

# DIE CHEMIE

(Angew. Chemie, Neue Folge)

55. Jahrgang, Nr. 3/4, Seiten 21—36, 17. Januar 1942

## 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 kann<sup>1)</sup>, gab es bis vor kurzem gegen die besonders gefährliche *Shiga-Kruse*-Ruhr noch keine Impfstoffe, die über ein Versuchsstadium mit befriedigendem Erfolg hinausgekommen wären<sup>2)</sup>. Vor allem standen schmerzhafte 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 gefunden<sup>3)</sup>, 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 „giftarinen“ Typen unterschieden; ihre Kolonien können in Gestalt der endotoxinhaltigen O-Formen und der endotoxinfreien o-Formen auftreten<sup>4)</sup>. 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 Gifftarten gleichzeitig erzeugen (O-Formen der *Shiga-Kruse*-Bac. und *Schmitz*-Bac.).

Tabelle 1.  
Vorkommen von Toxin und Endotoxin in Ruhrbacillen.

	<i>Shiga-Kruse</i> -Bac.		<i>Schmitz</i> -Bac.	<i>Flexner</i> -Bac.	<i>Kruse-Sonne</i> -Bac.
	O-Formen	o-Formen			
Toxin .....	+	+	(+) <sup>5)</sup>	+	+
Endotoxin .....	+	+	...	+	+

<sup>5)</sup> 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)<sup>5)</sup> produziert werden, in den „rauh“ wachsenden Stämmen (R-Formen)<sup>6)</sup> 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-K-Keime, dagegen gehen aus O-Kolonien bei Passagen O- und o-Formen hervor<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> R. Otto, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **140**, 237 [1937]; R. Prigge, Klin. Wschr. **19**, 337 [1940]; Verh. dtseh. Ges. inn. Med., 52, Kongress Wiesbaden 1940, S. 139; diese Ztschr. **53**, 374 [1940]; Kestermann, ebenda; Klin. Wschr. **20**, 739 [1941]; H. Rauch, Unschau Wiss. Techn. **45**, 113 [1941].

<sup>2)</sup> Über die Prüfung von „Eta“-Impfstoffen am Menschen vgl. Syltster, Klin. Wschr. **20**, 920 [1941].

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

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

<sup>5)</sup> Von „smooth“ (bzw. spiegelglatt).

<sup>6)</sup> 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.

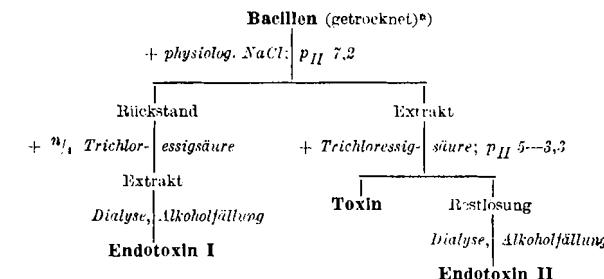
	Toxin	Endotoxin
Bindung an die Bakterienzelle .....	lose	fest
Löslichkeit in:		
a) Wasser .....	löslich <sup>7)</sup>	löslich, <sup>8)</sup>
b) n/100-Trichloressigsäure .....	unlöslich	löslich, <sup>9)</sup>
c) Diäthylenglykol .....	unlöslich	löslich $\dagger$ )
Verhalten gegen proteolytische Enzyme (Trypsin, Eryspin) .....	abgebaut	unverändert <sup>11)</sup>
Giftwirkung .....	Nervengift besonders toxisch für Kaninchen, Mäuse	Darmgift Meerschweinch.
Antigene Wirksamkeit (Immunisierungsvermögen) .....	gut	gering
*) Am besten in n/100 Soda.		**) Mit schwach saurer Reaktion,
**) Auch durch andere Eiweißfällungsmittel, wie Sulfosalicylsäure, Pikrinsäure, Wolframsäure, Naopsoxytolfranssäure, Tannin, Kaliumferrocyanid, ferner durch Al-, Cu-, Fe-, Pb-, Zn-, Hg- und Uranylalze (in saurer Lösung) können Endotoxine nicht niedergeschlagen werden, wohl aber durch Phosphorwolfranssäure in Gegenwart von viel HCl oder H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 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. Partridge, Biochemie, J. <b>34</b> , 169 [1940].		

### A. *Shiga-Kruse*-Endotoxin.

Darstellung: Zur Trennung der in den Bacillenleibern enthaltenen beiden Gifte bedienen sich *Boivin* u. *Mesrobeanu*<sup>7)</sup> 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. Morgan*<sup>8)</sup> 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. Kickisch* 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. Prigge*<sup>9)</sup> 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. Soda-Lösung zwecks Einstellung des *pH* 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 n/4-Trichloressigsäure. Schematisch stellt Tabelle 3 unseren Arbeitsgang dar:

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



<sup>7)</sup> Es wurden die Frankfurter Stämme 1, 14, 15, 16 und 17 verwendet.

<sup>8)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **112**, 76 [1933], **115**, 304, 309 [1934], **124**, 439, 442 [1937]; R. T. Immunologie **1940**, Nr. 2, S. 86.

<sup>9)</sup> Biochemie, J. **31**, 2003 [1937].

<sup>10)</sup> Zbl. Bakteriol., 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 bezeichneten, bezüglich des Stickstoffgehalts und der Gifigkeit. Fraktion I enthielt 4,8–5 % Stickstoff, 1,3 % Phosphor und 7–15 dlm/mg<sup>10</sup>; 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 abgebauten (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*<sup>11</sup>) 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 CY 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 zerlegen<sup>12</sup>). Die erzielte Anreicherung ist aber gering. Die Toxizitätsbestimmung nach der Adsorption ergab in manchen Fällen eine Erhöhung der Gifigkeit 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. Mesrobeanu*<sup>13</sup>) erhielten bei der Hydrolyse der Endotoxine Fettsäuren und Zucker und betrachteten diese Substanzen daher als Kohlenhydrat-Lipoid-Verbindungen. Die lipoide Komponente läßt sich durch Äther, Alkohol oder Aceton nicht herauslösen. *W. T. J. Morgan*<sup>14</sup>) fand im Hydrolysat des *Shiga-Kruse*-Endotoxins Aminosäuren, die offenbar einer Polypeptidkomponente entstammen, und wies nach, daß der lipoide Anteil Phosphor und Stickstoff im atomaren Verhältnis 1:1 enthält, also ein Phospholipid (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 dar<sup>15</sup>).

Von großem Interesse ist die Feststellung von *Morgan* u. *Partridge*<sup>16</sup>), daß das Phospholipid entfernt werden kann, ohne daß die Antigenstruktur des Restmoleküls verschwindet.

<sup>10</sup>) 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 Beobachtungszeit 3 Tage, beim Toxin 1 Woche.

In früheren Mitteilungen (*Wagner-Jauregg*, diese Ztschr. **52**, 289 [1939], **53**, 319 [1940]; *Zbl. Bakteriol., 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. Forschungsinst. Therapotherap. Frankfurt a. M.* **23**, 1 [1930] und v. d. *Waerden*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* **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“.

<sup>11</sup>) *Z. Immunitätsforsch. exp. Therap.* **97**, 317 [1930].

<sup>12</sup>) S. a. *A. Boivin*, *Mesrobeanu* u. *F. Jurd*, *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* **127**, 651 [1938].

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

<sup>14</sup>) Biochemie, J. **31**, 2003 [1937].

<sup>15</sup>) Das zuerst von *R. Prigge* (*Z. Hyg. Infekt.-Krankh.* **105**, 488 [1926]) nachgewiesene Endotoxin der *Flexner*-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.

<sup>16</sup>) Biochemie, J. **34**, 169 [1940].

Man löst das Endotoxin zu diesem Zweck in reinem Formamid und versetzt mit 75 Vol.-% Alkohol; dabei wird das Antigen ausgefällt, während das Phospholipid in Lösung bleibt. Wir fanden, daß durch die von *Morgan* zur Beseitigung des Lipoids angegebene Formamidbehandlung auch die Toxizität größtenteils unbeeinflußt bleibt. Das Phospholipid scheint demnach ein unwesentlicher Bestandteil der Endotoxinpräparate zu sein<sup>17</sup>). 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 kann<sup>18</sup>). Im Rohendotoxin scheint aber das Lipoid an das Polysaccharid und nicht an Polypeptid geknüpft zu sein. Denn *Morgan* erhielt daraus durch Einwirkung von Trypsin unter Zerstörung des Polypeptidrestes einen Phospholipid-Polysaccharidkomplex. Die verschiedenen Möglichkeiten des Abbaues zeigten Tabelle IV und V.<sup>19</sup>:

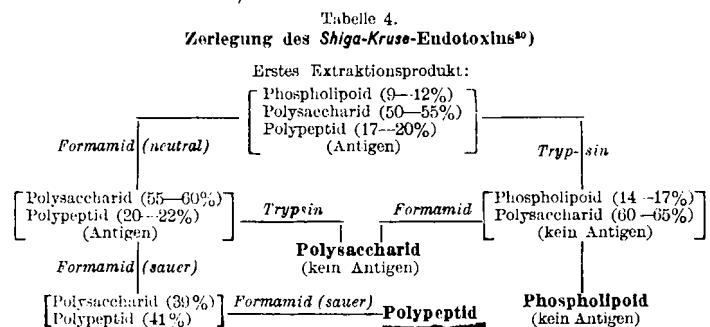


Tabelle 5.  
Hydrolyse des *Shiga-Kruse*-Endotoxins.

In  $\text{H}_2\text{O}$ , Essigsäure bei 95–98%  
Analyse des Ausgangsmaterials: 45,5 % C, 7,0 % H, 3,8 % N, 1,3 % P, 4–6 % Asche  
[ $\text{Fehl}$ ] =  $+55^\circ \pm 5^\circ$  (in Formamid); c = 0,5. Proteinreaktion nach Feigl u. Anger negativ

	Spaltprodukte:						
	unlöslich	in Äther	unlöslich	dünner Essig- säure	unlöslich	in 95%igem Alkohol	löslich 15%
<b>Phospholipold</b> (Kephalin?)			<b>Polypeptid</b>		<b>Polysaccharid</b>		enthalt Arginin
<i>Hydrolyse</i>		<i>Hydrolyse</i>		<i>Hydrolyse</i> <sup>21</sup>		<i>Hydrolyse</i>	
Palmitinsäure	Tyrosin (8%) <sup>21</sup>	Arginin (5,5%)		d-Galaktose (15%)		Fehling: +	
Ölsäure				l-Rhamnose (7,5%)			
α-Glycerin- phosphorsäure				N-Acetyl-amino- zucker (20–25%)			
Unverarbeitbar (2–3%)				(Glucosamin)			

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, hitzeagulierbarer Eiweißkörper<sup>22</sup>). Dagegen verhält sich hochgereinigtes Tetanustoxin nach Unter-

<sup>17</sup>) Ob das Phospholipid 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.

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

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

<sup>20</sup>) Alle Polysaccharide sind wahrscheinlich um 10–20% zu tief, da sie sich auf tatsächlich isoliertes Material beziehen.

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

<sup>22</sup>) 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. **62**, 389 [1939].

suchungen von Eaton u. Gronau<sup>23)</sup> nicht wie ein echtes Protein, sondern wie eine Proteose oder ein Polypeptid. Das Toxin der Scharlachstreptokokken ist hitzebeständig, stabil zwischen  $p_{\text{H}}$  1,0 und 11,0 und wird von Pepsin oder Trypsin nicht abgebaut. Vermutlich ist es ein niedermolekularer Eiweißkörper (Mol.-Gew. 4000–13000)<sup>24)</sup> oder ein stickstoffhaltiges Polysaccharid<sup>25)</sup>.

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 wurde<sup>26)</sup>. Das allgemeine chemische Verhalten entspricht demjenigen eines Eiweißkörpers, wie die im folgenden mitgeteilten Versuche zeigen<sup>27)</sup>.

**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 mehrtagigem 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 Toxizität<sup>28)</sup>.

Das Antitoxinbindungsvermögen kann mit Hilfe einer Flockungsreaktion gemessen und in Flockungseinheiten (Lf)<sup>29)</sup> ausgedrückt werden<sup>30)</sup>. Im 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 präcipitierende Toxine sind wohl als teilweise denaturiert zu betrachten.

In frischen Kochsalzextrakten können nach Prigge u. Klinkhart<sup>28)</sup> 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 Zustand 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, Uraacyacetat- und nochmalige Trichloressigsäure-fällung 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 Toxide 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 Formaltoxoid herstellen, doch ist die Gewinnung zur Immunisierung geeigneter Präparate hier schwieriger als beim Diphtherietoxin. Nach A. F. Scheinker<sup>31)</sup> 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  $p_{\text{H}} > 5$  ausfällt; die Hauptmenge des Toxins (90–100%) wurde erst zwischen  $p_{\text{H}}$  5 und 3,5 niedergeschlagen, bis  $p_{\text{H}} 1$  erfolgte dann noch eine sehr geringe Nachfällung von Toxin<sup>32)</sup>. Zur Erzielung guter Ausbeute 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 ( $p_{\text{H}}$ 5–3,5), mit $n/1000$ Essigsäure ( $p_{\text{H}}$ 5) gewaschen, darauf sofort in $n/100$ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ gelöst und geprüft ..	50%	–
167 C	Wie 167 B, aber nach der Essigsäurewaschung über $\text{P}_2\text{O}_5$ im Vakuum getrocknet, dann gelöst wie oben und geprüft ..	26%	4500 <sup>33)</sup>
167 D	Wie 167 C, aber unter Trichloressigsäure bei $p_{\text{H}}$ 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<sup>34)</sup> kam bei seinen Versuchen über die Beständigkeit gereinigter Dysenterietoxinpräparate aus Bouillonkulturfiltraten bei verschiedenem  $p_{\text{H}}$  zu dem Ergebnis, daß von einer deutlichen Schädigung der Toxizität erst bei  $p_{\text{H}}$ -Werten unter 4,5 gesprochen werden kann. Bei 37° war nach 24 und 72 h oft erst bei einem  $p_{\text{H}}$  von ~ 2,5 eine deutliche Schädigung feststellbar, während bei  $p_{\text{H}}$  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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -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 Ammonsulfat-fällung (30–70% Sättigung) vorgereinigten Präparates in 5 cm<sup>3</sup>  $n/100$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , verdünnten die Lösung, die ein  $p_{\text{H}}$  7 besaß, mit dem gleichen Volumen Wasser und leiteten 1 h  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  eingesetzt und weiter gegen dest.  $\text{H}_2\text{O}$  dialysiert. Die durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnenen Flöckchen enthielten ~ 57% des angewandten Toxins.

**Wärmebeständigkeit:** Bei 3ständigem Erhitzen eines durch Trichloressigsäure-Fällung gewonnenen Präparates in wässriger Lösung bei  $p_{\text{H}}$  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%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -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 Begleitstoffe noch stark beeinflußt wird, bzw., daß je nach Vorbehandlung Toxinkomplexe von verschiedenen Molekulargewicht vorliegen.

<sup>23)</sup> J. Bacteriol. **36**, 423 [1938].  
<sup>24)</sup> Barron, Dick u. Lyman, J. biol. Chemistry **137**, 267 [1941]; Chem. Ztbl. **1941** I, 2666.  
<sup>25)</sup> Hooper u. Follensby, J. Immunology **27**, 177 [1934]; A. H. Stock, Amer. J. Pathol. **13**, 618 [1937]. Siehe auch W. L. Koerner u. W. E. Bunney (J. Immunology **40**, 459 [1941], Chem. Ztbl. **1941** II, 2215).

<sup>26)</sup> Von neueren Arbeiten sei die von R. Haas, Z. Immunitätsforsch. exp. Therapie **99**, 121 [1940], erwähnt; dort auch Angaben über frühere Literatur.  
<sup>27)</sup> E. Helmert, L. Kicksch, R. Prigge u. Th. Wagner-Jauregg; die ausführlichere Mitteilung erfolgt später.  
<sup>28)</sup> R. Prigge, Zbl. Bakteriol., Parasitenkundl. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **144**, 14 [1939].  
<sup>29)</sup> Lf = Limus (Grenzwert) Flockung; als Flockungseinheit bezeichnet man diejenige Toxinmenge, die bei der Flockungsreaktion mit 1 Antitoxineinheit (AE) am schnellsten reagiert.  
<sup>30)</sup> R. Prigge u. L. Kicksch, i.e.v.

<sup>31)</sup> Chem. Ztbl. **1940** I, 3281; **1941** I, 3237.

<sup>32)</sup> Bei G. Istrati u. A. Olari, die mit einem endotoxinfreien Stamm arbeiteten, blieb beim Fällen des Toxins mit Trichloressigsäure bei  $p_{\text{H}}$  3,5 ein unspezifisches Antigen in der Restlösung zurück (Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **100**, 303 [1941]).

<sup>33)</sup> Dieses Präparat enthält 0,94% Schwefel.

<sup>34)</sup> Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **99**, 121 [1940].

<sup>35)</sup> Die Präparate verringern bei langerem Aufbewahren ihre Wirksamkeit. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Säureschädigung infolge Abgabe von Ammoniak.

Präparat Nr.	Ammonsulfatsättigung	Toxinausbeute	dlm/mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -haltige Trockensubstanz <sup>35)</sup>
Versuch I:	0 - 33%	4%	90
280 C	33 - 45%	15%	450
280 D	45 - 55%	45%	4500
280 E	55 - 65%	—	—
Versuch II:	33 - 45%	etwa 54%	etwa 0000
344 B	33 - 45%	etwa 36%	etwa 6700
344 C	45 - 60%	—	—

Zur Ermittlung des Reinheitsgrades der Präparate des Versuchs II wurden hier, wie in anderen Fällen, von der in Cellophan-schlüchen dialysierten Lösung durch Eindunsten über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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 Ammonsulfatfraktionierung der Kochsalzextrakte aus den getrockneten Bakillen (O-Formen), ohne vorliegende 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 möglich<sup>36)</sup>.

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<sub>H</sub> nun 5,3. Der Niederschlag, der durch Auflösen in 5%igem Natriuncitrat 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 pH 5 an Tonerde C gebunden und aus dem Adsorbat mit 2,4%igem sek. Natriumphosphat mit guter Ausbeute eluiert werden<sup>37)</sup>.

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

<sup>36)</sup> S. dazu auch A. Boirin, L. Mesrobian u. Y. Jzard, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Association **127**, 651 [1938].

<sup>37)</sup> S. a. A. Hansen, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Association **106**, 316 [1931]; Hosoya, Teruo u. Takata, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Ref. **112**, 120 [1933]; I. M. Chubasch u. L. S. Basilevskaja, Arch. Sci. biol. [russ.] **53**, Nr. 1, S. 123 [1939]; Chem. Ztbl. **1939** II, 2803.

## Der gegenwärtige Stand der Chemie der Metallcarbonyle

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

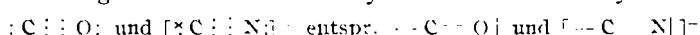
(Fortsetzung von S. 11

und Schluß)

### V. Allgemeine Valenz- und Strukturfragen.

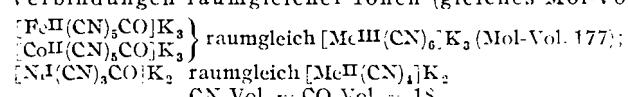
Die Valenz- und Konstitutionsprobleme auf dem Gebiet der Metallcarbonyle gehören zweifellos zu den interessantesten der anorganischen Chemie. Sie sind im Laufe der Entwicklung des Gebiets, besonders in letzter Zeit, wiederholt eingehend diskutiert worden, so daß über die grundsätzlichen Bindungsverhältnisse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

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



Die Raumgleichheit der bekannten Carbonyleyankomplexe mit Hexacyanverbindungen desselben Bautyps sowie die Isomorphie zwischen diesen Substanzen wurde schon früher aufgezeigt<sup>42)</sup>:

Verbindungen raumgleicher Ionen (gleiches Mol-Vol.):



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  $\sigma$ -Elektronen. Durch Verschmelzung

<sup>42)</sup> W. Hieber, K. Ries u. G. Bader, Z. anorg. allg. Chem. **190**, 219 [1930].

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 entfallenden dlm	Flockungsqualität
		dlm	Lf <sup>2)</sup>	dlm/mg	Lf/mg		
380 B	Trichloressigsäure-Fällung eines NaCl-Extraktes	93	93	315 <sup>*)</sup> (112-800) <sup>**</sup>	14,8 <sup>**</sup>	21,1	++
402 B	380 B zur Entfernung von Begleitstoffen mit Tonerde B und C <sub>7</sub> behandelt Ammonsulfat-Fällung von 402 B:	—	74	—	—	—	++
404 A	0 - 33% Sättigung	1	—	—	—	—	—
404 B	33 - 50% Sättigung	24,4	19,6	16425†	2800†	28,6	++ (+)
404 C	50 - 60% Sättigung	1,9	6,5	—	—	—	—
404 D	60 - 80% Sättigung	0,9	—	—	—	—	—

<sup>\*)</sup> Bezug auf die im ursprünglichen Kochsalzextrakt enthaltene Menge.

<sup>\*\*)'</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-haltiges Präparat.

<sup>\*\*)</sup> Die einklammerten Zahlen geben die Mutungsgrenzen an, zwischen denen der wahre Wert liegen kann.

<sup>†)</sup> Auf salzfreie Substanz bezogen. Nach dem Wiederauflösen des dialysierten und zur Trockne eingedunsteten Produktes wurden 3150 (4500 - 22500) dlm/mg und 80 Lf/mg gemessen (33,5 dlm/Lf); Flockungsqualität: ++.

Die Hauptmenge des gereinigten Präparates erschien hier zwischen 1/3 und 1/2-Sättigung mit Ammonsulfat und enthielt mehr als 11700 (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. Haas<sup>38)</sup> 1 Maus tötete (~ 1000 sicher tödliche Dosen/mg).

Die Eigenschaften verschiedener Ruhrtoxinpräparate 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].

<sup>38)</sup> Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **97**, 317 [1938]; das Präparat gab eine positive Eiweiß- und Molisch-Reaktion.

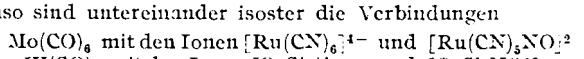
dieser Elektronen mit den Außenelektronen der zentralen Metallatome kommt sehr häufig ein abgeschlossenes Elektronensystem mit Edelgaskonfiguration zustande, so stets bei den durch besonders großes Bildungsbestreben ausgezeichneten flüchtigen Carbonylverbindungen<sup>43)</sup>. Es ergibt sich z. B. dieselbe 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)<sub>6</sub>.

Elektronenverteilung: Z. K. Covalenzen  
 $|1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6| \sigma(3d^4 4s^2 4p^6)^{12}|(X= Y)|_6$

Me(-CN) <sup>+</sup>	Me(-CO)	Me(-NO) <sup>+</sup>
MnI(CN) <sub>6</sub> <sup>5-</sup>	—	[MnI(CN) <sub>5</sub> NO] <sup>3-</sup>
FeII(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup>	[FeII(CN) <sub>5</sub> CO] <sup>3-</sup>	[FeII(CN) <sub>5</sub> NO] <sup>2-</sup>
CoIII(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>	—	—

ibenso sind untereinander isoster die Verbindungen



<sup>43)</sup> In diesem Zusammenhang sei auch auf das interessante gasförmige „Borincarbonyl“

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

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