

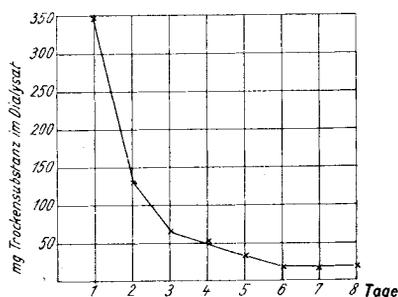
**125. Georg Hahn und Heinrich Leditschke: Über das Bienengift, III. Mittel.: Zerlegung des Giftes in zwei Komponenten.**

[Aus d. Institut für organ. Chemie d. Universität Frankfurt a. M.]  
(Eingegangen am 27. Februar 1937.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> über diesen Gegenstand wurde anlässlich der Ermittlung der geeignetsten Gewinnungsmethode des Giftes die Beobachtung gemacht, daß durch Erhitzen saurer Giftlösungen die krampferregende Komponente zerstört wird. Wir folgerten daraus, daß die dort angeführten vier Wirkungen des Bienengiftes nicht alle von ein und demselben Stoff ausgehen könnten. In dieser Auffassung bestärkte uns einerseits die Tatsache, daß der Giftapparat der Hymenopteren nach Carlett<sup>2)</sup> aus zwei Drüsen-systemen besteht, von denen das eine ein stark saures, das andere ein alkalisches Sekret absondern soll. Jedes dieser Sekrete habe eine besondere Wirkung, und erst ihr Gemisch solle die charakteristischen Erscheinungen des Aculeatenstiches hervorrufen. Andererseits zeigten unsere orientierenden Dialyserversuche mit dem, durch fraktionierte Extraktion mit wäßrigem Alkohol erhaltenen, angereicherten Giftpräparat, daß die krampferregende Komponente offenbar schneller durch die Membran hindurchgeht als der andere Giftbestandteil, der die Tiere unter ganz anderen, charakteristischen Symptomen tötet. Es lag daher nahe, das mit 60-proz. Alkohol erhaltene, reinere Gift fraktioniert zu dialysieren. Wir verfahren dabei so, daß wir eine gewogene Menge des gereinigten Gesamtgiftes, bei  $p_H = 4$  (ameisensäuer) jeweils 24 Stdn. gegen je 100 ccm destilliertes Wasser dialysierten. Wir benutzten dazu eine Dialysierhülse von Schleicher und Schüll.

Vergleicht man die Mengen Substanz, die während der Dialyse in je 24 Stdn. herausdialysieren mit der Menge des angewandten Ausgangsmaterials, so weist der Gang, den die graphische Darstellung des Dialysenverlaufes besonders deutlich wiedergibt, darauf hin, daß hier eine dialysable Komponente aus dem Gesamtgift abgetrennt wird. Wie die zwar geringfügige, aber doch deutlich merkbare Verminderung der Dialysesgeschwindigkeit bei Fraktion 6 und 7 zeigt, besteht eine  $p_H$ -Abhängigkeit derart, daß in stärker saurem Gebiet die Substanz schneller durch die Membran geht. Wie die Dialyse im alkalischen  $p_H$ -Bereich verläuft, wird noch untersucht.

Schon nach der vierten Fraktionierung wurden sowohl die Fraktionen als auch der Dialysier-Rückstand im Tierversuch geprüft. Es zeigte sich, daß die dialysable Substanz die krampferregende Komponente darstellt, während im Dialysier-Rückstand diejenige verbleibt,



Fraktionierte Dialyse von 1.730 g Extrakt mit 60-proz. Alkohol, gelöst in 5 ccm Wasser bei 20°,  $p_H = 4$ , gegen je 100 ccm dest. Wasser.

<sup>1)</sup> I. Mittel., Gg. Hahn u. H. Ostermayer, B. **69**, 2407 [1936]; II. Mittel., Hahn u. Leditschke, B. **69**, 2764 [1936].

<sup>2)</sup> Carlet, Compt. rend. Acad. Sciences **98**, 1550 [1884].

die den Tod der Tiere ohne jede Krampferscheinung, in der früher schon geschilderten, charakteristischen Weise herbeiführt, d. h. die Tiere sitzen nach der Injektion ruhig am selben Platz oder suchen sich, wenn möglich in langsamen Bewegungen, zu verkriechen. Unter heftiger Atemnot gehen die Tiere oft in normaler Sitzstellung ein. Krämpfe treten auch nicht beim Reizen auf.

Nach der vierten Fraktionierung müssen — wie aus dem weiteren Verlauf der Dialyse hervorgeht — mindestens noch 10% Krampfgift im Dialysier-Rückstand vorhanden gewesen sein; d. h., in je 10 mg injiziertem Dialysier-Rückstand befindet sich noch 1 mg Krampfgift. Daß die Tiere trotzdem schon an diesem Punkt der Trennung keine Krämpfe mehr bekamen liegt — wie wir ermittelt haben — daran, daß die Krämpfe bei 1 mg verabreichtem Krampfgift erst in einer Zeit auftreten können, in der die hohe Konzentration der anderen Komponente das Tier bereits getötet hat.

Aus dem Kurvenverlauf kann — im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Tierversuche — geschlossen werden, daß sich nach der 8. Fraktionierung nur noch verschwindende Mengen des Krampfgiftes im Dialysier-Rückstand befinden, daß also die Abtrennung dieser Komponente auf diesem Wege praktisch möglich sein muß. Während die Fraktionen 1 und 2 neben dem — offenbar für die pharmakologische Wirkung unwesentlichen  $MgPO_4$  auch noch andere Begleitstoffe zu enthalten scheinen, stellen die Substanzen von Fraktion 3 ab fast farblose Lacke dar, die sich zu nicht hygroskopischen Pulvern verreiben lassen. Wie aus den bisher vorliegenden Analysendaten hervorgeht, nähern sich diese konstanten Verhältniszahlen, die, sofern sie wiederholtes, fraktioniertes Dialysieren überstehen, als Kriterium der Einheitlichkeit der neurotoxischen Komponente angesehen werden können. Hierüber werden wir demnächst berichten. Auch für die mögliche Reindarstellung des nicht dialysablen Anteiles haben wir Anhaltspunkte gewonnen, indessen dürften die Verhältnisse hier wesentlich komplizierter liegen.

Wie schon in der ersten Mitteilung (S. 2416) aus den dort durchgeführten Untersuchungen hervorgeht, mußte die neurotoxische Komponente durch Erhitzen beseitigt bzw. zerstört worden sein, während die andere Giftkomponente erhalten blieb. Nachdem uns nunmehr die Abtrennung der neurotoxischen Komponente gelungen war, haben wir sie erneut auf ihre Hitzebeständigkeit gegen Säuren und Alkalien geprüft. Es ergab sich, daß die krampferregende Komponente, schon bei  $pH = 4$  (ameisensäuer) 2 Stdn. im Wasserbade auf  $90-100^\circ$  erhitzt, ihre Wirkung völlig einbüßt. Ebenso wird die Wirkung bei 2-stdg. Erhitzen mit Alkali — wir stellten ein  $pH = 12.6$  ein — auf  $90-100^\circ$  völlig vernichtet. Alle Tiere blieben, mit vor dem Erhitzen absolut tödlichen Dosen, frisch und munter. Hieraus geht gleichzeitig hervor, daß nicht etwa auch von der anderen Komponente Anteile durch die Membran gegangen sein können. Führt man nämlich den gleichen Erhitzungsversuch ( $pH = 4$ , ameisensäuer) mit dem Dialysier-Rückstand durch, so ist eine Abnahme der Giftigkeit nicht festzustellen. Die nicht dialysable Komponente ist somit unter den genannten Bedingungen hitzebeständig.

Versetzt man wäßrige Lösungen der krampferregenden Komponente mit wäßriger Pikrinsäure-Lösung, so entsteht, ebenso wie mit der Lösung des Dialysier-Rückstandes, eine starke flockige Fällung eines Pikrates. Inwieweit

sich die beiden Komponenten hinsichtlich der vier in der ersten Mitteilung angeführten Wirkungen voneinander unterscheiden, wird zurzeit geprüft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für gewährte Unterstützung, der Fa. H. Mack Nachf., Ulm a. D., für Ausführung von Tierversuchen dankbar.

**Beschreibung der Versuche.**

Fraktionierte Dialyse des Extraktes mit 60-proz. Alkohol.

Nach der in der ersten Mitteilung beschriebenen Methode wurden 1.730 g in 60-proz. Alkohol lösliches, von unwirksamen Ballaststoffen weitgehend befreites Bienengift dargestellt. Wie schon früher beschrieben, stellt dieses Präparat ein nicht hygroskopisches Pulver dar, das sich in Wasser spielend und klar löst. Die 1.730 g wurden in 5 ccm destilliertem Wasser kalt in Lösung gebracht, mit einigen Tropfen 1-n. Ameisensäure auf  $pH = 4$  gebracht und durch eine Dialysierhülle von Schleicher und Schüll bei  $20^{\circ}$  je 24 Stdn. gegen je 100 ccm destilliertes Wasser dialysiert. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle:

Fraktionierte Dialyse von 1.730 g Extrakt mit 60-proz. Alkohol, gelöst in 5 ccm dest. Wasser, bei  $pH = 4$ , gegen je 100 ccm dest. Wasser, bei  $20^{\circ}$ .

Fraktion	Dauer in Stdn.	Menge Trockensubstanz	pH	MgPO <sub>4</sub> -Gehalt
1	24 Stdn.	0.3458 g	4.0	+
2	24 „	0.1273 g	4.0	+
3	24 „	0.0650 g	4.0	—
4	25 „	0.0525 g	4.0	—
5	24 „	0.0332 g	4.0	—
6	24 „	0.0196 g	5.6	—
7	24 „	0.0163 g	5.6	—
8	24 „	0.0188 g	3.6	—
193 Stdn.		0.6785 g		
Dialysier-Rückstand		1.0515 g		
		1.7300 g		

Die in das Dialysierwasser gegangene Substanz wurde daraus durch Eindampfen im Hochvakuumverdampfer bei  $30-40^{\circ}$  und Trocknen des Rückstandes über  $P_2O_5$  bis zur Gewichtskonstanz gewonnen. Das MgPO<sub>4</sub> der ersten und zweiten Fraktion bzw. sein Fehlen in den folgenden Fraktionen, läßt sich mit genügender Genauigkeit unterm Mikroskop feststellen. Beim Betupfen mit konz. Ammoniak bilden sich in kurzer Zeit die charakteristischen Krystalle des MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>. Von Fraktion 3 ab sind die Trockensubstanzen Lacke, die beim Verreiben fast farblose, nicht hygroskopische Pulver ergeben. Ebenso wie die wäßrige Lösung des Dialysierrückstandes geben auch die Lösungen der Fraktionen mit wäßriger Pikrinsäurelösung dicke, flockige Fällungen eines Pikrates.

Tierversuche: Für jeden Versuch wurden drei Mäuse verwendet.

Fraktion 1. Konz. 10 mg/ccm; von einer Menge von 0.31 mg/g Maus wurden alle Tiere in durchschnittlich 15—20 Stdn. unter starken Krämpfen getötet.

Fraktion 2. Konz. 10 mg/ccm; von einer Menge von 0.31 mg/g Maus wurden alle Tiere in durchschnittlich 8—10 Stdn. unter schweren Krämpfen getötet.

Fraktion 3. Konz. 10 mg/ccm; von einer Menge von 0.38 mg/g Maus wurden alle Tiere unter schweren Krämpfen in etwa 8—10 Stdn. getötet.

Fraktion 4. Konz. 5 mg/ccm; 0.1 mg/g Maus töten noch alle Tiere unter schweren Krämpfen.

Konz. 1 mg/ccm; 0.04 mg/g Maus alle Tiere überleben, nach heftigen Krämpfen.

Fraktion 8. Konz. 1 mg/ccm; bei Dosen von 0.05 mg/g Maus treten etwa 3—4 Stdn. dauernde Krämpfe auf. Alle Tiere überleben.

Dialysier-Rückstand. 0.5 ccm der in der Hülse verbliebenen Lösung wurden im Hochvakuumverdampfer zur Trockne gebracht und über  $P_2O_5$  gewichtskonstant gemacht.

Konz. 10 mg/ccm. 0.25 mg/g Maus tötet alle Tiere in etwa 10—12 Stdn. Die Tiere sitzen völlig ruhig oder versuchen sich mit langsamen Bewegungen zu verkriechen. Auch beim Reizen treten keine Krämpfe auf.

Konz. 10 mg/ccm. 0.5 mg/g Maus töten alle Tiere in durchschnittlich 4—6 Stdn. unter den gleichen Symptomen ohne Krämpfe.

#### Prüfung der dialysablen, krampferregenden Komponente auf Hitzebeständigkeit.

1) Bei  $p_H = 3.6$ : 20 mg der Trockensubstanz der Frakt. 1 wurden in 0.5 ccm dest. Wasser gelöst, mit einigen Tropfen 1-n. Ameisensäure auf  $p_H = 3.6$  gebracht und die Lösung 2 Stdn. im siedenden Wasserbade erhitzt. Dann wurde gekühlt, mit 1-n. Ammoniak neutralisiert und im Meßgefäß auf 2 ccm aufgefüllt.

Tierversuche: Konz. 10 mg/ccm; mit 0.3 und 0.4 mg/g Maus waren die Tiere nach kurzem Trauern wieder völlig normal.

2) Bei  $p_H = 12.6$ : 10 mg der Frakt. 1 wurden in 0.5 ccm dest. Wasser gelöst und mit 0.2 ccm 2-n. Natronlauge versetzt. Das  $p_H$  der Lösung war danach 12.6. Nach 2-stdg. Erhitzen im siedenden Wasserbade wurde gekühlt, mit 2-n. HCl neutralisiert und schließlich auf 1 ccm aufgefüllt. Die Kochsalz-Konzentration blieb unter der der physiologischen.

Tierversuche: Konz. 10 mg/ccm; 0.3 mg/g Maus. Alle Tiere waren nach 2—3 Stdn. wieder völlig normal.

#### Prüfung der nichtdialysablen Komponente auf Hitzebeständigkeit.

Nach der 8. Dialyse wurde ein Teil der in der Hülse verbliebenen Lösung im Hochvakuumverdampfer zur Trockne gebracht und über  $P_2O_5$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. 20 mg hiervon wurden in 0.5 ccm Wasser gelöst, mit 1-n. Ameisensäure ein  $p_H = 4$  hergestellt und zwei Stdn. im siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Kühlen wurde dann mit 1-n. Ammoniak neutralisiert und auf 2 ccm aufgefüllt.

Tierversuche: Konz. 10 mg/ccm; 0.2 mg/g Maus tötete alle Tiere in 7—12 Stdn. unter den, für die nicht dialysable Komponente charakteristischen Symptomen, ohne Krämpfe.