

Die beiden Gifte der Ruhrbacillen

Von Prof. Dr. TH. WAGNER-JAUREGG und Dr. ERICA HELMERT

Aus der Chemischen Abteilung des Forschungsinstituts für Chemotherapie, Frankfurt a. M.

Die Schutzimpfung gegen Bacillenruhr (Dysenterie) durch aktive Immunisierung ist besonders im Kriege von großer Wichtigkeit. Obwohl dieses Problem in seinen Grundzügen als weitgehend geklärt betrachtet werden kann¹⁾, gab es bis vor kurzem gegen die besonders gefährliche *Shiga-Kruse-Ruhr* noch keine Impfstoffe, die über ein Versuchsstadium mit befriedigendem Erfolg hinausgekommen wären²⁾. Vor allem standen schmerzhafteste Impfreaktionen der allgemeinen Anwendung früherer Ruhrvaccinen hinderlich im Wege. Die unliebsamen Begleiterscheinungen bei der Impfung werden wahrscheinlich vorwiegend von Ballaststoffen hervorgerufen, welche den zur Impfstoffherstellung verwendeten Antigenen (Toxin, Toxoid, Endotoxin) beigemengt sind. Die Reinigung der Dysenteriegifte und ihrer Umwandlungsprodukte sowie die genaue Kenntnis ihrer Eigenschaften ist für die weitere Entwicklung dieses Gebiets sicher bedeutungsvoll. Im folgenden soll der gegenwärtige Stand der chemischen Erforschung dieser Substanzen kurz geschildert werden.

Es wurden zwei Giftstoffe, ein Toxin und ein Endotoxin in Ruhrbacillen gefunden³⁾, deren Verteilung auf die verschiedenen Typen Tabelle 1 zeigt. Die *Shiga-Kruse-Bacillen*, welche das für den Menschen besonders giftige Toxin produzieren, werden als „giftige“ von den übrigen „giftarmen“ Typen unterschieden; ihre Kolonien können in Gestalt der endotoxinhaltigen O-Formen und der endotoxinfreien o-Formen auftreten⁴⁾. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß es unter den Erregern der Dysenterie reine Toxin- (o-Formen der *Shiga-Kruse-Bac.*) und reine Endotoxinbildner (*Flexner-* und *Kruse-Sonne-Bac.*) gibt, sowie auch Typen, welche beide Giftarten gleichzeitig erzeugen (O-Formen der *Shiga-Kruse-Bac.* und *Schmitz-Bac.*).

Tabelle 1.
Vorkommen von Toxin und Endotoxin in Ruhrbacillen.

	<i>Shiga-Kruse-Bac.</i>		<i>Schmitz-Bac.</i>	<i>Flexner-Bac.</i>	<i>Kruse-Sonne-Bac.</i>
	o-Formen	O-Formen			
Toxin	+	+	(+) ²⁾	+	+
Endotoxin	+	+	+	+	+

²⁾ Sehr wenig.

Das Endotoxin ist identisch mit dem Agglutinogen (O-Antigen) der Vollbakterien. Bei den *Shiga-Kruse-Bacillen* soll es nach den Befunden einiger Autoren, vorwiegend von den „glatten“ Wachstumsformen (S-Formen)⁵⁾ produziert werden, in den „rauh“ wachsenden Stämmen (R-Formen)⁶⁾ dagegen nur ausnahmsweise vorkommen; diese Angabe konnte von *Prigge* nicht bestätigt werden. Eine zuverlässige Unterscheidung endotoxinfreier und endotoxinhaltiger Keime ist durch ihr Verhalten gegen Trypaflavin möglich: Beim Versetzen mit einer 0,2%igen wäßrigen Lösung dieses Farbstoffes werden erstere in charakteristischer Weise agglutiniert (o-Formen), während die endotoxinbildenden Stämme inagglutinabel sind (O-Formen). Dieses Verhalten der *Shiga-Kruse-O-Formen*, das man als „Trypaflavin-negativ“ bezeichnen könnte, erinnert an dasjenige der übrigen endotoxinhaltigen Bakterien bei der Färbung nach *Gram*, wobei sich alle als negativ erweisen. Offenbar blockieren die Endotoxine gerade diejenigen Reaktionsorte der Bakterienzellen, die zur Bindung basischer Farbstoffe geeignet sind.

In Bouillon wächst die O-Variante diffus, dagegen setzen sich die o-Bacillen in der Nährflüssigkeit ab (Spontanagglutination). Beim Abimpfen liefern o-Kolonien stets o-Keime, dagegen gehen aus O-Kolonien bei Passagen O- und o-Formen hervor⁴⁾.

¹⁾ R. Otto, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **140**, 237 [1937]; R. Prigge, Klin. Wschr. **19**, 337 [1940]; Verh. dtsh. Ges. inn. Med., 52, Kongr. Wiesbaden 1940, S. 139; diese Ztschr. **53**, 374 [1940]; Kestermann, ebenda; Klin. Wschr. **20**, 739 [1941]; H. Rauen, Umschau Wiss. Techn. **45**, 113 [1941].

²⁾ Über die Prüfung von „Eta“-Impfstoffen am Menschen vgl. *Sylvester*, Klin. Wschr. **20**, 929 [1941].

³⁾ Über bakterielle Toxine und Endotoxine s. Th. Wagner-Jauregg, diese Ztschr. **52**, 389 [1939], **53**, 319 [1940].

⁴⁾ R. Prigge, Klin. Wschr. **19**, 337 [1940]; R. Prigge u. L. Kicksch, Z. Hyg. Infekt.-Krankh., **123**, 417 [1941].

⁵⁾ Von „smooth“ (bzw. spiegelglatt).

⁶⁾ Von „rough“ (rauh).

Tabelle 2 bringt zur Einführung eine Gegenüberstellung der charakteristischsten Merkmale der beiden Ruhrgifte:

Tabelle 2.
Vergleich der Eigenschaften des Toxins und Endotoxins der *Shiga-Kruse-Ruhrbacillen*.

	Toxin	Endotoxin
Bindung an die Bakterienzelle	lose	fest
Löslichkeit in:		
a) Wasser	löslich ^{*)}	löslich ^{**)}
b) $\frac{1}{4}$ -Trichloressigsäure	unlöslich	löslich ^{***)}
c) Diäthylenglykol	unlöslich	löslich ^{†)}
Verhalten gegen proteolytische Enzyme (Trypsin, Erepsin)	abgebaut	unverändert ^{††)}
Giftwirkung	Nervengift	Darngift
besonders toxisch für	Kaninchen, Mäuse	Meerschweinchen
Antigene Wirksamkeit (Immunisierungsvermögen)	gut	gering

^{*)} Am besten in $\frac{1}{100}$ Soda.

^{**) Mit schwach saurer Reaktion.}

^{***)} Auch durch andere Eiweißfällungsmittel, wie Sulfosalicylsäure, Pikrinsäure, Wolframsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin, Kaliumferrocyanid, ferner durch Al-, Cu-, Fe-, Pb-, Zn-, Hg- und Uranylalze (in saurer Lösung) können Endotoxine nicht niedergeschlagen werden, wohl aber durch Phosphorwolframsäure in Gegenwart von viel HCl oder H₂SO₄. Manche Metallhydroxyde wirken adsorbierend.

^{†)} In der in der Bakterienzelle vorliegenden Form.

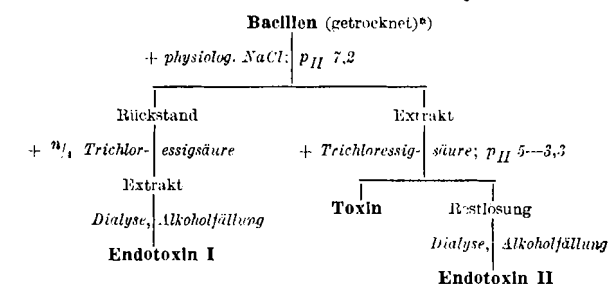
^{††)} In der Zelle; in isoliertem Zustand langsam angreifbar, W. T. J. Morgan u. S. Purridge, Biochemie, J. **34**, 169 [1940].

A. *Shiga-Kruse-Endotoxin*.

Darstellung: Zur Trennung der in den Bacillenleibern enthaltenen beiden Gifte bedienen sich *Boivin* u. *Mesrobianu*⁷⁾ ihrer Trichloressigsäure-Methode; das Toxin ist in verd. Trichloressigsäure, seiner Proteinnatur entsprechend, unlöslich, das Endotoxin kann, nach Entfernung der Säure durch Dialyse, aus der wäßrigen Lösung mittels Alkohol oder Aceton ausgefällt werden; Ausbeute ~10% vom Trockengewicht der Keime. W. T. J. Morgan⁸⁾ konnte durch Extraktion getrockneter *Shiga-Kruse-Bacillen* mit Diäthylenglykol und Fällung der dialysierten Lösung mit Alkohol oder Aceton das Endotoxin in einer Menge von 6—7% des Trockengewichts der Bakterien gewinnen; das Toxin geht dabei nicht in Lösung.

In gemeinsam mit R. Prigge und L. Kicksch durchgeführten Versuchen, bei denen es uns darauf ankam, neben dem Endotoxin auch das Toxin in möglichst unveränderter Form zu gewinnen, wurden nach dem von R. Prigge⁹⁾ angegebenen Verfahren die auf festem Nährboden gezüchteten, gewaschenen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrockneten Keime (O-Formen) zuerst mit 0,85%iger Kochsalzlösung extrahiert, unter Zugabe von etwas verd. Sodaauslösung zwecks Einstellung des p_H auf etwa 7,2. Der Extrakt enthielt nahezu das gesamte Toxin der Bacillen und einen Teil des Endotoxins. Die Trennung der beiden Gifte erfolgte durch Fällung mit Trichloressigsäure. Den Rest des Endotoxins ergab die Behandlung des Extraktionsrückstandes mit $\frac{1}{4}$ -Trichloressigsäure. Schematisch stellt Tabelle 3 unseren Arbeitsgang dar:

Tabelle 3.
Darstellung des Toxins und Endotoxins aus *Shiga-Kruse-Ruhrbacillen*.



^{*)} Es wurden die Frankfurter Stämme 1, 14, 15, 16 und 17 verwendet.

⁷⁾ C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **112**, 76 [1933], **115**, 304, 309 [1934], **124**, 439, 442 [1937]; Rev. Immunologie **1940**, Nr. 2, S. 86.

⁸⁾ Biochemie, J. **31**, 2003 [1937].

⁹⁾ Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **144**, 13 [1939].

Wie wir an einer größeren Anzahl von Versuchsansätzen feststellen konnten, unterschieden sich die beiden Endotoxinfraktionen, die wir mit I und II bezeichnen, bezüglich des Stickstoffgehalts und der Giftigkeit. Fraktion I enthielt 4,8–5% Stickstoff, 1,3% Phosphor und 7–45 dlm/mg¹⁰⁾; sie entspricht in ihren allgemeinen Eigenschaften annähernd den von *Boivin* durch Trichloressigsäure- und von *Morgan* durch Diäthylenglykolextraktion erhaltenen Endotoxinpräparaten. Der Gehalt der Fraktion II an Stickstoff war höher und schwankte zwischen 6 und 9,5% N. Auch waren diese Produkte toxischer; sie enthielten 35–167 dlm/mg.

Aus einer Endotoxinfraktion II mit 7% N erhielten wir durch nochmalige Behandlung mit verd. Trichloressigsäure und darauffolgende Aluminiumhydroxydfällung ein Präparat mit 3,8% N. Der Tierversuch spricht dagegen, daß die Endotoxinfraktion II ein Gemisch von Endotoxin I mit geringen Mengen von Toxin ist (das viel giftiger ist und mehr als 12% N enthält). Das durch Trichloressigsäureextraktion gewonnene Gift (Endotoxinfraktion I) dürfte vielmehr eine etwas abgebaute (niedriger molekulare) Form eines giftigeren, höhermolekularen „Nativ“-Endotoxins der Bakterienzelle sein, die Endotoxinfraktion II ein weniger denaturiertes Produkt, das zwischen beiden Formen steht.

Auch *W. T. J. Morgan* u. *S. M. Partridge* (l. c.) vermuten die Existenz einer höhermolekularen Vorstufe des aus der Zelle extrahierbaren Giftes. Im sog. Gefrierantigen von *R. Haas*¹¹⁾ scheint ebenfalls ein stabiler Komplex vorzuliegen, der an Eiweiß gebundenes Endotoxin enthält.

Reinigungsversuche: Die Fällung des Endotoxins (Fraktion I) mit Bleiessig in schwach alkalischer Lösung erwies sich zur Anreicherung als ungeeignet. Durch Kaolin oder Bleicherden, wie „Frankonit KI“ oder „Clarit hochaktiv“, wird das Gift nicht, durch Bentonit nur in geringem Maße, besser durch Tonerde C₇ adsorbiert. Zur Adsorption an Aluminiumhydroxyd erwies es sich am besten, dieses direkt in der Endotoxinlösung durch Fällen von Ammoniumalaun mit verd. Ammoniak bei p_H = 8 zu erzeugen und das Adsorbat durch Auflösen in Natriumcitrat und Dialyse zu zerlegen¹²⁾. Die erzielte Anreicherung ist aber gering. Die Toxizitätsbestimmung nach der Adsorption ergab in manchen Fällen eine Erhöhung der Giftigkeit etwa auf das Doppelte; das beste Präparat enthielt mindestens 70 dlm/mg. Der Stickstoff- und Phosphorgehalt änderte sich nicht wesentlich.

Chemische Natur: *A. Boivin* u. *L. Mesrobianu*¹³⁾ erhielten bei der Hydrolyse der Endotoxine Fettsäuren und Zucker und betrachteten diese Substanzen daher als Kohlenhydrat-Lipoid-Verbindungen. Die lipide Komponente läßt sich durch Äther, Alkohol oder Aceton nicht herauslösen. *W. T. J. Morgan*¹⁴⁾ fand im Hydrolysat des *Shiga-Kruse*-Endotoxins Aminosäuren, die offenbar einer Polypeptidkomponente entstammen, und wies nach, daß der lipide Anteil Phosphor und Stickstoff im atomaren Verhältnis 1:1 enthält, also ein Phospholipoid (vermutlich Kephalin) ist. Das Endotoxin, so wie man es durch Trichloressigsäure- oder Diäthylenglykolextraktion aus *Shiga-Kruse*-Bacillen erhält, stellt demnach einen höhermolekularen Phospholipoid-Kohlenhydrat-Polypeptid-Komplex dar¹⁵⁾.

Von großem Interesse ist die Feststellung von *Morgan* u. *Partridge*¹⁶⁾, daß das Phospholipoid entfernt werden kann, ohne daß die Antigennatur des Restmoleküls verschwindet.

Man löst das Endotoxin zu diesem Zweck in reinem Formamid und versetzt mit 75 Vol.-% Alkohol; dabei wird das Antigen ausgefällt, während das Phospholipoid in Lösung bleibt. Wir fanden, daß durch die von *Morgan* zur Beseitigung des Lipoids angegebene Formamidbehandlung auch die Toxizität größtenteils unbeeinflusst bleibt. Das Phospholipoid scheint demnach ein unwesentlicher Bestandteil der Endotoxinpräparate zu sein¹⁷⁾. Es ist bekannt, daß sich saure Phosphatide mit verschiedenen Eiweißkörpern zu salzartigen Komplexen vereinigen können, in denen die Lipoidkomponente so fest gebunden ist, daß sie durch Äther nicht herausgelöst werden kann¹⁸⁾. Im Rohendotoxin scheint aber das Lipid an das Polysaccharid und nicht an Polypeptid geknüpft zu sein. Denn *Morgan* erhielt daraus durch Einwirkung von Trypsin unter Zerstörung des Polypeptidrestes einen Phospholipoid-Polysaccharidkomplex. Die verschiedenen Möglichkeiten des Abbaues zeigten Tabelle IV und V.¹⁹⁾

Tabelle 4.
Zerlegung des *Shiga-Kruse*-Endotoxins²⁰⁾

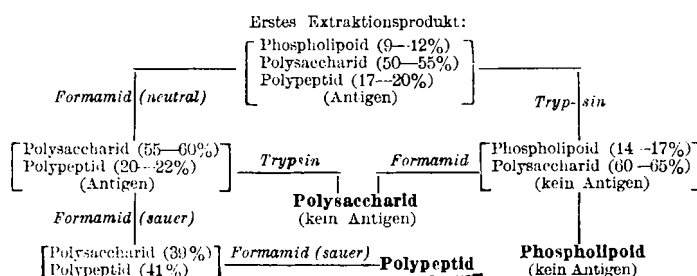


Tabelle 5.
Hydrolyse des *Shiga-Kruse*-Endotoxins.

In 2 $\frac{1}{2}$ Essigsäure bei 95–98°. Analyse des Ausgangsmaterials: 45,5% C, 7,6% H, 3,8% N, 1,3% P, 4–6% Asche [a]_D = +35° ± 5° (in Formamid; c = 0,5). Proteinreaktion nach *Feigl* u. *Anger* negativ

unlöslich		in verdünnter Essigsäure		löslich	
löslich	in Äther	unlöslich	unlöslich	in 95%igem Alkohol	löslich
9–12%		17–20%	50–55%		15%
Phospholipoid (Kephalin?)		Polypeptid	Polysaccharid		enthält Arginin
<i>Hydrolyse</i>		<i>Hydrolyse</i>	<i>Hydrolyse</i>		<i>Hydrolyse</i>
Palmitinsäure Ölsäure α-Glycerinphosphorsäure Unverseifbar (2–3%)		Tyrosin (8%) ¹⁾ Arginin (5,5%)	d-Galaktose (15%) L-Rhamnose (7,5%) N-Acetylaminosaccharid (20–25%) (Glucosamin)		Fehling: +

Als eigentlichen Träger der Endotoxinwirkung (Antigen und Gift) haben wir nach dem oben Gesagten einen Kohlenhydrat-Polypeptid-Komplex zu betrachten. Es ist *Morgan* gelungen, diesen durch Einwirkung von Ameisensäure in Formamidlösung in seine beiden Bestandteile zu zerlegen und daraus in neutralem Medium das Antigen zu resynthetisieren. Damit konnte zum erstenmal der Aufbau eines natürlichen Antigens aus seinen nichtantigenen Bruchstücken verwirklicht werden.

B. *Shiga-Kruse*-Toxin.

Die Reinigung von Toxinen ist in den wenigsten Fällen so weit gediehen, daß man mit voller Sicherheit Aussagen über deren chemische Natur machen könnte. Da diese Substanzen antigene Wirkung besitzen, muß ihnen ein hohes Molekulargewicht gemeinsam sein. Wenn man bedenkt, daß unter den natürlichen Antigenen als wesentliche Bestandteile einwandfrei bisher nur Proteine und komplexe Kohlenhydrate nachgewiesen wurden, dann ist es naheliegend, eine Zugehörigkeit auch der Toxine zu diesen beiden Gruppen von Substanzen anzunehmen. Das chemisch am besten untersuchte und in nahezu reiner Form gewonnene Diphtherietoxin ist ein typischer, hitzeoagulierbarer Eiweißkörper²²⁾. Dagegen verhält sich hochgereinigtes Tetanustoxin nach Unter

¹⁰⁾ dlm = mittlere tödliche Dosis (*dosis letalis media*) = dasjenige Quantum eines Giftes, welches im Durchschnitt 50% der zum Versuch eingesetzten weißen Mäuse (von 15 g Körpergewicht) bei intravenöser Injektion tötet. Bei der Bestimmung des Endotoxins beträgt die Beobachtungsdauer 3 Tage, beim Toxin 1 Woche.

In früheren Mitteilungen (*Wagner-Jauregg*, diese Ztschr. 52, 389 [1939], 53, 319 [1940]; *Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Abt. I, Orig.* 144, 31 [1939]) wurden die Toxizitätswerte in „sicher tödlichen Dosen“ angegeben. Man hat hierunter solche Giftmengen zu verstehen, welche „praktisch in allen Fällen“, also z. B. bei 95% der Versuchstiere, tödlich wirken. Auf eine in dieser Weise definierte „sicher tödliche Dosis“ entfallen beim *Shiga-Kruse*-Toxin ~4,5 dlm, beim *Shiga-Kruse*-Endotoxin ~7 dlm (vgl. *Prigge* u. *Hartoch*, Arb. staatl. Inst. exp. Therap. Forsch. inst. Chemotherap. Frankfurt a. M. 23, 1 [1930] und v. d. *Waerden*, Naunyn-Schmiedeberg Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 191, 281 [1939]).

Haas, *Morgan* und andere Untersucher geben keine strenge Definition der von ihnen verwandten Giftwerte, so daß die von den verschiedenen Autoren ermittelten Ergebnisse nicht ohne weiteres verglichen werden können. Ihre Zahlenangaben entsprechen ungefähr „sicher tödlichen Dosen“.

¹¹⁾ *Z. Immunitätsforsch. exp. Therap.* 97, 317 [1939].

¹²⁾ S. a. *A. Boivin*, *Mesrobianu* u. *J. Jazard*, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 127, 651 [1938].

¹³⁾ *Rev. Immunologie* 1, 554 [1935]; *Ann. Inst. Pasteur* 61, 426 [1938].

¹⁴⁾ *Biochemie* J. 31, 2003 [1937].

¹⁵⁾ Das zuerst von *R. Prigge* (*Z. Hyg. Infekt.-Krankh.* 105, 488 [1926]) nachgewiesene Endotoxin der *Flavim-Bacillen* ist im chemischen Aufbau demjenigen des *Bac. Shiga-Kruse* ähnlich (*Boivin*); das gleiche gilt auch für die Endotoxine des *Bac. Schmitz* und *Bac. Kruse-Sonne* (*Haas*, *Z. Immunitätsforsch. exp. Therap.* 94, 239, 480 [1938]). Immunologisch sind alle diese chemisch verwandten Substanzen verschieden.

¹⁶⁾ *Biochemie* J. 34, 169 [1940].

¹⁷⁾ Ob das Phospholipoid schon in der Bakterienzelle am eigentlichen Endotoxin sitzt, muß dahingestellt bleiben; es wäre denkbar, daß die Vereinigung beider Teile erst unter den Bedingungen der Extraktion erfolgt.

¹⁸⁾ *Th. Wagner-Jauregg* u. *H. Arnold*, *Biochem. Z.* 299, 274 [1938]; *Chargaff*, *J. biol. Chemistry* 125, 661 [1938], 131, 25 [1939].

¹⁹⁾ Tab. 4 ist der Arbeit von *Morgan* u. *Partridge* (l. c.) entnommen, Tab. 5 nach den Ergebnissen der gleichen Veröffentlichung zusammengestellt.

²⁰⁾ Alle Polysaccharidwerte sind wahrscheinlich um 10–20% zu tief, da sie sich auf tatsächlich isoliertes Material beziehen.

²¹⁾ *W. T. J. Morgan*, *Helv. chim. Acta* 21, 469 [1938].

²²⁾ *M. D. Eaton*, *J. Bacteriol.* 31, 347, 367 [1936], 34, 139 [1937]; *A. M. Pappenheimer jr.*, *J. biol. Chemistry* 120, 543 [1937]. S. dazu auch das Referat von *Th. Wagner-Jauregg* diese Ztschr. 52, 389 [1939].

suchungen von *Eaton* u. *Gronau*²³⁾ nicht wie ein echtes Protein, sondern wie eine Proteose oder ein Polypeptid. Das Toxin der Scharlachstreptokokken ist hitzebeständig, stabil zwischen p_H 1,0 und 11,0 und wird von Pepsin oder Trypsin nicht abgebaut. Vermutlich ist es ein niedermolekularer Eiweißkörper (Mol.-Gew. 4000–13000)²⁴⁾ oder ein stickstoffhaltiges Polysaccharid²⁵⁾.

Über die chemischen Eigenschaften des Toxins der *Kruse-Shiga*-Dysenteriebakterien lassen sich endgültige Angaben nicht machen, da hier eine sehr weitgehende Reinigung noch nicht durchgeführt wurde²⁶⁾. Das allgemeine chemische Verhalten entspricht demjenigen eines Eiweißkörpers, wie die in folgenden mitgeteilten Versuche zeigen²⁷⁾.

Darstellung und Beständigkeit des Toxins, Toxoidbildung: Die Gewinnung der Toxinlösung durch Behandlung der getrockneten Bacillen mit physiologischer Kochsalzlösung ist auf S. 21 beschrieben. Die Extrakte müssen möglichst rasch weiterverarbeitet werden, da das Toxin in diesen Lösungen nicht haltbar ist; nach mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur kann die Toxizität zum großen Teil verschwunden sein. Bei Aufbewahrung in gefrorenem Zustande (bei Temperaturen unter 0°) nimmt der Giftwert sehr viel langsamer ab. Vielleicht ist ein Ferment an dieser spontanen Inaktivierung des Toxins beteiligt. Es scheint dabei weniger eine völlige Zerstörung als vielmehr eine Umwandlung des Toxins in eine ungiftige Form (Toxoid) zu erfolgen; die Fähigkeit der Präparate, in spezifischer Weise Antitoxin zu binden, sinkt nämlich, wenn überhaupt, dann sehr viel langsamer ab als die Toxizität²⁸⁾.

Das Antitoxinbindungsvermögen kann mit Hilfe einer Flockungsreaktion gemessen und in Flockungseinheiten (Lf)²⁹⁾ ausgedrückt werden³⁰⁾. In folgenden ist die Qualität der Flockung in + bis ++++ angegeben, entsprechend der Schnelligkeit, mit der diese auftrat. Auch unter den höher gereinigten Präparaten befanden sich solche, die noch eine gute Flockungsqualität +++(+) besaßen. Sehr langsam präzipitierende Toxine sind wohl als teilweise denaturiert zu betrachten.

In frischen Kochsalzextrakten können nach *Prigge* u. *Klinkhart*²⁸⁾ auf eine Flockungseinheit bis zu 40 sicher tödliche Dosen = 180 dlm entfallen. Die von uns verarbeiteten Lösungen enthielten rd. 70 dlm/Lf. Nach 5 Monate langem Aufbewahren in eingefrorenem Zustande war in einem Falle diese Verhältniszahl auf 28 gesunken, bei Zimmertemperatur erfolgte der Abfall in wenigen Tagen. Die durch Trichloressigsäure, Ammonsulfat-Fällung usw. gereinigten Präparate zeigten Quotienten zwischen ~22 und 36; ein durch Trichloressigsäure, Uranylacetat- und nochmalige Trichloressigsäurefällung gewonnenes Toxin war, bei erhaltenem Antitoxinbindungsvermögen, fast ungiftig (3,6 dlm/Lf). Man müßte untersuchen, ob derartige Toxinpräparate noch als Antigene wirken und ob sich auf diesem Wege zur Immunisierung geeignete Toxoide gewinnen lassen.

Es ist anzunehmen, daß zukünftige Ruhrimpfstoffe an Stelle von Toxin Toxoid enthalten werden. Ähnlich wie bei anderen echten Toxinen läßt sich auch aus dem Dysenterietoxin (nicht dagegen aus Endotoxin) ein Formoltoxoid herstellen, doch ist die Gewinnung zur Immunisierung geeigneter Präparate hier schwieriger als beim Diphtherietoxin. Nach *A. F. Scheinker*³¹⁾ soll auch auf photochemischem Wege eine Toxoidbildung aus Ruhrtoxin möglich sein.

Säurefällung: Durch Fällung der rohen Kochsalzextrakte mit Trichloressigsäure ließen sich Toxinpräparate gewinnen, die auch in Lösung recht beständig zu sein scheinen. Dabei wird offenbar das toxinverändernde Agens entfernt oder denaturiert. Die Trichloressigsäure-Fällung ermöglicht gleichzeitig, wie *Boivin* gezeigt hat, die Abtrennung des Endotoxins, das in der Restlösung verbleibt, während das Toxin niedergeschlagen wird (siehe die schematische Dar-

stellung unseres Arbeitsganges auf S. 21). Bei fraktioniertem Zusatz der Trichloressigsäure erreichten wir außerdem die Abtrennung eines inaktiven Begleitstoffes, der bei einem $p_H > 5$ ausfällt; die Hauptmenge des Toxins (90–100%) wurde erst zwischen p_H 5 und 3,5 niedergeschlagen, bis p_H 1 erfolgte dann noch eine sehr geringe Nachfällung von Toxin³²⁾. Zur Erzielung guter Ausbeuten ist es unerlässlich, rasch und in der Kälte (0°) zu arbeiten; das Abschleudern der Niederschläge wird am besten in einer hochtourigen Zentrifuge unter Kühlung vorgenommen. Daß längere Berührung des Toxins mit dem sauren Medium schadet, zeigt folgender Vergleich dreier aus dem gleichen Kochsalzextrakt hergestellter Präparate:

Präparat Nr.	Darstellung	Ausbeute in dlm	Reinheitsgrad in dlm/mg
167 B	Trichloressigsäurefällung (p_H 5–3,5), mit $n/10000$ Essigsäure (p_H 5) gewaschen, darauf sofort in $n/100$ Na ₂ CO ₃ gelöst und geprüft ..	50%	—
167 C	Wie 167 B, aber nach der Essigsäurewaschung über P ₂ O ₅ im Vakuum getrocknet, dann gelöst wie oben und geprüft ..	26%	4500 ³³⁾
167 D	Wie 167 C, aber unter Trichloressigsäure bei p_H 3,5 3 h gestanden (Zimmertemperatur) ..	11%	2250

Besonders stark wurden durch Säureeinwirkung Präparate geschädigt, die schon etwas weiter gereinigt waren. Aus diesem Grunde erscheint uns die Trichloressigsäure-Fällung nur als erste Reinigungsoperation angezeigt, in diesem Fall aber wegen der stabilisierenden Wirkung recht geeignet.

*R. Haas*³⁴⁾ kam bei seinen Versuchen über die Beständigkeit gereinigter Dysenterietoxinpräparate aus Bouilloukulturfiltraten bei verschiedenen p_H zu dem Ergebnis, daß von einer deutlichen Schädigung der Toxizität erst bei p_H -Werten unter 4,5 gesprochen werden kann. Bei 37° war nach 24 und 72 h oft erst bei einem p_H von ~2,5 eine deutliche Schädigung feststellbar, während bei p_H 3,0 noch praktisch unveränderte Toxizität bestand.

Um eine Nachwirkung der Säure auf die mit Trichloressigsäure gefällten Niederschläge möglichst auszuschalten, wuschen wir diese vor dem Trocknen mit ges. Ammonsulfat-Lösung; die so gewonnenen Präparate (die natürlich stark (NH₄)₂SO₄-haltig waren), enthielten durchschnittlich 700–1600 dlm/mg. Zur weiteren Verarbeitung empfiehlt es sich, diese Präparate mit kleinen Portionen Wasser bzw. verd. Sodalösung zu extrahieren, nicht alles restlos zu lösen. Man erreicht auf diesem Wege schon eine gewisse Zerlegung in wirksamere und schlechtere Fraktionen.

Auch durch Kohlensäure läßt sich das Toxin ausfällen. Wir lösten 3 mg eines durch Trichloressigsäure- und Ammonsulfatfällung (30–70% Sättigung) vorgereinigten Präparates in 5 cm³ $n/100$ Na₂CO₃, verdünnten die Lösung, die ein p_H 7 besaß, mit dem gleichen Volumen Wasser und leiteten 1 h CO₂ durch. Dann dialysierten wir 24 h im Cellophanschlauch bei 0° gegen 0,2%iges Natriumcarbonat, hernach 24 h gegen dest. Wasser, am 3. Tag wurde 2 h CO₂ eingeleitet und weiter gegen dest. H₂O dialysiert. Die durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnenen Flockchen enthielten ~57% des angewandten Toxins.

Wärmebeständigkeit: Bei 3stündigem Erhitzen eines durch Trichloressigsäure-Fällung gewonnenen Präparates in wäßriger Lösung bei p_H 6,9 auf 59° trat kein Verlust des Antitoxin-Bindungsvermögens auf, dagegen wurden unwirksame Begleitstoffe ausgeflockt.

Ammonsulfatfällung: Die weitere Anreicherung des Toxins kann durch Ammonsulfatfraktionierung erfolgen. Bis $1/3$ -Sättigung werden dabei Ballaststoffe entfernt, die Hauptmenge des Toxins fällt zwischen $1/3$ - und $2/3$ -Ammonsulfat-sättigung. Zur weiteren Aufteilung wurde in kleineren Fällungsintervallen fraktioniert; dabei konnten wir zwischen 45 und 55% (NH₄)₂SO₄-Sättigung in manchen Fällen eine Fällungslücke beobachten; die Anteile des in der 2. und 3. Fraktion (33–45%; 45–66%) fallenden Toxinanteils waren aber in verschiedenen Ansätzen wechselnd, wie die beiden folgenden Beispiele zeigen. Die Deutung für dieses Verhalten ist wohl die, daß die Aussalzung des Toxins in diesem Reinheitsstadium durch Begleitsubstanzen noch stark beeinflußt wird, bzw., daß je nach Vorbehandlung Toxin Komplexe von verschiedenem Molekulargewicht vorliegen.

²³⁾ Bei *Gh. Istrati* u. *A. Olaru*, die mit einem endotoxinfreien Stamm arbeiteten, blieb beim Fällen des Toxins mit Trichloressigsäure bei p_H 3,5 ein unspezifisches Antigen in der Restlösung zurück (*Z. Immunitätsforsch., exp. Therap.* **100**, 303 [1941]).

²⁴⁾ Dieses Präparat enthielt 0,94% Schwefel.

²⁵⁾ *Z. Immunitätsforsch., exp. Therap.* **99**, 121 [1940].

²⁶⁾ Die Präparate verringern bei längerem Aufbewahren ihre Wirksamkeit. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Säureschädigung infolge Abgabe von Ammoniak.

²⁷⁾ *J. Bacteriol.* **38**, 423 [1938].

²⁸⁾ *Barron, Dick* u. *Lyman*, *J. Biol. Chemistry* **137**, 267 [1941]; *Chem. Ztbl.* **1941** I, 2666.

²⁹⁾ *Hoche* u. *Follensby*, *J. Immunology* **27**, 177 [1934]; *A. H. Stock*, *Amer. J. Pathol.* **13**, 618 [1937]. Siehe auch *W. L. Kocher* u. *W. E. Bunney* (*J. Immunology* **40**, 459 [1941]; *Chem. Ztbl.* **1941** II, 2215).

³⁰⁾ Von neueren Arbeiten sei die von *R. Haas*, *Z. Immunitätsforsch., exp. Therapie* **99**, 121 [1940], erwähnt; dort auch Angaben über frühere Literatur.

³¹⁾ *E. Heilmert*, *L. Kiecksch*, *R. Prigge* u. *Th. Wagner-Jauregg*; die ausführlichere Mitteilung erfolgt später.

³²⁾ *R. Prigge*, *Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh., Abt. I, Orig.* **144**, 14 [1939].

³³⁾ Lf = Limes (Grenzwert) Flockung; als Flockungseinheit bezeichnet man diejenige Toxinmenge, die bei der Flockungsreaktion mit 1 Antitoxineinheit (AE) am schnellsten reagiert.

³⁴⁾ *R. Prigge* u. *L. Kiecksch*, *l. c.*

³⁵⁾ *Chem. Ztbl.* **1940** I, 3281; **1941** I, 3237.

Präparat Nr.	Ammonsulfat- Sättigung	Toxinausbeute	dlm/mg (NH ₄) ₂ SO ₄ -haltige Trockensubstanz ³⁶⁾
Versuch I:			
280 C	0 33%	4%	90
280 D	33 45%	15%	450
280 E	45 55%	45%	4500
Versuch II:			
344 B	33 45%	etwa 54%	etwa 9000
344 C	45 60%	etwa 30%	etwa 6700

Zur Ermittlung des Reinheitsgrades der Präparate des Versuchs II wurden hier, wie in anderen Fällen, von der in Cellophan-schläuchen dialysierten Lösung durch Eindunsten über P₂O₅ im Vakuum Trockengewichtsbestimmungen gemacht. Nach dem Wiederauflösen dieser Trockenpräparate wurde stets eine geringere Giftigkeit gemessen als vorher, z. B. in obigem Versuch ~ 6700 (Präp. Nr. 344 B) und 2500 dlm/mg (Präp. Nr. 344 C). Das spricht dafür, daß die biologische Wirkung der Substanz bei der Dialyse bzw. dem Trocknen geschädigt wird, eine Erscheinung, die auch bei Enzymen häufig zu beobachten ist.

Wir versuchten auch eine direkte Ammonsulfat-fractionierung der Kochsalzextrakte aus den getrockneten Bacillen (O-Formen), ohne vorhergehende Trichloressigsäure-Fällung. Dabei wird in 2 Hauptfraktionen Gift niedergeschlagen, nämlich zwischen 33–45% und 52–55% Ammonsulfatsättigung. Die erste Fraktion enthält viel Endotoxin, die zweite hauptsächlich Toxin. Eine saubere Trennung der beiden Gifte auf diesem Wege ist aber nicht möglich³⁶⁾.

Fällung mit Uranylacetat: Ein durch Trichloressigsäure-Fällung gewonnenes Toxinpräparat wurde in n/10 Soda gelöst und mit 1/10 Volumen ges. Uranylacetat-Lösung versetzt: p_H nun 5,3. Der Niederschlag, der durch Auflösen in 5%igem Natriumcitrat und Dialyse vom Uran befreit wurde, enthielt noch 95% der antitoxin-flockenden Substanz.

Adsorption: Durch Behandlung mit Tonerde B oder Tonerde C bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion lassen sich unwirksame Begleitstoffe entfernen. Das Toxin selbst kann bei p_H 5 an Tonerde C_γ gebunden und aus dem Adsorbat mit 2,4%igem sek. Natriumphosphat mit guter Ausbeute eluiert werden³⁷⁾.

Auch durch Fällung mit Alaun bei p_H 5,5–6,0 läßt sich das Dysenterietoxin niederschlagen. Man versetzt dazu die Lösung mit 1/100–2/100 ihres Volumens 10%iger Kalialaun-

Lösung. Der frisch dargestellte Niederschlag löst sich in 2%iger Natriumcitrat-Lösung.

Kombination von Reinigungsoperationen: Wir geben dafür ein Beispiel, wobei ein durch Trichloressigsäure-Fällung aus dem ursprünglichen Kochsalzextrakt gewonnenes Präparat zur Entfernung von Begleitstoffen mit Aluminiumhydroxyd behandelt und nachher mit Ammonsulfat fraktioniert wurde:

Präparat Nr.	Darstellung	Ausbeute in %		Reinheitsgrad		Anzahl der auf 1 Lf ent- fallen- den dlm	Flok- kungs- qualität
		dlm	Lf ³⁸⁾	dlm/mg	Lf/mg		
380 B	Trichloressigsäure-Fällung eines NaCl-Extraktes	93	93	315 ³⁹⁾ (112–800) ^{39a)}	14,8 ³⁹⁾	21,1	++
402 B	380 B zur Entfernung von Begleitstoffen mit Tonerde B und C _γ behandelt Ammonsulfat-Fällung von 402 B:	–	74	–	–	–	++
404 A	0–33% Sättigung	1	–	–	–	–	–
404 B	33–50% Sättigung	24,4	19,6	16425† (11700–23400) ^{39a)}	2800†	28,6	++ (+)
404 C	50–60% Sättigung	1,9	6,5	–	–	–	–
404 D	60–80% Sättigung	0,9	–	–	–	–	–

³⁶⁾ Bezogen auf die im ursprünglichen Kochsalzextrakt enthaltene Menge.

³⁹⁾ (NH₄)₂SO₄-haltiges Präparat.

^{39a)} Die eingeklammerten Zahlen geben die Mutungsgrenzen an, zwischen denen der wahre Wert liegen kann.

†) Auf salzfreie Substanz bezogen. Nach dem Wiederauflösen des dialysierten und zur Trockne eingedunsteten Produktes wurden 3150 (4500–22500) dlm/mg und 89 Lf/mg gemessen (35,5 dlm/Lf); Flockungsqualität: ++.

Die Hauptmenge des gereinigten Präparates erschien hier zwischen 1/3- und 1/2-Sättigung mit Ammonsulfat und enthielt mehr als 11 700 (untere Mutungsgrenze) mittlere tödliche Dosen (–2600 sicher tödliche Dosen) pro Milligramm salzfreier Trockensubstanz bei guter Flockungsqualität. Zum Vergleich sei angeführt, daß 1 γ (als Eiweiß berechnet) des „Gefrierantigens“ von R. Haas³⁸⁾ 1 Maus tötete (~1000 sicher tödliche Dosen/mg).

Die Eigenschaften verschiedener Ruhrtoxinepräparate sind sicher zum Teil von der Herkunft des Giftes (Stamm, Darstellungsbedingungen, Begleitstoffen usw.) abhängig. Nähere Aussagen über seine chemische Natur wird erst die weitere Reinigung möglich machen.

Eingeg. 13. September 1941. [A. 85].

³⁸⁾ Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **97**, 317 [1938]; das Präparat gab eine positive Eieiß- und Molsch-Reaktion.

Der gegenwärtige Stand der Chemie der Metallcarbonyle

Von Prof. Dr. W. HIEBER, Anorganisch-chemisches Laboratorium der T. H. München

(Fortsetzung von S. 11
und Schluß)

V. Allgemeine Valenz- und Strukturfragen.

Die Valenz- und Konstitutionsprobleme auf dem Gebiet der Metallcarbonyle gehören zweifellos zu den interessantesten der anorganischen Chemie. Sie sind im Laufe der Entwicklung des Gebiets, besonders in letzter Zeit, wiederholt eingehend diskutiert worden, so daß über die grundsätzlichen Bindungsverhältnisse weitgehend Klarheit herrscht.

Nach der schon mehrfach begründeten Auffassung — vgl. die in Fußnote 2 zitierten zusammenfassenden Abhandlungen — ist das Kohlenoxyd isoster mit dem Cyanion:

:C::O: und [·C::N]· entspr. [·C≡O] und [·C≡N]·

Die Raumgleichheit der bekannten Carbonylcyanokomplexe mit Hexacyanverbindungen desselben Bautyps sowie die Isomorphie zwischen diesen Substanzen wurde schon früher aufgezeigt⁴²⁾:

Verbindungen raumgleicher Ionen (gleiches Mol.-Vol.):

$\left\{ \begin{array}{l} \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{CO} \cdot \text{K}_3 \\ \text{Co}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{CO} \cdot \text{K}_3 \end{array} \right\}$ raumgleich $[\text{M}^{\text{III}}(\text{CN})_6] \cdot \text{K}_3$ (Mol.-Vol. 177);
 $[\text{Ni}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{CO}] \cdot \text{K}_2$ raumgleich $[\text{M}^{\text{II}}(\text{CN})_6] \cdot \text{K}_2$
 CN-Vol. = CO-Vol. = 18.

Beim CO erfolgt wie beim Cyanion die Bindung an das Metallatom durch Betätigung sog. koordinativer Covalenzen zwischen dem Metall- und Kohlenoxyd-C-Atom, d. h. in der bei „Durchdringungskomplexen“ als normal anzunehmenden Art durch ein Paar von σ-Elektronen. Durch Verschmelzung

dieser Elektronen mit den Außenelektronen der zentralen Metallatome kommt sehr häufig ein abgeschlossenes Elektronensystem mit Edelgaskonfiguration zustande, so stets bei den durch besonders großes Bildungsbestreben ausgezeichneten flüchtigen Carbonylverbindungen⁴³⁾. Es ergibt sich z. B. dieselbe Elektronenverteilung für Nickelcarbonyl und Carbonylwasserstoffe, d. h. es liegen „isostere“ Typen vor, entsprechend dem schon oben (Abs. II, B) dargestellten Schema. Im gleichen Sinne ergibt sich die folgende Reihe von Verbindungen gleicher Elektronenverteilung („isostere Typen“):

Typ: Cr(CO)₆.
 Elektronenverteilung: Z. K. Covalenzen
 $|1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^3 d^8| \sigma(3d^4 s^2 4p^5)^{12} | (X \equiv Y)_6$

Me(-CN) ⁺	Me(-CO)	Me(-NO) ⁺
$[\text{Mn}^{\text{I}}(\text{CN})_5]^{3-}$ $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$	$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{CO}]^{3-}$	$[\text{Mn}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$

Ebenso sind untereinander isoster die Verbindungen

Mo(CO)₆ mit den Ionen $[\text{Ru}(\text{CN})_6]^{4-}$ und $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$,
 W(CO)₆ mit den Ionen $[\text{OsCl}_6]^{4-}$ und $[\text{OsCl}_5\text{NO}]^{2-}$.

⁴²⁾ In diesem Zusammenhang sei auch auf das interessante gasförmige „Borincarbonyl“

$\text{H}_2\text{B}:\text{C}::\text{O}:$ hingewiesen, das dieselben Bindungsverhältnisse zeigt und tetraedrische

Struktur besitzt. Es entsteht aus Diboran und Kohlenoxyd bei 100° entsprechend $\text{B}_2\text{H}_6 + 2\text{CO} \rightarrow 2\text{H}_2\text{B}:\text{C}::\text{O}:$. A. Burg u. H. I. Schlesinger, J. Amer. chem. Soc. **59**, 780 [1937]; S. A. Bauer, ebenda **59**, 1804 [1937].

⁴³⁾ W. Hieber, K. Ries u. G. Bader, Z. anorg. allg. Chem. **190**, 219 [1930].