

## Die Bestimmung der Purinstoffe in tierischen Organen mittels der Methode des korrigierten Wertes.

Von

Dr. Richard Burian,  
Privatdozent und Assistent  
am physiologischen Institut zu Leipzig

und

Dr. J. Walker Hall,  
Assistant lecturer in Pathology,  
Manchester.

---

(Aus dem physiologischen Institut zu Leipzig).

(Der Redaktion zugegangen am 21. April 1903.)

---

In Band XXX dieser Zeitschrift (S. 350) haben W. His d. J. und W. Hagen kritische Untersuchungen veröffentlicht, welche die quantitative Bestimmung der in den Auszügen tierischer Organe enthaltenen Purinstoffe zum Gegenstande haben. Die Verfasser stellten fest, daß die Vollständigkeit und Reinheit der Purinbasensilberniederschläge besonders durch zwei Umstände erheblich beeinträchtigt werden kann: erstens durch einen (im Vergleich zur vorhandenen Purinkörpermenge) hohen Albumosengehalt und zweitens durch weitgehende Verdünnung der zu untersuchenden Flüssigkeit. Da ferner Guanin, welches zu Organbreien resp. zu Organauszügen zugesetzt worden war, mittels der von His und Hagen angewandten Methoden meist nicht quantitativ wiedergefunden wurde, so gelangten die genannten Forscher zu der Ansicht, «daß wir eine für alle Fälle gültige Methode der Basenbestimmung nicht besitzen»<sup>1)</sup>.

Auf das von Burian und Schur<sup>2)</sup> benutzte (modifizierte Kosselsche Verfahren) des «korrigierten Wertes» können indessen die Erfahrungen von His und Hagen nicht ohne weiteres Anwendung finden, denn diese letzteren Autoren haben sich in keinem ihrer Versuche streng an jenes

---

1) His und Hagen l. c. S. 375.

2) Burian und Schur, Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 53, 1897. — Pflügers Archiv, Bd. 80, S. 241, 1900. — Pflügers Archiv, Bd. 87, S. 239, 1901.

Verfahren gehalten; gerade aber bei Methoden, welche, wie die Bestimmung der Purinkörper mittels ammoniakalischer Silberlösung, in ihren Resultaten von mannigfachen Nebenumständen abhängen, werden auch kleine, gewöhnlich belanglose Abweichungen von Einfluß auf die Ergebnisse sein können. Es scheint uns daher nicht gerechtfertigt, daß Loewi<sup>1)</sup> auf Grund der von His und Hagen gefundenen Tatsachen die Richtigkeit der Purinkörperbestimmungen von Burian und Schur in Zweifel zieht. Vielmehr muß eben erst geprüft werden, ob die Fehlerquellen, welche durch die Untersuchung von His und Hagen aufgedeckt worden sind, auch bei der Methode von Burian und Schur wirklich Irrtümer verursachen. Wir haben diese Prüfung durchgeführt und wollen die hierbei erhaltenen Resultate im nachstehenden mitteilen.

#### I. Genaue Beschreibung der „Methode des korrigierten Wertes“.

Da das in den Untersuchungen von Burian und Schur stets zur Anwendung gelangte Verfahren bisher noch nicht ganz detailliert beschrieben worden ist,<sup>2)</sup> glauben wir, vor allem andern diese Lücke ausfüllen zu sollen.

##### *Herstellung des schwefelsauren Organauszuges.*

Der Organbrei wird zunächst mit einer größeren Menge (1000 ccm für 100 g Brei) stark verdünnter Schwefelsäure (0,5 bis 1 Volumprozent) mindestens zwölf Stunden lang am Rückflußkühler gekocht.<sup>3)</sup> Anwendung einer geringeren

1) Loewi, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 45, S. 159 u. 174.

2) Eine kurze Darstellung desselben s. Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 64, A. und Walker Hall, The purinbodies of foodstuffs, p. 23 Manchester 1902.

3) Bei Verarbeitung größerer Quantitäten von Organbrei kann man das Kochen mit Vorteil in großen (mit Deckel versehenen) emaillierten Töpfen vornehmen, indem man das verdampfte Wasser ungefähr alle zwei Stunden wieder ersetzt. Es dürfen aber nur gut emaillierte Töpfe Verwendung finden; denn nimmt die saure Flüssigkeit Eisen in sich auf, so können bei der nachfolgenden Alkalisierung derselben mit Baryt die Xanthinbasen, wie wir beobachtet haben, als Eisenverbindungen in den Niederschlag übergehen und sich so der Bestimmung (ganz oder teilweise) entziehen.



Flüssigkeitsmenge und kürzere Kochdauer führen (wenigstens bei Nichtbenützung eines Dampfkochtopfes) häufig nicht zum Ziele, teils deshalb, weil dann die Zersetzung der Nucleoproteide eine unvollkommene bleiben kann, teils auch deshalb, weil es unter diesen Umständen — wahrscheinlich wegen der weniger intensiven Aufspaltung der Eiweißkörper — oft äußerst schwierig ist, die Purinbasenniederschläge von biuretgebenden Substanzen frei zu erhalten.

Ein Beispiel diene dazu, das Gesagte zu illustrieren.

Versuch I. (Burian, Winter 1901.) Je 100 g Brei von frischem Rinderpankreas wurden mit wechselnden Mengen von 0,5%iger Schwefelsäure verschieden lange gekocht und zwar:

A und A'	mit je	200 ccm	Schwefelsäure	durch	2	Stunden,
B	» B'	»	1000	»	»	2
C	» C'	»	200	»	»	12
D	» D'	»	1000	»	»	12

Sämtliche acht Zersetzungsflüssigkeiten wurden nach der unten beschriebenen Methode weiter verarbeitet. Die aus A, B, C und D gewonnenen Silberniederschläge (Hauptfällung und Korrekturfällung zusammengenommen) enthielten

A:	B:	C:	D:
0,0993 g N	0,1643 g N	0,1270 g N	0,1828 g N.

Die aus den Proben A', B', C', D' dargestellten Silberniederschläge (Hauptfällungen) dienen zur qualitativen Untersuchung. Sie wurden mit H<sub>2</sub>S zerlegt, und die resultierende Flüssigkeit nach Beseitigung des H<sub>2</sub>S auf die Gegenwart von Eiweißsubstanzen geprüft. Die von A' und besonders die von B' stammende Lösung gab sehr intensive, die aus C' erhaltene Flüssigkeit eben erkennbare Biuretreaktion. Die Hauptfällung von D' enthielt keine biuretgebende Substanz. Der reichlichste und reinste Purinbasenniederschlag wurde also erzielt bei langdauerndem — 12stündigem — Kochen des Organbreies mit großen Flüssigkeitsmengen — 1000 ccm auf 100 g Organ.

Nach beendigtem Kochen wird der schwefelsaure Organextrakt von dem ungelösten Rückstande mittels Faltenfilters getrennt. Filter samt Rückstand wird ausgekocht und das abfiltrierte Waschwasser mit dem ursprünglichen Extrakte vereinigt; diese Prozedur wiederholt man noch zweimal.

#### *Vorbereitung des Auszuges für die Silberfällung.*

Nunmehr wird die Flüssigkeit mit feingepulvertem festem Ätzbaryt unter gutem Rühren stark alkalisch gemacht, der

Barytniederschlag abfiltriert und mit Wasser von 60° C. ausgewaschen und das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat durch einen CO<sub>2</sub>-Strom, der bis zur neutralen oder schwach sauren Reaktion eingeleitet wird, vom überschüssigen Baryt befreit. Auf diesen Teil des Verfahrens ist besondere Sorgfalt zu verwenden. Daß in dem durch den Barytzusatz bewirkten Niederschlag reichlich Eiweißstoffe (Acidalbumin und Albumosen) enthalten sind, und daß die Flüssigkeit durch die Barytfällung stark entfärbt wird, darauf haben Burian und Schur bereits vor sechs Jahren aufmerksam gemacht. Man darf indessen, um möglichst weitgehende Beseitigung der genannten Eiweißsubstanzen und der Farbstoffe zu erzielen, nicht bloß soviel oder wenig mehr Baryt verwenden, als zur Bildung des Barytniederschlages notwendig ist, sondern tut gut, mit einem großen Überschusse von Baryt zu arbeiten.<sup>1)</sup> Fügt man nämlich zu der Flüssigkeit nur bis zu schwacher Alkalescenz Baryt hinzu, so erzeugt ein CO<sub>2</sub>-Strom in dem Filtrate der Barytfällung trotz der deutlichen Alkalescenz desselben keinen Niederschlag — offenbar deshalb, weil der geringfügige Barytüberschuß zur Bildung alkalisch reagierender, durch CO<sub>2</sub> nicht zerlegbarer, löslicher Baryumsalze organischer Säuren verbraucht worden ist. Da nun aber das BaCO<sub>3</sub>-Präzipitat, wie sich leicht zeigen läßt, abermals nicht unbeträchtliche Mengen von Eiweißstoffen (Albumosen) in sich aufnimmt und eine weitere Entfärbung der Flüssigkeit bewirkt, so ist die Bildung dieses BaCO<sub>3</sub>-Niederschlages wünschenswert, also der Zusatz eines bedeutenden Überschusses von Baryt zu dem schwefelsauerem Organextrakte zu empfehlen. Die Gefahr eines Verlustes von

1) Bei der Bestimmung der Harnsäure in schwefelsauren Organauszügen ist nach His und Hagen (l. c. S. 381) ein Barytüberschuß zu vermeiden. Übrigens sind auch in anderer Hinsicht die optimalen Bedingungen für die Harnsäurefällung von denen für die Basenfällung verschieden. Es empfiehlt sich deshalb, Purinbasen und Harnsäure getrennt zu bestimmen: die Basen nach der Methode des korrig. Wertes in schwefelsauren, die Harnsäure nach dem Verfahren von v. Schröder oder Wiener (Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 42, S. 381) in rein wässerigen Extrakten.



Purinstoffen (besonders von Adenin)<sup>1)</sup> durch Ausscheidung schwerlöslicher Baryumverbindung der letzteren besteht dabei durchaus nicht, weil wegen der großen zur Zerkochung des Organbreies angewandten Flüssigkeitsmenge und wegen der häufigen Waschungen die Verdünnung eine sehr beträchtliche ist. Selbstverständlich muß man, um die durch Neutralisation fällbaren Eiweißsubstanzen möglichst vollständig zu beseitigen, die Einleitung der  $\text{CO}_2$  in die stark alkalische Lösung nicht nur bis zur gänzlichen Abscheidung des  $\text{BaCO}_3$ -Niederschlags,<sup>2)</sup> sondern bis zur wirklich neutralen (oder selbst schwach sauren) Reaktion fortsetzen.

Der ungünstige Einfluß der Anwendung zu geringer Barytmengen (und des dadurch bedingten Wegfalles der  $\text{BaCO}_3$ -Fällung) äußert sich vornehmlich in einem erhöhten Albumosengehalte der für die Hauptfällung zu benützenden Flüssigkeit. Infolge dessen wird die Menge der Hauptfällung verringert, d. h. es bleibt ein größerer Teil der Purinstoffe für die Korrekturfällung zurück. Auch enthält die Hauptfällung dann manchmal Beimengungen, welche Biuretreaktion zeigen. Die drei im nachfolgenden beschriebenen Versuche liefern Beispiele für das Gesagte.

Versuch II. (Burian, Herbst 1901.) 460 g Brei von Schweinepankreas wurden mit 5 Litern Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht und die Gesamtmenge der Flüssigkeit nach dem Abfiltrieren und Waschen auf 6000 ccm gebracht. Hiervon wurden zwei Portionen, **A** und **B**, zu je 2775 ccm abgemessen. Lösung **A** wurde mit einem geringen, Lösung **B** mit einem großen Überschuß von festem Baryt versetzt: **A** zeigte deutliche Alkaleszenz, aber in dem Filtrat von dem Barytniederschlag bewirkt  $\text{CO}_2$  keine Eällung; **B** wurde sehr stark alkalisch,  $\text{CO}_2$  rief im Filtrat vom Barytpräzipitat einen reichlichen Niederschlag hervor. Beide Portionen wurden in gleicher Weise nach dem unten beschriebenen Verfahren weiter behandelt. Das Volumen der für die Hauptfällung vorbereiteten Flüssigkeit betrug schließlich bei **A** sowohl als auch bei **B** je 250 ccm. Von den beiden Lösungen wurde nun

1. je ein Teil zu 25 ccm, **A**<sub>1</sub> und **B**<sub>1</sub>, für die Bestimmung der in den Flüssigkeiten enthaltenen Albumosen verwendet;

1) Das Adenin gibt mit Barytwasser einen Niederschlag (Kossel, Diese Zeitschr., Bd. X, S. 257, 1890).

2) Die Reaktion der Flüssigkeit ist dann immer noch recht deutlich alkalisch, wegen der Gegenwart der oben erwähnten durch  $\text{CO}_2$  nicht zerlegbaren alkalisch reagierenden Ba-Verbindungen.

2. je 75 ccm **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** dienten zur Darstellung von Purinbasen-Silberniederschlägen, die qualitativ untersucht wurden (vgl. unten Versuch XXI);

3. je eine Portion **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>** zu 50 ccm (entsprechend 42,55 g frischen Pankreas) wurde nach der später geschilderten Methode zur quantitativen Bestimmung des Purin-N durch «Haupt-» und «Korrekturfällung» benützt, und je eine weitere Portion zu 50 ccm **A<sub>4</sub>** und **B<sub>4</sub>** wurde nach vorausgehendem Zusatz von je 10 ccm einer alkalischen 0,783%igen Guaninlösung <sup>1)</sup> (= 0,0783 g Guanin mit **0,0363** g N) in der gleichen Weise der quantitativen Bestimmung des Purin-N unterzogen.

Die bei diesen Prüfungen erhaltenen Resultate waren die folgenden:

1. **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>** wurden bei schwefelsaurer Reaktion mit Zinksulfat gesättigt und in den so erhaltenen Albumosenniederschlägen der N-Gehalt ermittelt. Lösung **A<sub>1</sub>** enthielt **0,344**%, Lösung **B<sub>1</sub>** **0,292**% Albumosen-N.

2. Über die qualitativen Untersuchungen der in **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** erzeugten Purinbasen-Silberniederschläge wird weiter unten (Vers. XXI, S. 375) berichtet werden. Hier sei nur hervorgehoben, daß weder der aus **A<sub>2</sub>** noch der aus **B<sub>2</sub>** erhaltene Niederschlag Biuretreaktion liefernde Beimengungen enthält.

3. Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen:

Tabelle I.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe, d. h. Gesamtpurin-N	Gesamtpurin-N in Prozenten des frischen Organbreies
A <sub>3</sub>	0,0444	0,0097	<b>0,0541</b>	0,1271 %
A <sub>4</sub>	0,0513	0,0357	berechnet (vorstehende «Summe» + 0,0363): <b>0,0904</b> gefunden: <b>0,0871</b>	—
B <sub>3</sub>	0,0500	0,0025	<b>0,0525</b>	0,1234 %
B <sub>4</sub>	0,0700	0,0177	berechnet (vorstehende «Summe» + 0,0363): <b>0,0888</b> gefunden: <b>0,0877</b>	—

1) Das Nähere über das angewendete Guanin s. unten, S. 385.



In diesem Falle war also die unter Anwendung eines geringen Barytüberschusses bereitete Lösung A ungefähr um den 6. Teil albumosenreicher, als die mit großem Barytüberschuß und nachfolgendem  $\text{BaCO}_3$ -Niederschlag hergestellte Lösung B. Die Folge hiervon ist, daß in  $A_3$  resp.  $A_4$  die Hauptfällungen kleiner und die Korrekturniederschläge größer ausfielen, als in  $B_3$  resp.  $B_4$ . Der Wert für den Gesamtpurin-N (Summe des Haupt- und Korrekturfällungs-N) erscheint zwar hierdurch bei  $A_3$  und  $A_4$  in dem vorliegenden Falle nicht beeinträchtigt. Es ist aber klar, daß es schon deshalb wünschenswert ist, den ganz überwiegenden Teil der Purinbasen in der Hauptfällung abzuscheiden, weil die umständlichen Manipulationen, die der Korrekturfällung vorangehen, und insbesondere wohl der die letztere vorbereitende Bleiacetatzusatz leicht zu Verlusten Anlaß geben können. Tatsächlich werden wir sofort Versuche kennen lernen, in denen das ungünstige gegenseitige Verhältnis der Haupt- und Korrekturfällung auch den Wert der «Summe» ganz merklich schädigt.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß die zugesetzte Guaninmenge sowohl bei A, als auch bei B mit geringen Verlusten ( $A_4$  — 3,3 %  $B_4$  — 1,3 %) wiedergefunden wurde.

Versuch III (Burian, Herbst 1901). 1000 g Pferdefleisch werden mit 5 l Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Gesamtflüssigkeitsmenge nach dem Filtrieren und Waschen 10 500 ccm. Dies Quantum wird zunächst in folgende vier Portionen geteilt:

1. in zwei Portionen zu je 4100 ccm, **A** und **B**, und
2. in zwei Portionen, **A<sub>4</sub>** und **B<sub>4</sub>**, à 1050 ccm (entsprechend je 100 g Fleisch); zu  $A_4$  und  $B_4$  werden je 10 ccm einer 0,708 %igen Xanthinlösung<sup>1)</sup> (= 0,0708 g Xanthin mit 0,0261 g N) hinzugefügt.

A und  $A_4$  werden mit Baryt bis zur schwachen Alkaleszenz versetzt;  $\text{CO}_2$  erzeugt in den Filtraten der Barytfällungen keinen Niederschlag. B und  $B_4$  werden durch Baryt stark alkalisch gemacht;  $\text{CO}_2$  ruft in den Filtraten Abscheidung von  $\text{BaCO}_3$  hervor.

Nach Durchführung der unten zu beschreibenden Maßnahmen beträgt das Volumen der zur Hauptfällung vorbereiteten Flüssigkeit bei  $A_4$  und  $B_4$  je 310 ccm, bei A und B je 1230 ccm. Die letztgenannten beiden Portionen, A und B, werden nun in je drei Teile zerlegt, und zwar werden

- 1 a) je 100 ccm, **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>**, zur Albumosenbestimmung verwendet;
- 1 b) je 800 ccm, **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>**, dienen zur Erzeugung von Purinbasensilberniederschlägen, die qualitativ untersucht werden (vgl. Vers. XXII);
- 1 c) je eine Portion, **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>**, zu 315 ccm (entsprechend 100 g Fleisch) endlich wird der quantitativen Purin-N-Bestimmung nach dem unten geschilderten Verfahren unterworfen.

1) Das Nähere über das verwendete Xanthin s. unten S. 385.

Es werden die nachfolgenden Resultate erhalten:

1 a) Lösung **A<sub>1</sub>** enthält **0,1205** %, Lösung **B<sub>1</sub>** **0,0759** % durch Zinksulfat bei schwefelsaurer Reaktion aussalzbaren N.

1 b) Über die qualitative Untersuchung der in **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** dargestellten Purinbasenniederschläge wird unten (Versuch XXII, S 377) berichtet werden.

Hier ist nur zu erwähnen, daß der aus **A<sub>2</sub>**, nicht aber der aus **B<sub>2</sub>** erhaltene Silberniederschlag mit biuretgebender Substanz verunreinigt war.

1 c) und 2. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen sind verzeichnet in

Tabelle II.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe, d. h. Gesamtpurin-N	Gesamtpurin-N in Prozenten des frischen Organbreies
A <sub>3</sub>	0,0377	0,0180	<b>0,0577</b>	0,0577 %
A <sub>4</sub>	0,0768	0,0028	berechnet (vorstehende «Summe» + 0,0261): <b>0,0838</b> gefunden: <b>0,0796</b>	—
B <sub>3</sub>	0,0473	0,0078	<b>0,0551</b>	0,0551 %
B <sub>4</sub>	0,0797	0,0024	berechnet (vorstehende «Summe» + 0,0261): <b>0,0812</b> gefunden: <b>0,0821</b>	—

Hier enthält die unter Anwendung eines geringen Barytüberschusses bereitete Lösung A mehr als 1½ mal soviel Albumosen, wie die mit großem Barytüberschuß und nachfolgendem BaCO<sub>3</sub>-Niederschlag hergestellte Lösung B. Dementsprechend haben die Hauptfällungen in A<sub>3</sub> resp. A<sub>4</sub> abermals die Tendenz, an Größe hinter jenen in B<sub>3</sub> resp. B<sub>4</sub> zurückzubleiben. Überdies sind die in der Flüssigkeit A erzeugten Hauptfällungen, wie die qualitative Untersuchung bei A<sub>2</sub> lehrt, durch albumosenartige Substanz verunreinigt, während die aus der Lösung B erhaltenen Hauptfällungen von einer solchen Beimengung frei sind.



In diesem Falle lassen nun auch bereits die «Summen»-Werte den nachteiligen Einfluß des ungenügenden Barytzusatzes erkennen. Für  $A_3$  ist der Gesamtpurin-N zwar größer als für  $B_3$ , offenbar deshalb, weil der wahrscheinlich vorhandene Verlust (vgl.  $A_4$ ) durch die Albumosenbeimengung überkompensiert wird. Für  $A_4$  aber ist die «Summe» deutlich kleiner als für  $B_4$ . Gegenüber dem aus dem Gesamtpurin-N von  $A_3$  resp.  $B_3$  einerseits und dem zugesetzten Xanthin-N andererseits berechneten Werte besteht bei  $A_4$  ein Verlust von ca. 5,0 %, bei  $B_4$  ein Plus von 1,1 %. Noch deutlicher treten die Vorteile der Anwendung eines großen Barytüberschusses zutage bei

Versuch IV (Burian, Herbst 1901). 325 g Kalbsthymusbrei werden mit 3500 ccm Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent 12 Stunden lang gekocht. Nach dem Filtrieren und Waschen beträgt die Gesamtmenge der Flüssigkeit 10 000 ccm. Dies Quantum wird zunächst analog dem in Versuch III eingehaltenen Vorgange in vier Teile zerlegt, nämlich:

1. in zwei Portionen zu je 3950 ccm, **A** und **B**, und

2. in zwei Portionen, **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>**, à 1000 ccm (entsprechend 32,5 g frischer Thymus). **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>** erhalten einen Zusatz von je 20 ccm einer 0,783 %igen Guaninlösung (= 0,1566 g Guanin mit 0,0726 g N).

A und  $A_3$  werden mit einem geringen Barytüberschuß behandelt, so daß  $CO_2$  in den Filtraten der Barytniederschläge keine Fällung bewirkt; B und  $B_3$  dagegen werden mit Baryt stark alkalisch gemacht, so daß durch den  $CO_2$ -Strom in den Filtraten reichliche  $BaCO_3$ -Ausscheidung hervorgerufen wird. Nach beendeter Vorbereitung der Flüssigkeiten für die Purinkörperfällung beträgt das Volumen der Lösungen  $A_3$  und  $B_3$  je 170 ccm, jenes der Lösungen A und B je 790 ccm. Die beiden Portionen A und B werden nunmehr in je zwei Parteien geteilt:

1a) Je 585 ccm, **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>**, werden für die Herstellung von Purinbasensilberniederschlägen benützt, die zur qualitativen Untersuchung gelangen (vgl. Versuch XXV); es muß jedoch bemerkt werden, daß die Proben  $A_1$  und  $B_1$  äußerer Umstände halber vor der Verarbeitung mehrere Tage lang im Laboratorium stehen bleiben;

1b) je eine Portion, **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>**, à 200 ccm (entsprechend 32,5 g frischer Thymus) wird zur quantitativen Purin-N-Bestimmung verwendet; die Verarbeitung von  $A_2$  und  $B_2$  erfolgt ohne Verzug und möglichst rasch.

#### Resultate:

1a) Über die qualitative Untersuchung der aus  $A_1$  und  $B_1$  erhaltenen Purinbasenfällungen wird unten (vgl. Versuch XXV, S. 380) das Nähere mitgeteilt werden. Hier sei nur bemerkt, daß keiner der beiden Niederschläge Albumosen enthält.

1b und 2) Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen:

Tabelle III.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe, d. h. Gesamtpurin-N	Gesamtpurin-N in Prozenten des frischen Organbreies
A <sub>2</sub>	0,1466	0,0062	<b>0,1528</b>	0,4701 %
A <sub>3</sub>	0,1649	0,0393	berechnet (vorstehende Summe + 0,0726): <b>0,2254</b> gefunden: <b>0,2042</b>	—
B <sub>2</sub>	0,1514	0,0054	<b>0,1568</b>	0,4824 %
B <sub>3</sub>	0,2226	0,0061	berechnet (vorstehende Summe + 0,0726): <b>0,2294</b> gefunden: <b>0,2287</b>	—

Wiederum sind also die Hauptfällungen in den mit geringem Barytüberschusse bereiteten Lösungen A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> kleiner als in den korrespondierenden unter Anwendung großer Barytmengen hergestellten Lösungen (B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub>). Ganz deutlich treten hier aber auch die Unterschiede der Gesamtpurin-N oder «Summen»-Werte hervor. Der Gesamtpurin-N zeigt sich bei A<sub>2</sub> um ca. 2,7 % kleiner als bei B<sub>2</sub> und bleibt bei A<sub>3</sub> um 9,8 %, bei B<sub>3</sub> dagegen nur um 0,3 % hinter dem berechneten Werte zurück!

Überdies lehrt Tabelle III ganz unzweideutig, daß ein Verlust von Purinbasen durch den Zusatz der großen Barytmengen nicht herbeigeführt wird. Denn am bedenklichsten steht es in dieser Hinsicht wohl mit dem Adenin, da dasselbe, wie erwähnt, mit Barytwasser einen Niederschlag gibt. Trotzdem finden wir in Tabelle III, deren Zahlen von einem Organe (Thymus) stammen, das einen sehr erheblichen Adeningehalt besitzt, bei den mit Barytüberschuß bereiteten Lösungen B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> kein Minus an Purin-N.<sup>1)</sup> Die Fähigkeit des Adenins, eine schwerlösliche

<sup>1)</sup> Obzwar sich in dem aus Lösung B<sub>1</sub> hergestellten Niederschlage kein Adenin nachweisen ließ (vgl. Versuch XXV, S. 380), haben die Proben B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> doch zweifellos Adenin enthalten. Denn, wie erwähnt, wurde die Flüssigkeit B<sub>1</sub> erst nach längerem Stehen ohne Antisepticum, wobei Adenin in Hypoxanthin übergehen kann (s. unten S. 381), in Arbeit genommen.



Baryumverbindung zu bilden, kommt eben wahrscheinlich für die Verdünnungen, die bei unserem Verfahren zur Zeit der Barytfällung (nicht zur Zeit der Herstellung des Purinbasensilberniederschlags) herrschen, gar nicht mehr in Betracht. Es genügt, darauf hinzuweisen, daß in den drei mitgeteilten Versuchen die der Barytbehandlung unterzogenen Lösungen in bezug auf Purin-N ca.  $\frac{1}{500}$  bis  $\frac{1}{1000}$  normal waren.

Nach dem vorstehenden erhält man also die Purinbasensilberniederschläge zweifellos am reinsten und am vollständigsten, wenn man die schwefelsauren Organauszüge mit einem so großen Barytüberschusse behandelt, daß bei der nachfolgenden  $\text{CO}_2$ -Einleitung reichliche  $\text{BaCO}_3$ -Fällung eintritt.

Nachdem man den  $\text{BaCO}_3$ -Niederschlag abfiltriert und mit heißem Wasser gut ausgewaschen hat, liegt nun zur weiteren Verarbeitung eine sehr große Flüssigkeitsmenge vor (gewöhnlich ca. 2,5 bis 3 Liter für 100 g Organbrei); dieselbe muß natürlich vor Ausführung der Silberfällung zunächst beträchtlich eingengt werden. Das Eindampfen darf jedoch nicht bei der durch die absorbierte  $\text{CO}_2$  bewirkten neutralen oder schwach sauren Reaktion geschehen; sonst tritt nach der Entfernung der  $\text{CO}_2$  wieder deutlich alkalische Reaktion ein (wegen der Gegenwart der oben erwähnten alkalisch reagierenden löslichen Baryumsalze), und man hat dann stets sehr erhebliche Verluste an Purinbasen — offenbar infolge einer Zersetzung der letzteren durch das viele Stunden währende Erhitzen in alkalischer Lösung. Die Flüssigkeit wird deshalb vor dem Einengen mit Essigsäure kräftig angesäuert.<sup>1)</sup>

Ist das Volumen genügend verringert (auf ca. 100 ccm für 100 g Organbrei), so darf die Flüssigkeit noch immer nicht ohne weiteres zur Silberfällung verwendet werden, vielmehr muß zuvor ein wenig starke Natronlauge, die zweckmäßig mit etwas Natriumcarbonat versetzt ist, hinzugefügt werden. Es kann nämlich — besonders bei Pankreas- und Thymusauszügen — geschehen, daß sich nach weit vorgerücktem Ein-

1) Das Einengen erfolgt am besten anfangs über freiem Feuer (Volhardscher Ofen) in einer großen Schale, aus der man die Flüssigkeit nach einiger Zeit in eine kleinere Schale übertragen kann u. s. f.; zum Schlusse muß selbstverständlich auf dem Wasserbade eingedampft werden.

engen am Boden der Abdampfschale einige bräunlich gefärbte, schwere Körner absetzen; in solchen Fällen gibt die von den letzteren abfiltrierte Flüssigkeit mit ammoniakalischer Silberlösung nur einen geringfügigen oder selbst gar keinen Niederschlag, während die Lösung der braunen Körner in Natronlauge eine reichliche Purinkörperfällung liefert. Wie ersichtlich, handelt es sich hier um die Abscheidung gewisser in Wasser (bei Gegenwart verdünnter Essigsäure) schwer löslicher Purinstoffe. Da nun Alkalihydratlösungen bekanntlich alle Purinkörper recht leicht lösen, so kann man sich gegen die unerwünschten Folgen des geschilderten Vorkommnisses am besten dadurch schützen, daß man nach erfolgtem Eindampfen der Flüssigkeit Natronlauge bis zur starken Alkalescenz hinzufügt. Der gleichzeitige Sodazusatz hat den Zweck, die in der Lösung enthaltenen Barytreste zu entfernen.<sup>1)</sup> Es empfiehlt sich, eine Mischung gleicher Volumina von 33 %iger Natronlauge und halbgesättigter Natriumcarbonatlösung vorrätig zu halten. Von dieser Mischung genügen wenige Kubikcentimeter zur Erzielung des erforderlichen Alkalescenzgrades.

Daß man das Eindampfen der mit Baryt behandelten Organextrakte bei saurer Reaktion vornehmen, die Flüssigkeit zum Schlusse aber wieder deutlich alkalisch machen muß, und daß bei Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßregeln sehr erhebliche Verluste zu befürchten sind, war Burian und Schur schon seit langem durch vielfältige Erfahrungen bekannt. Wir haben indessen noch eigens einige Versuche angestellt, um für unsere Ausführungen zahlenmäßige Belege beibringen zu können. Ein besonders charakteristischer von diesen Versuchen sei in extenso mitgeteilt.

Versuch V (Burian, Sommer 1901). 200 g Kalbsthymus wurden 12 Stunden lang mit Schwefelsäure von 1,0 Volumprozent gekocht. Nach Beendigung der vorbereitenden Operationen betrug die Gesamtmenge der einzuengenden Flüssigkeit 6000 ccm. Hiervon wurden drei Portionen, A, B und C, zu je 1500 ccm abgemessen.

<sup>1)</sup> Die Beseitigung des Baryts ist zwar für gewöhnlich nicht unbedingt nötig, weil die N-Bestimmung in den Purinbasensilberniederschlägen durch eine Barytbeimengung nicht beeinträchtigt wird; doch erleichtert Barytfreiheit der Lösung die weiteren Operationen (vgl. unten Anmerkung 2 auf S. 348). Will man die Purinkörperfällungen, wie wir es getan haben (vgl. Abschnitt II, S. 364—371), der Elementaranalyse unterziehen, so ist die Entfernung der Barytreste natürlich unerlässlich.



A wurde zunächst mit Essigsäure angesäuert, dann auf ca. 75 ccm eingeeengt (wobei sich bräunliche Körnchen abschieden) und schließlich mit carbonathaltiger Natronlauge stark alkalisch gemacht. Die aus dieser korrekt behandelten Probe erhaltene Hauptfällung enthielt:

**0,2142 g N.**

B wurde ohne Essigsäurezusatz langsam auf ca. 75 ccm. eingedampft; eine Abscheidung brauner Körnchen trat in diesem Falle nicht ein, trotzdem wurde die Flüssigkeit aber vor Ausführung der Hauptfällung alkalisch gemacht. Der Silberniederschlag enthielt hier bloss

**0,1301 g N;**

durch das Einengen ohne Säurezugabe war also ein Verlust von 39,2% zustande gekommen.

C wurde, mit Essigsäure versetzt, auf ca. 75 ccm eingedampft; es setzten sich abermals braune Körner ab. Die von den letzteren abfiltrierte Flüssigkeit gab mit ammoniakalischer Silberlösung nur eine Opalescenz, während die Lösung der Körner in Natronlauge einen reichlichen Purinbasenniederschlag lieferte, der

**0,1923 g N**

enthielt. Somit war fast die Gesamtmenge der vorhandenen Purinstoffe (vgl. A) beim Einengen ausgefallen.

Wie erwähnt, bewirkt der Zusatz der carbonathaltigen Lauge zu der eingeengten Flüssigkeit nicht bloss Auflösung etwa ausgeschiedener Purinkörper, sondern auch Ausfällung des noch anwesenden Baryums als Baryumcarbonat. Letzteres wird über einem kleinen Filter abfiltriert und mit Wasser von 60° gut ausgewaschen. Das alkalische Filtrat darf nun aber nicht direkt mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt werden, weil unter diesen Umständen Schwärzung unter Silberabscheidung (Reduktion) stattfinden kann. Man fügt deshalb zu der alkalischen Lösung zunächst Salzsäure bis zur sauren Reaktion hinzu<sup>1)</sup> und übersättigt dann erst mit Ammoniak; ein Niederschlag darf durch das Ammoniak nicht entstehen.<sup>2)</sup>

---

1) Der Salzsäurezusatz bewirkt bei richtiger Leitung der vorausgehenden Operationen keine Fällung; tritt eine solche (wegen nicht ganz korrekter Ausführung der oben geschilderten Barytbehandlung) dennoch ein, so tut man gut, den Niederschlag vor dem Ammoniakzusatz abzufiltrieren.

2) Dies gilt natürlich nur für den Fall, daß die letzten Barytreste durch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  vollständig beseitigt wurden; ist dies nicht geschehen, so erzeugt die stets carbonathaltige Ammoniakflüssigkeit zum mindesten

Das Volumen der auf diese Weise zur Ausführung der Hauptfällung endgültig vorbereiteten Flüssigkeit soll nicht mehr als ca. 200 ccm für 100 g Organbrei betragen. Erheblich stärkere Verdünnung wenigstens gibt leicht zu Fehlern Anlaß. Je größer nämlich die Verdünnung ist, desto mehr ändert sich das gegenseitige Mengenverhältnis von Haupt- und Korrekturfällung zugunsten der letzteren. Da nun aber bei der Korrekturfällung — insbesondere wohl wegen der vorbereitenden Behandlung der Flüssigkeit mit Bleiacetat — Verluste kaum ganz vermieden werden können, so pflegt in jenen Fällen, in denen nicht der weit überwiegende Teil der vorhandenen Purinstoffe bereits durch die Hauptfällung abgeschieden ist, auch die Gesamtsumme von Haupt- und Korrekturniederschlag merklich vermindert zu sein.

Über den Einfluß allzu weitgehender Verdünnung belehrt uns das nachfolgende Experiment.

Versuch VI (Burian, Sommer 1901). 500 g Pferdefleisch werden mit 5 l Schwefelsäure von 0,8 Volumprozent zerkocht. Menge des abfiltrierten und mit den Waschwassern vereinigten Auszuges: 7422 ccm.

Hiervon werden vier Portionen, A, B, C und D, zu je 1500 ccm (= 101,2 g Fleischbrei) abgemessen; zu C werden 20 ccm, zu D 30 ccm einer 0,977%igen alkalischen Xanthinlösung hinzugefügt. Der Überschuß an Purin-N (über die in A resp. B anwesende Menge desselben), beträgt demnach bei C **0,0720** g, bei D **0,1080** g. Während nun die Flüssigkeit A nach beendigter Barytbehandlung und erfolgtem Essigsäurezusatz bis auf 100 ccm eingedampft wird, sistiert man das Einengen der drei Portionen B, C und D, sobald ein Volumen von je 800 ccm erreicht ist. Dementsprechend beträgt nach den oben angegebenen letzten vorbereitenden Schritten die mit Silberlösung auszufällende Flüssigkeitsmenge bei A **200** ccm, dagegen bei B, C und D je **1000** ccm.

Die bei den vier verschiedenen Proben erhaltenen quantitativen Ergebnisse sind registriert in

---

eine Trübung, wodurch das Urteil darüber erschwert wird, ob die der Silberfällung vorauszuschickende Vorbereitung des Organextraktes wirklich gelungen ist. Dies der Hauptgrund, weshalb oben (S. 347) der gleichzeitige Zusatz von Lauge und Soda zur eingeeingten Flüssigkeit empfohlen wurde.



Tabelle IV.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe Gesamt-Purin-N	Verlust
A	0,0465	0,0090	<b>0,0555</b>	—
B	0,0188	0,0297	<b>0,0485</b>	gegenüber dem Gesamt-purin-N von A: 12,6 %
C	0,0840	0,0348	berechnet: I. Summe von A + 0,0720: <b>0,1275</b> II. Summe von B + 0,0720: <b>0,1205</b> gefunden: <b>0,1188</b>	gegenüber Berechnung I: 6,8 %  gegenüber Berechnung II: 1,3 %
D	0,1283	0,0174	berechnet: I. Summe von A + 0,1080: <b>0,1635</b> II. Summe von B + 0,1080: <b>0,1565</b> gefunden: <b>0,1457</b>	gegenüber Berechnung I: 10,8 %  gegenüber Berechnung II: 6,9 %

Wir sehen, daß bei sehr starker Verdünnung die Korrekturfällung sogar größer werden kann als die Hauptfällung: vgl. B, wo der Silberniederschlag in einer Lösung erzeugt wurde, die nur ca. 0,05 g Purin-N im Liter enthielt. Daß unter solchen Umständen auch der Gesamt-purin-N-Wert beeinträchtigt sein kann, das beweisen die (in Spalte 5 der Tabelle) unter der Überschrift «Verlust» verzeichneten Zahlen.

#### *Ausführung der Hauptfällung.*

Nach vollendeter Vorbereitung wird die ammoniakalische Flüssigkeit je nach der zu erwartenden Purinkörpermenge mit 30—50 ccm der Ludwigschen ammoniakalischen AgCl-Lösung vollständig ausgefällt.<sup>1)</sup> Den gewöhnlich fast rein weißen

<sup>1)</sup> Die Anwendung von AgCl statt AgNO<sub>3</sub> zur Bereitung der ammoniakalischen Silberlösung empfiehlt sich deshalb, weil dann das der Korrektur-

Purinbasen-Silberniederschlag läßt man mehrere Stunden stehen, filtriert ihn dann über einem großen aschearmen Filter ab<sup>1)</sup> und wäscht ihn sorgfältig zunächst einmal mit sehr verdünntem Ammoniak<sup>2)</sup> und hierauf mehrmals mit heißem Wasser aus. Nur bei gründlichem Aufwirbeln des Präzipitates durch einen kräftigen Strahl heißen Wassers, das den sehr voluminösen Niederschlag etwas schrumpfen macht, gelingt es, die letzten Spuren albumosenartiger Verunreinigungen ganz oder fast ganz auszuwaschen.<sup>3)</sup> Nach beendigem Waschen wird Filter und Niederschlag in einen nicht zu kleinen Kjeldahlschen Aufschließungskolben gebracht und der N-Bestimmung unterzogen. Doch ist es ratsam, der letzteren die von Arnstein<sup>4)</sup> empfohlene Maßnahme vorzuschicken, d. h. den Niederschlag im Aufschließungskolben mit wenig Wasser und MgO zu kochen; man ist dann sicher, nicht durch (oft hartnäckig festgehaltene) kleine Ammoniakreste gestört zu werden.

---

fällung vorausgehende Eindampfen des (entsilberten und angesäuerten) Hauptfällungsfiltrates nicht bei Gegenwart von Salpetersäure erfolgt, durch welche die noch vorhandenen Purinkörperreste geschädigt werden könnten.

1) Sehr geeignet ist das mit HCl und HF extrahierte Filter Nr. 589 (Weißband) von Schleicher und Schüll vom Durchmesser 18 1/2 cm. Bloß auf solchen großen Filtern läßt sich das Aufwirbeln der Niederschläge unbedenklich durchführen.

2) Ein häufigeres Waschen mit starkem Ammoniak ist nicht am Platze. Während die Purinbasensilberniederschläge nämlich im Momente ihrer Herstellung — d. h. also bei Gegenwart von unverbrauchtem Silber — selbst durch einen sehr erheblichen Ammoniaküberschuß nicht gelöst werden, können sie nachträglich — d. h. somit bei Abwesenheit von überschüssigem Silber — durch starkes Ammoniak zum Teil zerlegt werden, wobei die im Niederschlag enthaltenen Purinbasen, soweit sie in ammoniakalischem Wasser löslich sind, partiell in Lösung gehen. (Vgl. hierzu unten S. 368—371 Versuche XII und XIII.)

3) Die Purinkörpersilberniederschläge lösen sich weder in heißem Wasser, noch auch wird durch das letztere ihre Zusammensetzung verändert. Vgl. hierzu die Angabe von Bruhns (Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 545, 1890), daß Hypoxanthinsilberoxyd «in heißem Wasser so gut wie unlöslich ist», und ferner unsere Versuche XII und XIII.

4) Arnstein, Zentralblatt für die mediz. Wiss., Bd. 15, S. 257, 1897.



Welche große Bedeutung die Art des Auswaschens der Niederschläge für die Resultate der Bestimmung besitzt, das zeigt uns

Versuch VII (Hall, Sommer 1901)<sup>1)</sup>. In Mischungen von Wittepepton- und Guaninlösung<sup>2)</sup> erzeugte Silberniederschläge werden teils mit kaltem, teils mit heißem Wasser erschöpfend gewaschen:

1. Zwei Proben, **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>** — jede bestehend aus 20 ccm einer 6%igen Wittepeptonlösung + 20 ccm einer 0,2631%igen alkalischen Guaninlösung (= 0,0244 g N) + 160 ccm Wasser — werden mit 20 ccm ammoniakalischer Silberlösung gefällt.

2. Zwei Proben, **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** — jede bestehend aus 20 ccm einer 6%igen Wittepeptonlösung + 20 ccm einer 0,6946%igen alkalischen Guaninlösung (= 0,0644 g N) + 320 ccm Wasser — werden mit Barytwasser versetzt;<sup>3)</sup> nach Beseitigung des Baryts durch CO<sub>2</sub> und Zusatz von Essigsäure werden die Flüssigkeiten auf 200 ccm eingengt und hierauf mit 20 ccm ammoniakalischer Silberlösung gefällt.

3. Vier Proben, **A<sub>3</sub>** und **A<sub>4</sub>**, **B<sub>3</sub>** und **B<sub>4</sub>** — jede bestehend aus 20 ccm einer 6%igen Wittepeptonlösung + 20 ccm einer 0,5882%igen alkalischen Guaninlösung (= 0,0545 g N) + 600 ccm Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent — werden mehrere Stunden lang gekocht und dann genau so weiter behandelt, wie es oben für Organauszüge vorgeschrieben wurde; die auf 200 ccm eingedampften Flüssigkeiten werden schließlich mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt.

Die aus den Lösungen **A<sub>1</sub>** bis **A<sub>4</sub>** erhaltenen Silberniederschläge werden in der gewöhnlichen Weise durch Aufgießen kalten Wassers, die von den Proben **B<sub>1</sub>** bis **B<sub>4</sub>** stammenden Fällungen dagegen unter gründlichem Aufwirbeln mit heißem Wasser gewaschen. Nach beendigtem Waschen werden sämtliche Niederschläge unter Beobachtung der Arnsteinischen Vorsichtsmaßregel der N-Bestimmung nach Kjeldahl unterzogen.

1) Dieser Versuch wurde in dem physiol. Institute des Owens College, Manchester, ausgeführt. Dem Vorstande desselben, Herrn Prof. Stirling, sei für die freundliche Erlaubnis, das obige Experiment in seinem Laboratorium anstellen zu dürfen, unser aufrichtigster Dank ausgesprochen.

2) Die Wittepeptonlösung war durch Aufkochen bei essigsaurer Reaktion enteiweißt. Über die Herstellung des benutzten Guanins siehe unten S. 385.

3) Wittepepton gibt mit Barytwasser keinen Niederschlag.

Über die hierbei gewonnenen quantitativen Ergebnisse berichtet  
Tabelle V.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe d. h. Gesamtpurin-N	N des angewendeten Guanins	Fehler
A <sub>1</sub>	0,0232	—	—	} 0,0244	—
B <sub>1</sub>	0,0228	—	—		—
A <sub>2</sub>	0,0644	0,0019	0,0663	} 0,0644	+ 2,95 %
B <sub>2</sub>	0,0546	0,0058	0,0604		— 6,21 %
A <sub>3</sub>	0,0560	0,0056	0,0616	} 0,0545	+ 13,0 %
B <sub>3</sub>	0,0522	0,0039	0,0561		+ 2,9 %
A <sub>4</sub>	0,0540	0,0065	0,0605	} 0,0545	+ 11,0 %
B <sub>4</sub>	0,0518	0,0046	0,0564		— 3,4 %

Es sei hervorgehoben, daß die Konzentrationen der in dem vorliegenden Versuche verwendeten Lösungen durchaus den bei genauer Einhaltung unserer Methode für Organauszüge zutreffenden Konzentrationen entsprechen. Bei unserem Verfahren werden zur Hauptfällung 200 ccm einer Flüssigkeit benützt, die z. B. in Versuch III (S. 342) 0,076 % Albumosen-N = ca. 0,475 % Albumosen in sich schloß und in dem genannten Volumen eine Gesamtpurin-N-Menge von 0,0551 g enthielt. In dem obigen Experiment wurden die Hauptfällungen gleichfalls in 200 ccm von Lösungen ausgeführt, deren Albumosengehalt ca. 0,6 % und deren Gesamtpurin-N 0,0244—0,0644 g betrug.

Bei Betrachtung der Tabelle V fällt uns nun sofort auf, daß die mit heißem Wasser gewaschenen Niederschläge ausnahmslos weniger N enthalten, als die mit kaltem Wasser behandelten: der Gesamtpurin-N wurde für die Lösungen B stets um 8—10 % kleiner gefunden als für die korrespondierenden Lösungen A. Besonders charakteristisch sind die Resultate, die bei A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>4</sub>, also bei jenen Lösungen erhalten wurden, welche genau nach dem Muster der Organauszüge verarbeitet worden waren. Hier ist der N-Gehalt der kalt gewaschenen Fällungen um 11 resp. 13 %, jener der mit heißem Wasser aufgewirbelten Niederschläge dagegen bloß um 3 resp. 3 1/2 % größer, als nach der angewandten Guaninmenge erwartet werden mußte. Es war also nur bei der letztgenannten Art des Auswaschens gelungen, die in den voluminösen Silberniederschlägen zurückgehaltenen Albumosenreste fast vollständig zu entfernen.



Wir müssen hier in Kürze auf einige analoge Experimente von His und Hagen eingehen. Auch diese Forscher versuchten, aus Gemischen von Albumosen- und Guaninlösung das zugesetzte Guanin quantitativ wiederzuerhalten (Vers. IV—VI, S. 358—360). Ihre Resultate waren jedoch recht unbefriedigend; entweder entstand wegen der fällungshindernden Wirkung der Albumosen gar kein Silberpräzipitat oder aber es bildete sich ein Niederschlag, der infolge Albumosenbeimengung einen sehr viel zu hohen N-Gehalt besaß. Da His und Hagen keine Korrekturfällungen ausführten, so lassen sich ihre Zahlen nur mit den in der 2. Spalte unserer Tabelle V unter der Überschrift «N der Hauptfällung» verzeichneten Werten unmittelbar vergleichen. Diese letzteren sind nun aber ausnahmslos nicht oder kaum größer als die Werte, für den N des zugesetzten Guanins. Wir stoßen hier also auf eine Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und jenen von His und Hagen, die wahrscheinlich wenigstens zum Teil darauf beruht, daß die von den genannten Autoren angewandten Guaninmengen sehr klein waren. Während wir zu unseren Einzelproben 0,0244—0,0644 g Guanin-N hinzufügten, betrug das Guanin-N-Quantum, das His und Hagen aus den Albumosenlösungen wiederzugewinnen suchten, nur 0,0037—0,0056, also etwa den zehnten Teil der von uns benützten Mengen. Bei so außerordentlich geringen Quantitäten werden natürlich selbst kleine Fehler der Methode und des Arbeitens sehr stark ins Gewicht fallen müssen; man bedenke nur, daß dasselbe N-Plus, das bei uns einen Fehler von + 3% ausmachte, bei His und Hagen einen solchen von + 30% bedeuten würde! Noch verständlicher wird der Unterschied zwischen unseren Zahlen und jenen von His und Hagen, wenn man erwägt, daß diese Untersucher die Arnsteinsche Maßregel nicht in Anwendung brachten und ihre Niederschläge vermutlich überdies mit kaltem Wasser auswuschen.

Wie dem immer sei, die obige Tabelle zeigt jedenfalls, daß die aus dem Albumosengehalt der Lösung entstehenden etwaigen Fehler nicht überschätzt werden dürfen, insbesondere wenn für zweckentsprechende Waschung der Niederschläge Sorge getragen wird.

#### *Ausführung der Korrekturfällung.*

Burian und Schur haben vor 6 Jahren angegeben, daß bei der Fällung schwefelsaurer Organextrakte mit ammoniakalischer Silberlösung stets — auch wenn zuvor die oben geschilderte Vorbereitung der Auszüge stattgefunden hat — eine kleine Menge von Purinstoffen in Lösung bleibt, die nach vorausgehender Behandlung des Filtrates der Hauptfällung mit basischem Bleiacetat durch neuerlichen Silberzusatz nieder-

geschlagen werden können.<sup>1)</sup> Diese Beobachtung, die sich seit-her ausnahmslos bestätigt hat, bildet die Grundlage der «Korrekturfällung».

Zur Herstellung der letzteren wird das mit den Waschwassern vereinigte Filtrat von der Hauptfällung mit einigen Kubikcentimetern starker Essigsäure eben angesäuert und durch  $H_2S$  entsilbert. Hierauf dampft man die Flüssigkeit samt dem Schwefelsilber<sup>2)</sup> auf ca. 100 ccm für je 100 g ursprünglich verwendeten Organbreies ein, filtriert das Schwefelsilber ab und wäscht es mit heißem Wasser gründlich aus und erhitzt das Filtrat nochmals zum lebhaften Sieden (Entfernung letzter  $H_2S$ -Spuren).

Nunmehr wird die Flüssigkeit, deren Volumen nicht mehr als ca. 200 ccm für 100 g Organ betragen soll, mit basischem Bleiacetat versetzt. Hierbei sind die nachstehenden beiden Punkte zu berücksichtigen: 1. ein Teil der Albumosen (und zwar die Deuteroalbumosen und bei saurerer Reaktion auch die Protalbumose) werden nur durch basisches, nicht durch neutrales Bleiacetat gefällt;<sup>3)</sup> 2. die Xanthinbasen werden zum Teil (Carnin, unreines Hypoxanthin und bei Gegenwart von Farbstoffen auch Xanthin und 1-Methylxanthin)<sup>4)</sup> durch basisches Bleiacetat niedergeschlagen, aber nur bei Abwesenheit von Bleizucker<sup>5)</sup> (basisches Bleiacetat + Ammoniak fällt bekanntlich sämtliche Purinstoffe).

1) Burian und Schur haben diese Erscheinung auf die fällungshindernde Wirkung der Albumosen zurückgeführt, jedoch gefunden, daß außer dem Albumosengehalte «noch anderweitige Bedingungen die Menge der in Lösung gehenden Nucleinbasen bestimmen». Die wichtigste dieser Bedingungen scheint der Verdünnungsgrad der zur Hauptfällung benützten Flüssigkeit zu sein.

2) Die Vorschrift, daß man die Flüssigkeit samt dem Schwefelsilber einengen und dann erst filtrieren soll, beruht auf der Beobachtung, daß sich das Schwefelsilber häufig zuerst colloidal abscheidet und erst nach einigem Erwärmen filtriert werden kann.

3) Vgl. Kühne und Chittenden, Zeitschr. f. Biol., Bd. 20, S. 11, 1884.

4) Krüger u. Salomon, Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 379 ff.

5) Weidel, Liebigs Ann. d. Chem., Bd. 158, S. 358 u. 362. 1871.



Hieraus ergeben sich folgende Prinzipien für die Durchführung der Bleiacetatbehandlung. Da bei dem Zusatze von Bleiessig zu der essigsäuren Flüssigkeit zunächst zwar eine Trübung von Chlorblei, aber nicht auch sofort der flockige Niederschlag, der die basischen Bleiverbindungen der Albumosen enthält, zu entstehen pflegt, weil das basische Bleiacetat durch die vorhandene freie Essigsäure in neutrales Acetat übergeführt wird, so muß man mit dem Zusatze des Bleiessigs fortfahren, bis die schwach alkalische Reaktion des letzteren in der Flüssigkeit bemerkbar wird; dann erst scheiden sich die Albumosen ab. Man fügt nun vorsichtig so lange Bleiessig zu, als noch ein Niederschlag entsteht; ein weiterer Zusatz von basischem Bleiacetat ist nicht ratsam, weil einerseits die durch dasselbe ausgefällten Stoffe teilweise in einem Überschusse des Reagens löslich sind, und weil andererseits eine größere Menge Bleiessig aus dem in der Lösung reichlich vorhandenen Ammoniumacetat Ammoniak in Freiheit setzen und unter Mitwirkung des letzteren die Purinstoffe niederschlagen könnte.

Die Flüssigkeit enthält jetzt ein Gemenge von Bleizucker und Bleiessig, worin der erstere überwiegt, und das somit sehr wohl geeignet ist, die Xanthinbasen in Lösung zu halten. Trotzdem läßt es sich nicht völlig verhindern, daß Purinstoffe in den Bleiniederschlag übergehen; doch wird die Menge derselben durch genaue Beobachtung der oben gegebenen Regeln auf ein Minimum reduziert.

Wie geringfügig das durch den Bleiniederschlag mit niedergerissene Xanthinbasenquantum ist, ergibt sich daraus, daß es in der Regel nur schwierig gelingt, in der durch Zerlegung des Bleiniederschlages mit Schwefelnatrium erhaltenen Flüssigkeit mittels der gebräuchlichen Methoden Purinkörper nachzuweisen. Ein Beispiel hierfür liefert

Versuch VIII (Burian, Frühjahr 1902). 600 g Brei von Rindfleisch 12 Stunden lang mit 6 l Schwefelsäure von 1,0 Volumprozent gekocht. Die aus dem Extrakte (nach den bekannten Vorbereitungen) hergestellte Hauptfällung dient zur qualitativen Untersuchung (vgl. unten Vers. XVII, S. 373). Das mit Essigsäure versetzte, durch  $H_2S$  entsilberte und eingeengte Filtrat der Hauptfällung, das ein Volumen von 1200 ccm besitzt, gibt bei vorsichtigem Bleiessigzusatz einen mächtigen Nieder-

schlag, der mit etwas Natriumsulfidlösung zerlegt wird. Die hierbei resultierende Flüssigkeit wird mit Schwefelsäure angesäuert, auf 150 ccm eingedampft und in drei Portionen, **A**, **B** und **C**, zu je 50 ccm aufgeteilt.

**A** zeigt auf Zusatz von Ammoniak und ammoniakalischer Silberlösung keine Spur einer Trübung.

**B** wird mit Natronlauge neutralisiert, hierauf mit Essigsäure schwach angesäuert und in der Siedehitze mit Natriumbisulfit + Kupfersulfat gefällt. Der (größtenteils aus Cupri-Cuprosulfit-Natriumsulfit bestehende) Niederschlag wird abermals mit ein wenig Natriumsulfidlösung zerlegt; die hierdurch erhaltene Flüssigkeit gibt (nach dem Verjagen des  $H_2S$  bei saurer Reaktion) mit ammoniakalischer Silberlösung ganz schwache Opalescenz.

**C** wird mit Zinksulfat gesättigt und das Filtrat von der dadurch bewirkten Albumosenfällung (nach genauer Neutralisation mittels Natronlauge) durch  $H_2S$  vom Zink befreit und nach Entfernung des  $H_2S$  mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt; es entsteht ein sehr geringfügiger Niederschlag, dessen quantitative Verarbeitung kaum durchführbar ist.

Somit waren zwar Purinstoffe in den Bleiniederschlag übergegangen, aber jedenfalls nur in äußerst geringer Menge. Dabei lieferte die von der Bleifällung abfiltrierte Flüssigkeit nach dem unten beschriebenen Verfahren einen Korrekturniederschlag mit **0,061 g N**.

Es darf hiernach wohl als sehr wahrscheinlich gelten, daß die Bleiacetatbehandlung bei richtiger Ausführung keinen erheblichen Purinbasenverlust verursacht. Dies gilt jedoch natürlich nur für jene Fälle, wo in 100 ccm der mit Bleiessig zu versetzenden Flüssigkeit, wie in dem vorliegenden Versuche, bloß ca. 0,005 g Purin-N enthalten sind.<sup>1)</sup> Bei korrekter Herstellung der Hauptfällung ist dies Verhalten das normale. Es pflegt dann nämlich für 100 g Organbrei 0,002 g bis höchstens 0,015 g Purin-N im Hauptfällungsfiltrate zurückzubleiben; da nun das Volumen des letzteren beim Bleiacetatzusatze ca. 200 ccm für 100 g Organbrei beträgt, so kommt auf 100 ccm der Flüssigkeit etwa 0,001 bis 0,0075 g Purin-N. Ist infolge unrichtiger Behandlung des Extraktes — z. B. wegen zu großen Albumosengehaltes oder wegen zu starker Verdünnung — eine beträchtlich größere Purinbasenmenge im Filtrate der Hauptfällung verblieben, dann freilich scheint auch der Bleiniederschlag weit mehr Purinstoffe aufzunehmen, als in dem vorstehenden Versuche (vgl. z. B. Tab. IV A und B).

Der größere Purinkörpergehalt ist wohl auch die Ursache dafür, daß bei **direkter** Fällung schwefelsaurer Organauszüge mit Bleiessig (Kosselsche «Bleiacetatmethode») die Menge der in den Bleinieder-

1) Es sei daran erinnert, daß in dem obigen Experiment die 0,061 g Purin-N enthaltende Lösung ein Volumen von 1200 ccm besaß.



schlag übergehenden Xanthinbasen ganz erheblich wird. Die letzteren lassen sich in diesem Falle nach Burian und Schur<sup>1)</sup> ohne weiteres, d. h. ohne vorausgehende Beseitigung der Albumosen in der durch Zerlegung des Bleiniederschlages gewonnenen Flüssigkeit, nachweisen; dementsprechend ist der «Bleimethodenwert», wie Burian und Schur<sup>2)</sup> gezeigt haben, stets um 6—12% kleiner, als der «korrigierte Wert». Auch His und Hagen<sup>3)</sup> haben in einigen Fällen Organauszüge direkt mit Bleiessig gefällt, den Bleiniederschlag zersetzt und die resultierende Lösung auf ihren Purinbasengehalt untersucht, ohne zuvor die anwesenden Albumosen zu entfernen. Es ließ sich hierbei ausnahmslos die Gegenwart von Purinstoffen im Bleiniederschlage feststellen. Die Zahlen, die His und Hagen für das im Bleipräzipitate vorhandene Purin-N-Quantum gefunden haben, gestatten übrigens keine unmittelbare Anwendung auf die Kosselsche Bleiacetatmethode. Denn während bei der letzteren durch mehrstündiges Kochen mit verdünnter Schwefelsäure erhaltene Organauszüge mit Bleiessig gefällt werden, haben His und Hagen Organauszüge, die durch Digestion mit Wasser bei 50—60° hergestellt waren, der Bleiacetatbehandlung unterzogen. Hierdurch aber werden zwei bedeutsame Abweichungen vom Kosselschen Verfahren verursacht. Erstens enthält die mit basischem Bleiacetat versetzte Flüssigkeit dann kein Gemenge von Bleizucker und Bleiessig, sondern bloß Bleiessig, wodurch der Übergang von Purinstoffen in den Bleiniederschlag sehr begünstigt wird; zweitens dürften in den Versuchen von His und Hagen auch Reste unaufgespaltener Nucleoproteide resp. unzersetzte Nucleinsäuren in der Bleifällung zugegen gewesen sein und bei der Zerlegung des Bleiniederschlages ihre Xanthinbasen ganz oder teilweise abgegeben haben — abermals ein Umstand, durch den der Purinkörpergehalt des Bleipräzipitates erhöht wird.

Nach dem vorstehenden darf es wohl als ziemlich sichergestellt betrachtet werden, daß zwar bei unmittelbarer Fällung schwefelsaurer Organauszüge mit Bleiessig eine merkliche Xanthinbasenmenge mit dem Bleiniederschlage verloren geht, daß dagegen nach vorheriger Abscheidung der Hauptmenge der Purinstoffe — d. i. bei richtiger Ausführung der Hauptfällung — der im Filtrate bleibende Purinkörperrest durch die Bleibehandlung nur sehr unerheblich beeinträchtigt wird.

Hat sich der Bleiniederschlag abgesetzt,<sup>4)</sup> so filtriert

---

1) Burian u. Schur, Pflügers Arch., Bd. 80, S. 307. 1900.

2) Burian u. Schur, Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 17, 1897.

3) His u. Hagen, l. c. S. 372.

4) Bleibt der Niederschlag, was ab und zu vorkommt, unter milchiger Trübung der Flüssigkeit in letzterer suspendiert, so genügt Zusatz von etwas Talk und kräftiges Umschütteln, um alsbald Absetzen der Fällung zu bewirken.

man ihn ab und wäscht ihn gründlich mit kaltem Wasser aus.<sup>1)</sup> Das Filtrat wird mit  $H_2S$  entbleit und der gewöhnlich sehr reichliche Schwefelbleiniederschlag mehrmals mit Wasser ausgekocht.<sup>2)</sup> Die bleifreie, fast farblose Flüssigkeit wird nun auf ca. 30—40 ccm für je 100 g ursprünglich verwendeten Organbreies eingedampft, ammoniakalisch gemacht<sup>3)</sup> und mit wenigen Kubikcentimetern der oben erwähnten ammoniakalischen Silberlösung ausgefällt. Der auf diese Weise erhaltene Korrekturniederschlag wird hierauf genau so wie die Hauptfällung weiter verarbeitet und der N-Bestimmung unterzogen.

*Nochmalige summarische Beschreibung der Methode  
des korrigierten Wertes.*

Da im vorhergehenden der Gang der Darstellung häufig durch Mitteilung von Beispielen unterbrochen wurde, dürfte es aus praktischen Gründen angezeigt sein, die Beschreibung des Verfahrens in Schlagworten zu wiederholen.

1. Herstellung des Organauszuges: Zwölfstündiges Zerkochen des Organbreies mit der zehnfachen Menge Schwefelsäure von 0,5—1,0 Volumprozent, Abfiltrieren und dreimaliges Auskochen des ungelösten Rückstandes.

2. Vorbereitung des Organauszuges für die Hauptfällung: Starkes Übersättigen des mit den Waschwässern vereinigten Filtrates mit gepulvertem festen Baryt, Abfiltrieren des Barytniederschlages und Auswaschen des letzteren mit Wasser von 60° C.; Einleiten von  $CO_2$  in die stark alkalische Flüssigkeit bis zum Eintritt neutraler oder schwach saurer

1) Heißes Wasser löst den Bleiniederschlag teilweise wieder auf.

2) Burian und Schur haben empfohlen, das Blei aus dem Filtrate nicht mit  $H_2S$ , sondern mit Schwefelsäure zu entfernen. Dieser Vorschlag beruhte auf der Beobachtung, daß durch den Schwefelbleiniederschlag Purinstoffe mitgerissen werden können. Da jedoch die Entbleiung mittels Schwefelsäure recht mühsam ist, und sich herausstellte, daß bei sehr gründlichem Auskochen des Schwefelbleiniederschlages keine Verluste an Purinstoffen eintreten, sind wir wieder zum  $H_2S$  zurückgekehrt.

3) Der Ammoniakzusatz darf keinen Niederschlag hervorrufen.



Reaktion, Abfiltrieren des  $\text{BaCO}_3$ -Niederschleges und Nachwaschen desselben mit heißem Wasser.

Einengen des mit Essigsäure kräftig angesäuerten Filtrates vom  $\text{BaCO}_3$ -Niederschlage bis auf 100 ccm für je 100 g Organbrei; dann Alkalischemachen durch einige Kubikcentimeter eines Gemisches gleicher Volumina 33 %iger Natronlauge und halbgesättigter Sodalösung.

Abfiltrieren des neuerlichen  $\text{BaCO}_3$ -Niederschleges über kleinem Filter, Nachwaschen mit Wasser von 60°, Ansäuern des Filtrats mit wenig starker Salzsäure und Übersättigen mit Ammoniak.

3. Herstellung der Hauptfällung: Vollständige Ausfällung der nicht allzusehr verdünnten Lösung (200 ccm für je 100 g Organbrei) mit 30—50 ccm Ludwigscher ammoniakalischer Chlorsilberlösung; N-Bestimmung in dem einmal mit sehr verdünntem Ammoniak, dann mehrmals mit heißem Wasser gewaschenen Silberniederschlage unter Beobachtung der Arnsteinschen Vorsichtsmaßregel.

4. Herstellung der Korrekturfällung: Entsilberung des mit Essigsäure angesäuerten Filtrates von der Hauptfällung mittels  $\text{H}_2\text{S}$ , Abdampfen der Flüssigkeit samt Niederschlag auf ca. 100 ccm für je 100 g Organbrei, Abfiltrieren des Schwefelsilbers, Nachwaschen desselben mit heißem Wasser, nochmaliges Aufkochen des Filtrates.

Zusatz von basischem Bleiacetat zu der Flüssigkeit, deren Volumen nicht mehr als 200 ccm pro 100 g Organbrei beträgt, bis zum Eintritt alkalischer Reaktion und bis zur vollständigen Ausfällung des Bleiniederschleges. Abfiltrieren des letzteren und gründliches Nachwaschen mit kaltem Wasser.

Entfernung des Bleies aus dem Filtrate durch  $\text{H}_2\text{S}$ , mehrmaliges Auskochen des Schwefelbleiniederschleges; Einengen der bleifreien Flüssigkeit auf 30—40 ccm für je 100 g Organbrei.

Zusatz von Ammoniak und einigen Kubikcentimetern ammoniakalischer Silberlösung und N-Bestimmung in dem Silberniederschlag wie sub 3.

In dieser Ausführung, die in den Arbeiten von Burian und Schur stets eingehalten wurde, stellt die Methode des

«korrigierten Wertes», wie ersichtlich, eine Geduldprobe dar. Allein sie gewährt dann den Vorteil, daß die gefährlichsten Fehlerquellen, wie allzuhoher Albumosengehalt und allzuweitgehende Verdünnung der mit Silber zu fällenden Flüssigkeit, länger währendes Erhitzen der Purinstoffe in alkalischer Lösung etc., möglichst vermieden werden. Was speziell den erstgenannten Punkt, die Gegenwart der Albumosen, anlangt, so ließe sich das Verfahren natürlich sehr erheblich abkürzen, wenn es anginge, die Albumosen von vornherein zu beseitigen. Leider haben jedoch alle für diesen Zweck benutzten Mittel (Bleiacetat [Kossel<sup>1)</sup>], Alkohol [Salkowski,<sup>2)</sup> Salomon,<sup>3)</sup> Bockendahl und Landwehr<sup>4)</sup>], Ammonsulfat [His und Hagen,<sup>5)</sup> Walker Hall<sup>6)</sup>], Ammonsulfat und Eisenammonalaun [His und Hagen<sup>7)</sup>], Zinksulfat [His und Hagen,<sup>8)</sup> Walker Hall<sup>9)</sup>], Trichloressigsäure [His und Hagen<sup>10)</sup>], Gerbsäure und Alménsche Lösung [Walker Hall<sup>11)</sup>]) hinsichtlich der Resultate der nachfolgenden Purinkörperbestimmung keine sehr befriedigenden Ergebnisse geliefert. Es schien uns daher wohl der Mühe wert, zu untersuchen, wie es mit der Vollständigkeit und Reinheit der mittels der Methode des «korrigierten Wertes» erhaltenen Purinkörperfällungen steht. Die nachfolgenden Kapitel geben hierüber Aufschluß.

## II. Zusammensetzung der mittels der Methode des korrigierten Wertes erhaltenen Hauptfällungen.

Die Frage, ob die Purinbasensilberniederschläge, die nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind, merkliche

1) Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 267.

2) Salkowski, Virchows Archiv, Bd. 81, S. 166, 1880.

3) Salomon, Diese Zeitschrift, Bd. II, S. 65.

4) Bockendahl und Landwehr, Virchows Archiv, Bd. 84, S. 501.

5) His und Hagen, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 367, 1900.

6) Walker Hall, The purinbodies of foodstuffs, p. 17.

7) His und Hagen, l. c. S. 365.

8) His und Hagen, l. c. S. 366.

9) Walker Hall, l. c. p. 18.

10) His und Hagen, l. c. S. 366.

11) Walker Hall, l. c. p. 17.



Mengen von Verunreinigungen einschließen, haben wir nur für die Hauptfällungen untersucht. Denn einerseits stellen die letzteren bei richtigem Vorgehen die weitaus größere Komponente der Niederschlagssumme dar, und andererseits ist bei den Korrekturfällungen die Gefahr der Verunreinigung nur gering.

*Albumosengehalt der Hauptfällungen.*

His und Hagen<sup>1)</sup> geben an, daß die aus Gemischen von Wittepepton- und Guaninlösung erhaltenen Silberniederschläge mit Albumosen verunreinigt seien und erst durch ein- bis zweimaliges Umfällen von den Biuretreaktion liefernden Beimengungen befreit werden können. Selbst wenn der Albumosengehalt der Wittepepton-Guaninmischung durch Fällung mit Trichloressigsäure oder Ammonsulfat sehr erheblich herabgesetzt werde, nehme der Silberniederschlag noch Albumosen in sich auf.

Mit Rücksicht auf diese Beobachtungen, die von His<sup>2)</sup> vorläufig mitgeteilt worden waren, bemerkten Burian und Schur in ihrer ersten den Purinstoffwechsel betreffenden Untersuchung bezüglich der Methode des korrigierten Wertes, dieselbe «gebe nach His unter Umständen zu hohe Resultate, weil in die Hauptfällung Albumosen eingehen können».<sup>3)</sup> Burian und Schur überzeugten sich jedoch bald, daß die Silberniederschläge bei Befolgung der oben gegebenen Vorschriften keine Beimengungen enthalten, welche Biuretreaktion liefern; sie sprachen deshalb in ihrer zweiten Untersuchung den Satz aus, «daß bei genauem und strengem Einhalten des Verfahrens keine Albumosen in die Purinkörperfällungen eingehen».<sup>4)</sup>

Tatsächlich läßt sich die Richtigkeit dieser letzteren Angabe sehr leicht bestätigen. Wir haben zahlreiche von den verschiedensten Organen stammende Hauptfällungen in der

1) l. c. S. 363, 367, 371.

2) Verhandl. d. XVII. Kongr. f. inn. Mediz., S. 324. 1899.

3) Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 80, S. 306. 1900.

4) Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 87, S. 242. 1901.

Siedehitze mit Schwefelwasserstoff, Natriumsulfid oder Salzsäure<sup>1)</sup> zerlegt und die resultierenden purinbasenreichen Lösungen (eventuell nach Beseitigung des  $H_2S$ ) unter Anwendung aller Kautelen auf Biuretreaktion untersucht. Fast niemals kam eine solche zur Beobachtung, vorausgesetzt, daß die Vorbereitung des Organauszuges für die Silberfällung korrekt durchgeführt worden war. Nur wenn so große Niederschlagsmengen verarbeitet wurden, daß ein hinreichendes Auswaschen sehr schwierig war, gab die durch Zerlegung der Niederschläge erhaltene Flüssigkeit mitunter erkennbare Biuretreaktion. Doch war die Intensität derselben auch in diesen Fällen sehr gering.

Als Beispiel hierfür sei

Versuch IX (Hall, Frühjahr 1901) angeführt. 620 g Kalbsthymus, mit 6 Litern Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent zersetzt und entsprechend weiter verarbeitet, lieferten eine sehr mächtige Hauptfällung. Eine Probe der letzteren wurde nach einmaligem oberflächlichen Waschen (mit sehr schwachem Ammoniak) durch einige Kubikcentimeter siedender verdünnter Salzsäure zerlegt; die so erhaltene Lösung zeigte lebhaft Biuretreaktion, gab bei Sättigung mit Ammonsulfat einen Niederschlag und lieferte (nach vorausgehender Neutralisation) mit Kochsalz und Essigsäure, sowie mit Essigsäure und Ferrocyankalium dichte, in der Wärme schwindende Trübungen. Während der Silberniederschlag somit vor dem gründlichen Auswaschen zweifellos nicht unbedeutende Albumosenmengen einschloß, gab er, nachdem er unter kräftigem Aufwirbeln mit heißem Wasser gewaschen worden war, bei der Zerlegung mit Salzsäure eine Lösung, die nur spurenweise Biuretreaktion zeigte. 1,1 g des vollständig getrockneten Niederschlages — ein Quantum, das der Elementaranalyse des Niederschlages (Vers. XVIII, S. 373) zufolge 0,1925 g N enthielt — wurde mit siedender verdünnter Salzsäure zerlegt und die filtrierte und neutralisierte Lösung auf 100 ccm aufgefüllt. Diese Flüssigkeit gab eine Biuretreaktion, die ganz unvergleichlich schwächer war, als die einer 0,25%igen Wittepeptonlösung. Selbst nach Verdünnung auf das zehnfache Volumen zeigte die nunmehr 0,025%ige Albumosenlösung noch etwas intensivere Biuretreaktion als die aus der Silberfällung gewonnene Flüssigkeit.<sup>2)</sup> Die angewandte

1) Vergl. Bruhns, Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 551. 1890.

2) Es braucht wohl kaum hervorgehoben zu werden, daß bei der Ausführung der Biuretreaktion in der Zerlegungsflüssigkeit und in der Albumosenlösung genau die gleichen Bedingungen (bezgl. Alkalikonzentration und Kupfersulfatzusatz) hergestellt wurden.



Niederschlagsmenge kann somit höchstens **0,004 g** Albumosen-N (= **2,1 %** des gesamten N) enthalten haben.

In der größten Mehrzahl der Fälle war indessen, wie erwähnt, die Gegenwart biuretgebender Stoffe in der Purinkörperfällung überhaupt nicht mit Bestimmtheit nachzuweisen.

Öfters prüften wir die (möglichst stark konzentrierten) Zerlegungsflüssigkeiten auch durch Sättigen mit Ammonsulfat oder Zinksulfat bei schwefelsaurer Reaktion auf die Anwesenheit von Albumosen; in den untersuchten Fällen war der Erfolg stets ein negativer.

Durfte es nun aber auch als sicher gelten, daß Albumosen in sorgfältig gewaschenen Hauptfällungen nicht oder fast nicht vorhanden sind, so war hierdurch doch die Reinheit der letzteren keineswegs außer Zweifel gestellt. Nur die Elementaranalyse konnte uns darüber aufklären, ob die Silberniederschläge nennenswerte Mengen fremder Beimengungen enthalten oder nicht.

#### *Elementaranalysen von Hauptfällungen.*

In den Organextrakten ist niemals ein einziger Purinstoff, sondern stets ein Gemenge verschiedener Xanthinbasen zugegen. Man darf deshalb von vornherein nicht erwarten, daß die Elementaranalysen der Silberniederschläge genau die für die Silberverbindung einer bestimmten Basis berechneten Werte liefern. Die Untersuchung muß vielmehr in erster Linie darauf gerichtet sein, das Verhältnis C:N in den Silberniederschlägen festzustellen. Dies Verhältnis ist für die nicht substituierten Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin,  $C_5:N_4$ ) = **15:14**, für die nicht substituierten Mono-Aminopurine (Guanin und Adenin,  $C_5:N_5$ ) = **12:14**. Wegen des hohen N-Gehaltes des Purinkernes sind diese Zahlen sehr charakteristisch. Beim Kreatin und Cytosin ( $C_4:N_3$ ) beträgt das Verhältnis C:N = **16:14**, bei der N-reichsten Eiweißbase, dem Arginin ( $C_6:N_4$ ), = **18:14**, beim Uracil ( $C_4:N_2$ ) = **24:14**. Bestände der N einer Hauptfällung zu **20 %** aus Albumosen-N, so würde sich, je nachdem, ob die übrigen **80 %** des N Oxy- oder Aminopurinen an-

gehören, das Verhältnis C : N erhöhen auf ca. 21 : 14 resp. 18,6 : 14.

Da nun, vom Carnin des Muskels abgesehen, Xanthinstoffe mit einem höheren C-Gehalte, als ihn die genannten vier eigentlichen Nucleinbasen besitzen, in Organauszügen bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden sind und jedenfalls nur in äußerst kleinen Mengen vorhanden sein könnten, so darf man erwarten, in den Hauptfällungen, wofern dieselben genügend rein sind, für das Verhältnis  $\frac{C}{N}$  entweder  $\frac{12}{14}$  oder  $\frac{15}{14}$  oder aber einen zwischen diesen beiden Werten liegenden Bruch zu finden. Beim Carnin (C<sub>7</sub> : N<sub>4</sub>) beträgt das Verhältnis C : N allerdings 21 : 14.

Zur Elementaranalyse wurden die Hauptfällungen mit heißem Alkohol und Äther gewaschen,<sup>1)</sup> im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet, in der Achatschale zum feinen Pulver verrieben und abermals im Exsiccator bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Das Trocknen wurde deshalb bei gewöhnlicher Temperatur vorgenommen, um vom Xanthin, Hypoxanthin und Guanin sicher bloß die Silberoxydverbindungen vom Typus X. Ag<sub>2</sub>O zu erhalten. So sehr sich auch das beim Erhitzen von Hypoxanthinsilberoxyd auf 120° entstehende wasserärmere Derivat (C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>Ag<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O<sup>2)</sup> zur Analyse eignen mag, so ist doch nicht bekannt, wie sich die Silberoxydverbindungen der anderen Basen bei der gleichen Behandlung verhalten. Um also mit Sicherheit von den verschiedenen Purinbasen, soweit dies möglich ist, Silberverbindungen von gleichartiger Zusammensetzung zu gewinnen,<sup>3)</sup> schien es uns zweckmäßiger, auf das Trocknen bei höherer Temperatur zu verzichten.

Unsere Präparate enthielten ausnahmslos einige Procente Chlorsilber, das zugleich mit dem Silber bestimmt werden mußte. Zu diesem Zwecke wurde die Substanz entweder mit wenig siedender Salpetersäure

1) Diese zur Beschleunigung des Trocknens angewandten Waschmittel lassen die Hauptfällungen unverändert. Beim Verdampfen des Alkohols und des Äthers hinterbleibt kein Rückstand.

2) Strecker, Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 108, S. 136 und Bruhns, Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 544. 1890.

3) Bei Gegenwart von Adenin läßt sich dies Ziel nicht vollkommen erreichen, weil bei Fällung von Adeninslösungen mit ammoniakalischem Silber neben dem Adeninsilberoxyd C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub> · Ag<sub>2</sub>O bekanntlich stets auch Adeninsilber C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>AgN<sub>5</sub> sich bildet. (Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XII, S. 241, 1888 und Bruhns, l. c. 547.)



(D = 1,2) gelöst, das zurückbleibende AgCl (nach Verdünnung der Flüssigkeit auf das vierfache Volumen) in der Siedehitze abfiltriert und zur Wägung gebracht, und der Ag-Gehalt des Filtrates nach Volhard ermittelt; oder aber — und dies geschah in der Mehrzahl der Fälle — die Substanz wurde vorsichtig verascht, die aus Ag und AgCl bestehende Asche gewogen, dann das Ag durch Behandlung mit HNO<sub>3</sub> und HCl in AgCl übergeführt und aus der Gewichtszunahme der Gehalt der Asche an den beiden Komponenten berechnet.

Nach diesen Vorbemerkungen seien die bei diversen Hauptfällungen erhaltenen Ergebnisse mitgeteilt.

A. Pankreas. Ganz eindeutig sind die Resultate, welche die aus Pankreasauszügen stammenden Niederschläge liefern. Hier bestehen die Hauptfällungen, wenn sie genau nach den oben gegebenen Vorschriften hergestellt sind, bei rascher Arbeit zweifellos aus den reinen Silberverbindungen der Aminopurine, und zwar ganz vorwiegend aus Guaninsilberoxyd; die minder reichlich vorhandenen übrigen Nucleinbasen bleiben offenbar fast vollständig für die Korrekturfällung zurück. Wird die Vorbereitung des Extraktes ohne Zusatz eines Antisepticums sehr langsam durchgeführt, so können — wahrscheinlich infolge von unmerklicher Fäulnis — die Aminopurine in Oxypurine (spez. das Guanin in Xanthin) übergehen.

Versuch X. (Hall, Frühjahr 1901.) Aus 1570 g Hammelpankreas wurde möglichst schnell die Hauptfällung hergestellt. Eine Probe derselben wurde vor dem Auswaschen mit Salzsäure und H<sub>2</sub>S zerlegt; die Flüssigkeit gab intensive Biuretreaktion. Eine andere ziemlich große Probe wurde nach vollendetem Auswaschen durch H<sub>2</sub>S (bei Gegenwart von Salzsäure) zersetzt; die vom H<sub>2</sub>S befreite eingeeengte Lösung zeigte kaum spurenweise angedeutete Biuretreaktion und gab mit Ammoniak dichten charakteristischen Guaninniederschlag, der Trockenrückstand der Lösung lieferte keine «Weidelsche» Reaktion.<sup>1)</sup>

Analysen: 0,1759 g Substanz enthalten 0,0242 g AgCl und 0,0864 g Ag. — 0,1388 g Substanz (= 0,1197 g AgCl-freie Substanz): 19,80 ccm N (18°, 754 mm.)

1) Die Reaktion wurde in der von E. Fischer (Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 30, S. 2236 Anm.) angegebenen Weise ausgeführt. Um Verwechselungen mit anderen Xanthinkörperreaktionen vorzubeugen, soll im nachfolgenden die Bezeichnung «Weidelsche Reaktion» beibehalten werden.

Gefunden für AgCl-freie Substanz	Berechnet für				
	Guanin- silberoxyd $C_5H_5N_5 \cdot Ag_2O$	Adenin- silberoxyd $C_5H_5N_5 \cdot Ag_2O$	Xanthin- silberoxyd $C_5H_4N_4O_2 \cdot Ag_2O$	Hypo- xanthin- silberoxyd $C_5H_4N_4O \cdot Ag_2O$	Adenin- silber $C_5H_4N_4Ag$
%	%	%	%	%	%
N 18,94	18,27	19,07	14,58	15,21	28,92
Ag 56,95	56,40	58,86	56,25	58,69	44,62

Die Zahlen stimmen am besten auf Guaninsilberoxyd, dem etwas Adeninsilberoxyd beigemischt ist.

Versuch XI. (Burian, Sommer 1901.) Rasch dargestellte Hauptfällung aus 1390 g Rinderpankreas. Wird zwecks möglichst vollständiger Beseitigung des beigemischten AgCl sechsmal mit mäßig verdünntem Ammoniak, dann erst mit heißem Wasser gewaschen. Eine Probe des ausgewaschenen Niederschlages, bei Gegenwart von Salzsäure mit  $H_2S$  in Siedehitze zerlegt, gibt eine Lösung, die keine Spur einer Biuretreaktion, dagegen mit Ammoniak reichliche Guaninfällung liefert und deren Rückstand keine Weidelsche Reaktion zeigt.

Analysen: 0,2282 g Substanz enthalten 0,0071 g AgCl und 0,1098 g Ag. — 0,3098 g Substanz (= 0,2998 g AgCl-freie Substanz) : 0,2114 g  $CO_2$ , 0,0421 g  $H_2O$ . — 0,1975 g Substanz (= 0,1911 g AgCl-freie Substanz) : 38,5 ccm N ( $23\frac{3}{4}^\circ$ , 752,6 mm). — 0,2316 g Substanz (= 0,2241 g AgCl-freie Substanz) : 0,0508 g N (Kjeldahl).

Gefunden für AgCl-freie Substanz	Berechnet für			
	Guanin- silberoxyd, das 7,52% $Ag_2O$ verloren hat	Unverändertes Guanin- silberoxyd $C_5H_5N_5O \cdot Ag_2O$	Adenin- silberoxyd $C_5H_5N_5 \cdot Ag_2O$	Adeninsilber $C_5H_4AgN_5$
%	%	%	%	%
C 19,23	19,00	15,66	16,62	24,79
H 1,56	1,58	1,30	1,36	1,66
N 22,51—22,67	22,17	18,27	19,07	28,92
Ag 49,46	49,40	56,40	58,86	44,63
O 7,16	7,85	8,37	4,09	—
<b>C : N 11,91 : 14</b>	<b>12 : 14</b>			

Der für das Verhältnis C : N gefundene Wert lehrt, daß wir es hier zweifellos mit einem Niederschlage zu tun haben, der nur Aminopurine enthält. Durch die Ammoniakbehandlung war es gelungen, den AgCl-



Gehalt des Produktes zu verringern, nicht aber ihn völlig auf Null herabzudrücken; derselbe betrug im vorliegenden Falle 3,11 % von dem Gewichte der Substanz, während er sich in Versuch X auf 13,75 % belaufen hatte. Gleichzeitig scheint aber dem Niederschlage durch das häufige Waschen mit ziemlich starkem Ammoniak auch Silberoxyd entzogen worden zu sein. Wenigstens stimmen die gefundenen Zahlen am besten auf Guaninsilberoxyd, das 7½ %  $\text{Ag}_2\text{O}$  verloren hat, oder, was dasselbe ist, auf ein Gemenge von 87,6 % Guaninsilberoxyd und 12,4 % Guanin. Daß diese Auffassung die richtige ist, d. h., daß durch starkes Ammoniak aus einem Guaninsilberoxydniederschlage wirklich Silberoxyd ausgewaschen werden kann, das ergibt sich aus

Versuch XII. (Burian, Frühjahr 1902.) 0,1159 g Guanin<sup>1)</sup> werden in 100 ccm N-freier Natronlauge gelöst. 20 ccm der Lösung enthalten 0,01071 g N (Kjeldahl) = 0,0231 g Guanin; aus der angewandten Guaninmenge berechnen sich für 20 ccm der Lösung 0,02318 g Guanin. Das benutzte Guanin darf demnach als vollständig rein gelten.

75 ccm der alkalischen Guaninlösung — mit 0,0869 g Guanin — werden nun mit Salpetersäure neutralisiert und hierauf mit Ammoniak und ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Der Niederschlag wird über einen Gooch-Tiegel abgesaugt, sechsmal mit siedendem Wasser und dann mehrmals mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vacuum-exsiccator zur Gewichtskonstanz getrocknet.

	Gefunden:	Berechnet
Gewicht		aus der angewandten Guaninmenge:
des Niederschlages:	<b>0,2204 g</b>	<b>0,2204 g</b>
		(= 0,0869 g Guanin + 0,1335 g $\text{Ag}_2\text{O}$ )

Diesen Daten zufolge besteht der Niederschlag zweifellos aus dem unverminderten und unveränderten Guaninsilberoxyd; das letztere wird somit durch heißes Wasser weder merklich gelöst noch zersetzt. Nunmehr wird der Niederschlag im Gooch-Tiegel sechsmal mit starkem Ammoniak gewaschen. Das Präparat verändert hierbei sein Aussehen, indem die kompakten grauen Bröckel der Silberverbindung an der Oberfläche weißlich und locker werden; im ammoniakalischen Waschwasser läßt sich durch Salpetersäure und Salzsäure die Gegenwart von Silber nachweisen.

Der Niederschlag wiegt jetzt (nach neuerlicher Trocknung) nur mehr 0,2016 g; durch die Ammoniakbehandlung ist also ein Gewichtsverlust von 0,0188 g bewirkt worden. Handelt es sich hierbei um eine teilweise Auflösung des unveränderten Niederschlages in dem ammoniakalischen Waschwasser, so muß das letztere 0,0106 g und der

1) Bez. der Darstellung und der Eigenschaften des angewandten Guanins vgl. S. 385.

Filterrückstand 0,1137 g Ag enthalten.<sup>1)</sup> Beruht der Gewichtsverlust dagegen lediglich auf Abgabe von  $\text{Ag}_2\text{O}$ , so muß das Filtrat 0,0175 g und der Niederschlag 0,1068 g Ag in sich schließen.<sup>2)</sup> Tatsächlich liefert das ammoniakalische Waschwasser 0,0226 g  $\text{AgCl} = 0,0170$  g Ag, während beim Glühen des Niederschlages im Gooch-Tiegel 0,1071 g Ag erhalten werden. Also:

	Gefunden:	Berechnet	
		unter der Voraussetzung einer	
		bloßen Abgabe von $\text{Ag}_2\text{O}$ :	Auflösung von Guaninsilberoxyd:
Ag im Filtrate . . . .	0,0170 g	0,0175 g	0,0106 g
Ag im Niederschlage .	0,1071 >	0,1068 >	0,1137 >
Summe . .	0,1241 g	0,1243 g	0,1243 g

Diese Zahlen zeigen in ganz unzweideutiger Weise, daß Guaninsilberoxyd beim intensiven Waschen mit Ammoniak zum Teil zerlegt wird, wobei das  $\text{Ag}_2\text{O}$  in das Filtrat übertritt, während das Guanin auf dem Filter zurückbleibt. Infolge dieses partiellen Silberverlustes enthielt der mit Ammoniak behandelte Niederschlag im vorliegenden Falle 53,10%<sup>3)</sup> statt 56,40% Ag, d. h. er bestand aus 94,15% Guaninsilberoxyd und 5,85% Guanin. Die Wirkung des Ammoniaks ist hier eine etwas geringere, als in dem vorhergehenden Versuche, offenbar deshalb, weil nicht, wie in dem letzteren, die lockeren Flocken des frischen, sondern die kompakten Bröckel des getrockneten Niederschlages der  $\text{NH}_3$ -Einwirkung ausgesetzt wurden.

Die Tatsache, daß Guaninsilberoxyd durch Ammoniak zersetzt werden kann, ist für die quantitative Bestimmung der Purinbasen von Interesse. Während nämlich das aus seiner Silberverbindung durch  $\text{NH}_3$  freigemachte Guanin so gut wie völlig ungelöst und somit für die N-Bestimmung erhalten bleibt, müssen die in Ammoniak leichter löslichen Basen bei einer etwaigen analogen Zerlegung ihrer Silberverbindungen zugleich mit dem  $\text{Ag}_2\text{O}$  selbst in Lösung gehen. Der schließliche Effekt muß also hier der gleiche sein, wie bei einer einfachen partiellen Auflösung der unzersetzten Silberverbindungen. In der Tat wird, wie der nachfolgende Versuch lehrt, Hypoxanthinsilber-

1) Ins Waschwasser übergegangen: 0,0188 g Guaninsilberoxyd, entsprechend 0,0106 g Ag. Filterrückstand: 0,2016 g Guaninsilberoxyd, entsprechend 0,1137 g Ag.

2) Ins Waschwasser übergegangen: 0,0188 g  $\text{Ag}_2\text{O}$ , entsprechend 0,0175 g Ag; in dem Filterrückstand zurückgeblieben: 0,1335 g (ursprünglicher  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Gehalt des Niederschlages) minus 0,0188 g = 0,1147 g  $\text{Ag}_2\text{O}$ , entsprechend 0,1068 g Ag.

3) 0,2016 g Substanz: 0,1071 g Ag.



oxyd durch starkes  $\text{NH}_3$  zu einem kleinen Teile gelöst, ohne daß eine Zerlegung des Niederschlages nachweisbar würde.<sup>1)</sup>

Versuch XIII. (Burian, Sommer 1902.) 0,3130 g Hypoxanthin<sup>2)</sup> werden in etwas Ammoniak gelöst und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung ausgefällt. Der Niederschlag wird über einem Gooch-Tiegel abgesaugt, mehrmals mit heißem Wasser und dann mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsiccator zum konstanten Gewichte getrocknet.

Gefunden:                      Berechnet:

Gewicht des Niederschlages:    0,8426 g                      0,8469 g.

Zur Kontrolle werden 0,0500 g der trockenen Substanz verascht. Sie liefern 0,0293 g = 58,60% Ag;  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}$ .  $\text{Ag}_2\text{O}$  verlangt 58,69% Ag. Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß durch die Behandlung mit siedendem Wasser abermals keine Zersetzung und höchstens eine ganz geringfügige Auflösung des Niederschlages bewirkt worden ist.<sup>3)</sup>

Der Rest des Präparates, im Gewichte von 0,7926 g, wird im Gooch-Tiegel zwölfmal mit starkem Ammoniak gewaschen. Nach erneutem Trocknen zeigt sich das Gewicht des Niederschlages auf 0,6991 g reduziert: Gewichtsverlust 0,0935 g. Ist diese Gewichtsabnahme der Ausdruck einer teilweisen Auflösung des Hypoxanthinsilberoxyds, so muß das Waschwasser 0,0549 g und der Filtrerrückstand 0,4103 g Ag enthalten.<sup>4)</sup> Hat der Gewichtsverlust dagegen eine bloße Abgabe von  $\text{Ag}_2\text{O}$  zur Ursache, so muß der Ag-Gehalt des Filtrates 0,0870 g, jener des Niederschlages 0,3782 g betragen.<sup>5)</sup> In Wirklichkeit ergibt nun das ammoniakalische Waschwasser 0,0718 g  $\text{AgCl}$  = 0,0540 g Ag, während der Niederschlag beim Glühen im Gooch-tiegel 0,4045 g Ag hinterläßt. Also:

	Gefunden:	Berechnet	
		unter der Voraussetzung einer	
		bloßen Abgabe von $\text{Ag}_2\text{O}$ :	Auflösung von Hypo- xanthinsilberoxyd:
Ag im Filtrat . . . .	0,0540 g	0,0870 g	0,0549 g
Ag im Niederschlag .	0,4045 >	0,3782 >	0,4103 >
Summe . .	0,4585 g	0,4652 g	0,4652 g

1) Vgl. auch Bruhns, Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 545, wo sich die Angabe findet, daß Hypoxanthinsilber in konzentriertem Ammoniak nicht unlöslich, sondern nur schwerlöslich sei.

2) Bezüglich des angewandten Hypoxanthins siehe die Angaben auf S. 386.

3) Vgl. auch Bruhns, l. c. S. 545, wo das Hypoxanthinsilberoxyd als «in heißem Wasser so gut wie unlöslich» bezeichnet wird.

4) Ins Waschwasser übergegangen 0,0935 g Hypoxanthinsilberoxyd, entsprechend 0,0549 g Ag; Filtrerrückstand 0,6991 g Hypoxanthinsilberoxyd, entsprechend 0,4103 g Ag.

5) Ins Waschwasser übergegangen 0,0935 g  $\text{Ag}_2\text{O}$ , entsprechend 0,0870 g Ag; im Filtrerrückstand 0,4996 g (anfänglicher  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Gehalt) minus 0,0935 g = 0,4061  $\text{Ag}_2\text{O}$ , entsprechend 0,3782 g Ag.

Durch starkes Ammoniak wird Hypoxanthinsilberoxyd somit — ohne nachweisbare Spaltung in seine Komponenten — teilweise aufgelöst. Trotzdem dürfte der Lösung auch hier eine Zerlegung der Silberverbindung vorausgehen. Hierfür spricht die von uns öfters beobachtete Erscheinung, daß sich Purinkörpersilberniederschläge zwar nicht unter den Bedingungen, die bei der Herstellung der Silberfällung bestehen, d. h. nicht bei Gegenwart von viel unverbrauchtem Silber, wohl aber bei Abwesenheit von solchem in einem größeren Überschuß von Ammoniak partiell auflösen. Das Primäre scheint demnach ein Zerfall der Silberverbindungen zu sein, der bei Gegenwart eines Silberüberschusses unmerklich wird. Wie dem immer sei, das eine ergibt sich jedenfalls mit Bestimmtheit aus dem vorstehenden Experiment, daß ein häufigeres Waschen der Purinkörperfällungen mit starkem Ammoniak unbedingt zu vermeiden ist.<sup>1)</sup>

Wegen des ungünstigen Einflusses einer eingreifenden Ammoniakbehandlung wurde in einem weiteren mit Pankreas ausgeführten Versuche die  $\text{NH}_3$ -Waschung auf ein Minimum reduziert.

Versuch XIV. (Burian, Frühjahr 1902.) Möglichst rasch hergestellte Hauptfällung aus 1230 g Schweinepankreas. Der Niederschlag wurde einmal mit sehr verdünntem Ammoniak, mehrmals mit heißem Wasser gewaschen.

Analysen: 0,2583 g Substanz enthalten 0,0387 g AgCl und 0,1244 g Ag. — 0,2327 g Substanz (= 0,1979 g AgCl-freie Substanz): 0,1160 g  $\text{CO}_2$ , 0,0249 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0,1884 g Substanz (= 0,1602 g AgCl-freie Substanz): 0,0301 g N (Kjeldahl).

$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O} \cdot \text{Ag}_2\text{O}$ . Ber. %: C 15,66 H 1,30 N 18,27 Ag 56,40 O 8,37  
Für AgCl-freie Substanz gef. %: > 16,00 > 1,40 > 18,79 > 56,65 > 7,16

**C : N ber. 12 : 14, gef. 11,92 : 14.**

Auch hier handelt es sich um einen Niederschlag, der aus den Silberverbindungen der Aminopurine besteht. Zweifellos liegt im wesentlichen Guaninsilberoxyd vor; eine Beimengung von einigen Prozenten Adensilberoxyd ist nicht ausgeschlossen.

Während also in den Versuchen X, XI, und XIII die aus Pankreas hergestellten Hauptfällungen die Silberoxydderivate der Aminopurine sicher in ziemlich großer Reinheit enthielten, zeigt das nachstehende Experiment, daß bei langsamem Arbeiten an Stelle der Aminopurine Oxypurine gefunden werden können.

Versuch XV. (Burian, Herbst 1900.) 725 g Hammelpankreas wurden 12 Stunden lang mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent gekocht. Aus äußeren Ursachen wurde die Zersetzungsflüssigkeit nach dem Barytzusatze zwei und nach der  $\text{CO}_2$ -Einleitung drei Tage lang im warmen Laboratorium stehen gelassen. Die Lösung, welche keinen

1) Vgl. oben S. 351.



Fäulnisgeruch wahrnehmen ließ, wurde bei Gegenwart von Essigsäure eingeengt, jedoch hierauf nicht zunächst mit Natronlauge und Salzsäure, sondern direkt mit viel Ammoniak und ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Die hierbei erhaltene Hauptfällung ließ man zehn Tage lang im Dunkeln stehen, um zu prüfen, ob sie dabei eine Zersetzung erfahre: sie blieb rein weiß und anscheinend gänzlich unverändert. Nunmehr wurde der Niederschlag abfiltriert und zweimal mit verdünntem Ammoniak, mehrmals mit heißem Wasser gewaschen. Eine nicht zu kleine Probe des Präparates wurde bei Gegenwart von Salzsäure mit  $H_2S$  zerlegt; die resultierende Flüssigkeit zeigte keine Spur einer Biuretreaktion und gab mit Ammoniak keine Trübung, dagegen lieferte ihr Trockenrückstand deutliche Weidelsche Reaktion.

Analysen: 0,4182 g Substanz enthalten 0,0125 g  $AgCl^1$ ) und 0,2292 g Ag. — 0,65425 g Substanz (= 0,6346 g  $AgCl$ -freie Substanz): 0,3720 g  $CO_2$ , 0,0764 g  $H_2O$ . — 0,4806 g Substanz (= 0,4662 g  $AgCl$ -freie Substanz): 57,5 ccm. N (14,5°, 758,2 mm.).

$C_5H_4N_4O_2Ag_2O$ . Ber. %: C 15,62 H 1,04 N 14,58 Ag 56,24 O 12,51 (Xanthinsilberoxyd)

Für  $AgCl$ -freie Substanz gef. %: C 15,98 H 1,33 N 14,44 Ag 56,49 O 11,76

**C : N ber. 15 : 14, gef. 15,48 : 14.**

Dem für das Verhältnis C : N gefundenen Werte zufolge haben wir es hier nicht mit einem Amino-, sondern mit einem Oxypurinniederschlage zu tun. Die Analysenzahlen stimmen auf Xanthinsilberoxyd. Für die Gegenwart von Xanthin im Niederschlage spricht auch der positive Ausfall der Weidelschen Reaktion. Es hat also bei der (ohne Zusatz eines Antiseptikums vorgenommenen) lange dauernden Verarbeitung des Organauszuges eine Umwandlung des Guanins in Xanthin stattgefunden; die Ursache derselben ist wohl in einer unmerklichen Fäulnis zu suchen, die während des zwei- resp. dreitägigen Stehens des Extraktes nach dem Barytzusatz resp. der  $CO_2$ -Einleitung eingetreten sein dürfte.<sup>2)</sup>

B. Muskel und Thymus. Während demnach die Analysen der Pankreashauptfällungen keinen Zweifel daran zulassen, daß die letzteren vollständig aus Purinbasensilberverbindungen bestehen, besitzen die aus Muskel- und Thy-

1) Der relativ niedrige  $AgCl$ -Gehalt des Präparates erklärt sich daraus, daß in dem vorliegenden Falle der Silberfällung kein Salzsäurezusatz vorausgeschickt und nicht  $AgCl$ , sondern  $AgNO_3$  zur Herstellung der ammoniakalischen Silberlösung verwendet wurde.

2) Eine derartige Umwandlung von Guanin in Xanthin muß auch für zahlreiche Versuche anderer Autoren angenommen werden. Ein Beispiel hierfür liefert der Befund von Inoko (Diese Zeitschr., Bd. XVIII, S. 540, 1894), daß in Rinderpankreas 0,74% Xanthin, dagegen kein Guanin enthalten sei!

musextrakten hergestellten Hauptfällungen stets einen relativ zu hohen C-Gehalt. Das Verhältnis C:N beträgt in ihnen ca. 18—25:14 statt 12—15:14.

Versuch XVI. (Hall, Frühjahr 1901.) Hauptfällung aus dem schwefelsauren Extrakte von Rindfleisch. Eine ansehnliche Probe des Niederschlages liefert, mit H<sub>2</sub>S zerlegt, eine Lösung, die keine Spur einer Biuretreaktion gibt.

Analysen: 1) 0,2040 g Substanz: 0,1734 g CO<sub>2</sub>, 0,0426 g H<sub>2</sub>O. — 0,1965 g Substanz: 0,0280 g N (Kjeldahl).

Gef. %: C 23,10 H 2,32 N 14,23.

**C:N = 22,9:14.**

Versuch XVII. (Burian, Frühjahr 1902.) Hauptfällung aus 600 g Rindfleisch. Der Niederschlag ist frei von biuretgebenden Substanzen.

Analysen: 0,1387 g Substanz enthalten 0,0188 g AgCl und 0,0554 g Ag. — 0,1387 g Substanz (= 0,1199 g AgCl-freie Substanz): 0,1123 g CO<sub>2</sub>, 0,0305 g H<sub>2</sub>O. — 0,1715 g Substanz (= 0,1488 g AgCl-freie Substanz): 24,7 ccm N (13,8°, 768 mm).

Für AgCl-freie Substanz gef. %: C 25,54 H 2,82 N 19,80 Ag 46,20 O 5,64

**C:N = 18,05:14.**

Der Rest des Niederschlages wurde verwendet zur Ausführung von Versuch XXIII.

Versuch XVIII. (Hall, Frühjahr 1901.) Hauptfällung aus 620 g Kalbsthymus. Über den Gehalt derselben an Biuretreaktion gebenden Stoffen vgl. Versuch IX.

Analysen: 0,5360 g Substanz enthalten 0,0273 g AgCl und 0,2160 g Ag. — 0,5360 g Substanz (= 0,5087 g AgCl-freie Substanz): 0,4580 g CO<sub>2</sub>, 0,1366 g H<sub>2</sub>O. — 0,1424 g Substanz (= 0,13514 g AgCl-freie Substanz): 0,02366 g N (Kjeldahl).

Für AgCl-freie Substanz gef. %: C 24,55 H 2,98 N 17,50 Ag 42,46 O 12,51

**C:N 19,6:14.**

Versuch XIX. (Burian, Sommer 1901.) Hauptfällung aus dem schwefelsauren Extrakte von Kalbsthymus. Albumosenfrei.

Analysen: 2) 0,4611 g Substanz: 0,3404 g CO<sub>2</sub>, 0,0757 g H<sub>2</sub>O. — 0,6600 g Substanz: 0,0762 g N (Kjeldahl).

Gef. %: C 20,15 H 1,82 N 11,55.

**C:N = 24,4:14.**

Der Rest des Niederschlages diente zur Ausführung von Versuch XXIV.

Es müssen also in den von Muskel- und Thymusauszügen herstammenden Silberniederschlägen neben den unsubstituierten Purinstoffen Verbindungen mit einem verhältnismäßig

1) Die AgCl- und Ag-Bestimmung unterblieb in diesem Falle.

2) AgCl- und Ag-Bestimmung unterblieb.



hohen C-Gehalte zugegen sein, und zwar auch in Fällen, in denen eine erheblichere Albumosenbeimengung völlig ausgeschlossen ist. Handelt es sich hier um substituierte und deshalb relativ C-reiche Xanthinbasen, oder aber um (N-freie oder N-haltige) Substanzen, die gar nicht der Puringruppe angehören? Oder trifft vielleicht beides gleichzeitig zu?

Zur vorläufigen Orientierung über diese Fragen beschlossen wir, die bei der Zerlegung von Muskel- und Thymushauptfällungen resultierenden Flüssigkeiten mit Phosphorwolframsäure zu behandeln, um zunächst zu erfahren, ob die in Rede stehenden C-reichen Stoffe durch dies Reagens gefällt werden, also basischer Natur sind oder nicht.

*Untersuchungen von Hauptfällungen mittels Phosphorwolframsäure.*

Die Purinbasen werden durch Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Schwefelsäure nicht vollständig niedergeschlagen; vielmehr bleiben unter den Bedingungen, die in den nachfolgenden Versuchen eingehalten wurden, stets circa  $3^{1/2}$ — $5^{1/2}$  ‰ des angewandten Purinkörper-N im Filtrate.

Versuch XX. (Burian, Herbst 1901.) a) 10 ccm einer mit N-freier Natronlauge bereiteten Guaninlösung,<sup>1)</sup> 0,0363 g N enthaltend, werden mit N-freier Schwefelsäure neutralisiert, verdünnt, mit 2,5 g N-freier konzentrierter  $H_2SO_4$  versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit ist also ungefähr normal in bezug auf  $H_2SO_4$  und  $1/100$ -n in bezug auf Guanin. Nunmehr werden 25 ccm einer 10 ‰ igen Phosphorwolframsäurelösung hinzugefügt; das Reagens ist nicht N-frei, sondern enthält in 25 ccm 0,0012 g N. Der durch den Phosphorwolframsäurezusatz entstandene reichliche Niederschlag wird hierauf abfiltriert und dreimal mit je 30 ccm Normal- $H_2SO_4$ -Lösung nachgewaschen. Das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat ergibt 0,0025 g N, wovon jedoch die in der Phosphorwolframsäure von vornherein vorhandenen 0,0012 g N in Abzug zu bringen sind. Somit beträgt der nicht gefällte Guanin-N 0,0013 g = 3,6 ‰ des angewandten Guanin-N.

b) 10 ccm der nämlichen alkalischen Guaninlösung werden mit HCl neutralisiert, mit  $NH_3$  übersättigt und mit ammoniakalischer Ag-Lösung ausgefällt. Der sehr gut gewaschene Niederschlag von Guaninsilberoxyd wird in 100 ccm. Wasser, dem 2,5 g N-freier  $H_2SO_4$  zugesetzt sind, suspendiert und unter lebhaftem Sieden durch  $H_2S$  zerlegt. Die vom Schwefelsilber quantitativ getrennte Flüssigkeit wird eingengt und

1) Bezüglich des angewandten Guanins vgl. S. 385.

dann auf 50 ccm aufgefüllt; demnach bestehen hier die gleichen Konzentrationsverhältnisse wie in Experiment a. Hierauf werden 25 ccm einer N-freien 10 % igen Auflösung von (mit Äther gereinigter) Phosphorwolframsäure hinzugefügt. Behandlung des Niederschlages, wie sub a. Das Filtrat enthält in diesem Falle  $0,0019 \text{ g N} = 5,2 \%$  des angewandten Guanin-N.

c) 35 ccm einer alkalischen Hypoxanthinlösung<sup>1)</sup> mit  $0,0261 \text{ g N}$  werden in der sub b) beschriebenen Weise mit ammoniakalischer Ag-Lösung gefällt. Der sorgfältig gewaschene Hypoxanthinsilberoxydniederschlag wird mit 8,5 ccm einer starken, aus N-freier Natronlauge hergestellten Natriumsulfidlösung in der Siedehitze zerlegt, das Schwefelsilber abfiltriert und gründlich mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wird mit N-freier Schwefelsäure neutralisiert, nach Zusatz von 2,5 g konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eingengt und dann auf 45 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit ist somit wiederum ungefähr normal in bezug auf  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $1/100$ -n in Bezug auf Hypoxanthin. Fällung mit 25 ccm N-freier 10 % iger Phosphorwolframsäurelösung, Abfiltrieren und Auswaschen des Niederschlages wie sub b). — Filtrat-N:  $0,0013 \text{ g} = 4,9 \%$  des angewandten Hypoxanthin-N.

Ganz ähnliche Ergebnisse werden auch erhalten, wenn an Stelle von reindargestellten Purinsubstanzen Pankreashauptfällungen zur Anwendung gelangen. Dies lehrt

Versuch XXI. (Burian, Herbst 1901.) In den aus Schweinepankreas hergestellten Extraktfraktionen **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** des Versuches II (vgl. S. 341) werden in der gewöhnlichen Weise die Hauptfällungen erzeugt. Die sorgfältig gewaschenen Niederschläge werden in je 200 ccm Wasser, dem 5 g N-freier konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugesetzt sind, suspendiert und in der Siedehitze durch  $\text{H}_2\text{S}$  zerlegt. Nach Abfiltrieren und gründlichem Nachwaschen des Schwefelsilbers werden die Lösungen eingengt und dann in Maßkölbchen auf je 100 ccm aufgefüllt, so daß sie abermals in bezug auf  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ungefähr normal sind. Je 20 ccm der Flüssigkeiten dienen zur mehrmals wiederholten Anstellung der Biuretreaktion, die in beiden Fällen negativ ausfällt. In weiteren je 10 ccm wird der N-Gehalt der Lösungen bestimmt. Die aus **A<sub>2</sub>** stammende Probe liefert 0,0068 g, die aus **B<sub>2</sub>** stammende 0,0075 g N. Demnach beträgt der N-Gehalt der ganzen Zerlegungsflüssigkeit (Gesamthauptfällungs-N) bei **A<sub>2</sub>** **0,068 g**, bei **B<sub>2</sub>** **0,075 g**.

Je 50 ccm der beiden Lösungen werden nunmehr mit je 25 ccm der in Versuch XIX sub a) erwähnten N-haltigen 10 % igen Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt, die Niederschläge abfiltriert und dreimal mit je 30 ccm Normal- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung nachgewaschen. Der Filtrat-N beträgt bei **A<sub>2</sub>** 0,0028 g, bei **B<sub>2</sub>** 0,0030 g, wovon indessen — der in der Phosphorwolframsäure enthaltenen Verunreinigung halber — in beiden Fällen

1) Bezüglich des angewandten Hypoxanthins vgl. unten S. 386.



0,0012 g abgezogen werden müssen; für den genuinen N des Phosphorwolframsäurefiltrates bleiben somit übrig bei A<sub>2</sub> 0,0016 g, bei B<sub>2</sub> 0,0018 g. Rechnen wir diese N-Mengen auf das Gesamtvolumen der Zerlegungsflüssigkeiten (100 ccm) um, so erhalten wir als Totalmenge des unter den geschilderten Bedingungen durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren N

bei A<sub>2</sub> 0,0032 g N = 4,7 % des Gesamthauptfällungs-N,  
 bei B<sub>2</sub> 0,0036 g N = 4,8 % >

Bei Zusatz von Phosphorwolframsäure zu ca.  $\frac{1}{100}$  n-Purinbasenlösungen<sup>1)</sup> in n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Nachwaschen der abfiltrierten Niederschläge mit ungefähr dem gleichen Volum n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entgehen also stets etwa  $3\frac{1}{2}$ — $5\frac{1}{2}$  % der Purinbasen der Fällung.

Werden nun die Flüssigkeiten, welche bei der Zerlegung von Muskel- oder Thymus-Hauptfällungen resultieren, unter eben denselben Bedingungen mit Phosphorwolframsäure behandelt, so bleiben gleichfalls nur 5— $5\frac{1}{2}$  % des angewandten Hauptfällungs-N in Lösung; demnach hat man den Filtrat-N auch hier ganz oder doch fast ganz auf die ungefällten Purinkörperreste zu beziehen. Dagegen ist der Gehalt der Filtrate an organischer Substanz resp. an C viel zu groß, um bloß von jenen Resten herrühren zu können; folglich müssen neben den letzteren noch C-haltige, aber N-freie oder sehr N-arme Verbindungen in den Filtraten enthalten sein.

Andere als die eben genannten N-freien oder N-armen Verunreinigungen scheinen den Muskel- und Thymushauptfällungen nicht anzuhafte. Wenigstens liefern die aus den Phosphorwolframniederschlägen regenerierten Silberoxydverbindungen für das Verhältnis C : N sehr annähernd korrekte Werte, und zwar auch in Fällen, in denen der C-Gehalt der ursprünglichen Hauptfällung im Vergleich zum N um ein Bedeutendes zu hoch war.

Belege für die vorstehenden Angaben liefern die Protokolle der Versuche XXII—XXV.

1) Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß  $\frac{1}{100}$ -n-Purinbasenlösungen keineswegs übermäßig verdünnt sind. Je nachdem, ob es sich um Lösungen von Oxy- oder Aminopurinen handelt, enthalten sie 0,056 oder 0,070 g N in 100 ccm.

Versuch XXII. (Burian, Winter 1901.) In den aus Pferdefleisch hergestellten Extraktfraktionen **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** des Versuches III (vgl. S. 342) werden in der gewöhnlichen Weise die Hauptfällungen erzeugt. Die gründlich ausgewaschenen Niederschläge werden in je 300 ccm Wasser, dem 10 g N-freier konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt sind, suspendiert und in der Siedehitze mittels H<sub>2</sub>S zerlegt. Die vom Schwefelsilber getrennten Lösungen werden eingeengt und dann in Maßkölbchen auf je 200 ccm aufgefüllt. Da die Biuretprobe bei **A<sub>2</sub>** sehr deutlich positiv, bei **B<sub>2</sub>** aber vollkommen negativ ausfällt, so wird nur die von **B<sub>2</sub>** stammende Zerlegungsflüssigkeit weiter verarbeitet. 20 ccm dieser letzteren Lösung ergeben (nach Kjeldahl) 0,0114 g N. Dementsprechend beträgt der N-Gehalt der ganzen Zerlegungsflüssigkeit (Gesamthauptfällungs-N) **0,114 g**.

150 ccm der Lösung werden nunmehr mit 40 ccm einer N-freien 10%igen Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt; der Niederschlag wird abfiltriert und dreimal mit je 60 ccm n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung nachgewaschen.

a) Untersuchung des Phosphorwolframsäurefiltrates. Genau ein Drittel des Filtrates dient zur N-Bestimmung; es liefert 0,0015 g N. Somit enthält das Gesamtfiltrat **0,0045 g N**. Rechnen wir dies N-Quantum auf das ganze Volumen der Zerlegungsflüssigkeit um, so erhalten wir als Totalmenge des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren N-Anteiles **0,0069 g N = 5,2%** des Gesamthauptfällungs-N.

Genau zwei Drittel des Filtrates werden zur Bestimmung des Gehaltes an organischer Substanz verwendet. Die Flüssigkeit wird zu diesem Behufe mit Barytwasser von der H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und der Phosphorwolframsäure und mit CO<sub>2</sub> vom Barytüberschusse befreit. Nach dieser Behandlung ist jedoch noch Baryum als BaCl zugegen, weil bei der Zerlegung der Hauptfällung mittels H<sub>2</sub>S aus dem beigemengten AgCl Salzsäure entstanden ist. Es wird deshalb vorsichtig sehr verdünnte Schwefelsäure zugesetzt, bis weder Baryum, noch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in der Flüssigkeit nachweisbar ist. Hierauf wird die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und der im Wasser gelöste Rückstand in ein Wägegölchen gespült und abermals zur Trockne verdampft. Zur möglichst vollständigen Beseitigung der Salzsäure wird das Präparat, das eine in Wasser sehr leicht lösliche amorphe gelbliche Masse darstellt, im Vacuumexsiccator über Natronkalk bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Gewicht des Produktes: 0,2114 g.<sup>1)</sup> Das Gesamtfiltrat enthält demnach **0,3156 g** organische Substanz und (s. oben) nur 0,0045 g N.

Während also der N-Gehalt des Phosphorwolframsäurefiltrates (im Verhältnis zum angewandten Hauptfällungs-N) nicht größer ist als in den Versuchen mit reinen Purinstoffen, und daher zweifellos auf die

1) Eine Probe des Präparates hinterließ beim Verbrennen auf dem Platinblech keinen Rückstand.



ungefällten Basenspuren bezogen werden muß, beweist der hohe Gehalt des Filtrates an organischer Substanz, daß das letztere neben den ungefällten Basenspuren noch eine N-freie oder N-arme organische Verunreinigung enthält.

b) Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlages. Derselbe wird in Natronlauge gelöst und die Lösung durch Barytwasser von der Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure, dann durch etwas  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  vom Barytüberschuß befreit. Hierauf wird die alkalische Flüssigkeit mit  $\text{HCl}$  angesäuert und mit  $\text{NH}_3$  und ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Der hierbei entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise gewaschen und zur Analyse vorbereitet.

Analysen: 0,2136 g Substanz: 0,1515 g  $\text{CO}_2$ , 0,0269 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0,2004 g Substanz: 0,0363 g N (Kjeldahl).

Gef.  $\%$ : C 19,35 H 1,40 N 18,12.

**C : N = 14,95 : 14.**

Der C- und N-Gehalt des Niederschlages ist für Hypoxanthin- und Xanthinsilberoxyd zu hoch; vielleicht liegt ein silberärmeres Produkt vor. Wie dem auch sei, der für das Verhältnis C:N gefundene Wert zeigt jedenfalls, daß das Präparat ausschließlich unsubstituierte Oxypurine enthält. Außer der in das Phosphorwolframsäurefiltrat übergehenden N-armen Beimengung hat sich also in der angewandten Muskelhauptfällung keine weitere Verunreinigung nachweisen lassen.

Versuch XXIII. (Burian Frühjahr 1902.) Zur Ausführung dieses Versuches dient die aus Rindfleisch hergestellte Hauptfällung, deren Elementaranalyse in Versuch XVII mitgeteilt ist. 0,9500 g Silberniederschlag mit **0,1881 g N** (vgl. die eben zitierte Elementaranalyse) wird mit 60 ccm einer starken aus N-freier Natronlauge bereiteten Natriumsulfidlösung in der Siedehitze zerlegt. Die vom Schwefelsilber getrennte Flüssigkeit wird mit N-freier Schwefelsäure neutralisiert, nach Zusatz von 15 g N-freier conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eingeengt, auf 300 ccm aufgefüllt und mit 100 ccm einer N-freien 10%igen Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der reichliche Niederschlag wird abfiltriert und dreimal mit je 100 ccm n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  gewaschen.

a) Untersuchung des Phosphorwolframsäurefiltrates. Genau  $\frac{1}{7}$  des Filtrates dient zur N-Bestimmung; es enthält 0,0015 g N; somit beträgt der N-Gehalt des Gesamfiltrates

**0,0105 g N = 5,5% des angewandten Hauptfällungs-N.**

Die übrigen  $\frac{6}{7}$  des Filtrates werden durch Barytwasser von der Schwefelsäure und der Phosphorwolframsäure, dann durch  $\text{CO}_2$  vom Barytüberschuß befreit. Die alkalische Lösung<sup>1)</sup> wird hierauf unter

1) Wegen der Anwendung von Natriumsulfid zur Herstellung der Zerlegungsflüssigkeit reagiert die letztere nach Beseitigung der  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und der Phosphorwolframsäure (sowie des Barytüberschusses) natürlich alkalisch.

dauerndem Kochen mit sehr verdünnter Schwefelsäure aufs genaueste neutralisiert und danach zur Trockene eingedampft. Der hauptsächlich aus  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  neben etwas  $\text{NaCl}$  bestehende Rückstand, der durch eine in Wasser sehr leicht lösliche Substanz gelblich gefärbt ist, wird in ein breites Schiffchen übergeführt und zur Gewichtskonstanz getrocknet. Er liefert bei vorsichtiger Verbrennung im Sauerstoffstrom (mit vorgelegtem Bleichromat)  $0,1276 \text{ g CO}_2 = 0,0348 \text{ g C}$ . Demnach enthält das ganze Phosphorwolframsäurefiltrat **0,0406 g C**.

Wie wir sehen, entspricht der Filtrat-N abermals den ungefallten Basenresten, während der C-Gehalt des Filtrates zu groß ist, um aus jenen Resten herkommen zu können. Das Verhältnis C:N im Phosphorwolframsäurefiltrat beträgt  $54,1:14$ ! Die Anwesenheit einer N-armen oder N-freien C-haltigen Verunreinigung kann also nicht bezweifelt werden.

b) Untersuchung des Phosphorwolframniederschlages. Aus demselben werden, wie in Versuch XXII, die  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Verbindungen regeneriert.

Analysen:  $0,1360 \text{ g}$  Substanz enthalten  $0,0085 \text{ g AgCl}$  und  $0,0745 \text{ g Ag}$ .  $0,2020 \text{ g}$  Substanz (=  $0,1895 \text{ g AgCl}$ -freie Substanz):  $0,1155 \text{ g CO}_2$ ,  $0,0254 \text{ g H}_2\text{O}$ . —  $0,2002 \text{ g}$  Substanz (=  $0,1877 \text{ g AgCl}$ -freie Substanz):  $26,0 \text{ ccm N}$  ( $15^{3/4}^\circ$ ,  $746,7 \text{ mm}$ ).



Für  $\text{AgCl}$ -freie Substanz gef.  $\%: \text{C } 16,65 \quad \text{H } 1,48 \quad \text{N } 15,87 \quad \text{Ag } 58,40$

**C:N ber. 15:14, gef. 14,69:14.**

Das Präparat liefert also für das Verhältnis C:N, welches in der ursprünglichen Hauptfällung  $18,05:14$  betragen hatte, einen Wert, der vollständig einem reinen Oxypurin-niederschlag entspricht. Die Analysenzahlen stimmen annähernd auf Hypoxanthinsilberoxyd.

Versuch XXIV. (Burian, Frühjahr 1902.) Zur Untersuchung gelangt die aus Kalbsthymus stammende Hauptfällung, über deren Elementarzusammensetzung in Versuch XIX berichtet ist; die Substanz war ca.  $\frac{1}{2}$  Jahr lang im verschlossenen Präparatenglas aufbewahrt worden. Unter genauer Einhaltung der gleichen Bedingungen, wie in Versuch XXIII, wird  $1,6501 \text{ g}$  Silber-niederschlag mit **0,1906 g N** (vgl. die Analyse Versuch XIX) mittels Natriumsulfidlösung zersetzt und die Zerlegungsflüssigkeit mit Phosphorwolframsäure gefällt.

a) Untersuchung des Phosphorwolframsäurefiltrates.  $\frac{1}{3}$  des Filtrates wird zur N-Bestimmung verwendet; es liefert  $0,0032 \text{ g N}$ ; demnach enthält das Gesamtfiltrat

**0,0096 g N = 5,0 %** des angewandten Hauptfällungs-N.

$\frac{2}{3}$  des Filtrates dienen zur Ermittlung des C-Gehaltes und werden zu diesem Zwecke genau nach dem in Versuch XXIII beschriebenen Verfahren behandelt. Der durch die beigemengte organische Substanz bräunlich gefärbte Salzurückstand liefert bei der Verbrennung  $0,3619 \text{ g}$



$\text{CO}_2 = 0,0987 \text{ g C}$ . Das Gesamtfiltrat schließt somit **0,1481 g C** in sich. Wir haben also den Filtrat-N wiederum auf die ungefällten Basenreste zu beziehen, die letzteren müssen jedoch abermals von einer C-reichen, aber N-freien oder N-armen Verunreinigung begleitet sein.

b) Untersuchung des Phosphorwolframniederschlags. Der Niederschlag wird, wie in den vorhergehenden Versuchen, in die  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Verbindungen übergeführt.

Analysen: 0,2350 g Substanz: 0,1632 g  $\text{CO}_2$ , 0,0366 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0,1893 g Substanz: 0,0372 g N (Kjeldahl).

Gef.  $\%$ : C 18,94 H 1,73 N 19,65

**C : N = 13,5 : 14.**

Der für das Verhältnis C : N gefundene Wert entspricht einem Gemenge von Silberverbindungen unsubstituierter Oxy- und Aminopurine. Der hohe C- und N-Gehalt des Niederschlags dürfte auf die Gegenwart der Monosilberverbindung des Adenins zurückzuführen sein.

Versuch XXV. (Burian, Winter 1901.) Ausgangsmaterial: die Hauptfällungen, die in den aus Kalbsthymus bereiteten Extraktfraktionen  $\text{A}_1$  und  $\text{B}_1$  von Versuch IV erzeugt worden waren. Es muß bemerkt werden, daß die Flüssigkeiten  $\text{A}_1$  und  $\text{B}_1$  — im Gegensatze zu den anderen Extraktfraktionen des Versuches IV — äußerer Gründe halber mehrere Tage lang im Laboratorium stehen gelassen wurden (vgl. oben S. 344), jedoch zur Zeit der Ausführung der Hauptfällung noch keinerlei wahrnehmbare Fäulniserscheinungen darboten.

Die Niederschläge wurden, wie im Versuch XXII, mittels  $\text{H}_2\text{S}$  bei Gegenwart von Schwefelsäure zerlegt. Keine der beiden Zerlegungsflüssigkeiten gab (nach Beseitigung des  $\text{H}_2\text{S}$ ) Biuretreaktion. Die von  $\text{B}_1$  stammende Lösung wurde sodann unter genauer Einhaltung der bei Versuch XXII beschriebenen Bedingungen mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Untersuchung des Phosphorwolframsäurefiltrates verunglückte. Der Phosphorwolframniederschlag wurde in der früher angegebenen Weise in die  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Verbindungen zurückverwandelt.

Analysen: 0,1628 g Substanz enthalten 0,0098 g  $\text{AgCl}$  und 0,0874 g  $\text{Ag}$ . — 0,2333 g Substanz (= 0,2193 g  $\text{AgCl}$ -freie Substanz): 0,1272 g  $\text{CO}_2$ , 0,0245 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0,2142 g Substanz (= 0,2013 g  $\text{AgCl}$ -freie Substanz): 0,0302 g N (Kjeldahl).

$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{Ag}_2\text{O}$  } ber.  $\%$ : C 15,62 H 1,04 N 14,58 Ag 56,25  
(Xanthinsilberoxyd)

$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O} \cdot \text{Ag}_2\text{O}$  } ber.  $\%$ : C 16,30 H 1,08 N 15,21 Ag 58,69  
(Hypoxanthinsilberoxyd)

Für  $\text{AgCl}$ -freie Substanz gef.  $\%$ : C 15,81 H 1,24 N 15,00 Ag 57,10

**C : N ber. 15 : 14, gef. 14,75 : 14.**

Dem Werte zufolge, der für das Verhältnis C : N gefunden wurde, haben wir es in diesem Falle zweifellos mit einem reinen Oxypurin-niederschlage zu tun; die Analysenzahlen stimmen auf ein Gemenge

von Xanthin und Hypoxanthin. Da nun Thymus bekanntlich nicht unerhebliche Mengen von Adenin enthält, das wenigstens teilweise in die Hauptfällung eingehen muß, und da dementsprechend der Thymuspurin-niederschlag des vorhergehenden Versuches wirklich auch Aminopurine in sich schloß: so müssen wir wohl annehmen, daß hier ähnlich, wie wir es in Versuch XV bei einem Pankreasextrakt konstatieren konnten, eine Umwandlung von Aminopurinen in Oxypurine stattgefunden hat. Man wird wohl mit der Vermutung nicht fehlgehen, daß es sich abermals um die Wirkung einer unmerklichen Fäulnis handelt.

Diese Auffassung wird gestützt durch ein Experiment, das hier beiläufig Erwähnung finden möge.

Versuch XXVI. (Burian, Winter 1900). Aus 80 g Kalbsthymus wurde in der gewöhnlichen Weise ein schwefelsaurer Auszug bereitet. Man verarbeitete den Extrakt absichtlich sehr langsam, indem man zwischen den einzelnen Etappen des Verfahrens immer mehrtägige Pausen eintreten ließ, während welcher die Flüssigkeit im warmen Laboratorium stehen blieb. Zum Schlusse wurde die Lösung, die keine merklichen Fäulniszeichen aufwies, mit Schwefelsäure schwach angesäuert und auf ein Volumen von 175 ccm gebracht. Nunmehr wurden drei Portionen **A**, **B** und **C**, zu je 56 ccm (= 25,6 g Thymus) abgemessen.

Die in **A** erzeugte Hauptfällung lieferte bei der Zerlegung mit  $H_2S$  eine Flüssigkeit, in der sich durch verschiedene Reaktionen die Gegenwart geringer Albumosenspuren nachweisen ließ.

In **B** wurde durch Haupt- und Korrekturfällung der Gesamtpurin-N bestimmt.

**C** endlich wurde mit 6 g konzentrierter  $H_2SO_4$  versetzt und auf  $70^\circ$  erwärmt; dann fügte man unter möglichster Konstanthaltung der Temperatur portionenweise Natriumnitrit hinzu, bis der Geruch nach salpetriger Säure auch beim längeren Stehen in der Wärme nicht mehr verschwand. Im ganzen wurden ca. 5 g  $NaNO_2$  verbraucht. Nach dem Erkalten wurde die durch Nitroprodukte intensiv gelb gefärbte Lösung stark ammoniakalisch gemacht und zur Bestimmung des Gesamtpurin-N mittels Haupt- und Korrekturfällung weiter verarbeitet.

Die Resultate sind enthalten in

Tabelle VI

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe Gesamtpurin-N	Gesamt-Purin-N in Prozenten des frischen Organbreies
<b>B</b>	0,1089	0,0010	<b>0,1099</b>	0,4293 %
<b>C</b>	0,0742	0,0361	<b>0,1103</b>	0,4308 %

Es fällt zunächst auf, daß sich in der mit salpetriger Säure be-



handelten Extraktfraktion C die Verteilung des Purinkörper-N auf Haupt- und Korrekturfällung sehr stark zugunsten der letzteren verschoben hat; eine Erklärung hierfür vermögen wir nicht zu geben. Indessen ist der Gesamt-Purin-N in B und C gleich groß, und hieraus scheint uns mit ziemlicher Sicherheit hervorzugehen, daß der (ursprünglich zweifellos adeninhaltige) Thymusextrakt am Schlusse der sehr langsam durchgeführten Verarbeitung keine Aminopurine mehr enthielt, die durch salpetrige Säure unter N-Verlust in Oxypurine hätten übergeführt werden können. Dementsprechend wurde auch der prozentische Purinbasen-N-Gehalt der Thymus in diesem Versuche deutlich niedriger gefunden, als z. B. in Versuch IV bei den rasch verarbeiteten Extraktfraktionen A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>.

Nach dem vorstehenden sind die Muskel- und Thymushauptfällungen durch eine N-freie oder sehr N-arme organische Beimengung verunreinigt, die beim Umfällen der Niederschläge mit Phosphorwolframsäure (neben geringen Basenresten) im Filtrat zurückbleibt. Diese Beimengung bedeutet offenbar keine irgendwie erhebliche Fehlerquelle für das Verfahren «des korrigierten Wertes», weil bei demselben ja bloß der N-Gehalt der Niederschläge in Betracht kommt. Wir haben deshalb auch nicht weiter untersucht, welcher Art die erwähnte Verunreinigung ist; man könnte vielleicht an kohlehydratartige Substanzen denken.

Da die Muskel- und Thymusniederschläge nun keinerlei anderweitige Verunreinigung einzuschließen, sondern nach Entfernung der oben genannten Beimengung — den Elementaranalysen zufolge — nur mehr unsubstituierte Purinbasen zu enthalten scheinen,<sup>1)</sup> so darf es wohl für höchst wahrschein-

---

1) Daß die Analysen der Hauptfällungen — sei es unmittelbar (Pankreas), sei es nach vorausgehender Umfällung mit Phosphorwolframsäure (Muskel und Thymus) — in unseren Versuchen stets Werte geliefert haben, welche die ausschließliche oder fast ausschließliche Gegenwart unsubstituierter Purinbasen in den Hauptfällungen dartun, beweist keineswegs, daß in den Organextrakten nicht geringe Mengen von substituierten (alkylierten) Purinstoffen zugegen sein können. Dieselben könnten sehr wohl ganz oder größtenteils in den Filtraten der Hauptfällungen zurückbleiben, um dann in die Korrekturniederschläge einzugehen; bestehen doch z. B. auch die Pankreashauptfällungen bei rascher Arbeit nur aus Aminopurinen, obzwar das Vorhandensein eines kleinen Quantum von Oxypurinen im

lich gelten, daß auch die aus Muskel- und Thymusauszügen gewonnenen Hauptfällungen bei strenger Beobachtung unseres Verfahrens einen für die Zwecke des letzteren genügenden Grad von Reinheit besitzen.

Die Hauptergebnisse des vorliegenden Kapitels lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen :

1. Hauptfällungen, die genau nach der im I. Abschnitte beschriebenen Methode hergestellt sind, enthalten keine oder nur minimale Spuren von Albumosen.

2. Die von Pankreasauszügen herstammenden Hauptfällungen bestehen aus analysenreinen Purinbasensilberverbindungen, und zwar (bei rascher Arbeit) ganz vorwiegend aus Guaninsilberoxyd.

3. Die aus Muskel- und Thymusextrakten gewonnenen Hauptfällungen enthalten zwar eine Verunreinigung, doch scheint es sich hierbei so gut wie ausschließlich um eine N-freie oder sehr N-arme Beimengung zu handeln, die beim Umfällen der Niederschläge mit Phosphorwolframsäure (neben Resten der Purinbasen) im Filtrate zurückbleibt.

Einige Nebenresultate sind in den nachstehenden Sätzen verzeichnet :

4. Während bei der Ausführung der Purinbasensilberfällung (d. h. bei Gegenwart eines Silberüberschusses) eine hohe Ammoniakkonzentration nicht nur völlig unschädlich, sondern sogar behufs Fernhaltung von Beimengungen notwendig ist, betitzt starkes Ammoniak bei Abwesenheit von überschüssigem Silber eine langsame, aber deutliche Einwirkung auf die Purinbasen-Silberniederschläge: Guaninsilberoxyd wird teilweise in Guanin und  $\text{Ag}_2\text{O}$  gespalten, Hypoxanthinsilberoxyd dagegen — wenngleich in geringem Maße — ohne nachweisbare Zerlegung aufgelöst.

---

Pankreas erwiesen ist. Vielleicht werden sich zur Aufsuchung etwa in Organauszügen enthaltener alkylierter Purinstoffe gerade die Korrekturfällungen besonders gut eignen.



5. Bei Zusatz von Phosphorwolframsäure zu einer mäßig verdünnten Lösung von Purinbasen in Normalschwefelsäure werden die Purinbasen nicht vollständig gefällt; unter den früher angegebenen Bedingungen bleiben  $3\frac{1}{2}$ — $5\frac{1}{2}$  % derselben in Lösung.

6. Die Aminopurine scheinen schon durch eine ganz geringgradige, nicht ohne weiteres wahrnehmbare Fäulnis, wie sie in den Organextrakten bei langsamer Verarbeitung eintreten kann, in Oxyपुरine übergeführt zu werden.

### III. Verwendbarkeit der Methode des korrigierten Wertes für quantitative Zwecke.

An das Ergebnis des vorhergehenden Abschnittes, daß nämlich die Hauptfällungen allem Anscheine nach den erforderlichen Grad von Reinheit besitzen, um für die Bestimmung des Purinbasen-N von Organauszügen brauchbar zu sein, schließt sich naturgemäß die Frage an, ob die Niederschläge auch vollständig sind, ob also die Summe des Haupt- und Korrekturfällungs-N wirklich als Ausdruck des gesamten Purinbasengehalts der Auszüge betrachtet werden kann.

Für korrekt durchgeführte Analysen, in denen die überwiegende Menge der Basen bereits in der Hauptfällung abgeschieden wurde, dürfte die aufgeworfene Frage zu bejahen sein.<sup>1)</sup> Der einwandfreie Nachweis hierfür läßt sich jedoch nur schwer führen. Wir haben Versuche darüber angestellt, ob zu Organauszügen hinzugesetzte Purinbasen mittels der Methode des korrigierten Wertes quantitativ wiedergefunden werden. Derartige Versuche beweisen aber natürlich im Falle eines positiven Ergebnisses nicht mit voller Sicherheit, daß das Verfahren verlustlos ist; denn haftet den beiden Vergleichswerten (von denen der eine mit, der andere ohne Basenzusatz

---

<sup>1)</sup> Daß in Fällen, in welchen ein größeres Purinbasenquantum der Hauptfällung entgangen und für den Korrekturniederschlag zurückgeblieben ist, ziemlich erhebliche Verluste eintreten können, das ergibt z. B. ein Vergleich der in Versuch VI (Tab. IV, S. 350) für die Lösungen A und B gefundenen Werte.

erhalten wurde) das gleiche absolute Defizit an, so wird sich dasselbe in dem Resultate gar nicht ausprägen. Indessen würden die Experimente mit Purinkörperzusatz wenigstens im Falle eines ungünstigen Ergebnisses ganz zweifellos die Unbrauchbarkeit der Methode dartun; aus diesem Grunde schien es immerhin geboten, solche Experimente durchzuführen.

*Versuche über die Wiedergewinnung bekannter Purinbasenmengen aus Organextrakten.*

Bei diesen Versuchen gelangten Hypoxanthin, Xanthin und Guanin zur Anwendung. Das Hypoxanthin wurde in der bekannten Weise aus Fleischextrakt, das Xanthin nach der Vorschrift von E. Fischer<sup>1)</sup> aus Guanin, dies letztere endlich aus den Schuppen von *Alburnus lucidus* dargestellt.

Zur Gewinnung des Guanins aus den Fischschuppen benützten wir nicht die von Bethe<sup>2)</sup> verwendete Methode, sondern verfahren in der nachstehenden Weise. Wir erhitzen die Schuppen mit ungefähr der 5-fachen Gewichtsmenge Wassers zum Sieden, setzen zu der kochenden Flüssigkeit etwa  $\frac{1}{10}$  Volumen heißer, sehr konzentrierter Natronlauge hinzu und erhielten das Gemisch noch circa eine Viertelstunde lang im lebhaften Sieden; dann wurde rasch durch ein großes Faltenfilter filtriert und das Filtrat sofort abgekühlt. Der aus den gequollenen und macerierten Schuppen bestehende Rückstand wurde noch zweimal der gleichen Behandlung unterzogen. Die vereinigten Filtrate versetzten wir in der Kälte unter kräftigem Rühren umschichtig mit Kupfersulfat und Hydroxylaminchlorhydrat, bis neben dem weißlichen Purinkörperkupferoxydulniederschlag gelbe Flocken von Cuprohydroxyd bemerkbar wurden, die beim Umrühren nicht mehr verschwanden. Hierauf wurde der mit heißem Wasser gut ausgewaschene Kupferniederschlag mit farbloser Schwefelnatriumlösung unter lebhaftem Kochen zerlegt, Schwefelsäure bis zur deutlich sauren Reaktion hinzugefügt und das Schwefelkupfer abfiltriert. Aus der stark eingeengten Zerlegungsflüssigkeit erhielt man das Guanin durch Fällung mit Ammoniak. Das so gewonnene Produkt war noch aschehaltig;<sup>3)</sup> es wurde deshalb nochmals in wenig Natronlauge gelöst und (nach dem Abfiltrieren der ungelösten Partikel) aus dem zuvor angesäuerten Filtrat wiederum mit  $\text{NH}_3$  gefällt. Die sorgfältig ausgewaschenen Präparate erwiesen sich dann stets als nahezu aschefrei.

1) Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 215, S. 309. 1882.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 474. 1895.

3) Die Asche besteht im wesentlichen aus Calciumphosphat.



Eine zur Kontrolle ausgeführte N-Bestimmung ergab den berechneten Wert:

0,3257 g Substanz: 0,15054 g N (Kjeldahl)

$C_5H_5N_5O$  ber.  $\%$ : N 46,35, gef.  $\%$ : N 46,22.

Auch das aus dem Guanin dargestellte Xanthin war augenscheinlich rein:

0,4177 g Substanz: 0,15442 g N (Kjeldahl)

$C_5H_4N_4O_2$  ber.  $\%$ : N 36,84, gef.  $\%$ : N 36,96.

Daß das aus dem Fleischextrakt gewonnene Hypoxanthin gleichfalls den Anforderungen genügte, zeigt die nachfolgende Analyse:

0,2380 g Substanz: 0,0975 g N (Kjeldahl)

$C_5H_4N_4O$  ber.  $\%$ : N 41,17, gef.  $\%$ : N 40,96.

Um ohne Schwierigkeit ausreichende Konzentrationen erzielen zu können, lösten wir die Basen in (N-freier) Natronlauge auf. Die Resultate von drei Experimenten, in denen solche Lösungen zu Organauszügen hinzugefügt worden waren, sind bereits oben (Versuch II—IV) mitgeteilt worden. Wir haben dort gesehen, daß das zugesetzte Guanin und Xanthin aus den korrekt behandelten Extrakten (**B**) stets so gut wie vollständig wiedergewonnen wurde, und zwar gleichviel, ob der Zusatz der Purinsubstanz erst nach vollendeter Vorbereitung des Extraktes (Versuch II) oder gleich anfangs, d. h. noch vor der Barytbehandlung (Versuch III und IV), erfolgte. Ganz dasselbe Ergebnis lieferten auch einige andere analoge Versuche.

Versuch XXVII. (Hall, Frühjahr 1901.) 500 g Brei von Rindfleisch wurden mit 5 Litern Schwefelsäure von 0,5 Volumprozent zerkoht. Gesamtmenge von Filtrat und Waschwasser 9000 ccm. Es wurden drei Portionen, **A**, **B** und **C**, zu je 1800 ccm (entsprechend 100 g Fleisch) abgemessen. **A** wurde direkt verarbeitet; zu **B** wurden sofort, also noch vor dem Barytzusatz, zu **C** dagegen erst unmittelbar vor Ausführung der Hauptfällung je 15 ccm einer alkalischen Guaninlösung (mit 0,0777 g Guanin-N) hinzugefügt. Resultate:

Tabelle VII.

Lösung	N der Haupt- fällung	N der Korrektur- fällung	Summe Gesamtpurin-N	Fehler
A	0,0538	0,0082	0,0620	—
B	0,1301	0,0120	berechnet (vorstehende Summe + 0,0777): <b>0,1397</b> gefunden: <b>0,1421</b>	+ 1,7 %
C	0,1313	0,0197	berechnet (w. o.): <b>0,1397</b> gefunden: <b>0,1510</b>	+ 8,0 %

Versuch XXVIII. (Hall, Frühjahr 1901.) Schwefelsaurer Extrakt aus 400 g Kalbfleisch wird vor der Verarbeitung auf 2340 ccm eingengt. Drei Portionen, **A**, **B** und **C**, zu je 585 ccm (= 100 g Fleisch) gelangen zur Untersuchung. **A** wird ohne Zusatz verarbeitet, zu **B** werden vor der Barytbehandlung, zu **C** erst vor Ausführung der Hauptfällung je 5 ccm der im vorigen Versuch verwendeten alkalischen Guaninlösung (mit 0,259 g Guanin-N) hinzugefügt.

Tabelle VIII.

Lösung g	N der Haupt- fällung	N der Korrektur- fällung	Summe Gesamtpurin-N	Fehler
A	0,0491	0,0222	<b>0,0713</b>	—
B	0,0680	0,0311	berechnet (vorstehende Summe + 0,0259): <b>0,0972</b> gefunden: <b>0,0991</b>	+ 1,95 %
C	0,0702	0,0268	berechnet (w. o.): <b>0,0972</b> gefunden: <b>0,0970</b>	— 0,22 %



Versuch XXIX. (Burian, Frühjahr 1902.) a) Schwefelsaurer Extrakt aus 300 g Rindfleisch. Volumen der Flüssigkeit nach der Behandlung mit Baryt und mit  $\text{CO}_2$ : 5400 ccm. Zwei Portionen, **A** und **B**, zu je 1800 ccm (= 100 g Fleisch) werden abgemessen; zu **B** werden 35 ccm einer alkalischen Hypoxanthinlösung (mit 0,0262 g Hypoxanthin-N) hinzugesetzt. Beide Portionen werden dann bei Gegenwart von Essigsäure eingeengt und in der gewöhnlichen Weise weiter verarbeitet.

b) Schwefelsaurer Extrakt aus 140 g Rindfleisch. Volumen der für die Hauptfällung vollständig vorbereiteten Flüssigkeit: 150 ccm. Zwei Portionen, **M** und **N**, zu je 55 ccm (=  $51\frac{1}{3}$  g Fleisch) werden verwendet; zu **N** werden 15 ccm einer alkalischen Hypoxanthinlösung (mit 0,0229 g Hypoxanthin-N) hinzugefügt. Die Hauptfällungen werden in diesem Falle nicht direkt der N-Bestimmung unterzogen, sondern durch Behandlung mit Salpetersäure ( $D = 1,2$ ) unter Harnstoffzusatz in die Hypoxanthin- und Xanthinfraktion zerlegt; dann werden die möglichst quantitativ getrennten Fraktionen auf die gebräuchliche Weise in die  $\text{Ag}_2\text{O}$ -Verbindungen übergeführt und die letzteren zur N-Bestimmung benützt.

Tabelle IX.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung	Summe Gesamtpurin-N	Fehler
<b>A</b>	0,0593	0,0036	<b>0,0629</b>	—
<b>B</b>	0,0910	0,0018	berechnet (vorstehende Summe + 0,0262): <b>0,0891</b> gefunden: <b>0,0928</b>	+ 4,1 %
<b>M</b>	Hypoxanthin- fraktion: 0,0159 Xanthinfraktion: 0,0107	0,0040	<b>0,0310</b>	—
<b>N</b>	Hypoxanthin- fraktion: 0,0305 Xanthinfraktion: 0,0180	0,0041	berechnet (vorstehende Summe + 0,0229): <b>0,0539</b> gefunden: <b>0,0526</b>	— 2,4 %

Versuch XXX. (Hall 1901.) Schwefelsaurer Extrakt aus 450 g Kalbsthymus. Volumen von Filtrat und Waschwasser: 6000 ccm. Zur Verarbeitung gelangen drei Portionen, **A**, **B** und **C**, zu je 1200 ccm (= 90 g Thymus), nachdem zuvor, d. h. noch vor der Barytbehandlung, zu **A** 5 ccm einer alkalischen Guaninlösung (mit 0,0259 g N),  
 » **B** 10 » derselben » » ( » 0,0518 » N),  
 » **C** 15 » » » » ( » 0,0777 » N)  
 hinzugesetzt worden sind.<sup>1)</sup>

Tabelle X.

Lösung	N der Hauptfällung	N der Korrekturfällung:	Summe Gesamtpurin-N	Fehler
<b>A</b>	0,3917	0,0323	<b>0,4240</b>	—
<b>B</b>	0,4194	0,0302	berechnet (vorstehende Summe + 0,0518 — 0,0259 = + 0,0259): <b>0,4499</b> gefunden: <b>0,4496</b>	— 0,1 %
<b>C</b>	0,4373	0,0445	berechnet: I. (Summe von A + 0,0777 — 0,0259 = + 0,0518): <b>0,4758</b> II. (Summe von B + 0,0777 — 0,0518 = + 0,0259): <b>0,4755</b> gefunden: <b>0,4818</b>	gegenüber Berechnung I: + 1,2 % gegenüber Berechnung II: + 1,3 %

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente, in denen wir versuchten, zu Organauszügen zugesetzte Purinbasen quantitativ wiederzugewinnen, sind zusammengestellt in

1) Eine Vergleichsportion, die ohne Basenzusatz verarbeitet wurde, verunglückte.



Tabelle XI.

Übersicht über die Versuche mit Purinkörperzusatz.

Ver- suchs- nummer	Verglichene Lösungen	Gesamt- purin-N ohne Zusatz	Zugesetzte Purinsubstanz	Menge des zu- ge- setz- ten Purin-N	Gesamtpurin-N bei Purinkörper- zusatz		Fehler
					be- rechnet	ge- funden	
<b>A. Muskel.</b>							
III	B <sub>3</sub> und B <sub>4</sub>	0,0551	Xanthin	0,0261	0,0812	0,0821	+ 1,1 %
XXVII	A und B	0,0620	Guanin	0,0777	0,1397	0,1421	+ 1,7 %
XXVII	A und C	0,0620	Guanin	0,0777	0,1397	0,1510	+ 8,1 %
XXVIII	A und B	0,0713	Guanin	0,0259	0,0972	0,0991	+ 1,95 %
XXVIII	A und C	0,0713	Guanin	0,0259	0,0972	0,0970	- 0,22 %
XXIX	A und B	0,0629	Hypoxanthin	0,0262	0,0891	0,0928	+ 4,1 %
XXIX	M und N	0,0310	Hypoxanthin	0,0229	0,0539	0,0526	- 2,4 %
<b>B. Thymus.</b>							
IV	B <sub>2</sub> und B <sub>3</sub>	0,1568	Guanin	0,0726	0,2294	0,2287	- 0,3 %
XXX	A und B	0,4240	Guanin	0,0259	0,4499	0,4496	- 0,1 %
XXX	A und C	0,4240	Guanin	0,0518	0,4758	0,4818	+ 1,2 %
<b>C. Pankreas.</b>							
II	B <sub>3</sub> und B <sub>4</sub>	0,0525	Guanin	0,0363	0,0888	0,0877	- 1,3 %

Dieser Tabelle zufolge sind die zu den Extrakten hinzugefügten Purinstoffe stets vollständig wiedergefunden worden; der Fehler beträgt - 2,4 bis + 8,1 % vom berechneten Werte, liegt aber — insbesondere bei den Versuchen mit Muskelauszügen — meistens nach der positiven Seite. Da die Muskelhauptfällungen, wie wir oben gesehen haben, höchstwahrscheinlich bloß durch eine N-freie oder sehr N-arme Substanz verunreinigt sind, so dürfte das fehlerhafte Plus an N nicht so sehr auf der Gegenwart einer (mit der Niederschlagsmenge wachsenden) N-haltigen Beimengung, als vielmehr darauf beruhen, daß der ohne Purinbasenzusatz erhaltene Vergleichswert häufig etwas zu niedrig ist.<sup>1)</sup>

1) In der Tat ist speziell bei Muskelextrakten das Purinbasenquantum, das der Hauptfällung entgeht und für die Korrekturfällung übrig bleibt, (oder mit anderen Worten, der Korrekturniederschlag) bei

Wie dem immer sei, die Resultate unserer Zusatzversuche sind jedenfalls recht befriedigende. Während also His und Hagen mittels der von ihnen benützten, von unserem Verfahren abweichenden Methode Guanin, das sie zu Organauszügen hinzugefügt hatten, meist nicht quantitativ zurückgewannen (Versuch II, XXI, XXII und XXIII der genannten Autoren<sup>1)</sup>), hat sich die Methode des korrigierten Wertes bei unseren analogen Versuchen durchaus bewährt.

Es muß indessen hervorgehoben werden, daß zur Erzielung so günstiger Resultate nicht nur genaueste Beobachtung aller eingangs beschriebenen Details, sondern auch Mitberücksichtigung der Korrekturniederschläge ganz unerlässlich ist. Bloßer Vergleich der Hauptfällungen nach dem älteren Kosselschen Verfahren kann erhebliche Fehler nach sich ziehen. Um nur ein besonders eklatantes Beispiel anzuführen: In Versuch II, Tabelle I (Pankreasexperiment), beträgt der Unterschied zwischen dem N der Hauptfällungen bei B<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> **0,0200** g, dagegen ist die Differenz zwischen dem Gesamt-Purin-N von B<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> (der ungleich großen Korrekturniederschläge halber) **0,0352** g; tatsächlich war zu Lösung B<sub>4</sub> **0,0363** g Guanin-N hinzugefügt worden. Bei bloßer Berücksichtigung der Hauptfällungen hätte also der beobachtete Zuwachs in diesem Falle kaum mehr als die Hälfte des tatsächlichen Zusatzes ausgemacht!

---

Basenzusatz, d. h. bei höherer Purinkörperkonzentration, oft nicht nur relativ, sondern auch absolut geringer, als ohne Zusatz, d. h. bei niedrigerer Purinkörperkonzentration (vgl. z. B. Tabelle IX, A und B). Nun wissen wir aber, daß die Summe oder der Gesamtpurin-N desto vollständiger zu sein pflegt, je besser es gelungen ist, die Hauptmenge der Purinstoffe bereits in der Hauptfällung abzuscheiden, je weniger Purinkörper somit für die mit kleinen Verlusten verbundene Korrekturfällung zurückgeblieben sind (vgl. z. B. Tabelle IV, A und B). Es wäre deshalb — wegen der günstigeren Verteilung des Purin-N auf Haupt- und Korrekturniederschlag — wohl möglich, daß die Gesamt-Purinkörperausbeute bei Basenzusatz manchmal noch kompletter ist, als ohne Zusatz.

1) Über His und Hagens Versuche Guanin in Wittepeptonlösung zu bestimmen, vgl. die Ausführungen oben auf S. 354.



*Über den Purinbasengehalt von Fleisch, Thymus und Pankreas.*

Die Gesamtheit der mitgeteilten Erfahrungen macht es sehr wahrscheinlich, daß die Methode des korrigierten Wertes bei Muskel, Thymus und Pankreas vollkommen zuverlässige Ergebnisse liefert. Hierdurch gewinnen die wenigen Resultate, die bisher mittels dieses Verfahrens bei den genannten Organen erhalten worden sind, eine erhöhte Bedeutung. Es dürfte deshalb nicht überflüssig erscheinen, die an verschiedenen Stellen der vorliegenden Arbeit verstreuten Angaben über den Purinbasengehalt von Fleisch, Thymus und Pankreas noch einmal zusammenzufassen, um sie mit den (ebenfalls durch das Verfahren des korrigierten Wertes gefundenen) Zahlen von Burian und Schur und von Walker Hall vergleichen zu können. Dieser Zusammenfassung ist die nachstehende Tabelle gewidmet.

Tabelle XII.

Laufende Nummer	Versuchsobjekt	Versuchsnummer und Tabelle	Lösung	Gesamtpurin-N in Prozenten des feuchten Organes
<b>A. Fleisch.</b>				
1	} Pferdefleisch	{ Versuch III, Tab. II	B <sub>3</sub>	0,055 0/0
2			» VI, » IV	A
3	} Rindfleisch	{ » XXVII, » VII	A	0,062 0/0
4			» XXIX, » IX	A
5	} Kalbfleisch	{ » XXVIII, » VIII	A	0,071 0/0
<b>B. Thymus.</b>				
6	} Kalbsthymus	{ Versuch IV, Tab. III	B <sub>2</sub>	0,482 0/0
7			» XXVI, » VI	B
<b>C. Pankreas.</b>				
8	Schweinepankreas	Versuch II, Tab. I	B <sub>3</sub>	0,123 0/0
9	Rinderpankreas	» I —	D	0,183 0/0

Die in der Tabelle verzeichneten Werte für den Purinbasengehalt des **Fleisches** stehen mit den Analyseergebnissen von Burian und Schur und von Walker Hall in guter

Übereinstimmung. So fanden die Erstgenannten<sup>1)</sup> in Pferdefleisch **0,065** % und Walker Hall<sup>2)</sup> in Rindfleisch (Lende und Keule, Mittel aus vier Bestimmungen) **0,060** % Purin-N. Es muß jedoch betont werden, daß das Fleisch verschiedener Regionen einen differenten Purinbasengehalt zu besitzen scheint, und daß speziell Nackenstück nach Walker Halls Untersuchungen ganz auffallend purinbasenarm ist.<sup>3)</sup> Für die Bestimmungen, deren Resultate in der Tabelle zusammengestellt sind, wurden ebenso, wie seinerzeit für die von Burian und Schur mitgeteilten Analysen und Fütterungsexperimente stets Lendenstücke verwendet. In Anbetracht der oben nachgewiesenen Zuverlässigkeit der Methode des korrigierten Wertes dürfte die nochmalige Feststellung der Tatsache, daß die erwähnte Fleischsorte bei Anwendung dieser Methode im Durchschnitte 0,06 % Purinbasen-N liefert, wohl geeignet sein, zur Bekräftigung jener Anschauungen beizutragen, die Burian und Schur über das quantitative Verhalten der exogenen Harnpurine des Menschen an der Hand zahlreicher eigener und fremder Versuche entwickelt haben.<sup>4)</sup>

Was die in Tab. XII für **Thymus** angemerkten Prozentzahlen betrifft, so stammt die eine (Nr. 6) von einem möglichst schnell, die andere (Nr. 7) von einem absichtlich sehr langsam durchgeführten Versuche. In der ersten der beiden Prozentzahlen dürfte deshalb der Amino-N des Adenins etc. mitinbegriffen sein, während für die zweite derselben die Abwesenheit von Aminopurinen mit ziemlicher Sicherheit festgestellt werden konnte (vgl. Tab. VI, C [Nitritversuch]). Tatsächlich ist der Gesamt-Purinbasen-N bei Nr. 7 um ca. 0,05 g pro 100 g Organ kleiner als bei Nr. 6. Ganz ähnliche Diffe-

1) Archiv f. d. ges. Physiol., Bd 80, S. 309, Tab. VIII.

2) The purinbodies of foodstuffs, S. 29, Tab. IV.

3) Nackenstück vom Kalb enthielt **0,030** %, Nackenstück vom Schwein (Mittel aus zwei Bestimmungen) **0,023** % Purin-N, während fette Schweinslende einen Purinbasen-N-Gehalt von **0,048** % aufwies.

4) Vgl. die Zusammenstellung im Archiv f. d. ges. Physiol, Bd. 94, S. 295ff und S. 310ff.



renzen zeigen sich auch bei den von Burian und Schur<sup>1)</sup> früher veröffentlichten Zahlen; so fanden diese Autoren den Purinkörper-N-Gehalt von Kalbsthymus bei langsamer Arbeit zu **0,405** resp. **0,414** ‰<sup>2)</sup>, während ein schnell ausgeführter Kontrollversuch **0,516** ‰ Purin-N lieferte. Da die Versuche XXV und XXVI (vgl. oben S. 380 u. 381) ergeben haben, daß die Aminopurine der Thymus bei langsamer Arbeit vollständig in Oxypurine übergehen können, so dürften die soeben besprochenen Zahlen die Ansicht von Burian und Schur gerechtfertigt erscheinen lassen, daß für Thymus durch die Prozentzahl 0,4 ‰ «wahrscheinlich nur der wirklich dem Purin-Doppelring angehörige N, der Purin-N sensu strictiori,» angegeben werde<sup>3)</sup>.

Bezüglich der **Pankreas**-Werte in Tab. XII sei daran erinnert, daß Burian und Schur für Schweinepankreas (in Übereinstimmung mit der Angabe der obigen Tabelle) einen Purinbasen-N-Gehalt von **0,133** ‰, dagegen für Rinderpankreas einen solchen von **0,145** ‰ gefunden haben<sup>4)</sup>; die letztere Prozentzahl ist ungefähr um ein Fünftel kleiner als der korrespondierende Wert in Tabelle XII. Auch diese Differenz könnte vielleicht darauf beruhen, daß bei der Analyse von Burian und Schur (infolge von unmerklicher Fäulnis) eine Umwandlung der Aminopurine in Oxypurine eingetreten sein mag. Um den für Mensch und Säugetier festgestellten Übergang gebundener Aminopurine der Nahrung in Harnsäure<sup>5)</sup>, an welchem der Amino-N unbeteiligt ist, genau quantitativ verfolgen zu können, wäre eine sichere Kenntnis des im Purinkern selbst enthaltenen N's der betreffenden Nah-

1) Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 80, S. 309, Tab. VIII.

2) Auch Walker-Hall gibt für Kalbsthymus einen Purinbasen-N-Wert von **0,402** ‰ an (The purinbodies of foodstuffs, p. 29, Tab. IV).

3) Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 87, S. 303.

4) Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 87, S. 319.

5) Abgesehen von der ganz außer Zweifel stehenden Harnsäuresteigerung nach Thymus- und Pankreasgenuß, ist hier auch die Harnsäurevermehrung zu erwähnen, die Mendel, White and Underhill (Amer. Journ. of physiol. vol. VIII, p. 377, 1903) nach Verfütterung der aminopurinhaltenen Weizen nucleinsäure beim Menschen beobachteten.

rungsmittel durchaus erforderlich. Eine Untersuchung dieser Frage, bei welcher wohl das schon in Versuch XXVI (S. 381) benutzte Nitritverfahren anzuwenden sein wird, ist deshalb von dem einen von uns in Aussicht genommen.

Als Hauptergebnis des vorstehenden Kapitels ist anzuführen, daß zu Muskel-, Thymus- und Pankreasauszügen hinzugesetzte Purinbasen mittels der «Methode des korrigierten Wertes» vollständig wiedergefunden werden. Im Zusammenhalte mit den Resultaten des II. Kapitels spricht dies Ergebnis für die vollkommene Zuverlässigkeit der Methode in ihrer Anwendung auf die genannten Organe.

Anhangsweise sei bemerkt, daß es einige wenige Spezialfälle gibt, in denen das Verfahren des korrigierten Wertes nicht benutzt werden kann. Einen solchen Spezialfall stellen die Lösungen dar, die beim Zerkochen von Blut mit verdünnter Schwefelsäure resultieren<sup>1)</sup>; in diesen Lösungen, welche sehr große Quantitäten von Albumosen und nur Spuren von Purinbasen enthalten, läßt sich ohne vorherige totale oder partielle Entfernung der Albumosen gar kein Silberniederschlag bewirken, mit anderen Worten, eine Hauptfällung ist hier nicht zu erzielen. Auch bei Gegenwart von Stoffen, die ammoniakalische Silberlösung in der Kälte reduzieren, ist das Verfahren des korrigierten Wertes nicht anwendbar<sup>2)</sup>; es bleibt hier vorläufig kein anderer Weg als der, die Purinbasen zunächst in Form des Kupferoxydulniederschlages abzuscheiden und dann den letzteren in die Silberoxydverbindungen überzuführen.

---

1) Über die Untersuchung derartiger Flüssigkeiten wird in der III. Abhandlung von Burian und Schur berichtet werden.

2) Vgl. die von Burian und Schur (Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 80, S. 286) und von Walker Hall (The purinbodies of foodstuffs, p. 33) ausgeführten Bestimmungen des Purinbasengehaltes sehr stärkerer Vegetabilien.

---