

Kritische Untersuchungen über den Nachweis von Harnsäure und Purinbasen im Blut und in thierischen Organen.

Von

Professor **W. His d. J.** und cand. med. **W. Hagen.**

(Aus der medicinischen Klinik zu Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 1. Juli 1900.)

Harnsäure und ihre Salze, in fester Form Kaninchen eingebracht, werden von Phagocyten aufgenommen. Freudweiler (Deutsches Archiv 63, S. 266) hat deren Verhalten im Unterhautzellgewebe genauer beschrieben, und in einer späteren Arbeit konnte ich zeigen (Ebenda 67, S. 81), dass die von Zellen aufgenommene Harnsäure allmählich unsichtbar wird und wahrscheinlich der Zersetzung anheimfällt. Es schien uns von grossem Interesse, das Schicksal der Säure innerhalb der Phagocyten, im Blut und den Organen genauer zu verfolgen und zu ermitteln, ob sich ein Transport in entlegene Organe oder eine Umwandlung in andere Purinkörper auf chemischem Wege erkennen liesse.

Bei diesen Untersuchungen kamen wir zur Ueberzeugung, dass die bisher angegebenen Bestimmungsmethoden mit beträchtlichen Fehlerquellen behaftet sein müssten; wir waren daher genöthigt, die Brauchbarkeit dieser Methoden systematisch zu prüfen.

Meinem Freunde Professor Siegfried bin ich für die Erlaubniss, einzelne Untersuchungen in dem von ihm geleiteten chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts auszuführen, und für manchen guten Rath herzlich dankbar, ebenso Herrn Privatdocenten Dr. Burian, der uns die Resultate seiner methodischen Untersuchungen schon vor deren Publication freundlichst mittheilte.

Nachweis der Purinbasen in Organextracten.

Ueber den quantitativen Nachweis der Purinbasen im Blute und in Organextracten existirt eine Reihe von Untersuchungen,¹⁾ die darauf hinausgehen, dasjenige Verfahren zu finden, welches die höchste Ausbeute liefert, ohne gleichzeitig andere Stoffe mit zu bestimmen. Auf Kossel's Anregung namentlich sind Bestimmungen ausgeführt worden, bei denen die gesuchten Stoffe rein dargestellt, gesondert und gewogen wurden: doch ist die Trennung der einzelnen Basen von einander schwierig, mit Verlusten verbunden und bei kleineren Mengen (s. Krüger und Salomon, Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. XXIV, S. 364, 1897 und Bd. XXVI, S. 350, 1898) überhaupt nicht ausführbar, so dass man zur indirekten Methode Zuflucht nehmen muss. Die Basen werden als Silber- oder Kupfersalz gefällt und in diesem der Stickstoff bestimmt. Dabei bleibt indessen unsicher, ob die Basen vollständig in den Niederschlag übergehen und ob nicht etwa fremde, N-haltige Stoffe mitgefällt werden, die den N-Gehalt zu hoch erscheinen lassen. Dies lässt sich entscheiden, wenn man den Organauszug theilt, die eine Hälfte direkt, die andere nach Zusatz einer gemessenen Menge einer Purinbase verarbeitet und sieht, ob die in der zweiten Hälfte gefundene Menge von Purin-N dem Zuwachs entspricht. Derartige Prüfungen liegen auffälliger Weise nicht vor; wir sahen uns genöthigt, dieselben systematisch vorzunehmen, und richteten unsere Aufmerksamkeit auf

1) Die wichtigsten derselben sind beschrieben von:

Kossel, Ztschr. f. physiol. Chemie V, S. 267,

„ „ „ „ „ VI, „ 422,

„ „ „ „ „ VII, „ 7,

„ „ „ „ „ VIII, „ 404;

Schindler, Ztschr. f. physiol. Chemie XIII, S. 432 (1889);

Jnoko, „ „ „ „ „ XVIII, „ 540 (1894);

Salomon, „ „ „ „ „ II, „ 65;

Bockendahl und Landwehr, Virchow's Archiv 84, S. 501.

Salkowski, Virchow's Archiv 50, S. 174, 1870.

„ „ „ „ „ 81, S. 166, 1880.

Stadthagen, „ „ „ „ „ 109, S. 320, 1887.

Burian und Schur, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 59, 1897.

„ „ „ „ „ Pflüger's Archiv, 80, S. 241, 1900.

- I. die Herstellung der Organauszüge,
- II. die Entfernung der Eiweissstoffe und Albumosen.
- III. die Fällungsmittel für die Basen.

I. Die älteren Autoren hatten die zerkleinerten Organen mit Wasser bei mässiger Temperatur (50—60°) ausgezogen und dabei nur jenen Antheil der Purinbasen erhalten, der präformirt im Körper enthalten ist: Kossel (Ztschr. f. physiol. Chemie V, 267) zeigte zuerst, dass mehr Hypoxanthin erhalten wird, wenn die Muskeln mit verdünnter Schwefelsäure ausgekocht werden, wodurch das Nuclein und die anderen Bindungsformen der Basen zerlegt werden. Es muss indessen die Schwefelsäure durch Baryt entfernt werden, wobei Verluste möglich waren. Wir haben einige Kontrollversuche mit Wasser- und Schwefelsäureextraction an Muskeln angestellt, welche ja die Hauptmenge an Basen in präformirtem Zustand enthalten: doch sind die Resultate, aus später zu nennenden Gründen, nicht eindeutig gewesen.

II. Nach Entfernung des fällbaren Eiweisses durch Kochen und Zusatz von Essigsäure bleiben im Extract beträchtliche Mengen von Albumosen zurück. Der Einfluss derselben auf die Silberfällung der Basen ist nur unvollständig bekannt. Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. V) gab an, dass Hypoxanthin bei Gegenwart von viel Pepton oder Eiweiss durch ammoniakalische Silberlösung nicht ausgefällt wird, wohl aber bei Zusatz von Alkohol; später bemerkte er (Ebenda, Bd. VIII), dass Peptone das Ausfällen der Basen nicht hindern und deren Entfernung durch Bleiessig nicht nothwendig sei.

Salkowski, Salomon, Landwehr und Bockendahl fällten die Albumosen aus dem eingedampften Extract durch das doppelte Volumen 95°'igen Alkohols, doch ist diese Fällung, wovon man sich leicht überzeugen kann, eine unvollständige. Stadthagen befreite den schwefelsauren Auszug mit Baryt von Schwefelsäure, mit kohlensaurem Lithion vom überschüssigen Baryt. Die Flüssigkeit durfte mit Ferrocyankali keinen Niederschlag geben; andernfalls wurde sie mit Pepsin verdaut; die Albumosen hat Stadthagen nicht weiter entfernt. Burian und Schur haben bei ihren ausgedehnten Unter-

suchungen zwei Wege eingeschlagen. Auch sie bedienten sich zur Extraction der verdünnten Schwefelsäure, entfernten dieselbe mit Baryt und fanden, dass der Barytniederschlag sämtliches Acidalbuminat und einen Theil der Albumosen einschliesst. Ein anderer Theil der letzteren geht ins Filtrat über und hindert, wie schon Drechsel und Salomon angegeben, die vollständige Fällung der Basen. Diese erste, aus albumosehaltiger Lösung gefällte Basenmenge wurde als «Hauptfällung» bezeichnet, das Filtrat derselben mit basischem Bleiacetat von Albumosen befreit und nochmals mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, welche nun eine zweite, kleinere Basenmenge liefert (Correctur). Die Summe beider Werthe wurde als «corrigirter Werth» bezeichnet.

Ein anderes Vorgehen bestand darin, dass der neutralisirte Organextract gleich Anfangs mit basischem Bleiacetat ausgefällt und das entbleite Filtrat mit Silber gefällt wurde. Die nach letzterem Verfahren gewonnenen Werthe waren um 10—12 % niedriger, als die «corrigirten» Werthe.

Endlich fällten Burian und Schur den Organextract nach Krüger-Wulff (wodurch mehr N ausfällt, als durch Silberlösung), zerlegten den Niederschlag und fällten, nach Entfernung des Kupfers, mit Silber. Diese Werthe waren am niedrigsten: obwohl also Kupfersulfat und Natriumbisulfit im Ganzen mehr N fällten, war die Xanthinbasenfällung am unvollkommensten.

In ihrer letzten Arbeit (Pflüger's Archiv, 80) besprechen Burian und Schur diese Methoden nochmals (S. 306 ff.): sie geben zu, dass die «Hauptfällung» ihrer ersten Methode wegen des Albumosengehaltes zu hohe, die zweite Methode, wegen des Uebergangs von Albumosen in den Bleiniederschlag, zu niedrige Werthe liefern müsste, und dass der wahre Werth in der Mitte liege: doch waren die Differenzen so gering, dass sie für ihre Ueberlegungen nicht ins Gewicht fielen.

III. Ueber den Unterschied der Silber- und Kupferfällung an Basen wurde soeben das Ergebniss von Burian und Schur besprochen: wir verweisen auf unsere unten mitgetheilten Versuche (S. 376).

Eigene Untersuchungen.

Aus unseren zahlreichen Versuchen, die Purinbasen in Kaninchenorganen zu bestimmen, seien hier nur einige wenige als Belege für die Fehlergrösse der benützten Methoden angeführt.

Versuch I (Nr. XVIII unserer Protokolle), angestellt, um den Unterschied der Extraction mit Wasser und mit Schwefelsäure, sowie den Einfluss der Entfernung der Albumosen mit Alkohol (nach Salkowski) auf die Menge der Silberfällung zu zeigen.

Ein Kaninchen, dem Harnsäure subcutan injicirt war, wurde nach 12 Tagen getödtet, Muskeln und Organe zusammen in der Fleischhackmaschine zerkleinert, sorgfältig gemischt: die ganze Masse (1242 g) in 4 gleiche Theile getheilt: 2 Portionen mit Wasser bei 50—60° 12 Stunden digerirt, der Rückstand ausgepresst und noch zweimal mit warmem Wasser ausgezogen: die Filtrate vereinigt («Wasserauszug»). Die 2 anderen Portionen wurden mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprocent ausgezogen, mit Baryt und Lithioncarbonat nach Stadthagen behandelt. Von jeder der 4 Portionen wurde ein Drittel direkt mit ammoniakalischem Silber ausgefällt und in dem gewaschenen Niederschlag der N-Gehalt bestimmt. Die anderen zwei Drittel wurden mit 4 Volumen absoluten Alkohols versetzt, vom Peptonniederschlag abfiltrirt, aus dem Filtrat der Alkohol verjagt, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen, nach dem Erkalten mit Ammoniak versetzt und dann mit salpetersaurem Silber gefällt, der gewaschene Silberniederschlag nach Kjeldahl behandelt. Auf die Gesamtmenge (1242 g) berechnet wurden gefunden

im Wasserextract, bei direkter Fällung	0,1118 N
nach Alkoholbehandlung	1. 0,3089
	2. 0,4687
im Schwefelsäureauszug, bei direkter Fällung	1. 0,3770
	2. 0,4152
nach Alkoholbehandlung	1. 0,2592
	2. 0,3402

Versuch II (Nr. XIX unserer Protokolle). Untersuchung der wässerigen und schwefelsauren Auszüge, unter Zusatz von Guanin.

IV. Schwefelsaurer Auszug mit Zusatz von Guanin

IV a) ging verloren.

b) nach Alkoholbehandlung

N-Gehalt der Organe, nach III b) 0.0151

» des Guanins 0.0107

für beide berechnet 0.0258

gefunden 1. 0.0192

Verlust 0.0066

gefunden 2. 0.0204

Verlust 0.0054

Diese beiden Versuche mögen statt vieler zeigen, dass die nach diesem Verfahren gewonnenen Werthe von einander stark abweichen, und dass eine Gesetzmässigkeit dieser Abweichungen nicht zu ermitteln ist. Die Fällung nach vorheriger Alkoholbehandlung gab bald höhere, bald niedrigere Werthe, als die direkte Fällung; der Schwefelsäureauszug lieferte bald mehr, bald weniger Stickstoff, als der Wasserauszug. Portionen, die ganz gleichmässig behandelt waren und bei denen nur die Flüssigkeitsmenge, in der die Silberfällung vorgenommen wurde, differirte, gaben ganz verschiedene Stickstoffmengen. Versuch II zeigt, dass das dem Organbrei zugesetzte Guanin nur mit beträchtlichen Verlusten wiedergefunden wurde.

Namentlich fiel uns auf, dass die für gleiches Material gefundenen absoluten Werthe für den Basenstickstoff stark von einander abwichen, je nachdem wir die ganze Menge des Organauszuges in concentrirter Form oder kleine Theilmengen in grösserer Verdünnung fällten.

Sehr oft begegnete es uns, dass eine Silberfällung überhaupt nicht zu Stande kam, sondern nur eine Trübung eintrat, die sich nicht zu Boden setzte, bis die Flüssigkeit unter Schwärzung nach mehreren Tagen sich zersetzte. Auch Zusatz von Alkohol, nach Kossel's Empfehlung, blieb häufig unwirksam.

In einigen Fällen, in denen Albumosen besonders reichlich zugegen waren, gelang es uns nicht, durch basisch essigsäures Blei einen Niederschlag zu erzielen: derselbe blieb bei tagelangem Stehen suspendirt. Zusatz von Ammoniak erleichterte

zwar die Fällung, riss aber zugleich die Hauptmenge der Basen nieder.

Wir sehen uns daher genöthigt, den Einfluss der fällungshindernden Stoffe, vor allem der Albumosen, eingehend zu untersuchen.

Versuche über Fällung von Guanin in albumosehaltigen Lösungen.

Zu diesen Versuchen verwendeten wir ein von Georg Gröbler in Leipzig bezogenes Guaninpräparat, welches nur 85% des geforderten Stickstoffs, ziemlich viel Kalk, daneben auch noch andere Basen enthielt, welche die Xanthin-Murexidprobe gaben. Diese Verunreinigungen schaden im vorliegenden Falle nicht, da die Menge des durch Silber fällbaren Basenstickstoffs bei jeder frisch bereiteten Lösung nach Kjeldahl besonders bestimmt wurde.

Als Albumosengemenge benutzten wir das Witte'sche Pepton. Dasselbe enthält nach E. Pick (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 346) wenigstens 5 verschiedene Albumosen, 2 Peptone und ausserdem etwas Eiweiss, das durch Neutralisiren und Kochen der Lösung ausgefällt werden kann. Alle von mir verwendeten Lösungen sind von diesem Eiweissantheil befreit. Ich zog das Wittepepton zu unsern Versuchen einer reinen Albumose vor, weil es als Albumosengemenge die Verhältnisse bei thierischen Organauszügen am besten nachahmt.

Versuch III (Nr. XX unseres Protokolls): Lösung von Wittepepton 1:15, Lösung von salzsaurem Guanin, wovon 10 ccm. 5,6 mg N enthält: ausgefällt mit 10 ccm. n/5 Silbernitrat, 20 ccm. 10% Ammoniak.

1. 50 ccm. Peptonlösung, 10 ccm. Guaninlösung, Gesamtvolumen nach Zusatz von Silberlösung und von Ammoniak 90 ccm., Peptongehalt ca. 3,7%: leichte Trübung, nach 12 Stunden noch kein flockiger Niederschlag;

2. 50 ccm. Peptonlösung, 10 ccm. Guaninlösung, 250 ccm. Wasser, Gesamtvolumen 340 ccm., Peptongehalt ca. 1%: die Lösung bleibt völlig klar. Zusatz von weiteren 10 ccm. Silberlösung erzeugt keinen Niederschlag, all-

mählicher Zusatz bis zu 80 ccm. eine leichte Trübung, die auf Ammoniak sofort verschwindet:

3. 10 ccm. Peptonlösung, 40 ccm. Wasser, 10 ccm. Guaninlösung, Gesamtvolumen 90 ccm., Peptongehalt 0,54 ‰: die Lösung wird stark getrübt, setzt aber keinen Niederschlag ab, auch nicht beim weiteren Zusatz von Silberlösung.

Ein Albumosengehalt von 1/2 ‰ ist also schon im Stande, die Fällung des Guanins zu verhindern.

Wir vermutheten nun, dass ein niedrigerer Gehalt die Fällung zwar nicht ganz, aber doch zum Theil verhindern könne, und untersuchten daher den Stickstoffgehalt des ammoniakfrei gewaschenen Niederschlags. Dabei ergab sich jedoch, dass durch die ammoniakalische Silberlösung ein Theil der Albumosen zugleich mit dem Guanin gefällt und dabei der N-Gehalt des Niederschlags zu gross gefunden wird.

Eine Peptonlösung, die vom Eiweiss befreit ist, gibt an sich mit ammoniakalischem Silber keinen Niederschlag.

Versuch IV (XXb): Verwendet Peptonlösung 1:20, vom Eiweiss durch Kochen und Ansäuern mit Essigsäure befreit: obige Guaninlösung, von der 10 ccm. 5,60 mg N enthielten: zur Fällung wurden 10 ccm. n 5 Silbernitratlösung und 25 ccm. 10 ‰ eiges Ammoniak verwendet; das Gesamtvolumen der Flüssigkeit wurde jedesmal auf 135 ccm. gebracht.

0.5 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0185 ‰	
für Guanin berechnet	5,60 mg
gefunden	<u>7.14</u> >
N zuviel	1.54 mg = 27.1 ‰
1.0 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,037 ‰	
berechnet	5.00 mg
gefunden	<u>7.56</u> >
N zuviel	1.96 mg = 35.0 ‰

2,0 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,074 ‰: wird durch ammoniakalisches Silber opalescent, hat aber nach 12 Stunden keinen Niederschlag abgesetzt.

5 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,185 ‰: trübt sich nicht beim Zusatz von Silberlösung, ist auch nach 12 Stunden noch völlig klar.

Versuch V (XXIII): Wechselnde Mengen Peptonlösung 1:20: zu jedem Versuch 10 ccm. Guaninlösung, enthaltend 4,84 mg N: zur Fällung 10 ccm. n/5 Lösung von Arg. nitr., 25 ccm. Ammoniak, spec. Gewicht 0,950; Gesamtvolumen auf 150 ccm. gebracht.

1. 0,1 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0033%
 berechnet 4,84 mg N
 gefunden 4,98
 N zuviel 0,14 mg = 2,89%
2. 0,2 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0066%
 N zuviel 0,73 mg = 15,03%
3. 0,3 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0099%
 N zuviel 1,04 mg = 21,47%
4. 0,4 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,013%
 N zuviel 1,39 mg = 28,78%
5. 0,5 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0165%
 N zuviel 1,39 mg = 28,78%

Versuch VI (XXIV): Einfluss der Verdünnung auf die Fällung des Guanins in Albumoselösungen.

10 ccm. einer Guaninlösung, enthaltend 3,71 mg N mit 5 ccm. einer 1%igen Lösung von Pepton: das Gesamtvolumen auf 100, 300 und 1000 ccm. gebracht; zur Fällung je 10 ccm. n/5 Silbernitratlösung und 25 ccm. Ammoniak, 0,950 spec. Gewicht.

1. Gesamtvolumen 100 ccm., Peptongehalt 0,033%. Beim Zusatz von Silber erscheint der Niederschlag sofort als bläuliche Trübung und setzt bald gut ab.

N-Gehalt berechnet 3,71 mg
 gefunden 5,66
 zuviel 1,95 mg = 51,52%

2. Gesamtvolumen 300 ccm., Peptongehalt 0,0143%. Auf Zusatz des Silbers schwach bläuliche Trübung: nach 12 Stunden Niederschlag gut abgesetzt.

N berechnet 3,71 mg
 gefunden 5,72
 zuviel 2,01 mg = 54,02%

3. Gesamtvolumen 1000 ccm., Peptongehalt 0,0047%. Auf Zusatz der Silberlösung blieb die Flüssigkeit zunächst klar,

ist nach 12 Stunden opalescent, hat aber nach 8 Tagen keinen Niederschlag abgesetzt.

4. Versuch wie unter II, aber mit 25 ccm. Guaninlösung, entsprechend 9,29 mg. N, Gesamtvolumen 300 ccm., Peptongehalt 0,0137%. Auf Silberzusatz sofort flockige Fällung, die alsbald zu Boden sinkt.

N berechnet	9,29 mg
gefunden	9,80 "
	<u> </u>
zuviel	0,51 mg = 5,49%

Denselben Einfluss des Gesamtvolumens auf die Fällbarkeit des Guanins zeigt

Versuch VII (XXXI): 5 ccm. Guaninlösung, mit 1,86 mg N, mit 5 ccm. 1%iger Peptonlösung.

Gesamtvolumen 20 ccm.:	flockige Fällung, nach 3 Stunden klar abgesetzt
„ 40 „	} Trübung, nach 3 Tagen nicht abgesetzt
„ 60 „	
„ 100 „	

Uebersichtstabelle.

Peptongehalt	N-Ueberschuss
0,0033 %	2,89 %
0,0066 „	15,03 „
0,0099 „	21,47 „
0,0139 „	20,78 „
0,0165 „	28,78 „
0,0185 „	27,1 „
0,037 „	35,0 „
0,074 „	Niederschlag setzt nicht ab
0,033 „	51,52 %
0,014 „	54,02 „
0,047 „	Niederschlag setzt nicht ab
0,137 „	5,49 %

Ergebnisse:

1. Sind Albumosen in einer Guaninlösung vorhanden, so gehen sie entweder in den Silberniederschlag zum Theil über oder sie verhindern dessen Entstehung. Ersteres ist bei geringem, letzteres bei höherem Albumosengehalte der Fall.

2. Die Menge der in den Silberniederschlag übergehenden

Albumosenstickstoffe wächst mit dem Gehalt der Lösung an Albumosen und ihrem Verhältniss zum Guaningehalt. Schon ein sehr geringer Albumosengehalt (0,006%) der Lösung bedingt beträchtliche Fehler (15%), wenn in dem Silberniederschlag der N-Gehalt bestimmt wird.

3. *Schon in geringer Menge (0,05%) können die Albumosen die Entstehung des Silberniederschlags verhindern. Ob ein Niederschlag entsteht oder nicht, hängt ab:*

1. *bei gleicher Basenmenge von dem procentualen Gehalt an Albumosen;*
2. *bei gleicher Basen- und Albumosenmenge von dem Volumen der auszufällenden Flüssigkeit;*
3. *bei gleichem Volumen und Albumosengehalt von der Menge der vorhandenen Base.*

Einfluss des Salzgehaltes auf die Ausfällung der Basen in albumosenhaltigen Lösungen.

Versuch VIII. 5 ccm. Guaninlösung, enthaltend 3,43 mg N. mit 5 ccm. 2%iger Peptonlösung versetzt und mit der ausreichenden Menge von 5 ccm. $\frac{1}{5}$ Silbernitratlösung und ebensoviel Ammoniak ausgefällt.

1. Gesamtvolumen 20 ccm.: dichte Trübung, nach 12 Stunden kein Niederschlag;
2. a) Gesamtvolumen 50 ccm.: sofort schwache Opalescenz, nach 12 Stunden kein Niederschlag;
b) dieselbe Lösung, mit 1,0 g Ammonsulfat: sofort flockige Fällung; nach 12 Stunden gut abgesetzt;
3. a) Gesamtvolumen 100 ccm.: sofort schwache Opalescenz, nach 12 Stunden fast klar;
b) dieselbe Lösung, mit 2,0 g Ammonsulfat: sofort flockige Fällung, nach 12 Stunden Niederschlag gut abgesetzt;
4. a) Gesamtvolumen 200 ccm.: ist nach 12 Stunden noch wasserklar;
b) dieselbe Lösung, mit 5,0 g Ammonsulfat: sofort dichte, nicht flockige Fällung; nach 12 Stunden flockiger Niederschlag;

5. Kontrolle: 5 ccm. Peptonlösung, ohne Guanin, mit 200 g Wasser und 5,0 g Ammonsulfat: gibt mit Ammoniak und Silberlösung keinen Niederschlag, auch nach 12 Stunden keine Trübung:

6. 100 ccm. einer kaltgesättigten Lösung von Ammonsulfat mit 10 ccm. Guaninlösung, Ammoniak und Silberlösung versetzt. Sofort feine flockige Fällung. Nach 12 Stunden abfiltrirt, ammonfrei gewaschen und nach Kjeldahl bestimmt:

berechnet 6,86 mg

gefunden 7,05 „

zuviel 0,19 mg, wahrscheinlich im Silberniederschlag zurückgehaltenes Ammoniak.

7. 50,0 g Zinksulfat in 50 ccm. Wasser gelöst, Ammoniak zugefügt, der Niederschlag von Zinkhydroxyd im Ueberschuss gelöst: Gesamtvolumen 150 ccm. Dazu 5 ccm. Guaninlösung und 5 ccm. Silberlösung gesetzt. Nach 12 Stunden ist kein Niederschlag ausgefallen.

8. 10,0 g Trichloressigsäure in 100 ccm. Wasser gelöst, 5 ccm. Guaninlösung (mit 3,43 mg N), 5 ccm. Silberlösung und Ammoniak bis zu deutlich alkalischer Reaction zugefügt. Sofort schwache Trübung, die beim Umrühren zunächst verschwindet: nach 12 Stunden dichter Niederschlag am Boden des Gefäßes. Dieser wird gesammelt, ammonfrei gewaschen und nach Kjeldahl bestimmt:

berechnet 3,43 mg N

gefunden 4,44 „ „

zuviel 1,01 mg N, offenbar retinirtes Ammoniak.

Ergebnisse:

4. *Die Entstehung eines Silberniederschlags in albumosehaltigen Lösungen wird durch Zusatz von Ammonsulfat begünstigt.*

5. *In kaltgesättigter Lösung von Ammonsulfat kann der Basenstickstoff durch Füllen mit ammoniakalischem Silber bestimmt werden.*

Ebenso in einer 10^o igen Lösung von Trichloressigsäure. In einer Lösung von Zinksulfat ist diese Bestimmung nicht möglich.

**Zusammensetzung des in albumosehaltiger Lösung erhaltenen
Silberniederschlags.**

Versuch IX (XXIV): 0,1 g Pepton Witte und 0,04 g Guanin (reines Präparat, von Drechsel hergestellt) wurden in Wasser und etwas Salzsäure gelöst, mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und Ammoniak im Ueberschuss zugefügt. Der entstandene Silberniederschlag wurde decantirt, bis das Waschwasser, auch beim Einengen bis auf 2 cem., keine Biuretreaction mehr gab. Der Niederschlag wurde mit Schwefelammon zersetzt, aus dem Filtrat mit Essigsäure und Erwärmen der Schwefelwasserstoff entfernt: die Flüssigkeit gibt starke Biuretreaction.

Ebenso, wenn statt mit Silbernitrat mit einer Lösung von Chlorsilber in Ammoniak gefällt wurde. Obige Flüssigkeit, welche neben dem Guanin noch Albumosen enthielt, wurde nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt, der Niederschlag wie oben mit Schwefelammon zersetzt; die Flüssigkeit gab nun, nach Verjagen des SH_2 , keine Biuretreaction mehr.

Aus einem mit verdünnter Schwefelsäure extrahirten Kaninchenmuskel war durch Fällung mit ammoniakalischem Silber und Zerlegung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff eine bräunliche Masse erhalten worden. Dieselbe gab, mit einem Tropfen HCl und etwas Wasser gelöst, starke Biuretreaction. Ein Theil der Lösung wurde nochmals mit Silber gefällt (wobei der Niederschlag sich schlecht absetzte und das Filtrat trüb blieb), der Niederschlag albumosefrei gewaschen, dann mit Schwefelammon zersetzt. Die vom SH_2 befreite Flüssigkeit gab noch deutliche Biuretreaction. Erst nachdem die Silberfällung nochmals wiederholt war, blieb die Biuretreaction in dem zersetzten Niederschlag aus.

Ergebnisse:

6. *Der in albumosehaltigen Lösungen erzeugte Silberniederschlag des Guanins enthält Albumosen eingeschlossen. Dieselben können durch Zerlegen des Niederschlags und abermaliges Füllen mit Silber entfernt werden.*

7. Bei geringer Albumosenmenge genügt einmaliges Umfällen zur Entfernung der Albumosen, bei höherem Albumosengehalt ist dreimaliges Umfällen (im Ganzen also 4malige Silberfällung) nothwendig, um die Reste der Albumosen zu entfernen.

Nun sind die unsicheren und schwankenden Werthe verständlich, die wir bei Kontrollbestimmungen in Organextracten erhielten: je nach dem Gehalt an Albumosen und Basen mussten sie bald zu hoch, bald zu niedrig ausfallen, und selbst in gleichartigen Proben differiren, sobald nur die Flüssigkeitsmenge, in der die Fällung vorgenommen wurde, verschieden war.

Um diese Fehlerquellen zu umgehen, schienen zwei Wege gangbar:

1. konnte der Silberniederschlag, falls er unvollkommen auftrat, durch Zusatz von Ammonsulfat erleichtert und vervollständigt und der Albumosengehalt aus demselben durch mehrfaches Umfällen entfernt werden; 2. konnten die Albumosen vor der Silberfällung entfernt werden.

1. Das Umfällen ist eine Operation, die leicht mit Verlusten verbunden ist; Taylor (Centralbl. f. inn. Medicin, 1897, Nr. 34) hat bereits darauf hingewiesen, dass, um den Silberniederschlag vollständig zu zersetzen, stundenlang Schwefelwasserstoff eingeleitet werden muss, auch Salkowski und Camerer (Zeitschr. f. Biol., N. F. 20, S. 275) haben diese Schwierigkeit wohl erkannt.

Leichter gelingt die Zersetzung in der kochenden Flüssigkeit mit frisch bereitetem Schwefelammon: das häufig colloid ausfallende Schwefelsilber ballt sich meist beim Neutralisiren mit Essigsäure leicht zusammen. Doch sind auch hier Verluste nur bei sehr sorgfältigem Arbeiten zu vermeiden. Der Silberniederschlag wird vom Filter ins Becherglas gebracht, an dessen Seitenwand zunächst mit ganz wenig Wasser fein verrieben und nur allmählich Wasser zugefügt, dann zum Kochen erwärmt und der Flüssigkeit Schwefelammon zugefügt, bis die Flüssigkeit überschüssigen Schwefelwasserstoff entwickelt; trotzdem sieht man oft zwischen den braunen Schwefelsilberkörnchen noch graues, unzersetztes Basensilber, das erst

bei längerem Stehen verschwindet: ganz unkontrollirbar sind die im Centrum der Klümpchen zurückbleibenden, durch den Ueberzug von Schwefelsilber geschützten unzersetzten Massen. In einen Kontrollversuch gab eine Guaninlösung, die 9,32 mg N enthielt, nach einmaligem Umfällen 4,55 mg, nach zweimaligem Umfällen nur noch 3,43 mg N.

Schliesslich ist uns auch begegnet, dass sehr albumosereiche Extracte, die direkt mit Silber keine Fällung lieferten, auch nach Zusatz von Ammonsulfat keinen reinlichen Niederschlag lieferten.

Aus all diesen Gründen bemühten wir uns, Methoden zu finden, durch welche die Albumosen vor der Silberfällung ohne Basenverlust weggeschafft werden konnten.

Versuche über Entfernung der Albumosen vor der Silberlösung.

I. Ammonsulfat und Eisenalaun.

Versuch X. 1. 0,2 g Pepton Witte, 0,04 g Guanin, mit 200 ccm. halbgesättigter Ammonsulfatlösung: nach 3 Tagen kein Niederschlag:

2) derselbe Versuch: der Lösung wird Eisenammoniakalaun zugefügt. Es entsteht ein brauner Niederschlag. Der Niederschlag gewaschen, durch Ammoniak zersetzt, vom Eisenoxydhydrat abfiltrirt: das Filtrat gibt starke Biuretreaction; mit Silberlösung keinen Niederschlag.

Das Filtrat, nach Entfernung der Schwefelsäure durch Baryt, des Baryts durch CO_2 eingedampft: Rückstand in wenig Wasser aufgenommen: gibt keine Biuretreaction mehr, aber nur ganz schwache Silberfällung.

Es müssen demnach Basen in den Eisenniederschlag übergegangen, aber ihre Silberfällung bei dessen Zersetzung durch die Albumosen verhindert worden sein.

Versuch XI (XXX): Eine Guaninlösung, 5,57 mg N enthaltend, wurde mit 10 ccm. 2%iger Peptonlösung versetzt, mit Wasser auf 250 ccm. aufgefüllt; dazu 250 ccm. einer kaltgesättigten Ammonsulfatlösung und 20 ccm. gesättigter Eisenammonalaunlösung gefügt. Der braune Niederschlag in warmer Salzsäure gelöst, das Eisen durch Ammoniak ausgefällt, das Filtrat neutralisirt, zur Entfernung der Albumosen

mit Ammonsulfat gesättigt, mit Ammoniak und Silberlösung versetzt: kein Niederschlag. Es schienen also im Eisenpeptonniederschlag keine Basen vorhanden zu sein.

Das Filtrat der Eisenpeptonfällung, von Schwefelsäure und Baryt befreit, mit Ammoniak und Silber gefällt; es entstand eine schwache Fällung, die aber nur 2,1 statt der gesuchten 5.57 g N enthielt. Somit waren Basen verloren gegangen.

II. Entfernung der Albumosen durch Zinksulfat.

Zinksulfat ist nach Zuntz (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 219) ein gutes Fällungsmittel für die Albumosen des Wittepeptons. Eine Guaninlösung, mit Zinksulfat und soviel Ammoniak versetzt, dass das ausgefallene Zinkhydroxyd wieder völlig gelöst wird, gibt mit Silbernitrat einen Niederschlag von Guaninsilber.

Ist jedoch in der Lösung gleichzeitig Pepton vorhanden, so bleibt, wie wir oben sahen, die Fällung aus.

Es muss somit, nach Entfernung der Albumosen durch Zinksulfat, das Zink vor der Silberfällung entfernt werden.

Versuch XII (XXXIV C): Guanin, entsprechend 6,86 mg N, mit 0,2 g Wittepepton in 100 ccm. Wasser gelöst, mit Schwefelsäure leicht angesäuert, mit Zinksulfat gesättigt, von den ausgefallenen Albumosen abfiltrirt.

1. Direkte Fällung mit Silbernitrat: kein Niederschlag:

2. Zink durch hinreichende Menge Ammoniak als Hydroxyd gefällt, dem Filtrat Silbernitrat zugefügt: kein Niederschlag:

3. Zink durch Schwefelwasserstoff entfernt, dieser im Filtrat durch Essigsäure und Kochen verjagt, dann mit Ammonsilber gefällt, der gewaschene Niederschlag nach Kjeldahl behandelt:

berechnet	6,86 mg
gefunden	6,9 >

also ein geringer, von Ammoniakresten herrührender Ueberschuss an N.

III. Entfernung der Albumosen durch Trichloressigsäure.

Trichloressigsäure (S. Fränkel) ist ein gutes Fällungsmittel für Eiweisskörper: Albumosen fällt es nicht vollständig:

daher enthält der Silberniederschlag Albumosen, die nach Zerlegung durch die Biuretprobe nachgewiesen wurden, und muss umgefällt werden, sonst bekommt man zu hohe Stickstoffwerthe.

Mit Trichloressigsäure allein gibt Guanin keine Fällung.

Versuch XIII (XXXV 8): 5 cem. Guaninlösung, enthaltend 3.43 mg N, mit 0,1 g Wittepepton, 100 cem. Wasser und 10,0 g Trichloressigsäure. Nach einigem Stehen vom Albumosenniederschlag abfiltrirt, Filtrat ammoniakalisch gemacht, mit Silber gefällt und direkt der Stickstoff bestimmt:

berechnet	3.43 mg
gefunden	<u>4.44</u> >

also ein Ueberschuss von 1,00 mg, vom Albumosen-N herrührend.

(XXXIV B.) Guaninlösung 6,86 mg N enthaltend, mit 0,05 g Wittepepton in 100 cem. Wasser gelöst, 10 g Trichloressigsäure zugefügt; das Filtrat, nach Uebersättigen mit Ammoniak, durch Silbernitrat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelammon zersetzt und nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt:

berechnet	6.86 mg N
gefunden 1.	5,67 > >
2.	6.30 > >

IV. Entfernung der Albumosen durch Ammonsulfat.

A. Unvollständige Albumosenfällung.

Versuch XIV (XXXIV D): 1. Guaninlösung, entsprechend 6,86 mg N, mit 0,02 g Pepton Witte in 100 cem. Wasser gelöst, 1 g Ammonsulfat zugesetzt, filtrirt, das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt, der Niederschlag 3 Mal umgefällt:

berechnet	6.86 mg N.
gefunden	1. 4.69 > >
	2. 5,28 > >

2. Guaninlösung, entsprechend 6,37 mg N, mit 2,0 g Pepton Witte in 100 cem. Wasser gelöst, mit ammoniakalischem Silber versetzt. Erst bei Zusatz von 20 g Ammonsulfat entsteht ein Niederschlag. Dieser wird gesammelt, 3 Mal umgefällt (nach der ersten Zersetzung mit Schwefelammon entsteht ein Nieder-

schlag mit ammoniakalischem Silber erst nach Zufügen von 1 g Ammonsulfat):

berechnet	6,37 mg N,
gefunden	5,28 » »

B. Vollständige Albumosenfällung.

3. Guaninlösung, enthaltend 6,86 mg N, mit 0,2 g Pepton Witte in 60 g Wasser gelegt, 1 ccm. 25%ige Schwefelsäure zugefügt (Pick l. cit.): krystallisirtes Ammonsulfat bis zur Sättigung eingetragen, nach einigen Stunden von den Albumosen abfiltrirt, das Filter mit angesäuerter, concentrirter Ammonsulfatlösung nachgewaschen: das Filtrat mit Ammoniak und Silbernitrat gefällt, im gewaschenen Silberniederschlag der Stickstoff ohne Umfällen bestimmt:

berechnet	6,86 mg N.
gefunden	6,12 » »
Verlust	0,74 mg N.

Versuch XV (XXXVI): Guaninlösung, 9,32 mg N enthaltend, wurde mit verschiedenen grösseren Mengen Wittepepton in 100 ccm. Wasser gelöst, 2 ccm. 25%ige Schwefelsäure zugefügt, die Lösung kalt mit Ammonsulfat gesättigt, filtrirt, der Albumosenniederschlag nochmals in etwas Wasser gelöst, und wieder mit Ammonsulfat gesättigt: die Filtrate vereinigt, mit Ammoniak versetzt und mit Silberlösung gefällt, und da nicht völlig albumosenfrei, einmal mit Schwefelammon zersetzt und nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt:

	verlangt	9,32 mg N,	
Peptongehalt 5%	gefunden	7,19 » »	Verlust 2,13 mg.
» 10%	»	8,12 » »	» 1,20 »
» 25%	»	7,19 » »	» 2,13 »

Versuch XVI (XLII): Peptongehalt 5%, Guaninmenge wechselnd, Behandlung wie oben:

verlangt	9,32 mg,	gefunden	5,22 mg,	Verlust	4,1 mg.
»	27,96 »	»	22,48 »	»	5,48 »

Versuch XVII (XLIV): Peptongehalt 5%: wechselnde Menge von Guanin. Die Lösung zum Sieden erhitzt, kochend mit Ammonsulfat gesättigt, zwei Tage auf Eis gestellt, dann filtrirt. Der Rückstand, Pepton und krystallinisches Ammon-

sulfat enthaltend, in heissem Wasser gelöst und nochmals mit Ammonsulfat gesättigt, nach 24 Stunden filtrirt. Die vereinigten Filtrate mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt:

verlangt	18.66 mg N.	gefunden	16.24 mg	Verlust	2.42 mg
„	27.97 „ „	„	24.42 „	„	3.55 „
„	27.97 „ „	„	24.81 „	„	3.16 „

Thatsächlich sind die Verluste aber noch grösser, denn die Ausfällung der Albumosen durch Ammonsulfat im Sieden ist unvollständig und der Silberniederschlag durch SH_2 zersetzt, das Filtrat stark eingeengt, gibt schwache, aber deutliche Biuretreaction.

Werden dagegen die Albumosen in der Kälte durch Sättigen mit Ammonsulfat und Zusatz von 2 cem. 25%iger Schwefelsäure auf 100 cem. Flüssigkeit ausgefällt, so ist die Fällung eine vollständige, und es gehen, wie mehrere Kontrollversuche zeigten, keine Albumosen mehr in den Silberniederschlag über. Die Verluste im Versuch XVI rühren daher, dass in concentrirter Lösung von Ammonsulfat die Silberverbindung des Guanins nicht vollständig ausfällt.

Versuch XVIII (XLVII): Guanin in concentrirter Ammonsulfatlösung, mit ammoniakalischem Silber gefällt:

verlangt	13.99 mg N.	gefunden	11.79 mg.	Verlust	2.20 mg.
„	„	„	11.85 „	„	2.14 „

Versuch XIX (L): Ebenso, Ammonsulfatlösungen mit wechselnder Concentration:

gesättigte Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15.92 mg.	gefunden	14.42 mg.	Verlust	1.50 mg.
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

50%ige Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15.92 mg.	gefunden	15.12 mg.	Verlust	0.60 mg.
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

25%ige Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15.92 mg.	gefunden	15.54 mg.	Verlust	0.38 mg.
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

Die Ammonsulfatlösung muss also vor der Silberfällung mit ca. 3—4 Theilen Wasser verdünnt werden.

Versuch XX (XLIII): Guaninlösung, in 100 cem. 5%iger Peptonlösung, mit 2 cem. 25%iger Schwefelsäure angesäuert, in der Kälte mit Ammonsulfat gesättigt, nach 24 Stunden filtrirt, der Filtrerrückstand in wenig heissem Wasser gelöst, nochmals mit Ammonsulfat behandelt; die vereinigten

Filtrate mit Wasser verdünnt und mit ammoniakalischem Silber gefällt:

verlangt 18,65 mg N, gefunden 18,00 mg, Verlust 0,65 mg,
 » 27,97 » » » 26,35 » » 1,62 »

Übersichtstabelle.

Bestimmung von Guanin in albumosenhaltigen Lösungen.

Methode.	Berechnet mg N	Gefunden mg N	Differenz mg N
I. Silberfällung in albumosenhaltiger Lösung:			
in gesättigter Ammonsulfatlösung,	6,86	7,05	+ 0,19
in 10%iger Lösung von Trichloressigsäure	3,43	4,44	+ 1,01
II. Silberfällung nach vorheriger Entfernung der Albumosen:			
A. durch Ammonsulfat und Eisenalaun			
	5,37	2,1	— 3,2
B. durch Zinksulfat:			
in der Zinksulfatlösung gefällt	6,86	—	— 6,86
Zink durch SH ₂ entfernt	6,86	6,91	+ 0,05
C. durch Trichloressigsäure:			
Silberniederschlag, direkte Bestimmung	3,43	4,44	+ 1,01
» 1 mal umgefällt	6,86	6,30	— 0,56
D. durch Ammonsulfat:			
Albumosengehalt 0,33%	6,86	6,12	— 0,74
» 5%, Ag-Niederschlag 4 mal umgefällt	9,32	7,19	— 2,13
» 10%, » » »	9,32	8,12	— 1,20
» 25%, » » »	9,32	7,19	— 2,13
» 5%, von d. Albumosen sofort abfiltrirt	9,32	5,22	— 4,10
» 5%, » » »	27,96	22,48	— 5,48
» 5%, nach 24 Stunden filtrirt	18,66	18,00	— 0,65
» 5%, » » »	27,97	26,35	— 1,62
» 5%, Albumosen im Sieden ausgesalzen	18,66	16,24	— 2,42
» 5%, » » »	27,97	24,42	— 3,55
» 5%, » » »	27,97	24,81	— 3,16

Ergebnisse:

8. *Durch Zusatz von Ammonsulfat oder Trichloressigsäure gelingt es, in albumosenreichen Lösungen einen Silberniederschlag zu erzielen. Derselbe enthält indessen Albumosen.*

9. *Die Entfernung der Albumosen vor der Silberfällung geschieht:*

durch Ammonsulfat und Eisenalaun, unter starkem Verlust von Basen;

durch Trichloressigsäure unvollkommen, so dass der Silberniederschlag Albumosen einschliesst;

durch Zinksulfat vollständig, doch muss das Zink vor der Silberfällung durch Schwefelwasserstoff völlig entfernt werden, da es die Fällung der Basen hindert;

durch Ammonsulfat in leicht schwefelsaurer Lösung vollständig, falls der Albumosenniederschlag durch Sättigung in der Kälte erzeugt wird und 24 Stunden steht. In diesem Falle ist der Silberniederschlag frei von Albumosen und braucht nicht umgefällt zu werden.

10. *In concentrirter Lösung von Ammonsulfat ist die Silberfällung verzögert und unvollständig, in 25%iger Lösung dagegen vollständig. Es muss daher die von den Albumosen abfiltrirte Lösung vor der Silberfällung entsprechend mit Wasser verdünnt werden.*

Neben der «Ammonsulfatmethode» haben wir noch eine zweite versucht, bei der die Albumosen durch basisches Bleiacetat vor der Silberfällung niedergeschlagen wurden. Nun geht, wie schon Städeler (Ann. der Chemie u. Pharmacie, 116. S. 105), Krüger und Salomon (Zeitschr. f. physiol. Chemie, XXIV, S. 364 ff.) und Burian und Schur (Pflüger's Archiv, 81) beobachtet hatten, ein Theil der Basen in den Bleiniederschlag über. Burian und Schur haben diesen Antheil vernachlässigt; wir hielten es aber doch für nöthig, denselben zu bestimmen, und zerlegten daher den Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff, befreiten das Filtrat durch Ansäuern und Erwärmen von demselben und fällten mit am-

moniakalischer Silberlösung («Correctur»). Ebenso wurde das Filtrat vom Bleiniederschlag behandelt; beide Werthe mussten vereinigt die Menge des Basenstickstoffs repräsentiren. Die Verarbeitung des Bleiniederschlags auf Purinbasen musste nun um so nothwendiger erscheinen, als wir in den Bauchorganen von Kaninchen eine Base fanden (die anderwärts beschrieben werden soll), welche im Gegensatz zum Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Adenin schon durch basisches Bleiacetat, ohne Zusatz von Ammoniak, gefällt wird.

Bestimmung bekannter Guaninmengen in Extracten von Rinds- und Kaninchenmuskel.

Versuch XXI (LI): Je 250 g geschabtes Rindfleisch wurden verarbeitet, die eine Hälfte für sich, die andere nach Zusatz von 50 cem. einer salzsauren Guaninlösung, welche 41,20 mg N enthielt.

Jede Probe wurde zuerst 12 Stunden bei ca. 50° mit 750 cem. Wasser, der ausgepresste Rückstand noch 2 Mal mit je 400 cem. Wasser extrahirt, die vereinigten Filtrate durch Aufkochen mit Essigsäure vom Eiweiss befreit, eingeeengt und in zwei gleiche Theile getheilt. Ein Theil wurde mit Ammonsulfat, der andere, zum Vergleich, nach der oben angegebenen Methode mit basischem Bleiacetat behandelt, die zur Silberfällung vorbereitete Flüssigkeit genau halbirte, jede Hälfte für sich ausgefällt und im Niederschlag der Stickstoff bestimmt.

I. Ammonsulfatmethode:

Die guaninfreie Fraction wurde genau wie im Versuch XX behandelt.

Gefunden wurden	1.	17,5 mg N,
	2.	15,4 » »
		im Mittel 16,5 mg N.

Die Guaninfractionen, deren jede 10,3 mg Guanin-N enthielt.

lieferten	1.	14,56 mg N,
	2.	14,14 » »
		im Mittel 14,35 mg N,

berechnet waren	$16,5 + 10,3 =$	26,8 » »
also bestand ein Deficit von		12,5 mg N.

II. Bleiacetatmethode:

Die guaninfreien Portionen lieferten.

im Filtrat vom Bleiniederschlag	16.7 mg N.
im Bleiniederschlag («Correctur»)	2.0 » »
zusammen	18.7 mg N.

Die Guaninportion gab

im Filtrat vom Bleiniederschlag	26.06 mg N.
im Bleiniederschlag («Correctur»)	2.95 » »
zusammen	29.01 mg N.
berechnet waren $18.7 + 10.3 =$	29.00 » »

Versuch XXII (LII): Muskeln und Knochen eines Kaninchens zusammen in der Fleischhackmaschine zerkleinert, 100 g des Gemenges ohne Guaninzusatz, 400 g nach Zusatz von 75 cem. Guaninlösung, entsprechend 61,80 mg N verarbeitet, jede Portion in zwei gleichen Hälften nach der Ammonsulfat- und der Bleimethode behandelt; Extraction der Muskeln mit Wasser wie im Versuch XXI.

Ammonsulfatmethode:

die guaninfreie Portion lieferte	38.64 mg N.
die Guaninportion	34.5 » »
berechnet waren $38.64 + 15.45 =$	48.9 » »
somit ein Deficit von	14.4 mg N.

Bleimethode:

die guaninfreie Portion lieferte	26.4 mg N.
die Guaninportion	33.2 » »
berechnet waren $26.4 + 15.45 =$	41.9 » »
somit ein Deficit von	8.7 mg N.

Die Ursache dieses Deficits kann nur in dem Umstand liegen, dass eine ungewöhnlich grosse Menge von Basenstickstoff in dem Bleiniederschlag gefunden wurde (13,16 mg. gegen 4,06 mg «Correctur» im Versuch 51) und dass die bei Zerlegung des Bleiniederschlags freigewordenen Albumosen die vollständige Fällung der Basen verhindert haben. Ausserdem aber war denkbar, dass die Extraction des Muskelfleisches durch warmes Wasser unvollkommen gewesen: daher wiederholten wir den Versuch in der Weise, dass wir das Guanin der

einen Hälfte des fertigen, vom Eiweiss befreiten Auszuges zersetzen.

Versuch XXIII (LIII): 250 g Kaninchenmuskeln mit Knochen, fein gewiegt, wurden mit 500 ccm. Wasser bei 50—60° zwei Stunden digerirt, filtrirt, das Filtrat vom Eiweiss befreit und in zwei gleiche Hälften getheilt. Die eine wurde für sich behandelt, die andere mit 25 ccm. Guaninlösung, entsprechend 20,6 mg N versetzt. Jede Hälfte wurde bis zu amphoterer Reaction neutralisirt, mit basischem Bleiacetat vollständig ausgefällt, filtrirt: aus Filtrat und Niederschlag das Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Schwefelblei mehrfach mit Wasser ausgekocht, die Filtrate vereinigt, eingeeengt, halbirte und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt.

Die guaninfreien Portionen gaben

im Filtrat vom Bleiniederschlag (Mittel aus beiden Bestimmungen)	9.8 mg N.
im halben Bleiniederschlag (Correctur)	0.2 „ „
zusammen	10.0 mg N.

Die Guaninportion gab

im Filtrat vom Bleiniederschlag	13.8 mg N.
im halben Bleiniederschlag (Correctur)	0.3 „ „
zusammen	13.8 mg N.
berechnet waren 10.0 + 10.3 (für die Hälfte des Guanins) =	20.3 „ „
somit ein Deficit von	6.5 mg N.

Aus diesen Versuchen ergibt sich:

11. dass die Bestimmung des Basenstickstoffs nach der Ammonsulfatmethode in Organextracten sehr beträchtliche Fehler gibt, indem zu wenig Stickstoff gefunden wird. Da diese Methode in Lösungen, welche nur Albumosen enthalten, befriedigende Resultate gibt, muss angenommen werden, dass in Organauszügen ausser den Albumosen noch andere Stoffe vorhanden sind, welche die Fällung des Guanins als Silbersalz verhindern. Möglicher Weise sind dies die Nucleinsäuren, die ja, wie Kossel gefunden und Schmiedeberg bestätigt hat, mit den Purinbasen durch Silber nicht vollständig fällbare Verbindungen bilden: doch ist nicht ausgeschlossen, dass auch andere Stoffe die gleiche hemmende Wirkung ausüben.

12. die Bleiacetatmethode gab in einem Versuch (Rindfleisch-extract, Versuch 51) ein gutes Resultat, in Versuch 52 und 53 (Auszug von Kaninchenmuskel) aber erhebliches Deficit.

Die Ursache desselben ist in Folgendem zu suchen: Bei der Fällung mit basischem Bleiacetat bleiben die Purinbasen zum grösseren Theil in Lösung, zum kleineren gehen sie in den Niederschlag über. Der Niederschlag wurde mit SH_2 zerlegt; dadurch werden die Basen in Freiheit gesetzt, zugleich aber auch die Albumosen und anderen Stoffe, welche die Silberfällung verhindern. Es sind da dieselben Schwierigkeiten zu überwinden, wie sie oben beim Fällen in albumosenhaltigen Lösungen geschildert sind. Mehrfach ist es uns begegnet, dass ein Silberniederschlag überhaupt erst nach Zusatz von Ammonsulfat entstand, und wir sehen, dass genaue Werthe bei Gegenwart von Albumosen nicht zu erhalten sind. Die Menge der durch das Bleiacetat gefällten Basen ist wechselnd und nicht unbeträchtlich. Aus reinen Lösungen wird Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin durch basisches Bleiacetat (ohne Ammoniak) zwar nicht gefällt, doch können, wie Krüger und Salomon (Zeitschr. f. physiol. Chemie, XXIV, S. 364 ff.) zeigten, Xanthin und 1-Methylxanthin durch ausfallende Farbstoffe mitgerissen werden. Im Kaninchenkörper kommt die obengenannte Base in Betracht, welche zur Xanthin-Gruppe gehört und aus reiner Lösung durch basisches Bleiacetat gefällt wird, und deren Menge in gewissen Extracten nicht unbeträchtlich ist, so dass Fehler in deren *«Correctur»*, sei es ein Zuviel durch mitgerissenen Albumosenstickstoff, sei es ein Verlust durch unvollkommene Ausfällung unvermeidlich ist.

13. Es geht aus alledem die Thatsache hervor, dass wir eine für alle Fälle gültige Methode der Basenbestimmung nicht besitzen.

Fällung in albumosenhaltiger Lösung liefert je nach dem Gehalt der Basen und Albumosen entweder gar keine, oder eine nur unvollkommene Fällung, welche zwar durch Zusatz von Ammonsulfat erleichtert wird, alsdann aber Albumosen einschliesst und von diesen nur durch mehrfaches, mit Verlusten verbundenes Umfällen befreit werden kann. Oder bei geringem Albumosen-

gehalt fällt sofort ein Niederschlag aus, der aber wiederum Albumosen einschliesst und, bei direkter Bestimmung, zu hohen Resultate gibt.

Die Entfernung der Albumosen durch Sättigen mit Ammoniumsulfat liefert unter den obengenannten Cautelen in reinen Albumosenlösungen gute Resultate, lässt aber bei Organextracten im Stich, weil noch andere fällungshindernde Substanzen (Nucleinsäuren?) zugegen sind.

Die Bleiacetatomethode gibt in einzelnen Fällen (Rindsmuskel) gute, in anderen (Kaninchenmuskel) unbefriedigende Werthe, ist indessen das einzige Verfahren, das, wenigstens unter Umständen, brauchbar ist.

Bei Bestimmung in einem bisher ungeprüften Organ ist die Zulässigkeit derselben zuerst zu prüfen, indem man einem Theil des Organuszuges eine gemessene Menge einer bekannten Base zusetzt und ermittelt, ob der hierdurch bedingte Zuwachs an Basen-N in der Analyse richtig zum Ausdruck kommt.

Prüfung der Kupferfällung nach Krüger-Wulff.

Bei der Schwierigkeit, durch Silberfällung befriedigende Resultate zu erhalten, haben wir auch die Fällung der Basen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid nach Krüger-Wulff geprüft. Der Stickstoffgehalt des hierbei ausfallenden Niederschlages darf nicht direkt bestimmt werden, da nach Huppert Eiweisskörper, Rhodan, nach Burian und Schur Albumosen und überhaupt noch zahlreiche andere Stoffe in denselben enthalten sein können. Wir haben den Niederschlag mit Schwefelkalium zersetzt, das Filtrat nach Entfernung des Schwefels mit ammoniakalischem Silber gefällt und den Stickstoff in diesem Niederschlag bestimmt. Die Werthe sind durchweg höher, als bei direkter Silberfällung, z. B.:

	Silberfällung direkt	Silberfällung nach Kupferfällung
Versuch XIV.*) in 100 g Organen	0.0976	0.1556
» » » Muskel	0.0233	0.0478
» XV » Muskel	0.0857	0.0958
» XVI » Organen	0.0644	0.1101
» » » Muskel	0.0324	0.0354

* Versuchsnummern unserer Protokolle.

Trotzdem haben wir diese Methode nicht weiter verfolgt, da wir fanden, dass die obenbeschriebene Base, gleich dem Coffein, Theobromin, nach Krüger-Wulff nicht gefällt wird, die Kupferfällung also, trotzdem sie mehr Stickstoff liefert als die direkte Silberfällung, den Basenstickstoff nicht vollständig enthält.

Ueber den Nachweis der Harnsäure im Blut und in Organauszügen.

Der Eingangs erwähnte Plan unserer Untersuchung erforderte die möglichst genaue Bestimmung der Harnsäure im Blut und den Organen der Versuchsthiere. Zur Bestimmung im Blut hat v. Schröder (Beiträge zur Physiologie, C. Ludwig gewidmet, 1887, S. 89) das Salkowski-Maly'sche Verfahren soweit verfeinert, dass er 1 mg Harnsäure, 100 ccm. defibri-nirtem Rinderblut zugesetzt, wiederfinden konnte: etwas grössere Mengen gewann er mit Verlusten von 0,2 bis 1,8 mg quantitativ wieder.

Bei der Ausführung dieses vielfach benutzten Verfahrens fanden wir gelegentlich Schwierigkeiten beim Enteiweissen des Blutes und bei der Zerlegung des harnsauern Silbermagnesi-salzes durch Schwefelwasserstoff.

v. Schröder befreit das Blut vom Eiweiss zuerst bei neutraler, dann im Filtrat bei schwach saurer Reaction. Beide Fällungen bleiben zuweilen aus: Zusatz von Kochsalz, abwechselndes Zuträufeln von Essigsäure und kohlensaurem Natron und andere kleine Hilfsmittel helfen öfters; lassen sie im Stich, so ist der Zusatz eines Eisensalzes zu versuchen. Vom Citrat, Acetat und Eisenammoniak sahen wir keinen Vortheil, wohl aber von einigen Tropfen Eisenchloridlösung. Es war nur zu fürchten, dass dieses kräftige Oxydationsmittel einen Verlust an Harnsäure bewirkte: dies ist wohl der Fall, doch ist der Verlust relativ nicht sehr bedeutend. In einem Fall fanden wir von 0,1053 g Harnsäure 0,1014 g wieder, also einen Verlust von 3,9 mg = 3,7%.

Versuche, durch Zusatz von Magnesium- oder Ammon-sulfat die Fällung zu erleichtern, ergaben kein günstiges Resultat, indem die Harnsäure grösstentheils mit den Eiweisskörpern ausfiel.

Die Zerlegung des Silbermagnesianiederschlages hat

v. Schröder mit Schwefelwasserstoff statt mit Schwefelkalium vorgenommen, um die Berührung der Harnsäure mit freiem Alkali zu vermeiden. Die Entsilberung mit Schwefelwasserstoff ist indessen nur dann vollständig, wenn das Gas stundenlang eingeleitet wird (Taylor, Camerer s. o.) und das Schwefelsilber fällt bei Gegenwart kleiner Eiweiss- oder Albumosenmengen (besonders bei nicht ganz frischem Blut oder wenn das Entweissen lange gedauert hatte) colloïd aus und geht, selbst wenn bis zur Trockne eingedampft wurde, in gleicher Form wieder in Lösung. Wir sind daher zur Anwendung des Schwefelkaliums zurückgekehrt, bei dem die Zerlegung des Niederschlages weit rascher erfolgt, und haben die schädliche Wirkung des freien Alkali dadurch vermieden, dass wir sofort nach Bildung des Schwefelsilbers die Flüssigkeit mit Essigsäure schwach ansäuerten; dabei ballt sich das Schwefelsilber (begünstigt durch die Anwesenheit eines Neutralsatzes) sehr rasch zusammen und das Filtriren macht keine Schwierigkeit.

Der durch Anwendung des Schwefelkaliums bewirkte Harnsäureverlust ist offenbar sehr gering, wie die nachstehenden Kontrollanalysen beweisen.

Harnsäure gesucht :	Harnsäure gefunden :
26.4 mg	26.1 mg
26.6 »	27.9 »
18.3 »	19.5 »
8.5 »	8.7 »
8.5 »	7.5 »
8.5 »	8.0 »
6.8 »	6.3 »
6.8 »	6.8 »
6.8 »	8.7 »
6.8 »	6.7 »

Alle Proben waren mit 100—200 ccm. defibrinirtem Rinderblut angestellt, die Harnsäure aus dem Stickstoffgehalt des Silberniederschlags bestimmt. Der geringe Ueberschuss, der in einzelnen Fällen gefunden wurde, rührt wahrscheinlich von Ammoniakretention beim Auswaschen her, da bei Anstellung jener Versuche die Arbeiten von Salkowski, Camerer und die Methode von Arnstein noch nicht erschienen waren.

In Organauszügen ist die quantitative Bestimmung der Harnsäure bekanntlich schwieriger und weniger genau, als im Blut. Für die Herstellung der Auszüge und die Silberfällung der Säure sind eine Anzahl von Vorschriften vorhanden.

Meissner (Zeitschr. f. ration. Medicin 31) extrahirte die Organe von Hühnern mit warmem Wasser, befreite vom Eiweiss durch Kochen, fällte das (vom Leberglycogen) opalescente Filtrat mit Baryt und bemerkte, dass Harnsäure «nicht oder nur in seltenen Fällen» in den Barytniederschlag übergeht.

Salkowski (Virchow's Archiv 31, S. 166, 1880), Bockendahl und Landwehr (ebenda 84, S. 561, 1881), Salomon, (Zeitschr. f. phys. Chemie II, S. 65) u. A. zogen ebenfalls mit Wasser aus, befreiten vom Eiweiss durch Kochen, fanden es aber nothwendig, wenigstens die Hauptmenge der Albumosen durch Zusatz des doppelten bis vierfachen Volumens Alkohol aus dem Filtrat vor der Silberfällung zu entfernen. Stadt-hagen (Virchow's Archiv 109, S. 390, 1887) ging von der Möglichkeit aus, es möchte die Harnsäure in zusammengesetzten, durch Silber nicht fällbaren Verbindungen innerhalb der Organe vorhanden sein, daher behandelte er die Organe 12—24 Stunden mit kochender, verdünnter Schwefelsäure, filtrirte, fällte die Schwefelsäure durch Baryt nahezu vollständig aus, neutralisirte genau mit kohlensaurem Baryt und filtrirte nach 24 Stunden. Ebenso behandelte er den mit Schwefelsäure ausgezogenen Organrest, befreite die vereinigten Filtrate durch Kochen und Ansäuern und, wenn dies nicht vollständig gelang, durch Verdauen mit Pepsin von Eiweiss. Auf diese Art konnte er von einigen Deci- oder Centigrammen Harnsäure, die einem Kilo Fleisch zugesetzt waren, 80—85% wiedergewinnen.

Nach Abschluss unserer Untersuchungen hat Wiener, (Ueber Zersetzung und Bildung von Harnsäure im Thierkörper, Arch. f. exp. Pathologie 42, S. 381) die Genauigkeit des Harnsäurenachweises in Organextracten nachgeprüft, da er sich überzeugete, dass «alle in der Litteratur angegebenen Wege keine befriedigenden Resultate gaben». Zu seinem besonderen Zweck extrahirte er die Organe bei 38° unter Schütteln, fällte das Eiweiss durch Kochen und Essigsäurezusatz, wusch die

Eiweissfällung durch Aufkochen mit NaCl-Lösung mehrfach aus, engte ein und fällte ohne vorherige Entfernung der Albumosen, nach Ludwig-Salkowski.

Den Silberniederschlag zersetzte er mit Schwefelnatrium, das durch Einleiten von SH_2 in 30%ige Lösung von kohlensaurem Natron hergestellt war: das bei Gegenwart von Eiweiss colloide Schwefelsilber fällte er durch einige Tropfen gesättigter Lösung von Aluminiumacetat, kochte das Filter mitsamt dem Schwefelsilber mehrfach aus und engte die vereinigten Filtrate ein. Zugleich mit der Harnsäure fielen Fettsäuren aus, die durch kochenden Alkohol extrahirt wurden: dann wurde mit Schwefelkohlenstoff, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und die Harnsäure als solche gewogen.

Nach diesem sorgfältigen Verfahren fand Wiener 89—91% der zu Blut, Hühnereiweiss oder Lebercolatur zugesetzten Harnsäure wieder.

Bei allen diesen Methoden sind bei der Silberfällung der Harnsäure Albumosen zugegen, und da die Resultate nicht unbefriedigend sind, ist anzunehmen, dass die Fällung der Harnsäure weniger als die der Basen durch Albumosen beeinträchtigt wird. Dies hat schon Stadthagen angegeben (a. a. O.), Kontrollversuche haben es uns bestätigt. So erhielten wir durch Silberfällung einer Lösung, die 65 mg Harnsäure enthielt, bei einem Peptongehalt von 0,02% 55 mg, bei 0,5% Pepton 60 mg der Harnsäure wieder. Nur darf kein allzugrosser Ueberschuss von Ammoniak zugesetzt werden und nimmt das Absitzen des Niederschlages mehrere Stunden in Anspruch. Auffallend ist, dass bei Gegenwart von Albumosen die Harnsäure durch ammoniakalische Silberlösung (ohne Magnesiummischung) selbst bei längerem Stehen nicht reducirt wird.

Diese Unabhängigkeit der Harnsäurefällung vom Albumosengehalt beweist, dass man nach der Stadthagen'schen Methode nur relativ geringfügige Verluste erleidet, sofern man alle anderen Fehlerquellen vermeidet. Weniger günstig erwies sich die Wasserextraction und Fällung der Albumosen durch Alkohol nach Salkowski: es gingen öfters Harnsäuremengen von mehreren Centigrammen verloren.

Auch bei der Stadthagen'schen Methode hatten wir Anfangs beträchtliche Verluste, welche, wie sich herausstellte, beim Behandeln mit Baryt und Lithioncarbonat sich einstellten. Das endgiltige Verfahren war folgendes: Die gewogenen Organe oder Muskeln werden in grossen Kolben mit 2 Liter Wasser und 10 cem. concentrirter Schwefelsäure durch 12 Stunden so erhitzt, dass die Flüssigkeit niemals ins Sieden kam. Dabei setzt sich bald das coagulirte Eiweiss zu Boden: die Flüssigkeit bleibt 12 Stunden stehen und wird dann durch grosse Faltenfilter filtrirt, was sehr rasch vor sich geht. Der Filtrerrückstand wird noch zweimal mit Schwefelsäure von 0.5 Volumprocent in der Wärme je 2—3 Stunden extrahirt, sämtliche Filtrate (die, wenn das Sieden vermieden wurde, klar sind) vereinigt und mit soviel Barythydrat versetzt, als der zugesetzten Schwefelsäure entspricht: hierbei kommt in der Lösung ein geringer Ueberschuss von Baryt, da etwas Schwefelsäure im ausgefällten Eiweiss zurückgehalten wird. Harnsäure geht in den Barytniederschlag in der Regel nicht über, obwohl der saure harnsaure Baryt nach Allan und Bensch (Ann. der Chemie und Pharmacie 65, S. 181, 1848) in Wasser fast unlöslich ist. Bereitet man eine Lösung von Harnsäure in kohlensaurem Lithion und setzt Aetzbaryt zu, so kann man im ausgefallenen kohlensauren Baryt, nach Auflösen in Salzsäure, Harnsäure gewinnen und durch die Murexidprobe nachweisen. In den Organextracten hatten wir Anfangs Verluste hierdurch: sie lassen sich indessen vermeiden, wenn der Baryt nur in geringem Ueberschuss zugesetzt wird. Der Niederschlag von schwefelsaurem Baryt sitzt, bei gelinder Wärme, in einigen Stunden gut ab; es wird filtrirt, kohlensaures Lithion bis zu neutraler Reaction zugesetzt und, während der Niederschlag absitzt, von Zeit zu Zeit mit Essigsäure von Neuem neutralisirt. Auch dieser Niederschlag setzt sich am besten bei 30—40°. Eine Probe der überstehenden Flüssigkeit darf weder mit Baryt noch mit Lithioncarbonat mehr Trübung geben. Ist dies, eventuell durch nachträglichen Zusatz, erreicht, so wird filtrirt, mit heissem Wasser mehrfach nachgewaschen, das Filtrat eingeengt (wobei Albumosen flockig ausfallen),

eventuell nochmals filtrirt, dann im Ganzen oder in einzelnen Portionen die Fällung mit Silber vorgenommen.

Mehrfache Kontrollversuche zeigten, dass die auf solche Weise enthaltenen Barytniederschläge weder Harnsäure noch Alloxurbasen enthalten.

Die Verarbeitung der Silberniederschläge geschieht, wie oben beim Blut beschrieben: die Harnsäure wurde, wenn ungefärbt, durch Wägung, sonst durch Stickstoffbestimmung gemessen, in jedem Falle an einem Minimum derselben die Murexidprobe ausgeführt.

Kontrollversuche.

Kaninchen- muskel	Harnsäure	
	zugesetzt:	gefunden:
130 g	22,4 mg	22,6 mg + 0,2 mg
130 „	38,1 „	36,2 „ — 1,9 „ = 95,0%
130 „	49,6 „	48,2 „ — 1,4 „ = 97,2%
130 „	113,2 „	104,5 „ — 8,7 „ = 93,3%
295 „	129,8 „	117,4 „ — 12,4 „ = 90,4%

Es wäre nun werthvoll gewesen, die Harnsäure und die Purinbasen in ein und demselben Extract bestimmen zu können. Wir sehen aber, dass die Basen in albumosenhaltiger Lösung nicht gefällt werden können. Daher untersuchten wir, ob nach Entfernung der Albumosen nach der Ammonsulfat- oder Bleimethode die Harnsäure noch quantitativ bestimmt werden könne.

In gesättigter Lösung von Ammonsulfat ist die Harnsäure an sich nicht löslich, bleibt aber, in gelöster Form zugesetzt, ziemlich lange in übersättigter Lösung, namentlich in Gegenwart von Albumosen fällt das harnsaure Ammon selbst nach mehreren Tagen nur unvollständig aus, sodass die Harnsäure theils im Albumosenniederschlag, theils im Filtrat erscheint. In Letzterem fanden wir in einem Versuch statt 85 mg nur 47 mg. Ebenso bei Anwendung schwefelsaurer Magnesia zur Albumosenfällung. Es ist somit diese Methode zur Bestimmung der Harnsäure nicht brauchbar. Dasselbe gilt für die Fällung der Albumosen mit basischem Bleiacetat, welches ebenso den grössten Theil der Harnsäure als Bleisalz fällt.

Wo also Harnsäure neben Basen bestimmt werden soll, muss das schwefelsaure Extract, nach Behandlung mit Baryt und Lithioncarbonat, in zwei Hälften getheilt werden, deren eine auf Harnsäure, die andere auf Basen verarbeitet wird.

14. *Die Fällung der Harnsäure als Silbermagnesiumsalz wird durch Albumosen in geringer Menge nicht verhindert.*

Für den Nachweis in Organen ist die Extraction mit halbpromcentiger Schwefelsäure nach Stadthagen geeignet. Bei richtiger Ausführung werden 90—97% der zugesetzten Harnsäure wiedergefunden.

Die Ammonsulfat- und Bleiacetatmethode ist zum Nachweis der Harnsäure nicht geeignet. Daher muss der schwefelsaure Organextract auf Harnsäure und Basen in zwei Hälften getrennt rerarbeitet werden.
