

42. K. H. Slotta und Heinz L. Fraenkel-Conrat: Schlangengifte, II. Mitteil.: Über die Bindungsart des Schwefels.

[Aus d. Chem. Abteil. d. Instituto Butantan, São Paulo, Brasilien.]

(Eingegangen am 17. Dezember 1937.)

Die Analyse unseres trocknen, gewöhnlichen Giftes von *Crotalus t. terrificus* ergab C 47.5%, H 5.9%, N 13.2%, S 3.4% (O 30.0%). Für ein anscheinend nur lufttrocknes Gift von *Crotalus t. terrificus* fanden andere¹⁾ C 43.4%, H 6.6%, N 12.6%, S 2.9%, was mit unseren Werten sehr gut übereinstimmt, wenn man einen Wassergehalt von 10.8% in dem von den Autoren analysierten Gifte annimmt. Vergleicht man diese Analysenwerte mit den durchschnittlichen Analysen der Proteine (C 50—54%, H 6.5—7.3%, N 17.0—17.6%, S 0.3—2.3%, O 21.5—23.5%), so fällt vor allem der hohe Sauerstoff- und Schwefel-Gehalt auf. Der erstere macht es wahrscheinlich, daß sauerstoffreiche Verbindungen — wohl Kohlehydrate — in höherem Maße als in anderen Eiweißverbindungen am Aufbau des Giftes beteiligt sind. Der hohe Schwefelgehalt wurde auch bei Elapiden-Giften festgestellt: Für rohes *Naja-tripudians*-Gift wurden 3.2%, für gereinigtes 5.1%²⁾, für rohes *Naja-flava*-Gift 4.6%, für gereinigtes 5.5%³⁾ Schwefel gefunden.

Es fiel weiterhin sowohl uns wie auch in den beiden anderen, eben genannten Arbeitskreisen auf, daß mit Nitroprussidnatrium und Folinischem Reagens keine freien —SH-Gruppen nachzuweisen sind. Hingegen konnten wir im Gift von *Crotalus t. terrificus* nach Reduktion mit Natriumsulfit —SH-Gruppen mittels Folin-Reagens nachweisen, was mit Nitroprussidnatrium, das viel weniger scharf anspricht, allerdings auch hier nicht gelang. Ähnliches scheint neuerdings Micheel⁴⁾ bei *Naja*-Gift beobachtet zu haben, wenn wir eine Anmerkung in seiner neuesten Arbeit richtig verstehen.

Nun liegt bei einem anderen, physiologisch aber auch hochaktiven Eiweißstoff etwas Ähnliches vor: Das Insulin enthält Schwefel in derselben Größenordnung (3.3%), der ebensowenig in —SH- wie in leicht reduzierbarer —S-S-Bindung vorhanden ist⁵⁾. Es wurde schon vor mehreren Jahren gezeigt⁶⁾, daß Cystein(—SH) ein spezifisches Reduktionsmittel für Protein—S-S-Bindungen darstellt, wobei es selbst zu Cystin(—S-S-) dehydriert wird. Auf dieser Erkenntnis fußend, gelang es schließlich nachzuweisen^{5a, b)}, daß der Schwefel im Insulin doch in Form von —S-S-Brücken gebunden ist. Durch die spezifische Wirkung des Cysteins(—SH) konnten diese Brücken gesprengt werden, und zwar unter vollständigem Verluste der Aktivität des Hormons.

Da es sich bei der Reaktion des Cysteins(—SH) mit Eiweiß(—S-S-) um die Verschiebung eines Gleichgewichtszustandes handelt, ist natürlich ein großer Überschuß an Cystein(—SH) nötig, um eine möglichst quantitative Ausbeute an Protein(—SH) zu erzielen. Weiter ist die Reaktion

¹⁾ Chr. Tetsch u. K. Wolff, *Biochem. Ztschr.* **288**, 126 [1936].

²⁾ H. Wieland u. W. Konz, *Sitz.-Ber. math.-nat. Abt. bayr. Akad. Wiss.* **1936**, 177.

³⁾ F. Micheel u. J. Jung, *Ztschr. physiol. Chem.* **239**, 217 [1936].

⁴⁾ F. Micheel, H. Dietrich u. S. Bischoff, *Ztschr. physiol. Chem.* **249**, 157 [1937].

^{5a)} V. du Vigneaud, A. Fitch, E. Pekarek u. W. W. Lockwood, *Journ. biol. Chem.* **94**, 233 [1932/33].

^{5b)} O. Wintersteiner, *Journ. biol. Chem.* **102**, 473 [1933].

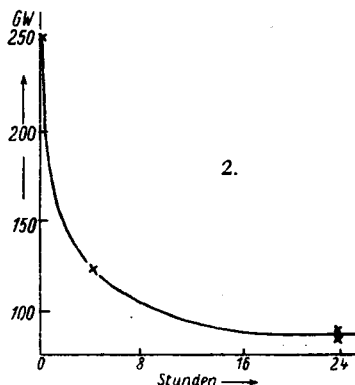
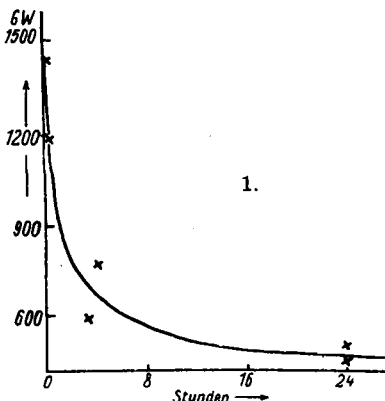
^{5c)} K. Freudenberg u. Th. Wegmann, *Ztschr. physiol. Chem.* **233**, 159 [1935].

⁶⁾ A. E. Mirsky u. M. L. Anson, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **28**, 170 [1930].

weitgehend vom p_H abhängig^{5b)}: Bei einem p_H unterhalb von 6 tritt sie nicht ein, verläuft beim p_H 6—7 noch sehr langsam, darüber hinaus aber mit steigender Alkalität immer schneller. Bei stark alkali-empfindlichen Proteinen, wie beim Insulin, hat sich daher ein p_H von 7.5—8.0 als optimal erwiesen.

Es lag nun nahe, den Einfluß von Cystein(—SH) auf unser *Crotalus-t.terrificus*-Gift zu untersuchen. Wir benutzten dazu das sehr aktive, frisch getrocknete Gift ohne weitere Reinigung; es hat sich nämlich bei uns wie bei anderen⁴⁾ gezeigt, daß Versuchsergebnisse mit nicht weiter gereinigtem Gift grundsätzlich auf das reine Neurotoxin übertragbar sind. Wir gaben zu der Giftlösung die zwanzigfache Menge Cystein(—SH) und stellten die Lösung daraufhin mit Natriumcarbonat und Phosphat-Puffer auf ein p_H von 7.6 ein. Nach einigen Stunden Stehenlassens bei Zimmertemperatur wurde die Giftigkeit bestimmt, die außerordentlich schnell abnahm (Kurve 1). Daß die Giftigkeit nicht vollständig verschwand, liegt anscheinend an dem sich einstellenden Gleichgewicht; jedenfalls konnte mit dem doppelten Überschuß von Cystein(—SH) die Entgiftung noch wesentlich weiter getrieben werden. Übrigens beobachteten wir auch ein noch schnelleres Absinken des GW, als wir einmal ganz frische Cystein(—SH)-Präparate für diese Versuche benutzen konnten (s. dazu in unserer I. Mitteil., Versuchsteil unter B 3 und 4)⁷⁾.

Zur Kontrolle wurde durch einen Teil der Cystein(—SH)-Lösung unter Zusatz einer minimalen Menge von Cupri-Ionen als Oxydations-Katalysator Sauerstoff geleitet, bis die Reaktion auf —SH-Gruppen mit Nitroprussidnatrium negativ war, also nur Cystin(—S—S—) vorlag, das sich teilweise ausschied. Diese Cystin(—S—S—)-Suspension wurde zu einem Teile der schon auf p_H 7.6 eingestellten Giftlösung zugefügt, die Mischung unter den gleichen Bedingungen wie die andere Lösung aufbewahrt und die Giftwerte gleichzeitig kontrolliert. Die GW der Kontroll-Lösung sanken innerhalb der Versuchszeit überhaupt nicht ab, auch hatte sowohl die cystein(—SH)- wie die cystin(—S—S—)-haltige Giftlösung am Ende noch das gleiche p_H von 7.6 wie am Anfang.

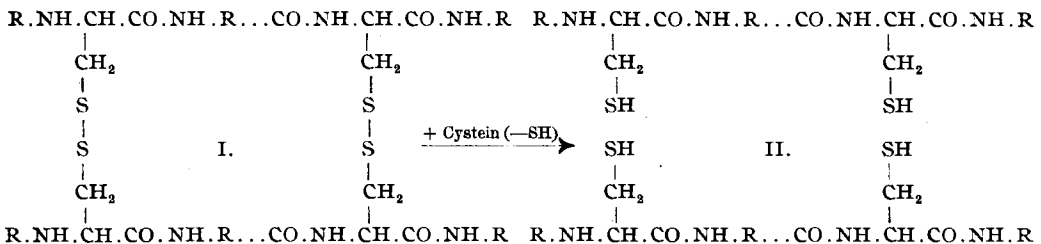


Wirkung von Cystein auf den Giftwert (GW) von Lösungen des Giftes von *Crotalus t. terrificus* (Kurve 1), von *Bothrops jararaca* (Kurve 2).

⁷⁾ K. H. Slotta u. G. Szyszka, B. 71, 263 [1938].

Wir haben gleichzeitig dieselben Versuche mit dem Gifte der im mittleren Brasilien verbreitetsten giftigen Schlange, *Bothrops jararaca*, durchgeführt. Dieses Gift, das nur rund den sechsten Teil der Giftigkeit des *Crotalus-t.-terrificus*-Gifts besitzt, nahm, wie Kurve 2 zeigt, auch entsprechend ab, während die ebenso wie beim *Crotalus*-Gift durchgeführten Kontrollen keine oder höchstens eine innerhalb der Fehlergrenze liegende Abnahme des GW erkennen ließen. Leider besaßen wir kein frisches *Naja-flava*- oder *Naja-tripudians*-Gift. Das sehr alte *Naja-tripudians*-Giftpräparat, das wir hatten, besaß nur etwa 15% der von anderen ermittelten Aktivität, und wir wollen die bisher nicht eindeutigen Versuche lieber mit frischem Gift später wiederholen.

Unsere Versuche mit der Entgiftung durch Cystein (—SH) lassen sich nur so deuten, daß durch die Cystein (—SH)-Einwirkung in der neurotoxischen Komponente der Schlangengifte (I) die -S-S-Brücken unter Verlust der



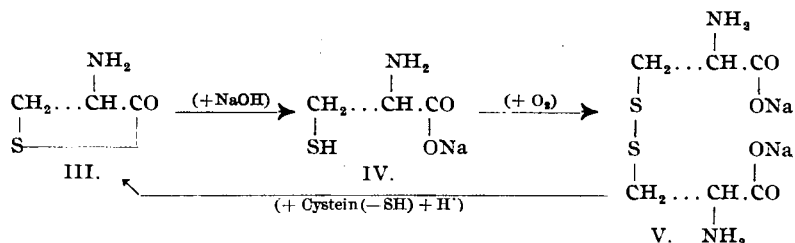
Aktivität des Neurotoxins aufgespalten werden (II). Ebensovienig wie beim Insulin, gelang es hier, die —SH-Gruppen durch Cystin (-S-S-) im Überschuß wieder in der Weise dehydrierend zu verknüpfen, daß die neurotoxische Aktivität des Giftes zurückkehrte.

In letzter Zeit wurde nun von Micheel und Mitarbeitern³⁾⁴⁾ eine wesentliche Anreicherung des Neurotoxins von *Naja*-Giften beschrieben. In diesen experimentell sehr wertvollen Arbeiten wurde aber über die Bindung des Schwefels im Schlangengift eine unserer Auffassung vollkommen widersprechende Hypothese aufgestellt. Nun haben wir allerdings mit anderen Schlangengiften als die Genannten gearbeitet, aber wir glauben doch, daß der Schwefel in den neurotoxischen Komponenten aller Schlangengifte in ähnlicher Weise im Molekül eingebaut ist; wie schon gesagt⁷⁾, haben wir nämlich die durch mannigfaltige Beobachtungen sicher berechnigte Vermutung, daß das Bauprinzip dieser Gruppe von Naturstoffen überhaupt keine grundsätzlichen Unterschiede aufweist.

Micheel hatte³⁾, genau wie wir vor zunächst, weder —SH- noch -S-S-Bindungen mit den üblichen Reaktionen nachweisen können und kommt so zu der Hypothese, daß der Schwefel im Schlangengift in gänzlich anderer Bindungsart als in den gewöhnlichen Proteinen, nämlich als Thiolacton (III), vorliegt. Da nach seinen Versuchen das Neurotoxin aus *Naja flava* ein Molekulgewicht von 2500—4000 und einen Schwefelgehalt von 5.5% hat, enthält das Molekül 4 bis 7 Schwefelatome. Aus seiner Arbeit geht nicht hervor, ob er alle oder nur einen Teil dieser Schwefelatome in Thiolacton-Bindung annimmt; jedenfalls aber glaubt er, daß die Giftigkeit des Neurotoxins wesentlich durch diese Thiolacton-Gruppe oder -Gruppen bedingt ist.

Er stützt seine Hypothese auf folgenden Versuch: Sauerstoff wurde 24 Stdn. durch die Giftlösung bei pH 9—10 geleitet, wobei diese 50% an

Giftigkeit verlor. Dieselbe Lösung wurde dann mit Cystein ($-\text{SH}$) bei pH 2—3 behandelt, wodurch rund die Hälfte der verlorenen Aktivität zurückkehrte. Zur Erklärung dieser Reaktionsfolge gibt Micheel das folgende Schema: Durch Alkali öffnet sich der Thiolacton-Ring (III), durch Sauerstoff wird das so entstandene Thiol (IV) zur unwirksamen Disulfid-Form (V) dehydriert und diese dann wieder durch Cystein ($-\text{SH}$) im Überschuß über eine intermediäre Thiocarbonsäure in das Thiolacton (III) zurückgebildet.



Nachdem wir an den uns zur Verfügung stehenden Giften das Vorhandensein von $-\text{S}-\text{S}-$ Gruppen bewiesen haben, erklärt sich der Micheelsche Versuch einfach folgendermaßen: Durch alkalische Hydrolyse werden solche $-\text{S}-\text{S}-$ Brücken in Thiole und unbeständige Sulfensäuren gespalten⁸⁾; d. h. die Neurotoxine der Formel I gehen in Verbindungen entsprechend der Formel VI über. Dieser Vorgang verläuft schon im schwach alkalischen Gebiet spontan und wird durch Sauerstoff stark beschleunigt, so daß die beobachtete Inaktivierung durchaus verständlich ist.

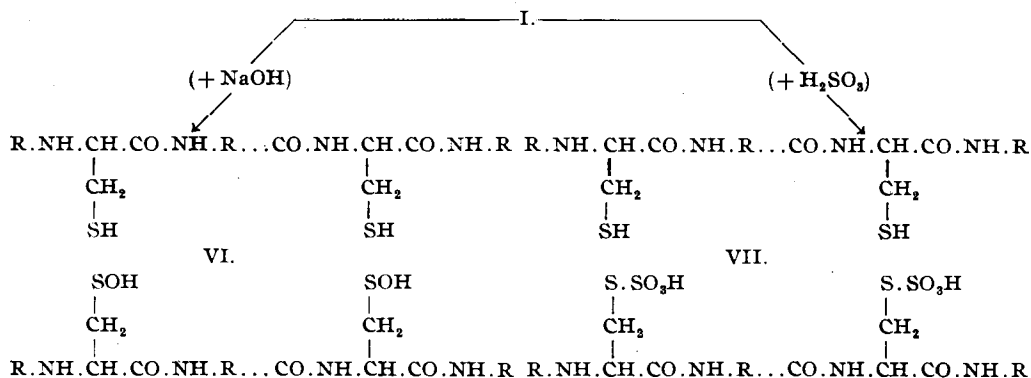
Die teilweise Reaktivierung des erhaltenen Produktes durch Cystein ($-\text{SH}$) in saurer Lösung erschien uns von vornherein etwas fraglich. Nun gibt Micheel in seiner letzten Arbeit⁴⁾ an, daß die Reaktivierung derartiger „Oxydationsprodukte“ durch Reduktion mit Cystein ($-\text{SH}$) „nur in wenigen Fällen gelungen“ sei, wobei sich „die Reaktionsbedingungen nicht sicher reproduzieren“ ließen. Selbst wenn Micheel nicht ein Produkt der hydrolytischen Spaltung, sondern die in seinem Schema geforderte unwirksame $-\text{S}-\text{S}-$ Verbindung (V) hätte, würde er diese unter den von ihm angegebenen Bedingungen niemals haben reduzieren können. Kann man ja $-\text{S}-\text{S}-$ Brücken in Proteinen mit Cystein ($-\text{SH}$) nur in fast neutralen oder in alkalischen Lösungen hydrieren, wie wir schon erwähnten. Es ist jedenfalls den Spezialisten auf diesem Gebiete⁹⁾ niemals gelungen, diese Reaktion bei pH 2—3, wie es Micheel versuchte, zu erreichen.

Wie kommt aber Micheel zu seiner komplizierten Hypothese? Das Naheliegendste ist doch, in thioalfreien, dabei aber schwefelreichen Proteinen den Schwefel in $-\text{S}-\text{S}-$ Brücken zu vermuten, die sich durch Cystein ($-\text{SH}$) aufspalten lassen. Das ist Micheel nicht geglückt, aber nicht weil $-\text{S}-\text{S}-$ Brücken im Gift fehlen, sondern weil ihm anscheinend die strenge Abhängigkeit dieser Reaktion vom pH entgangen ist, wie wir aus dem erwähnten Versuche schließen müssen, in dem er ja bei pH 2—3 mit Cystein ($-\text{SH}$) reduziert zu haben vermeint. Obwohl es uns nach dem Schrifttum schon aussichtslos

^{8a)} A. Schöberl, A. 507, 111 [1933]; Collegium 795 (VII), 412 [1936].

^{8b)} J. S. Fruton u. H. T. Clarke, Journ. biol. Chem. 106, 667 [1934].

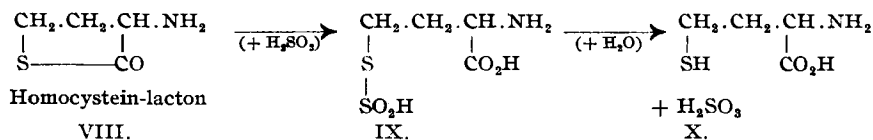
erschien, haben wir zur Sicherheit versucht, Giftlösungen bei pH 4—5, also sogar weniger sauer als Micheel, mit Cystein(—SH) zu inaktivieren; wir konnten aber selbst nach Wochen keinerlei Abfall der Giftwerte feststellen.



Infolge seiner Arbeitshypothese geht Micheel auch in seiner neuesten Arbeit⁴⁾ an der ungezwungenen Erklärung seiner schönen Versuche vorbei. Wenn er verdünnte Giftlösung einige Stunden mit Bisulfit stehen läßt, tritt folgendes ein: „1) Auftreten von —SH-Gruppen, 2) Ausfall eines in Wasser unlöslichen Niederschlages, der einen erhöhten Schwefelgehalt besitzt, 3) Verschiebung der optischen Drehung in negativer Richtung und 4) Inaktivierung der Giftwirkung.“

Wir haben die Micheelschen Versuche mit unserem *Crotalus-t.-terrificus*-Gift wiederholt und sind zu vollkommen entsprechenden Ergebnissen gekommen. Auch bei uns fiel ungefähr die Hälfte der Gewichtsmenge aus und in der Lösung blieb eine Substanz, die mit Folin's Reagens deutlich die Probe auf —SH-Gruppen gab. Die Drehung änderte sich in gleichem Sinne und ähnlichem Maße wie bei Micheel. Niederschlag und Lösung waren praktisch ungiftig. Alles das ist auch wieder ein Beweis dafür, daß man bei der nötigen Kritik die mit Naja-Giften gewonnenen Ergebnisse auf die Chemie der *Crotalus*-Gifte übertragen kann und umgekehrt.

Micheel versucht nun wieder, die Einwirkung von Bisulfit auf das Gift als Aufspaltung seines Thiolacton-Ringes zu erklären. Als Modellversuch führt er die Behandlung von Homocystein-lacton (VIII) mit Bisulfit an, wobei durch weitere Hydrolyse der zuerst gebildeten Verbindung der Formel IX —SH-Gruppen auftreten (X). Durch Heranziehung dieses Schemas läßt sich aber das gleichzeitige Auftreten eines Thiols und einer schwefelreicheren Verbindung aus dem Schlangengift nicht zwanglos erklären. Da die schwerer lösliche schwefelreiche Substanz in Alkali gelöst und mit Säure fast quantitativ wieder gefällt werden kann, wie wir feststellten, ist sie auch nicht gar so instabil gegen hydrolytische Einwirkungen, wie man nach dem Micheelschen Schema annehmen müßte.



Nach unserer Auffassung der Neurotoxine als Substanzen mit -S-S-Bindungen ist die Reaktion mit Sulfid sehr einfach zu erklären: Die -S-S-Brücken werden durch schweflige Säure im Sinne der Formel VII zu einer Thiol- und einer Thiosulfonsäure-Verbindung gespalten. Das ist nämlich die ganz normale Reaktion von Substanzen mit -S-S-Brücken: Mit Natriumsulfid wird Cystin(-S-S-) nicht einfach reduziert, denn es tritt dabei kein Natriumsulfat auf; auch läßt sich nur die Hälfte des Cystins(-S-S-) in Cystein(-SH) umwandeln, während die andere Hälfte zur Cystein-S-sulfonsäure wird⁹⁾. Damit erklären sich die von Micheel beobachteten und von uns experimentell vollkommen bestätigten Tatsachen vollständig: 1) Die Thiol-Verbindung ist verhältnismäßig leicht löslich und die Thiol-Gruppen lassen sich also in der Lösung nachweisen. 2) Die Thiosulfonsäure-Verbindung ist in der schwach sauren Lösung in der Kälte ziemlich schwer löslich und recht beständig; sie besitzt natürlich ungefähr den doppelten Schwefelgehalt des Neurotoxins. 3) Die Drehungsänderung ist verständlich, wenn sich aus ihr auch keine weitgehenden Schlüsse ziehen lassen. 4) Das Verschwinden der Giftigkeit ist im Hinblick auf die Entgiftung des Neurotoxins (I) durch reduktive und hydrolytische Spaltung der -S-S-Brücken (II, VI) gar nicht verwunderlich.

In einer anderen Gruppe von Versuchen gelang Micheel eine Entgiftung seines Neurotoxins durch Oxydation mit Sauerstoff im sauren Gebiete bei Zusatz von Cystein(-SH) und viel Cupro-oxyd. Nach den Versuchen von anderen¹⁰⁾ oxydiert sich Cystin(-S-S-) in saurer Lösung langsam, aber ziemlich vollständig zu Cystein-säure, $\text{HO}_2\text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CO}_2\text{H}$. Zwar ist in den Micheelschen Versuchen die Lösung viel weniger sauer und die Zeit kürzer gewesen, dafür arbeitet er aber mit viel Schwermetallkatalysator in starkem Sauerstoffstrom. Wir glauben jedenfalls, daß in seinen Versuchen die -S-S-Brücken des Giftes oxydativ gespalten wurden.

Im ganzen ist durch unsere Versuche eindeutig bewiesen, daß in verschiedenen Neurotoxinen normale -S-S-Brücken vorliegen, die für die Wirksamkeit der Gifte von entscheidender Bedeutung sind. Wie wir weiterhin gezeigt zu haben glauben, sprechen auch alle von Micheel beobachteten Tatsachen dafür und nichts dagegen.

Bei allen anderen hochaktiven Proteinen (z. B. Insulin, Proteinase, Toxinen, Virus) hat man bisher unter den als Spaltstücken aufgefundenen Aminosäuren keine entdeckt, die nach Struktur oder Menge für das betreffende aktive Protein besonders charakteristisch wären. Die Natur baut die Proteine anscheinend immer wieder aus den bekanntesten Bausteinen auf; die Aktivität scheint dabei mehr von der Gesamtstruktur als von wenigen heterogenen Bestandteilen abzuhängen. Die Micheelsche Theorie erfordert eine Atomgruppierung, bei der eine Thiol-Gruppe in einer für den Lacton-Ringschluß günstigen Stelle, etwa in δ -Stellung zu einer Carboxyl-Gruppe vorhanden sein müßte. Eine solche Verbindung ist unter den Spaltstücken von Proteinen bisher nicht bekannt geworden. Hingegen ist gerade bei hochaktiven Proteinen häufig ihr -SH- und -S-S-Gehalt von ausschlaggebender Bedeutung; verliert doch Insulin seine Aktivität durch Hydrierung der -S-S-Brücken, während die katheptischen Proteinase dadurch wirksamer werden.

⁹⁾ H. T. Clarke, Journ. biol. Chem. **97**, 235 [1932].

⁹⁾ A. Schöberl u. E. Ludwig, B. **70**, 1422 [1937].

¹⁰⁾ J. C. Andrews, Journ. biol. Chem. **97**, 657 [1932].

Beschreibung der Versuche.

I) Entgiftung des Giftes von *Crotalus t. terrificus* mit Cystein.

Es wurden folgende Lösungen hergestellt:

a) Giftlösung: 4 mg *Crotalus-t.-terrificus*-Gift wurden in 4 ccm 8.5-proz. Natriumchlorid-Lösung gelöst.

b) Cysteinlösung: 75 mg Cystein-hydrochlorid (Kahlbaum) wurden mit 50 mg Natriumcarbonat in 7.5 ccm Wasser, durch das schon vorher lange Stickstoff geleitet worden war, gelöst und 3 ccm dieser Lösung unter Stickstoff gehalten.

c) Cystin-Suspension: Die restlichen 4.5 ccm der Lösung wurden mit einer Spur Cuprichlorid versetzt und mit Sauerstoff 30 Min. durchströmt, bis die Nitroprussidnatrium-Probe negativ war.

Versuch mit der 20-fachen Cystein-Menge.

Zu 10 ccm Phosphatpuffer-Lösung vom p_H 7.5, durch die auch lange Stickstoff geleitet worden war, wurden 1.5 ccm Giftlösung (a) und 3 ccm Cystein-Lösung (b) zugesetzt, das Gemisch mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und nach Verdrängung der Luft mittels Stickstoffs im Schliffkölbchen bei 21° stehen gelassen.

Im Kontrollversuch wurden zu ebensoviel Puffer- und Giftlösung (a) 3 ccm Cystin-Suspension (c) gesetzt, das Gemisch auf 25 ccm aufgefüllt und ebenso aufbewahrt. Das p_H in Versuchs- und Kontroll-Gemisch betrug 7.6 bei Beginn des Versuches und nach 24 Stdn.

Nach 15 Min., 3 Stdn. und 22 Stdn. wurden Serien von 6 Mäusen mit beiden Lösungen gespritzt⁷⁾ und so die GE des Giftes ermittelt. Sie betrug bei unserem Rohgifte 0.8 γ . Im Kontrollversuche blieb dieser Wert unverändert. Im Cystein-Versuche betrug er nach 15 Min. 1.0 γ , nach 3 Stdn. 2.0 γ und nach 24 Stdn. 2.4 γ . Nach Abzug von 15.6% (Feuchtigkeitsgehalt des eingesetzten Giftes) und Umrechnung auf die Giftwerte⁷⁾ ergab sich der in der ersten Kurve wiedergegebene Abfall der GW. Dieser Versuch wurde unter denselben Bedingungen wiederholt und die Ergebnisse in die gleiche Kurve eingetragen.

Versuch mit der 40-fachen Cystein-Menge.

Zu einer mit Stickstoff behandelten Lösung von 2 mg Gift von *Crotalus t. terrificus* in 0.2 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung, 2.4 ccm Phosphatpuffer und 2.4 ccm Wasser wurden 40 mg Cystein-Hydrochlorid und 27 mg Natriumcarbonat gesetzt und nach 24 Stdn. nochmals dieselbe Menge Cystein-Hydrochlorid und Natriumcarbonat zugegeben, so daß also im ganzen 40-mal mehr Cystein als Gift vorhanden war. Nach einem weiteren Tage Stehens war die GE des so behandelten Giftes größer als 9.0 γ , der Giftwert also kleiner als 110, mithin auf unter 5% gefallen.

II) Entgiftung des Giftes von *Bothrops jararaca* mit Cystein

a) Giftlösung: 8.8 mg *Bothrops-jararaca*-Gift wurden in 1.1 ccm 8.5-proz. Natriumchlorid-Lösung gelöst.

b) Cystein-Lösung: 220 mg Cystein-Hydrochlorid und 148 mg Natriumcarbonat wurden in einem mit Stickstoff gesättigten Gemische von

4.5 ccm Phosphat-Puffer (p_H 7.5) und 6.1 ccm Wasser gelöst. 4.5 ccm dieser Lösung wurden unter Stickstoff aufbewahrt.

c) Cystin-Suspension: Das Cystein in der übrigen Lösung wurde, wie oben beschrieben, mit Sauerstoff in Cystin überführt.

4.5 ccm Cystein-Lösung (b) wurden mit 0.5 ccm Bothrops-Gift-Lösung (a) versetzt und unter Stickstoff bei 21° aufbewahrt. Zur Kontrolle wurden 4.5 ccm Cystin-Suspension (c) mit 0.5 ccm Giftlösung (a) versetzt.

Die GE unseres Bothrops-Giftes lag zwischen 4 und 5 γ . Das Gift im Kontroll-Versuch hatte nach 4 und 24 Stdn. noch dieselbe Wirksamkeit von 4.5 γ pro GE. Das mit Cystein behandelte Gift hatte nach 4 Stdn. eine GE in 9.0 γ , nach 24 Stdn. in 11.2 γ bzw. bei einer Wiederholung des Versuches in 11.7 γ . Nach Abzug von 10.1% (Feuchtigkeitsgehalt des Bothrops-Giftes) und Umrechnung auf Giftwerte wurde der in der zweiten Kurve wiedergegebene Abfall beobachtet.

III) Einwirkung von Natriumbisulfit auf das Gift von *Crotalus t. terrificus*.

1) 22 mg Gift von *Crotalus t. terrificus* und 66 mg Natriumbisulfit wurden in 3 ccm Wasser gelöst und die Lösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 17 Stdn. hatte sich eine Fällung abgeschieden. Die Suspension enthielt in 20 γ eine GE, hatte also einen Giftwert von nur mehr 50. Der Niederschlag wog 9.8 mg nach Trocknen im Hochvakuum. Er löste sich in $n_{/10}$ -Ammoniak nicht, war dagegen in 1.2 ccm $n_{/10}$ -Natronlauge löslich und konnte mit 1 ccm $n_{/10}$ -Salzsäure wieder gefällt werden, wobei 7.8 mg trockne Substanz zurückgewonnen wurden.

2) In 2 Versuchen wurden 20 mg Gift von *Crotalus t. terrificus* in je 0.2 ccm 4.25-proz. Natriumchlorid-Lösung gelöst und mit 2 verschiedenen Mengen von Natriumbisulfit in 2 ccm Wasser versetzt:

a) Mit 20 mg Natriumbisulfit. Nach 4 Stdn. hatten sich 3.6 mg Niederschlag gebildet, nach 24 Stdn. nochmals 3.6 mg und nach 2 Tagen weitere 2.9 mg, also im ganzen 10.1 mg. Die GE nach 4 Stdn. war 3 γ , der Giftwert also nur noch 333.

b) Mit 40 mg Natriumbisulfit. Nach 4 Stdn. wurden 5.6 mg Niederschlag gewonnen, nach 24 Stdn. 7.1 mg, später fiel nichts mehr aus. Die Gesamtmenge war also 12.7 mg.

3) Die Reaktion wurde in verdünnter Lösung wiederholt, um ein Ausfallen des schwerlöslichen Produktes zu verhindern. 35 mg *Crotalus-t.-terrificus*-Gift wurden in 2.5 ccm 8.5-proz. Natriumchlorid-Lösung gelöst, 1 ccm 5-proz. Natriumbisulfit-Lösung zugesetzt und nach Auffüllen auf 25 ccm die optische Drehung bestimmt. $[\alpha]_D^{17}$ war bei Beginn des Versuches: $-32.1^\circ \pm 3.6^\circ$, nach 1 Stde. $-42.9^\circ \pm 3.6^\circ$, nach 17 Stdn. $-55.0^\circ \pm 5.4^\circ$. Nach 17 Stdn. war etwas schwerlösliches Produkt ausgeschieden. Nach weiteren 24 Stdn. hatte sich der zum Schluß angegebene Wert nicht mehr geändert.