

Die Titration der Säure gelang in warmer Alkohol-Lösung unter Zusatz von Phenol-phthalein. Wegen der erwähnten leichten Esterifizierung wurde ein Überschuß von 0.1-n. Lauge zugesetzt und aufgeköcht, danach mit 0.1-n. Säure zurücktitriert.

1. 0.2358 g Säure verbrauchten 6.37 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 370.2. — 0.2519 g Säure verbrauchten 6.78 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 371.5. — 2. 0.3462 g Säure verbrauchten 9.2 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 372.7. — 0.2920 g Säure verbrauchten 8.00 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 365.0. — 3. 0.5512 g Säure verbrauchten 15.12 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 364.6. — 0.3234 g Säure verbrauchten 8.91 ccm 0.1-n. Lauge. Äquiv.-Gew. 363.0.

Mittelwert 367.8; ber. für $C_{24}H_{48}O_2$ 368.4.

Die Bezifferung ist dieselbe wie bei den Acetaten.

Lignocerinsäure.

Aus den Salzen in dem wasser-unlöslichen Teil der Sulfat-Seife wurde durch Kochen mit verd. Salzsäure die freie Säure gewonnen, die sich in jeder Hinsicht genau wie die obenerwähnte, durch Oxydation gewonnene verhielt. Der Schmp. wurde zwar etwas niedriger gefunden: $[77.0^0] - 80.3^0 - 81.0^0$, eine Mischprobe zeigte aber keine Schmelzpunkts-Erniedrigung. Es gelang nicht, durch fraktioniertes Ausfällen mit Li-Acetat Fraktionen mit höherem Schmp. zu erhalten.

0.1715, 0.1514, 0.1402 g Sbst.: 0.4905, 0.4333, 0.4013 g CO_2 , 0.1994, 0.1775, 0.1646 g H_2O .

$C_{24}H_{48}O_2$. Ber. C 78.18, H 13.13. Gef. C 78.00, 78.05, 78.06, H 13.01, 13.12, 13.14.

Titration: 0.4014 g Säure verbrauchten 10.90 ccm 0.1-n. Lauge: Äquiv.-Gew. 368.3. — 0.4865 g Säure verbrauchten 13.09 ccm 0.1-n. Lauge: Äquiv.-Gew. 371.7.

Ber. für $C_{24}H_{48}O_2$ 368.4.

Der Methylester wurde durch Einleiten von wasser-freiem Chlorwasserstoff in die methylalkohol. Lösung der Säure dargestellt. Weiße, weiche Krystalschuppen vom Schmp. $58.0 - 59.8^0$.

347. Ernst Maschmann, Emil Küster und Werner Fischer: Über die Fähigkeit des Tonerde-Präparates B, Diphtherie-Toxin zu adsorbieren.

[Aus d. Georg-Speyer-Haus und dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie,
Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 29. Juli 1931.)

Beim Vergleich des Adsorptionsvermögens der von R. Willstätter und H. Kraut¹⁾ dargestellten Tonerde-Präparate A, B und Cy für Diphtherie-Toxin fanden wir, daß alle Präparate leicht und mit guter Ausbeute das Toxin adsorbieren, wobei die Tonerde B am besten auswählt. Die Adsorption des Diphtherie-Toxins ist von der Anfangs-Konzentration und der Wasserstoff-ionen-Konzentration der Giftlösung abhängig: Die Resultate sind am günstigsten, wenn man aus verdünnter Toxin-

¹⁾ vergl. H. Kraut, Methoden d. Adsorption u. Elution in C. Oppenheimer u. L. Pincussen: Die Methodik der Fermente, Leipzig 1929, S. 445 u. zw. S. 480.

Lösung von schwach saurer Reaktion adsorbiert. K. Linderström-Lang und S. Schmidt²⁾ stellten eine maximale Adsorption in schwach alkalischen Lösungen fest.

Im Laufe der Adsorptionsversuche, die zum Zwecke einer Reinigung des Diphtherie-Toxins unternommen wurden³⁾, beobachteten wir ein starkes Schwanken der Adsorptionsfähigkeit der Tonerde B. Mit fortschreitendem Alter des unter Wasser aufbewahrten Präparates derselben Darstellung nahm das anfangs stark ausgeprägte Adsorptionsvermögen immer mehr ab, so daß schließlich nach ungefähr 2 Monaten die Adsorptionsausbeute unter 42% gesunken war. Dieses auffallende Verhalten konnten wir an 4 verschiedenen, genau nach Vorschrift dargestellten Präparaten feststellen, deren Adsorptionsvermögen anfangs gut und ziemlich gleich war.

Nimmt man mit R. Willstätter an, daß die chemische Konstitution eines Adsorbens für die selektive Adsorption von ausschlaggebender Bedeutung ist, dann kann der rasche Rückgang des Adsorptionsvermögens der Tonerde B für Diphtherie-Toxin nicht allein durch die Änderung der Teilchengröße des Tonerde-Gels bedingt sein, sondern es muß zur befriedigenden Erklärung vor allem eine Umwandlung des Präparates in ein Stoffindividuum von anderer chemischer Konstitution angenommen werden.

Diese Annahme steht in gutem Einklang mit Feststellungen, über die vor kurzem H. Kraut und H. Humme⁴⁾ berichteten. Sie fanden, daß Dialuminiumhydroxyd, das die chemischen Eigenschaften des Tonerde-Präparates B besitzt, beim Aufbewahren unter Wasser seinen Gehalt an chemisch gebundenem Wasser verändert und innerhalb weniger Wochen in Bayerit übergeht. Diese auf chemisch-analytischem und röntgenometrischem Wege festgestellte Umwandlung erklärt nun zwanglos die rasche Abnahme des Adsorptionsvermögens frisch dargestellter Tonerde-Präparate der Sorte B für Diphtherie-Toxin. Da in dem Maße, wie die Alterung des Präparates fortschreitet, der Gehalt an Bayerit nach Kraut und Humme zunimmt, die Adsorptionsfähigkeit aber abnimmt, so liegt die Schlußfolgerung nahe, daß Bayerit im Gegensatz zu Dialuminiumhydroxyd bzw. frisch dargestellter Tonerde B nur ein sehr geringes Adsorptionsvermögen für Diphtherie-Toxin besitzt.

Das Adsorptionsverhalten des Diphtherie-Toxins gegen Tonerde B zeigt erneut, von welcher großen Bedeutung die chemische Konstitution eines Adsorbens für die selektive Adsorption ist.

Beschreibung der Versuche.

1. Ausgangsmaterial und Masse.

Als Ausgangsmaterial für die Adsorptionsversuche benutzten wir das durch Ganzsättigung der Diphtherie-Bouillonkultur⁵⁾ mit Ammoniumsulfat ausgefällte Aggregat: Eiweißstoffe + Diphtherie-Toxin, das auf Tontellern

²⁾ Kolloid-Ztschr. 51, 152 [1930]; auch S. Schmidt u. A. Hansen, Biochem. Ztschr. 228, 263 [1930].

³⁾ Über die Ergebnisse der Reinigungsversuche werden wir in der Ztschr. physiol. Chem. berichten. ⁴⁾ B. 64, 1697 [1931].

⁵⁾ Als Nährlösung wurde Fleischwasser mit 2% Witte-Pepton und 0,5% Kochsalz von einem $p_H = 7.6$ benutzt.

im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet und dann in der Kugelmühle staubfein gepulvert wurde. Das Diphtherie-Toxin läßt sich zusammen mit den Eiweißstoffen der Diphtherie-Bouillon mit Ammoniumsulfat ziemlich quantitativ ausfällen. Im Trockenpräparat liegt das Toxin ungefähr $2\frac{1}{2}$ -mal reiner vor, als in der Ausgangs-Kulturflüssigkeit.

Beispiel: Aus 8660 ccm Bouillon-Toxin mit einem Trockengewichts-Gehalt von 274.2 g (5 ccm gaben 0.1583 g Abdampfrückstand), wurden durch Ganzsättigung mit Ammoniumsulfat 106 g Trockensubstanz gewonnen. Die D. c. l. m. des Ausgangsgiftes war 0.007 ccm; die D. c. l. m. einer Toxinlösung von 10 mg Trockengift in 100 ccm betrug 0.87 ccm. Aus diesen Daten berechnet sich der Toxingehalt von 1 g Trockensubstanz für das Bouillon-Toxin zu 4500 D. l., für 1 g Trockengift zu 11 500 D. l. Daraus ergibt sich eine ungefähr $2\frac{1}{3}$ -fache Anreicherung.

Gewinnt man das Gift mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln, z. B. mit Methyl- oder Äthylalkohol, so sind die Ausbeute, der Reinheitsgrad und die Adsorbierbarkeit des Toxins merklich schlechter.

Die Verwendung von „Trockengift“ bietet verschiedene Vorteile: während im Bouillongift eine fortschreitende Umwandlung von Toxin in Toxoide stattfindet, bleibt das Verhältnis Toxin:Toxoide im Trockengift, soviel wir wissen, konstant. Der Toxoidgehalt des festen Giftes ist gering, wenn man es aus einer ungefähr 6–12-tägigen Diphtherie-Bouillonkultur gewinnt. Aus dem natürlichen Bouillon-Toxin wird das Diphtheriegift schlecht adsorbiert; es liegt also darin in benachteiligter Konzentration vor. Aus Lösungen von Trocken-Toxin wird das Gift leicht und mit guter Ausbeute adsorbiert, da bei der Ausfällung des Giftes Begleitstoffe, die eine Adsorption erschweren, in der Mutterlauge verbleiben. In Trockentoxin-Lösungen befindet sich Diphtherie-Toxin also in bevorzugter Konzentration für die Adsorption.

Wir beschränkten uns darauf, die Giftwirkung der Trockengift-Lösungen und Adsorptionsflüssigkeiten im Tierversuch zu ermitteln. Die Maßeinheit für die Toxinmenge ist die Dosis certe letalis minima, d. h. diejenige kleinste Menge Toxin, die, subcutan injiziert, gerade 100% der Meerschweinchen von 250 g (240–260 g) bis zum 5. Tage tötet. Die D. l. der Trockengift-Lösungen wurde für jedes Gift an mehr als 100 Meerschweinchen ermittelt. In Spalte 2 der nachfolgenden Tabellen ist angegeben, wieviel D. l. in der zur Adsorption benutzten Menge Trockengift vorhanden sind. In Spalte 7 ist angegeben, wieviel D. l. in den Restlösungen nachweisbar sind; diese D. l. der Restlösungen wurden in einer Reihe von je 8–12 Meerschweinchen ermittelt, von denen 2 bzw. 3 Tiere, die die gleiche Dosis (in gleichbleibendem Volumen bei einem p_H von 6–8) injiziert bekommen hatten, bis zum 5. Tage gestorben sein mußten. Als Maß des Adsorptionsvermögens der Tonerde-Präparate übernehmen wir den von R. Willstätter und W. Wassermann⁶⁾ eingeführten Adsorptionswert (A.-W.); dieser gibt in unserem Falle die Anzahl Dosen letales (Spalte 9 der Tabellen) an, die 1 g Tonerde (als Al_2O_3 berechnet) unter den angegebenen Bedingungen aufgenommen hat.

2. Adsorption durch Tonerde A, B und C γ .

Beim Vergleich des Adsorptionsvermögens der Tonerde-Präparate A, B und C γ (Willstätter-Kraut) fanden wir, wie durch die Adsorptionswerte

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 123, 182, u. zw. S. 184 [1922].

in Tabelle 1 belegt wird, daß die Sorte B Diphtherie-Toxin aus Lösungen von Trocken-Toxin am auswählendsten adsorbiert. Die Daten sind Adsorptionsversuchen entnommen, die mit wechselnden Tonerde-Mengen ausgeführt wurden, wobei die Anfangs-Konzentration und die Wasserstoffionen-Konzentration konstant waren.

Tabelle 1.

Angewandt wurden im Volumen 50.0 ccm				Restlösung			Adsorption in %	A.-W.
Trocken- gift mg	mit D. 1.	bei pH	Al ₂ O ₃ mg	Volumen ccm	D. 1.	Anzahl D. 1.		
50	385	6	10.2 Sorte B ⁷⁾	50.0	1.1	45	88	33.400
50	385	6	12.5 „ C ⁸⁾	50.0	0.75	67	83	25.400
50	385	6	14.0 „ A ⁸⁾	50.0	0.6	83	78	21.500

3. Einfluß der Ausgangs-Konzentration und der Acidität auf die Adsorption.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Adsorption des Diphtherie-Toxins an Tonerde aus verdünnter Lösung besser als aus konzentrierter und bei schwach saurer Reaktion günstiger als bei schwach alkalischer.

Tabelle 2.

Angewandt wurden im Volumen 50.0 ccm				Restlösung			Adsorption in %	A.-W.
Trocken- gift mg	mit D. 1.	bei pH	Al ₂ O ₃ mg	Volumen ccm	D. 1.	Anzahl D. 1.		
50	385	6	10.2 Sorte B ¹¹⁾	50.0	>1.7	<29	>92.5	>35.000
50	385	6	10.2 „ B ¹²⁾	50.0	0.9	55	86	32.300
250	1925	6	51.0 „ B ¹³⁾	250.0	0.3	830	57	21.400
500	3850	6	102.0 „ B ¹³⁾	500.0	0.22	2280	41	15.300
50	385	6	10.2 Sorte B ¹¹⁾	50.0	>1.7	<29	>92.5	>35.000
50	385	7	10.2 „ B ¹¹⁾	50.0	0.9	55	86	32.300
50	385	8	10.2 „ B ¹¹⁾	50.0	0.3	167	57	21.400
50	385	6	8.64 Sorte B ¹⁴⁾	50.0	0.45	111	61	31.700
50	385	7	8.64 „ B ¹⁴⁾	50.0	0.22	237	38	17.000

4. Einfluß des Alters der Tonerde B auf die Adsorption.

Die Fähigkeit des frisch bereiteten Tonerde-Präparates B, Diphtherie-Toxin leicht und in guter Ausbeute zu adsorbieren, nimmt beim Aufbewahren unter Wasser nach kurzer Zeit ab. Bei Verwendung dieser Tonerde-Sorte

7) Präparat war 20 Tage alt.

8) Präparat war 6 Wochen alt.

9) Präparat war 6 Wochen alt¹⁰⁾.

¹⁰⁾ Die Tonerde-Sorte A scheint ähnlich dem Präparat B eine Alters-Abnahme ihres Adsorptionsvermögens aufzuweisen; wir haben jedoch noch nicht genügend Beobachtungsmaterial, um bestimmte Aussagen machen zu können.

11) Präparat war 6 Tage alt.

12) Präparat war 17 Tage alt.

13) Präparat war 14 Tage alt.

14) Präparat war 11 Tage alt.

zur Adsorption muß man deshalb nach unseren Erfahrungen (s. Tabelle 3) alle 14 Tage das alte durch ein neu dargestelltes Präparat ersetzen.

Tabelle 3.

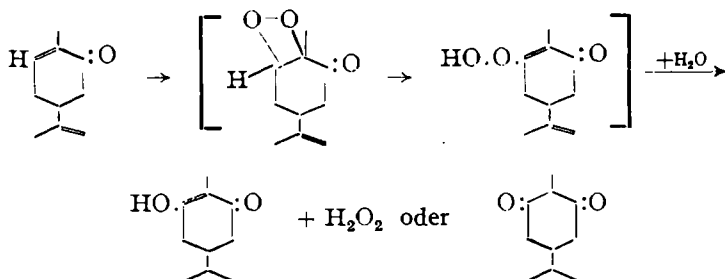
Angewandt wurden 50 mg Trockengift im Volumen 50.0 ccm				Restlösung			Adsorption in %	A.-W.
Alter der Tonerde	mit D. l.	bei pH	Al ₂ O ₃ mg	Volumen ccm	D. l.	Anzahl D. l.		
3	575	6	10.5 Sorte B	50.0	3.0	17	97	53.000
14	575	6	10.5 „ B	50.0	1.7	29	95	51.800
25	575	6	10.5 „ B	50.0	0.6	88	85	46.800
60	575	6	10.5 „ B	50.0	<0.15 ¹⁵⁾	>333	<42	<23.000

Wie Tabelle 3 belegt, sinkt mit fortschreitendem Alter die Adsorptionsausbeute und beträgt nach ungefähr 2 Monaten weniger als 42% des angewandten Toxins.

348. W. Treibs: Zur Autoxydation α,β -ungesättigter Ketone (II.¹⁾ Mitteil.).

(Eingegangen am 3. Juli 1931.)

Für die von ihm aufgefundene Autoxydation des Carvons in Gegenwart von Baryhydrat und etwas Methanol zu einem Diketon C₁₀H₁₄O₂ stellte Harries²⁾ im Sinne der Anschauungen von M. Traube³⁾ folgendes Reaktions-Schema auf: C₁₀H₁₄O + H₂O + O₂ = C₁₀H₁₄O₂ + H₂O₂. Engler und Weißberg⁴⁾ nahmen als Zwischenprodukt ein hypothetisches Moloxyd, entstanden durch Anlagerung molaren Sauerstoffs an die cyclische Doppelbindung des Carvons, an und stellten dessen Übergang in das Diketon durch eine Reihe ebenfalls hypothetischer Formelbilder folgendermaßen dar:



Abgesehen von den unbewiesenen Zwischenstufen war ihre Reaktionsgleichung dieselbe wie die von Harries. Die Ausbeute an Diketon war so

¹⁵⁾ Eine kleinere Dosis wurde nicht geprüft.

¹⁾ vergl. Treibs, Die Autoxydation des Piperitons in alkal. Lösung, B. 63, 2423 [1930].

²⁾ B. 34, 2105 [1901].

³⁾ B. 26, 1476 [1893].

⁴⁾ Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation, S. 192 [1904].