

273. Karl Heinrich Slotta, Walter Forster und Heinz Ludwig Fraenkel-Conrat: Schlangengifte, V. Mitteil.: Über die schwefelhaltigen Bausteine des Cobra-Giftes.

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

(Eingegangen am 4. Juli 1938.)

Auf Grund unserer Feststellungen am Klapperschlangen-Gift und der Versuchsergebnisse anderer^{1, 2)} am Cobra-Gift (*Naja naja* und *Naja flava*) hatten wir die Vermutung ausgesprochen, daß auch im Gift der Cobra-Arten der Schwefel weitgehend in Form von -S-S-Brücken vorläge³⁾. Wir haben weiterhin an unserem Crotoxin⁴⁾ gezeigt, wie man den Schwefel eines Proteins eindeutig verschiedenen Gruppen schwefelhaltiger Bausteine zuordnen kann⁵⁾, wenn man die nach Folin, Sullivan und Bärnstein erhaltenen Ergebnisse systematisch auswertet. Es interessierte uns nun weiter, diese Methode auch auf das Cobra-Gift anzuwenden, wozu wir durch den Erhalt von frisch getrocknetem *Naja-naja*-Gift instand gesetzt wurden⁶⁾. Dieses Gift hatte einen Schwefelgehalt von 3.65%, wies einen Giftwert⁷⁾ von 2600, einen Lecithinasewert⁷⁾ von 15 auf und besaß praktisch weder koagulierende noch proteolytische Wirkung. Das trockne Cobra-Gift, von dem andere Autoren ausgingen^{1, 2)}, hatte durchschnittlich einen Giftwert von 1300, und es gelang, daraus in beiden Arbeitskreisen gleichmäßig Neurotoxine mit einem Schwefelgehalt von 5.1—5.5% und mit Giftwerten um ungefähr 8000 herzustellen. Mithin ergibt sich, daß unser *Naja*-Rohgift zu etwa 30% aus diesem Neurotoxin besteht, und daß rund die Hälfte seines Schwefels dem Neurotoxin zukommt. Wir hatten zunächst davon abgesehen, das Gift für unsere Versuche weiter zu reinigen. Das erwies sich auch deshalb bald als unnötig, weil es sich herausstellte, daß die Bindungsart des Schwefels im Cobra-Neurotoxin und in dessen Begleitsubstanzen die gleiche ist.

Wir teilten zunächst in einem Mikro-Ansatz den Schwefel nach H. D. Bärnstein⁸⁾ auf und fanden in der ersten Titration den -S-S-Schwefel zu 3.63%, was also schon den durch Verbrennungsanalysen ermittelten Schwefelgehalt der Substanz deckte. Entsprechend ergab die zweite Titration praktisch einen vollständigen Nullwert; im Cobra-Gift ist also weder Methionin noch „Thiolacton“ vorhanden.

Weiterhin hydrolysierten wir entsprechend den am Crotoxin gewonnenen Erfahrungen das Cobra-Gift 50 und 67 Stdn. mit Salzsäure-Ameisensäure-Gemisch⁹⁾ und stellten dabei fest, daß sich der nach M. X. Sullivan¹⁰⁾ für Cystin(-S-S-) erhaltene Wert vollkommen mit dem Ergebnis der Bestimmung nach Folin¹¹⁾ deckte, daß aber bei dieser Hydrolysendauer nur etwa 80%

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

2) F. Michael u. Mitarbb., Ztschr. physiol. Chem. **239**, 217 [1936]; **249**, 157 [1937].

3) K. H. Slotta u. H. L. Fraenkel-Conrat, B. **71**, 264 [1938].

4) K. H. Slotta u. H. L. Fraenkel-Conrat, B. **71**, 1076 [1938].

5) K. H. Slotta u. W. Forster, B. **71**, 1082 [1938].

6) Wir sind Hrn. Kollegen B. N. Ghosh, Calcutta, für die freundliche Überlassung eines so hochwirksamen Präparates außerordentlich dankbar.

7) K. H. Slotta u. G. Szyszk, B. **71**, 258 [1938].

8) Journ. biol. Chem. **106**, 453 [1934].

9) G. L. Miller u. V. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. **118**, 101 [1937].

10) M. X. Sullivan, Publ. Health Rep. suppl. **78** [1929].

11) O. Folin u. A. D. Marenzi, Journ. biol. Chem. **88**, 103 [1929].

des Schwefels erfaßt wurden. Nach den von du Vigneaud⁹⁾ für die Cystin(-S-S)-Bestimmung im Insulin gemachten Erfahrungen und veröffentlichten Kurven erschien uns wahrscheinlich, daß die Hydrolyse schon viel früher beendet ist, und 20% des Cystins(-S-S-) schon wieder umgewandelt und zerstört waren. Daraufhin hydrolysierten wir in gleicher Weise 3-mg-Ansätze des Giftes, wobei sich ergab, daß die Hydrolyse schon nach 18 Stdn. vollständig ist, und daß auch noch bei einer 28-stdg. Dauer derselbe Cystin(-S-S-) Wert gefunden wird. Liegen die durch Verbrennungsanalyse gefundenen 3.65% Schwefel unseres Naja-naja-Giftes in Form von Cystin(-S-S-) vor, so müßten aus 100 g Gift 13.7 g Cystin(-S-S-) entstehen. Wir fanden nach Sullivan¹⁰⁾ statt dessen 13.6, 13.8 und 13.9 g Cystin(-S-S-).

Es bleibt noch die Frage offen, inwieweit die Wirkung des Cobra-Giftes vom Vorhandensein der -S-S-Brücken abhängt. Vor kurzem wurde gezeigt¹²⁾, daß Cystein(-SH) in großem Überschuß bei pH 7.4 die Giftwirkung des Naja-Giftes nur zu 25% schädigt. Wir können diesen Befund grundsätzlich bestätigen, fanden wir doch sogar, daß der Giftwert unseres Naja-Giftes unter Einwirkung eines riesigen Cystein(-SH)-Überschusses innerhalb der Fehlergrenzen gleich blieb, während unter den gleichen Bedingungen die Giftigkeit des Crotalus- und Bothrops-Giftes, wie wir schon früher zeigten³⁾, fast vollständig verloren geht. Es gibt u. E. dafür nur 2 Erklärungen: Entweder ist die durch die Cystein(-SH)-Reduktion entstandene Thiol-Form des Naja-Neurotoxins ähnlich giftig wie seine -S-S-Form, oder die -S-S-Brücken dieses Polypeptid-Toxins sind gegen Cystein(-SH) außerordentlich beständig. Daß nämlich die Reaktionsfähigkeit der -S-S-Brücken des Cystins(-S-S-) stark davon abhängt, welche Aminosäuren ihm in der Peptid-Kette benachbart stehen, geht aus einigen neueren Arbeiten hervor^{13, 14)}. Das wesentliche bleibt aber: Gegenüber der gegenteiligen, von anderer Seite neuerdings wieder geäußerten Ansicht¹⁵⁾ unterliegt es nach unseren eindeutigen Ergebnissen gar keinem Zweifel mehr, daß aller Schwefel im Naja-Rohgift, und infolgedessen selbstverständlich auch der gesamte Schwefel des in ihm enthaltenen Neurotoxins, als Cystin(-S-S-)-Schwefel gebunden ist.

Beschreibung der Versuche.

Das Gift von Naja naja wurde zur Analyse und Hydrolyse 3 Stdn. im Hochvakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet⁵⁾.

1) Bestimmung des Gesamt-Schwefels nach Schöberl¹⁶⁾: 11.432, 13.500 mg Sbst. gaben 3.659, 4.347 mg Benzidinsulfat. Die Substanz hinterließ in jedem Falle nur Spuren von Rückstand: S 3.64, 3.66; im Mittel S 3.65%.

2) Cystin(-S-S-), bestimmt nach Bärnstein⁸⁾: 30.77 mg Gift wurden in 5 ccm Jodwasserstoffsäure unter den früher angegebenen Bedingungen⁵⁾ hydrolysiert und das Hydrolysat jodometrisch, wie dort angegeben, titriert. Es wurden 3.48 ccm zur sauren und 0.02 ccm 0.01-n. Bijodat zur alkalischen Titration verbraucht. Daraus ergibt sich, daß das Gift 13.6% Cystin(-S-S-) (entsprechend 3.63% Schwefel) und kein Methionin enthält.

¹²⁾ F. Micheel u. H. Schmitz, B. 71, 703 [1938].

¹³⁾ J. S. Fruton u. H. T. Clarke, Journ. biol. Chem. 106, 667 [1934].

¹⁴⁾ A. Schöberl u. T. Hornung, A. 584, 210 [1938].

¹⁵⁾ F. Micheel u. G. Bode, Naturwiss. 26, 298 [1938].

¹⁶⁾ Angew. Chem. 50, 334 [1937].

3) Cystin(-S-S-), bestimmt nach Polin¹¹⁾ und Sullivan¹⁰⁾: Für die Bestimmungen nach Polin und Sullivan wurden die folgenden Mengen trockenen Giftes während der in der Tafel genannten Zeiten mit 5 bzw. 11 ccm des von du Vigneaud für die Hydrolyse des Insulins angegebenen Salzsäure-Ameisensäure-Gemisches⁹⁾ hydrolysiert:

Stunden	4	8	18	24	28	50	67
mg	3.357	2.162	3.659	7.610	7.980	31.80	29.00
ccm Säuregemisch	5	5	5	5	5	11	11
Gesamtmenge des Hydrolysats	1	1	1	2.5	2.5	10	10
γ Cystin(-S-S-) je ccm Hy- { Sullivan, 350 263 505 416 440 375 320							
drolysat nach { Polin 375 324							
% Cystin(-S-S-) gefunden { Sullivan, 10.4 12.3 13.9 13.6 13.8 11.7 11.1							
nach { Polin 11.7 11.2							

Bei den größeren Mengen verfahren wir wie früher⁵⁾ angegeben. Es wurde auf 10 ccm aufgefüllt und sowohl für die Polin- wie für die Sullivan-Reaktion je 1 ccm benutzt.

Wir fanden es später ausreichend, die für Cystin(-S-S-) höchst spezifische Reaktion nach Sullivan¹⁰⁾ mit je nur 2—4 mg Gift durchzuführen. Dabei wurde gleichzeitig in einer Probe der Wassergehalt bestimmt und von der Einwaage in Abzug gebracht. Wir verfahren so, daß etwa 3 mg Gift in ein längliches, hohes Schliffkölbchen von 40 ccm Inhalt eingewogen wurden. Nach Zugabe von 5 ccm Salzsäure-Ameisensäure-Gemisch wurde das Gift beispielsweise 18 Stdn. unter Rückfluß in der Weise hydrolysiert, daß nur der mit Flüssigkeit bedeckte Boden ins 140—150° warme Ölbad tauchte, so daß keine Substanz an den heißen Wänden antrocknen konnte, was die Ergebnisse erfahrungsgemäß schädigt. Nach Abdestillieren der Säure bei einem Unterdruck von 60 mm wurden 1—2 ccm Wasser zugegeben und auch dieses überdestilliert. Der Rückstand wurde bei 100²/2 mm von den letzten Spuren Säure befreit, 1 ccm 0.1-n. Salzsäure und 4 ccm Wasser zugegeben und nun, wie früher für größere Ansätze beschrieben, verfahren. Wir benutzten zur colorimetrischen Auswertung das Zeiss'sche Stufenphotometer und erhielten für das Naja-Gift nach 18—28-stdg. Hydrolyse 13.6—13.9% Cystin(-S-S-), was 3.63—3.71% Schwefel entspricht.

274. Alfons Klemenc: Bemerkungen über das Tricarbonodioxyd. (Erwiderung zu Otto Diels: Zur Frage des „Pentacarbonodioxyds“¹⁾.)

[Aus d. Institut f. Anorgan. u. Analyt. Chem. d. Techn. Hochschule Wien.].
(Eingegangen am 8. Juli 1938.).

Herr O. Diels hat sich unter dem genannten Titel mit dem von uns beschriebenen Pentacarbonodioxyd befaßt. Es werden eine Reihe von Bedenken angeführt, welche gegen die tatsächliche Auffindung einer solchen Verbindung sprechen. Ich ergreife gerne die Gelegenheit, um die vorläufigen Bedenken mit wenigen Worten zu zerstreuen.

Es wäre zu betonen, daß das als Ausgangsmaterial dienende Tricarbonodioxyd (Kohlensuboxyd), das wir aus Malonsäure hergestellt haben, stets auf das peinlichste nach der Hochvakuumtechnik gereinigt worden ist und auf diese Weise Begleitstoffe, wie Kohlendioxyd, Essigsäure, Wasser und andere vollständig ausgeschlossen sind²⁾. Auf Malonsäureester zurückzugreifen, wäre aus diesem Grunde nicht notwendig. Es war daher eine besondere Prüfung auf den Wasserstoffgehalt der Verbindung vorerst nicht so wichtig, die aber selbstverständlich nachzutragen sein wird. Warum nur bei dem aus Malonsäure nach O. Diels und G. Meyerheim³⁾

¹⁾ B. 71, 1197 [1938].

²⁾ s. A. Klemenc, „Die Behandlung und Reindarstellung von Gasen“, Akad. Verl.-Ges. Leipzig (1938).

³⁾ B. 40, 355 [1907].