

# Über das Nucleoproteid der Leber.

## II. Mitteilung.

Von

**J. Wohlgemuth.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. August 1904.)

Bei der großen Rolle, welche der Leber im Haushalt des Körpers zufällt, und bei den ausgedehnten und komplizierten chemischen Prozessen, die sich in ihr abspielen, sollte man annehmen, daß das Nucleoproteid dieses Organes in allererster Linie das Interesse der Physiologen auf sich gelenkt hätte. Und doch ist von ihm am allerwenigsten bekannt, so wenig, daß Cohnheim in der neuesten Auflage seines Buches, „Chemie der Eiweißkörper“, es nicht einmal besonders erwähnt.

Ich habe nun vor Jahresfrist in der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> über die Natur der in dem Nucleoproteid enthaltenen Pentose (Xylose) berichtet. Der vorliegende Teil beschäftigt sich mit dem Gehalt an Xanthinkörpern, und in einer demnächst erscheinenden dritten Mitteilung sollen über die Mono- und Diaminosäuren, aus denen sich hauptsächlich das Leberproteid zusammensetzt, nähere Angaben gemacht werden.

Zur Beschaffung des erforderlichen Materials wurde in ganz derselben Weise verfahren wie früher: Möglichst frische Rinderleber wurde fein zerkleinert, mehrmals mit Wasser ausgekocht und aus sämtlichen vereinigten Extrakten das Proteid mittels Essigsäure ausgefällt. Durch längeres Stehen unter absolutem Alkohol, der häufig gewechselt wurde, und unter Äther wurde der Niederschlag von den etwa anhaftenden Spuren von Fett befreit und dann zur Reinigung in Natriumkarbonat

<sup>1)</sup> J. Wohlgemuth, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 475, 1903.

gelöst und mit verdünnter Essigsäure gefällt. Danach zeigte die Substanz einen Phosphorgehalt von 2,95%. Es wurde nun versucht, durch abermaliges Lösen in verdünntem Natriumkarbonat und Fällen mit wenig Essigsäure den Phosphorgehalt zu steigern. Er betrug danach 3,09%. Weiteres Fortsetzen dieser Manipulation war ohne Erfolg; der Gehalt der Substanz an Phosphor betrug nach der dritten Behandlung mit Soda und Essigsäure 3,05%. Es wurde nun die ganze Menge auf zahlreiche kleine Portionen verteilt und zweimal hintereinander in derselben Weise behandelt, dann mehrere Wochen unter Alkohol und Äther gehalten und schließlich bei ca. 60° getrocknet. Dargestellt wurden auf diese Weise 140 g Nucleoprotein: dazu waren 50 kg Rinderleber erforderlich, sodaß nicht ganz 3 g gereinigten Proteids einem Kilo Leber entsprachen. Eine Probe des Materials lieferte folgende Analysenwerte:

0,3274 g Substanz = 0,0058 g Asche<sup>1)</sup> + 0,3216 g aschefreie Substanz  
gaben 0,5333 g CO<sub>2</sub> und 0,1656 g H<sub>2</sub>O

C (im aschefreien Präparat) = **45,22%**

H „ „ „ „ „ = **5,72%**

0,3228 g Substanz = 0,0044 g Asche<sup>1)</sup> + 0,3184 g aschefreie Substanz  
gaben 16,2 ccm N bei 18° u. 756 mm

N (im aschefreien Präparat) = **16,67%**

0,2212 g Substanz lieferten Baryumsulfat = 0,0134 g; S = **0,637%**

0,211 „ „ „ Pyrophosphat = 0,0231 g; P = **3,06%**

Zur Darstellung der Xanthinbasen wurden 50 g der Substanz nach Vorschrift von Kossel<sup>2)</sup> mit 500 ccm einer 1% igen Schwefelsäurelösung am Rückflußkühler 3 Stunden erhitzt. Die Flüssigkeit wurde noch heiß im Überschuß mit pulverisiertem Baryt versetzt, vom Baryumsulfat abgesaugt, der Rückstand mehrmals mit heißem Wasser ausgekocht und sämtliche Filtrate auf ein Volumen von 500 ccm eingeeengt. Nachdem der in Lösung gegangene Baryt durch Kohlensäure entfernt war, wurde die Lösung, die durch Einengen auf das Volumen von 300 ccm gebracht war, mit Ammoniak im Überschuß versetzt und dann mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Die Menge des Silberniederschlages war recht beträchtlich: er wurde von der

<sup>1)</sup> Im Schiffehen gewogen.

<sup>2)</sup> Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 405, 1884.

Lösung abfiltriert, mit destilliertem Wasser sorgfältig gewaschen und dann bei Wasserbadtemperatur mit verdünnter Salzsäure so lange erwärmt, bis vollständige Umsetzung erfolgt war. Nach Zusatz eines Überschusses von Salzsäure wurde vom Chlorsilber abfiltriert und der Rückstand mehrmals mit heißer, verdünnter Salzsäure ausgewaschen. Die weitere Verarbeitung geschah nun nach dem sehr bequemen Verfahren von Krüger und Salomon.<sup>1)</sup> Das gesamte Filtrat wurde zur Vertreibung der Salzsäure auf dem Wasserbad unter beständigem Ersetzen der verdampften Flüssigkeit durch Alkohol mehrmals zur Trockene eingedampft, bis der Rückstand grobpulverig geworden war, dann mit Wasser bei 50° digeriert, nach mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit Wasser und dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Der Rückstand (Xanthinfraktion) sollte das Xanthin, das Filtrat (Hypoxanthinfraktion) das Guanin, Adenin und Hypoxanthin enthalten.

Zur Darstellung des Xanthins wurde der Rückstand in der mehrfachen Menge 3,3%iger Natronlauge heiß gelöst und 24 Stunden stehen gelassen, ohne daß dabei ein Niederschlag auftrat. Die alkalische Lösung wurde in ein vorher aufgekochtes kaltes Gemisch von 20 ccm konzentrierter Salpetersäure und 20 ccm Wasser langsam eingetragen, wobei starke Erwärmung eintrat, und schon nach einstündigem Stehen hatte sich salpetersaures Xanthin in nicht unbeträchtlicher Menge ausgeschieden. Zur Reinigung wurde die Substanz in Ammoniak gelöst, zweimal mit Knochenkohle behandelt und dann die ammoniakalische Lösung verdampft. Der Rückstand war reines Xanthin; als solches charakterisiert wurde es mittels der Chlorkalkprobe, der Weidelschen Reaktion und der Stickstoffbestimmung. Die Ausbeute betrug 0,3831 g.

0,0983 g Substanz (bei 150° getrocknet) verbrauchten nach Kjeldahl  
 12,8 ccm  $\frac{1}{5}$  N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 36,68% N  
 Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub> = 36,8% >

Die Mutterlauge des Xanthins enthielt nur noch Spuren von Stickstoff und konnte deshalb vernachlässigt werden.

<sup>1)</sup> Krüger und Salomon, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 350, 1898/99.

Die Verarbeitung der «Hypoxanthinfraktion» geschah in folgender Weise: Das salzsaure Filtrat wurde in geringem Überschuß mit Ammoniak versetzt: es fiel dabei das Guanin aus, das nach 24stündigem Stehen abgesaugt wurde. Um den Niederschlag noch von etwaigen Beimengungen zu trennen, wurde er mehrere Stunden mit verdünntem Ammoniak digeriert, davon abfiltriert, in Natronlauge gelöst und mit wenig Essigsäure wieder ausgefällt. Die Ausbeute betrug 0,432 g. Identifiziert als solches wurde es mittels der Probe mit Salpetersäure + Natronlauge — typisch blauviolette Färbung, die auf Zusatz von Wasser wieder verschwand und bei abermaligem Verdampfen wiederkehrte — und der Stickstoffbestimmung.

0,0953 g Substanz (bei 120° getrocknet) sättigten 15,7 ccm  $\frac{1}{5}$  N.-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 = 46,18% N

Berechnet für C<sub>5</sub>N<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O = 46,36% »

Sämtliche ammoniakhaltigen Auszüge wurden zur Vertreibung des Ammoniaks auf dem Wasserbad mehrmals eingengt, unter Ersatz des verdampften Wassers, dann in der Kälte mit 1,1%iger Pikrinsäurelösung in geringem Überschuß versetzt und der Niederschlag sofort abgesaugt. Nach einmaligem Umkristallisieren zeigte er den Schmelzpunkt von 279°, war also vollkommen reines Adeninpikrat. Die Ausbeute betrug 0,8805 = 0,324 g freies Adenin. Zu dem zurückgebliebenen Filtrat wurde noch ein Überschuß von Pikrinsäure zugesetzt und 48 Stunden stehen gelassen. Dabei schied sich das Hypoxanthinpikrat aus. Dasselbe wurde in Salpetersäure gelöst, mit Benzol von der Pikrinsäure befreit und so in das Hypoxanthinnitrat übergeführt. Erhalten wurden 0,304 g. Zur Identifizierung diente die Kristallform (wetzsteinförmig) und wiederum die Stickstoffbestimmung.

0,1095 g Substanz verloren bei 105° 0,0090 g = 8,13% H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O · HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O = 8,29% »

und verbrauchten nach Kjeldahl 12,4 ccm  $\frac{1}{5}$  N.-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 32,08% N

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O · HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O = 32,26% »

Wenn man nun noch einmal die gewonnenen Resultate zusammenstellt, so sind an Xanthinbasen aus 50 g Leber-nucleoproteid isoliert worden:

Xanthin	= 0.3831 g
Guanin	= 0.432 »
Adenin	= 0.324 »
Hypoxanthin	= 0.304 »

Bekanntlich setzt sich nun ein Nucleoprotein zusammen aus dem Eiweiß- resp. Histon- und dem Nucleinsäurekomplex. Unser Nucleoprotein hat einen Phosphorgehalt von 3.06%. Die Nucleinsäure aus der Leber, welche Levene<sup>1)</sup> darstellte, enthält 8.08% Phosphor. Demnach wären im Leberprotein ungefähr zwei Teile Eiweiß resp. Histon und ein Teil Nucleinsäure enthalten, und es wären bei der Verarbeitung von 50 g Protein ca. 17 g Nucleinsäure zugegen gewesen. Legt man diese Zahlen den gefundenen Mengen an Xanthinbasen zugrunde, so sind in 100 g Nucleinsäure der Leber enthalten:

an Xanthin	= 2.2526 g
» Guanin	= 2.5402 »
» Adenin	= 1.9051 »
» Hypoxanthin	= 1.7875 »

Diese Zahlen, verglichen mit den Werten, die Steudel<sup>2)</sup> für die Xanthinbasen der Thymusnucleinsäure angibt, zeigen, daß die Lebernucleinsäure entschieden reicher daran ist als jene, speziell reicher an Guanin und Xanthin, dagegen ärmer an Adenin: die Hypoxanthinmengen halten sich in fast gleichen Grenzen.

<sup>1)</sup> Levene, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 134, 1903.

<sup>2)</sup> Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 163, 1904.