

Aus der physikalisch-chemischen Abteilung des Instituto Butantan in São Paulo, Brasilien.

Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung *Bothrops*.

II. Mitteilung.

Eine verbesserte Methode zur Herstellung von Bothropotoxin*.

Von

D. von Klobusitzky.

(Eingegangen am 7. XI. 1935.)

Vor kurzer Zeit haben wir zwei Verfahren beschrieben, die zur Herstellung von Bothropotoxin aus dem Giftdrüsensekret der *Bothrops jararaca* (Wied), einer brasilianischen Otternart, ausgearbeitet wurden¹. Das mit diesen Methoden hergestellte Bothropotoxin war dreimal wirksamer als das Ausgangsmaterial. Wir haben aber schon damals darauf hingewiesen, daß keine von den beiden Methoden als vollkommene zu betrachten ist, da die eine verhältnismäßig geringe und die andere eine sehr schwankende Ausbeute liefert. Außerdem waren beide Verfahren ziemlich kompliziert, so daß eine Wiederholung für andere schwierig sein dürfte. Der Hauptgrund des Bestrebens nach einer besseren Methode lag aber darin, daß es König und mir inzwischen gelungen ist, aus dem Giftdrüsensekret der genannten Schlange eine sehr stark gerinnungsfördernde, jedoch toxisch unwirksame Substanz zu isolieren², was zu den Ergebnissen unserer früheren Versuche¹, nach denen zwischen der gerinnungsfördernden und toxischen Wirkung des Bothropotoxins ein strenger Parallelismus besteht, in Widerspruch stand. Wir mußten also durch Änderung der Herstellungsmethode danach trachten, solches Bothropotoxin herzustellen, dessen Eigenschaften mit diesem neuen Befund im Einklang stehen.

Im Laufe der Zeit ist es gelungen, in der folgenden Methode ein sehr einfaches Verfahren auszuarbeiten, was nicht nur eine größere Ausbeute ermöglicht, sondern dessen Endprodukt neurotoxisch viereinhalbmal wirksamer, hingegen gerinnungsfördernd (am oxalathaltigen Pferdeblut bestimmt und auf die kleinste tödliche Dosis¹ berechnet) fünfmal schwächer ist als das Ausgangsmaterial.

* Ursprünglich war der II. Teil dieser Mitteilungsserie für die Resultate der quantitativen Analysen des Bothropotoxins vorbehalten. Inzwischen wurden aber von Herrn Koll. Dr. Paul König und mir zwei Veröffentlichungen über die immunologischen Eigenschaften des Bothropotoxins der Zeitschr. f. Immunitätsforschung eingesandt, und da die in diesen Versuchen verwendeten Präparate mit dieser neuen Methode hergestellt waren, erscheint uns zweckmäßiger, diese Veröffentlichung vorangehen zu lassen.

¹ von Klobusitzky, D.: Arch. f. exper. Path. **179**, 204 (1935). —
² von Klobusitzky, D. u. P. König: Ebenda, erscheint demnächst.

Die Methode ist wie folgt: Aus dem eingetrockneten Drüsensekret wird mit 8%igem NaCl eine 2%ige Lösung bereitet, die man nachher durch ein gewöhnliches Filterpapier abfließen läßt. Die so gewonnene klare, von Zellresten befreite Lösung wird am Wasserbad möglichst rasch und unter ständigem Rühren auf 60° C erwärmt, nachher soviel 5%ige HCl-Lösung hinzugefügt, bis in ihr grobe Eiweißflocken entstehen (pro 500 ccm Lösung sind ungefähr 12—14 ccm Säure erforderlich). Nachher setzt man das Aufwärmen bis zu 75° C fort, worauf die Lösung 5 Minuten bei dieser Temperatur gehalten wird. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Lösung möglichst rasch abgekühlt und im Kühlraum durch Faltenfilter abfiltriert. Durch diese Hitzekoagulation werden alle typischen Eiweißkörper entfernt, so daß eine zweite Fällung — wie sie früher mit kolloidalem Eisenhydroxydsol gemacht wurde und wodurch manchmal sehr große Verluste an der wirksamen Substanz entstanden sind — überflüssig wird. Zu dem nunmehr eiweißfreien, jedoch peptonhaltigen Filtrat wird soviel n NaOH-Lösung hinzugefügt, daß die Reaktion nur schwach sauer bleibt. Das Präzipitat, was ziemlich viel von der wirksamen Substanz mit sich gerissen hat, wird im Kühlraum mit absolutem Alkohol ausgewaschen und nachher im Vakuum (gleichfalls im Kühlraum) stehengelassen. Nach 24 Stunden wird der — größtenteils aus denaturierten Eiweißkörpern bestehende — Rückstand mit wenig Wasser ($\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens der Lösung) bei 37° ausgeschüttelt und im Kühlraum abfiltriert. Dieses zweite Filtrat, was gleichfalls eiweißfrei ist, wird zu dem ersten Filtrat gegeben. Will man rasch weiterarbeiten, so fügt man zum Gesamtfiltrat das fünffache Volumen absoluten Alkohols hinzu und läßt das Präzipitat nachts über im Kühlraum absetzen. Wird auf ein rasches Arbeiten kein Wert gelegt, so wird das Filtrat durch Ultrafiltrieren oder durch Verdunsten im Hochvakuum auf $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{8}$ seines ursprünglichen Volumens eingeeengt. Bei Anwendung des Ultrafiltrierens ist jedoch darauf zu achten, daß die Durchmesser der größten Poren unterhalb von 330 m μ liegen sollen¹. Nach der Beendigung des Ultrafiltrierens wird die Ultrafiltermembran zerkleinert und mit Wasser bei 37° gut ausgeschüttelt. Nachdem das Waschwassers zum Ultrafiltrat gegeben wurde, versetzt man es wieder mit dem fünf- bis sechsfachen Volumen Alkohol und läßt es 24 Stunden im Kühlraum stehen.

Diese erste Alkoholfällung bedeutet dem früheren Verfahren gegenüber eine wesentliche Verbesserung. Während nämlich bei den älteren Methoden die sich im Filtrat befindlichen, Biuret-Reaktion gebenden Substanzen mit einer sehr vorsichtigen Fällung durch eine 10%ige Metaphosphorsäurelösung entfernt werden mußten, bleiben sie durch die Anwendung dieses Kunstgriffes in Lösung. Der große Vorteil dieser Abänderung wird besonders dann augenscheinlich, wenn man nach dem raschen Verfahren arbeitet.

Der durch die Alkoholfällung entstandene Bodensatz, welcher unter anderem auch das Bothropotoxin enthält, wird — wie es bei den anderen