

[Aus dem Institut für Infectionskrankheiten zu Berlin.]

## Ueber Antitoxine und Toxine.<sup>1</sup>

Von

Prof. Dr. **Brieger**, und Sanitätsrath Dr. **Boer**.  
Vorsteher der Krankenabtheilung  
des Instituts.

---

Alle Versuche, aus dem Blutserum immunisirter Thiere die wirksamen Schutzstoffe möglichst quantitativ und frei von den übrigen Blutbestandtheilen abzuscheiden, sind bisher gescheitert. Die Methoden, welche zur Darstellung concentrirter Antitoxine herangezogen wurden, stützten sich sämmtlich, wie der Eine von uns (Brieger) bereits ausgeführt hat, auf die Anwendung des Principis der mechanischen Ausfällung. Von vornherein ausgeschlossen war hier der sonst in der organischen Chemie mit Vorliebe und ausserordentlichem Erfolge beschrittene Weg der Extraction chemischer Substanzen durch Lösungsmittel, wie Alkohol, Aether u. s. w., da nach Ehrlich und Brieger's Untersuchungen die Antitoxine einzig und allein nur in Wasser sich lösen. Auch jene in der Chemie vielfach gebräuchlichen und von glänzenden Resultaten gekrönten Methoden der Ueberführung chemischer Körper in möglichst unlösliche Doppelverbindungen mit nachfolgender Zerlegung in ihre Componenten begegnet hinsichtlich ihrer Anwendung auf die Antitoxine recht erheblichen Schwierigkeiten; denn die leichte Zersetzlichkeit der letzteren durch chemische Agentien gestattet nur eine recht beschränkte Auswahl unter den chemischen Paarlingen. Und doch scheint, wie aus folgenden Zeilen ersichtlich wird, dieser bisher noch nicht beachtete Darstellungsmodus der Antitoxine am ehesten geeignet zu sein, eine Reindarstellung der Antitoxine und auch

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 12. December 1895.

der Toxine zu ermöglichen. Somit eröffnet sich die Aussicht, dieses für die Theorie und Praxis so überaus wichtige Gebiet der Medicin auch der exakten chemischen Forschung zugänglich zu machen. Vorläufig haben wir in den Kreis unserer Untersuchungen nur das Blutserum von gegen Tetanus und Diphtherie immunisirten Thieren gezogen. Und zwar standen uns zu Gebote:

1. Zur Darstellung der Tetanusantitoxine Ziegen Serum, das einen Immunitätswerth von 800 000 bis 3 000 000 repräsentirte und

2. zur Isolirung der Diphtherieantitoxine Kuhserum von 60 fachen und Pferdeserum von 100 fachen Normal-Einheiten.

Da wir somit gezwungen waren, mit Serumsorten verschiedener Thier-species zu arbeiten, so liess sich hierbei gleich die Frage entscheiden, ob die Verschiedenartigkeit des Serums auch Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der Methoden zur Gewinnung der Antitoxine bedingt. Wir haben uns nun überzeugt, dass die Herkunft des Serums die Brauchbarkeit der als zuverlässig erkannten Verfahren nicht im Mindesten beeinträchtigt.

Unsere gesammten, recht zeitraubenden Untersuchungen im Detail hier mitzuthemen, würde zu weit führen. Wir beschränken uns deshalb nur darauf, über die mehr erfolgreichen Versuche zu berichten.

Vor allen Dingen wurde im Auge behalten unter sorgfältiger Beachtung der üblichen äusserst exakten und mathematisch sicher arbeitenden Werthbestimmungen eine möglichst quantitative Ausbeute zu erzielen und dann zu versuchen, die Antitoxine von den unwirksamen Begleitsubstanzen zu befreien.

---

## I.

Zunächst war unser Augenmerk darauf gerichtet, die bekannten mechanischen Fällungsmethoden behufs Darstellung der Antitoxine aus dem Blute systematisch durchzuprüfen und denselben eventuell neue Combinationen hinzuzufügen.

Von der zwar heftig angefeindeten, vorläufig aber durch keine tatsächlichen Unterlagen widerlegten Annahme ausgehend, dass die Antitoxine selbst Eiweisskörper oder denselben nahestehende Derivate sind, wurden in erster Linie Eiweissfällungsmittel benutzt. Hierbei zeigte es sich, dass gewisse Substanzen aus dieser Gruppe, wie Aethylalkohol, Methylalkohol, Aceton, Essigsäure und Ferrocyankalium, die Mineral- und organischen Säuren in verdünnten Lösungen von 1 Proc. bis 1 Promille nicht bloss die

Antitoxine, sondern auch die Hauptmasse der Blutalbuminate — häufig schon im trockenen Zustande — gewöhnlich aber erst nach dem Trocknen in wasserunlösliche Modificationen verwandeln. Diese werden dann erst mit Hülfe von ganz schwachen Alkalien, die an und für sich die specifische Kraft der Antitoxine nicht im Mindesten beeinträchtigen, wieder in Lösung gebracht. Die nun zu constatirende fast gänzliche Einbusse an specifischer Wirkung von Seiten dieses Fluidums beweist, dass die alkoholischen und stark sauer reagirenden Substanzen die Antitoxine zerstören.

Andere Eiweissreagentien wie Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat allein oder in Verbindung mit phosphorsaurem Natron, Natriumnitrat, metaphosphorsaures Natron u. s. w. liefern Eiweissfällungen, welche zwar Antitoxine mit einschliessen und selbst nach scharfem Trocknen löslich bleiben, die aber für praktische Zwecke unbrauchbar sind, da erst nach vollständigem Ausfällen der Eiweisskörper auch die Antitoxine quantitativ mit niedrigerissen werden.

Dass auch die mechanische Ausfällung von Antitoxinen bei wechselseitiger Einwirkung von mineralischen Stoffen wie z. B. von Chlorcalcium und phosphorsauren Natron, oder durch Bildung von Hydroxyden in statu nascendi aus Erdalkalien oder Schwermetallen in unzulänglicher und in für die Praxis ganz unbefriedigender Weise von Statten geht, war nach unseren früheren Erfahrungen nicht überraschend.

Die physiologische Chemie lehrt nun, dass gewisse Eiweisssubstanzen in der Wärme ergiebiger niedergeschlagen werden als in der Kälte. Besonders bekannt ist es, dass die sogenannten Globuline durch Kochsalz unvollkommen, durch Magnesiumsulfat bei 30° C. dagegen vollkommen ausgesalzen werden. Von dieser Thatsache hat bereits Tizzoni<sup>1</sup> Gebrauch gemacht, ohne auf die quantitativen Ausbeuten Rücksicht zu nehmen.

Tizzoni nahm „1<sup>ccm</sup> Blutserum vom immunen Hunde, setzte dazu Magnesiumsulfat in Krystallen, bis ein Theil derselben bei der Temperatur von 30° C. ungelöst auf dem Boden des Reagensgläschens zurückblieb.“ Tizzoni fährt dann wörtlich fort: „Nach Ablauf der für das Absetzen des Niederschlages nothwendigen Zeit habe ich bei derselben Temperatur filtrirt, mit gesättigter Lösung von schwefelsaurer Magnesia nachgewaschen und endlich habe ich, sowohl das Filtrat als auch den Niederschlag, bei einer Temperatur von 36° in kleinen Dialysatoren zum Dialysiren gegen viel Wasser hingestellt, indem ich mich während dieser ganzen Operation stets nur steriler Gefässe und Flüssigkeiten bediente. Zum Schluss wurden sowohl das Filtrat als auch der Niederschlag, in welch' letzterem die Globuline nach der Dialyse wieder gelöst worden waren, durch Zusatz eines Tropfens von Natriumcarbonatlösung 2 Stunden lang mit  $\frac{1}{2}$ <sup>ccm</sup> filtrirter Tetanuscultur in Berührung gebracht und unter die Haut des Oberschenkels zweier Kaninchen von

<sup>1</sup> Virchow's *Festschrift*. III. S. 48.

ungefähr gleichem Gewichte injicirt. Von diesen Thieren starb das mit dem Filtrat injicirte nach 30 Stunden unter allen Erscheinungen des acuten Tetanus, als ob es einfach eine Injection filtrirter Cultur erhalten hätte, dasjenige hingegen, welches die Injection des Niederschlages bekommen hatte, zeigte gar kein Symptom des Tetanus. Diese Thatsache führte mich zu dem Schlusse, dass das Antitoxin des Tetanus kein Serumalbumin ist, sondern dass es vielmehr ein Globulin ist, oder eine Substanz, welche mit dem Globulin ausgefällt wird.

Wir erwähnen die Methode Tizzoni's hier ausführlich, weil wir in der gleichen Weise mit dem Magnesiumsulfat, das zuerst von Ehrlich und Brieger<sup>1</sup> zur Ausfällung der Antitoxine empfohlen wurde und auch mit Kochsalz, bei Temperaturen von 30 bis 37° C. operirt haben. Doch ist die Anwendung dieser Methoden allein nicht zweckentsprechend, da hierdurch höchstens nur 50 Procent der Antitoxine aussalzbar sind, selbst wenn man die Einwirkung der Wärme bis auf 24 Stunden ausdehnt. Zudem fallen hierbei noch so grosse Mengen unwirksamer Blut-Albuminate mit aus, dass von einer erheblichen Concentrirung kaum die Rede sein kann.

Bei geeigneter Combination des Kochsalzes mit gewissen Salzen, darunter auch mit Magnesiumsulfat, gelang es uns aber, für die Praxis recht brauchbare Resultate zu erzielen. Während eine Vermischung von Kochsalz mit Magnesiumsulfat und anderen schwefelsauren oder phosphorsauren Alkalien, mit Bromiden, wie Bromnatrium, Bromkalium, mit Jodiden, wie Jodnatrium, mit jodsauren oder chloresauren Salzen die Antitoxinfällung aus dem Blutserum nur ungenügend beeinflusst, scheidet Kochsalz in Verbindung mit Chlorkalium unter Umständen auch mit Jodkalium — Substanzen, die an und für sich selbst in der Wärme nicht einmal Spuren von Antitoxinen aussalzen — bei längerer Einwirkung von Temperaturen von 30 bis 37° C., die Antitoxine aus dem Blutserum und auch aus der Milch vollständig quantitativ aus. Die Werthigkeit des Serums bleibt hierbei ohne Belang, eine Thatsache, welcher gegenüber den bisherigen Erfolgen eine grosse praktische Bedeutung beizumessen ist. Und zwar haben uns zahlreiche Controlversuche ergeben, dass man am zweckmässigsten in der Weise vorgeht, dass man in je 10 <sup>ccm</sup> Blutserum, das noch mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt wird, stets 4 <sup>grm</sup> Chlorkalium bezw. Jodkalium löst, die Flüssigkeit mit 4 bis 5 <sup>grm</sup> fein zerriebenen Kochsalz tüchtig durchschüttelt und dann dieses Gemisch der Brutwärme überantwortet.

---

<sup>1</sup> Diese Zeitschrift. Bd. XIII. S. 345.

Unter noch nicht übersehbaren Bedingungen ballen sich bei Anwendung von Jodkalium und Chlornatrium, insbesondere bei längerem Verweilen im Brütschranke die Antitoxine mit einem Theil der Albumine zu unlöslichen Niederschlägen zusammen, welche mit Wasser ohne Verlust ausgewaschen werden können und die nur in schwach alkalischem Wasser das wirksame Princip quantitativ abgeben. Dieses Verfahren soll noch weiter studirt werden.

Beschickt man hingegen das Blutserum mit Chlorkalium und Kochsalz und überlässt diese Mischung 18 bis 20 Stunden lang Temperaturen von 30 bis 37° C., so ist man stets sicher, die Antitoxine quantitativ in Niederschläge zu finden. Der Erfolg dieser Methode ist aber wesentlich an die Dauer der Wärmeeinwirkung gebunden, denn successive Prüfungen ergaben, dass von Stunde zu Stunde die Ausbeute an Antitoxinen wächst, um nach 18 bis 20 Stunden das gewünschte Optimum zu erreichen.

Das Gewicht derartiger gut über Thon abgesaugter, und im Exsiccator getrockneter Niederschläge aus Diphtherie-Heilserum betrug stets ca. 0.4 gr<sup>m</sup> aus 10 ccm<sup>m</sup> Blutserum, die sich etwa in gleichen Theilen Wasser lösen, und schloss ausser der Gesamtmenge der Antitoxine noch Eiweiss und Salze ein. Behufs Höhertreibung der Concentrirung galt es nun, die anhaftenden Salze, ohne Schädigung des Antitoxingehaltes, zu entfernen. Dieser Aufgabe konnten wir uns dadurch nach Wunsch entledigen, dass wir die wieder aufgelösten Niederschläge gegen fliessendes und destillirtes Wasser längere Zeit dialysirten, eine Procedur, bei der, wie uns eine Reihe von Vorversuchen bewiesen, auch nicht der geringste Verlust an Antitoxinen, wenigstens aus dem Blutserum, zu befürchten steht.

Grössere und vorläufig auf diesem Wege nicht zu überwältigende Schwierigkeiten stellten sich der Eliminirung der die Antitoxine umhüllenden Eiweisssubstanzen entgegen. Indessen gelingt es, noch einen erheblichen Bruchtheil der letzteren, bei quantitativen Antitoxinausbeuten dadurch los zu werden, dass man den in Wasser gelösten Chlorkalium-Chlornatrium-Niederschlag mit dem gleichen Volumen feingepulverten Magnesiumsulfat versetzt, und dann das Ganze 2 bis 3 Stunden lang dem Brütschranke anvertraut. Auch die Filtration des dabei entstehenden Niederschlages nebst Auswaschen durch gesättigte Magnesiumsulfatlösung muss im Brütschrank erfolgen. Nimmt dieser Vorgang aber zu lange Zeit in Anspruch, so gewärtigt man recht bedeutende Verluste an Antitoxinen in Folge Zersetzung derselben.

Unterwarf man 10 ccm<sup>m</sup> Diphtherie-Heilserum diesem Verfahren und

dialysirte oder schlemmte mit Chloroform<sup>1</sup> ergiebig, so resultirten ca. 0.2<sup>grm</sup> eines trockenen Rückstandes, der sich in gleichen Theilen Wasser löste und die Antitoxine quantitativ enthielt. Eine Wiederholung dieser Methode verbessert keineswegs das Ergebniss, gefährdet aber die Antitoxinausbeute. Dem praktischen Bedürfniss, aus minderwerthigem Serum recht concentrirte hochwerthige Producte zu extrahiren, dürfte dieses Verfahren vorerst genügen, um so mehr, als auch die Anwendung desselben z. B. auf das Tetanusheilserum genau die gleichen quantitativen Concentrationsgewichte lieferte, wie wir sie bezüglich des Diphtherieheilserum berichten konnten. Auch die Milch immunisirter Thiere, welche bekanntlich stets recht geringwerthig bleibt — wir selbst konnten bei einer gegen Tetanus immunisirten Ziege, deren Blutserum sich auf 3 000 000 bewerthete, im günstigsten Falle einmal eine Milch von 300 000 Immunitätswerth erzielen — bildet für die in Rede stehende Concentrirungsmethode ein dankbares Object. So erhielten wir aus einem Liter Milch dieser Ziege von 30 000 Immunitätswerth ca. 1<sup>grm</sup> eines äusserst leicht löslichen Pulvers, das den vollen ursprünglichen Concentrationsgrad besass.

---

## II.

Wie aus den obigen Zeilen erhellt, lässt sich kaum erwarten, durch mechanische Fällungen, mögen dieselben noch so mannigfaltig variirt werden, der Antitoxine, befreit von dem Ballast der unwirksamen Albuminate habhaft zu werden. Ein Erfolg nach dieser Richtung hin lässt sich nur dann erhoffen, wenn es gelingt:

1. Die Antitoxine mit irgend welchen Chemikalien derart zu paaren, dass eine stabile, widerstandsfähige Doppelverbindung geschaffen wird, von der nun die anhaftenden Eiweisssubstanzen leicht abgespült werden können.

2. Muss diese innige Antitoxinpaarung auf nicht zu eingreifende Weise wieder in seine Componenten zu zerlegen sein. Natürlich darf dadurch die specifische Kraft der Antitoxine nicht im Mindesten alterirt werden, andererseits soll aber auch der begleitende, numehr lästige Paaring beseitigt werden.

Fehlversuche hatten wir zu registriren, als wir es unternahmen, solche Verbindungen zu construiren mit Hilfe von stickstoffhaltigen Substanzen aus der organischen Reihe, wie Pyridinderivaten (Pyridin, Chinolin,

---

<sup>1</sup> Vgl. Brieger u. Cohn. *Diese Zeitschrift*. Bd. XV. S. 445.

Acridin u. s. w.) oder Alkaloiden (Strychnin, Brucin, Morphin u. s. w.), die theilweise bereits für gewisse Zwecke der organischen Chemie (Zuckergruppe, Emil Fischer) erprobt worden sind.

Auf die richtigen Bahnen glaubten wir uns aber geleitet zu sehen, als wir den Salzen der Schwermetalle wiederum<sup>1</sup> eine grössere Beachtung schenkten. Das genauere Studium der seiner Zeit für unsere Zwecke in den Vordergrund gestellten basischen und neutralen Bleiessige gab die Grundlage für unsere weiteren Experimente ab.

Durch recht zahlreiche und mannigfach abgeänderte Einzelversuche mit basischen und neutralen Plumbaten hofften wir Einblicke zu gewinnen in die Bedingungen, unter denen die quantitative Abscheidung der Antitoxine aus dem Blutserum sich vollzieht. In Betracht kommen hierbei die Anwendung:

1. von verdünnten und concentrirteren Lösungen der Bleisalze und zwar
2. Mit oder ohne Berücksichtigung höherer Temperaturgrade, oder
3. In der Form der fractionirten Fällung, und schliesslich
4. Unter Zusatz von mehr oder minder grossen Mengen von Ammoniak bezw. Alkalien.

Wir hatten hier von Anfang an mit dem Uebelstand zu kämpfen, das bald in den Niederschlag, bald in das Filtrat ein mehr oder weniger ansehnlicher Theil der Antitoxine hinein ging. Selbst nur ein höchst geringfügiger Ueberschuss von Bleilösung oder von Alkalien befördert den Uebertritt der Antitoxine in das Filtrat. Das neutrale Bleiacetat verdient aber für unsere Zwecke den Vorzug vor dem basischen Bleiacetat. Wird ersteres in recht verdünnter Lösung mit einer Spur Ammoniak zu Heilserum hinzugegossen, so bleibt die Hauptmasse der überflüssigen Eiweisssubstanzen im Niederschlage, und die Antitoxine finden sich quantitativ angehäuft im Filtrat.

Aus 10<sup>cem</sup> Diphtherie-Heilserum kann nach diesem Verfahren mit nachfolgendem Schütteln des Filtrats mit Ammoniumsulfat, Dialysiren und Trocknen, günstigsten Falls 0.06<sup>gramm</sup> eines leicht löslichen Pulvers von quantitativer Antitoxinwirkung dargestellt werden.

Auf Grund dieser Versuche drängte sich uns die Ueberzeugung auf, dass die Antitoxine mit Salzen der Schwermetalle zu mehr oder weniger lockeren Verbindungen zusammentreten, die sich in Alkalien

<sup>1</sup> Vgl. Brieger u. Cohn. *Diese Zeitschrift*. Bd. XV. S. 6 u. 446. — Brieger. Bd. XIX. S. 106.

jedenfalls äusserst leicht lösen. Dieser Umstand erklärt auch die schwankenden quantitativen Ergebnisse bei der Gewinnung von Antitoxinen mittels der durch Ammoniak hergestellten Metall-Hydroxydniederschläge.

Da die Bleiverbindungen selbst bei geringstem Ueberschuss der Reagentien sich wieder theilweise lösten, so gestaltete sich das Arbeiten mit diesen Reactiven zu heikel. In Folge dessen prüften wir eine grosse Zahl anderer Salze der Schwermetalle auf ihre Fähigkeit sich mit den Antitoxinen zu paaren. Gewisse, stark sauer reagirende Salze wie Eisenchlorid, Eisensulfat, Zinnbichlorid u. s. w. gehen mit den Antitoxinen überhaupt keine Verbindung ein.

Andere Salze wie z. B. das Cadmiumsulfat führen nur höchstens 50 Procent des wirksamen Princips in feste Form über.

Bessere Dienste leisteten uns schon Kupfersulfat und Quecksilberbichlorid, die in Gemeinschaft mit viel Eiweiss die Antitoxine quantitativ ausfällen.

Das Quecksilberbichlorid ist praktisch verwerthbar, wenn man das Blutserum vor dem Ausfällen durch das Sublimat mit sehr geringen Mengen Chlornatrium versetzt, wodurch die Antitoxinpaarlinge ins Filtrat übergehen. Dieses während 24 Stunden analysirte Filtrat wird nun im Vacuum getrocknet, wiederum gelöst, wobei sich dann der Antitoxinpaarling in Gestalt einer im Wasser schwer löslichen amorphen Masse abscheidet.

Auch Silbernitrat, dem mit Kochsalz versetzten Heilserum zugefügt, zeitigt dasselbe Resultat wie Sublimat und Kochsalz, ist aber wegen leichter Zersetzlichkeit praktisch unbrauchbar.

Am besten eignen sich aber für unsere Zwecke gewisse Zinksalze. Zinksulfat sowie Zinkchlorid schlagen die Antitoxine aus dem Heilserum völlig quantitativ nieder. Allerdings erwächst auch hier wiederum die grosse Schwierigkeit, die Zinkverbindung der Antitoxine von den Begleitsubstanzen abzutrennen. Bis zu einem gewissen Grade ist uns aber diese Aufgabe geglückt.

Zur völligen Ausscheidung der Antitoxine aus 10 <sup>cem</sup> Heilserum, das zweckmässig mit 5fachem Volum Wassers verdünnt wird, genügen 20 <sup>cem</sup> einer 1 procent. Zinksulfat- oder Zinkchloridlösung. Nach kurzem Stehen wird der Niederschlag abfiltrirt. Im Filtrat entstehen häufig noch nachträglich Trübungen, um die man sich aber weiter nicht zu kümmern braucht, da der erste Niederschlag bereits die Gesammtmenge der Antitoxine enthält. Nur in recht viel Wasser löst sich dieser Niederschlag wieder gänzlich auf, so dass man denselben vorsichtig auswaschen kann.

Alsdann löst man den Niederschlag in schwach alkalischem Wasser (1 Tropfen Normal-Natronlauge : 20 <sup>cem</sup> Wasser) und leitet Kohlensäure ein.



Hierbei reagiren nun die Zinkverbindungen verschiedenartig, insofern als die mit Zinksulfat vorbehandelten Antitoxine durch Kohlensäure in den Niederschlag hineingerissen werden, während die mit Zinkchlorid gepaarten Antitoxine alsdann im Filtrat verharren. Ausschlaggebend für diese Differenz sind wohl der höhere oder geringere Säuregrad der betreffenden Metallverbindungen.

Bei den weiteren Manipulationen behufs Reinigung erwies es sich von Vortheil, den die Antitoxine einschliessenden Antheil im Exsiccator zu trocknen, da dann die Zinkalbuminate grösstentheils noch vom Wasser aufgenommen werden, die Zinkantitoxine hingegen ungelöst bleiben. Kochsalz, oder noch besser schwache Alkalien, lösen die letzteren leicht. Durch weitere Behandlung mit Kohlensäure gelingt es dann noch, aus dem Zinkchloridantitoxin den grössten Theil des Zinks zu eliminiren. Die Versuche, die letzten Spuren von Zink z. B. durch Schwefelammonium oder Schwefelwasserstoff, welche die Antitoxine nicht weiter schädigen, zu entfernen, sowie die noch hartnäckig anhaftenden geringen Beimengungen von Eiweiss und Zucker gänzlich herauszuwerfen, werden von uns noch weiter fortgesetzt. Vorläufig gelang es uns nach dieser Methode aus 10<sup>cem</sup> Diphtherie- oder Tetanusheilsersum ca. 0.1<sup>gmm</sup> eines in Wasser leicht löslichen Pulvers zu erhalten, das quantitativ die Antitoxine in sich birgt.

### III.

Nichts lag näher, als die bei der Antitoxin-Gewinnung bewährten Methoden auch in ihrer Anwendung auf die Darstellung der Toxine zu übertragen.

Die Chlorkalium-Chlornatrium-Methode versagte gänzlich. Versetzt man aber filtrirte Diphtherie- oder Tetanusbouillon mit Quecksilberchlorid, Zinksulfat oder noch besser mit Zinkchlorid, so werden das Tetanustoxin und das Diphtherietoxin quantitativ ausgefällt.

Da diese Niederschläge im Wasser gänzlich unlöslich sind, so können sie recht sauber und sorgfältig ausgewaschen werden. Nur durch Lösen dieser gereinigten Doppelverbindung in kochsalzhaltigem oder schwach alkalischem Wasser kann man sich davon überzeugen, dass man die Toxine hier quantitativ in Händen hat. Versucht man durch Einleiten von Kohlensäure in die durch Alkali gelösten Zinktoxine das Zink zu entfernen, so verbleibt das Toxin stets beim Zink. Schwefelwasserstoff ist hier nicht anwendbar, da derselbe die Toxine vernichtet. Die gereinigte Zink-Doppelverbindung der Toxine enthält keine Spur von Eiweiss oder Peptonen mehr. Ein sogenanntes Eiweissderivat im land-

läufigen Sinne liegt in den Toxinen der Diphtherie und des Tetanus jedenfalls nicht vor. Ein Liter Diphtherie oder Tetanusbouillon geben ca. 3.0  $\text{grm}$  der getrockneten Zinkdoppelverbindung, die nur ca. 0.3  $\text{grm}$  organische Substanz enthält, welche die Gesamtmenge der Toxine umfasst.

Diese Zinkverbindungen werden nur durch Kohlensäure, nicht durch Mineralsäuren, nicht durch Mittelsalze, z. B. Ammoniumsulfat, nicht durch Phosphormolybdänsäure, nicht durch Phosphorwolframsäure gefällt. Die Abwesenheit der Xanthoprotein-, der Biuret-, der Adamkiewicz'schen Reaction, das Ausbleiben von Rothfärbung beim Kochen mittels Millon's Reagens, das Fehlen jeder Ablenkung nach der einen oder anderen Richtung hin bei der Untersuchung mit dem Polarisationsapparat bestätigen, dass hier weder ein Pepton noch irgend eine Albumose oder Albuminat vorliegt.

Nur beim Kochen mit Eisenchlorid entsteht deutliche Rothfärbung. Ob dieselbe nur durch unwesentliche Beimengungen (Amidosäuren) bedingt ist, werden die weiter fortgesetzten Untersuchungen, welche sich auch auf die Fermente erstrecken, zu ermitteln haben.

Eine Sprengung der Zinkverbindung liess sich vorläufig nur durch Natriumphosphat bewerkstelligen. Den hierdurch in Freiheit gesetzten Toxinen des Tetanus und der Diphtherie haften allerdings auch dann noch recht hartnäckig anorganische Substanzen an.

---