse.

Es wurde — in Übereinstimmung mit Beobachtungen von GLIMM und WADEHN und von C. FUNK — frühzeitig die Beobachtung gemacht, daß ähnlich wie bei Plazentaextrakten sich aus einer ätherischen Lösung der Schwangerenharnöle stets ein wechselnd großer Hormonanteil mit Alkali ausschütteln läßt, während der Rest erst nach sehr lange anhaltendem Schütteln mit häufig zu erneuernder Natronlauge im Alkali zu lösen ist. Aus der alkalischen Lösung läßt sich das Hormon erst nach dem Ansäuern leicht wieder extrahieren; durch langanhaltendes Schütteln mit häufig zu erneuerndem Äther ist jedoch ein Teil des Hormons allmählich auch aus alkalischer Lösung extrahierbar.

Durch eine große Reihe gleichartiger Parallelversuche mit verschiedenem Ausgangsmaterial wurden folgende Verteilungszahlen ermittelt:

Aus einer ätherischen Lösung von Hormonölen ließen sich ausschütteln: a) mit Natriumbikarbonat 5—10% an sauren Verunreinigungen, welche kein Hormon enthielten, b) mit Natriumkarbonat 12—20% an sauren Verunreinigungen, in denen sich geringe Spuren von Hormon fanden, c) mit verdünnter Natronlauge (durch kurzes Ausschütteln) 15—50 Gewichtsprozent des Öls, 20 bis 50% an Hormon, das nach dem Ansäuern wieder mit Äther extrahierbar war und häufig auf diese Weise in sehr viel größerem Reinheitsgrad erhalten wurde. — Als Beispiel sei angeführt:

Versuch Nr. 297 vom 8. V. 1929.

290 mg Hormonöl (Charge 272 a) von der Wirksamkeit 140 000 ME pro Gramm (s. Tabelle VIII) wurden in 15 ccm Alkohol gelöst und mit 250 ccm peroxydfreiem Äther versetzt. Die ätherische Lösung (a) wurde zunächst mit Sodalösung (b), sodann mit 1n Natronlauge (c) durchgeschüttelt. Die alkalischen Lösungen wurden angesäuert und wieder mit Äther extrahiert. Alle ätherischen Lösungen wurden gewaschen, getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Es wurden isoliert: Fraktion 297 a (neutrale Anteile) = 173 mg (60%) von der physiologischen Wirksamkeit 200 000 ME pro Gramm.

Fraktion 297 b (karbonatlösliche Anteile) = 34 mg (12%), die eine geringe physiologische Wirkung von etwa 5000 ME pro Gramm zeigten.

Fraktion 297 c (alkalilösliche Anteile) = 51 mg (17%) von der physiologischen Wirksamkeit 360 000 ME pro Gramm.

Die Auswertungen dieses Versuches sind aus Tabelle VIII ersichtlich.

Erwärmt man Hormonöle einige Zeit mit Alkali, so gelingt es leicht, das zunächst ermittelte Verteilungsverhältnis der wirksamen Anteile zwischen Äther und Alkali zugunsten der alkalilöslichen Phase zu verschieben. Man vermag sämtliches Hormon im Alkali zu lösen, der alkalischen Lösung kann man aber stets wieder einen Teil des Hormons durch langandauerndes Schütteln mit Äther allmählich entziehen. Die obwaltenden Verhältnisse wurden in 15 Parallelversuchen unter verschiedenen Konzentrationen und Temperaturbedingungen beobachtet. Als Beispiel sei gegeben:

Versuch Nr. 296 vom 8. V. 1929.

290 mg des Hormonöles 267 a von der Wirksamkeit 60000 ME pro Gramm (s. Tabelle VIII) wurden in 18 ccm Alkohol gelöst und mit 18 ccm 20%iger methylalkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbad erwärmt. Die mit Wasser verdünnte Reaktionslösung wurde ausgeäthert (a), anschließend angesäuert und erschöpfend mit Äther extrahiert (b). Es wurden isoliert:

Fraktion 296 a (neutrale Anteile): 136 mg (= 47%) von der physiologischen Wirksamkeit 15000 ME pro Gramm.

Fraktion 296 b (saure Anteile): 50 mg (= 17%) von der physiologischen Wirksamkeit 125000 ME pro Gramm.

Die Auswertungen befinden sich in Tabelle VIII.

Von besonderem Interesse erwies sich die Beeinflussung des Verteilungsverhältnisses der Hormonöle zwischen Alkali und Äther durch eine voraufgegangene saure Hydrolyse, deren Wirkung eine dreifache ist: Außer einer Anreicherung des Hormons in den ätherlöslichen Anteilen, wurde durch Salzsäure-Hydrolyse stets eine Vermehrung der in Natriumkarbonat löslichen (unwirksamen) Begleitstoffe, also auch ein stärkerer Reinigungseffekt durch deren Abtrennung erzielt; die durch kurzes Ausschütteln mit Alkali löslichen Anteile an wirksamer Substanz wurden durch saure Hydrolyse stets erheblich verringert, oftmals auf sehr geringe Anteile herabgemindert. Nach dem Abtrennen der sauren Verunreinigungen konnte durch langanhaltendes Ausschütteln der ätherischen Lösung mit verdünntem Alkali das Hormon allmählich im Alkali gelöst werden, aus dem es nach dem Ansäuern in weitgehend gereinigter Form gewonnen wurde. Als Beispiele seien angeführt:

Versuch Nr. 320 vom 27. V. 1929.

542 mg eines Hormonöles (Charge 294 a) von der physiologischen Wirksamkeit 200000 ME pro Gramm (s. Tabelle VIII), das

nach einem quantitativ durchgeführten Parallelversuch aus 60% alkalilöslichen und 30% alkaliumlöslichen Hormonanteilen bestand, wurden mit 18 ccm Alkohol und 6 ccm verdünnter Salzsäure kurze Zeit auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Verdünnen der Lösung wurde das Reaktionsgut mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung (a) (unter gleichen Bedingungen wie im erwähnten Parallelversuch) sofort mit Sodalösung (b) und dann mit verdünnter Natronlauge (c) kurz ausgeschüttelt. Es wurden nur noch 37% des Hormons in angereicherter Form im Alkali vorgefunden:

Fraktion 320 a (neutrale Bestandteile): 265 mg von der Wirksamkeit 150 000 ME pro Gramm.

Fraktion 320 b (sodalösliche Anteile): 100 mg von der Wirksamkeit 5000 ME pro Gramm.

Fraktion 320 c (alkalilösliche Anteile): 51 mg von der Wirksamkeit 750 000 ME pro Gramm.

Die Auswertungen befinden sich in Tabelle VIII.

Versuch Nr. 324 vom 28. V. 1929.

287 mg des Hormonöles 286 b von der Wirksamkeit 160 000 ME pro Gramm (s. Tabelle VIII), welches sich nach einem durchgeführten Parallelversuch quantitativ (und ohne Reinigungseffekt) aus einer ätherischen Lösung mit Alkali ausschütteln ließ, wurden in 15 ccm Alkohol gelöst und nach Zusatz von 5 ccm verdünnter Salzsäure 2 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Nach der unter Versuch 320 angegebenen Aufarbeitungsvorschrift wurden isoliert:

Charge 324 a (neutrale Anteile): 30 mg von der Wirksamkeit 750 000 ME pro Gramm, d. i. 50% des Hormons.

Charge 324 b (sodalösliche Anteile): 85 mg ohne physiologische Wirksamkeit.

Charge 324 c (alkalilösliche Anteile): 38 mg von der physiologischen Wirksamkeit 550 000 ME pro Gramm, d. i. 50% des Hormons.

Die Auswertungen des Versuches 324 finden sich in Tabelle VIII.

Diese Versuchsergebnisse sind in ihrem wesentlichen Inhalt folgendermaßen zusammenfassen:

1. durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure ist eine weitgehende Anreicherung des Hormons in der ätherlöslichen Phase zu erzielen, während beträchtliche Mengen der Begleitstoffe in der salzsauren Lösung verbleiben,
2. die in Natriumkarbonat löslichen, physiologisch unwirksamen Begleitstoffe des Hormons können durch saure Hydrolyse vermehrt werden; durch ihre Abtrennung wird ein zweiter Anreicherungsseffekt erzielt,

3. alle Versuchsreihen über die Behandlung von Hormonölen mit Alkali und Säure deuten darauf hin, daß das Hormon in einer alkalilöslichen und einer alkaliunlöslichen Form zu existieren vermag, die augenscheinlich miteinander in einem durch Einwirkung von Säure oder Alkali zu beeinflussendem Gleichgewicht stehen,

4. durch vollkommene Überführung des Hormons in alkalische Lösung, aus der es nach dem Ansäuern mit Äther extrahierbar ist, kann man einen dritten weitgehenden Reinigungseffekt erzielen.

Diese an Plazenta und Schwangerenharn gewonnenen Erkenntnisse für die weitere Anreicherung des Hormons nutzbar zu machen und mit ihrer Hilfe höchstgereinigte, von neutralen und stark sauren Begleitstoffen weitgehend befreite Hormonöle darzustellen, ist das Ziel von über 300 weiteren systematischen Versuchen gewesen, die auf den skizzierten Ergebnissen beruhten. Die folgerichtige Anwendung der bisher ermittelten Erkenntnisse hat ausgereicht, um eine Methode zur Reindarstellung des Hormons kennen zu lehren, die später (Seite 40 ff.) im Zusammenhang besprochen werden soll.

Adsorptions- und Fällungsversuche an Hormonölen aus Schwangerenharn.

Wie bei den Plazentaölen sind auch zur Reinigung des Follikelhormons aus Schwangerenharn-Rohölen eine sehr große Zahl von Adsorptions- und Fällungsmethoden auf ihre Brauchbarkeit geprüft worden. Als Adsorbentien sind unter verschiedenen Bedingungen Aluminiumhydroxyd, Kupferhydroxyd, Eisenhydroxyd, Silberchlorid verwendet worden, ohne daß eine Fällung oder Anreicherung des wirksamen Stoffes erzielt wurde; ebenfalls ohne nennenswerten Erfolg waren Fällungsversuche mit Cyansäure, Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure. Die Anwendung von Natrium-desoxycholat auf der Grundlage des „Choleinsäure-Prinzips“ führte stets zu einer Teilung des Hormons zwischen wäßriger Lösung und Niederschlag und ist deshalb wegen der auftretenden Verluste nicht weiter verfolgt worden¹³⁾.

In vielen Fällen ist die bei der Bearbeitung von Plazentaextrakten bereits verwendete Methode der Behandlung von Hormonölen mit Aluminiumamalgam in ihrer Einwirkung auf Schwangerenharnöle geprüft worden, oft mit sehr gutem Erfolg

13) WIELAND, STRAUB und DORFMÜLLER haben später über gute Anreicherungsresultate mit Hilfe dieser Methode berichtet.

der Axe, Z die Höhe des Schwingungspunktes über dem Referenzniveau der Erdoberfläche. Wegen der Mithilfe der elastischen Kräfte, auf welche sich die Konstante f' bezieht, ist eine stabile Gleichgewichtslage und darum eine brauchbare Konstruktion nun auch möglich, wenn Schwerpunkt und Schwingungspunkt über der Axe liegen; für diesen Fall gelten die oberen, für den entgegengesetzten die unteren der doppelten Vorzeichen.

Nach den Formeln (84), (85) verhält sich unser physischer Seismograph ganz so wie ein Pendelseismograph mit punktförmiger Masse, bei dem die Pendellänge $= L$, die Indikatorlänge $= J^{(e)}$ und der Pendelkörper sich in der Höhe $Z = Z_A \pm L_0$, also in der Höhe des Schwingungspunktes befindet.

Der Umstand, dass bei angemessener Konstruktion des physischen Pendels der Schwerpunkt leicht sehr nahe der Axe gelegt und damit Z sehr gross gemacht werden kann, ist von besonderem Interesse, denn wir haben in Artikel 23 erkannt, dass bei dem wichtigen Problem der Trennung seismischer Horizontalverrückungen und Neigungen gerade die Höhe Z entscheidend ist. Während nun das einfache Pendel aus praktischen Gründen eine hinreichende Variation der Höhe nicht gestattet, lässt sich diese mit dem physischen Pendel, wo es sich nur um die Verlegung des Schwingungspunktes handelt, in bequemer Weise erreichen.

Bei der Konstruktion seines Klinographen hat sich W. Schlüter diese Verhältnisse zu Nutze gemacht. Der pendelnde Körper erhielt die Gestalt eines Waagebalkens von 150 cm Länge mit festen Gewichten an den Enden. Die interessirenden Daten waren:

$$\begin{aligned} \Theta &= 7 \text{ kg m}^2, \quad M = 15 \text{ kg}, \quad S = 0,04 \text{ mm}, \quad Z_A = 0, \\ I &= 700 \text{ m}, \quad L_0 = \frac{\Theta}{MS} = 12000 \text{ m}, \quad Z = Z_A - L_0 = -12000 \text{ m}, \\ T &= 20 \text{ sec}, \quad L = 100 \text{ m}, \quad V^{(e)} = -\frac{1}{20}, \quad J^{(e)} = 6 \text{ m}, \quad W^{(e)} = 700 \text{ m}. \end{aligned}$$

Der Klinograph entsprach hiernach bei seinen Registrirungen einem einfachen Pendel von 144 m Länge, das von einem starren Gerüst nicht weniger als 15000 m unterhalb des Referenzniveaus getragen wird, und dessen Ausschläge 20-mal verkleinert aufgezeichnet werden. Die ungeheure äquivalente Gerüstgrösse macht es einleuchtend, dass nicht daran zu denken ist, mit einfachen Pendeln Klinographen entsprechender Leistungsfähigkeit zu konstruieren.

Die Aufzeichnungen des Klinographen wurden verglichen mit denen eines Horizontalpendels folgender Daten:

$$T = 12 \text{ sec}, \quad L = 36 \text{ m}, \quad V^{(e)} = 25, \quad J^{(e)} = 900 \text{ m}, \quad W^{(e)} = 0, \quad Z = 0.$$

Man erkennt die weite Ueberlegenheit des Horizontalpendels in dem Gliede I. Klasse und die des Klinographen in dem Gliede II. Klasse. Da der Klinograph auch von den stärksten beobachteten Erdbeben, bei denen die scheinbaren Neigungen in den langen Wellen $1\frac{1}{2}$ Sekunden erreichten, unbeeinflusst blieb,

konnte, geschlossen werden, dass nicht wirkliche Neigungen, sondern Horizontalverschiebungen im Wesentlichen die Aufzeichnung des Horizontalpendels und also auch die der übrigen ähnlichen Apparate veranlassen, während die wirklichen Neigungen sehr klein bleiben (in den beobachteten Fällen unter 1/40 Sekunde).

31. *Seismograph beliebiger Konstruktion für eine Komponente.* Wir wollen nun sogleich zu dem allgemeinsten Fall einer beliebigen Konstruktion übergehen, wobei für das Gehänge in irgend einer Weise Axen, Hebel, Federn und dergleichen verwendet sein können. Jedoch nehmen wir zur Vereinfachung der Darstellung vorläufig nur *einen Grad der Freiheit* an; relativ zum Gestell sollen sich also die Punkte des Gehänges nur in *Kurven* bewegen können, und es soll die Lage aller Punkte bestimmt sein, wenn die Lage eines einzigen vorgeschrieben ist. *Die Angabe des Ausschlags a eines Indikators und seiner Aenderungen genügt hiernach vollständig, um die jeweilige relative Lage und die relativen Bewegungen festzustellen.*

Die angenommene Verknüpfung der Bewegungen hat zur Folge, dass eine bewegendende Kraft, die an irgend einer Stelle des Gehänges wirkt, durch eine Kraft an irgend einer anderen Stelle ersetzt werden kann. Nach dem mechanischen *Prinzip der virtuellen Verrückungen* müssen sich dabei die Intensitäten der beiden Kräfte umgekehrt verhalten wie die entsprechenden Verrückungen. Ist also zum Beispiel K die zunächst gegebene Kraft, Q ihr Aequivalent am Indikator, so muss

$$(86) \quad Q = K \frac{\alpha}{a}$$

sein, wenn α den zum Indikatorsausschlag a gehörigen Ausschlag des Angriffspunktes von K parallel ihrer Wirkungslinie bedeutet. *Von diesem Satze werden wir im Folgenden ausgiebigen Gebrauch machen, um das gesamte Kraftsystem in einer für die Anwendung bequemen Weise auf den Indikator zu beziehen.* Zunächst ist dabei freilich vorauszusetzen, dass der Indikator von einem starren Arm geführt werde, dass es sich also um mechanische Registrierung handle. Da jedoch die ideelle Kraft Q einfach als eine rechnerische Hilfsgrösse für die Entwicklung der Theorie aufgefasst werden kann, steht garnichts im Wege, sie selbst dann beizubehalten, wenn der Indikator durch einen photographirenden Lichtpunkt gebildet wird. Will man das aus besonderen Gründen nicht thun, *so ist an Stelle des Indikators irgend ein passend scheinender Punkt des Gehänges auszuwählen und unter a im Folgenden der Ausschlag dieses Punktes zu verstehen.* —

Bei der Berechnung der Trägheitskräfte (Artikel 29) sind die absoluten Bewegungen des Gehänges zu verfolgen. Doch darf dabei wie bisher von den Bewegungen der Erde als Weltkörper abgesehen werden, das heisst, *es genügt, als „absolute“ Bewegungen diejenigen relativ zur Erde im Ganzen zu bezeichnen.*

ξ^* , η^* , ζ^* seien die *absoluten Verschiebungen* eines Punktes des Gehänges, ξ' , η' , ζ' die *entsprechenden Verschiebungen relativ zum Gestell*. Wir nehmen stets

nur so kleine seismische Störungen an, dass gemäss Artikel 16:

$$(87) \quad \xi^* = \xi' + \xi + zi_x - y\vartheta_x, \quad \eta^* = \eta' + \eta + zi_y + x\vartheta_x, \quad \zeta^* = \zeta' + \zeta - xi_x - yi_y,$$

gesetzt werden kann, wobei x, y, z die Koordinaten der Ruhelage relativ zum Referenzpunkt der Erdoberfläche bedeuten.

32. *Seismische Ruhe.* Zunächst soll wie bei der Behandlung des physikalischen Pendels der *Fall seismischer Ruhe* untersucht werden. Bei einem Ausschlag a verursachen die bewegenden Kräfte — herrührend zum Beispiel von der Schwere oder von Federn irgend welcher Art — eine zurücktreibende Komponente. Es entspricht unserer Annahme über die Kleinheit der Verschiebungen, diese proportional mit a zu setzen.

$$(88) \quad Q^{(e)} = -fa$$

stelle demgemäss die *Resultante der auf das Gehänge wirkenden bewegenden Kräfte* in Bezug auf den Indikator dar, wobei f eine gewisse Konstante ist.

Um die Resultante der Trägheitskräfte zu finden, bedenken wir, dass bei kleinen Bewegungen die Verrückung eines jeden Theilchens proportional mit a gesetzt werden darf;

$$(89) \quad \left[\frac{\xi'}{a} \right], \quad \left[\frac{\eta'}{a} \right], \quad \left[\frac{\zeta'}{a} \right]$$

bedeuten hiernach für jedes Theilchen gewisse Konstanten, welche uns mittels

$$(90) \quad \left[\frac{\xi'}{a} \right] \frac{da}{dt}, \quad \left[\frac{\eta'}{a} \right] \frac{da}{dt}, \quad \left[\frac{\zeta'}{a} \right] \frac{da}{dt}$$

die Komponenten der Geschwindigkeit, mittels

$$(91) \quad \left[\frac{\xi'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}, \quad \left[\frac{\eta'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}, \quad \left[\frac{\zeta'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}$$

die Komponenten der Beschleunigung und mittels

$$(92) \quad -d\mu \left[\frac{\xi'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}, \quad -d\mu \left[\frac{\eta'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}, \quad -d\mu \left[\frac{\zeta'}{a} \right] \frac{d^2a}{dt^2}$$

die Komponenten der Trägheitskraft ergeben, wenn $d\mu$ die Masse des Theilchens bezeichnet. So folgt denn nach dem Prinzip der virtuellen Verrückungen für den Indikator die äquivalente Kraft

$$(93) \quad -d\mu \left[\frac{\xi'}{a} \right]^2 \frac{d^2a}{dt^2} - d\mu \left[\frac{\eta'}{a} \right]^2 \frac{d^2a}{dt^2} - d\mu \left[\frac{\zeta'}{a} \right]^2 \frac{d^2a}{dt^2},$$

und wir erhalten als *Resultante der Trägheitskräfte bei seismischer Ruhe*:

$$(94) \quad Q^{[e]} = -m \frac{d^2a}{dt^2},$$

wenn

$$(95) \quad m = \int d\mu \left\{ \left[\frac{\xi'}{a} \right]^2 + \left[\frac{\eta'}{a} \right]^2 + \left[\frac{\zeta'}{a} \right]^2 \right\} = \int d\mu \left[\frac{\xi'^2 + \eta'^2 + \zeta'^2}{a^2} \right]$$

gesetzt wird. $Q^{(a)}$ würde dieselbe Grösse erhalten, wenn sich eine Masse m am Indikator selbst bewegte; wir wollen demgemäss m die *resultirende Masse* des Gehänges nennen. Die Formel (95) lehrt unmittelbar folgenden für die Berechnung von m wichtigen Satz: *Der Antheil eines Elementes des Gehänges zur resultirenden Masse verhält sich zur eigenen Masse wie das Quadrat der relativen Verrückung zum Quadrat des zugehörigen Indikatorausschlags:*

$$(96) \quad dm : d\mu = \xi'^2 + \eta'^2 + \zeta'^2 : a^2.$$

Das D'Alembert'sche mechanische Prinzip, nach welchem die Trägheitskräfte jederzeit die bewegendenden Kräfte aufheben müssen, verlangt bei Abwesenheit von Störungen $Q^{(a)} + Q^{(g)} = 0$ und ergibt so in

$$(97) \quad \frac{d^2 a}{dt^2} = -\frac{f}{m} a$$

die Indikatorgleichung bei Eigenschwingungen. Schwingungsperiode T und äquivalente Pendellänge L werden nach (97) durch

$$(98) \quad \left(\frac{2\pi}{T} \right)^2 = \frac{g}{L} = \frac{f}{m}$$

bestimmt.

33. *Ableitung der Indikatorgleichung.* Bei Neigungen des Gestelles und Aenderungen der Schwerkraft tritt zu der *Resultante der bewegendenden Kräfte*:

$$Q^{(a)} = -fa,$$

welche im Falle der seismischen Ruhe allein zu berücksichtigen war, noch eine Kraft, welche der veränderten Einwirkung der Schwere entspricht. Die Neigung i_x ist gleichwerthig mit dem Auftreten einer horizontalen Komponente der Schwerkraft $\parallel x$ im Betrage von gi_x . Das Theilchen $d\mu$ des beweglichen Theiles erfährt also $\parallel x$ im ganzen eine Kraft $d\mu (gi_x + \Delta g_x)$ und ergibt für den Indikator die äquivalente Kraft $d\mu (gi_x + \Delta g_x) [\xi'/a]$. In gleicher Weise gehört zu y die Kraft $d\mu (gi_y + \Delta g_y) [\eta'/a]$, zu z die Kraft $d\mu \Delta g_z [\zeta'/a]$, und wir erhalten als *Resultante der bewegendenden Kräfte, welche durch die Neigungen des Apparates und durch Schwerkraftänderungen erregt werden*:

$$(99) \quad Q^{(a)} + Q^{(g)} = \left(\int d\mu \left[\frac{\xi'}{a} \right] \right) (gi_x + \Delta g_x) + \left(\int d\mu \left[\frac{\eta'}{a} \right] \right) (gi_y + \Delta g_y) + \left(\int d\mu \left[\frac{\zeta'}{a} \right] \right) \Delta g_z.$$

Zur Berechnung der Trägheitskräfte soll die Bewegung des Gehänges aufgefasst werden als Superposition der Bewegung relativ zum Gestell und der vom Gestell selbst ausgeführten Bewegung. Diese letztere wiederum zerlegen wir in

abgetrennt und nach dem dritten Zusatz von 20 ccm Wasser erschöpfend mit Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petrolätherauszüge hinterlassen nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels 6 g Rückstand, der im physiologischen Testversuch eine nur geringe Wirksamkeit zeigt; es lassen sich aus ihm an krystallisierten Stoffen etwas Benzoesäure und geringe Mengen Cholesterin darstellen¹⁶⁾.

Das Hormon kann aus der alkoholisch-wäßrigen Phase durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum in entsprechend angereicherter Form isoliert werden; doch hat es sich für die weitere Reinigung als zweckmäßig erwiesen, die alkoholische Phase mit dem 3—4fachen Volumen an Wasser zu versetzen und dieser trüben Lösung die wirksame Substanz durch Ausschütteln mit Äther zu entziehen, da bis zu 20 Gewichtsprozent des Ausgangsmaterials an Verunreinigungen in der wäßrigen Schicht verbleiben können. Nach dem Waschen, Trocknen und Verdampfen der ätherischen Lösung hinterbleiben 2 g eines rotbraunen Öls, d. i. 20 % des angewandten Rohöls (Charge 270 a). Die physiologische Auswertung dieser Charge ergibt einen Wirkungswert von 180000 ME pro Gramm, das entspricht einer fast quantitativen Hormonausbeute (s. Tabelle X).

Die mit dieser Technik darstellten Öle enthielten — je nach der Wirksamkeit des Ausgangsmaterials — 100—200000 ME pro Gramm, doch war die Ausbeute stets annähernd quantitativ. Geringe Hormonverluste, die im Petroläther verbleiben, sind leicht durch nochmalige Verteilung größerer Anteile gesammelter Petrolätherrückstände zwischen 50 %igem Alkohol und Petroläther in der alkoholischen Phase anzureichern: 20 g Petrolätherrückstand löst man zu diesem Zweck in 100 ccm Petroläther, versetzt mit 45 ccm Alkohol und unter Schütteln mit 45 ccm Wasser in 3 Anteilen. Die alkoholische Phase wird wie oben verarbeitet, die hierbei erhaltenen Öle können einem neuen Arbeitsgang zugeführt werden.

Reinigungsstufe II:

Entmischung mit wäßrigem Alkohol-Benzol.

Auf Grund der Erfahrungen mit weiteren Entmischungsmethoden (Seite 32) kann durch anschließende Anwendung einer Verteilung des in der Reinigungsstufe I erhaltenen Öles zwischen wäßrigem Alkohol und Benzol eine weitere Anreicherung erzielt werden. Es hatte sich gezeigt, daß das Hormon im Gegensatz zu vielen Begleit-

16) Aus 10 kg Schwangerenarn konnten 50 mg Cholesterin und 1,7 g Benzoesäure isoliert werden.

stoffen in 60 %igem Alkohol weit schwerer löslich ist als in Benzol und sich daher aus einer Lösung in 60 %igem Alkohol mit Benzol weitgehend angereichert ausschütteln läßt (Seite 33). Je nach der Wirksamkeit der verwendeten Öle liegt der erzielte Reinigungsgrad nach Anwendung einer solchen „Benzoltrennung“ bei 300 bis 500 000 ME pro Gramm. Die Ausbeute an Hormon wechselt, sie beträgt zumeist etwa 85 %, jedoch haben eine Reihe von technischen Rohölen in dieser Reinigungsstufe (aus später zu erörternden Gründen) nur etwa 60 % der Wirksamkeit an die Benzolphase abgeben (s. Seite 44 oben und Seite 71).

Technik: Versuch Nr. 342 vom 7. IV. 1929.

2 g Hormonöl von der Wirksamkeit 180 000 ME pro Gramm werden in 24 ccm Alkohol gelöst, unter Schütteln mit 16 ccm Wasser versetzt und wiederholt mit etwa 20 ccm Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolphasen werden häufig (6—8 mal) mit 60 %igem Methylalkohol gewaschen. Nach dem Trocknen der Benzollösung mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt: es hinterbleiben 685 mg eines rotbraunen Öls, also 34 Gewichtsprozent des Ausgangsöls (Charge 342 a). Die physiologische Auswertung dieser Fraktion ist aus Tabelle X ersichtlich, 1 g des Öls hat eine Wirksamkeit von etwa 500 000 ME, das entspricht einer Hormonausbeute von 92 %.

Die bei den „Benzoltrennungen“ erhaltenen wäßrig-alkoholischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser verdünnt und ausgeäthert. Die ätherische Lösung hinterläßt nach dem Trocknen und Abdestillieren des Lösungsmittels rotbraune Öle, die in wenig Alkohol gelöst und einige Zeit bei 0° aufgehoben werden. Es erfolgt häufig Krystallisation schwach gelb gefärbter, prismatischer Nadeln, die sich um 300° zersetzen. Sie lassen sich aus Alkohol oder Wasser umkrystallisieren und sind rein weiß zu erhalten; es handelt sich um eine stickstoffhaltige Verbindung von saurem Charakter. Die Ausbeute an diesem Stoff ist wechselnd, sie beträgt zumeist wenige mg aus 1 g Öl dieser Phase¹⁷⁾.

17) Zu einer vorläufigen Untersuchung der Substanz (ausgeführt von Herrn Dr. F. HILDEBRANDT) stand nur eine sehr geringe Menge zur Verfügung. Der Stoff erwies sich als beständig gegen Kochen mit 20 %iger Kalilauge und verdünnter Salzsäure, dagegen sehr empfindlich gegen Oxydationsmittel. Er besitzt keine Ketoneigenschaften, scheint aber leicht azylierbar zu sein. Die molekulare Zusammensetzung ist wahrscheinlich durch den Ausdruck $C_{13}H_{11}N_3O_2$ wiederzugeben; durch Behandlung mit Diazomethan konnte ein krystallisiertes Derivat der Formel $C_{14}H_{13}N_3O_2$ dargestellt werden, aus dem jedoch mit HJ kein Methoxyl abzuspalten ist.

Die von Krystallen getrennte alkoholische Lösung enthält zumeist die restlichen 15—40 % an Hormon; durch erneute Entmischung mit Alkohol-Benzol kann ein weiterer, wechselnd großer Anteil in der Benzolphase erfaßt werden. Der Rest wird durch eine besondere Aufarbeitung gewonnen (s. Seite 71/72).

Reinigungsstufe III:

Die weitere Reinigung des Hormons unter Ausnutzung seines Verhaltens gegen Alkali und Säure.

Es war beobachtet worden (s. Seite 34), daß sich aus der ätherischen Lösung der Hormonöle stets ein Teil des Hormons (20—50 %) mit Alkali ausschütteln läßt; aus der alkalischen Lösung ist es erst nach dem Ansäuern quantitativ mit Äther zu extrahieren. Das Verteilungsverhältnis des Hormons zwischen Äther und Alkali ist stark zu beeinflussen: durch Behandlung mit verdünnter Säure auf dem Wasserbad ist der alkalilösliche Teil erheblich zu verringern, durch langanhaltendes Kochen mit alkoholischer Kalilauge alles Hormon im Alkali zu lösen. Dieses an ein Laktan erinnernde Verhalten hat zur weiteren Reinigung der in der Reinigungsstufe II erhaltenen Öle folgende Methodik anwenden lassen:

Nach 3 stündigem Erwärmen der gereinigten Öle mit verdünnter alkoholisch-wäßriger Salzsäure, lassen sich aus ihrer ätherischen Lösung saure Begleitstoffe fast ohne Verlust an Hormon mit Natriumkarbonatlösung abtrennen (s. Seite 35). Schüttelt man die verbleibende Ätherlösung nunmehr längere Zeit wiederholt mit wäßriger Natronlauge, so vermag man durch diese Behandlung das Hormon dem Äther allmählich als Natriumsalz zu entziehen, während neutrale Begleitstoffe im Äther verbleiben. Aus der alkalischen Lösung läßt sich nach dem Ansäuern mit verdünnter Säure ein höchstgereinigtes Hormonöl mit Äther extrahieren.

Man erreicht in dieser dritten Reinigungsstufe einen Reinheitsgrad von 1,5—2 Millionen ME pro Gramm, die Ausbeute beträgt im Durchschnitt 75 % an Hormon; ein Rest von 15—20 % verbleibt bei den neutralen Begleitstoffen, die gesammelt werden, um für eine besondere Aufarbeitung nutzbar gemacht zu werden.

Technik: Versuch Nr. 394 vom 16. VII. 1929.

1,14 g des durch die Reinigungsstufe II auf eine Wirksamkeit von 450 000 ME pro Gramm angereicherten Öls werden in 114 ccm Äthylalkohol gelöst, mit dem dritten Teil des Volumens an verdünnter (2 n) wäßriger Salzsäure versetzt und 3 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die mit 500 ccm Wasser versetzte Reaktions-

lösung wird wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung mit wäßriger Karbonatlösung gewaschen, bis diese sich nicht mehr anfärbt. Die vereinigten Karbonatauszüge (b) werden nochmals mit Äther extrahiert und dieser zur ursprünglichen Ätherlösung hinzugefügt. Man extrahiert nun die gesamte ätherische Lösung (a) mit Alkali, indem man sie 2—3 mal mit der Hälfte ihres Volumens an 1 n wäßriger Natronlauge versetzt und jedesmal 12 Stunden auf der Maschine schüttelt. — Die vereinigten Alkaliauszüge (c) werden mit verdünnter Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit Äther aufgenommen, die ätherische Lösung wird gewaschen, getrocknet und abdestilliert. Es hinterbleiben 210 mg eines rotbraunen Öls, d. i. 18,4% des Ausgangsöls. In Tabelle X ist die Auswertung dieser Charge 394 c gegeben: die Wirksamkeit beträgt 1,75 Millionen ME pro Gramm, das entspricht einer Hormonausbeute von 72%.

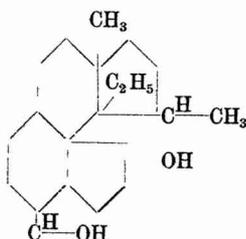
Den Natriumkarbonatauszügen (b) kann man durch eine Ätherextraktion nach dem Ansäuern 97 mg Öl entziehen; diese Fraktion enthält in 1 g etwa 5000 ME (vergl. Auswertung 320 b auf Tabelle VIII).

In dem ursprünglichen ätherischen Auszug (a) verbleiben nach der Behandlung mit Karbonat und Alkali die neutralen Begleitstoffe. Durch Aufnehmen in Azeton oder Alkohol kann man das Pregnandiol krystallisiert abtrennen; es ist ein gesättigter Alkohol der Formel $C_{21}H_{36}O_2$ vom Schmelzpunkt $234-235^{018}$.

Reinigungsstufe IV: Die Destillation höchst gereinigter Öle im Hochvakuum.

Aus Ölen von dem Reinheitsgrade von 1 Million ME pro Gramm ab ist durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum direkt krystallisiertes Hormon darstellbar.

18) Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß das Pregnandiol ein neutrales Oxydationsprodukt der Sterine von folgender Formel darstellt: (vergl. A. BUTENANDT, Über das Pregnandiol, einen neuen Sterinabkömmling aus Schwangerenarn. Ber. chem. Ges. 63, 659 (1930)).



Technisch verfährt man derart, daß die in der Reinigungsstufe III erhaltenen Öle in kleinen, kugeligen Glasretorten von etwa 4 ccm Inhalt und einem 12 cm langen Ansatzrohr in Anteilen von je 300—400 mg der Destillation bei 0,02—0,03 mm Hg unterworfen werden. Das Vakuum wird durch eine Quecksilberdampfstrahlpumpe mit einer Azeton-Kohlensäure gekühlten Vorlage erzeugt. Die Retorte wird in einem Luftbad erhitzt; sie wird zunächst 12 Stunden bei 100—115° belassen, in diesem Temperaturgebiet geht ein Vorlauf über, der 20—25 % des Öles ausmacht. Die Destillation wird unterbrochen und der Vorlauf mit Äther aus dem Retortenansatz herausgelöst. Man unterwirft nunmehr den Rückstand einer langsamen Sublimation, indem man die Temperatur über 60 Stunden allmählich von 120° auf 220° steigert. Von 130° ab setzen sich an dem Retortenhals eisblumenartige oder prismatische Krystalle des Hormons ab, die sich im Laufe der Destillation vermehren; der größte Anteil geht um 150° über. Um das Ende der Sublimation zu erkennen, wird das Destillat täglich entfernt und die Destillation erst abgebrochen, wenn keine weitere Krystallisation mehr erfolgt. Wenn man bereits im Besitz von Hormonkrystallen ist, erweist es sich als zweckmäßig, nach jeder Unterbrechung im Retortenhals zu impfen.

Die Krystallisate sind zumeist mit gelb gefärbtem Öl verunreinigt, von dem man sie durch kurzes Abspülen mit kaltem Äther befreit. Die im Retortenansatz zurückbleibenden Krystalle werden mit Azeton herausgelöst, aus dem man sie nach dem Verdampfen des Lösungsmittels — zumeist in Nadeln krystallisiert — isolieren kann. Die Ausbente an Rohkrystallisaten beträgt bei der Destillation eines Öles der Wirksamkeit 1 Million ME pro Gramm durchschnittlich 8 % des Gewichts, da die Wirksamkeit der Rohkrystallisate 7—8 Millionen ME pro Gramm beträgt, so berechnet sich eine Hormonausbeute von 64 %. — Durch nochmalige Behandlung gesammelter Destillationsrückstände mit Salzsäure und Alkali nach dem Verfahren der Reinigungsstufe III und anschließender Destillation der alkalilöslichen Anteile kann ein weiterer Anteil an Hormon gewonnen werden.

Reinigungsstufe V:

Die Reinigung der Rohkrystallisate.

Die völlige Reinigung der Krystallisate kann durch nochmalige Sublimation im Hochvakuum geschehen, besser aber durch Behandlung mit Lösungsmitteln.

Zum ersten Umkrystallisieren hat sich Essigester unter

Zusatz von hochsiedendem Petroläther weitaus am besten bewährt. Die aus der Azetonlösung isolierten Krystalle werden heiß in Essigester gelöst und heiß mit dem gleichen Volumen Petroläther versetzt. Von wenig ausfallenden braunen Flocken, welche die letzten Verunreinigungen einschließen, wird sofort abfiltriert; die auf dem Wasserbad vorsichtig konzentrierte Lösung liefert das krystallisierte Hormon in kleinen, fast farblosen Blättchen, die nochmals aus Essigester (ohne Zusatz von Petroläther) umkrystallisiert werden und dann in reinen, farblosen, rhombischen Täfelchen zu erhalten sind. Zur völligen Reinigung kann das Hormon bis zum konstanten Schmelzpunkt von $250-51^{\circ}$ (korr.) aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert werden.

Die einzelnen Phasen der geschilderten Aufarbeitung sind aus der Übersichtstabelle Seite 48 zu ersehen.

Die Methodik der Hormondarstellung aus Schwangerenharn nach E. A. Doisy.

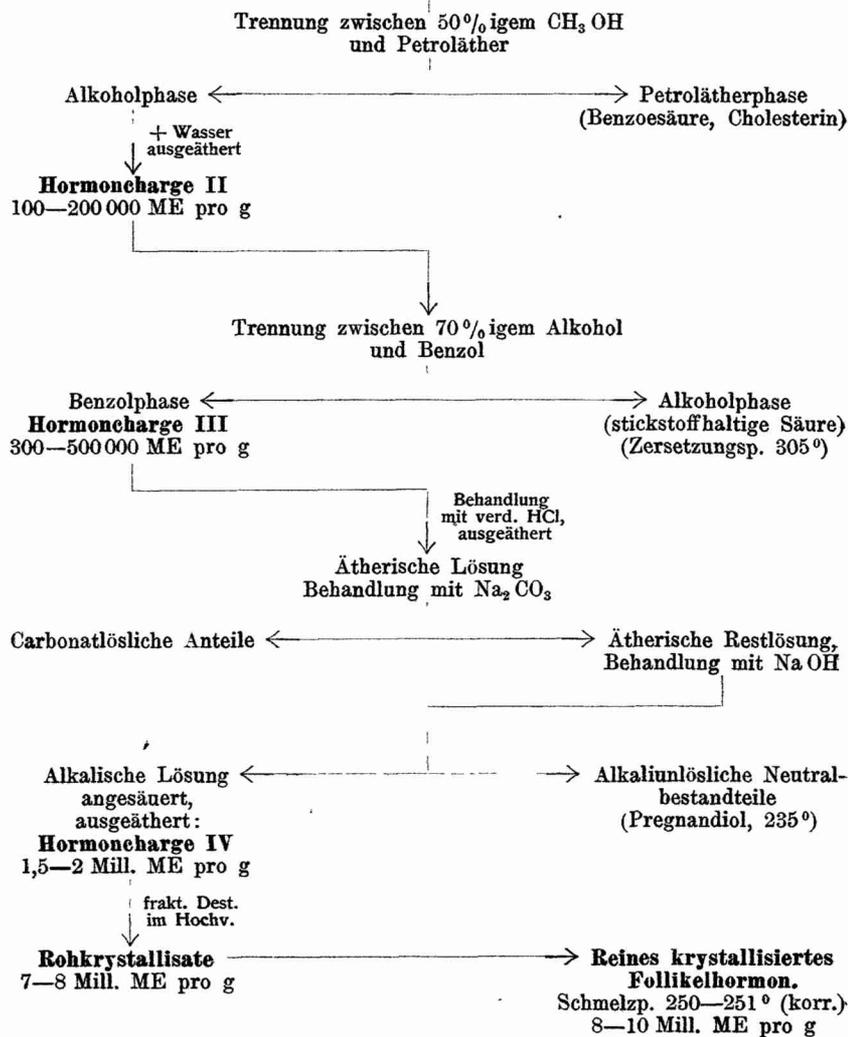
E. A. Doisy und Mitarbeiter haben kürzlich ihre Methodik zur Darstellung des krystallisierten Hormons aus Schwangerenharn ausführlich beschrieben. Es ist von Interesse, daß sie in einigen technischen Überlegungen einen ähnlichen Weg zur Reinigung des Hormons eingeschlagen haben, wie er eben dargelegt wurde: Sie benutzen Extraktionsmethoden mit organischen Lösungsmitteln und machen sich ebenfalls den schwach sauren Charakter des Hormons zunutze, indem sie es in eine alkalische Lösung überführen und dieser den größten Teil des Hormons durch häufiges Ausschütteln mit Äther allmählich wieder entziehen; das hier verwendete typische Verhalten des Hormons wurde schon bei der Besprechung der systematischen Versuchsreihen gekennzeichnet (s. Seite 34).

E. A. Doisy und Mitarbeiter extrahieren den angesäuerten Harn mit Olivenöl, Chloroform oder Butylalkohol. Seitdem sich Butylalkohol besonders gut bewährt hat, scheint er ausschließlich verwendet worden zu sein. Der Rückstand der Extraktlösungen (aus dem Olivenöl ist das Hormon am besten mit 95%igem Alkohol auszuschütteln) wird nach dem Verdampfen der Lösungsmittel mit heißem Benzol ausgezogen, in dem das Hormon leicht löslich ist. Nach dem Verdampfen des Benzols wird das Hormon in wäßrig-alkalische Lösung übergeführt; zu diesem Zweck wird entweder der hormonhaltige Rückstand der Benzollösung mit 1 Teil Butylalkohol und 20 Teilen Petroläther versetzt und wiederholt mit 0,25—0,5 n wäßriger Kalilauge geschüttelt, oder er wird wieder-

Übersichtstabelle
zur Hormondarstellung nach BUTENANDT (Seite 40 ff.).

Schwangerenurin-Rohöl.

(Hormonecharge I)
30 000 ME pro g.



holt direkt mit 75° heißer 0,5 n Natronlauge durchgerührt. Die vereinigten alkalischen Auszüge werden nach dem Abkühlen filtriert und mit Äther extrahiert; der Äther wird abdestilliert und der Rückstand durch Wasserdampfdestillation von flüchtigen Begleitstoffen getrennt. Der kondensierte Dampf wird von den nicht-

flüchtigsten Anteilen durch Destillation getrennt, diese werden erneut 4—5 mal mit heißer 0,25 n Natronlauge ausgezogen. Diese alkalische Lösung wird häufig mit dem vierten Teil ihres Volumens an Äther extrahiert, die ätherischen Lösungen nach dem Waschen mit Natriumbikarbonat, Salzsäure und Wasser zur Trockne gedampft. Nunmehr erfolgt zum 3. Mal eine wiederholte Extraktion mit wäßrigem Alkali (0,25 n, 25° warm); der alkalischen Lösung werden Verunreinigungen durch einmaliges kurzes Ausschütteln mit Äther entzogen, dann wird zur Gewinnung des Hormons anhaltend mit Äther extrahiert. Der nach dem Waschen, Trocknen und Verdampfen dieser ätherischen Lösung hinterbleibende Rückstand wird zunächst aus alkoholischer Lösung mit Wasser gefällt, anschließend aus Butylalkohol unter Zusatz von Petroläther, zuletzt aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, bis die farblosen Blättchen einen konstanten Schmelzpunkt von 243—243,5° (unkorr.) zeigen.

In Übereinstimmung mit den früher geschilderten Erfahrungen über die Extraktion des Hormons aus alkalischer Lösung (Seite 35) betont auch DOISY, daß das Hormon in diesem Arbeitsgang nicht völlig erfaßt wird; die Aufarbeitung alkalischer Restlösungen erfolgt in besonderem Verfahren.

Die Darstellung krystallinischen Sexualhormons aus Schwangerenharn nach E. Laqueur.

Anfang des Jahres 1930 haben E. LAQUEUR und Mitarbeiter ebenfalls über krystallisiertes Sexualhormon aus Schwangerenharn berichtet, welches nach den angegebenen Eigenschaften sehr wahrscheinlich mit den eben beschriebenen Krystallisaten identisch ist. Eine genaue Darstellungsvorschrift ist hingegen von Seiten LAQUEURS bisher nicht erfolgt, sodaß ihre eingehende Besprechung nicht möglich ist.

Der Harn wurde angesäuert und mit Benzol extrahiert, zur weiteren Anreicherung wurde die Erkenntnis benutzt, daß das Hormon „eine Art Säurecharakter“ besitzt; E. LAQUEUR und Mitarbeiter charakterisieren die angewendete Methodik der Reinigung folgendermaßen: „Wir haben ferner die auch schon von uns früher beobachtete und beschriebene verschiedene Adsorbierbarkeit des Menformons¹⁹⁾ und der Begleitstoffe zur weiteren Reinigung gebraucht, indem wir einen in wenig Benzol gelösten Benzolextrakt z. B. an Fuller-Erde adsorbierten, diese Erde mit Benzol aus-

19) Über die Nomenklatur des Sexualhormons vergl. Seite 74.

kochten und den Rückstand mit wenig Benzol in viel Petroläther ausgossen. Nach Abkühlen wird die zunächst vorhandene Trübung zu einem festen Niederschlag, dieser wird in 70 %igem Alkohol unter Zufügung von KOH aufgenommen, die alkalische Lösung mit Benzol ausgeschüttelt danach wird die alkalische alkoholische Lösung wieder angesäuert und nun aufs neue mit Benzol extrahiert. Dabei geht das gereinigte Menformon nun wohl in das Benzol. Diese Prozedur kann wiederholt und bei der letzten Reinigung auch noch etwas Bleiazetat hinzugefügt werden. Die letzten Benzollösungen liefern bei vorsichtigem Abdampfen Krystalle, diese lassen sich umkrystallisieren, manchmal besser aus 70 %igem Alkohol oder aus einem Gemisch von Benzol mit Ligroin oder Petroläther²⁰⁾.

Es wird zu dieser Aufarbeitungsvorschrift bemerkt, daß Ausgangshypothese und Weg ähnlich waren, wie sie von mir benutzt wurden; soweit man aus der Darstellung entnehmen kann, wird auch in diesem Verfahren der größte Reinigungseffekt durch Ausnutzen der Alkalilöslichkeit des Hormons erzielt.

Über physikalische Eigenschaften des krystallisierten Follikelhormons²¹⁾.

Krystallform und Schmelzpunkt.

Reines Follikelhormon krystallisiert in sehr schön ausgebildeten Krystallen. Aus Essigester erhält man es in rhombischen Täfelchen (s. Abbildung 18, Tafel VI), aus verdünntem Alkohol — je nach der Krystallisationsgeschwindigkeit — in verschiedenen Formen: aus weitgehend verdünntem Alkohol krystallisiert es in kleinen, spindelförmigen, stark lichtbrechenden Blättchen (Abbildung 19, Tafel VI), durch sehr langsame Krystallisation erzielt man die Ausbildung von 1—2 ccm langen, oft blumenartig verzweigten Krystallen von perlmutterähnlichem Glanz (Abbildung 20, Tafel VI).

Über die verschiedenen Krystallformen, in denen das Hormon vorliegen kann, haben auch E. A. DOISY und E. LAQUEUR berichtet. Die durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Essigester und Alkohol-Wasser völlig gereinigten Krystallisate sind farblos und

20) Zitiert nach E. LAQUEUR und Mitarbeiter: Deutsch-med. Wochenschrift 1930, Nr. 8.

21) Aus A. BUTENANDT, Über physikalische und chemische Eigenschaften des krystallisierten Follikelhormons. HOPPE-SEYLER'S Zeitschr. f. physiol. Chemie, 191, Seite 140 (1930).

zeigen unter geringen Zersetzungserscheinungen einen konstanten Schmelzpunkt von 250—251° C (korr.); nach DOISY 243,5° (unkorr.); nach LAQUEUR 240° (unkorr.).

Löslichkeit.

Das krystallisierte Hormon zeigt in seiner Löslichkeit ausgesprochenen Lipoidcharakter; es ist leicht löslich in Alkohol, Azeton, Chloroform, Benzol, schwerer in Äther und Essigester, sehr schwer in Petroläther. Aus seiner Lösung in Alkohol oder Azeton läßt es sich mit Wasser, aus Essigester, Chloroform und Benzol mit Petroläther krystallin fällen.

Wasserlöslichkeit.

Die „echte“ Wasserlöslichkeit des Hormons ist zu einer Zeit Gegenstand vielseitiger Bearbeitung gewesen, als diese Frage praktisch nicht lösbar war. Die Wasserlöslichkeit des krystallisierten reinen Hormons (in neutraler Lösung!) ist sehr gering; sie ist wegen der Herstellung therapeutischer Präparate in wäßriger Lösung nicht ohne Bedeutung und daher durch physiologische Versuche genauer ermittelt worden: 1 ccm einer gesättigten wäßrigen Hormonlösung enthält im Durchschnitt etwa 150 ME, danach sind in 100 ccm Wasser höchstens 1,5 mg löslich. Die Auswertung einer gesättigten wäßrigen Hormonlösung findet sich in Tabelle XI.

Optisches Drehungsvermögen.

Das Hormon dreht die Ebene des polarisierten Lichtes stark rechts; die spezifische Drehung beträgt: $[\alpha]_D^{18} = +156^{\circ}$ (0,0187 g Hormon, gelöst in 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm, $\alpha = +1,46^{\circ}$).

Ultraviolett-Absorptionsspektrum.

Die Messung der Ultraviolett-Absorption (mit Quecksilberquarzlicht unter Anwendung der lichtelektrischen Methode) führte zu Ergebnissen, die durch die Tabelle XVIII und Figur 1 belegt werden. Danach zeigt das krystallisierte Hormon ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 283—285 m μ .

Farbreaktion.

Das Hormon gibt keine charakteristischen Farbreaktionen, insbesondere sind die Reaktionen auf Sterine nach SAL-KOWSKY und LIEBERMANN-BURCHARD negativ, es erfolgt nur eine gelbrote Färbung durch konzentrierte Schwefelsäure. Mit eisenoxydhaltigem Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure ist keiner der intensiven Farbtöne zu beobachten, die z. B. für Digitalinum verum charakteristisch sind. Auch mit Ferrichlorid tritt keine Färbung auf.

Die physikalischen Eigenschaften des krystallisierten Hormons wurden an vielfach (bis zu 20 mal) umkrystallisierten Präparaten geprüft und als konstant bleibende Charakteristika erkannt. Alle ermittelten Merkmale sprechen einwandfrei dafür, daß in dem isolierten Stoff ein einheitlicher, chemisch reiner Stoff vorliegt.

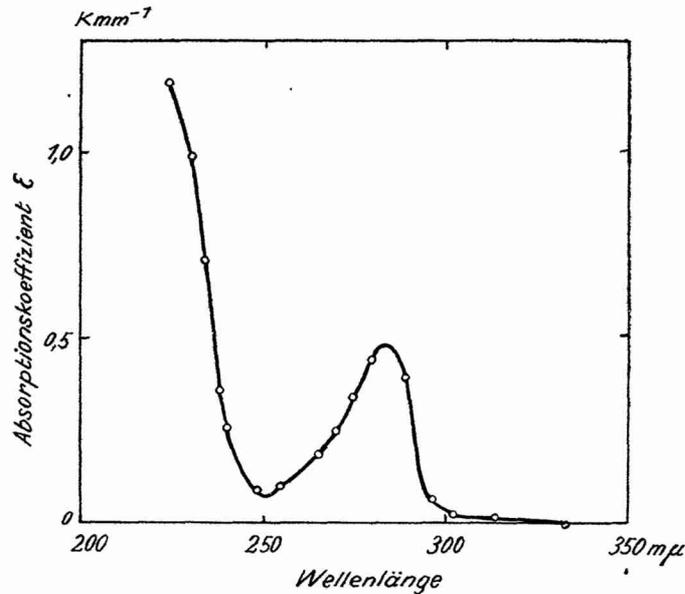


Fig. 1. Absorptionsspektrum einer 0,027% cgm alkoholischen Hormonlösung.

Über physiologische Eigenschaften des krystallisierten Follikelhormons.

Völlig gereinigte und durch die Konstanz ihrer physikalischen Eigenschaften charakterisierte Hormonkrystallisate wurden in ausgedehnten Versuchsreihen zunächst quantitativ auf ihre Wirksamkeit im biologischen Testversuch geprüft. Insbesondere wurde diese Wirkung nach vielfach wiederholtem Umkrystallisieren und Resublimieren an einer Reihe von Krystallisaten verschiedener Herstellung ermittelt, um mit voller Sicherheit aussagen zu können, daß die physiologische Wirksamkeit an die isolierte Substanz selbst, und nicht an eine in kleinster Menge vorhandene „Verunreinigung“ geknüpft ist.

Von den durchgeführten Auswertungsversuchen sollen im folgenden eine Reihe in ihren Ergebnissen und Folgerungen besprochen werden.

Auswertung des krystallisierten Hormons in Versuchsreihen mit einmaliger Injektion.

Es erfolgte zunächst eine Festlegung der Wirksamkeitsgrenze des krystallisierten Hormons mit der oben (Seite 12) genau angegebenen Methodik bei Verabreichung der Dosis in einmaliger Injektion. Zur genauen Ermittlung der Grenzdosis wurde das Präparat Pg. II in einer ausführlichen Konzentrationsreihe entsprechend einer Wirksamkeit von 3—10 Millionen ME pro Gramm an 70 Tiere verabfolgt. Das Ergebnis ist in der Tabelle XII wiedergegeben.

Die Auswertungsreihe ergab, daß die Grenzdosis (nach gegebener Definition) bei 8—9 Millionen ME pro Gramm liegt, d. h. 0,000125 mg lösen in einmaliger Injektion in Öllösung an 80 % der Versuchstiere die Vollbrunstreaktion aus.

Die Tabelle XII zeigt überdies die einwandfrei starke Überdosierung, die mit Mengen, entsprechend einer Wirksamkeit von 3—6 Millionen ME erzielt wurde und sich in einer mehrtägigen „Dauerbrunst“ bei 100 % der Versuchstiere äußert. Sie läßt außerdem den Unterschied zwischen den Wirksamkeiten von $\frac{1}{8}$ Millionstel und $\frac{1}{10}$ Millionstel Gramm zahlenmäßig deutlich in Erscheinung treten, im ersteren Fall reagieren 85 %, im zweiten nur noch 62 % der Versuchstiere mit Vollbrunst.

Zur Kontrolle der absoluten Reproduzierbarkeit dieser Werte wurden Krystallisate von gleicher Reinheit, aber anderer Herstellung mit gleicher Technik ausgewertet. In Tabelle XII ist ebenfalls die Auswertung des Präparates Pg. 429 aufgenommen. Diese Kontrollauswertung zeigt dasselbe Resultat und zeigt zudem die Konstanz der gefundenen Werte an verschiedenen Tagen und mit verschiedenem Tiermaterial.

Die Auswertung des Präparates Pg. 415 (Tabelle XII) zeigt die Konstanz der physiologischen Wirksamkeit an einem Krystallisat, das vor der Injektion nochmals im Hochvakuum sublimiert wurde.

Sämtliche durchgeführten Auswertungen an krystallisiertem Hormon haben gezeigt, daß alle untersuchten Präparate auch nach oftmals wiederholter Reinigung durch Krystallisation und Sublimation ihre völlig konstante physiologische Wirksamkeit nicht mehr ändern.

Auswertung des krystallisierten Hormons in Ver- suchsreihen mit protrahierter Injektionstechnik.

Während bei den Anreicherungsversuchen zur Darstellung des Hormons aus den früher erörterten Gründen (Seite 13) auf jede

kompliziertere Auswertungstechnik verzichtet wurde, forderte die physiologische Untersuchung des krystallisierten Hormons auch seine „Auswertung“ mit protrahierter Injektionstechnik, in Anlehnung an die von anderer Seite vorgeschlagenen Methoden.

Es seien die Ergebnisse solcher Versuchsreihen zusammengestellt²²⁾:

Verteilt man beim krystallisierten Hormon die zu injizierende Dosis auf 2—3 Injektionen innerhalb von 12—14 Stunden, so liegt die Grenzdosis bereits wesentlich niedriger: 0,000067 mg genügen, um bei 75 % der Versuchstiere Volloestrus zu erzielen. Nach dieser Technik, die sich an Versuche von KAHNT und DOISY anlehnt, kommt man für das Hormon zu einem Wirkungswert von 15 Millionen ME pro Gramm. Die entsprechenden Ergebnisse sind aus Tabelle XIII ersichtlich.

MARRIAN und PARKES haben vorgeschlagen, innerhalb von 36 Stunden in viermaliger Dosis zu injizieren, sie prüfen auf Vollbrunst bei 50 % der Versuchstiere; H. WIELAND und W. STRAUB bevorzugen eine Unterteilung in 5 Dosen über etwa 35 Stunden, E. LAQUEUR sowie DODDS injizieren 6 mal innerhalb von 48 Stunden, LIPSCHÜTZ empfiehlt 6 malige Injektion innerhalb von 60 Stunden.

In Anlehnung an diese verschiedenen Verteilungsarten wurden einige Auswertungsreihen vorgenommen, deren Ergebnisse zusammenfassend besprochen werden sollen:

Tabelle XIV umfaßt die Auswertungen von 2 Injektionsmethoden, deren Ergebnisse gleichlautend sind: Bei viermaliger Injektion innerhalb von 36 Stunden und bei sechsmaliger Injektion innerhalb von 40 Stunden wurde die Grenzdosis bei etwa 0,0000333 mg ermittelt, das entspricht einem Wirkungswert von 30 Millionen ME pro Gramm.

Verteilt man die 6 Injektionen über 48 Stunden, so vermag man bei Prüfung auf Vollbrunst die wirksame Dosis bis auf 0,0000286 mg, bei Prüfung auf Verschwinden der Leukozyten (LAQUEUR) bis auf 0,000025 mg herabzusetzen. Die entsprechenden Ergebnisse sind aus Tabelle XV ersichtlich.

Damit wird dem krystallisierten Follikelhormon ein Wirkungswert von 35—40 Millionen ME pro Gramm zuerteilt, der bei weiterer Unterteilung der Injektionsgaben wahrscheinlich noch zu erhöhen ist.

22) Mit Ausnahme der Verteilungsart entsprach die angewandte Technik den Angaben auf Seite 12. Es wurde stets in Sesamöllösung injiziert, Abstriche wurden bei protrahierter Technik 3 mal täglich vorgenommen.

E. A. DOISY und Mitarbeiter haben für ihre Krystallisate einen Wirkungswert von 3 Millionen RE pro Gramm angegeben, das würde etwa 12 Millionen ME pro Gramm entsprechen; E. LAQUEUR und Mitarbeiter ermittelten mit protrabierter Technik 10 bis 14 Millionen ME pro Gramm. Wie aus den ausführlich dargelegten Ermittlungen der Wirksamkeit mit unterschiedlicher Injektionstechnik hervorgeht, sind die Resultate verschiedener Autoren nur bedingt miteinander vergleichbar.

Über weitere physiologische Merkmale des krystallisierten Follikelhormons.

Es war von großem Interesse, festzustellen, welche der früher am unreinen Stoff ermittelten Merkmale dem reinen, einheitlich krystallisierten Hormon zukommen würden. Diese Feststellungen waren von Bedeutung in bezug auf die Zahl der im Ovarium produzierten Hormone.

Es konnten außer der Brunstwirkung auch die typischen Wachstumswirkungen an Uterus, Vagina und Brustdrüse (vergl. die Abbildungen auf Tafel I—III) mit reinstem Hormon erzeugt werden. Als erste haben E. LAQUEUR und Mitarbeiter ausführlicher über entsprechende Versuche mit ihren Krystallisaten berichtet: Durch Injektion von 10 Einheiten krystallisierten Hormons (über 5 Tage verteilt) wurde an jungen weiblichen Ratten eine Vergrößerung des Uterus um durchschnittlich 110% erzielt; an jungen männlichen Ratten wurde eine Wachstumshemmung an den Genitalorganen um etwa 58% (gemessen am Testisgewicht) beobachtet, wenn 3 Wochen lang täglich 6 Einheiten krystallisierten Hormons verabreicht wurden; entsprechende Versuche an erwachsenen männlichen Ratten zeigten im Laufe von einer Woche eine starke Rückbildung der Genitalien bei täglicher Verabreichung von zweimal 50 ME; an Meerschweinchen wurde die Wirkung des krystallisierten Hormons auf die Brustdrüse gemessen, nach 12tägiger Behandlung mit täglich 100 ME zeigte sich eine Vergrößerung der Mamma um fast das Doppelte der Breite und Länge.

Alle vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen, daß die ermittelten physiologischen Merkmale sämtlich ein und demselben Hormon zukommen.

Über die Haltbarkeit des Hormons.

Krystallisiertes Hormon ist oxydabel, es zeigt die Empfindlichkeit gegen Sauerstoff, die schon an Rohölen allgemein erkannt worden ist. In verkorkten Gefäßen aufbewahrte Krystallisate zeigen sich nach Monaten in ihrer physiologischen Wirkung un-

verändert, jedoch ist die Haltbarkeit in alkoholischer Lösung gering. Die physiologische Prüfung alkoholischer Lösungen zeigt, daß innerhalb von 2 Monaten ein Abklingen ihrer Wirksamkeit um mindestens $\frac{1}{3}$ feststellbar ist. Das Hormon verwandelt sich dabei in ein nicht krystallisierendes braunes Harz.

Über die Chemie des Follikelhormons.

Die chemische Erforschung des weiblichen Sexualhormons ist erst in ihren Anfängen, sie wird sehr erschwert durch die schwierige Zugänglichkeit des reinen Stoffes. Die zur Bearbeitung jeweils vorhandenen Stoffmengen an reinstem Hormon sind so gering, daß man wahrscheinlich nur allmählich gesicherten Einblick in die Konstitution des Follikelhormons wird gewinnen können.

Das wichtige erste Ergebnis der Untersuchung der reinen Krystallisate ergab, daß sie frei sind von Stickstoff, Schwefel und Phosphor. Das Hormon enthält nur Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff.

Die Durchführung zahlreicher Analysen und Molekulargewichtsbestimmungen hat die Molekularformel $C_{18}H_{22}O_2$ wahrscheinlich gemacht, doch darf gegenwärtig eine homologe Formel $C_{17}H_{20}O_2$ noch nicht als sicher ausgeschlossen gelten.

Die Funktion der 2 Sauerstoffatome konnte durch einige Umsetzungen sichergestellt werden; eines liegt in Form einer Hydroxylgruppe, ein zweites in Form einer Ketogruppe vor, da jedoch unter geeigneten Versuchsbedingungen auch Di-ester dargestellt werden können, so ist die Ketogruppe als leicht enolisierbar anzusprechen.

Gegen katalytische Hydrierung ist das Hormon nicht beständig, es ist ungesättigt und enthält nach dem gegenwärtigen Stand der Untersuchung wahrscheinlich 3 Doppelbindungen.

Das weibliche Sexualhormon muß also nach bisherigen Ergebnissen als ein dreifach ungesättigtes Oxyketon betrachtet werden; sein schwach saurer Charakter im Verhalten gegen Alkali ist vermutlich auf die leichte Enolisierbarkeit der Karbonylgruppe zurückzuführen, das schon an Rohölen beobachtete Gleichgewicht zwischen einer neutralen und einer sauren Form kann ebenfalls durch die vorliegende Möglichkeit der Keto-enol-tautomerie ausreichend gedeutet werden.

Über die Zugehörigkeit des Hormons zur aromatischen oder hydroaromatischen Reihe sind noch keine experimentellen Anhaltspunkte vorhanden. —

Die Ermittlung der Molekularformel.

Das krystallisierte Follikelhormon ist schwer verbrennlich, erst bei Berücksichtigung dieses Umstandes bei der Analyse liefert es konstante Verhältniszahlen für Kohlenstoff und Wasserstoff:

3,010; 4,604; 2,949 mg Substanz (getrocknet bei 100° im Hochvakuum über P₂O₅) gaben 8,775; 13,445; 8,630 mg CO₂ und 2,21; 3,34; 2,19 mg H₂O.

Daraus berechnet sich: 79,51; 79,65; 79,81 % C
8,22; 8,11; 8,31 „ H.

Mikromolekulargewichtsbestimmungen nach RAST ergaben folgende Werte:

1,239; 0,339; 0,195 mg Substanz, gelöst in 16,272; 3,851; 3,240 mg Kampher ergaben eine Depression von 10,5; 12,8; 8,9°.

Daraus berechnet sich M = 290, 275, 271.

Aus den Analysenergebnissen und den Molekulargewichtsbestimmungen ergibt sich für das Follikelhormon die wahrscheinliche Zusammensetzung C₁₈H₂₂O₂: Ber. 79,9 % C, 8,20 % H, M = 270. (Für C₁₇H₂₀O₂ berechnet sich: 79,64 % C, 7,86 % H, M = 256.)

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ermittelten E. A. DOISY und Mitarbeiter für die Zusammensetzung des Hormons im Durchschnitt: 79,69 % C und 8,49 % H. Als Molekülgröße wurde nach RAST 274,6, durch Titration mit Jod 266 gefunden. E. A. DOISY und Mitarbeiter stellten auf Grund dieser Befunde die — in bezug auf den Wasserstoffwert unwahrscheinliche — Formel C₁₈H₂₃O₂ auf.

Der Alkoholcharakter des Follikelhormons.

1. Der physiologische Nachweis einer Hydroxylgruppe und über die physiologische Wirkung von Hormonestern.

Über die Funktion eines Sauerstoffatoms konnten schon durch das Studium von Umsetzungen der Hormonöle Anhaltspunkte gewonnen werden. E. A. DOISY, RALLS und JORDAN haben 1926 an Ölen aus Follikelflüssigkeit die Beobachtung gemacht, daß die physiologische Wirkung dieser Öle durch Umsatz mit Azylierungsmitteln verloren geht und auf Grund dieser Versuche die Möglichkeit des Vorliegens einer Hydroxylgruppe im Follikelhormon erörtert. Das Verschwinden der physiologischen Wirksamkeit nach dem Umsatz von Hormonölen mit Azylierungsmitteln konnte in den untersuchten Fällen nicht bestätigt werden, hingegen zeigte sich an den azylierten Ölen im Brunstversuch an der kastrierten

Maus eine sehr charakteristische Änderung der physiologischen Wirkung:

Während der Umsatz von Hormonölen mit Essigsäureanhydrid keinen bemerkenswerten Effekt hervorruft, zeigen die mit Phenylcyanat behandelten Öle im Tierversuch drei neue Merkmale gegenüber der Normalreaktion: 1. Die Wirkung ist um das vierfache verringert, d. h. man benötigt zum Erreichen der Vollbrunst eine vierfach größere Dosis gegenüber dem Ausgangsmaterial, 2. der Wirkungsbeginn ist gegenüber einer Normalreaktion etwas verzögert, der Brunstgipfel wird um 1–2 Tage später erreicht, 3. die Reaktionsdauer ist wesentlich verlängert.

Beispiel: Versuch Nr. 606 vom 2. XI. 1929.

50 mg eines Hormonöles von der Wirksamkeit 800 000 ME pro Gramm wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit 1 Stunde mit einigen ccm Phenylcyanat erwärmt, mit wasserfreiem Benzol aufgenommen, im Vakuum zur Trockne gedampft und für die physiologische Prüfung nach genauer Wägung in Sesamöl gelöst. Die nach einmaliger Injektion verschieden großer Dosen beobachteten Wirkungen seien in folgender Übersicht zusammengestellt:

Einmalig injizierte Dosis mg	Ungerechnet auf ME pro g	Zahl der Versuchstiere	Reaktion der Tiere
0,00133	750 000	6	Nach 60 Std. alle 6 Tiere ohne Reaktion; nach 84 Std. zeigen 2 Tiere schwache Wirkung, die am gleichen Tag zum Ruhestadium abklingt.
0,00266	375 000	6	Nach 84 Std. zeigen alle 6 Tiere eine über 24 Std. anhaltende schwache Wirkung.
0,00500	200 000	6	1 Tier tot; 5 Tiere zeigen nach 48 Std. schwache Wirkung, nach 60 Std. zeigt 1 Tier Volloestrus, die übrigen Prooestrus; nach 84 Std. erreichen weitere 2 Tiere Volloestrus, ein weiteres Tier nach 138 Std. Feststellbare Wirkung bei allen Tieren vom 2. bis ungefähr 9. Tag nach der Injektion. — Injizierte Dosis = 1 ME.
0,01000	100 000	6	1 Tier tot. Nach 48 Std. sind 2 Tiere, nach 84 Std. weitere 2 Tiere auf dem Volloestrusstadium. Dauerbrunst von 4–5 Tagen. 1 Tier nur Prooestrus. — Injizierte Dosis = 2 ME.

Der Umsatz von Hormonölen mit Benzoylchlorid und Natronlauge führte zu einem besonders bemerkenswerten Resultat. Eine

Verringerung der Wirksamkeit wurde in diesem Falle nicht beobachtet, jedoch war die verzögerte und die verlängerte Wirkung deutlich ausgeprägt.

Beispiel: Versuch vom 10. V. 1930.

250 mg eines Hormonöles der Wirksamkeit 1 Millionen ME pro Gramm wurden in 2 ccm Benzoylchlorid gelöst und in der Kälte mit viel überschüssiger wässriger Natronlauge versetzt, dann kurze Zeit gelinde erwärmt. Nach dem Erkalten wurde von dem ausgefallenen braunen Öl abdekantiert, dieses mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die physiologische Auswertung des in Sesamöl eingestellten Umsetzungsproduktes zeigte folgende Resultate:

Einmalig injizierte Dosis mg	Umgerechnet auf ME pro g	Zahl der Versuchstiere	Reaktion der Tiere
0,001	1000000	9	Beginn der Reaktion 48—60 Std. nach der Injektion. (Normal nach 36—45 Std.!) Vollbrunst bei 8 Tieren (89%) nach 60—70 Std. nach der Injektion. (Normal nach 36—54 Std.!) Dauer der Vollbrunst 2—3 Tage, Abklingen der Wirkung über weitere 3 Tage.
0,002	500 000	10 (1 tot)	Beginn der Reaktion 48—60 Std. nach der Injektion. Vollbrunst bei allen Tieren nach 60—70 Std. nach der Injektion. Dauer der Vollbrunst 3—4 Tage, Abklingen der Wirkung über weitere 4 Tage. Insgesamt Wirkung über 7—8 Tage!
0,010	100 000	10	Beginn der Reaktion 36 Std. nach der Injektion. Vollbrunst bei allen Tieren nach 48—60 Std. Ausgesprochene Dauerbrunst über 6—15 Tage! Abklingen der Wirkung über weitere 3—6 Tage. Insgesamt Wirkung über 12—18 Tage! (Injizierte Dosis = 10 ME.)

Eine anschauliche Vergleichsübersicht über die Wirksamkeit gleicher Hormonmengen bei einmaliger Injektion vor und nach einer Benzoylierung ist aus Fig. 2 (S. 60) zu entnehmen.

Besonders charakteristisch tritt die veränderte Wirkung der Ester hervor, wenn man überdosiert. Man erreicht durch einmalige Injektion von mehreren ME „Normalöl“ häufig das Auftreten der Vollbrunst über mehrere (meist 3) Tage; mit benzoyliertem Hormonöl hat sich nach einmaliger Injektion von 10 ME eine „Dauerbrunst“ über 11—16 Tage erzielen lassen! Man vermag

also auf diese Weise dem Organismus ein über einen längeren Zeitraum wirkendes Hormondepot zu verabreichen.

Nach der Verseifung der veresterten Öle kehrt die Wirkung zur ursprünglichen zurück.

Diese Versuche zeigen ein in 3 Richtungen bemerkenswertes Resultat: 1. sie enthalten den Nachweis einer veresterbaren Hydroxylgruppe im Hormon; 2. es scheint der Schluß berechtigt, daß diese Hydroxylgruppe für die physiologische Wirkung des Hormons notwendig ist, denn die protrahierte Wirkung der Ester findet ihre einfache Deutung in der Annahme, daß die längere Zeit im Blut kreisenden Ester allmählich vom Organismus

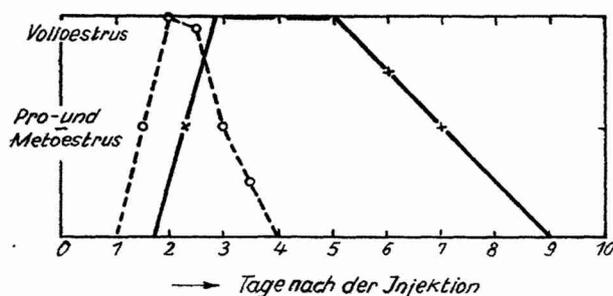


Fig. 2. Änderung der physiologischen Wirksamkeit eines Hormonöls durch Benzoylierung.

----- Wirkungskurve nach Injektion von 1 ME „Normalöl“.

———— Wirkungskurve nach Injektion einer gleichen Dosis benzoyliertem Hormonöl.

verseift werden. Diese Verseifung liefert dem Körper fortlaufend kleinste wirksame Hormondosen über einen längeren Zeitraum; 3. es erscheint nicht ausgeschlossen, daß für die therapeutische Verwendung von Hormonextrakten dieses Verhalten nicht ohne Bedeutung ist, da man die Anzahl der Hormongaben vielleicht durch Injektion veresteterter Öle zu verringern imstande ist, ohne ein schnelles Abklingen der Wirkung zu befürchten.

2. Der Nachweis der Hydroxylgruppe durch die Darstellung und Untersuchung krystallisierter Ester.

Die veresterbare Hydroxylgruppe hat sich auch am reinen Hormon durch die Darstellung krystallisierter Ester nachweisen lassen, durch deren analytische Zusammensetzung die ermittelte Molekularformel gestützt wird. So ließ sich bei der Behandlung des Hormons mit Essigsäure-anhydrid in Gegenwart von Pyridin ein Azetylderivat darstellen, und der Umsatz des Hormons mit Benzoylchlorid und Alkali führte zu einem gut krystallisierenden Benzoylderivat.

Azetylderivat: 17 mg Hormon wurden mit 0,6 ccm Pyridin und 2 ccm Essigsäure-anhydrid 2 Tage in der Kälte aufbewahrt, in 20 ccm verdünnte Schwefelsäure eingegossen und einige Zeit bei 0° gehalten. Das sich absetzende Öl krystallisierte allmählich und war nach dem Abfiltrieren aus verdünntem Alkohol umzu-krystallisieren.

Das Azetat des Hormons krystallisiert in feinen Nadeln oder Blättchen, bei sehr langsamem Abkühlen seiner Lösung erhält man es in charakteristischen, zu Rosetten angeordneten, meist spindelförmig ausgebildeten Prismen (Abbildung 21 auf Tafel VII). In allen Fällen ist der Schmelzpunkt des Azetates konstant: Bei 111 bis 112° zerfließt der Krystall (wahrscheinlich unter Verlust von Krystallwasser) zu einer trüben Schmelze, die bei 126° klar wird. Wiedererstarnte Schmelzen zeigen einen scharfen Schmelzpunkt von 126° (unkorr.).

Analyse: 4,340; 2,344 mg Substanz (getrocknet bei 70° im Hochvakuum über P₂O₅) gaben 12,155; 6,620 mg CO₂ und 2,90; 1,60 mg H₂O.

Gef. 76,41	77,01 % C	7,48	7,64 % H
Ber. 76,87 % C		7,75 % H	

für C₂₀H₂₄O₃.

Die physiologische Prüfung des Azetats, ausgeführt in Sesamöllösung in einmaliger Injektion, ergab, daß das azetylierte Hormon praktisch dieselbe Wirksamkeit zeigt wie das Hormon selbst; eine geringe protrahierte Wirkung ist aber auch hier unverkennbar. Die Ergebnisse der Auswertung sind aus Tabelle XVI ersichtlich.

E. A. Doisy und Mitarbeiter haben ebenfalls über ein Azetylderivat des Hormons berichtet, welches einen Schmelzpunkt von 122° und ein Molekulargewicht von 356 zeigt. Sie vermuten, daß in diesem noch nicht analysierten Azetat ein Diazetat des Hormons vorliegt. Daß man unter geeigneten Bedingungen in der Tat Di-ester erhalten kann, ist sicher richtig, so entsteht auch neben dem Mono-azetat in der oben angegebenen Vorschrift stets ein zweites Produkt, in welchem vermutlich das Di-azetat vorliegt. Die Bildung eines Di-esters konnte auch durch Umsatz des Follikelhormons mit Bromessigsäure-anhydrid erwiesen werden.

Bromazetylderivat: Um über die Molekulargröße des Hormons sichere Auskunft zu erhalten, wurde versucht, ein bromhaltiges Derivat darzustellen. Es gelang der Umsatz des Hormons mit Bromessigsäure-anhydrid, jedoch war das Reaktionsprodukt nach seinem Verhalten nicht einheitlicher Natur. Wahrscheinlich

entstehen unter den gewählten Bedingungen Mono- und Di-azetat nebeneinander. Die zur Verfügung stehende Substanzmenge reichte zur Isolierung einer einheitlichen Krystallfraktion nicht aus.

7 mg Hormon wurden mit 200 mg Bromessigsäure-anhydrid und 20 mg bromessigsäurem Natrium während 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Die erkaltete Lösung wurde unter Kühlung mit Wasser versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Öl erstarrte allmählich krystallin. Durch langsame Krystallisation aus wäfrigem Azeton schieden sich zu Rosetten angeordnete Nadeln aus, die auch nach 3 maligem Umkrystallisieren nicht einheitlich aussahen und einen unscharfen Schmelzpunkt von 133—147° aufwiesen.

Analyse: 4,390 mg Substanz (getrocknet bei Zimmertemperatur im Hochvakuum) lieferten 0,993 mg Brom = 22,62%. Für den Monoester $C_{20}H_{23}O_3Br$ berechnet sich 20,43% Br, für den Diester $C_{22}H_{24}O_4Br_2$ berechnet sich 31,22% Brom.

Benzoylderivat: 10 mg Hormon wurden unter Erwärmen in 10 ccm verdünnter Natronlauge gelöst, nach dem Erkalten wurde unter Schütteln Benzoylchlorid hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 10 Minuten in der Kälte, dann weitere 5 Minuten unter gelindem Erwärmen geschüttelt. Das benzylierte Hormon fällt während der Veresterung aus, es erstarrt nach dem Abkühlen der Lösung, wird von dieser durch Filtrieren getrennt und mit wenig Chloroform aufgenommen. Nach dem Zusatz von Petroläther scheidet sich das Benzoylderivat aus dieser Lösung allmählich grob krystallin ab. Es ist aus verdünntem Alkohol in kleinen weißen, durch langsame Krystallisation aus absolutem Alkohol in langen, prismatischen, farblosen Nadeln zu erhalten. Es schmilzt unter Zersetzung bei 211—212° (unkorr.). Nach der Analyse handelt es sich wahrscheinlich um das Mono-benzoylderivat:

2,868 mg Substanz (getrocknet bei 100° im Vakuum über P_2O_5) gaben 8,414 mg CO_2 und 1,855 mg H_2O .

	Gef.:	80,01 % C	7,23 % H
Für $C_{25}H_{26}O_3$	Ber.:	80,17 % C	7,00 % H
Für $C_{32}H_{30}O_4$	Ber.:	80,29 % C	6,32 % H

Der Keton- und Säurecharakter des Follikelhormons.

Bei der Besprechung der Hormondarstellung ist ausführlich dargelegt worden, daß man schon an Rohölen aus Schwangerenharn oder Plazenta erkennen kann, daß das Hormon in einer neutralen und einer sauren Form zu existieren vermag.

Diese Eigenschaft findet sich auch am reinen Hormon wieder: Es ist ein neutraler Stoff, wie aus der Reaktion seiner wäßrigen oder alkoholisch-wäßrigen Lösung gegen Lackmus zu erkennen ist; auch bei der Säuretitration mit Alkali in Gegenwart von Phenolphthalein erweist es sich als neutral. In kalter wäßriger Natronlauge lösen sich die gepulverten Krystalle erst allmählich, werden jedoch beim Erwärmen sofort gelöst; aus der alkalischen Lösung sind sie durch wiederholtes kurzes Ausschütteln mit Äther nicht zu extrahieren, während sie durch Einleiten von Kohlensäure oder durch Ansäuern der alkalischen Lösung mit Mineralsäure unverändert wieder zu fällen sind. Dieses Verhalten ist früher durch das Vorliegen eines leicht spaltbaren Laktonringes gedeutet worden, nachdem jedoch für die Molekularformel des Hormons der Ausdruck $C_{18}H_{22}O_2$ ermittelt worden ist und an dem Vorhandensein einer freien Hydroxylgruppe kein Zweifel besteht, ist das Vorliegen einer Laktongruppe nicht möglich.

Bis zu einem gewissen Grade kann man das Verhalten des Hormons gegen Alkali und Säure durch die Annahme eines phenolischen Hydroxyls deuten, welches weitgehend hydrolysierte Alkalisalze bildet; doch sprechen die neutrale Reaktion der Hormonlösung, das Ausbleiben einer Färbung mit Ferrichlorid und die relativ große Beständigkeit des Hormons gegen Diazomethan²³⁾ nicht für diese Annahme, jedoch ist sie bisher experimentell nicht widerlegt.

Es hat sich gezeigt, daß das Hormon mit Hydroxylamin in essigsaurer Lösung unter Bildung eines wohlkrystallisierten Oxims von der erwarteten Zusammensetzung $C_{18}H_{22}O(NOH)$ reagiert. Durch diesen Versuch wurde die Ketonnatur des Follikelhormons sichergestellt.

Darstellung des Oxims: 20 mg krystallisiertes Hormon wurden mit überschüssigem Hydroxylamin-azetat in 10 ccm Alkohol 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung konzentriert und mit einigen Tropfen Wasser versetzt.

Das Oxim des Hormons krystallisiert in derben zu Büscheln vereinigten Nadeln, die sich gut aus verdünntem Alkohol umlösen lassen; sie zersetzen sich um 230° (unkorr.).

23) Nach mehrstündiger Einwirkung von ätherischer Diazomethanlösung auf krystallisiertes Hormon ist dieses unverändert wieder zu isolieren. Nach 24stündiger Reaktionsdauer ist nur ein geringer Teil des Hormons verändert und nicht mehr in Alkali zu lösen.

Analyse: 4,921 mg Subst. gaben 13,440 mg CO₂ und 3,60 mg H₂O bei einem Rückstand von 0,049 mg. 2,472 mg Subst. lieferten 0,098 ccm N (21,5°; 752 mm); Subst. getrocknet bei 100° im Hochvakuum über P₂O₅.

	Gef.:	75,24 % C	8,27 % H	4,6 % N
Für C ₁₈ H ₂₃ O ₂ N	Ber.:	75,74 % C	8,13 % H	4,9 % N
(Für C ₁₇ H ₂₁ O ₂ N	Ber.:	75,22 % C	7,81 % H	5,2 % N).

Nachdem die Ketonatur des Follikelhormons erwiesen ist, liegt es nahe, das Verhalten des Hormons gegen Alkalien durch Keto-enolautomerie zu deuten; unter dieser Annahme würde aus dem neutralen Oxyketon unter Wirkung von Alkali ein Oxy-Enol entstehen, das in seinem Verhalten einem Phenol nahe stände.

Über die Hydrierung des Hormons.

Es konnte schon an gereinigten Hormonölen festgestellt werden, daß ihre physiologische Wirksamkeit durch energische katalytische Hydrierung verloren geht; auf Grund dieses Verhaltens wurde auf die Anwesenheit ungesättigter Atomgruppierungen im Follikelhormon geschlossen. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung hat sich das reine Hormon (als Azetat) mit katalytisch erregtem Wasserstoff in ein gut krystallisiertes Derivat überführen lassen, welches gegen weitere Reduktion beständig ist. Es hat die Zusammensetzung C₁₈H₃₀O. Die Funktion des einen Sauerstoffatoms ist experimentell noch nicht geprüft, doch ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen, daß die ursprüngliche Hydroxylgruppe (unter Abspaltung des Azetatrestes) erhalten geblieben ist, während die Ketogruppe anscheinend durch CH₂ ersetzt ist und 3 Doppelbindungen abgesättigt sind. In Übereinstimmung mit der Abwesenheit der Karbonylgruppe ist das perhydrierte Hormon auch beim Kochen in wäßrigem Alkali nicht mehr löslich, die sauren Eigenschaften des Hormons sind also bei der Hydrierung verloren gegangen.

Würde dem Hormon phenolischer Charakter zukommen, so wäre die Entstehung dieses Hydrierungsproduktes so zu deuten, daß die phenolische Hydroxylgruppe durch Wasserstoff ersetzt und 4 Doppelbindungen oder ein Benzolring und eine aliphatische Doppelbindung hydriert worden wären. Die nähere Untersuchung der katalytischen Hydrierung des Hormons unter milden Bedingungen wird die vorliegenden Verhältnisse klären können.

Perhydriertes Hormon: 15 mg Hormonazetat wurden in 50 ccm absolutem Alkohol in Gegenwart von Platinoxid-Katalysator nach ADAMS-SHREINER in einer Wasserstoffatmosphäre geschüt-

telt. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wurde die Lösung filtriert, stark eingengt und mit einigen Tropfen Wasser versetzt. Nachdem von einem geringen flockigen Niederschlag abfiltriert worden war, wurde die Lösung 12 Stunden bei 0° aufbewahrt. Es erfolgte die Abscheidung des perhydrierten Hormons in seidenweichen Nadeln, die aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, bei 95° (wahrscheinlich unter Verlust von Krystallwasser) erweichen und bei 104° (unkorr.) schmelzen (s. Abbildung 22, Tafel VII).

Analyse: 3,023; 4,508; 4,369 mg Substanz (getrocknet bei 60° im Hochvakuum über P₂O₅, wobei sich ein bedeutender Verlust an Krystallwasser zeigte) gaben 9,129; 13,540; 13,155 mg CO₂ und 3,171; 4,61; 4,54 mg H₂O.

Für C₁₈H₃₀O

Ber. 82,36 % C

11,53 % H

Gef. 82,36; 81,93; 82,11 % C

11,74; 11,44; 11,63 % H.

Über die Darstellung eines zweiten physiologisch wirksamen Hormonkrystallisates aus Schwangerenharn durch G. F. Marrian.

In letzter Zeit sind durch Arbeiten von G. F. MARRIAN einige interessante neue Ergebnisse über die chemische Beschaffenheit des Follikelhormons erzielt worden. Es gelang ihm unter Anwendung von ganz ähnlichen Anreicherungsprinzipien, wie sie bisher bevorzugt wurden, ein hochwirksames Krystallisat aus Schwangerenharn zu bereiten, das nach seiner Charakterisierung einheitlich, aber sicher von dem besprochenen Krystallisat verschieden ist.

Die Darstellungsmethode von MARRIAN durchläuft folgende Stufen: Der mit konzentrierter Salzsäure angesäuerte Schwangerenharn wird mit Äther extrahiert; der Ätherextrakt wird mit Wasser gewaschen, zur Trockne gedampft und mit 5%iger wässriger Kalilauge 1/2 Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt; die alkalische Lösung wird mit Kohlensäure gesättigt und nach dem Verdünnen mit Wasser erschöpfend mit Äther extrahiert. Der trockne Rückstand des ätherischen Auszugs wird (zur Abtrennung des Pregnandiols) in Azeton aufgenommen und ausgefroren, die in Azeton lösliche Fraktion darauf wiederholt mit 50%igem Alkohol ausgezogen, in welchem sich der größte Teil des Hormons lösen soll. Die vereinigten alkoholischen Filtrate werden zur Trockne gedampft und unter Hinzufügen von wenig Alkohol in Äther aufgenommen; darauf wird das Hormon der ätherischen Lösung durch häufiges Ausschütteln mit 5%igem wässrigem Alkali

entzogen. Die vereinigten alkalischen Auszüge werden angesäuert und mit Äther extrahiert, der ätherische Extrakt wird gewaschen, getrocknet und vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in wenig heißem Alkohol gelöst, mit dem 10fachen Volumen an Aether versetzt und bei -15° ausgefroren. Die entstehende Fällung wird abfiltriert, sie enthält den Hauptanteil an Hormon, zu dessen Reindarstellung man den Niederschlag wiederholt in alkoholischer Lösung $\frac{1}{2}$ Stunde mit Tierkohle kocht. Die Tierkohle adsorbiert Verunreinigungen und Farbstoffe, die alkoholische Lösung liefert nach dem Abfiltrieren der Kohle und dem Verdampfen des Lösungsmittels einen grob krystallisierten Rückstand, der aus verdünntem Alkohol oder Essigester in Form von Nadeln oder Blättchen zu erhalten ist, die sich bis zur Reinheit umkrystallisieren lassen. Nach den Angaben von MARRIAN wird in diesem Aufarbeitungsgang 35% der Wirksamkeit in krystallisierter Form erfaßt.

In gemeinsamer Arbeit mit Dr. F. HILDEBRANDT wurde diese Methodik von MARRIAN auf Chloroform-Rohextrakte aus Schwangerenharn, wie auch auf das bisher von uns verwendete technische Schwangerenharn-Rohöl angewandt. In beiden Aufarbeitungsgängen konnten die sehr zuverlässigen und exakten Angaben von MARRIAN in jeder Phase vollauf bestätigt werden; wir konnten ohne Schwierigkeit ein Krystallisat gewinnen, das in seinen physikalischen Eigenschaften ein gleiches Verhalten zeigte, wie es von MARRIAN für seine Präparate angegeben wird. Durch anschließende Behandlung der bei -15° ausgefrorenen ätherisch-alkoholischen Mutterlaugen, die auch bei Wiederholung der letzten Aufarbeitungsstufe keine krystallisierten Anteile mehr abgaben, mit verdünnter Salzsäure, Natriumkarbonat und Alkali nach den Angaben der Reinigungsstufe III unserer Aufarbeitung (s. Seite 44) konnte aus den alkalilöslichen Anteilen eine weitere Krystallfraktion gleichen Verhaltens gewonnen werden, sodaß die Ausbeute an krystallisierter Substanz sich auf 40% der Gesamtwirksamkeit belief. — Über die vergleichende Untersuchung dieses Krystallisates wird weiter unten (Seite 67 ff.) im Zusammenhang berichtet werden. —

Über die Eigenschaften des von Marrian isolierten Hormonpräparates.

MARRIAN hat seine Krystallisate durch folgende Angaben charakterisiert: sie sind farblos, schmelzen (nach vorhergehender Sinterung um 255°) bei $263-266^{\circ}$ (unkorr.) unter Braunfärbung und sind durch eine geringe Löslichkeit in den meisten orga-

nischen Lösungsmitteln ausgezeichnet, insbesondere sind sie schwer löslich in Aether, besser in Alkohol, Chloroform und Azeton, leicht in Pyridin.

Charakteristische Farbreaktionen des Präparates wurden nicht beobachtet, jedoch zeigt es eine starke optische Rechtsdrehung von $[\alpha]_{5461} = +38^{\circ}$.

Zur physiologischen Prüfung wurden die dargestellten Krystallisate in wässriger Lösung in 4maliger Unterteilung innerhalb von 36 Stunden injiziert, es wurde auf Vollbrunst bei 50% der Versuchstiere geprüft (Eichungsmethode nach MARRIAN und PARKES); der Wirkungswert liegt bei Anwendung dieser Technik nach MARRIANS Angaben bei etwa 8 Millionen M.E. pro Gramm, er bleibt auch bei sehr häufigem Umkrystallisieren der Präparate konstant.

Durch eine Reihe von Analysen und Molekulargewichtsbestimmungen nach RAST ermittelte MARRIAN für das von ihm isolierte Hormonpräparat die Molekularformel $C_{18}H_{24}O_3$. Alle drei Sauerstoffatome liegen in Form von Hydroxylgruppen vor; es gelang leicht die Darstellung eines Triacetates der Zusammensetzung $C_{18}H_{21}(OCOCH_3)_3$ vom Schmelzpunkt 120—122°, welches durch Verseifung die ursprüngliche Substanz zurücklieferte.

Während das Azetat nicht in Alkali löslich ist, läßt sich der wirksame Stoff selbst in 5% iger wässriger Kalilauge in der Kälte lösen; aus seiner alkalischen Lösung wird er durch Kohlensäure wieder gefällt. Dieser schwach saure Charakter des Hormons wird von MARRIAN durch die Annahme eines phenolischen Hydroxyls gedeutet, zu dessen Nachweis eine Leitfähigkeitstitation durchgeführt wurde und positive Farbreaktionen mit MILLONS Reagenz, diazotiertem p-Nitro-anilin und konzentrierter Salpetersäure angegeben werden.

Die Untersuchung des von F. HILDEBRANDT dargestellten Präparates führte zu einer Bestätigung der wesentlichsten von G. F. MARRIAN ermittelten Angaben: Wir fanden den Schmelzpunkt bei 268—269° (nach vorhergehender Sinterung um 265°), einmal wurde er zu 273° (unkorr.) ermittelt; beim Schmelzen findet Zersetzung unter Braunfärbung statt.

Die Prüfung der analytischen Zusammensetzung bestätigte die von MARRIAN angegebenen Werte: 4,145; 4,758 mg Substanz (getrocknet bei 100° im Hochvakuum über P_2O_5) gaben 11,360; 13,030 mg CO_2 und 3,08; 3,50 mg H_2O .

	Gef: 74,75; 74,69% C	8,32; 8,23% H
Für $C_{18}H_{24}O_3$	Ber: 75,00% C	8,33% H.

Herr Dr. MARRIAN hatte die große Liebenswürdigkeit, uns einige mg seines Originalpräparates zu Vergleichszwecken zu überlassen²⁴⁾; wir ermittelten dessen Schmelzpunkt zu 268—269° (nach vorhergehender Sinterung um 266°), ein Mischschmelzpunkt mit unserem bei 268° schmelzenden Stoff lag bei 269°. Die Identität der Krystallisate ist auch durch alle übrigen untersuchten Kriterien völlig gesichert.

Von ganz besonderem Interesse erschien uns die physiologische Auswertung der Krystallisate nach unserer Eichungsmethodik, durch Injektion des Präparates in Öllösung in einmaliger Dosis (Methodik von BUTENANDT und VON ZIEGNER, s. Seite 12), da es nunmehr erstmalig möglich war, Auswertungen mit gleicher Technik auf streng vergleichbarer Grundlage an beiden Präparaten vorzunehmen. Die bisher durchgeführten Auswertungsreihen sind in Tabelle XVII wiedergegeben: Es wurden 2 unserer Präparate (KMI und KM II) unabhängig voneinander verabreicht und als drittes das Originalpräparat von MARRIAN (KM III) zum Vergleich hinzugezogen. Wir ermittelten übereinstimmend als Grenzwert der physiologischen Wirksamkeit etwa 1,5 Millionen ME pro Gramm. Da das von uns isolierte krystallisierte Follikelhormon $C_{18}H_{22}O_2$ mit dieser Technik einen Grenzwert von 8 Millionen ME pro Gramm ergibt (s. Seite 53 und Tabelle XII), so hat es nach den bisher vorliegenden Erfahrungen den Anschein, daß das von MARRIAN entdeckte Hormonpräparat $C_{18}H_{24}O_3$ zwar unzweifelhaft eine ihm eigene, qualitativ gleichartige²⁵⁾ Brunstwirkung auslöst, daß es aber in quantitativer Hinsicht nur etwa $\frac{1}{5}$ der Wirksamkeit des zunächst isolierten Krystallisates zu entfalten vermag. In sehr guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen die früher mit protrahierter Injektionstechnik ermittelten Wirksamkeiten des krystallisierten Hormons $C_{18}H_{22}O_2$, die bei einem entsprechend 4—5fach höheren Wert von 30—40 Millionen ME pro Gramm liegen (s. Seite 54).

Die Feststellung, daß die physiologische Wirksamkeit der beiden Krystallisate sich wie etwa 1:5 verhält, hat besonderes Interesse für die Beziehungen der beiden Stoffe zueinander.

24) Herrn Dr. MARRIAN sei auch an dieser Stelle für sein bereitwilliges Entgegenkommen verbindlichst gedankt. —

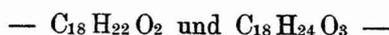
25) Aus einigen Beobachtungen glauben wir schließen zu können, daß das Hormonpräparat nach MARRIAN gegenüber unserem ursprünglichen Krystallisat eine etwas schnellere Wirkung entfaltet.

Über die Beziehung des von Marrian isolierten Stoffes zu den Hormonpräparaten von Doisy und Butenandt.

Durch die bisher vorliegenden Untersuchungen ist ohne Zweifel gesichert, daß man bei geeigneter Methodik aus Schwangerenharn zwei chemisch reine, nicht miteinander identische Hormonpräparate von gleichartiger physiologischer Wirkung darzustellen imstande ist. Die Aufklärung ihrer Beziehungen zueinander war die zunächst wichtigste Aufgabe der weiteren Untersuchung.

Schon die gleichartige physiologische Wirksamkeit beider Stoffe weist darauf hin, daß zwischen ihnen auch ein sehr naher chemischer Zusammenhang bestehen muß.

Die Molekularformeln beider Stoffe



deuten diesen Zusammenhang an: Da im ersten Stoff 3, im zweiten 2 Doppelbindungen vermutet werden, das übrige chemische Verhalten der beiden Krystallisate sehr ähnlich ist, so liegt die Deutung nahe, daß der von MARRIAN isolierte Stoff $C_{18}H_{24}O_3$ durch Addition von 1 Mol Wasser an eine Doppelbindung von $C_{18}H_{22}O_2$ entstanden gedacht werden kann.

Grundsätzlich waren die Möglichkeiten gegeben, daß entweder einer der beiden Stoffe während des Aufarbeitungsganges künstlich aus dem anderen hervorgeht, oder daß beide Stoffe nebeneinander im Schwangerenharn vorliegen.

Die gemeinsam mit F. HILDEBRANDT bisher durchgeführten Versuchsreihen haben ergeben, daß keines der beiden Krystallisate unter den Bedingungen des jeweils verwendeten Aufarbeitungsganges irgendwie zu verändern ist oder in das andere übergeführt werden kann; insbesondere ist das MARRIAN-Präparat $C_{18}H_{24}O_3$ völlig beständig gegen Behandlung mit alkoholischer Salzsäure (nach dem Verfahren der Reinigungsstufe III, Seite 44) und im Hochvakuum leicht und ohne die geringste Zersetzung zu sublimieren. G. F. MARRIAN hat angegeben, daß sein Krystallisat bei 165° und 0,001 mm Hg schwer sublimierte, die geringen übergelassenen Anteile aber unverändert schienen. Wir sublimierten einige mg reiner Krystalle in einem Hochvakuum von 0,03 mm bei $160-200^{\circ}$, eine zweite Probe wurde bei $250-260^{\circ}$ übergetrieben, in beiden Fällen wurden keinerlei Zersetzungserscheinungen beobachtet, das gut krystallisierte Destillat wurde durch seine Löslichkeit, durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt als unverändertes Ausgangsmaterial identifiziert.

Um eine möglich erscheinende Wirkung von Begleitstoffen auszuschließen, wurde ein reines Hormonpräparat nach MARRIAN künstlich einem Hormonöl höherer Reinheitsstufe zugesetzt, wir vermochten es aus dem Hochvakuum-Destillat einwandfrei als solches wieder zu isolieren. — Da andererseits — wie auch aus den Aufarbeitungsvorschriften von DOISY und LAQUEUR hervorgeht (s. Seite 47 und 49) — das krystallisierte Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ ohne Behandlung der Rohöle mit Salzsäure und ohne Hochvakuumdestillation aus dem Schwangerenharn darstellbar ist, so halten wir es für einwandfrei erwiesen, daß unter den gewählten Darstellungsbedingungen des krystallisierten Follikelhormons $C_{18}H_{22}O_2$ eine Abspaltung von Wasser aus $C_{18}H_{24}O_3$ nicht stattfindet, sondern daß das Hormonpräparat von E. A. DOISY und uns als solches im Schwangerenharn vorhanden ist.

G. F. MARRIAN hat die Möglichkeit erörtert, daß sein Krystallisat $C_{18}H_{24}O_3$ als Kunstprodukt aus dem Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ während des Aufarbeitungsganges entsteht; wir konnten zeigen, daß das Krystallisat $C_{18}H_{22}O_2$ durch keine der von MARRIAN verwendeten Methoden verändert wird, insbesondere ist es völlig stabil gegen mehrstündiges Kochen mit wässrigem Alkali.

Diese Ergebnisse führen zwangsläufig zu der Vorstellung, daß beide Krystallisate nebeneinander im Schwangerenharn vorhanden sind; es ergab sich daraus die Notwendigkeit, sie nebeneinander aus dem Harn zu isolieren und nach dem jeweiligen Verbleib des einen oder des anderen Stoffes bei der Anwendung der bisherigen Darstellungsmethoden zu fahnden. Es ist möglich gewesen, durch eine Kombination beider Verfahren die zwei Krystallisate nebeneinander darzustellen: in den Restölen der Aufarbeitung nach MARRIAN fand sich das gesuchte Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ vom F.P. 250—251°, aus den Mutterlängen unseres Aufarbeitungsganges war der von MARRIAN isolierte Stoff $C_{18}H_{24}O_3$ vom F.P. 268—269° zu isolieren.

Die Darstellung des Hormonkrystallisates $C_{18}H_{22}O_2$ (F.P. 250—51°) aus den Restölen der MARRIAN-Aufarbeitung: Es wurde bereits erwähnt (s. Seite 66), daß sich durch Behandlung der letzten Darstellungsmutterlängen des MARRIAN-Krystallisates mit verdünnter Salzsäure und Alkali nach den Angaben der Reinigungsstufe III ein zweiter gleichartiger Krystallanteil aus dem alkalilöslichen Öl isolieren ließ; durch anschließende Hochvakuumdestillation des (nach dem Abtrennen der Krystalle im Alkohol-Äther-Gemisch) verbleibenden Öls nach den Angaben der Reinigungsstufe IV (s. Seite 45) wurde ein weiteres reichliches

Krystallisat erhalten, aus dem sich nach mehrfachem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol ein dritter Anteil des Krystallisates $C_{18}H_{24}O_3$ darstellen ließ. Aus seinen Mutterlängen wurde in geringer Menge das gesuchte Hormonpräparat $C_{18}H_{22}O_2$ isoliert und als solches charakterisiert. — Größere Anteile dieses Hormons mußten in anderen Restölen gesucht werden; die physiologische Auswertung des gesamten Arbeitsganges ließ erkennen, daß die nach Extraktion der Rohöle mit 50%igem Alkohol (s. Aufarbeitung MARRIAN, Seite 65) reichlich verbleibenden dunklen Abfallöle noch eine Wirksamkeit von etwa 50000 ME pro Gramm zeigten, die hier verbliebenen wirksamen Anteile waren schwer mit 50%igem Alkohol zu extrahieren. Die sorgfältige Behandlung dieser Restöle nach den Angaben unseres Aufarbeitungsganges (s. Seite 40 ff.) führte ohne Schwierigkeit zu einem wohlcharakterisierbaren Krystallisat, das mit voller Sicherheit als das uns bekannte Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ vom F.P. 250—251° identifiziert werden konnte²⁶⁾.

Die Darstellung des Hormonkrystallisates $C_{18}H_{24}O_3$ (F.P. 268—269°) aus den Restölen der Aufarbeitung nach BUTENANDT: Nachdem die Behandlung unseres technischen Ausgangsmaterials nach der Methode von MARRIAN ebenfalls zu dem Krystallisat $C_{18}H_{24}O_3$ geführt hatte, damit sein Vorhandensein in unseren Aufarbeitungen erwiesen war, mußte ermittelt werden, in welcher Reinigungsstufe der Verlust dieses Krystallisats eintrat. Es ließ sich durch Übertragung der MARRIAN-Technik auf die Öle einzelner Reinigungsstufen leicht erweisen, daß aus unseren hochwirksamen Chargen, wie sie nach dem Überschreiten der Reinigungsstufe II (Entmischung mit wässrigen Alkohol-Benzol, s. Seite 42) erhalten wurden, keine nachweisbaren Anteile des MARRIAN-Krystallisates mehr zu isolieren waren, wir sind überzeugt, daß die Abtrennung des zweiten Krystallisates in der Reinigungsstufe II erfolgt, und zwar verbleibt hier — in völliger Analogie zu dem Verhalten in der Aufarbeitung von MARRIAN — das Trioxyprodukt größtenteils im 60%igem Alkohol, während das Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ sich im Benzol anreichert. Es wurde früher (Seite 43 u. 44) betont, daß in dieser Reinigungsstufe das Verhalten der technischen Rohöle unterschiedlich war und häufig nur bis zu 60% der Wirksamkeit in der Benzolphase erfaßt wurde, das Verhalten schwankt augen-

26) Eine genaue Durcharbeitung dieser und der folgenden Methodik mit dem Ziel der möglichst quantitativen Erfassung beider Krystallisate steht noch aus; die bisherige Untersuchung trägt mehr qualitativen Charakter und es ist nach ihrem Ergebnis noch nichts Gesichertes über die prozentuale Verteilung der beiden Stoffe im Harn und in den Aufarbeitungschargen anzugeben.

scheinlich mit der vorhandenen Menge an Krystallinat $C_{18}H_{24}O_3$; erwartungsgemäß vermochten wir aus der alkoholischen Phase der „Benzoltrennung“ größere Anteile des von MARRIAN isolierten Präparates darzustellen, es konnte durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt identifiziert werden²⁷⁾.

Durch diese Untersuchungsreihen, die sich gegenseitig widerspruchslos ergänzen, scheint das Nebeneinander der zwei Krystallinate $C_{18}H_{22}O_2$ und $C_{18}H_{24}O_3$ im Schwangerenharn erwiesen; ihre unterschiedliche Erfassung in den verschiedenen Aufarbeitungsgängen ist allein durch die Löslichkeitsverhältnisse bedingt: das Trioxyprodukt $C_{18}H_{24}O_3$ ist leichter in wässrigem Alkohol, aber schwerer in organischen Lösungsmitteln löslich als das Oxy-Keton $C_{18}H_{22}O_2$, es wird daher in den jeweils verwendeten alkoholischen Verdünnungen angereichert und von dem Hauptanteil des anderen Krystallinates getrennt.

Die Überführung des MARRIAN-Krystallinates $C_{18}H_{24}O_3$ in das krystallisierte Follikelhormon $C_{18}H_{22}O_2$.

Die schon dargelegte naheliegende Deutung, daß das von MARRIAN isolierte Krystallinat sich durch Anlagerung von 1 Mol Wasser an eine Doppelbindung des Hormons $C_{18}H_{22}O_2$ von diesem ableitet, ließ sich experimentell dadurch stützen, daß das Trioxyprodukt $C_{18}H_{24}O_3$ durch energische Behandlung mit wasserentziehenden Mitteln unter Abspaltung von 1 Mol Wasser in das krystallisierte Hormon $C_{18}H_{22}O_2$ übergeführt werden konnte.

Methodisch hat sich folgender Weg am besten bewährt: 12 mg des Krystallinates $C_{18}H_{24}O_3$ (F. P. 268–269°, physiologische Wirksamkeit = 1.5 Millionen ME pro Gramm) wurden mit 500 mg geschmolzenem Kaliumbisulfat innig verrieben, in eine Hochvakuumretorte gefüllt und bei 0,02 mm Hg zunächst 2 Stunden auf 110°, dann weitere 5 Stunden auf 180–200° erhitzt. Nach der Temperaturerhöhung auf 180° sublimierte das entstandene Follikelhormon $C_{18}H_{22}O_2$ in den Retortenansatz, aus dem es mit Alkohol herausgelöst wurde. Die konzentrierte alkoholische Lösung lieferte nach dem Anspritzen mit Wasser 9 mg eines einheitlichen, sehr reinen Krystallinates vom F. P. 250–251° und der physiologischen Wirksamkeit 8 Millionen ME pro Gramm.

Das entstandene Produkt konnte durch Mischschmelzpunkt,

27) Vgl. Anmerkung 26 auf Seite 71.

Analyse und physiologische Prüfung völlig einwandfrei als das Follikelhormon $C_{18}H_{22}O_2$ erkannt werden.

Der experimentellen Verknüpfung der beiden Krystallisate kommt eine mehrfache Bedeutung zu; sie sichert den nahen chemischen Zusammenhang der beiden physiologisch gleichartig wirkenden Stoffe und läßt das von MARRIAN isolierte Krystallisat als ein „hydratisiertes Follikelhormon“ erkennen; überdies hat die Reaktion insofern Interesse, als die eintretende chemische Umwandlung von einer wesentlichen Erhöhung der physiologischen Wirksamkeit begleitet ist, wie durch erneute physiologische Auswertungen einwandfrei gesichert wurde. Es ist denkbar, daß man die aus dem Schwangerenharn zu gewinnenden wirksamen Einheiten bei zweckmäßiger Anwendung der dargelegten Methode zu erhöhen imstande ist, wissenschaftlich von größerer Bedeutung erscheint die Tatsache, daß durch diese Reaktion auf rein chemischem Wege „physiologische Wirksamkeiten“ erzeugt werden, damit wird auch der letzte — von anderer Seite²⁸⁾ noch geäußerte — Zweifel daran, daß in dem isolierten Krystallisat tatsächlich das reine Follikelhormon vorliegt, endgültig widerlegt.

Die quantitativ unterschiedliche Wirksamkeit der beiden Krystallisate macht es sehr wahrscheinlich, daß in dem zunächst isolierten Stoff $C_{18}H_{22}O_2$ das eigentliche Hormon vorliegt; das von MARRIAN dargestellte Produkt $C_{18}H_{24}O_3$ ist entweder als dessen Vorstufe, oder wahrscheinlicher als ein zum Zwecke der leichteren Ausscheidung (größere Wasserlöslichkeit des Trioxyderivates!) vom Organismus „hydratisiertes“ Hormon aufzufassen. Ein solches Verhalten des Organismus ist vielfach beobachtet, ob überdies zur leichteren Ausscheidung des Hormons noch eine Veresterung der Hydroxylgruppe mit einer Polyoxysäure stattfindet, wie es erwartet werden könnte, entzieht sich z. Zt. noch unserer Kenntnis; die Tatsache, daß zumeist nur ein mehr oder weniger großer Teil des Hormons aus dem Schwangerenharn direkt mit Chloroform zu extrahieren ist und der kürzlich von B. ZONDEK erhobene Befund, daß die sehr großen Hormonanteile, die sich im Harn trächtiger Stuten vorfinden, garnicht durch Ausschütteln mit Chloroform zu gewinnen sind, deuten nach dieser Richtung. —

28) E. LAQUEUR, B. ZONDEK, E. A. DOISY.

Die nähere vergleichende Untersuchung beider Krystallisate, insbesondere ihre katalytische Hydrierung, wird eine Reihe von weiteren Aufklärungen über die Konstitution des Follikelhormons bringen und eine einwandfrei gesicherte Aufklärung der Ursache seines sauren Charakters ermöglichen; im Gegensatz zum Hormon selbst, hat uns das hydratisierte Hormon bei der Behandlung mit Hydroxylaminazetat kein Oxim geliefert, die für das Hormon charakteristische Keto-Enol-Tautomerie ist also anscheinend durch die Hydratisierung verloren gegangen. Die nähere Untersuchung dieser noch nicht völlig gesicherten Ergebnisse wird vermutlich weiteren Einblick in den Sättigungsgrad des Hormons gewähren.

Die Konstitution des Follikelhormons.

Die Erforschung der Konstitution des Follikelhormons steht heute noch in ihren Anfängen; wie ausführlich dargetan wurde, besteht an der Reinheit und Einheitlichkeit der Hormonpräparate kein Zweifel mehr.

Zur Nomenklatur: Es wäre wünschenswert, für die Bezeichnung des reinen Stoffes einen allgemein anerkannten Namen zu wählen, da z. Zt. die Nomenklatur auf dem Gebiet des weiblichen Sexualhormons außergewöhnlich verwirrend ist. War schon die Benennung unreiner Hormonextrakte von großer Willkür, so sind im letzten Jahre auch für die Bezeichnung des krystallisierten Präparates von allen Bearbeitern andere Namen verwendet worden.

Da das von mir im Oktober 1929 beschriebene Krystallisat das erste charakterisierte reine Hormonpräparat war, schien es wünschenswert, ihm einen neuen, nunmehr endgültigen Namen zu verleihen. Das von der SCHERING-KAHLBAUM A.-G. hergestellte Rohöl, aus dem der reine Stoff isoliert wurde, hat seit längerer Zeit den Namen „Progynon“ getragen. Nach dem beim Insulin und in anderen Fällen geübten Vorgehen, den Namen des Rohpräparates, das zur Darstellung der reinen Stoffe verwendet wurde, auf diese zu übertragen, hat mich veranlaßt, für das erste physikalisch und chemisch charakterisierte reine Hormon die Namensbezeichnung „Progynon“ in Vorschlag zu bringen. Leider ist eine allgemeine, für die Zukunft sehr wünschenswerte Einigung in der Namensgebung bisher nicht erfolgt. So verwendet E. LAQUEUR für krystallisierte Präparate weiter den Namen „Menformon“, E. A. DOISY hat kürzlich die Bezeichnung „Theelin“ vorgeschlagen, während G. F. MARRIAN das Hormon „Östrin“ nennt.

Da gegen den Namen „Progynon“ geltend gemacht wurde, daß er bereits als Handelsbezeichnung verwendet worden ist, erfüllt der völlig neutrale Vorschlag „Theelin“ vielleicht am besten alle Anforderungen, die man zu stellen berechtigt ist; doch wäre bei Einführung dieses Namens das endgültige Verschwinden aller übrigen Bezeichnungen des krystallisierten Präparates aus der wissenschaftlichen Literatur unbedingt zu fordern. Eine baldige Einigung erscheint dringend erwünscht; da sie bisher nicht erfolgt ist, wurde in vorliegender Abhandlung stets nur vom „krystallisierten Follikelhormon“ gesprochen.

Es ist bisher nicht möglich, über die erörterten Ergebnisse hinaus experimentell Gesichertes über die Konstitutionsformel des Hormons auszusagen, insbesondere ist seine Zugehörigkeit zur aromatischen Reihe (wie sie auf Grund des phenolischen Charakters durch MARRIAN verteidigt wird) oder zur hydroaromatischen Reihe noch nicht sicher entscheidbar. Dem perhydrierten Hormon $C_{18}H_{30}O$ liegt wahrscheinlich der Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{30}$ zugrunde, er enthält 8 Wasserstoffatome weniger als ein gesättigtes Paraffin, was durch das Vorliegen eines aromatischen Kerns oder durch das Vorhandensein von 4 hydrierten Ringen im Molekül gedeutet werden könnte.

Auf Grund der molekularen Zusammensetzung kann mit Sicherheit gesagt werden, daß ein chemischer Zusammenhang des Hormons mit den Eiweißstoffen und Kohlenhydraten nicht vorliegt, ein naher Zusammenhang mit den (4 hydrierte Ringe enthaltenden) Sterinen und Gallensäuren ist möglich, aber experimentell nicht erwiesen, auch ist ein einfacher Übergang dieser Stoffe in einen Typus mit 18 Kohlenstoffatomen nicht leicht ersichtlich, wie auch eine genetische Beziehung des Hormons zu dem Pregnandiol, seinem charakteristischen Begleiter im Schwangerenarn (siehe Seite 45), durch die bisherigen Experimente nicht begründet ist.

Eine durch die Kostbarkeit des Materials sehr erschwerte systematische Untersuchung des krystallisierten Hormons wird erst allmählich weiteren Einblick in die Konstitution dieses interessanten Naturstoffes bringen können.

Tabellen.

Die in den Tabellen I—XVII wiedergegebenen physiologischen Auswertungen sind aus Versuchsreihen an über 2000 Chargen ausgewählt worden. Einige von den in den ersten Tabellen wiedergegebenen Auswertungen entsprechen nicht den Anforderungen, die nach den Darlegungen auf Seite 12 an die technische Durchführung des ALLEN-DOISY-Testes gestellt werden müssen; naturgemäß hat sich die Handhabung des Testes erst allmählich an Erfahrungen herausgebildet. — Die in den Tabellen enthaltenen Zahlenwerte sind größtenteils abgerundet.

Tabelle I.
Auswertung eines Plazentarohöles (Ausgangsmaterial).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
Pl. H. 8	0,040	4 Ratten	—	—	25 000	100 000
	0,060	6 Ratten	—	—	16 600	66 600
	0,015	4 Mäuse	—	—	—	66 600
	0,075	6 Ratten	1	16,6	13 300	53 000
	0,080	3 Ratten	—	—	12 500	50 000
	0,020	4 Mäuse	—	—	—	50 000
	0,150	12 Ratten	6	50,0	6 700	26 500
	0,0375	3 Mäuse	2	66,6	—	26 500
	0,040	8 Mäuse	6	75,0	—	25 000

Tabelle II.
Auswertungen von Plazentaölen, die durch Behandlung mit Salzsäure erhalten wurden (s. Seite 21).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
9 a	0,0275	3 Ratten	—	—	36 300	145 000
	0,0550	6 Ratten	5	83,3	18 150	72 000
10 a	0,0310	6 Ratten	1	16,6	32 200	129 000
	0,0400	3 Ratten	2	66,6	25 000	100 000
61 a	0,0400	4 Ratten	1	25,0	25 000	100 000
	0,0100	6 Mäuse	2	33,3	—	100 000
	0,0125	6 Mäuse	4	66,6	—	80 000

Tabelle III.

Auswertungen von Plazentaölen, die durch alkalische Behandlung erhalten wurden (s. Seite 22—24).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
30 a	0,040	3 Ratten	—	—	25 000	100 000
	0,075	6 Ratten	1	16,6	13 300	53 000
	0,020	4 Mäuse	1	25,0		50 000
	0,025	4 Mäuse	2	50,0		40 000
30 b	0,040	3 Ratten	—	—	25 000	100 000
	0,030	4 Mäuse	—	—		33 000
	0,060	6 Mäuse	—	—		16 600
11 a	0,040	3 Ratten	—	—	25 000	100 000
	0,080	6 Ratten	3	50,0	12 500	50 000
11 b	0,0093	3 Ratten	—	—	108 000	430 000
	0,0186	3 Ratten	—	—	54 000	215 000
	0,0400	6 Ratten	1	16,6	25 000	100 000
	0,0500	6 Ratten	3	50,0	20 000	80 000
49 a	0,040	5 Ratten	2	40,0	33 300	133 000
	0,040	5 Ratten	4	80,0	25 000	100 000
	0,010	8 Mäuse	6	75,0		100 000
62 a	0,0050	6 Mäuse	—	—		200 000
	0,0067	6 Mäuse	5	83,3		150 000
	0,0133	6 Mäuse	6	100,0		75 000
62 b	0,060	4 Ratten	1	25,0	16 600	67 000
	0,120	4 Ratten	3	75,0	8 300	33 000
79 a	0,0067	6 Mäuse	—	—		150 000
	0,0100	6 Mäuse	—	—		100 000
	0,0200	6 Mäuse	4	66,6		50 000
	0,0300	6 Mäuse	5	83,3		33 300
	0,0400	6 Mäuse	6	100,0		25 000
79 b	0,015	4 Ratten	—	—	67 000	270 000
	0,060	4 Ratten	2	50,0	16 600	66 600
	0,020	8 Mäuse	6	75,0		50 000
	0,090	4 Ratten	3	75,0	11 100	44 400
	0,120	4 Ratten	4	100,0	8 300	33 300
89 a	0,010	8 Mäuse	4	50,0		100 000
	0,050	6 Ratten	4	66,6	20 000	80 000
	0,0125	8 Mäuse	6	75,0		80 000
	0,060	4 Ratten	3	75,0	16 600	66 600
	0,0167	8 Mäuse	7	87,5		60 000
89 b	0,040	4 Ratten	2	50,0	25 000	100 000
	0,010	6 Mäuse	2	33,3		100 000
	0,0133	6 Mäuse	5	83,3		75 000
	0,060	4 Ratten	4	100,0	16 600	66 600
	0,020	6 Mäuse	6	100,0		50 000

Tabelle III, Fortsetzung.

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
106 a	0,050	4 Ratten	1	25,0	20 000	80 000
	0,060	6 Ratten	2	33,3	16 600	66 600
	0,0167	8 Mäuse	4	50,0		60 000
	0,075	6 Ratten	4	66,6	13 400	53 000
	0,020	8 Mäuse	5	62,5		50 000
	0,025	8 Mäuse	6	75,0		40 000
	0,120	6 Ratten	5	83,3	8 300	33 300

Tabelle IV.

Auswertungen von Plazentaölen, die durch Anwendung kombinierter Säure- und Alkalibehandlung erhalten wurden (s. Seite 25/26).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
17 a	0,020	3 Ratten	—	—	50 000	200 000
	0,006	3 Mäuse	2	66,6		166 000
17 b	0,080	3 Ratten	2	66,6	12 500	50 000
	0,015	3 Mäuse	—	—		67 000
18 a	0,010	3 Ratten	2	66,6	100 000	400 000
	0,0035	4 Mäuse	4	100,0		290 000
	0,015	3 Ratten	3	100,0	67 000	270 000
	0,004	3 Mäuse	3	100,0		250 000
	0,022	3 Ratten	3	100,0	45 000	180 000
28 a	0,020	3 Ratten	2	66,6	50 000	200 000
28 b	0,040	6 Ratten	3	50,0	25 000	1 000 000
	0,060	6 Ratten	5	83,3	16 600	66 600
29 a	0,010	4 Ratten	1	25,0	100 000	400 000
	0,015	3 Ratten	2	66,6	67 000	270 000
	0,004	8 Mäuse	6	75,0		250 000

Tabelle V.

Auswertungen von Plazentaölen, die durch Entmischung mit Lösungsmitteln und durch Adsorptionsversuche erhalten wurden (s. Seite 26/28).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
183 a	0,0100	8 Mäuse	5	62,5		100 000
	0,0125	8 Mäuse	7	87,5		80 000
	0,0154	6 Mäuse	6	100,0		65 000
206 a	0,012	6 Ratten	3	50,0	83 000	330 000
	0,004	8 Mäuse	6	75,0		250 000
	0,018	6 Ratten	5	83,3	55 000	220 000
	0,006	8 Mäuse	8	100,0		165 000
123 a	0,022	6 Mäuse	—	—		45 000
	0,100	4 Ratten	—	—	10 000	40 000
	0,033	6 Mäuse	2	33,3		30 000
	0,150	4 Ratten	2	50,0	6 700	27 000
	0,050	6 Mäuse	4	66,6		20 000
151 a	0,0050	6 Mäuse	3	50,0		200 000
	0,0222	4 Ratten	3	75,0	45 000	180 000
	0,0067	6 Mäuse	5	83,3		150 000
	0,0333	4 Ratten	4	100,0	30 000	120 000
	0,0100	6 Mäuse	6	100,0		100 000
Pl. 8 a	0,0083	6 Mäuse	3	50,0		120 000
	0,0400	4 Ratten	3	75,0	25 000	100 000
	0,0011	8 Mäuse	6	75,0		90 000
	0,0167	8 Mäuse	8	100,0		60 000
	0,0670	4 Ratten	4	100,0	15 000	60 000
Pl. 16 a	0,0083	8 Mäuse	6	75,0		120 000
	0,0100	8 Mäuse	7	87,5		100 000
	0,0125	8 Mäuse	8	100,0		80 000
84 a	0,0100	6 Mäuse	3	50,0		100 000
	0,0111	6 Mäuse	4	66,6		90 000
	0,0133	6 Mäuse	5	83,3		75 000
	0,0670	6 Ratten	6	100,0	15 000	60 000
87 a	0,0133	4 Ratten	—	—		300 000
	0,0200	4 Ratten	2	50,0	75 000	200 000
	0,0050	6 Mäuse	4	66,6	50 000	200 000
	0,0057	6 Mäuse	5	83,5		175 000
	0,0080	6 Mäuse	6	100,0		125 000

Tabelle VI.
Auswertung eines Schwangerenharn-Rohöls (Ausgangsmaterial)
(s. Seite 31).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
H. 15	0,0200	6 Mäuse	2	33,3	5 000	50 000
	0,0250	6 Mäuse	3	50,0		40 000
	0,0333	6 Mäuse	5	83,3		30 000
	0,0500	6 Mäuse	6	100,0		20 000
	0,2000	4 Ratten	4	100,0		20 000

Tabelle VII.
Auswertungen von Hormonölen aus Schwangerenharn, die durch Entmischungsmethoden mit Lösungsmitteln gewonnen wurden
(s. Seite 32/33).

Präparate Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
304 a	0,004	6 Mäuse	3	50,0	33 300	250 000
	0,005	6 Mäuse	5	83,3		200 000
	0,006	6 Mäuse	6	100,0		167 000
	0,030	6 Ratten	6	100,0		133 000
340 a	0,0025	8 Mäuse	5	62,5	50 000	400 000
	0,00286	8 Mäuse	6	75,0		350 000
	0,00333	8 Mäuse	7	87,5		300 000
	0,0200	6 Ratten	6	100,0		200 000
340 c	0,0040	8 Mäuse	4	50,0	41 500	250 000
	0,0050	8 Mäuse	6	75,0		200 000
	0,0240	6 Ratten	6	100,0		167 000
291 a	0,0042	6 Mäuse	3	50,0	50 000	238 000
	0,0200	6 Ratten	4	66,6		200 000
	0,0055	6 Mäuse	5	83,3		180 000
	0,0067	6 Mäuse	6	100,0		150 000
341 a	0,0020	7 Mäuse	3	43,0		500 000
	0,0025	8 Mäuse	6	75,0		400 000
	0,0033	8 Mäuse	7	87,5		300 000
	0,0040	8 Mäuse	8	100,0		250 000
341 c	0,0180	6 Ratten	4	66,6	55 500	222 000
	0,0200	6 Ratten	5	83,3	50 000	200 000
	0,0050	4 Mäuse	3	75,0		200 000
	0,0250	6 Ratten	6	100,0	40 000	160 000
293	0,0040	6 Mäuse	2	33,3		250 000
	0,0050	6 Mäuse	4	66,6		200 000
	0,0055	6 Mäuse	5	83,3		180 000
	0,0067	6 Mäuse	6	100,0		150 000

Tabelle VII, Fortsetzung.

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
343 a	0,00182	6 Mäuse	2	33,3	125 000	550 000
	0,00800	7 Ratten	4	57,0		500 000
	0,00222	6 Mäuse	5	83,3	100 000	450 000
	0,01000	7 Ratten	6	86,0		400 000
	0,00274	6 Mäuse	6	100,0		365 000

Tabelle VIII.

Auswertungen von Hormonölen aus Schwangerenharn, die durch Verteilung von Rohölen zwischen Äther und Alkali gewonnen wurden (s. Seite 34—36).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
272 a	0,0063	6 Mäuse	4	66,6	33 300	160 000
	0,0071	6 Mäuse	5	83,3		140 000
	0,0300	4 Ratten	3	75,0		133 000
	0,0083	6 Mäuse	5	83,3		120 000
	0,0100	6 Mäuse	6	100,0		100 000
297 a	0,0150	6 Ratten	2	33,3	66 600	270 000
	0,0040	6 Mäuse	3	50,0	50 000	250 000
	0,0200	5 Ratten	3	60,0		200 000
	0,0055	5 Mäuse	4	80,0		180 000
	0,0060	6 Mäuse	5	83,3	167 000	
	0,0080	6 Mäuse	6	100,0	125 000	
297 b	0,05	6 Mäuse	—	—	1 250	20 000
	0,10	6 Mäuse	3	50,0		10 000
	0,20	6 Mäuse	6	100,0		5 000
	0,80	6 Ratten	5	83,3	5 000	
	1,00	6 Ratten	6	100,0	1 000	4 000
297 c	0,0025	10 Mäuse	6	60,0	45 000	400 000
	0,0023	10 Mäuse	8	80,0		360 000
	0,0030	10 Mäuse	9	90,0		333 000
	0,0038	6 Mäuse	6	100,0		270 000
	0,0050	6 Mäuse	6	100,0		200 000
	0,0225	6 Ratten	6	100,0		180 000
267 a	0,0050	6 Mäuse	0	—		200 000
	0,0075	6 Mäuse	0	—		133 000
	0,0100	6 Mäuse	2	33,3		100 000
	0,0133	6 Mäuse	4	66,6		75 000
	0,0167	6 Mäuse	5	83,3		60 000

Tabelle VIII, Fortsetzung.

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
296 a	0,0125	6 Mäuse	0	—	7 500	80 000
	0,0167	6 Mäuse	0	—		60 000
	0,1333	6 Ratten	1	16,6		30 000
	0,0500	6 Mäuse	4	66,6		20 000
	0,1000	6 Mäuse	6	100,0		10 000
296 b	0,0067	8 Mäuse	4	50,0	33 300	150 000
	0,0300	6 Ratten	4	66,6		133 000
	0,0080	8 Mäuse	6	75,0		125 000
	0,0400	6 Ratten	6	100,0		100 000
294 a	0,0040	6 Mäuse	3	50,0		250 000
	0,0050	6 Mäuse	5	83,3		200 000
	0,0060	6 Mäuse	6	100,0		167 000
	0,0075	6 Mäuse	6	100,0		133 000
320 a	0,0025	6 Mäuse	—	—	33 300	400 000
	0,0033	6 Mäuse	1	16,6		300 000
	0,0067	6 Mäuse	5	83,3		150 000
	0,0050	6 Mäuse	3	50,0		200 000
	0,0300	6 Ratten	6	100,0		133 000
320 b	0,10	6 Mäuse	3	50,0	1 250	10 000
	0,80	6 Ratten	5	83,3		5 000
	0,20	6 Mäuse	6	100,0		5 000
	1,00	6 Ratten	6	100,0		1 000
320 c	0,001	8 Mäuse	3	37,5	125 000	1 000 000
	0,00117	8 Mäuse	5	62,5		850 000
	0,00133	8 Mäuse	6	75,0		750 000
	0,00167	8 Mäuse	7	87,5		600 000
	0,00800	6 Ratten	6	100,0		500 000
286 b	0,005	8 Mäuse	4	50,0		200 000
	0,00625	8 Mäuse	6	75,0		160 000
	0,0375	8 Mäuse	8	100,0		133 000
324 a	0,001	6 Mäuse	2	33,3	125 000	1 000 000
	0,00112	6 Mäuse	4	66,5		850 000
	0,00133	6 Mäuse	5	83,3		750 000
	0,00800	4 Ratten	4	100,0		500 000
324 c	0,00143	8 Mäuse	4	50,0	125 000	700 000
	0,00182	8 Mäuse	6	75,0		550 000
	0,00800	6 Ratten	5	83,3		500 000
	0,00250	8 Mäuse	8	100,0		400 000

Tabelle IX.

Auswertungen von Hormonölen aus Schwangerenharn, die durch Adsorptions- und Fällungsversuche erhalten wurden (s. Seite 38/39).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	RE pro Gramm	ME pro Gramm
279 a	0,00333	8 Mäuse	4	50,0	40 000	300 000
	0,00400	8 Mäuse	6	75,0		250 000
	0,00500	8 Mäuse	7	87,5		200 000
	0,02500	4 Ratten	4	100,0		160 000
302 a	0,00100	6 Mäuse	1	16,6	125 000	1 000 000
	0,00117	6 Mäuse	3	50,0		850 000
	0,00133	6 Mäuse	5	83,3		750 000
	0,00154	6 Mäuse	6	100,0		650 000
	0,00800	4 Ratten	4	100,0		500 000
259 a	0,00364	8 Mäuse	2	25,0		275 000
	0,00415	8 Mäuse	4	50,0		240 000
	0,00500	7 Mäuse	5	71,4		200 000
	0,00555	8 Mäuse	7	87,5		180 000
263 a	0,0200	4 Ratten	—	—	50 000	200 000.
	0,0250	4 Ratten	—	—	40 000	160 000
	0,0080	6 Mäuse	2	33,3		125 000
	0,0100	6 Mäuse	3	50,0		100 000
	0,0125	6 Mäuse	5	83,3		80 000
285 b	0,0040	8 Mäuse	5	62,5		250 000
	0,0050	6 Mäuse	5	83,3		200 000
	0,00625	6 Mäuse	6	100,0		160 000
	0,0075	7 Mäuse	7	100,0		133 000
319 a	0,0050	8 Mäuse	4	50,0	30 000	200 000
	0,0057	8 Mäuse	4	50,0		175 000
	0,0067	8 Mäuse	6	75,0		150 000
	0,0333	6 Ratten	6	100,0		120 000
319 b	0,00167	6 Mäuse	3	50,0	100 000	600 000
	0,00182	6 Mäuse	5	83,3		550 000
	0,00200	5 Mäuse	5	100,0		500 000
	0,0100	6 Ratten	6	100,0		400 000

Tabelle X.
Auswertungen eines Arbeitsganges zur Reindarstellung
des Hormons (s. Seite 41—45).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Mäuse pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro Gramm
270 a	0,00555	5	4	80	180 000
	0,00670	6	5	83	150 000
	0,00833	6	6	100	120 000
342 a	0,00167	6	4	67	600 000
	0,00182	7	5	71	550 000
	0,00250	6	6	100	400 000
394 c	0,00050	6	4	67	2 000 000
	0,00067	7	6	86	1 500 000
	0,00100	4	4	100	1 000 000

Tabelle XI.

Auswertung einer gesättigten wäßrigen Hormonlösung (s. Seite 51).
Die wäßrige Lösung wurde in 4maliger Injektion im Abstand von
je 12 Stunden ausgewertet. Zur Injektion wurden die in der
Tabelle angegebenen Mengen der wäßrigen Hormonlösung jeweils
mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,1 ccm aufgefüllt.

Injizierte Menge an gesättigter wäßriger Hormonlösung in ccm	Injizierte Gesamt- menge in ccm	Anzahl Mäuse pro Dosis	Anzahl Tiere auf Voll- brunst	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro ccm wäßriger Hormon- lösung
4×0,000625	0,0025	13	0	0	400
4×0,001250	0,0050	12	5	42	200
4×0,002500	0,0100	13	13	100	100

Tabelle XII.

Auswertung des krystallisierten reinen Hormons in einmaliger Injektion in Öllösung (s. S. 53).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Mäuse pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	Dauer des Oestrus in Tagen	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro Gramm in Millionen
Pg. II	0,000300	4	4	2—3	100	3,33
	0,000250	13	13	2—3	100	4,0
	0,000200	8	8	2—2	100	5,0
	0,000187	6	6	—2	100	5,35
	0,000167	8	8	1—2	100	6,0
	0,000156	5	5	—1	100	6,4
	0,000125	13	11	—1	85	8,0
	0,000100	8	5	—1	62	10,0
Pg. 429	0,000125	11	9	—1	82	8,0
	0,000125	10	9	—1	90	8,0
	0,000100	12	7	—1	58	10,0
	0,000100	10	6	—1	60	10,0
Pg. 415	0,000187	11	11	—2	100	5,35
	0,000125	12	11	—1	92	8,0

Tabelle XIII.

Auswertung des krystallisierten Hormonpräparates Pg. II in 2—3maliger Injektion innerhalb von 12—14 Stunden (s. Seite 54).

Injizierte Dosis in mg	Gesamtdosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Oestrus in Tagen	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro g in Millionen
2 × 0,000067	0,000133	12	12	—2 ¹ / ₁	100	7,5
2 × 0,000044	0,000089	12	11	1—1 ¹ / ₂	92	11,25
2 × 0,000033	0,000067	13	10	—1	77	15
3 × 0,000017	0,000050	12	4	—1	33	20

Tabelle XIV.

Auswertung des krystallisierten Hormonpräparates Pg. IV in 4—6maliger Injektion im Abstand von 12 bzw. 8 Stunden (s. Seite 54).

Injizierte Dosis in mg	Gesamtdosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Oestrus in Tagen	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro g in Millionen
4 × 0,000017	0,000067	10	10	2	100	15
4 × 0,000013	0,000050	8	8	1 ¹ / ₂ —2	100	20
4 × 0,000008	0,000033	8	7	1	88	30
6 × 0,000008	0,000050	8	7	1 ¹ / ₂ —2	88	20
6 × 0,000006	0,000033	8	7	1	88	30

Tabelle XV.

Auswertung der krystallisierten Hormonpräparate Pg. II und Pg. IV in 6maliger Injektion innerhalb von 48 Stunden (s. Seite 54).

Injizierte Dosis in mg	Gesamtdosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Oestrus in Tagen	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro g Millionen
6 × 0,000008	0,000050	12	12	2½—3	100	20
6 × 0,000006	0,000033	12	11	1½—2	92	30
6 × 0,000005	0,000029	8	6	½—1	75	35
6 × 0,000004	0,000025	8	5	—½	63	40

* Tabelle XVI.

Auswertung des krystallisierten Hormon-Azetates in einmaliger Injektion in Sesamöllösung (s. Seite 61).

Einmalig injizierte Dosis in mg	Umgerechnet auf ME pro g	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst
0,000100	10 000 000	12	6	50
0,000125	8 000 000	12	8	66
0,000167	6 000 000	12	9	75

Tabelle XVII.

Auswertung des hydratisierten Hormons C₁₈ H₂₄ O₃, isoliert nach der Methode von MARRIAN, in einmaliger Injektion in Öllösung (s. Seite 68).

Präparat Nr.	Injizierte Dosis in mg	Anzahl Tiere pro Dosis	Anzahl Tiere auf Vollbrunst	% Tiere auf Vollbrunst	ME pro g Millionen
KM I	0,000100	11	—	0	10,0
	0,000111	10	—	0	9,0
	0,000125	11	1	9	8,0
	0,000154	10	1	10	6,5
	0,000200	10	2	20	5,0
KM II	0,000100	10	—	0	10,0
	0,000125	11	2	18	8,0
	0,000167	10	1	10	6,0
	0,000250	10	2	20	4,0
	0,000500	8	4	50	2,0
	0,000666	8	6	75	1,5
	0,001000	13	12	92	1,0
KM III Originalpräparat von MARRIAN	0,000111	10	—	0	9,0
	0,000143	10	1	10	7,0
	0,000200	10	2	20	5,0
	0,000333	8	3	38	3,0
	0,000400	7	3	43	2,5
	0,000800	8	7	87	1,25

Tabelle XVIII.

Absorptionsmessung (s. Seite 51).

2,714 mg, gelöst in 10 ccm absolutem Alkohol, ergeben folgende Werte:

λ	Lösungs- mittel J_0	Lösung J	Lösungs- mittel*) J_0	Lösung J^*	$\log \frac{J}{J_0^{**}}$	$\varepsilon = \frac{2,3 \log \frac{J}{J_0}}{1,12}$
365	20,0	20,0	—	—	—	—
334	21,5	21,5	—	—	—	—
313	21,2	20,8	21,1	20,9	0,006	0,0123
302	20,9	20,5	21,1	20,6	0,01	0,0205
296	22,5	21,0	22,4	21,0	0,029	0,0595
289	23,5	15,1	23,5	15,1	0,192	0,394
280	26,0	16,0	26,0	15,9	0,212	0,435
275	29,1	19,9	28,6	19,4	0,167	0,343
270	25,1	19,1	25,1	19,1	0,119	0,244
265	23,4	19,0	23,5	19,1	0,09	0,185
254	25,0	22,5	24,9	22,5	0,045	0,0925
248	24,3	22,2	24,3	22,2	0,04	0,0822
240	24,0	18,0	24,0	18,0	0,125	0,256
238	25,4	16,9	25,4	17,0	0,175	0,36
234	22,0	10,0	22,0	10,0	0,342	0,703
230	24,1	8,1	24,0	8,0	0,475	0,975
224	26,7	7,1	26,8	7,0	0,579	1,19

*) Kontrollmessung.

**) Errechnet aus den Mittelwerten beider Messungen.

Literaturübersicht.

Zusammenfassende Abhandlungen.

- TRENDELENBURG, P.: Die Hormone, Bd. 1, Berlin 1929.
 HARMS, I. W.: Körper und Keimzellen, Berlin 1926.
 ALLEN, E. und DOISY, E. A.: Ovarian and Placental Hormones, *Physiol. Rev.*
 Vol. VII, 4, 1927.
 PARKES, A. S.: The Internal Secretions of the Ovary, London 1929.
 FRANK, R. T.: The Female Sex Hormone, Baltimore 1929.

Original-Arbeiten.

- ADLER, L.: *Arch. f. Gynäk.* **95**, 349 (1912).
 ALLAN, H., DICKENS, F., DODDS, E. C. und HOWITT, F. O.: *Biochem. J.* **22**, 1526
 (1928).
 — — — : *J. of Physiol.* **68**, 348 (1930).
 ALLEN, E. und DOISY, E. A.: *J. Amer. Med. Assoc.* **81**, 819 (1923).
 — — — : *Amer. J. Physiol.* **69**, 577 (1924).
 — — — : *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* **22**, 303 (1925).
 — PRATT, I. P. und DOISY, E. A.: *J. Amer. Med. Assoc.* **85**, 399 (1925).
 ASCHHEIM, S.: *Med. Klin.* **22**, 2023 (1926).
 ASCHNER, B.: *Arch. f. Gynäk.* **99**, 534 (1913).
 BENCAN, CHAMPY und KELLER: *C. r. Soc. biol.* 1927, **2**, 229 u. 427.
 BERTHOLD: *Arch. Anat. Physiol. wiss. Med.*, (1849), 42.
 BEUTHNER und FELS: *Endocrinologie* **2**, 406 (1928).
 BISCEGLIE: *Ronas Berichte* **12**, 663 (1929).
 BLOTEVOGEL, W., DOHRN, M. und POLL, H.: *Med. Klin.* 1926, 35.
 BOUIN, P., ANCEL, P. und VILLEMEN, F.: *C. r. Soc. biol.* **61**, 417 (1906).
 BROUHA, L. und SIMONNET, H.: *C. r. Soc. biol.* **93**, 489 (1925) u. **93**, 557 (1925).
 — — — : *Press. Med.* **103**, 1619 (1926).
 — — — : *C. r. Soc. biol.* **96**, 96 (1927).
 BROWN-SEQUARD, C.: *C. r. Soc. biol.* **1**, 415, 420 u. 430 (1899).
 BUCURA, C. J.: *Z. f. Heilkunde* **28**, 147 (1907).
 BUTENANDT, A.: *Naturw.* **17**, 897 (1929).
 — : *Dtsch. med. Wo.* 1929, 2171.
 — und VON ZIEGNER, E.: *HOPPE-SEYLER'S Z. f. physiol. Chem.* **188**, 1 (1930).
 — : *HOPPE-SEYLER'S Z. f. physiol. Chem.* **191**, 127 u. 140 (1930).
 CHAMPY und GLEY, E.: *C. r. Soc. biol.* 1927, Bd. II, 119.

- CLAUBERG, C.: C. f. Gynäk. 1930, Nr. 1, 7.
 COLLIP: Nature 22. III. 1930.
 CORNER, G. W.: Amer. J. Anat. 32, 345 (1923).
 — : Physiol. Rev. 3, 457 (1923).
 — und HURNI, F. H.: Amer. J. Physiol. 46, 483 (1918).
 — und ALLEN: Amer. J. Physiol. 88, 326 u. 340 (1929).
 COURBIER, R.: C. r. Soc. biol. 90, 453 (1924).
 — : C. r. Acad. d. sci. 178, 2192 (1924).
 — : Arch. de Biol. 34, 369 (1924).
 — : C. r. Soc. biol. 90, 808 (1924).
 — : C. r. Soc. biol. 93, 672 (1925).
 — und POTWIN, R.: C. r. Soc. biol. 94, 878 (1926).
 — und MASSE, M.: C. r. Soc. biol. 1928, Bd. II, 263 u. 265.
 COWARD, C. H. und BURN, I. H.: J. of Physiol. 63, 270 (1927).
 DICKENS, F., DODDS, E. C. und WRIGHT, S.: Biochem. J. 19, 853 (1925).
 — — und BRINKWORTH, D. I. T.: Lancet 1927, 1015 u. 1182.
 DODDS, E. C.: Lancet 1928, 1107.
 — und DICKENS, F.: J. of Obst. Gyn. of Brit. Emp. 36, Nr. 1 (1929).
 DOHRN, M., FAURE, W., POLL, H. und BLCTEVOGEL, W.: Med. Klin. 1926, Nr. 37.
 — : Klin. Wo. 1927, Nr. 8.
 DOISY, E. A., RALLS, I. O., ALLEN, E. und JOHNSTON, C. G.: J. Biol. Chem. 61, 711 (1924).
 — — und JORDAN, C. N.: Endocrinol. 10, 273 (1926).
 — : Proc. Inst. of Med. Chicago 1927.
 — VELER, C. D. und THAYER, S.: J. Biol. Chem. 96, 499 (1930).
 EVANS, H. M. und BURR, G. O.: Mem. of Univ. of California, Vol. 8, 1927.
 FAUST, E. S.: Schweiz. Med. Wo. 55, 575 (1925).
 FELLNER, O. O.: Z. f. allg. Path. u. path. Anat. 23, 673 (1912).
 — : Arch. f. Gynäk. 100, 641 (1913).
 — : Wien. Klin. Wo. 29, 930 (1916).
 — : Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. 54, 88 (1917).
 — : C. f. Gynäk. 44, 1133 (1920).
 — : PFLÜGERS Arch. 189, 199 (1921).
 — : Arch. f. Gynäk. 120, 231 (1923).
 — : Klin. Wo. 1925, 1651.
 FELS, E.: Klin. Wo. 1926, 2349.
 FOÀ: Ar. di fisiol. 1908, Vol. 5.
 FRAENKEL, L.: Arch. f. Gynäk. 68, 438 (1903).
 FRANK, R. T.: J. Amer. Med. Assoc. 78, 181 (1922).
 — BONHAM, C. D. und GUSTAVSON, R. G.: Amer. J. Physiol. 74, 359 (1925).
 — FRANK, M. L., GUSTAVSON, R. G. und WEYERTS, W. W.: J. Amer. Med. Assoc. 85, 510 (1925).
 — und GOLDBERGER, M. A.: J. Amer. Med. Assoc. 86, 1686 (1926), 87, 554, 1719 (1926).
 — GUSTAVSON, R. G., HOLLOWAY, J., HYNDMAN, D., KRÜGER, H. und WHYTE, J.: Endocrinol. 10, 260 (1926).
 — KINGERY, H. M. und GUSTAVSON, R. G.: J. Amer. Med. Assoc. 85, 1558 (1925).
 — und ROSENBLoom, J.: Surg. Gynec. and Obst. 21, 646 (1925).

- FRÄNKEL, S. und FONDA, M.: *Biochem. Z.* 141, 379 (1923).
 GLEY, P.: *C. r. Soc. biol.* 1928, Bd. I, 504, 656 u. 834.
 GLIMM, E. und WADEHN, F.: *Biochem. Z.* 179, 3 (1926).
 — — : *Biochem. Z.* 207, 301 (1929).
 — — : *Biochem. Z.* 219, 155 (1930).
 GUTHRIE, C. C.: *J. exper. Zool.* 5, 563 (1907).
 — : *J. exper. Med.* 12, 269 (1910).
 HALBAN, J.: *Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* 12, 496 (1900).
 — : *Arch. Gynäk.* 75, 353 (1905).
 HALBERSTÄDTER, L.: *Berl. Klin. Wo.* 42, 64 (1905).
 HART, P. C., DE JONGH, S. E., LAQUEUR, E. und WIJSENBECK, I. A.: *Dtsch. Med. Wo.* 1925, 1700.
 HARTMANN, M.: *Klin. Wochenschr.* 1926, 2152.
 — und ISLER, H.: *Biochem. Z.* 175, 46 (1926).
 HERRMANN, E.: *C. f. Gynäk.* 137, 1563 (1913).
 — : *Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* 41, 1 (1915).
 — : *Wien. klin. Wo.* 1916, 778.
 — : *Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* 54, 152 (1917).
 — : *C. f. Gynäk.* 45, 501 (1921).
 — und STEIN, M.: *Wiener klin. Wo.* 1916, 778.
 — — : *C. f. Gynäk.* 42, 425 (1919).
 — — : *C. f. Gynäk.* 44, 1449 (1920).
 ISCOVESCO, H.: *C. r. Soc. biol.* 73, 16 u. 104 (1912).
 JENTZNER, A. und BEUTTNER, O.: *Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* 42, 66 (1900).
 JORDAN, C. N. und DOISY, E. A.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 24, 216 (1926).
 JOUBLOT, J.: *C. r. Soc. biol.* 1928, Bd. I, 1542.
 JUHN, M. und GUSTAVSON, R. G.: *J. exper. Zool.* 56, 31 (1930).
 KAHNT, L. C. und DOISY, E. A.: *Endocrin.* 12, 760 (1928).
 KNAUER, E.: *Arch. f. Gynäk.* 60, 322 (1900).
 KNAUS, H.: *Klin. Wo.* 1930, Nr. 21.
 KOLB: *Schweiz. Naturf. Ges.* 103, 311 (1922).
 LAQUEUR, E.: *Klin. Wo.* 1927, 390.
 — : *Klin. Wo.* 1926, 399.
 — HART, P. C. und DE JONGH, S. E.: *Versl. d. k. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 29, 329, 591 u. 890 (1926).
 — — — und WIJSENBECK, I. A.: *Dtsch. med. Wo.* 1926, 4 u. 52.
 — — — : *Dtsch. med. Wo.* 1926, 1247 u. 1331.
 — BORCHARDT, E., DINGEMANSE, E. und DE JONGH, S. E.: *Z. f. d. ges. exper. Med.* 68, 86 (1929).
 — DE JONGH, S. E. und DINGEMANSE, E.: *Ronas Ber.* 52, 801 (1929).
 — — : *Klin. Wo.* 1928, 1851.
 — DINGEMANSE, E., DE JONGH, S. E. und KOBER, S.: *Dtsch. med. Wo.* 1930, Nr. 8.
 — FREUD, E. und DE JONGH, S. E.: *PFLÜGERS Arch.* 225, 742 (1930).
 LIPSCHÜTZ, A., VESNJAKOW, S., TUISK, R. und ADAMBERG, L.: *C. r. Soc. biol.* 94, 738 (1926).
 — : *PFLÜGERS Arch.* 211, 682, 722 (1926).
 — : *PFLÜGERS Arch.* 220, 321 (1928).

- LIPSCHÜTZ, A.: *Biochem. Z.* **215**, 222, (1929).
- LOEB, L.: *Z. f. allgem. u. path. Anat.* **18**, 563 (1907).
- LOEWE, S.: *C. f. Gynäk.* **49**, 1735 (1925).
- Voss, H. E. und PAAS, E.: *PFLÜGERS Arch.* **215**, 453 (1926).
- : *Klin. Wo.* 1925, 1407 u. 1926, 1327.
- und LANGE, F.: *Dtsch. med. Wo.* 1926, 284.
- : *Z. f. d. ges. exper. Med.* **60**, 284 (1926).
- : *Klin. Wo.* 1926, 1038.
- und FAURE, J.: *Dtsch. med. Wo.* 1926, 307 u. 559.
- und SPOHR, E.: *Biochem. Z.* **180**, 1 (1927).
- und VOSS, E. H.: *Klin. Wo.* 1926, 1083.
- LANGE, F. und WÄHNER, A.: *Klin. Wo.* 1928, 29, 1376.
- LANGE, F. und KÄER, E.: *Endokrinol.* **5**, 177 (1929).
- : *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.* **120**, 48 (1927).
- LONG, I. A. und EVANS, H. M.: *Mem. Univ. Calif.* 1922, **6**, 1.
- MARRIAN, G. F. und PARKES H. S.: *J. of Physiol.* **67**, 389 (1929).
- : *Biochem. J.* **23**, 1090 (1929).
- : *Biochem. J.* **24**, 435 u. 1021 (1930).
- MARSHALL, F. H. A. und JOLLY, W. A.: *Proc. Roy. Soc., B.*, **86**, 395 (1905).
- MORRIS, R. T.: *N. Y. State J. Med.* **62** (1895).
- OKINTSCHITZ, L.: *Arch. f. Gynäk.* **102**, 333 (1914).
- PARKES, A. S.: *Proc. Roy. Soc. B.*, 1926, **100**, 151 u. 172. 1927, **101**, 71 u. 421.
- und BELLERBY, C. W.: *J. Physiol.* **62**, 145, 301 u. 385 (1927).
- : *Journ. of Physiol.* **65**, 341 (1928).
- PETTINARI, V.: *Arch. ital. de Biol.* **74**, 57 u. 62 (1924).
- PÉZARD, A.: *C. r. Akad. Sci.* **158**, 513 (1914). **160**, 260 (1915).
- RALLS, J. O., JORDAN, C. N. und DOISY, E. A.: *J. Biol. Chem.* **69**, 357 (1926).
- SCHICKELE, G.: *Biochem. Z.* **38**, 169, 191 u. 214 (1912).
- : *Z. f. d. ges. exper. Med.* **1**, 539 (1913).
- SCHOELLER, W., DOHRN, M. und HOHLWEG, W.: *Intern. Sex Congress, London, Aug. 1930.*
- SCHRÖDER, R.: *Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* **51**, 1920 (1920).
- und GÖRBIG, F.: *Z. f. Geburtsh. u. Gynäk.* **83**, 764 (3921).
- VON SCHUBERT: *Klin. Wo.* 1927, 136.
- SERENI, ENRICO und RIVKA: *Ronas Ber. Bd.* **53**, 585 (1930).
- SEITZ, L., WINTZ, H. und FINGERHUT, L.: *Münch. med. Wo.* 1914, 1657 u. 1734.
- : *Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk.* **49**, 1 (1919).
- SIEBKE, H.: *Münch. med. Wo.* 1929, 1752.
- : *C. f. Gynäk.* 1929, 2450. 1930, 1601, 1618 u. 1734.
- SLAWSON, C. B.: *J. Biol. Chem.* **97**, 373 (1930).
- SLOTTA, K. H.: *Dtsch. med. Wo.* 1927, 2158.
- STARLING: *Lancet* 1905.
- STEIN, M. und HERRMANN, E.: *Arch. f. Entw. Mech.* **48**, 447 (1921).
- STEINACH, E., HEINLEIN, H. und WIESNER, B. P.: *PFLÜGERS Arch.* **210**, 598 (1925).
- und HOLZKNECHT, G.: *Arch. f. Entw. Mech.* **42**, 490 (1916).
- KUN, H. und HOHLWEG, W.: *PFLÜGERS Arch.* **219**, 325 (1928).
- DOHRN, M., SCHOELLER, W., HOHLWEG, W. und FAURE, W.: **219**, 306 (1928).
- STOCKARD, C. R. und PAPANICOLAOU, G. N.: *Amer. J. Anat.* **22**, 225 (1917).

- THAYER, S. A., VELER, C. D. und DOISY, E. A.: Proc. Soc. exper. Biol. and Med. **27**, 735 (1930).
- VELER, C. D., THAYER, S. A. und DOISY, E. A.: J. of Biol. Chem. **97**, 357 (1930).
- WIELAND, H., STRAUB, W. und DORFMÜLLER, TH.: HOPPE-SEYLER'S Z. f. physiol. Chem. **186**, 97 (1929).
- WIESNER, B. P.: Klin. Wo. 1926, Nr. 28.
- : Nature **121**, 498 (1928).
- und PATEL: Nature **123**, 449 (1928).
- WINTZ, H.: Arch. f. Gynäk. **113**, 457 (1920).
- : Dtsch. med. Wo. 1924, 67.
- ZONDEK, B.: Klin. Wo. 1926, 1218 u. 1521.
- und ASCHHEIM, S.: Arch. f. Gynäk. **127**, 250 (1925).
- : Klin. Wo. 1926, 400, 979 u. 2199.
- : Klin. Wo. 1927, 248.
- und BERNHARDT, H.: Klin. Wo. 1925, 2001.
- und BRAHN, B.: Klin. Wo. 1925, 2445.
- : Klin. Wo. 1928, 485, 1929, 229.
- und VAN EWYK, C.: Klin. Wo. 1930, 1436.
- : Klin. Wo. 1930, 2285.

TAFELN.

Die Abbildungen 1—13, die mir freundlichst zur Verfügung gestellt wurden, entstammen Arbeiten, die im Hauptlaboratorium der SCHERING-KAHLBAUM, A.-G., Berlin ausgeführt wurden. Die Aufnahmen 1—10 sind entnommen der Arbeit von W. SCHOELLER, M. DOHRN und W. HOHLWEG „Die perorale Wirkung des Follikelhormons“ (International Sex Congress, London, August 1930), die Bilder 11—13 einer Abhandlung von E. STEINACH, H. KUN und W. HOHLWEG „Reaktivierung des senilen Ovars und des weiblichen Gesamtorganismus auf hormonalem Wege“ (PFLÜGERS Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 219, Heft 2 (1928)).

Tafel I.

Uterus-Wachstum unter Hormonwirkung.

Abbildung 1: Meerschweinchen-Uteri.

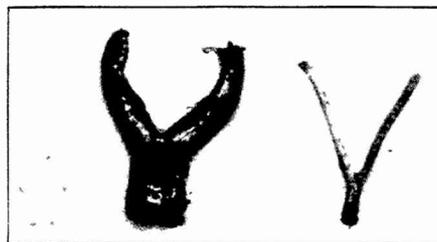
- a) Uterus eines infantil kastrierten Tieres nach peroraler Hormonbehandlung.
- b) Uterus eines infantil kastrierten Tieres; unbehandelte Kontrolle.

Abbildung 2 und 3: Meerschweinchen-Uteri, Längsschnitte.

- Bild 2) Uterus eines infantil kastrierten Tieres nach peroraler Hormonbehandlung.
- Bild 3) Uterus eines infantil kastrierten Tieres; unbehandelte Kontrolle.

Abbildung 4 und 5: Affen-Uteri, Querschnitte.

- Bild 4) Uterus eines infantilen Affenweibchens nach vierwöchentlicher peroraler Behandlung mit 10 000 ME Hormon.
- Bild 5) Uterus eines infantilen Affenweibchens, unbehandelte Kontrolle.



a b

Abbildung 1.

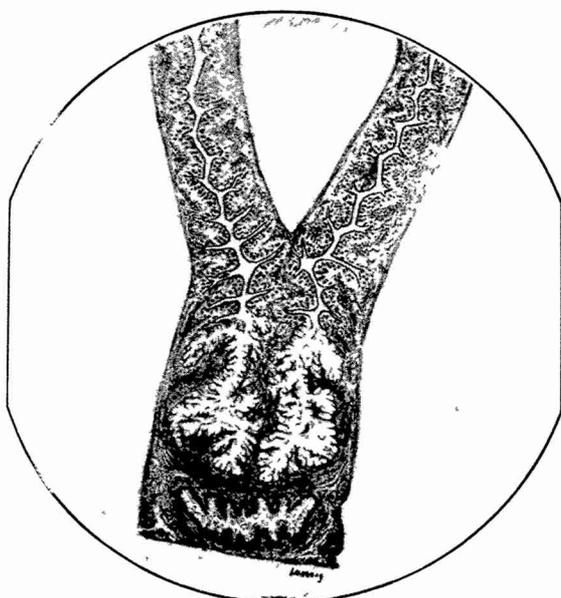


Abbildung 2.

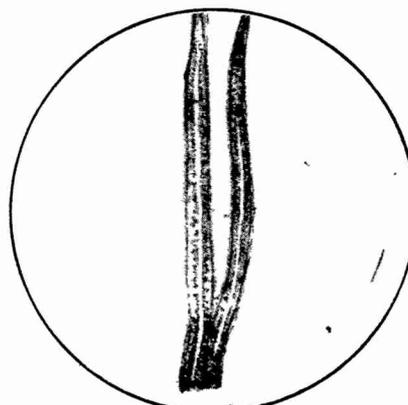


Abbildung 3.

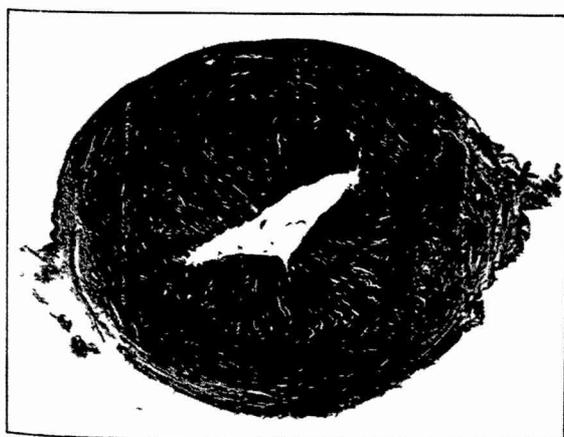


Abbildung 4.

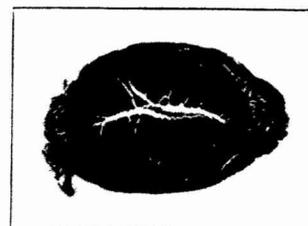
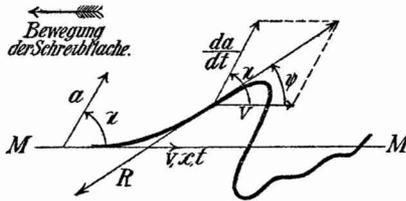


Abbildung 5.

Die bisherigen Schlussfolgerungen beziehen sich auf den Fall der geradlinigen und zur Mittellinie senkrechten Bewegung des Indikators. Wir wollen nun der Reihe nach untersuchen, wie sie bei immer complicirteren Bewegungsformen des Indikators zu ändern sind.

b) Der zunächst in Betracht kommende Fall ist derjenige, in welchem die Indikatorbahn noch geradlinig, aber gegen die Mittellinie geneigt ist.

χ sei der Winkel, den die Richtung der positiven Indikatorbewegung bei ruhend gedachter Schreibfläche gegen die Mittellinie bildet, ψ wiederum der entsprechende Winkel für die jeweilige Relativbewegung des Indikators (Figur 14). Es ist dann



Figur 14.

$$(300) \quad \text{ctg } \psi = \frac{1}{\sin \chi} \frac{v}{\frac{da}{dt}} + \text{ctg } \chi,$$

$$(301) \quad Q^{(R)} = -R' \cos(\chi - \psi). -$$

Ist da/dt sehr klein gegenüber v ,

so darf

$$(302) \quad \sin \psi = \sin \chi \frac{1}{v} \frac{da}{dt}, \quad \cos \psi = 1,$$

also

$$(303) \quad Q^{(R)} = -R' \cos \chi - \left(\frac{R'}{v} \sin^2 \chi \right) \frac{da}{dt}$$

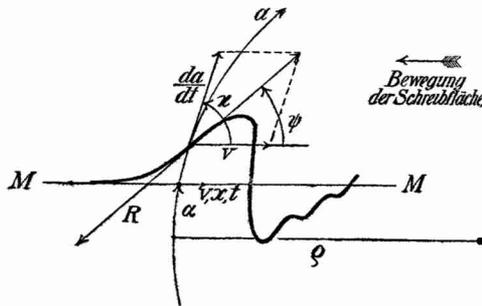
gesetzt werden. Die Reibung im Gehänge entspricht also nun bei sehr kleinen Indikatorgeschwindigkeiten einer konstanten ablenkenden Kraft und einer Dämpfung.

Ist andererseits da/dt sehr gross gegenüber v , so erhalten wir

$$(304) \quad \psi = \chi \text{ oder } = \chi - \pi, \quad Q^{(R)} = \mp R';$$

bei sehr grossen Indikatorgeschwindigkeiten ergibt sich also wieder die gleiche Wirkung wie bei Reibung im Gehänge.

c) Drittens untersuchen wir den Fall einer kreisförmigen Indikatorbahn (Figur 15).



Figur 15.

Am einfachsten wäre es, wenn der Mittelpunkt der Indikatorbahn auf der Mittellinie des Diagramms läge, die Bahn die Mittellinie also senkrecht schnitte. Es scheint aber nicht nöthig diesen Fall noch besonders auszuzeichnen; wir wollen vielmehr sogleich den Fall einer „abgelenkten“ Mittellage betrachten und die „Ablenkung“, das heisst

den (Bogen-)Abstand der Mittellage von der Lage, in welcher die Bewegungsrichtung senkrecht zur Registrirrichtung ist, mit a bezeichnen. Der Ausschlag a werde wie gewöhnlich von der Mittellage ab gerechnet; ψ möge dieselbe, χ die analoge, aus der Figur ersichtliche, Bedeutung wie vorhin haben; χ_0 gehöre zu $a = 0$. Es variirt dann χ mit a und zwar ist

$$(305) \quad \chi = \frac{\pi}{2} \mp \frac{a}{\rho} \mp \frac{a}{\rho} = \chi_0 \mp \frac{a}{\rho}.$$

Das obere oder untere Vorzeichen gilt, jenachdem die Registrirbewegung der Schreibfläche in der Richtung vom Mittelpunkt der Indikatorbahn zum Schreibstift, wie in der Figur, oder umgekehrt erfolgt. Zur Bestimmung der Kraft $Q^{(R)}$, welche der Indikator erfährt, erhalten wir wieder, wie im Falle b , die Formeln

$$(306) \quad \operatorname{ctg} \psi = \frac{1}{\sin \chi} \frac{v}{\frac{da}{dt}} + \operatorname{ctg} \chi, \quad Q^{(R)} = -R' \cos(\chi - \psi).$$

Bei sehr kleinen Indikatorgeschwindigkeiten ergibt sich wiederum die Gleichung (303), wobei aber zu beachten ist, dass χ mit a variirt. Um zu einfachen Schlussfolgerungen zu gelangen, setzen wir auch die Indikатораusschläge selbst als klein voraus, ersetzen in (303) demgemäss $\cos \chi$ durch $\cos \chi_0 \pm (a/\rho) \sin \chi_0$, $\sin^2 \chi$ durch $\sin^2 \chi_0$ und erhalten

$$(307) \quad Q^{(R)} = \mp \left(\frac{R'}{\rho} \sin \chi_0 \right) a - R' \cos \chi_0 - \left(\frac{R'}{v} \sin^2 \chi_0 \right) \frac{da}{dt}.$$

Bei (gegenüber der Registrirgeschwindigkeit v) sehr kleinen Indikatorgeschwindigkeiten da/dt und (gegenüber dem Radius der Indikatorbahn) sehr kleinen Indikатораusschlägen a entspricht die Reibung am Schreibstift einer dem Indikатораusschlag proportionalen stabilisirenden oder astasirenden Kraft, einer konstanten ablenkenden Kraft und einer mit der Indikatorgeschwindigkeit proportionalen dämpfenden Kraft.

Stabilisirung oder Astasirung tritt ein, jenachdem die Registrirbewegung der Schreibfläche in der Richtung vom Mittelpunkt der Indikatorbahn zum Schreibstift (wie in der Figur) oder umgekehrt erfolgt.

Bei (gegenüber der Registrirgeschwindigkeit v) sehr grossen Indikatorgeschwindigkeiten da/dt ergibt sich wieder

$$(308) \quad Q^{(R)} = \mp R',$$

also die gleiche Wirkung wie bei Reibung im Gehänge.

d) Im allgemeinsten Fall muss nicht nur angenommen werden, dass die Bahn beliebig gekrümmt ist, sondern auch, dass als Ausschlag a eine beliebige Funktion der Bogenlänge zu rechnen ist. Es scheint unnöthig, auf die dann eintretenden Komplikationen weiter einzugehen, und genügend, darauf hinzuweisen, dass doch auch dann für kleine Stückchen der Bahn Kreisform und lineare Verknüpfung zwischen Bogenlänge und Ausschlag angenommen werden kann, sodass

bei hinreichend kleinen Ausschlägen sowohl für sehr kleine als für sehr grosse Indikatorgeschwindigkeiten die Sätze unter c) gültig bleiben. —

Ueberblicken wir im Ganzen die Ueberlegungen dieses Artikels, so kann geschlossen werden, dass der Dämpfung gegenüber die Reibung am Schreibstift mit der Reibung im Gehänge den Uebelstand theilt, die Nachwirkung grosser Störungen nicht genügend stark zu beseitigen. Den schlimmsten Fehler der Reibung im Gehänge, den, die Aufzeichnungen sehr kleiner Störungen ganz zu unterdrücken, theilt sie nicht, indem sie sich solchen gegenüber wie eine Dämpfung verhält. Freilich zeigt die Erfahrung, dass manchmal sehr hohe, in der Praxis nicht erfüllbare Anforderungen in Betreff der Verminderung der Reibung am Schreibstift gestellt werden müssen, wenn die Beeinträchtigung der Aufzeichnungen kleiner Störungen nicht doch empfindlich hoch sein soll.

60. *Indikatorgleichung bei Reibung am Schreibstift.* In die Indikatorgleichung geht rechts Q/m ein, wobei m die resultirende Masse ist, die Gleichung erhält also im Falle (a) einer geradlinigen, zur Registrirrichtung senkrechten Indikatorbahn (Figur 13) die Form:

$$(309) \quad \left\{ \begin{aligned} \frac{d^2 a}{dt^2} &= -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 a - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} \mp \frac{R}{m} - \frac{R'}{m} \sin \psi + \text{Störungsglieder} \\ &= -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 a - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} \mp \frac{R}{m} - \frac{R'}{mv} \frac{da}{dt} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{1}{v} \frac{da}{dt}\right)^2}} + \text{Störungsglieder.} \end{aligned} \right.$$

R ist auf die Reibung im Gehänge zu beziehen. Wie hier im einfachsten Falle, so geht allgemein die Indikatorgeschwindigkeit bei Reibung im Gehänge in transcedenter Weise in die Indikatorgleichung ein. *Das Prinzip der Superposition wird hiernach wie bei der Reibung im Gehänge verletzt.* Es kann wiederum gerettet werden, wenn man die Reibung als äussere Störung ansieht.

Unnöthig scheint, noch für die Fälle (b), (c), (d) die Indikatorgleichung besonders hinzuschreiben, wichtig aber ist für uns, zu untersuchen, welche Formen die Indikatorgleichung in den schon vorhin ausgezeichneten Fällen sehr geringfügiger und sehr heftiger Störungen annimmt. Dies soll im Folgenden unter A und B geschehen.

A. *Die Indikatorausschläge sind im Verhältniss zur Registrirgeschwindigkeit so geringfügig, dass der Indikator in der Relativbewegung zur Schreibfläche stets nur mit geringer Neigung gegen die Registrirrichtung fortschreitet.*

Wir wollen hier sogleich den allgemeinsten Fall beliebig geformter Indikatorbahn annehmen, und dürfen dann gemäss dem unter (d) und (c) im vorigen Artikel Gesagten und mit Benutzung von (307) schreiben:

$$(310) \quad \left\{ \begin{aligned} \frac{d^2 a}{dt^2} &= -\frac{R'}{m} \cos \chi_0 - \left(\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 \pm \frac{R'}{qm} \sin \chi_0 \right) a - \left(\frac{2}{\tau} + \frac{R'}{vm} \sin^2 \chi_0 \right) \frac{da}{dt} \\ &\mp \frac{R}{m} + \text{Störungsglieder.} \end{aligned} \right.$$

ϱ ist der Krümmungsradius der Indikatorbahn in der Mittellage des Indikators, χ_0 für diese der Winkel der positiven Richtung in der Indikatorbahn gegen die Richtung, in welcher im Diagramm die Zeit fortschreitet, $\chi = \chi_0 \mp a/\varrho$ der entsprechende Winkel beim Ausschlag a . Hier und in den Faktoren, welche R' enthalten, ist das obere Zeichen zu nehmen, wenn der Krümmungsmittelpunkt gegenüber der Bahn auf der Seite liegt, von welcher die Schreibfläche sich her bewegt — wie in Figur 15 —, andernfalls das untere Zeichen. Vor R/m gilt das obere oder untere Zeichen, jenachdem da/dt positiv oder negativ ist.

Bedeutet T'_0 den durch die Reibung am Schreibstift veränderten Werth der reducirten Schwingungsdauer, so ist nach (310):

$$(311) \quad \left(\frac{2\pi}{T'_0}\right)^2 = \left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 \pm \frac{R'}{\varrho m} \sin \chi_0 = \left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 \left(1 \pm \frac{r'}{\varrho} \sin \chi_0\right).$$

r' bedeutet hier den maximalen Reibungsausschlag, der zu R' gehören würde, wenn die Reibung am Schreibstift ebenso wirkte, wie die Reibung im Gehänge:

$$(312) \quad r' = \left(\frac{T_0}{2\pi}\right)^2 \frac{R'}{m}.$$

Ist die Veränderung von T_0 infolge der Reibung am Schreibstift nur gering, so kann man nach (311) auch schreiben:

$$(313) \quad T'_0 = T_0 \left(1 \mp \frac{1}{2} \frac{r'}{\varrho} \sin \chi_0\right).$$

Für die konstante Ablenkung infolge der Reibung am Schreibstift ergibt sich nach (310) die Grösse

$$(314) \quad a' = -\frac{\frac{R'}{m} \cos \chi_0}{\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 \pm \frac{R'}{\varrho m} \sin \chi_0} = -\frac{r' \cos \chi_0}{1 \pm \frac{r'}{\varrho} \sin \chi_0},$$

wobei es meist erlaubt sein wird, einfacher

$$(315) \quad a' = -r' \cos \chi_0$$

zu schreiben.

Änderung der reducirten Schwingungsdauer und konstante Ablenkung werden in der Regel wenig bedeutungsvoll sein. Von grosser Wichtigkeit aber ist die Verstärkung der Dämpfung, die wir nun untersuchen wollen, denn in ihr beruht ja die Verminderung der Empfindlichkeit des Seismographen gegen sehr kleine Störungen.

Als Relaxationszeit tritt nach (310) anstelle von τ eine durch die Gleichung

$$(316) \quad \frac{1}{\tau'} = \frac{1}{\tau} + \frac{R'}{2mv} \sin^2 \chi_0 = \frac{1}{\tau} + \frac{2\pi^2}{T_0} \frac{r'}{w_0} \sin^2 \chi_0$$

bestimmte Zeit τ' .

Je grösser die Relaxationszeit ist, um so kleiner ist die Dämpfung; wir erkennen hiernach aus (316), dass die Dämpfung infolge der Reibung am Schreibstift mit wachsender Registrirgeschwindigkeit abnimmt.

In die Rechnungen über den Einfluss der Dämpfung geht vornehmlich der Ausdruck $T_0/2\pi\tau$ ein. Der Ersatzwerth bei Reibung am Schreibstift ist:

$$(317) \quad \frac{T_0'}{2\pi\tau'} = \frac{T_0'}{2\pi\tau} + \frac{T_0'}{4\pi} \frac{R'}{mv} \sin^2 \chi_0 = \frac{T_0'}{2\pi\tau} + \pi \frac{T_0'}{T_0} \frac{r'}{w_0} \sin^2 \chi_0.$$

Die Eigenschwingungen des Seismographen werden aperiodisch, wenn $T_0'/2\pi\tau'$ den Werth 1 erreicht. Wird die Mittellinie von der Bahnkurve senkrecht geschnitten, und ist keine besondere Dämpfung vorhanden, so tritt dieses ein für

$$(318) \quad R' = \frac{4\pi mv}{T_0'}, \quad r' = \frac{w_0}{\pi} \frac{T_0'}{T_0}.$$

Findet auch abgesehen von der Reibung am Schreibstift Dämpfung statt, so tritt die Aperiodicität schon bei kleineren Werthen der Reibungskraft R' , bezüglich des zugehörigen maximalen Reibungsausschlages r' ein. Ist zum Beispiel ohne Mitwirkung der Reibung am Schreibstift das Dämpfungsverhältniss 5:1, also nach der Tabelle auf Seite 80 $T_0/2\pi\tau = 0,456$, so ergibt sich Aperiodicität schon bei einer Intensität der Reibung entsprechend:

$$R' = 0,544 \cdot \frac{4\pi mv}{T_0}, \quad r' = \frac{0,544}{\pi} w_0 = 0,173 w_0.$$

Von einer etwaigen Aenderung der reducirten Schwingungsperiode durch die Reibung ist hier abgesehen.

B. Die Indikatorbewegungen finden im Verhältniss zur Registrirgeschwindigkeit so heftig statt, dass der Indikator in seiner Relativbewegung zur Schreibfläche während des Haupttheiles der Zeit nahezu in derjenigen Richtung sich bewegt, welche sich bei ruhender Schreibfläche ergeben würde. Wir ersetzen dann entsprechend den Ueberlegungen des vorigen Artikels $Q^{(R)}$ durch $\mp R'$ und erhalten als Indikatorgleichung

$$(319) \quad \begin{cases} \frac{d^2 a}{dt^2} = -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 a - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} \mp \frac{R+R'}{m} + \text{Störungsglieder} \\ \quad \quad \quad = -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 (a \pm r \pm r') - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} + \text{Störungsglieder;} \end{cases}$$

wobei von den doppelten Vorzeichen das obere oder untere gilt, jenachdem da/dt positiv oder negativ ist. Die Reibung am Schreibstift nimmt ganz das Verhalten der Reibung am Gehänge an.

§ 9. Bestimmung der Konstanten.

61. *Direkte Bestimmung der Konstanten eines Horizontalseismographen ohne Reibung.* Wir wollen zunächst voraussetzen, dass die Reibung nicht merklich ist. Dann erfüllt der Indikatorschlag a die Gleichung:

$$(320) \quad \frac{d^2 a}{dt^2} = -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 a - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} - V^{(s)} \left(\frac{d^2 \sigma}{dt^2} - g i_s - \Delta g_s \right),$$

wenn mit s die (horizontale) Arbeitsrichtung des Seismographen bezeichnet wird. σ ist seine Verschiebung $\parallel s$, i_s die Neigung parallel der zugehörigen Vertikalenebene, Δg_s die ablenkende, parallel s gerichtete Komponente der Schwerkraft.

Direkt beobachtbar ist zunächst das Verhältniss $\varepsilon : 1$, in welchem wegen der Dämpfung die aufeinanderfolgenden grössten Ausschläge bei Eigenschwingungen abnehmen. Dieses *Dämpfungsverhältniss* liefert mittels der nach Artikel 47 gültigen Formeln:

$$(321) \quad \varepsilon = e^{\frac{T}{2\tau}}, \quad \frac{T}{2\pi\tau} = \frac{1}{\pi} \log \text{nat } \varepsilon = 0,733 \log \varepsilon,$$

wobei $\log \varepsilon$ den gewöhnlichen Logarithmus bezeichnet, den Werth von $T/2\pi\tau$. Wird überdies die *thatsächliche Schwingungsperiode* T beobachtet, so ist es möglich, die *Relaxationszeit* τ zu bestimmen, ferner mittels der Gleichung

$$(322) \quad \left(\frac{T}{T_0}\right)^2 = 1 + \left(\frac{T}{2\pi\tau}\right)^2$$

die *reducirte Schwingungsperiode* T_0 .

Bei *starker Dämpfung* ist es schwierig, T mit Schärfe zu messen, und daher vortheilhaft, wenn Vorsorge getroffen ist, die Dämpfung ohne Aenderung von T_0 bis auf einen kleinen Rest ausschalten zu können. Man geht dann den angegebenen Weg bei verminderter Dämpfung und bestimmt so T_0 , schaltet darauf die volle Dämpfung ein und misst das Dämpfungsverhältniss $\varepsilon : 1$, welches mittels (321) und (322) die Relaxationszeit τ ergibt. (Tabelle auf Seite 80.)

Es mag noch darauf hingewiesen werden, dass man gut thun wird, mit der Berechnung von τ zugleich die von $T_0/2\pi\tau$ zu verbinden, da gerade dieser Werth vornehmlich in die Rechnungen eingeht.

Mit T_0 hängt die „äquivalente Pendellänge“ L durch die Beziehung

$$(323) \quad \frac{g}{L} = \left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2$$

zusammen. Bei der Berechnung, wird es in den meisten Fällen durchaus genügen, für die Fallbeschleunigung g den unter 45° Breite im Meeresspiegel

gültigen Werth

$$(324) \quad g = 9,81 \text{ (Meter, Sekunde)}$$

anzunehmen, der nirgends grössere Fehler als $\frac{1}{3}\%$ ergibt.

T_0, L, τ, T könnte man als „innere Konstanten“ des Seismographen bezeichnen, wenn man ihnen als „äussere Konstanten“ die Indikatorvergrösserung $V^{(a)}$, bezüglich die damit durch

$$(325) \quad J^{(a)} = LV^{(a)}$$

zusammenhängende äquivalente Indikatorlänge $J^{(a)}$ gegenüber stellt.

Die äusseren Konstanten ergeben sich am einfachsten durch Beobachtung der Neigungsempfindlichkeit. Bedeutet a den zur dauernden Neigung i_s gehörigen dauernden Ausschlag, so ist

$$(326) \quad \frac{a}{i_s} = J^{(a)} = LV^{(a)}.$$

i_s ist hier in Bogenmaass zu messen. — Benutzt man zur Herstellung von i_s zum Beispiel eine Stellschraube des Apparates von der Ganghöhe H , deren Kopf in N Theile getheilt ist, und die man um n Theile dreht, so ist

$$(327) \quad i_s = \frac{n}{N} \frac{H}{D} \sin \varphi,$$

wenn D den Abstand die Schraubenspitze von der Drehaxe und φ den Winkel zwischen der Drehaxe und der Arbeitsrichtung s bedeutet. Steht die Drehaxe auf der Arbeitsrichtung senkrecht, so geht (327) über in

$$(327') \quad i_s = \frac{n}{N} \frac{H}{D}.$$

Es ist von einigem praktischen Interesse, zu beachten, dass diese einfache Formel sich auch dann ergibt, wenn das Instrument auf drei Schrauben in den Ecken eines gleichschenkligen Dreiecks steht, dessen Grundlinie parallel der Arbeitsrichtung s ist, sofern man eine der Schrauben an der Grundlinie zur Erzeugung der Neigung i_s benutzt und unter D die Länge der Grundlinie versteht.

Der Ausschlag für eine Bogensekunde ist $J^{(a)}/206000$.

62. *Indirekte Bestimmung der äusseren Konstanten eines Horizontalseismographen; Einleitung.* Ist es nicht möglich, die Neigungsempfindlichkeit zu messen, so ist, da wohl nur ausnahmsweise die Vergrösserung $V^{(a)}$ sehr kleiner Erschütterungen direkt bestimmt werden kann, die Feststellung der äusseren Konstanten erheblich umständlicher. Es wird nöthig, auf die besondere Art der Konstruktion des Seismographen Rücksicht zu nehmen, und gemäss dieser $V^{(a)}$ oder $J^{(a)}$ zu berechnen.

Manchmal lässt sich die Empfindlichkeit gegen sehr schnelle Erschütterungen leicht angeben, wie zum Beispiel bei den Horizontalpendeln einfachster Art. Man beginnt hier mit der Messung der Schwingungsperiode des eigentlichen Pendels unter der Einwirkung der Schwerkraft, wenn die Schwingungsaxe hori-

zontal gestellt ist. Bedeutet T' die gefundene Periode, so liegt der Schwingungsmittelpunkt um die Strecke

$$(328) \quad L' = g \left(\frac{T'}{2\pi} \right)^2$$

von der Drehaxe entfernt. Bedenkt man, dass in dem für die Registrirung vorbereiteten Instrument bei sehr schnellen Verschiebungen dieser Punkt in Ruhe bleibt, so wird es sogleich möglich, aus den Abmessungen des Instrumentes und seiner Stellung gegenüber dem Registrirapparat V^ω zu berechnen. — Ist eine Dämpfung vorhanden, und wird sie bei der Bestimmung von L' nicht in ordnungsmässiger Weise verwandt, so giebt die Methode allerdings nur dann brauchbare Resultate, wenn die Dämpfung nicht merklich T_0 ändert. Darüber wird eine besondere Untersuchung entscheiden müssen.

Sobald die Konstruktion Komplikationen zeigt, empfiehlt es sich, die durch die allgemeine Theorie (Artikel 34) gebotene Formel

$$(329) \quad V^\omega = \frac{1}{m} \int d\mu \left[\frac{\sigma'}{a} \right]$$

zu benutzen. Es bedeutet hierin m die resultirende Masse des Gehänges und ist die Summe über alle Massenelemente $d\mu$ des Gehänges auszudehnen, jedes multiplicirt mit der zum Ausschlag a gehörigen Verschiebung σ' relativ zum Gestell in der Richtung s und dividirt durch a .

63. *Bestimmung der resultirenden Masse.* Die resultirende Masse kann entweder durch Rechnung oder experimentell bestimmt werden. Im ersteren Falle kann man die allgemeine Formel

$$(330) \quad m = \int d\mu \left[\frac{\xi'^2 + \eta'^2 + \zeta'^2}{a^2} \right],$$

worin $\xi'^2 + \eta'^2 + \zeta'^2$ das Quadrat der zu a gehörigen Verschiebung von $d\mu$ gegen das Gestell bedeutet, meist in mannigfacher Weise bequemer gestalten.

In der Regel wird das Gehänge aus einer Anzahl von *festen Einzeltheilen* bestehen, deren jeder sich relativ zum Gestell um eine bestimmt gegebene Axe dreht. Es möge in einem solchen Falle l der Abstand irgend eines zweckmässig gewählten Punktes eines solchen Theiles von seiner Drehaxe, a die zu a gehörige Verschiebung des Punktes sein, M die ganze Masse des Theiles, p der Abstand seines Schwerpunktes von der Axe, Θ das Trägheitsmoment um eine zur Drehaxe parallelen Axe durch den Schwerpunkt. Dann ist

$$(331) \quad \left(\frac{p}{l} \right)^2 M + \frac{1}{l^2} \Theta = \frac{1}{l^2} (p^2 M + \Theta)$$

zunächst seine resultirende Masse im ausgewählten Punkt und also

$$(332) \quad \left[\frac{a}{\alpha} \right]^2 \frac{1}{l^2} (p^2 M + \Theta)$$

sein Antheil an der resultirenden Masse m im Indikator.

M wird im Allgemeinen durch direkte Wägung festgestellt werden können. p ergibt sich leicht, wenn man den Theil auf Schneiden auflegt oder an Fäden aufhängt.

Lässt sich die Drehaxe des Theiles horizontal lagern, und kann man ihn dann unter der alleinigen Einwirkung der Schwerkraft schwingen lassen, so ist

$$(333) \quad \left(\frac{2\pi}{T}\right)^2 = \frac{gpM}{p^2M + \Theta},$$

wenn T die Schwingungsperiode bedeutet, man erhält also bei schon bekanntem Werth von pM sogleich $p^2M + \Theta$.

Kann man die Drehaxe des Theiles vertikal stellen, so empfiehlt sich folgende Methode zur Bestimmung von $p^2M + \Theta$. Man setzt eine Federkraft, welche den Theil in eine bestimmte Lage zu führen strebt, wenn eine solche noch nicht vorhanden sein sollte, in passender Weise hinzu, ohne die Massen merklich zu vergrössern. Die Schwingungsperiode sei T . Es ist dann

$$(334) \quad \left(\frac{T}{2\pi}\right)^2 = \frac{p^2M + \Theta}{F},$$

wobei F von der Intensität der Federkraft abhängt. Im Abstände p' von der Drehaxe werde nun eine Masse M' mit dem Trägheitsmoment Θ' in Bezug auf die eigene Schwerpunktsaxe hinzugefügt und die sich ergebende Schwingungsperiode T' ebenfalls beobachtet. Es ist

$$(335) \quad \left(\frac{T'}{2\pi}\right)^2 = \frac{p^2M + \Theta + p'^2M' + \Theta'}{F},$$

also folgt:

$$(336) \quad \frac{T^2}{T'^2 - T^2} = \frac{p^2M + \Theta}{p'^2M' + \Theta'},$$

und es kann $p^2M + \Theta$ nun berechnet werden, wenn $p'^2M' + \Theta'$ bekannt ist. Das letztere ist in üblicher Weise zu erreichen, indem man das Zusatzgewicht (M') zweckmässig wählt.

Eine der zuletzt beschriebenen ähnliche Methode lässt sich manchmal mit sehr grossem Vortheil anwenden, um die ganze resultirende Masse m mit einem Mal zu bestimmen. Man fügt zu diesem Zweck an irgend einem der beweglichen Theile ohne Veränderung der zurücktreibenden Kräfte eine Masse so hinzu, dass die Vermehrung m' der resultirenden Masse m des Gehänges (mittels der Formel 332) leicht berechnet werden kann, und beobachtet die Vergrösserung der Schwingungsperiode. Ist T_0 die vergrösserte reducirte Schwingungsperiode, so gilt die Beziehung

$$(337) \quad m : m + m' = T_0^2 : T_0'^2,$$

welche m zu berechnen erlaubt. —

64. *Indirekte Bestimmung der äusseren Konstanten eines Horizontalseismographen; Einzelnes.* Auch für $\int d\mu [\sigma'/a]$ wird man leicht Vereinfachungen der Rechnung finden. Ein jeder der vorhin betrachteten drehbaren Theile liefert zu $\int d\mu [\sigma'/a]$ den Antheil

$$M \left[\frac{\sigma'}{a} \right],$$

wobei σ' die zum Ausschlag a gehörige Verschiebung des Schwerpunktes parallel der Arbeitsrichtung s bedeutet. —

Zuweilen ist es möglich und bequem die äusseren Konstanten V^ω , J^ω durch experimentelle Bestimmung der Empfindlichkeit gegen Schwereänderungen festzustellen. Zwar hat man über die Schwerekomponente Δg_s , auf die es hier ankommt, keine Gewalt, man kann sie aber im Experiment ersetzen durch Kräfte anderer Art, die man auf die Massen des Gehänges in passender Weise einwirken lässt. Es geschieht das zum Beispiel, wenn man an jedem Massentheile M des Gehänges im Schwerpunkt eine Kraft von der Intensität

$$(338) \quad M \Delta g_s$$

parallel s wirken lässt. Ist der Ausschlag, den man dann erhält a , so folgt nach der Indikatorgleichung (320)

$$(339) \quad V^\omega = \left(\frac{2\pi}{T_0} \right)^2 \frac{a}{\Delta g_s}, \quad J^\omega = L V^\omega = \frac{g}{\Delta g_s} a. \quad -$$

Die erforderliche Kraft $M \Delta g_s$ entspricht einem Zug, welcher der Schwerkraft entgegen eine Masse

$$(340) \quad \Delta M = M \frac{\Delta g_s}{g}$$

zu tragen vermag. — Bezeichnen wir das für das Experiment gewählte Verhältniss $\Delta g_s/g$ mit i_s :

$$(341) \quad i_s = \frac{\Delta g_s}{g} = \frac{\Delta M}{M},$$

so wird

$$(342) \quad J^\omega = \frac{a}{i_s},$$

wodurch in leicht übersehbarer Weise die Bedeutung des Experimentes auch als eine indirekte Bestimmung der Neigungsempfindlichkeit dargethan wird. —

Bei der Ausführung der Messungen wird man sich für einen gewissen Werth i_s des Verhältnisses $\Delta g_s/g$ entscheiden, unter Verwerthung von (340) die Züge parallel s entsprechend reguliren, den Indikatore Ausschlag a beobachten und mittels (342) J^ω berechnen. —

Der Theorie wird in erster Linie entsprochen, wenn die Züge $M \Delta g_s = \Delta M \cdot g$ in den Schwerpunkten der Massen M wirken. Statt dessen kann man sie in beliebig anderer Weise angreifen lassen, sofern man dafür sorgt, dass die näm-

liche Indikatorresultante hervorgeht. Ist zum Beispiel für einen drehbaren Theil des Gehänges mit der Masse M der Abstand des Schwerpunktes von der Axe $= p$, so kann $M \Delta g_s = \Delta M \cdot g$ durch die Kraft $\Delta M' \cdot g = \Delta M \cdot (p/l)g$ im Abstände l in gleicher Richtung von der Axe ersetzt werden. — Lässt sich der Theil vom übrigen Mechanismus absondern und mit horizontaler Axe lagern, und ist im Abstände l von der Axe ein Zug $= M' \cdot g$, das heisst ein Zug, welcher der Schwere der Masse M' entspricht, nöthig, um den Schwerpunkt von M in gleicher Höhe mit der Drehaxe zu halten, so ist $M' = Mp/l$, also $\Delta M'/M' = i_s$. Die Rücksicht hierauf wird bei der experimentellen Feststellung von M' oftmals in willkommener Weise die Bestimmung des Schwerpunktes von M ersetzen.

Bei den mechanisch schreibenden Seismographen mit erheblicher Vergrößerung hat der Schreibarm zunächst auf die resultirende Masse und damit auch auf die äusseren Konstanten einen sehr grossen, leicht zu unterschätzenden Einfluss. Für mein astatiches Pendel ist bei 200-facher Vergrößerung der Bewegungen des Schwerpunktes des 1200 Kilogramm-Gewichtes die resultirende Masse des letzteren, im Schwerpunkt vereinigt gedacht, doch nur

$$\frac{1200}{200 \cdot 200} \text{ Kilogramm} = 30 \text{ Gramm.}$$

Wäre also der den Schreibstift führende Arm auch nur so schwer, dass er am Schreibstift einer Masse von 30 Gramm entspräche, so würde er nach (329) die Indikatorvergrößerung doch schon auf etwa die Hälfte reduciren. Wie man sieht, kommt es selbst bei so grossem Pendelgewicht sehr darauf an, die Massenwirkung des Schreibarmes mit Sorgfalt zu vermindern. —

65. *Bestimmung der Konstanten eines Vertikalseismographen.* Die Indikatorgleichung lautet, wenn von der Reibung abgesehen wird

$$(343) \quad \frac{d^2 a}{dt^2} = -\left(\frac{2\pi}{T_0}\right)^2 a - \frac{2}{\tau} \frac{da}{dt} - V^{(\omega)} \left(\frac{d^2 \xi}{dt^2} - \Delta g_s \right).$$

Ueber die Bestimmung der inneren Konstanten T_0 , $L = g(T_0/2\pi)^2$, τ gilt genau das in Artikel 61 Gesagte.

Eine direkte Methode zur Bestimmung der äusseren Konstante $V^{(\omega)}$, der *Indikatorvergrößerung*, welche der Benutzung der Neigungsempfindlichkeit bei Horizontalseismographen entspräche, giebt es nicht. Eine direkte Methode, welche auf die Bedeutung von $V^{(\omega)}$ als Vergrößerung sehr schneller Vertikalbewegungen Rücksicht nimmt, wird nur selten anwendbar sein, so muss man im allgemeinen seine Zuflucht zu indirekten Methoden nehmen, welche auf die Eigenart der Konstruktion gegründet sind. Was in den Artikeln 62—64 für die Horizontalseismographen gesagt wurde, ist dabei im Wesentlichen auch hier verwertbar.

Besonders empfehlenswerth ist meistens die in Artikel 64 besprochene Methode, welche der Benutzung einer Schwerkraftänderung entspricht. Da es sich hier um eine Schwerkraftvermehrung handelt, können die nothwendigen Züge