

serum dar, Reihe A die hämolytische Wirkung von synthetischem, Reihe B von Eigelb-Lysolecithin, und zwar in den Konzentrationen:

$$1 \quad 2 \quad 3 \quad 4 \quad 5 \quad 6 \\ 5.53 \times 10^{-4} \quad 2.7 \times 10^{-4} \quad 1.35 \times 10^{-4} \quad 0.675 \times 10^{-4} \quad 0.3375 \times 10^{-4} \quad 0.1687 \times 10^{-4}.$$

C ist der Standard-Ansatz.

Wie man sieht, beginnt die hämolytische Wirkung beim synthetischen Lysolecithin bei einer Konzentration von 1.35×10^{-4} , beim Eigelb-Lysolecithin bei 0.3375×10^{-4} .

173. Karl Heinrich Slotta und Heinz Ludwig Fraenkel-Conrat: Schlangengifte, III. Mittel.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes.

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

(Eingegangen am 11. April 1938.)

Als wir mit Anreicherungsversuchen des Klapperschlangen-Giftes (*Crotalus t. terrificus*) angingen, benutzten wir bei 37° getrocknete ältere Sammelpräparate des Instituts mit Giftwerten¹⁾ von 1200—1700. Durch verschiedene Koagulations- und Fällungsmethoden gelang es uns verhältnismäßig leicht, dieses schwach gelblich verfärbte Rohgift von unwirksamen Begleitsubstanzen zu befreien und ein farbloses Produkt mit einem GW von etwa 2500—3000 zu erhalten, das in keiner Weise weiter angereichert werden konnte. Da wir die Möglichkeit hatten, größere Mengen ganz frischen Giftsekrets zu erhalten, haben wir dieses im gefrorenen Block im Hochvakuum zur Trockne gebracht, wobei 20% eines schneeweißen Trockengiftes vom GW 2000 erhalten wurden. Dieses Gift ließ sich mit den Methoden, die sich bei den älteren Präparaten schon als die besten bewährt hatten, auch nur bis auf den GW von 2500—3000 anreichern. Wir haben mit Alkohol und Aceton in ähnlicher Weise wie H. Wieland²⁾ beim Naja-Gift Fraktionierungen ausgeführt, haben mit Ammoniumsulfat in üblicher Weise getrennt und auch bei verschiedenen Säurestufen zwischen p_H 4—6, also in der Nähe des isoelektrischen Punktes dieser giftigen Proteine, fraktionierte Fällungen vorgenommen. Auch unter noch so vorsichtigen Bedingungen erhielten wir kein Präparat mit einem über 3000 liegenden GW, wobei die einzelnen Fraktionen jedes Versuches schließlich unter sich gleich wirksam waren.

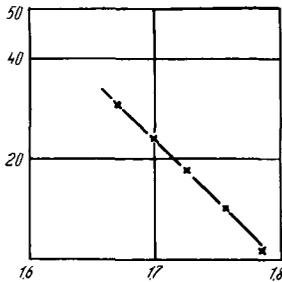
Auf Grund dieser Erfahrung lag es nahe, anzunehmen, daß das Klapperschlangen-Gift von Natur aus zu ungefähr zwei Dritteln aus einem einheitlichen, giftigen Protein besteht. Um die das wirksame Prinzip des *Crotalus*-Giftes begleitenden Eiweißsubstanzen zu entfernen, fanden wir vor allem zwei Wege geeignet: Das flüssige Rohsekret oder das wie oben beschrieben vorsichtigst eingedampfte Rohgift wird 10 Min. in einer Lösung von p_H 4.1 auf 70° erhitzt, wobei nur neurotoxisch unwirksames Protein koagulierte. Die Lösung wird auf p_H 4.6—5.0 gebracht, wobei 40—50% des Trockengiftes als wirksames Protein ausfallen. Durch Zusatz von Alkohol kann

¹⁾ K. H. Slotta u. G. Szyszka, B. 71, 258 [1938].

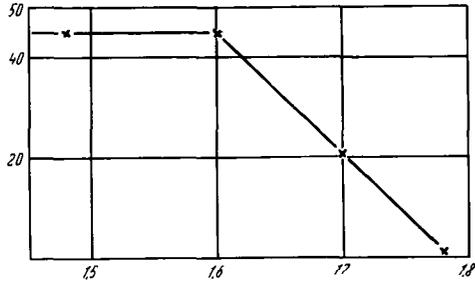
²⁾ H. Wieland u. W. Konz, Sitz.-Ber. math.-nat. Abt. bayr. Akad. Wiss. 1936, S. 177.

die Ausbeute noch verbessert werden; so gelingt es, die neurotoxische Wirksamkeit fast quantitativ und, wie wir sofort sehen werden, in Form eines einheitlichen Moleküls abzuscheiden. Man erreicht etwa das gleiche, wenn man eine Lösung des genannten Ausgangsmaterials nach Verdünnen mit physiologischer Kochsalz-Lösung zunächst mit Ammoniumsulfat auf einen Sättigungsgrad von 0.45 bringt, wobei die Begleitstoffe zusammen mit nur wenig Gift ausfallen. Dann bringt man die Lösung mit mehr Ammoniumsulfat auf einen Sättigungsgrad von 0.62, löst den Niederschlag in Wasser, dialysiert und erhält nach Eindampfen das Gift in bereits reiner Form.

Es war nun wichtig, festzustellen, ob das nach diesen beiden Methoden erhaltene Giftpräparat vom GW 2500—3000 wirklich ein einheitliches Protein darstellte. Wir bedienten uns dazu der neuerdings³⁾ auch für die Eiweißkomponente des gelben Fermentes angewandten Methodik von E. J. Cohn⁴⁾.



Abbild. 1. (Versuchsteil II, 1).



Abbild. 2. (Versuchsteil II, 2).

Abzissen: log des Sättigungsgrades an Ammoniumsulfat in Prozenten der Vollsättigung ausgedrückt. Ordinaten: mg Crotoxin in Lösung.

Das zu untersuchende Protein wird mit Ammoniumsulfat in steigenden Sättigungsgraden gefällt und die in der Lösung dabei verbleibenden Proteinmengen für jeden Sättigungsgrad bestimmt. Trägt man diese Mengen gegen die Logarithmen der entsprechenden Ammoniumsulfat-Konzentrationen auf, so ergibt sich für ein einheitliches Protein eine Gerade. Als wir diese Methode auf unser wie beschrieben auf zwei Wegen gereinigtes Gift anwandten, ergab sich, daß es sich um ein einheitliches Protein handelte (s. Abbild. 1 u. 2).

Wir nennen diesen erstmalig rein dargestellten Eiweißkörper, der das aus dem *Crotalus*-Gift isolierte Toxin darstellt, Crotoxin. Dieser Name ist kürzer und von dem von Faust geprägten (*Crotalotoxin*) genügend unterschieden; Faust bezeichnete mit diesem Namen ein stickstoffreies Produkt aus dem *Crotalus*-Gift, das weder wir noch andere je wieder erhalten konnten.

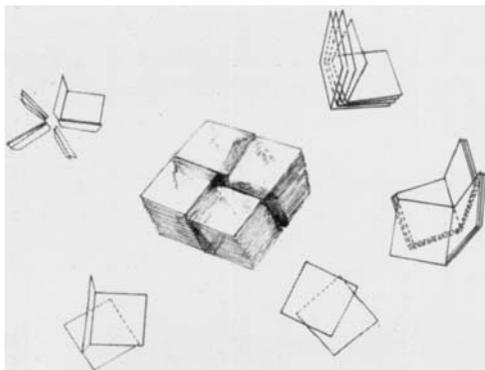
Crotoxin ist ein typisches, farbloses Protein, dessen Schwefelgehalt von 4.0% erheblich höher als der des rohen *Crotalus*-Giftes liegt. Es hat einen durchschnittlichen GW von 2800 und LW¹⁾ von 170. Weder von uns noch von anderen ist bisher ein giftigeres Präparat aus dem Gift von *Crotalus t. terrificus* erhalten worden. Interessanterweise liegen Schwefel-

³⁾ R. Kuhn u. P. Desnuelle, B. **70**, 1907 [1937].

⁴⁾ Physiol. Rev. **5**, 349 [1925].

gehalt wie GW und LW des Crotoxins gleichmäßig um rund 20—25% höher als im Rohgift.

Nach verschiedenen Vorversuchen gelang es uns weiter, das Crotoxin zu krystallisieren. Zu diesem Zweck wurde es in verd. Essigsäure unter schwachem Erwärmen gelöst und mit verd. Pyridin auf pH 4.4 gebracht. Bei sehr langsamer Abkühlung der Lösung schied sich das Crotoxin in makroskopischen Krystalldrusen an den Wänden ab. Diese bestehen aus quadratischen, sehr dünnen Plättchen, die sich meist in der in der Zeichnung wiedergegebenen Weise anordnen. Von der Kante gesehen zeigen sie Polarisation (s. Abbild. 3 u. 4).

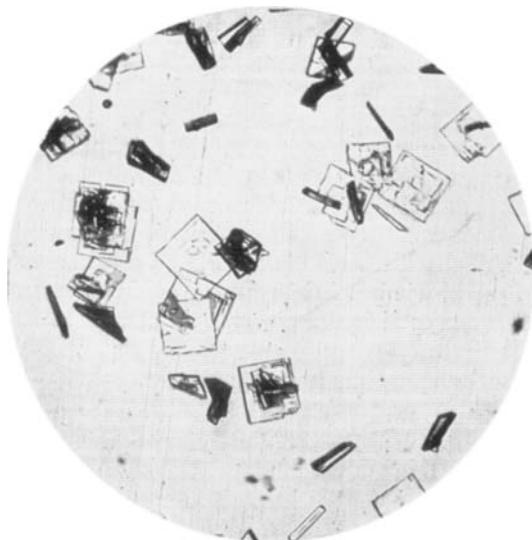


Abbild. 3. Crotoxin, Krystalle.

Lösung krystallisiert, erhält man rund 80% Krystallisat als erste Menge. Bei weiterem, bis zu fünfmaligem Umlösen verliert man jedesmal rund 10—15%. Krystallisiertes Crotoxin hat denselben GW und LW wie das amorphe (GW 2800—3000; LW 170—200), und sein Schwefelgehalt ist der gleiche ($S=4.0\%$). Durch mehrfaches Umlösen steigen diese Werte nicht, eher kann man feststellen, daß die Giftigkeit des Präparates durch zu häufiges Erwärmen auf 55° beim Umrystallisieren in allerdings geringfügiger Weise geschädigt wird.

Zusatz von Zinksalzen ist zur Krystallisation von Crotoxin nicht nötig; gegenüber älteren Angaben konnten wir auch im Rohgift keine nachweisbare Menge Zink finden und natürlich auch nicht im krystallisierten Crotoxin, das überhaupt ohne Hinterlassung eines wägbaren Rückstandes verbrennt.

Wir hatten früher den Eindruck, daß in den Schlangengiften die verschiedenen physiologisch aktiven Komponenten in einem gemeinsamen



Abbild. 4. Crotoxin, Krystalle.
96-fache Vergrößerung.

Komplex vereinigt wären. Nachdem es uns nun zum erstenmal geglückt ist, ein einheitliches, krystallisiertes und hochgiftiges Molekül in sehr guter Ausbeute aus dem Klapperschlangengift zu isolieren, erhebt sich die Frage, inwieweit diesem alle physiologischen Wirkungen des Giftes zukommen. Wir sagten schon, daß die neurotoxische und die, Lecithinase-Wirkung, also die im Klapperschlangen-Gift bei weitem überwiegenden Wirkungen im krystallisierten Crotoxin im gleichen Verhältnis zueinander wie im Rohgift voll vorhanden sind. Dieses Molekül besitzt also die früher zwei verschiedenen Substanzen zugeordneten Eigenschaften: sowohl die toxische Wirkung auf das Nervensystem wie die typisch fermentative auf das Lecithin der Blutkörperchen, und somit die hämolytische. Man könnte infolgedessen versucht sein, zu vermuten, daß dasselbe Ferment, das das Lecithin in den Blutkörperchen spaltet, auf die Nervenlipide ähnlich wirkt, und sich die toxische Wirkung so als reine Fermentwirkung darstellt. Das Crotoxin wäre dann also als ein Ferment aufzufassen, das auf seine Substrate in verschiedenen Körperorganen verschieden wirkt, wie das auch bei anderen Fermenten der Fall ist. So ist die Urease infolge ihrer Fermentwirkung auf den Harnstoff des Blutes ein hochtoxisches Prinzip, das hinsichtlich seiner Giftigkeit den wirksamsten Schlangentoxinen entspricht.

Als wir Crotoxin auf seine Fähigkeit, Oxalat-Blut zu koagulieren, prüften, ergab sich, daß diese verschwunden war. Wir stellten daraufhin Crotoxin unter den allervorsichtigsten Bedingungen her, aber auch dieses so gewonnene Präparat war frei von koagulierendem Prinzip. Nun ist im *Crotalus*-Rohgift der KW¹⁾ nur 30 (im Gegensatz zu etwa 2000 bei *Bothrops*-Giften!), aber aus der genannten Tatsache geht mit Sicherheit hervor, daß das *Crotalus*-Gift noch ein anderes Ferment-Molekül enthalten muß. Wenn dieses auch gerade bei dieser Giftart nach Menge und Wirkung gegenüber dem Crotoxin keine Rolle spielt, so erscheint es uns doch wichtig, auf diese Tatsache hinzuweisen.

Beschreibung der Versuche.

I) Herstellung des Crotoxins.

- 1) Durch Hitzekoagulation und Fällung in der Nähe des isoelektrischen Punktes.

15 ccm frisch entnommenes, zentrifugiertes Gift (= 3 g Trockensubstanz) wurden mit 36 ccm 0.1-n. Salzsäure und 250 ccm Wasser versetzt und 10 Min. auf 70° erwärmt. Das nach dem Abkühlen abgeschleuderte Koagulat wog nach dem Trocknen etwa 300 mg und war ungiftig. Zur klaren Lösung wurden 21.5 ccm 0.1-n. Ammoniak unter gutem Schütteln langsam zugesetzt. Der Niederschlag wog nach Abschleudern und Trocknen im Hochvakuum 1.250 g, was 42% des Trockengehaltes vom Rohgift ausmacht. GW etwa 3000, LW = 165,° KW = 0, Asche weniger als 0.2%.

3.978 mg Sbst. (mit 5.75% Feuchtigkeit): 0.574 ccm N₂ (29°, 702 mm). — 6.044 mg Sbst. (mit 5.75% Feuchtigkeit): 0.863 ccm N₂ (29°, 702 mm). Gef. N 16.0%; 15.8% (auf Trockensubstanz berechnet).

Schwefelanalysen siehe Schlangengifte IV, anschließende Arbeit. Gef. S 4.05%; 4.02%.

Drehung in 0.85-proz. Kochsalzlösung: $l = 1$ dm., $c = 2.4$, $\alpha = -0.17^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = -7.1^\circ \pm 0.9^\circ$.

Aus der Mutterlauge konnte durch Zusatz von 6 ccm 0.1-n. Ammoniak und 60 ccm absol. Alkohol noch eine Fraktion mit einem GW von 2500 gewonnen werden. Es waren 500 mg, also 17% des Trockengehaltes vom Rohgift. Im ganzen sind also in Form von amorphem Crotoxin 59% der im Drüsensekret enthaltenen festen Substanz auf diese Weise erfaßt worden.

2) Durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat.

10 ccm flüssiges Frischgift (= 2 g Trockengift) wurden mit 175 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt und unter starkem Rühren langsam mit 150 ccm gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Der Sättigungsgrad an Ammoniumsulfat betrug nun etwa 0.45. Der Niederschlag wurde abgeschleudert, in Wasser gelöst, diese Lösung so lange dialysiert, bis das Außenwasser keine Reaktion auf Sulfat-Ionen mehr gab, und schließlich im gefrorenen Block im Hochvakuum eingedampft. Es wurden 250 mg (12.5% des trocknen Rohgiftes) vom GW 2000 erhalten.

Die Lösung wurde mit weiteren 50 ccm gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt, so daß der Sättigungsgrad an Ammoniumsulfat 0.52 betrug. Der jetzt erhaltene Niederschlag war nach Aufarbeitung, wie oben angegeben, reines Crotoxin vom GW 2500. Er wog 312 mg. Die Lösung wurde schließlich noch mit 100 ccm gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt, so daß ihr Sättigungsgrad 0.62 betrug. Es ließen sich noch weitere 430 mg Crotoxin vom GW 2500 nach entsprechender Aufarbeitung daraus erhalten.

II) Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des Crotoxins⁴).

1) 220 mg Crotoxin, das nach der unter I, 1 beschriebenen Methode hergestellt worden war, wurden in 55 ccm 0.1-gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gelöst. Je 10 ccm Lösung, die also 40 mg Crotoxin entsprachen, wurden mit verschiedenen Mengen gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung und Wasser versetzt, so daß in jedem Gefäß das Gesamtvolumen 45 ccm betrug. Die Ammoniumsulfat-Mengen wurden so gewählt, daß die 5 Lösungen Sättigungsgrade an Ammoniumsulfat von 0.47, 0.50, 0.53, 0.57 und 0.61 hatten. Die Präzipitate wurden nach einigen Stunden abgeschleudert, in dest. Wasser gelöst und bis zum Verschwinden der Sulfat-Ionen gegen Wasser dialysiert. Die so erhaltenen fünf Suspensionen von Crotoxin wurden bei Zimmertemperatur zur Trockne gedampft, über Phosphorpentoxyd vollständig getrocknet und gewogen. Die in Lösung gebliebenen Protein-Mengen wurden als Differenz zwischen den in jedem Versuch eingesetzten 40 mg Gift zu den ausgefallten und gewogenen Gift-Mengen ermittelt. Das in Lösung gebliebene Crotoxin betrug 31.0, 24.1, 17.8, 10.4, 1.7 mg; bei einem Sättigungsgrad von 0.47, 0.50, 0.53, 0.57, 0.61. Trägt man die angegebenen mg-Mengen auf der Abszisse und die Logarithmen der Ammoniumsulfat-Sättigungsgrade auf der Ordinate in ein Koordinatensystem ein, so erhält man eine Gerade (s. Abbild. 1).

2) 180 mg Crotoxin, das nach der unter I, 2 beschriebenen Methode hergestellt worden war, wurden in vier Teilen von je 45 mg mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung und Wasser versetzt, so daß das Gesamtvolumen in jedem Falle 45 ccm und die Sättigungsgrade an Ammoniumsulfat 0.3,

0.4, 0.5 und 0.6 betragen. Die Bestimmung der ausgefallenen Protein-Mengen und die Berechnung der in Lösung gebliebenen ergab, daß 45.0, 44.8, 20.8 und 1.2 mg Crotoxin bei den Sättigungsgraden von 0.3, 0.4, 0.5 und 0.6 gelöst blieben. Wir erhielten so die oben angeführte Kurve der Abbild. 2.

III) Krystallisation des Crotoxins.

730 mg amorphes Crotoxin wurden in 8.5 ccm 1-proz. Essigsäure bei 55° gelöst und unter Schütteln mit 4.5 ccm 1-proz. Pyridin versetzt. Die Lösung, die ein p_H von 4.4 hatte, enthielt also 0.6% Pyridinacetat. Sie wurde langsam im Wasserbade abkühlen gelassen, wobei nach ungefähr 30 Min. die Krystallisation begann. Am nächsten Tage wurde das krystalline Crotoxin isoliert und getrocknet. Dabei ist zu beachten, daß man es nur nach gutem Waschen mit Wasser scharf trocknen kann, da anhaftende Spuren von Pyridin und Essigsäure beim Trocknen das Protein schon zum Teil denaturieren und den GW des Präparates herabsetzen können. 1 ccm Wasser löst nur 2.3 mg Crotoxin, so daß die durch Waschen bedingten Verluste sehr klein gehalten werden können. In diesem Versuch wurden 575 mg (= 80%) erhalten.

Aus 140 mg amorphem Crotoxin erhielten wir nach 5-maligem Umkrystallisieren 74 mg krystallisiertes Crotoxin.

Das krystallisierte Crotoxin besitzt einen GW von 2750. Es ist wie gesagt in Wasser kaum, in 4-proz. Kochsalzlösung gut löslich. In einem auf p_H 4.4 gebrachten Pyridinacetat-Gemisch löst es sich auch bei 55° nicht.

Verzichtet man bei der Krystallisation zugunsten besonders schöner Krystalle auf Höchstausbeuten, so kann man das Crotoxin bei 40° in 1-proz. Essigsäure lösen (wobei man nur 3- bis 5-proz. Eiweißlösungen erhält) und das Crotoxin dann nach Zusatz von einer entsprechenden Menge 1-proz. Pyridins in verhältnismäßig großen, gut ausgebildeten Krystallen herauskommen lassen.

Aus 140 mg amorphen Crotoxins, das nach Methode I, 1 gewonnen worden war, stellten wir ein solches Präparat her, das bei der Krystallisation nur immer bis auf 40° erwärmt wurde. Nach 5-maligem Umlösen wurden 14 mg reinstes krystallisiertes Crotoxin gewonnen, dessen Analyse folgende Werte ergab:

3.439 mg Sbst. (im Hochvakuum bei 100° getrocknet): 6.400 mg CO_2 , 1.970 mg H_2O . — 5.707 mg Sbst. (mit 13.2% Feuchtigkeit): 0.747 ccm N_2 (26°, 701 mm). — 7.454 mg Sbst. (mit 13.2% Feuchtigkeit): 0.980 ccm N_2 (27°, 701 mm). — 5.993 mg Sbst. (mit 12.4% Feuchtigkeit): 1.834 mg Benzidinsulfat. — 16.061 mg Sbst. (mit 9.1% Feuchtigkeit): 5.188 mg Benzidinsulfat.

Gef. C 50.77, H 6.41, N 15.86, 15.90, S 3.96, 4.03.