

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft

1936, Nr. 11.

— Abteilung B (Abhandlungen) —

4. November.

436. Georg Hahn und Hans Ostermayer: Über das Bienengift (I. Mitteil.).

[Aus d. Institut für organ. Chemie d. Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 23. September 1936.)

Schon seit dem Altertum ist das Bienengift, vornehmlich allen Imkern, als Heilmittel gegen rheumatische Erkrankungen bekannt gewesen. Obgleich diese Wirkung durch klinische Untersuchungen des öfteren bestätigt wurde, erfreute sich die Bienengift-Therapie¹⁾ keiner besonderen Beliebtheit, solange man genötigt war, die Applikation durch den Bienenstich selbst vorzunehmen. Erst die Möglichkeit, mittels geeignet hergestellter Salbe²⁾ das Gift in die Haut einzureiben und damit die Schmerzhaftigkeit des Stiches zu umgehen, schuf die Grundlage einer allgemeinen, bequemen Anwendbarkeit des Giftes³⁾. Diese Anwendungsart sowohl, als die für spezielle Fälle in Frage kommende Injektion von Bienengift-Lösungen, haben geeignete Gewinnungsmethoden des Giftes zur Voraussetzung. Es sind daher in letzter Zeit eine ganze Reihe von Verfahren ausgearbeitet worden, denen zwar eine in der Natur der Sache begründete Umständlichkeit anhaftet, die aber alle so vervollkommen sind, daß heute fast beliebige Mengen des Giftes in der Reinheit, in der es aus dem Stachelapparat austritt, zur Verfügung stehen. Die Wirkungen des Bienengiftes sind verschiedener Art. Ihre Kenntnis verdankt man insbesondere den Untersuchungen von F. Flury⁴⁾ und J. Langer⁵⁾. Danach können folgende charakteristische Wirkungen unterschieden werden:

1) Gewebsschädigende Wirkung. Sie besteht darin, daß z. B. Bienengift, in den Conjunctivalsack des Kaninchenauges eingeträufelt, Hyperämie der Conjunctiva, Tränenfluß und in hohen Konzentrationen Chemosis erzeugt.

¹⁾ F. Terç, Wien. Med. Presse, Nr. 35 [1888].

²⁾ Dr. med. K. A. Forster, früher Pharmakolog, Institut d. Universität Würzburg.

³⁾ R. Schwab, Münch. Med. Wchschr. Nr. 21, 793 [1934]; Schwab, Ärtzl. Korresp., Heft 11 [1935]; G. Zachariae, Ärtzl. Korresp., Heft 5 [1934]; E. Henssge, Ztschr. ges. Neurolog. Psychiatr. 151, Heft 3, 370; Kleinberg, Medizin. Klinik, Heft 35 [1936].

⁴⁾ F. Flury, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. 85, 319 [1920].

⁵⁾ J. Langer, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. 38, Heft 5/6 [1897]; Arch. Pharmacodynam., Vol. VI [1899].

2) Hämolyse. In vivo und in vitro wirkt Bienengift nach Flury stark hämolytisch. 8 mg/kg, intravenös injiziert, hämolsieren das Blut des Tieres vollständig⁶⁾. Dementsprechend ist das anatomisch pathologische Vergiftungsbild bei intravenöser Injektion ein völlig anderes als bei subcutaner.

3) Neurotoxische Wirkung. Beim Warmblüter ruft Bienengift Lähmungserscheinungen hervor, die von klonischen Krämpfen gefolgt sind. Der Tod erfolgt durch Respirations-Stillstand.

4) Von Essex, Markowitz und Mann⁷⁾ und von Lyssy⁸⁾ sind bei intravenöser Injektion Blutdrucksenkung und Anregung der Peristaltik beschrieben worden, wie man sie sonst bei Histamingaben beobachten kann. Man kann somit auch von einer Histamin-Wirkung des Bienengiftes reden.

Über die chemische Natur des Bienengiftes liegen bisher Angaben nur von Flury und Langer (l. c.) vor. Nach Langer ist die giftige Substanz „eine organische Base, die mit Alkalien, insbesondere mit Ammoniak ausfällt, allgemeine Alkaloid-Reaktionen gibt und unzerstörbar ist bei Einwirkung von trockner und feuchter Hitze (100°). Die mit Säuren und Alkalien angestellten Versuche ließen eine schädigende Beeinflussung des Giftes nicht erkennen.“ Zerstört wird die Wirkung des Giftes dagegen augenblicklich von Bromwasser, Permanganat-Lösung, Kaliumpersulfat, Jodsäure und konz. Salpetersäure. Wasserstoffsuperoxyd und reduzierende Agenzien sind nach Langer ohne Einfluß. Zerstörend wirken ferner Fermente wie Pepsin (in saurer Lösung), wobei interessanterweise auch das Ferment seine Wirkung gegenüber Eiweißsubstanzen einbüßt. Ebenso vernichten Pankreatin, Papain, Labferment und Diastase in Gestalt eines frisch bereiteten Malzauszugs das Bienengift. Unbeeinflußt blieb das Gift dagegen von Bierhefe.

Das als reines, eiweißfreies Bienengift bezeichnete Präparat, hat Langer⁹⁾ in folgender Weise erhalten:

Stachel und Giftblasen von 12000 Bienen wurden in 96-proz. Alkohol gesammelt, der Alkohol abfiltriert, die Stachel getrocknet und zu einem Pulver verrieben. Zur Extraktion wurden 5—10 ccm destilliertes Wasser verwendet, nachdem andere Lösungsmittel wie Glycerin und 0.6-proz. Kochsalzlösung keine Vorteile boten. Das nach 24-stdg. Digestion bei Zimmertemperatur (15°) erhaltene klare, bräunlich gefärbte Filtrat wurde durch Eintropfen in 96-proz. Alkohol gefällt und die Extraktion so lange wiederholt, als noch Fällung mit Alkohol eintrat. Der entstandene Niederschlag wurde schließlich von der überstehenden klaren Lösung durch Dekantieren getrennt, mit absol. Alkohol und zum Schluß mit Äther trocken gewaschen. Dieses Rohgift, über dessen Menge Langer keine Angaben macht, löste er in wenig verd. Essigsäure, versetzte mit Ammoniak und filtrierte die ausfallenden Flocken ab. Filtrat sowohl als auch der Niederschlag zeigten Conjunctival-Reaktion. Der Filtrerrückstand wurde in verd. Essigsäure gelöst und erneut mit Ammoniak gefällt. Dies wurde so lange wiederholt, bis das Filtrat — das mit mehr Ammoniak keine Ausflockung mehr geben soll — keine Biuret-Reaktion mehr zeigt. Die dann vereinigten Filtrate wurden eingeeengt und gaben nunmehr mit Ammoniak eine Fällung, die mit Alkohol und Äther in Trockensubstanz übergeführt, von Langer als „reines, eiweißfreies Bienengift“ bezeichnet wurde.

⁶⁾ C. W. Lacaillade, *Americ. Journ. Physiol.* **105**, 251 [1935].

⁷⁾ H. Essex, J. Markowitz u. F. C. Mann, *Americ. Journ. Physiol.* **94**, 209 [1930].

⁸⁾ R. Lyssy, *Arch. Int. Physiol.* **16**, 272 [1921].

⁹⁾ J. Langer, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* **38**, Heft 5/6 [1897].

Flury (l. c.) hat mit dieser, nach Langer dargestellten Substanz weitergearbeitet und durch Hydrolyse mit siedender 4-proz. Salzsäure zeigen können, daß es sich nicht um eine einheitliche Substanz, bestimmt nicht um eine organische Base vom Typus eines Alkaloids handelt.

Dem Eindampfrückstand des Hydrolysats konnte Flury mit Chloroform einen Lipoid-Anteil entziehen, während er in der verbliebenen Salzmasse mittels der Fichten-span- und einiger anderer Farbreaktionen Tryptophan nachgewiesen zu haben glaubte. Den gelblichen wachsähnlichen Rückstand des Chloroform-Auszugs, das „Fett“, hält Flury für lecithinhaltig. Er beobachtete Dimorphismus der Platinsalze einer mit alkoholischem Sublimat gefällten Substanz, was nach Kauffmann und Vorländer charakteristisch für Cholin ist. Er isolierte eine aus Aceton umkrystallisierbare, bei 63° schmelzende Substanz, die gegen Oxydationsmittel beständig, sich in Alkalien zu schäumenden Lösungen löst, und die er daher als Palmitinsäure ansprach. Der beim Erhitzen des „Fettes“ mit Kaliumbisulfat auftretende Acrolein-Geruch wies auf Glycerin hin, und schließlich konnte Phosphorsäure exakt als Magnesiumammoniumphosphat und mit Molybdänsäure nachgewiesen werden. Mit 90-proz. Alkohol behandelt, blieb von dem „Fett“ ein firnisähnlicher, stickstofffreier Anteil ungelöst, den Flury als gesättigtes Säureanhydrid anspricht, weil es sich in Alkalien nur langsam zu einer ebenfalls schäumenden Lösung auflöste.

Von den Wirkungen des Bienengiftes bleibt nach der Säure-Hydrolyse nach Flury nur die hämolytische Wirkung erhalten, die der stickstofffreien Substanz in Form der freien Säure zukommen soll, während das Anhydrid auch gewebsschädigende, blasenziehende Wirkung besitzt. Diesen stickstofffreien Anteil hält Flury für den eigentlich wirksamen Bestandteil des Bienengiftes und schreibt ihm Saponincharakter¹⁰⁾ zu; er soll mit dem Lecithin eine als Toxolecithid bezeichnete Verbindung bilden.

Wir haben nun unser Augenmerk zunächst auf die Ausarbeitung einer geeigneten Gewinnungsmethode für das Gift gerichtet, weil die von Flury und Langer angegebenen Verfahren ohne Mengenangaben sind. Nach Überwindung gewisser Schwierigkeiten, die u. a. die Verunreinigung des Giftes durch Darminhalts-Stoffe betrafen, verfügten wir über ein Ausgangsmaterial — bestehend aus Stacheln, Giftblasen und daraus ausgetretenem Gift —, für dessen Überlassung in größeren Mengen wir Hrn. Dr. med. K. A. Forster von den Forapin-Werken H. Mack Nachf., Ulm a. D., zu außerordentlichem Dank verpflichtet sind.

Die Extraktion dieses Rohmaterials geschieht, wie im Versuchsteil belegt wird, am besten mit kalter verd. Ameisensäure. Wasser allein entzieht das Gift nur sehr langsam. Heiße verd. Säure verändert dagegen bereits — im Gegensatz zu der Feststellung Langers — das Gift in charakteristischer Weise. Aus 1000 Bienen wurden in 2-maliger Digestion, Eindampfen der Extrakte im Hochvakuum bei höchstens 10—15° und Trocknen über Phosphor-pentoxyd bis zur Gewichtskonstanz 465 mg Rohgift im Durchschnitt erhalten. Die Giftmenge einer Biene beträgt danach 0.4—0.5 mg. Langer ermittelte die Giftmenge einer Biene zu 0.3—0.4 mg. Veranlaßt man eine Biene durch Druck zwischen zwei Fingern zur Giftabgabe, so wiegt das austretende Tröpfchen Gift nur 0.2—0.3 mg. Das Rohgift stellt eine lackartig erstarrte, schwach hygroskopische, durchsichtige Masse dar, schmeckt bitter und hat einen feinen aromatischen Geruch, wie er auch im Bienenstock wahrnehmbar ist. Die Tatsache, daß mit verd. Ameisensäure schon der dritte Auszug völlig giftfrei ist, während Wasser allein noch im zehnten Auszug Gift aufweist,

¹⁰⁾ Die Hemmung der hämolytischen Wirkung des Bienengiftes durch Cholesterin wurde als Stütze für den Saponincharakter angesehen.

deutet auf den basischen Charakter des Giftes. Damit steht im Einklang, daß das aus dem Stachel austretende Tröpfchen natives Giftes sauer reagiert, d. h. eine Ameisensäure-Lösung ($p_H \sim 5$) des Giftes darstellt. Daß auch mit Ammoniak beträchtliche Mengen Gift (175 mg aus 1000 Bienen) kalt herausgelöst werden können, erklärt sich einerseits aus der Wasserlöslichkeit des Giftes, andererseits aus einer Veränderung des Rohgiftes unter Ausscheidung eines schön krystallisierten Phosphorsäure-Derivates, womit offenbar die Freilegung größerer Mengen des Giftes verknüpft ist. Diese, von Langer übersehene Wirkung des Ammoniaks, wird Gegenstand einer weiteren Untersuchung sein, in der geklärt werden soll, ob die Abspaltung des Phosphates aus dem Giftmolekül selbst oder aus einer Begleitsubstanz erfolgt. Die in sehr geringer Menge anfallenden Krystalle dieses Phosphates konnten aus diesem Grunde hinsichtlich ihrer Konstitution noch nicht aufgeklärt werden. Ihre Analyse ergab 25.39% Phosphor bei einem Stickstoffgehalt von 9.66%. Die Kohlenwasserstoff-Werte sind dagegen so gering (C 3.17%, H 3.04%), daß man trotz der schön ausgebildeten, glasklaren Krystalle an Einschlüsse organischer Natur denken muß. Es bleibt bei der Verbrennung außerdem ein beträchtlicher Rückstand, der auf anorganische Bestandteile hinweist. Wie schon erwähnt, ist es nicht gleichgültig, ob man das Rohmaterial mit heißer oder mit kalter verd. Ameisensäure extrahiert. Beim Erhitzen mit verd. Säuren wird nämlich, wie im Versuchsteil näher ausgeführt, die krampferregende Komponente des Bienengiftes beseitigt. Wenn aber die neurotoxische Komponente des Giftes auf so einfache Weise entfernt bzw. zerstört werden kann, so ist daraus zu folgern, daß die vier genannten Wirkungen des Giftes nicht alle von ein und demselben Stoff ausgehen. In diesem Zusammenhange erscheint eine Mitteilung von Carlet¹¹⁾ beachtenswert, wonach der Giftapparat der Hymenopteren immer aus zwei Drüsensystemen bestehen soll, deren eines — die Giftdrüse — ein stark saures, das andere — die Glandula sebacea — ein schwach alkalisches Sekret liefert. Jedes dieser Sekrete soll eine andere Wirkung besitzen, und nur ihr Gemisch rufe das typische Bild des Aculeaten-Stiches hervor.

Da Adsorptionsversuche zu keiner Anreicherung führten, fraktionierte Fällungen zu verlustreich waren, sind wir dazu übergegangen das Rohgift mit Alkohol steigenden Wassergehaltes in Fraktionen zu zerlegen, ein Verfahren, das sich außerordentlich bewährt hat. Es zeigte sich dabei, daß absol. Alkohol eine beträchtliche Menge Gift zu lösen imstande ist, wenn das Rohgift nicht absolut trocken ist. Trocknet man das Rohgift dagegen sorgfältig über Phosphorpentoxyd, dann werden mit absol. Äthanol nur unwirksame Begleitstoffe entfernt. 90- und 80-proz. Alkohol lösen danach nur noch geringfügige Mengen ebenfalls unwirksamer Stoffe heraus. 60-proz. Alkohol nimmt dagegen überraschenderweise fast die Hälfte der Rohgiftmenge auf. Aus der Lösung wird ein viel reineres, hochwirksames Produkt zurückerhalten. 50-, 40- und 30-proz. Alkohol lösen dann nur noch verschwindende Mengen unwirksamer Stoffe. Der Rückstand — etwa ein Drittel der gesamten Menge — ist ebenfalls im Tierversuch unwirksam. Durch Wiederholung dieser Extraktionen mit dem Rückstand des 60-proz. Auszuges, wurde schließlich ein fast farbloses, nicht mehr hygroskopisches Pulver erhalten, das sich im Tierversuch als hochwirksam erwies. Es löst sich

¹¹⁾ Carlet, Compt. rend. Acad. Sciences 98, 1550 [1884].

spielend in Wasser zu klarer, farbloser Lösung, die auch beim Kochen klar bleibt. Mit Ammoniak entsteht die schon beschriebene Fällung unter Ausscheidung des kristallisierten Phosphates. Entgegen der Angabe Langers können aus dem Filtrat dieser Fällung erneut Abscheidungen mit Ammoniak erhalten werden, wenn man die Ammoniak-Konzentration u. U. durch Einleiten von Ammoniakgas entsprechend erhöht. Es handelt sich bei dem ausfallenden Körper um eine wasserlösliche, zweifellos basische Substanz, die von Ammoniak nur unvollständig ausgefällt wird. Es ist noch nicht entschieden, ob hierbei nicht eine Veränderung des wirksamen Moleküls stattthat. Um neben dem Tierversuch chemische Kriterien für den Anreicherungsprozeß zu besitzen, wurden in den einzelnen Produkten Stickstoff, Schwefel und Phosphor bestimmt.

Rohgift	N 11.42	S 1.10	P 1.09
100-proz. Äthanol-Extrakt	„ 10.35	„ 0.53	„ 0.56
60-proz. Äthanol-Extrakt	„ 13.78	„ 1.67	„ 1.17

Aus den Daten geht hervor, daß mit zunehmender Reinheit des Giftes sowohl der Stickstoff- als auch der Schwefel- und Phosphorgehalt angestiegen ist.

Führt man mit dem 60-proz. Alkohol-Extrakt die Ammoniakspaltung (Phosphat-Abscheidung) durch und untersucht den im Ammoniak gelöst gebliebenen Anteil, dann zeigt sich bei nur schwach verringerter pharmakologischer Wirkung ein starkes Absinken des Phosphorgehaltes, während Stickstoff und Schwefel etwa gleich geblieben sind.

60-proz. Äthanol-Extrakt	N 13.78	S 1.67	P 1.17
Ammoniak-Spaltungsprodukt des 60-proz. Extraktes ..	„ 14.20	„ 1.53	„ 0.44

Orientierende Versuche über die Dialysierfähigkeit des Bienengiftes, die wir anstellten, um die Dialyse u. U. für Anreicherungs-zwecke verwenden zu können, zeigten, daß entgegen den Angaben von Flury und Langer Bienengift relativ rasch durch Membranen hindurch geht.

In dem durch die Fraktionierung mit Alkohol-Wasser-Gemischen erhaltenen hochaktiven Pulver liegt zweifellos ein schon sehr reines Bienengift-Präparat vor. Aus der Tatsache, daß trotzdem noch einige Eiweiß-Reaktionen unvermindert stark positiv sind, schließen wir, daß es sich im Bienengift um einen den Eiweißstoffen nahestehenden Körper handelt. Damit steht im Einklang, daß 1) Bienengift von Fermenten proteolytischer Art zerstört, 2) beim Kochen mit verd. organischen Säuren die neurotoxische Komponente entfernt wird und durch Mineralsäure-Hydrolyse alle Wirkungen bis auf die Hämolyse zum Verschwinden gebracht werden können; 3) man weiß aus vielfältigen Beobachtungen aus der Bienenzucht und einigen wissenschaftlichen Untersuchungen, daß es möglich ist, gegen Bienengift immun zu werden. Da bis heute der sichere Nachweis fehlt, daß auch nichteiweißartige Stoffe im Organismus Gegengifte erzeugen können, muß auch hieraus auf die Eiweißnatur des Bienengiftes geschlossen werden.

Es ist uns schließlich eine angenehme Pflicht, Hrn. Direktor Dr. G. Kränzlein, Werk Höchst der I.-G. Farbenindustrie A.-G., für Gewährung eines Stipendiums für den einen von uns (H. Ostermayer) aufs herzlichste zu danken.

Beschreibung der Versuche.

A) Ausgangsmaterial.

Als Ausgangsmaterial stand uns ein aus normal gehaltenen Bienen gewonnenes Rohprodukt zur Verfügung, das aus einem Gemisch von Stacheln, Giftblasen und bereits ausgetretenem Gift bestand. Wir verdanken dieses Material dem lebenswürdigen Entgegenkommen des Hrn. Dr. med. K. A. Forster von den Forapin-Werken H. Mack Nachf., Ulm a. D. Es war dafür Sorge getragen, daß stets nur frisch gewonnenes, unvorbehandeltes Material zur Untersuchung kam.

B) Tierversuche.

Da chemische Reagenzien für den Nachweis des Bienengiftes bis jetzt nicht bekannt sind, bzw. es unsicher ist, ob die von früheren Bearbeitern angegebenen Reaktionen charakteristisch für das Gift sind, haben wir uns der pharmakologischen Wirkung auf weiße Mäuse bedient. Injiziert man Bienengift-Lösungen — 0.05 ccm pro g Maus — subcutan, so treten bei nativen Giftlösungen folgende Symptome auf: Apathie, spastischer Gang, zuerst leichte, dann schwere Krämpfe, die das Tier oft 10—15 cm hoch schleudern. Entweder tritt der Tod hierbei ein, oder aber die Krämpfe nehmen wieder ab, und das Tier verendet bei Seiten- oder Rückenlage an Respirationsstillstand.

Je nach der Konzentration des Giftes sind die Krämpfe stärker oder schwächer und dauern dementsprechend längere oder kürzere Zeit, so daß man Änderungen in der Giftkonzentration sehr gut abschätzen kann. Wir haben für den gleichen Tierversuch möglichst nur Mäuse des gleichen Wurfs benutzt, die unter völlig gleichen Bedingungen in gleichmäßig temperierten Räumen gehalten wurden.

Alle Lösungen wurden vor dem Injizieren auf ein p_H zwischen 6 und 7 eingestellt, wobei mit Ameisensäure und Ammoniak gearbeitet wurde, so daß Ammoniumformiat das einzige eingeführte Fremdsalz ist. Da Ammoniumsalze in höherer Konzentration sehr starke Gifte sind, wurde dafür Sorge getragen, daß die Ammoniumsalz-Konzentration stets unterhalb der wirksamen blieb. Injiziert man z. B. eine 10-proz. Ammoniumchlorid-Lösung (0.05 ccm pro g Maus), dann tritt 2—4 Min. nach der Injektion ein ruckartig einsetzender Streckkrampf auf, der das Tier einen 30—40 cm weiten Sprung auszuführen zwingt, wo es dann in dieser charakteristischen Streckstellung der Hinterläufe tot liegen bleibt. Das von uns im Höchsthalle angewendete $\frac{1}{2}$ -n. Ammoniumformiat dagegen war völlig wirkungslos.

C) Extraktion des Rohmaterials.

Wenn im folgenden von Trockensubstanz gesprochen wird, so ist darunter — sofern nichts anderes bemerkt — ein Eindampfrückstand zu verstehen, der im Hochvakuum-Verdampfer (Leistung: 100 ccm in 1—2 Std.) bei höchstens 10—20° und anschließender Trocknung über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz erhalten wurde.

1) Mit Wasser: Extrahiert man Rohmaterial durch jeweils 20—25 Min. dauerndes Auskochen mit Wasser, dann zeigt sich, daß das Gift nur langsam vollständig in Lösung geht. Die zehnte Wiederholung ergibt immer noch — wenn auch nur schwache — Giftwirkung. Setzt man dem Wasser dagegen

einige Tropfen verd. Ameisensäure zu (Ameisensäure, weil diese schon in geringer Menge im Bienengift vorhanden ist), dann ist bereits der dritte Auszug praktisch giftfrei. Die Extraktion mit kaltem Wasser ergab folgendes: Rohmaterial aus 1000 Bienen wurde 2-mal mit je 90 ccm dest. Wasser 3 Stdn. verschlossen stehengelassen, abgesaugt und mit je 10 ccm nachgewaschen. Die Lösung war milchig trüb. Erhalten 160 mg Trockensubstanz.

Tierversuche: 20 mg pro ccm töten Mäuse in 1 Stde. 30 Min. (Durchschnitt), 40 mg pro ccm töten Mäuse in 40—50 Min. (Durchschnitt).

Daß das Bienengift, sofern es sich nicht einfach um eine wasserlösliche Substanz handelt, amphoterer Charakter hat, beweist der Auszug:

2) Mit verd. Ammoniak: Rohmaterial aus 1000 Bienen wurde 2-mal mit je 40 ccm $\frac{1}{2}$ -n. Ammoniak kalt 3 Stdn. stehengelassen, abgesaugt, nachgewaschen und die Lösung zur Trockne gebracht. Erhalten 175 mg Trockensubstanz.

Tierversuche: 20 mg pro ccm töten Mäuse nach durchschnittlich 3 Stdn.

3) Mit verd. Ameisensäure: Rohmaterial aus 1000 Bienen wurde 2-mal mit je 100 ccm $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure bei gewöhnlicher Temperatur 2 Stdn. stehengelassen, abgesaugt, nachgewaschen und die Lösungen zur Trockne gebracht. Erhalten 1. Auszug: 422 mg, 2. Auszug: 43 mg, zusammen 465 mg; der 3. Auszug (heiß), 28 mg, war völlig giftfrei.

Tierversuche: Die vereinigten ersten beiden Auszüge zeigen folgende Wirksamkeit: 20 mg pro ccm töten Mäuse in durchschnittlich 3 Stdn., 40 mg pro ccm töten Mäuse in durchschnittlich 1 Stde.

Hieraus geht hervor, daß die saure Extraktion allen andern vorzuziehen ist. Sie muß kalt vorgenommen werden, weil, wie später gezeigt werden wird, das Erhitzen mit verd. Säuren das Gift verändert.

Trockensubstanz durch Fälln wäßr. Lösungen.

1) Mit Alkohol nach Flury, l. c.: 1000 mit Alkohol konservierte Stachelapparate wurden mit Wasser erschöpfend extrahiert und die Lösungen mit Alkohol gefällt. Flury erhielt 20 mg Trockensubstanz.

2) Mit Aceton: Da, wie weiter unten gezeigt werden wird, Alkohol aus nicht sorgfältig getrocknetem Material beträchtliche Mengen Gift herauszulösen imstande ist, haben wir als Fällungsmittel Aceton benützt. Rohmaterial aus 1000 Bienen wurde mit je 100 ccm $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure 2-mal heiß extrahiert, die Lösungen auf etwa 12 ccm eingengt und langsam in 200 ccm Aceton eingetragen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Aceton und schließlich mit Äther nachgewaschen. Erhalten 170 mg. Die wäßrige Aceton-Lösung wurde zur Trockne gebracht und der Rückstand im Tierversuch geprüft. Er erwies sich als völlig wirkungslos.

D) Beseitigung der krampferregenden (neurotoxischen) Komponente aus dem Bienengift.

Für die folgenden Versuche wurde — wenn nichts anderes bemerkt — Trockensubstanz benützt, die nach Extraktionsmethode 3) mit verd. Ameisensäure erhalten worden war. Diese Trockensubstanz stellt eine zu gelblichem, aber durchsichtigem Lack erstarrte Masse dar, die folgende Analysenwerte zeigt:

2.537 mg Sbst.: 0.255 ccm N_2 (22.5°, 753 mm). — 14.762 mg Sbst.: 1.190 mg $BaSO_4$.
— 11.238 mg Sbst.: 7.810 mg $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$.

Gef. N 11.42, S 1.10, P 1.09.

Einwirkung von Ammoniak: Betupft man wirksamen Trockenrückstand, gleich nach welcher Extraktionsmethode er gewonnen wurde, mit verd. oder besser konz. Ammoniak, so kann man unterm Mikroskop fast augenblicklich schöne, glasklare Prismen anwachsen sehen. Sie lösen sich z. Tl. in Wasser, spielend aber in verd. Säuren und kommen auf Zusatz von Ammoniak wieder heraus.

Um diese Krystalle zu isolieren, verfährt man am besten folgendermaßen: Der Trockenrückstand wird unter Zusatz weniger Tropfen Ameisensäure klar gelöst, stark verdünnt und dann in der Hitze mit Ammoniak deutlich ammoniakalisch gemacht. Es tritt hierbei sofort eine dicke, flockige Fällung ein, an der viel Bienengift adsorbiert bleibt, während ein Teil sich in der Lösung befindet. Man läßt jetzt 24 Stdn. ruhig stehen, wonach sich am Boden des Gefäßes die krystalline Substanz in derben Aggregaten, umgeben von viel flockigem Eiweiß, abgesetzt hat. Die spezifisch viel leichteren Flocken lassen sich nun unter Verwendung von 1-n. Ammoniak, worin die Krystalle sehr schwer löslich sind, leicht abschlämmen, wobei die Krystalle schon in sehr reiner Form übrig bleiben. Durch 2-3-mal wiederholtes Umfällen aus verd. Ameisensäure mit Ammoniak lassen sie sich analysenrein gewinnen. Etwa noch anhaftendes Eiweiß bleibt beim Auflösen in verd. Ameisensäure ungelöst, wenn man nicht länger wartet als eben zur Lösung der Krystalle erforderlich ist. Man erhält aus 1000 Bienen etwa 5—10 mg. Sie sind sehr schwer löslich in verd. Ammoniak, leichter in Wasser, spielend in verd. Säuren. Alkali oder Soda fällt sie aus den verd. Säuren nicht wieder aus, sondern nur Ammoniak. Sie enthalten viel Phosphorsäure und nur wenig Kohlenstoff.

Tierversuch: Maus, Gewicht: 15.5 g; 0.75 ccm (3 mg in ccm) Lösung subc. Das Tier blieb völlig frisch, zeigte nur sehr starke grüne Harnabscheidung.

Zur Analyse wurden mit Wasser gewaschene und über Phosphorpentoxyd bis zur Konstanz getrocknete Krystalle verwendet.

6.689 mg Sbst.: 2.980 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 3.709 mg Sbst.: 56.935 mg $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$. — 3.104 mg Sbst.: 1.362 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 1.742 mg Sbst.: 0.147 ccm N_2 (21°, 749 mm). — 4.872 mg Sbst.: 2.036 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 2.836 mg Sbst.: 0.330 mg CO_2 , 0.770 mg H_2O , 2.227 mg Rckstd.

Gef. P 25.39, N 9.66, C 3.17, H 3.04.

Ammoniakspaltung des Aceton-Trockenrückstandes der Extraktion mit heißer Ameisensäure.

280 mg Trockensubstanz entsprechend 2240 Bienen, gewonnen nach der beschriebenen Acetonfällungs-Methode, wurden im Zentrifugierröhrchen 3 Stdn. mit 10 ccm 1-n. Ammoniak unter öfterem Umrühren mit dem Glasstab verkorkt stehengelassen. Das anfänglich klebrig zusammengeballte Produkt war in dieser Zeit in einen feinen, dunkelgrauen Niederschlag übergegangen, in dem die Krystalle des Phosphates zu erkennen waren. Es wurde scharf abzentrifugiert und die klare Lösung durch ein Filter abgossen. Erhalten wurden 12 ccm, die 7.3 ccm 1-n. Ameisensäure benötigten, um auf pH 6 gebracht zu werden. Es wurden also etwa 2.7 ccm Ammoniak verbraucht.

Daß Ammoniak bei der Abspaltung des krystallinen Phosphates verbraucht wird, geht auch daraus hervor, daß bei Ansätzen mit zu wenig Ammoniak die anfänglich deutlich alkalische Lösung nach einigen Stunden wieder lackmussauer reagierte.

Tierversuche mit der klaren Lösung: 19.3 ccm, pH 6.]

Maus 1, Gewicht 19.5 g, 0.97 ccm subc. injiz. Wirkung: Tier sitzt auffallend ruhig mit gespreizten Gliedern am selben Fleck. Im Gegensatz zu nativem Bienengift treten keinerlei Krampferscheinungen ein, das Tier verendet nach 2 Stdn. 54 Min. an Herzstörungen und Respirations-Stillstand.

Maus 2, Gewicht 19.5 g, 0.97 ccm subc. injiz. Wirkung: Erscheinungen wie bei 1. Exitus nach 2 Stdn. 15 Min.

Maus 3, Gewicht 20.0 g, 1.0 ccm subc. injiz. Wirkung: Erscheinungen wie bei 1 und 2. Exitus nach 2 Stdn. 42 Min.

Der Zentrifugier-Rückstand der ersten Extraktion wurde mit 5 ccm 1-n. Ammoniak nachgewaschen, das Waschwasser aber verworfen und darauf erneut mit 10 ccm 1-n. Ammoniak — nun aber 16 Stdn. — verkorkt unter öfterem Umrühren stehengelassen. Wieder scharf abzentrifugiert und durch ein Filter abgossen. Nunmehr wurden zum Ansäuern auf pH 6 etwa die gleiche Anzahl ccm 1-n. Ameisensäure benötigt. Die Spaltung unter Ammoniak-Verbrauch scheint somit schon bei der ersten Behandlung zu Ende gegangen zu sein.

Tierversuch mit 3 Mäusen des gleichen Wurfes, der zur ersten Extraktprüfung gedient hatte, ergab völlige Wirkungslosigkeit des zweiten Extraktes.

Der Rückstand der zweiten Ammoniak-Extraktion wurde daraufhin durch wiederholtes Behandeln mit Aceton in Trockensubstanz verwandelt. Erhalten: 170 mg. 110 mg waren somit — offenbar in den ersten — Ammoniak-Auszug gegangen. 41 mg dieses neuen Trockenrückstandes wurden in 3 ccm 1-n. Ameisensäure kalt gelöst und mit etwas weniger als der gleichen Menge 1-n. Ammoniak auf pH 5.5 abgestumpft. Hierbei trat eine dicke, flockige Fällung ein, von der filtriert wurde. Die klare, gelbliche Lösung wurde zum Tierversuch verwendet.

Maus 1, Gewicht 20.5 g, 1.0 ccm subc. injiz. Zeit: 10 Uhr. Wirkung: 10 Uhr 10 Min. kurze, sich in Sprüngen äußernde Krampferscheinungen, 10 Uhr 13 Min. Seitenlage und nur ab und zu krampfartiges Zucken. Sehr schmerzempfindlich bei Berührung, wodurch häufig ein Strecken der hinteren Extremitäten ausgelöst wurde wie bei NH_4 -Vergiftung. 11 Uhr 35 Min. empfindungslos. Heftiges, stoßweises Atmen. Exitus 11 Uhr 50 Min., also nach 1 Stde. 50 Min.

Maus 2, Gewicht 16.5 g, 0.82 ccm subc. injiz. Zeit: 10 Uhr 6 Min. Wirkung: wie bei 1. Exitus 1 Uhr 30 Min., also nach 3 Stdn. 24 Min.

Maus 3, Gewicht 16.5 g, 0.82 ccm subc. injiz. Zeit: 10 Uhr 16 Min. Wirkung: wie bei 1 und 2, aber schon 10 Uhr 30 Min. Exitus.

Man sieht also auch hier die Wirkung des nativen Giftes dahin abgeändert, daß die krampferregende Wirkung nur noch ganz schwach ist.

Wegen der Wichtigkeit dieses Befundes wurden diese Ammoniakspaltungen mit zwei weiteren zu anderen Zeiten gesammelten Rohgiftmengen durchgeführt und die Ammoniak-Extrakte etwa 20 Mäusen eingespritzt. Kein einziges Tier bekam Krämpfe, alle gingen in der schon geschilderten Weise ein.

Es muß also eine krampferregende Komponente des Bienengiftes beseitigt worden sein. Um zu entscheiden, ob die Abspaltung des Phosphates damit zusammenhängt, oder ob eine der vorherigen Operationen diese Trennung bewirkt hat, wurde zunächst einmal der Einfluß des Erhitzens ausgeschaltet und die Ammoniakspaltung mit Trockensubstanz durchgeführt, die nach der Methode 3 mit kalter verd. Ameisensäure, sowohl durch direktes Eindampfen als auch durch Fällen mit Aceton, erhalten worden war.

Ammoniakspaltung des Aceton-Trockenrückstandes der Extraktion mit kalter Ameisensäure.

589 mg Trockenrückstand, erhalten durch Eingießen der konz. ameisen-sauren Extrakte in Aceton, wurden 2-mal mit je 15 ccm 1-n. Ammoniak 3 Stdn. unter öfterem Umrühren verkorkt stehengelassen. Danach abzentrifugiert und die klare Lösung im Hochvakuum zur Trockne gebracht.

Tierversuche: Maus 1, Gewicht 17.0 g, 0.85 ccm (Konz.: 5 mg/ccm). Exitus nach 2 Stdn. 38 Min. unter schweren Krampferscheinungen.

Maus 2, Gewicht 17.0 g, 0.85 ccm (Konz.: 5 mg/ccm). Exitus nach 3 Stdn. 23 Min. unter schweren Krämpfen.

Maus 3, Gewicht 11.0 g, 0.55 ccm (Konz.: 5 mg/ccm). Exitus nach 1 Stde. 8 Min. nach schweren Krämpfen.

Also alle drei unter den Erscheinungen, die natives Bienengift auch hervorruft.

500 mg der nach der Methode 3), der Extraktion mit kalter Ameisensäure erhaltenen Trockensubstanz wurden, wie beschrieben, mit Ammoniak behandelt und die Lösung zur Trockne gebracht. Erhalten 360 mg.

Tierversuche: Maus 1, Gewicht 19.0 g, 0.95 ccm (Konz.: 1 mg/ccm). Exitus nach 2 Stdn. 40 Min. unter schweren Krämpfen.

Maus 2, Gewicht 20.0 g, 1.00 ccm (Konz.: 3 mg/ccm). Exitus nach 2 Stdn. 7 Min. nach schweren Krämpfen.

Um der Möglichkeit zu begegnen, daß hier die Abtrennung der krampferregenden Komponente aus irgendeinem Grunde nicht vollständig war, wurde die Ammoniakbehandlung mit dem ersten Ammoniak-Extrakt wiederholt.

350 mg des zuerst erhaltenen Ammoniak-Extraktes wurden erneut mit 12 ccm 1-n. Ammoniak versetzt, aber jetzt 12 Stdn. stehengelassen, dann aufgearbeitet wie sonst. 283.0 mg gingen in Lösung, 57.2 mg blieben im Rückstand.

Tierversuche: Maus 1, Gewicht 15.5 g, 0.78 ccm (Konz.: 5 mg/ccm). 35 Min. nach der Spritze heftige Krämpfe, an denen das Tier zugrunde ging.

Maus 2, Gewicht 13.5 g, 0.68 ccm (Konz.: 10 mg/ccm). Exitus nach 2 Stdn. 40 Min. unter heftigen Krämpfen.

Diese Versuche beweisen, daß die Abspaltung des Phosphates mit der Beseitigung der krampferregenden Komponente nichts zu tun hat, sondern daß diese durch das Erhitzen mit verd. Ameisensäure beseitigt — sehr wahrscheinlich — zerstört wird. Würde sie nur abgetrennt, dann müßte sie sich an irgendeiner Stelle in entsprechend höherer Konzentration wiederfinden lassen, was aber nicht der Fall war.

E) Anreicherungsversuche durch fraktionierte Extraktion des Rohgiftes mit wäßr. Alkohol.

Aus Rohmaterial von 8000 Bienen wurden nach der Extraktionsmethode 3) mit kalter verd. Ameisensäure 3.2472 g Trockensubstanz erhalten. Das über

Phosphorpentoxyd sorgfältig wasserfrei¹²⁾ gemachte Produkt wurde der Reihe nach mit absol. 90-, 80-, 60-proz. usw. Alkohol erschöpfend kalt ausgezogen und die erhaltenen Auszüge jedesmal im Hochvakuum zur Trockne gebracht. Es wurden erhalten:

100-proz. Alkohol	0.4990 g Trockensubstanz
90-proz. Alkohol	kein nennenswerter Rückstand
80-proz. Alkohol	kein nennenswerter Rückstand
60-proz. Alkohol	1.270 g Trockensubstanz.

Um von koagulierte Eiweiß eingeschlossenes Gift frei zu legen, wurde der hier verbliebene Rückstand, 1.4782 g, in kalter verd. Ameisensäure gelöst und vom Unlöslichen filtriert. Ungelöst blieben hierbei 1.1182 g, die beim Betupfen mit Ammoniak keine Phosphatkrystalle mehr abschieden und sich auch im Tierversuch als unwirksam erwiesen.

Aus der Lösung wurden 0.360 g Trockensubstanz erhalten, die erneut mit 60-proz. Alkohol 3 Stdn. kalt digeriert wurden. Es gingen hierbei 0.164 g in Lösung, während wieder 0.196 g im Tierversuch unwirksamer Ballaststoffe ausgeschieden werden konnten. Die 0.164 g gaben starke Phosphat-Abscheidung und wurden dem schon erhaltenen 60-proz. Extrakt zugefügt, dessen Menge damit 1.434 g betrug. Er erwies sich im Tierversuch als sehr wirksam. Demgegenüber waren die mit absol. Alkohol erhaltenen 0.4990 g im Tierversuch unwirksam und gaben auch keine Phosphat-Abspaltung beim Behandeln mit Ammoniak. Da durch das Auflösen und Wiedereindampfen auch bei dem 60-proz. Extrakt ein neuer Verteilungszustand hervorgerufen war, wurde bei diesem die Extraktion mit absol. Alkohol noch einmal durchgeführt

¹²⁾ Ist die Substanz noch feucht, dann gehen beträchtliche Mengen Gift in den absol. Alkohol. Aus dem gleichen Grunde können aus frischen Stachelapparaten mit absol. Alkohol sehr große Mengen Gift herausgelöst werden.

Versuch: 1118 mg Trockensubstanz, nach Methode 3) gewonnen, aber nicht bis zur Gewichtskonstanz über P_2O_5 getrocknet, dann mit Alkohol abnehmender Konzentration ausgezogen, ergaben:

100-proz. Alkohol	0.451 g Trockensubstanz
90-proz. Alkohol	0.059 g Trockensubstanz
80-proz. Alkohol	kein nennenswerter Rückstand
60-proz. Alkohol	0.206 g Trockensubstanz
50-proz. Alkohol	0.057 g Trockensubstanz
40-proz. Alkohol	0.028 g Trockensubstanz
30-proz. Alkohol nach 3 Stdn. ... 0.0095 g	} 0.013 g Trockensubstanz
30-proz. Alkohol nach 45 Stdn. ... 0.0035 g	
Wasser	0.021 g Trockensubstanz
Rest	0.283 g Trockensubstanz
Zusammen	1.118 g Trockensubstanz

Von dem hier erhaltenen Rückstand der Extraktion mit absol. Alkohol töten:

10 mg/ccm	in etwa 10 Stdn.	} Symptome wie bei nativem Gift.
20 mg/ccm	in etwa $6\frac{1}{2}$ Stdn.	
30 mg/ccm	in etwa $2\frac{1}{2}$ Stdn.	

Bei allen Operationen mit feuchtem Alkohol gehen also beträchtliche Mengen Gift verloren.

mit dem Erfolg, daß noch einmal 0.110 g unwirksame Ballaststoffe in den Alkohol gingen. Die Gesamtbilanz ist danach folgende:

Unwirksamer Ballaststoff	1.9232 g
Wirksamer 60-proz. Äthanol-Extrakt	1.2340 g
Zusammen 3.2472 g Rohgift	

Der Wirkungsunterschied gegenüber dem Rohgift ist grob ermittelt folgender:

Rohgift	Konz.: 20 mg/ccm	tötet in durchschnittlich 3 Stdn.
Rohgift	Konz.: 40 mg/ccm	tötet in durchschnittlich 1 Stde.
60-proz. Äthanol-Extrakt	Konz.: 1 mg/ccm	wird häufig noch überlebt.
60-proz. Äthanol-Extrakt	Konz.: 2 mg/ccm	tötete in allen 4 Fällen in 20—24 Stdn.
60-proz. Äthanol-Extrakt	Konz.: 10 mg/ccm	tötete in allen 4 Fällen in 1 Stde.

Untersuchung des Extraktes mit 60-proz. Äthanol.

Das bis zu diesem Grade angereicherte Bienengift stellt ein feinkörniges, fast farbloses Pulver dar, das nicht hygroskopisch ist. Wasser löst in der Kälte spielend zu einer klaren, farblosen Lösung, die auch in der Hitze klar bleibt. Aus einer wäßr. Lösung der Konzentration 30 mg/ccm fällt Aceton anscheinend alles wieder aus. Setzt man Ammoniak zur wäßr. Lösung zu, dann scheiden sich augenblicklich farblose Flocken aus, die von den schon erwähnten Phosphatkrystallen durchsetzt sind. Filtriert man ab und verstärkt die Ammoniakkonzentration, etwa durch Einleiten von Ammoniakgas, so werden immer neue Mengen farbloser Flocken abgeschieden. Diese Flocken sind mit Wasser allein nur schwer, mit verd. Säuren dagegen leicht wieder in Lösung zu bringen.

Eiweiß-Reaktionen:

Fällen mit Ammoniumsulfat	+	Alkoholfällung (95-proz. Lösung)	+
Unterschichten mit konz. Salpetersäure	—	Biuret-Reaktion	+
Kochprobe	—	Xanthoprotein-Reaktion	+
Kochen mit Natriumsulfat u. Essigsäure	—		

Analyse: 3.154 mg Sbst.: 0.148 g Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 3.006 mg Sbst.: 0.370 ccm N_2 (28°, 750 mm). — 12.316 mg Sbst.: 0.603 g Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm; über P_2O_5); 11.713 mg Sbst.: 1.430 mg $BaSO_4$. — 14.473 mg Sbst.: 1.044 g Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 13.429 mg Sbst.: 10.775 mg $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$.

Ameisensäure-Extrakt. Gef. N 11.42, S 1.10, P 1.09.

Extrakt mit 100-proz. Äthanol. Gef. N 10.35, S 0.53, P 0.56.

Extrakt mit 60-proz. Äthanol. Gef. N 13.78, S 1.67, P 1.17.

Analyse des Extraktes mit 100-proz. Äthanol: 3.160 mg Sbst.: 0.340 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 2.820 mg Sbst.: 0.265 ccm N_2 (27.5°, 750 mm). — 13.011 mg Sbst.: 0.962 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 12.049 mg Sbst.: 0.465 mg $BaSO_4$. — 16.770 mg Sbst.: 1.484 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 15.286 mg Sbst.: 5.875 mg $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$.

Ammoniakspaltung des Extraktes mit 60-proz. Äthanol.

350 mg des Extraktes wurden in 6 ccm Wasser gelöst, die klare Lösung mit 6 ccm konz. Ammoniak versetzt und 12 Stdn. verkorkt stehengelassen. Danach wurde zentrifugiert, der etwas schleimige Rückstand mit Ammoniakwasser nachgewaschen und anschließend mit Aceton in die Trockensubstanz übergeführt. Erhalten 57.2 mg; sie erwiesen sich im Tierversuch als wirkungslos. Die Lösung wurde zur Trockne gebracht: 283.6 mg.

Fünf zum Tierversuch verwendete Mäuse gingen auch hier wieder unter Symptomen wie beim nativen Bienengift, also unter starken Krämpfen, ein. Es scheint nicht, daß die Wirkungsstärke des Bienengiftes durch die Behandlung mit Ammoniak gelitten hat. Das mit Ammoniak in Lösung gegangene Produkt zeigte folgende Werte:

3.362 mg Sbst.: 0.376 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 3.086 mg Sbst.: 0.393 ccm N_2 (27°, 745 mm). — 12.839 mg Sbst.: 0.910 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 11.929 mg Sbst.: 1.365 mg $BaSO_4$. — 10.492 mg Sbst.: 0.579 mg Gew.-Verl. (30°, 0.1 mm, über P_2O_5); 9.913 mg Sbst.: 2.990 mg $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$.

Ammoniak-Spaltungsprodukt. Gef. N 14.20, S 1.53, P 0.44.

Extrakt mit 60-proz. Äthanol. Gef. N 13.78, S 1.67, P 1.17.

In dem Ammoniak-Spaltungsprodukt ist zwar unter dem Mikroskop nichts mehr von dem krystallinen Phosphat zu erkennen, da dieses aber in Ammoniakwasser nicht ganz unlöslich ist, glauben wir vorerst den geringen Phosphorgehalt auf noch in Lösung gebliebenes Phosphat zurückführen zu können, d. h. die Bienengift-Konzentration geht unter Umständen nicht parallel mit dem Phosphorgehalt. Dagegen bleibt der Schwefelgehalt unverändert.

Orientierende Dialysierversuche.

Rohgift: 50 mg nach Extraktionsmethode 3) mit kalter Ameisensäure gewonnener Trockensubstanz wurden in 1.5 ccm Wasser gelöst und gegen 250 ccm Wasser 65 Stdn. bei Zimmertemp. dialysiert (Hülse von Schleicher und Schüll). Danach war das Dialysierwasser trübe, das anfänglich gelbe Dialysat nunmehr farblos und zeigte flockige Ausscheidungen. Der Tierversuch mit dem Dialysat (Flocken wurden mitgespritzt) ergab völlige Wirkungslosigkeit. Das Dialysierwasser wurde im Hochvakuum zur Trockne gebracht: 33.4 mg. Eine Konzentration von 16 mg/ccm tötete in 24 Stdn. unter den Symptomen des Ausgangsmaterials.

Extrakt mit 60-proz. Äthanol: 30 mg in 3 ccm Wasser gelöst und gegen 300 ccm Wasser 65 Stdn. dialysiert. Danach war das Dialysierwasser schwach milchig getrübt, und das Dialysat zeigte flockige Ausscheidung. Das Dialysat tötete die Maus nach 4 Stdn. 10 Min. fast ohne Krämpfe. Dialysierwasser zur Trockne gebracht: 11.5 mg. Die Maus wurde von einer Konzentration von 10 mg/ccm in 1 Stde. 13 Min. unter den Symptomen des Ausgangsmaterials getötet.

Ammoniak-Spaltungsprodukt: 30 mg des Extrakts mit 60-proz. Äthanol wurden mit 2 ccm 1-n. Ammoniak 12 Stdn. stehen gelassen, dann abzentrifugiert, durch ein Filter gegossen und mit Ameisensäure auf p_H 6 gebracht. Die nunmehr 3 ccm betragende Lösung wurde gegen 300 ccm Wasser 65 Stdn. dialysiert. Das Dialysat war wasserklar; die damit gespritzten Mäuse blieben frisch und munter. Das Dialysierwasser wurde im Hochvakuum zur Trockne gebracht: 20.6 mg. Bei einer Konz. von 13 mg/ccm ging die Maus unter heftigen Krämpfen nach etwa 24 Stdn. ein.

Aus allen drei Versuchen geht — im Gegensatz zu den Angaben von Langer und Flury — hervor, daß das Gift durch die Hülsen von Schleicher und Schüll dialysabel ist.