

# Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

## IX. Mitteilung.

Über den Nachweis und die Bestimmung von gebundenen und freien Purinen im menschlichen Blut- und Eiterserum.

Von

S. J. Thannhauser und G. Czoniczer.

(Aus der II. med. Klinik (F. Müller), München.)  
(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1920.)

Die Polynucleotide werden im menschlichen Dünndarm zu einfachen, wasserlöslichen Nucleotidkomplexen aufgespalten (Thannhauser und Dorf Müller<sup>1)</sup>). Die große Wasserlöslichkeit der durch die Dünndarmverdauung entstandenen einfachen Nucleotidkomplexe und das Fehlen von tiefergehenden Spaltprodukten macht es wahrscheinlich, daß keine freien Purinbasen, sondern die präformierten Purinzuckerphosphorsäurekomplexe zur Resorption und in den intermediären Stoffwechsel gelangen. In gleichem Sinne sprechen die subkutanen Injektionen der Nucleoside, Guanosin und Adenosin (Thannhauser und Bommes, Severin<sup>2)</sup>). Während bei der Verfütterung der freien Aminopurine (Minkowski, Krüger und Schmidt, Brugsch und Schittenhelm<sup>3)</sup>) nur ein geringer Bruchteil als Harnsäure im Urin wieder erscheint, werden die Vorstufen

<sup>1)</sup> Thannhauser und Dorf Müller, Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 329; Bd. 95, S. 259; Bd. 100, S. 121.

<sup>2)</sup> Thannhauser und Bommes, Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 336. — Severin, Hab.-Schrift, Breslau 1916.

<sup>3)</sup> Minkowski, Arch. f. exp. Pharm. u. Path. Bd. 20, S. 41 (1886); Bd. 51, S. 214 (1895). — Krüger und Schmidt, Diese Zeitschr. Bd. 34, S. 549 (1902). — Brugsch und Schittenhelm, Nucleinstoffwechsel, G. Fischer, Jena, S. 83 (1910).

der Aminopurine, das Guanosin und Adenosin, nach subkutaner Injektion nahezu vollständig als Harnsäure ausgeschieden. Die freien Aminopurine dürften wegen ihrer schweren Löslichkeit nur ganz unvollständig zur Resorption gelangen. Sie werden durch die Bakterienflora der unteren Darmabschnitte, welche den Purinring aufzuspalten imstande ist, vollständig zersetzt und der im Purinring enthaltene Stickstoff als Ammoniak abgespalten (Thannhauser und Dorfmueller<sup>1)</sup>).

Diese Untersuchungsergebnisse führten uns zu der Annahme, daß im kreisenden Blute neben dem Endprodukt des Purinstoffwechsels, der Harnsäure, auch ihre Vorstufen, die in Nucleotidform gebundene Purine, wie sie vom Darm her in den intermediären Stoffwechsel gelangen, nachzuweisen und zu bestimmen sein müssen. Für diese Anschauung spricht bereits ein experimenteller Befund, den R. Baß<sup>2)</sup> erhoben hat. Baß fand im Blut nach vorangegangener Säurespaltung nicht unbeträchtliche Purinmengen, die durch die Säurehydrolyse aus Nucleotidkomplexen sekundär abgespalten sein dürften. In neuerer Zeit gibt Benedict<sup>3)</sup> für das Tierblut und Griesbach<sup>4)</sup> unter Benützung der Benedictschen Methode für das Menschenblut an, daß neben freier auch gebundene Harnsäure vorhanden sei. Der Benedictsche Nachweis der gebundenen Harnsäure geschieht in der Art, daß im enteiweißten Serum vor und nach dem Kochen mit Mineralsäuren die Harnsäure nach dem Folin-Denisschen Verfahren mit Phosphorwolframsäure kolorimetrisch bestimmt wird. Bei der Nachprüfung der Benedictschen Methode an Lösungen reiner Purinzuckerbindungen (Nucleosiden) konnten wir nachweisen, daß zwar Guanin, Adenin und Xanthin wie auch die Nucleoside: Guanosin, Adenosin und Xanthosin mit P.W.S. nur eine geringe Blaufärbung erkennen lassen, daß aber Guanosin, Adenosin und Xanthosin mit Mineralsäure gekocht die gleiche intensive Blaufärbung mit

<sup>1)</sup> Thannhauser und Dorfmueller, Diese Zeitschr. Bd. 102, S. 148 (1918).

<sup>2)</sup> R. Baß, Arch. f. exp. Pharm. u. Path. Bd. 76.

<sup>3)</sup> Benedict, Chem. Centralblatt Bd. 2, S. 675 (1915).

<sup>4)</sup> Griesbach, Kongreß f. innere Medizin, Dresden 1920.

P. W. S. wie die Harnsäure zeigen. Das Benedictsche Verfahren kann somit nicht zum Nachweis von gebundener Harnsäure herangezogen werden.

Eine Methode des Nachweises und der Bestimmung der gebundenen Purinkörper im Blute muß sich auf eine exakte, quantitative Bestimmung der freien Purine (mit Einschluß der Harnsäure) stützen. Die Voraussetzung für eine solche Methode ist in den heute üblichen Purinfällungsmethoden nach Ludwig-Salkowski und Krüger-Schmidt gegeben.

Für alle Untersuchungen, die sich mit der Methodik des Purinnachweises im Blute befaßten, gliedert sich das Problem der quantitativen Bestimmung in drei Aufgaben: 1. Die Enteiweißung des Serums, 2. die Fällung der Purinkörper, 3. die quantitative Aufarbeitung der Purinfällung.

#### Bestimmung der freien Purine (inkl. Harnsäure) im Blutserum.

Für die Frage der Enteiweißung war zuerst zu untersuchen, welche Enteiweißungsmethode die Nucleotide mitausfällt und nur die freien Purine in Lösung beläßt. In Tastversuchen an Purin- und Pyrimidinnucleotiden (Adenosin- und Uridinphosphorsäure)<sup>1)</sup> konnten wir feststellen, daß diese Substanzen vollständig durch Uranylacetat gefällt werden, während Harnsäure und Aminopurine in verdünnten Lösungen, wie sie im Blut zu erwarten sind, keine Fällung mit Uranylacetat geben. Die Nucleoside, Guanosen, Adenosin etc., fallen mit Uranylacetat in geringprozentigen Lösungen zwar auch nicht und würden neben den freien Purinen im enteiweißten Serum in Lösung bleiben. Da es uns aber nicht gelungen ist, einen qualitativen Nachweis von Nucleosiden im Serum zu führen, so können wir annehmen, in einem mit Uranylacetat enteiweißten Serum nur die freien Purine in Lösung zu haben. Für die Enteiweißung benutzten wir 1,55%ige Uranylacetatlösung (Oszaki<sup>2)</sup>), indem wir auf 1 Teil Serum 1 Teil Wasser und

<sup>1)</sup> S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 158 (1919).

<sup>2)</sup> Oszaki, Zeitschr. f. Klin. Med. Bd. 77, S. 913.

1 Teil Uranylacetatlösung verwendeten. Das Filtrat ist biuret-frei und kann ohne Niederschlagsbildung auf ein kleines Volumen eingeeengt werden.

Für die Fällung der Purine stehen 2 Methoden zur Verfügung: Die Fällung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung nach Ludwig-Salkowski<sup>1)</sup> und die Methode nach Krüger-Schmidt<sup>2)</sup>, wobei die Purine mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit in annähernd neutraler Lösung niedergeschlagen werden. Der Vorzug der Ludwigschen Methode ist ihre große Spezifität, ihr Nachteil aber, daß man nur in Purinlösungen von relativ hoher Konzentration eine quantitative Fällung bekommt. Unsere ersten Versuche begannen wir an einer Harnsäure-Testlösung, die 20 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub>ig war. Eine Konzentration, die noch höher ist, als wir sie in einem auf den 3. Teil eingeeengten Serum eines gesunden Individuums zu erwarten hätten. Bei der Verarbeitung des Silberniederschlags (N-Bestimmung in einem Mikrokjeldahlapparat nach vorherigem Kochen mit MgO) erhielten wir kleinere N-Werte, als der angewandten Substanzmenge entsprach. Die Silberfällung war trotz Zugabe überschüssiger Silberlösung und peinlicher Vermeidung einer zu stark ammoniakalischen Reaktion nicht vollständig. Die Konzentration von 20 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> ist zu klein, um eine quantitative Ausfällung nach Ludwig-Salkowski zu bekommen. Auf Grund dieser Versuche dürfte bei der niederen Purinkonzentration im Blutserum die Silberfällung auch in stark eingeeengten Sera zu kleine Werte geben<sup>3)</sup>. Befriedigende Resultate erreichten wir mit dem Krügerschen Verfahren. Wir verwendeten 10 ccm Testlösung = 2 mg Harnsäure ( $\bar{U}$ ) und erhielten in 3 Parallelversuchen: I = 1,97 mg  $\bar{U}$ , II = 1,97 mg  $\bar{U}$ , III = 2,0 mg  $\bar{U}$  zurück. Die Kupfersulfat-Bisulfitfällung ist auch in Purinlösungen geringer Konzentration vollständig.

<sup>1)</sup> Ludwig-Salkowski, Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. 21, S. 148; Virchows Archiv Bd. 52, S. 60.

<sup>2)</sup> Krüger-Schmidt, Diese Zeitschr. Bd. 45.

<sup>3)</sup> Dies dürfte auch der Grund sein, warum man früher bei Anwendung der Silberfällung zur Harnsäurebestimmung im Blutserum nur geringe Mengen oder gar keine Harnsäure fand.

Zur quantitativen Bestimmung des Puringehaltes des Kupferniederschlags verwendeten wir die N-Bestimmung nach Kjeldahl in einer Mikroapparatur ähnlich der Bangschen, wie sie von Lautenschläger unter der Bezeichnung „II. med. Klinik“ geliefert wird. Die Titration mit  $\frac{1}{100}$  n. Lösungen (1 ccm = 0,00014 g N) gibt einwandfreie Resultate auch für die kleinsten N-Mengen. Daß außer den Purinen keine wesentlichen Mengen anderer stickstoffhaltiger Substanzen durch den Cu-Niederschlag mitgefällt werden, soll weiter unten in der Kritik der Methode ausgeführt werden.

Die Bestimmung der freien Purine führten wir auf folgende Weise aus: Das aus der Cubitalvene entnommene Blut (100—150 ccm) wird in einem hohen Zylinder gut verkorkt im Eisschrank mehrere Stunden aufbewahrt, bis sich das Serum gut abgesetzt hat. Sollte sich das Serum nicht rasch und klar absetzen, so ist es abzuzentrifugieren. 40 ccm Serum werden pünktlichst in gleichen Teilen mit destilliertem Wasser und 1,55 % iger Uranylacetatlösung verdünnt und vom Niederschlag abfiltriert (Verdünnung 1 : 3). Von dem wasserklaren, biuret-freien Filtrat, das keine Spuren von Eiweiß, jedoch die Purine quantitativ enthält, werden 60 ccm mit einer Pipette in ein kleines Becherglas von 200 ccm Inhalt abgemessen und auf ca. 15 ccm auf dem Wasserbade eingeeengt. Die Flüssigkeit bleibt vollständig klar. Hierauf wird eine Messerspitze (ca. 0,5 g) chemisch reines Natriumacetat und 1 ccm 40 % ige (käufliche) Natriumbisulfitlösung zugegeben und aufgeköcht. Sobald die Mischung stark kocht (nicht eher, da sonst die Fällung leicht kolloidal bleibt) wird 1 ccm 10 % ige Kupfersulfatlösung (Kupfersulfat chemisch rein) zugesetzt und die Mischung 3—4 Minuten in kräftigem Kochen gehalten. Es entsteht eine dunkelbraune Fällung, die deutlich erkennbar aus 2 Komponenten besteht. Der grünlichbraune, feinkörnige Niederschlag ist  $\text{CuO}$ , der graubraune flockige Niederschlag ist die eigentliche Purinfällung. Nach vollständiger Abkühlung wird Niederschlag und Flüssigkeit in ein ca. 50 ccm fassendes Zentrifugierglas quantitativ gespült. Der Niederschlag läßt sich vorzüglich zentrifugieren. Die überstehende Flüssigkeit ist wasserklar und läßt

sich abgießen, ohne daß meßbare Mengen des Bodensatzes verloren gingen, was durch die vollständige Übereinstimmung der Parallelversuche bewiesen wird. Der Niederschlag wird während einer Stunde auf der elektrischen Zentrifuge zentrifugiert und 4—5 mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Der auf diese Weise von den letzten Spuren des Serums befreite Niederschlag wird mittels eines kleinen Trichterchens quantitativ in dem Mikrokjeldahlkolben gespült, wozu nicht mehr als 50—60 ccm Wasser benötigt werden sollen. Nach Zusatz von 1 ccm konz. Schwefelsäure, einigen Kriställchen Kupfersulfat und Kaliumsulfat wird auf kleiner Flamme eingedampft. Sobald die Veraschung beginnt, wird die Flamme vergrößert. Nach ca. 2 Stunden ist die ganze Operation beendet. Bei der nun folgenden Destillation werden 10 ccm  $\frac{1}{100}$  n. HCl vorgelegt. Von der Zahl der verbrauchten ccm HCl muß die Menge abgezogen werden, welche „Leerversuche“ ergeben. — Beim Leerversuch werden 10 ccm destilliertes Wasser, eine Messerspitze Natriumacetat und 1 ccm Bisulfitlösung gekocht und zur kochenden Flüssigkeit 1 ccm Kupfersulfatlösung zugesetzt. Es entsteht ein aus CuO bestehender brauner Niederschlag, der auf die oben beschriebene Weise abzentrifugiert und kjeldahlisiert wird. Bei unseren Blindversuchen bekamen wir meistens einen Ausschlag von 0,4 ccm  $\frac{1}{100}$  n. HCl. Da jedoch diese Zahl mit der Reinheit der Reagenzien wechseln kann, ist der Leerversuch bei Verwendung neuer Reagenzien stets zu wiederholen.

Die Ausrechnung der Bestimmung geschieht auf folgende Weise: Angenommen, wir verarbeiteten 60 ccm des 1:3 entweißten Serums und verbrauchten beim Kjeldahlisieren 3,4 ccm  $\frac{1}{100}$  HCl, so ist diese Zahl nach Abziehung des Leerversuchwertes (0,4 ccm) mit 5 zu multiplizieren, um auf die HCl-Menge zu kommen, die 100 ccm Serum entspricht ( $3 \times 5 = 15$  ccm HCl). Diese Zahl (15 ccm) ist mit 0,14 zu multiplizieren, um den Purinstickstoffwert in mg% zu erhalten ( $= 2,1$  mg% Purin N).

Zur Kritik dieser Methode müssen wir folgende Einwände beantworten: 1. Lassen sich die mittels Kupferfällung nieder-

geschlagenen Purine mit genügender Genauigkeit auf die angegebene Weise bestimmen? Werden durch die Kupferfällung nicht auch andere N-haltige Substanzen mitgefällt und als Purine berechnet?

Auf die erste Frage geben schon die oben erwähnten Vorversuche mit 20 mg % Harnsäurelösung eine befriedigende Antwort. Um aber die Vollständigkeit der Fällung auch im Serum zu beweisen, setzten wir dem Serum noch vor der Enteiweißung Harnsäure zu. Dabei fanden wir von 4 mg zugesetzter Harnsäure 3,9 mg (97,5 %), von 3,3 mg zugesetzter Harnsäure 3,1 mg (94 %) zurück. Zugleich ist hierdurch der Beweis erbracht, daß beim Zentrifugieren und den sonstigen Manipulationen vom Niederschlage nichts verloren geht und daß das Mikrojeldahlverfahren mit  $\frac{1}{100}$  n. Lösungen eine genügende Genauigkeit für die Erfordernisse einer quantitativen Bestimmung des Purinstickstoffes Gewähr leistet.

Der zweite Einwand, daß die Kupferfällung auch andere N-haltige Substanzen des enteiweißten Serums außer Purinen enthalten könnte, ist schon früher gegen das Krüger-Schmidtsche Verfahren erhoben worden (Huppert<sup>1</sup>). Wir versuchten nochmals, Lösungen der in Frage kommenden Substanzen Kreatin, Kreatinin, Aminosäuren (Glykokoll, Alanin), Albumosen mit Kupferbisulfit zu fällen, konnten aber durchweg die erhaltenen CuO-Niederschläge als N-frei befinden. Gegen die Beimengungen nicht purinhaltiger Körper spricht auch der Vergleich unserer Resultate mit den Werten, die man bei den gleichen Sera mit der Folin-Denisschen Phosphorwolframsäurekolorimetrie nach der Neubauerschen Modifikation der direkten Kolorimetrie im enteiweißten Serum erhält. Wir rechneten den Purinstickstoff in seiner Gesamtheit auf Harnsäure um und fanden folgende Zahlen:

Kolorimetrisch .	3,0 mg % $\bar{U}$	6,6 mg % $\bar{U}$	9,8 mg % $\bar{U}$	13,6 mg % $\bar{U}$
Purinstickstoff .	1,05 mg % P.N.	2,3 mg % P.N.	3,3 mg % P.N.	4,4 mg % P.N.
auf Harnsäure berechnet . .	3,15 mg % $\bar{U}$	6,9 mg % $\bar{U}$	10,0 mg % $\bar{U}$	13,2 mg % $\bar{U}$

<sup>1</sup>) Huppert, Diese Zeitschr. Bd. 22, S. 556 (1897).

Der unbedeutende Unterschied zwischen dem kolorimetrischen Harnsäurewert im Serum und der aus dem Purinstickstoffwert errechneten Harnsäurezahl zeigt, daß neben der Harnsäure nur geringe Mengen freier Purine im Blutserum vorkommen, und daß man praktisch den nach dem oben beschriebenen Verfahren im Blutserum ermittelten Purinstickstoffwert in Harnsäure umrechnen kann. Die vergleichende Untersuchung der Purinstickstoffbestimmung und der direkten Kolorimetrie in dem mit Uranylacetat enteiweißten Serum erweist gleichzeitig die Brauchbarkeit der einfachen, wenig zeitraubenden P.W.S.-Kolorimetrie zur Harnsäurebestimmung, wengleich das von uns geübte titrimetrische Verfahren den Vorzug der Objektivität hat.

Es soll aber nicht verschwiegen werden, daß in einer kleinen Zahl der untersuchten Fälle mit unserer Methode sich etwas größere Stickstoffwerte für die freien Purine fanden, als der kolorimetrisch ermittelten Harnsäurezahl entsprechen würde. Daß in diesen Fällen neben Harnsäure auch andere Purine vorhanden waren, zeigen zwei andere Versuche, die wir mit Eiterserum anstellten. Hierbei zeigten sich große Unterschiede zwischen dem Puringehalt und dem kolorimetrisch ermittelten Harnsäurewert. In dem ersten dieser Fälle fanden wir 3 mg Harnsäure kolorimetrisch, mit unserer Methode hingegen 3,5 mg % Purinstickstoff, was auf Purine umgerechnet 10,5 mg % Purine<sup>1)</sup> bedeuten würde, also abzüglich der vorhandenen Harnsäure ca. 7 mg % Purine. In einem zweiten Fall 3,3 mg % Harnsäure kolorimetrisch und 14,6 mg % Purinstickstoff nach unserm Verfahren (nach Abzug des kolorimetrisch ermittelten Harnsäurewertes ca. 40,5 mg % Purine).

---

<sup>1)</sup> Die errechneten Purinzahlen sind analog der Harnsäureberechnung durch Multiplikation des P. N. mit 3 erhalten. Da die verschiedenen Purine verschiedenen Stickstoffgehalt haben, liegt dieser Zahl keine vollständig genaue Berechnung zugrunde.

## Nachweis und Bestimmung der gebundenen Purine (Nucleotide) im Blutserum.

Der qualitative Nachweis von Nucleotiden dürfte als erbracht gelten, wenn aus einer Lösung die Nucleotide durch eine möglichst spezifische Fällungsreaktion niedergeschlagen werden und in dem Niederschlage nach Zersetzung mit Säuren die Bausteine der Nucleotide, Purine, Zucker, Phosphorsäure sich durch spezifische Reaktionen nachweisen lassen. Die Schwierigkeit, die Nucleotide im Blut- oder Eiterserum zu fassen, liegt in der Wahl der geeigneten Enteiweißungsmethode. Unsere Vorversuche an reinen Lösungen von Adenosinphosphorsäure und Triphosphonucleinsäure zeigten, daß diese Substanzen durch alle Metalle und Metallsalzlösungen mehr oder minder vollständig ausgefällt werden. Enteiweißungsmethoden mit Metallsalzlösungen können somit für unsere Zwecke nicht in Frage kommen. Auch die Phosphorwolframsäure fällt die Nucleotide zum Teil aus. Arbeitet man wie Baß mit P.W.S. in stark mineral-sauren Lösungen, so werden die Nucleotide zersetzt. Man erhält wohl hohe Purinwerte, aber ein zwingender Nachweis, daß diese Purine vorher in gebundener Form vorhanden waren, ist nicht zu erbringen. Die Enteiweißung des Serums zum Nucleotidnachweis muß in schwach-saurer (ja nicht mineral-sauer!) Lösung stattfinden. Die alte Methode durch Kochen und Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Essigsäure liefert keine vollständig eiweiß-freien Filtrate. Beim Einengen fallen hier immer noch flockige Trübungen aus. Durch Enteiweißen mit 15%iger Trichlor-essigsäure in der Kälte bekamen wir vollständig klare und eiweißfreie Filtrate, jedoch hemmt die Trichloressigsäure im eingeeengten Filtrat die nachfolgende Kupferfällung. Mehrere Versuche, mit 20%iger Sulfosalizylsäure in der Kälte zu ent-eiweißen, zeigten, daß zur vollständigen Enteiweißung ein Überschuß von Sulfosalizylsäure nötig ist, so daß sie beim Einengen in dicken Kristallbüscheln wieder ausfällt und die Weiterverarbeitung stört. Eine Kombination der Hitze-koagulation mit Zusatz von einigen ccm Sulfosalizylsäure ergab

endlich die geeignete Methode, um schwachsaure, eiweißfreie Filtrate, die sich ohne Niederschlagbildung einengen lassen, zu erzielen.

Die Nucleotide werden aus ihren Lösungen durch Metallsalze gefällt. Die bei ihrer chemischen Herstellung gebräuchliche Methode, sie mit basisch essigsaurem Blei zu fällen, ist im enteiweißten Blutserum nicht zugänglich, da der Bleiessig auch andere N-haltige Bestandteile mitreißen würde. Ammoniakalische Silbernitratlösung fällt die in geringer Konzentration vorhandenen Nucleotide nur unvollständig. Hingegen konnten wir an einer 0,1%igen Testlösung von kristallisierter Adenosinphosphorsäure zeigen, daß diese Substanz durch Kupfersulfat und Bisulfit ebenso wie die freien Purine niedergeschlagen wird. 10 mg Adenosinphosphorsäure wurden mit Kupfer- und Bisulfit nach den weiter unten angegebenen Vorschriften gefällt und in zwei Kontrollversuchen 9,0 mg und 8,8 mg zurückgefunden. Somit entgeht der Fällung nur ein geringer Bruchteil des Nucleotids. Durch diesen Befund war gleichzeitig ein Hinweis gegeben, wie man gebundene und freie Purine nebeneinander bestimmen kann. In dem ersten Falle Enteiweißung in saurer Lösung, im zweiten Fall Enteiweißung mit Metallsalzen (Uranylacetat) wie oben beschrieben. Die Unterschiede der Purinstickstoffwerte im sauer enteiweißten und in dem mit Metallsalz enteiweißten Serum dürften den Gehalt des Serums an „gebundenen Purinstickstoff“ ergeben.

Es war nunmehr der qualitative Nachweis zu führen, ob tatsächlich in dem durch Hitzeoagulation unter Sulfosalizylsäurezusatz enteiweißten Serum der Kupferniederschlag Nucleotide enthält. In Parallelversuchen wurden 600 ccm Eiter-serum und 300 ccm Blutserum durch Hitzeoagulation unter Sulfosalizylsäurezusatz enteiweißt, die Filtrate auf  $\frac{1}{3}$  ihres Volumens eingeeengt und mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Die Niederschläge wurden bei neutraler Reaktion mit Schwefelwasserstoff zersetzt, filtriert und im Vakuum vollständig eingeeengt. Die gelben Rückstände beider Sera gaben starke gelbrote Murexidprobe. Ein Teil wurde mit 5%iger Mineralsäure in der Hitze aufgenommen. Diese Lösungen gaben mit

Resorcin eine dunkelrote Zuckerprobe, mit Orcin eine braunrote Verfärbung. Die Phosphorsäurereaktion mit Ammoniummolybdat war gleichfalls stark positiv. Durch den Ausfall dieser Reaktionen im zersetzten Kupferniederschlag des Blut- und Eiterserums ist der qualitative Nachweis von Nucleotiden im Serum von uns erbracht.

Die Bestimmung der in Nucleotidform im Blutserum gebundenen Purine wird in folgender Weise ausgeführt:

30 ccm Serum (für 30 ccm Serum sind ca. 100 ccm Vollblut nötig) werden mit einer Pipette genau abgemessen und mit 55 ccm dest. Wasser verdünnt. Die Mischung wird kurz aufgekocht und in dem Augenblick des Aufkochens 5 ccm 20%ige Sulfosalizylsäurelösung zugegeben. Beim Erhitzen wird auf dem Erlenmeyerkolben als Kühler ein Trichterchen mit der Spitze nach unten gesetzt, so daß keine meßbare Menge Wasser verdampfen kann. (30 ccm Serum + 55 ccm Wasser + 5 ccm Sulfosalizylsäure gibt eine Verdünnung von 1:3. 3 ccm Filtrat = 1 ccm Serum.) Die koagulierte Mischung muß in Eis vollständig abgekühlt werden, da sie nur kalt schön zu filtrieren ist. Das gewonnene Filtrat ist wasserklar und eiweißfrei. Das Filtrat gibt zwar mit Uranylacetat und P.W.S.-Lösung eine Trübung, die jedoch nicht von Eiweißkörpern herrührt, da diese Reagenzien auch andere Substanzen, unter denen die von uns gesuchten Nucleotide sind, zu fällen vermögen. — 50 ccm des Filtrates werden in ein 200 ccm fassendes Becherglas abpipettiert und auf dem Wasserbade bis ca. 15 ccm eingeengt. Stärkeres Einengen muß vermieden werden, da sonst die Konzentration der Sulfosalizylsäure eine Höhe erreicht, die hemmend auf die Kupferfällung wirken würde. Beim Einengen wird die Flüssigkeit etwas trübe. Die Trübung verschwindet bei dem nun folgenden Aufkochen, so daß die Kupferfällung in einer klaren Lösung erfolgt. Die Kupferfällung wird auf die gleiche Weise ausgeführt, wie dies oben bei der Fällung der freien Purine beschrieben wurde. Der grobflockige, dunkelbraune Kupferniederschlag setzt sich rasch ab, die überstehende Flüssigkeit ist vollkommen durchsichtig. Sollte dies nicht der Fall sein und ein kolloidaler

nicht zentrifugierbarer Niederschlag entstehen, so ist dies ein Zeichen, daß im Verfahren ein Fehler begangen wurde. Entweder wurde das Filtrat zu stark eingengt oder die Kupfersulfatlösung wurde zugesetzt, bevor die Flüssigkeit in vollem Kochen war. Der Kupferniederschlag wird eine Stunde lang zentrifugiert, die Waschflüssigkeit viermal abgegossen und wieder aufgefüllt. Der auf diese Weise in der Zentrifuge gewaschene Niederschlag wird, wie oben beschrieben, in ein Mikrokjeldahlkölbchen quantitativ gespült und verascht.

Als Muster für die Berechnung sei folgendes Beispiel ausgeführt: 50 ccm Filtrat verbrauchen 4,4 ccm  $\frac{1}{100}$  n. HCl, nach Abzug des Leerversuchwertes 4,0 ccm. Da die Verdünnung 1 : 3 war, besteht die Gleichung:  $50/3 : 4 = 100 : x$ . Die für  $x$  erhaltene Zahl (24) ist mit 0,14 zu multiplizieren. Die auf diese Weise berechnete Zahl (3,36 mg %) ist der gesamte Stickstoffwert für die freien und gebundenen Purine des Serums (G.N.). Zieht man von diesem Wert die mit der oben beschriebenen Methode (Uranylacetatenteiweißung) gefundene Zahl des freien Purinstickstoffs (P.N.) ab, so erhält man den Nucleotidstickstoffgehalt (N.N.) des Blutserums. So lassen zum Beispiel 3,6 mg % G.N. (Gesamtpurinstickstoff) und 1,2 mg % P.N. nach der Gleichung

$$N.N. = G.N. - P.N.$$

2,4 mg % N.N. (Nucleotidstickstoff) berechnen.

Zur Kritik der Methode können zwei Einwände gemacht werden. 1. Enthält das auf die oben angegebene Weise enteiweißte Serum keine andern Bestandteile, die mit Kupfer-Bisulfit fallen? 2. Werden die im Serum vorhandenen Nucleotide mit Kupfersulfat-Bisulfit vollständig ausgefällt?

Zu dem ersten Einwand muß gesagt werden, daß im wasserklaren Filtrat manchmal Spuren einer Biuretreaktion vorhanden waren. Als Ursache dieser Reaktion könnte man kleine Mengen von Albumosen, die sich bei der Hitzeokoagulation abgespalten hätten, vermuten. Eine 0,5%ige Albumose-lösung wurde deshalb hergestellt und mit Kupfersulfat-Bisulfit gefällt. Der Kupferniederschlag gibt keinen Ausschlag beim

Kjeldahlisieren. Daß außer Purinen und Nucleotiden im entweißten Serum keine meßbaren Mengen anderer stickstoffhaltiger Substanzen enthalten sind, die mit Kupfer-Bisulfit fallen, wurde bereits oben durch Versuche bewiesen.

Um den zweiten Einwand zu entkräften, setzten wir dem Serum vor dem Entweißen Adenosinphosphorsäure zu. Wir verfahren dabei so, daß wir das Serum vor der Koagulation anstatt mit 'destilliertem Wasser mit 0,1%iger Adenosinphosphorsäurelösung verdünnten. Dabei fanden wir von 7,5 mg zugesetzter Adenosinphosphorsäure 6,5 mg, in einem zweiten Versuch von 6,7 mg zugesetzter Adenosinphosphorsäure 5,8 mg zurück. Es ist also mit Sicherheit anzunehmen, daß bei derselben Versuchsanordnung auch die präformierten Nucleotide des Serums nahezu quantitativ ausfallen.

Ein weiterer Beweis für die Brauchbarkeit des beschriebenen Verfahrens sind die Resultate, die wir bei Aufarbeitung eines während mehrerer Monate autolysierten Eiters erhielten. Hier war zu erwarten, daß durch die Autolyse der Eiterkörperchen größere Mengen von Nucleotiden entstanden und sich nachweisen ließen. Wir fanden in der Tat in diesem Eiter sechsfach größere Mengen von Nucleotiden als im Blutserum. Im gleichen Eiter konnten, wie oben mitgeteilt, auch beträchtliche Mengen von freien Purinen nachgewiesen werden. In dem autolysierten Eiter fanden wir 27 mg % G.N. (Gesamtpurinstickstoff), 14 mg % P.N. Stickstoff der freien Purine, und demzufolge 13 mg % N.N. (Nucleotidstickstoff). In dem 14 mg % P.N. war nur 1,1 mg % Harnsäurestickstoff (berechnet aus 3,3 mg % kolorimetrisch gefundener Harnsäure) enthalten<sup>1)</sup>. Diesen abnormen Werten des autolysierten Eiterserums seien die an gesunden Personen ermittelten Normalwerte des Blutserums gegenübergestellt:

<sup>1)</sup> Der Eiter verhält sich wie ein unter Luftabschluß autolysierendes Organ. Es entstehen aus den Kernsubstanzen Nucleotide, die hinwiederum in ihre Bausteine durch die Autolyse zerlegt werden. Da die Autolyse unter Luftabschluß verläuft, können sich wohl freie Aminopurine, Hypoxanthin und Xanthin, aber fast keine Harnsäure bilden.

	Stickstoff der freien Purine P.N. %	Stickstoff der gesamten Purine G.N. %	Nucleotid- Stickstoff N.N. %	Harn- säure, kolori- metrisch bestimmt %	Stickstoff der freien Purine in Harnsäure umge- rechnet (P.N. × 3) %	Das Ver- hältnis N.N. : P.N.
H. P. ♂ 32j.	1,6 mg	4,77 <sup>1)</sup> } 4,83 } 4,8 mg	3,2 mg	4,86 mg	4,80 mg	3,2 : 1,6
F. S. ♂ 40j.	1,47 mg	4,70 mg	3,23 mg	3,8 mg	4,41 mg	3,23 : 1,47
J. L. ♂ 55j.	1,0 mg	3,05 mg	2,05 mg	2,82 mg	3,0 mg	2,05 : 1,0
M. K. ♂ 28j.	1,40 <sup>1)</sup> } 1,48 } 1,44 mg	4,50 mg	3,06 mg	4,3 mg	4,32 mg	3,06 : 1,44
H. W. ♂ 25j.	1,32 mg	4,12 <sup>1)</sup> } 4,18 } 4,15 mg	2,83 mg	3,90 mg	3,96 mg	2,83 : 1,32
G. R. ♂ 49j.	1,20 <sup>1)</sup> } 1,26 } 1,23 mg	3,85 mg	2,62 mg	3,55 mg	3,69 mg	2,62 : 1,23

Aus diesen Zahlen ersehen wir, daß beim gesunden Menschen ca. 2—3 mg Nucleotidstickstoff (N.N.) der Normalwert in 100 ccm Serum ist. Der freie Purinstickstoff (P.N.), normalerweise 1—1,5 mg mit 3 multipliziert, ist praktisch gleichbedeutend der im Serum vorhandenen Harnsäuremenge. Der Nucleotidstickstoff ist beim gesunden Individuum ca. 2mal größer als der Stickstoff der freien Purine.

Die für die Klinik interessierenden Fragestellungen, die sich mit dem beschriebenen Verfahren angehen lassen, wurden bereits von uns bearbeitet und sollen gleichzeitig im „Deutschen Archiv für klinische Medizin“ besprochen werden.

<sup>1)</sup> Parallelversuche. Die mehrmals ausgeführten Parallelversuche haben immer übereinstimmende Resultate ergeben.