

# Ueber Molekularverhältnisse von Tetanusgiftlösungen.

## I. Mittheilung.

Von

**Dr. W. G. Ruppel** und **Dr. F. Ransom.**

Aus dem Privatinstitut des Professors Dr. Behring für experimentelle Therapie.

(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1899.)

Nach den thermodynamischen Betrachtungen van t Hoff's<sup>1)</sup> ist man berechtigt, in isotonischen Lösungen, d. h. in Lösungen von gleichem osmotischen Druck, eine gleiche Anzahl von Molekülen anzunehmen. Lösungen, welche den gleichen Gefrierpunkt zeigen, enthalten danach gleich viele Moleküle, und umgekehrt besitzen äquimolekulare Lösungen den gleichen Gefrierpunkt. Aus der beobachteten Gefrierpunktserniedrigung einer Lösung lässt sich daher die Zahl der vorhandenen Moleküle berechnen. Der Gefrierpunkt einer Lösung sinkt proportional der Zunahme der Concentration. Die Gefrierpunktdifferenz zwischen Lösungsmittel und Lösung wächst proportional der Anzahl der gelösten Moleküle, gleichviel welcher Art dieselben sind.

Auf diese grundlegenden Gesetze van t Hoff's stützt sich die von Raoult<sup>2)</sup> zur Bestimmung der Molekulargewichte von organischen Verbindungen angewandte Gefrierpunktsernie-

1. J. H. van t Hoff, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. I, S. 481, 1887.

2. F. M. Raoult, Ann. de Chim. et de Phys., 20, p. 217, 1880, 28, p. 133, 1883, 29II, p. 66, 93, 99 u. 115, 1884, 30IV, p. 401, 1885 u. a., O.

drigungsmethode, welche mit Hülfe des von Beckmann<sup>1)</sup> construirten Apparates leicht ausführbar ist.

Nach Raoult-Beckmann's Methode ist es gelungen, die Molekulargrösse vieler organischer Verbindungen zu ermitteln. Wir haben nun versucht, dieses Verfahren auch zur Erforschung der molekularen Verhältnisse in Lösungen von Toxinen und Antitoxinen zu verwenden. Bei diesen Versuchen musste man von vornherein auf die Aussicht verzichten, zu absolut richtigen Zahlengrössen zu gelangen, da wir keine reinen Toxine und Antitoxine besitzen. Wir mussten uns in Folge dessen zunächst darauf beschränken, Lösungen von Toxinen und Antitoxinen, deren Gehalt an wirksamer Substanz durch das Thierexperiment festgestellt werden konnte, hinsichtlich ihrer Gefrierpunkte miteinander zu vergleichen und ferner die Veränderungen zu verfolgen, welche durch das Wachstum der Bakterien und die hiermit eventuell verbundene Giftbildung in den Nährsubstraten oder durch das Auftreten der Antikörper im Blut immunisirter Thiere hervorgerufen werden.

Zahlreiche Versuche mit Tetanusbouillonculturen haben zu folgenden Ergebnissen geführt: Es gelingt thatsächlich, mit Hülfe der Raoult-Beckmann'schen Methode Unterschiede in der Zusammensetzung von Nährflüssigkeiten vor und nach dem Wachstum von Tetanusbacillen zu constatiren: und zwar deuten die nach dem Wachstum stets beobachteten Erniedrigungen des Gefrierpunktes auf eine Vermehrung der Moleküle in den betreffenden Flüssigkeiten. Hierdurch könnte die Annahme als berechtigt erscheinen, dass bei der Lebensthätigkeit der Tetanusbacillen spaltende Prozesse gegenüber der synthetischen vorherrschen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Eine aus Fleischpresssaft und käuflichem Pepton hergestellte Nährbouillon wurde in zwei Portionen getheilt. Die eine Portion wurde mit Tetanusbacillen geimpft, während die andere nur zur Kontrolle diente und deshalb in dieser Abhandlung als Controllbouillon be-

<sup>1)</sup> F. Beckmann, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. II, S. 638, 1888. Bd. VII, S. 324, 1891.

zeichnet werden soll. Beide Portionen wurden sodann in eine Wasserstoffatmosphäre gebracht, und verblieben bis zur Prüfung im Brutschrank bei 37° C.

Unsere Beobachtungen werden am besten aus folgender Tabelle ersichtlich.

Tabelle I.

Datum	Trockengehalt der		Gefrierpunct von			Differenz gegen		Giftwerth 1 ccm. =
	Kontroll- Bouillon	Tetanus- Bouillon	Wasser	Kontroll- Bouillon	Tetanus- Bouillon	Gefrier- Wasser	Gefrier- Bouillon	
7. III. 98	2,95 ‰	—	2,590°	2,170°	—	0,420°	—	—
17. I. 99	2,95 ‰	2,95 ‰	5,165°	4,755°	4,550°	0,615°	0,200°	400000 + Ms.
23. I. 99	4,47 ‰	—	4,770°	4,110°	—	0,660°	—	—
31. I. 99	4,47 ‰	4,42 ‰	4,770°	4,110°	3,910°	0,860°	0,200°	500000 + Ms.
30. I. 99	4,35 ‰	—	4,115°	3,375°	—	0,740°	—	—
3. II. 99	4,35 ‰	4,35 ‰	4,115°	3,375°	3,240°	0,875°	0,130°	2000000 + Ms.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass das Aufbewahren der Kontrollbouillon unter den gleichen Bedingungen, unter welchen das Wachstum der Tetanusbacillen erfolgt, weder eine Veränderung am Trockengehalt, noch am Gefrierpunct hervorruft. Nach dreitägigem Wachstum der Bacillen zeigte der Gefrierpunct nur eine geringe Differenz gegenüber der Kontrollbouillon, während er nach sieben Tagen seine tiefste Lage erreicht hat. Eine weniger concentrirte Bouillon zeigte nach vierwöchentlichem Verbleiben im Brutschrank dieselbe Erniedrigung wie nach 7 Tagen.

Aus obigen Versuchen geht ein Zusammenhang zwischen der Gefrierpuncterniedrigung und dem Giftwerth nicht direkt hervor, indem bei der geringsten Differenz (0,130°) der Giftwerth am höchsten, dagegen bei der grösseren Differenz (0,200°) nach vierwöchentlichem Wachstum der Bacillen am geringsten war.

Die Beobachtung, dass der direkte Giftwerth einer Tetanusbouillon abnehmen kann, während die Cultur sich im Brutschrank unter Luftabschluss befindet, ist bekannt. Dass die Abschwächung des direkten Giftwerthes weit rascher erfolgt, wenn

die Bouillon der atmosphärischen Luft ausgesetzt wird, lässt sich experimentell mit Leichtigkeit nachweisen.

Eine Bouillon, welche nach dreitägigem Wachstum der Tetanusbacillen einen Giftgehalt von 2000000 + Ms. in 1 cem. hatte (d. h. 1 cem. enthielt eine Giftmenge, welche genügte, um 2000000 gr. Lebendmäusegewicht oder 100000 Mäuse von je 20 gr. Gewicht zu tödten), zeigte nach dreitägigem Stehen an der Luft nur noch einen Giftwerth von 500000 + Ms. in 1 cem.

Es ist bemerkenswerth, dass mit dieser Abschwächung auch eine Aenderung des Gefrierpunktes der Tetanusbouillon Hand in Hand ging, und zwar erfuhr der Gefrierpunkt der Bouillon nach dreitägigem Stehen nicht eine Erniedrigung, sondern im Gegentheil eine immerhin bemerkbare Erhöhung. Obige Bouillon zeigte am 3. II. 99 einen Gefrierpunkt bei 3,240°, während der Gefrierpunkt der abgeschwächten Bouillon am 6. II. 99 bei 3,260° lag.

Bei völliger Zerstörung des Tetanusgiftes, wie eine solche durch Erhitzen der Tetanusbouillon auf 100° C. oder darüber erfolgt, wird diese Steigerung der Gefriertemperatur noch mehr in die Augen fallend.

Diese Verhältnisse gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle II.

Datum	Giftwerth 1 cem. =	Gefrierpunct		Differenz		Erhitzt auf
		des Wassers	der Tetanus- Bouillon	Gefrier- Wasser	Gefrier- Bouillon	
3. II. 99	2000000 + Ms.	4,115°	3,240°	0,875°	—	
6. II. 99	500000 + Ms.	4,155°	3,260°	0,855°	0,02°	
6. II. 99	500000 + Ms.	4,115°	3,260°	0,855°	—	
6. II. 99	0	4,115°	3,305°	0,720°	0,135°	100° 1/2 Stunde
6. II. 99	0	4,115°	3,645°	0,470°	0,385°	150° i. v. 10 Min.

Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass bei der Abschwächung des Tetanusgiftes in der Bouillon eine Zusammenlagerung von Molekülen (Condensation) stattfindet.

Auch die Veränderungen, welche das Auftreten der Antikörper im Blute immunisirter Thiere hervorruft, haben wir versucht, mit Hilfe dieser Methode zu verfolgen, ebenso wie wir bemüht waren, die Wechselwirkung zwischen Toxin und Antitoxin durch Veränderungen des Gefrierpunktes der betreffenden Lösungen festzustellen, jedoch sind unsere Versuche noch nicht weit genug gediehen, um jetzt schon definitive Resultate zu geben. Wir behalten uns vor, dieselben in einer späteren Mittheilung zu veröffentlichen.