

# FID Biodiversitätsforschung

## Decheniana

Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Rheinlande und  
Westfalens

Über die Enteiweißung von Organextrakten und Preßsäften für Harnsäure-  
und Purinbestimmungen - mit Unterstützung der Deutschen  
Forschungsgemeinschaft

**Heidermanns, C.**

**1938**

---

Digitalisiert durch die *Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, Frankfurt am Main* im  
Rahmen des DFG-geförderten Projekts *FID Biodiversitätsforschung (BIOfid)*

---

### **Weitere Informationen**

Nähere Informationen zu diesem Werk finden Sie im:

*Suchportal der Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, Frankfurt am Main.*

Bitte benutzen Sie beim Zitieren des vorliegenden Digitalisats den folgenden persistenten  
Identifikator:

[urn:nbn:de:hebis:30:4-197645](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:30:4-197645)

## Über die Enteiweißung von Organextrakten und Preßsäften für Harnsäure- und Purinbestimmungen.

Von **C. Heidermanns.**

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bonn.)

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Unsere quantitativen Harnsäure- und Purinbestimmungsmethoden sind für Verhältnisse ausgearbeitet worden, wie sie im Serum, im Harn und in den Organen der Wirbeltiere, insbesondere der Säugetiere vorliegen. In der Exkretionsphysiologie der Evertibraten, die in neuerer Zeit vielfach bearbeitet worden ist, liegen teilweise ganz andere Bedingungen vor, sowohl was Concentration der genannten Stoffe wie auch die Substanzen anbelangt, die sich mit ihnen vergesellschaftet finden. Für eine quantitative Bestimmung ist die Berücksichtigung der Concentration der Purine deswegen von großer Bedeutung, weil infolge ihrer Schwerlöslichkeit bei hohen Concentrationen Verluste durch Nichtlösen oder durch Ausfällen eintreten. Die Begleitstoffe beeinflussen den Gang der Bestimmung insofern, als sie mehr oder weniger leicht durch Enteiweißung zu beseitigen sind und in verschiedenem Maße Purine bei der Ausfällung adsorbieren. Wie verschiedenartig z. B. die Harnsäureconcentration in den Organen der einzelnen Evertibraten ist, zeigt nachstehende Zusammenstellung (Tab. 1).

**Tabelle 1. Harnsäurekonzentrationen in den Organen verschiedener Evertebraten.**

Tierart	Organ	Harnsäure- gehalt in mg/g	Autor
Cancer	Blut	0,002	Delaunay 1927
Helix pomatia	„	0,008	„ 1927
Antheraea pernyi	„	0,19	H. Leifert 1935
Helix pomatia	Mitteldarmdr.	0,35	G. Wolf 1933
Maja squinado	„	0,85	Delaunay 1927
Paludina	„	2,98	J. Spitzer 1937
Antheraea pernyi	Puppen, frisch	3,95	H. Leifert 1935
„ „	„ überwintert	19,6	„ 1935
Helix pomatia	Nephridien	7,78	G. Wolf 1933
Helix aspersa	„	29,0	J. Needham 1935
Antheraea pernyi	Schlüpfungs- exkret	248,6	H. Leifert 1935

Bei unseren Untersuchungen fiel auf, daß dem Organbrei zugesetzte Harnsäure nicht quantitativ wiedergewonnen werden konnte, und daß der Verlust nach Tierart und nach der Art der angewandten Enteiweißung konstant verschieden war. So konnte z. B. Harnsäure, die der Mitteldarmdrüse von *Arion empericorum* zugesetzt worden war, bei Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure nur zu 50 %, bei *Helix pomatia* aber zu 90 % und bei *Rana temporaria* zu 95 % wiedergewonnen werden. Das veranlaßte zu einer Untersuchung, unter welchen Bedingungen eine möglichst gute und gleichmäßige Wiedergewinnung zugesetzter Purinsubstanzen erfolgt.

Bislang hat man bei der Harnsäurebestimmung im Blutserum oder in Organextrakten für die Enteiweißung vornehmlich zwei Methoden für geeignet gehalten. Die erste beruht auf der Enteiweißung mit Na-wolfram-Schwefelsäure, die gestattet, mit Alkalien den Eiweißniederschlag aufzulösen und damit gleichzeitig die an den Niederschlag adsorbierte Harnsäure wieder in Lösung zu bringen. Durch mehrmaliges Umfällen im Centrifugenglas zieht man so in stets wachsendem Maße die Harnsäure heraus. Die andere Methode besteht darin, bei möglichst alkalischer Reaktion zu enteiweißen. So gibt neuerdings *Stranisky* (1937) an, daß sich die Uranylacetat-Methode für Serum der Säuger sehr gut bewährt

habe. Ich hatte jedoch mit dieser Methode bei vielen Evertebraten, vor allem bei Mollusken und Würmern, schlechte Resultate, wohl deswegen, weil hier Mucinsubstanzen die Enteiweißung stören.

**Methodik.** Mitteldarmdrüse wurde mit Seesand im Mörser zerrieben und mit kleinen Portionen Wasser solange verrieben und ausgelaugt, bis das Gesamtvolum das 10fache des Ausgangsmaterials betrug. Zu 2,5 ccm dieser Eiweißlösung wurde 2,5 ccm einer Lösung von bekanntem Puringehalt zugesetzt, sodaß die Gesamtverdünnung 1:20 betrug. Der Gehalt der Zusatzlösung an Purinen wurde durch N-Bestimmung geprüft. Es wurde davon Abstand genommen die Purinlösung dem Seesand-Zellbrei direkt zuzusetzen, um Verluste beim Auslaugen zu verhindern. Um etwa mitdekantierte Zellteilchen aus der Eiweißlösung zu beseitigen, wurde vor dem Zusatz der Purinlösung scharf abcentrifugiert. Im enteiweißten Filtrat dieser Lösung wurde der Gesamt-N bestimmt und verglichen mit dem Gesamt-N eines anderen Teiles der Eiweißlösung, der anstatt einer Purinlösung die gleiche Menge Wasser zugesetzt worden waren. Die Differenz der Total-N-Werte beider Bestimmungen entspricht der Menge an Purin, die aus der eiweißhaltigen in die enteiweißte Lösung überführt worden war. Eine direkte Bestimmung der einzelnen Purine wurde nicht vorgenommen, weil sie mit der notwendigen Genauigkeit in Reihenversuchen zu langwierig und schwierig ist, andererseits der Zuwachs an N nur von dem Purin-N herrühren kann, welcher der Eiweißlösung zugesetzt worden war.

**Beispiel:** 4 g Froschleber wurden mit 40 ccm Wasser verrieben und die dekantierten Portionen scharf abcentrifugiert.

**Ansatz a:** Zu 5,00 ccm dieser Lösung wurden 2,50 ccm Purinlösung + 1,00 ccm  $\frac{1}{2}$  n Schwefelsäure + 0,75 ccm Wasser + 0,75 ccm 10 % Na-wolframat zugegeben = 10,00 ccm Gesamtlösung.

**Ansatz b:** Zu 5,00 ccm Eiweißlösung wurden 3,25 ccm Wasser + 1,00 ccm  $\frac{1}{2}$  n Schwefelsäure + 0,75 ccm 10 % Na-wolframat zugesetzt = 10,00 ccm Gesamtlösung.

Bei Preßsäften erwies es sich als notwendig die Gesamtverdünnung statt auf 1:20 auf 1:40 zu steigern, weil die Eiweißconcentration sonst zu groß und die Niederschlagsmenge im Verhältnis zu der abgießbaren Flüssigkeitsmenge in zu krassem Mißverhältnis stand. Im Centrifugat der enteiweißten Lösungen wurden Gesamt-N-bestimmungen vorgenommen.

Bei den in Tabelle 2 angeführten Versuchen wurde zu den Eiweißlösungen aus Leber bzw. Mitteldarmdrüse soviel Harnsäure

zugefügt, daß in der eiweißhaltigen Lösung vor der Fällung 25 mg % Harnsäure vorhanden war, eine Concentration, die in der Regel in Organextrakten nicht erreicht wird.

**Tabelle 2. Wiedergefundene Harnsäure aus Eiweißlösungen nach Enteiweißung in % der zugesetzten Menge.**

Enteiweißungs- mittel	Frosch ph	0/0	Helix ph	0/0	Arion ph	0/0	Anthe- raea pernyi ph	0/0	Anodon- ta ph	0/0
Alkalisches Zinksulfat	6,6	8,8	6,2	12,3	7,7	4,0	6,8	29,1	6,3	9,5
Uranylacetat	5,8	78,2	5,7	44,9	6,1	28,5	5,9	58,0	5,7	19,4
Eisenhydroxyd	3,6	76,4	4,1	59,1	5,2	29,1	3,2	69,2	4,2	61,8
Molybdänsäure	4,1	72,8	4,2	66,2	4,7	32,0	3,5	58,2	4,4	55,7
Phosphor- wolframsäure	2,5	76,0	3,0	71,0	4,1	46,7	2,4	79,5	3,2	70,8
Sulfosalicylsäure	2,4	95,3	2,8	90,5	3,9	50,1	2,3	89,3	2,5	87,6
Ultrafiltration	6,7	96,1	6,8	93,8	7,6	91,0	6,4	97,2	6,9	94,5

Es zeigt sich, daß bei Enteiweißung mit alkalischem Zinksulfat in allen Fällen fast die gesamte Harnsäure verloren geht, d. h. bei der Fällung mitgerissen wird. Auch die anderen Enteiweißungsmittel geben sehr schwankende Werte bis auf die Sulfosalicylsäure und die Ultrafiltration; erstere gibt aber auch bei Arion schlechte Werte. Bei der Ultrafiltration werden dagegen durchweg 91 bis 97 % der zugesetzten Harnsäure wiedergefunden. Bei der Ultrafiltration muß mit Überdruck gearbeitet werden, um eine Verdünnung und damit eine Konzentrationsanreicherung zu verhindern. Zudem hat ihre Anwendung den großen Vorteil, daß man ein eiweißfreies Filtrat ohne jedwede sonstige Zusätze erhält, dem allerdings der Nachteil gegenüber steht, daß bei der Filtration durch ein kleines Filter immerhin eine beträchtliche Zeit verstreicht, ehe man zu einer normalen Analyse eine hinreichende Flüssigkeitsmenge filtriert hat. Andererseits kann man sich mit einer geringen Verdünnung begnügen, so bei Blutplasma z. B. mit einer Verdünnung 1 : 5, wodurch man in kürzerer Zeit eine größere Harnsäuremenge filtriert. Bei den in Tab. 2 angeführten Versuchen wurde bei einer Verdünnung 1 : 20 filtriert.

Ultrafiltration ist eine Enteiweißungsart, die m. E. heut noch viel zu wenig angewandt wird und die den Analysengang in vielen

Fällen sehr vereinfacht. Leider ist sie oft bei Fermentversuchen nicht anwendbar, wenn die Fermentwirkung plötzlich unterbrochen werden muß. Vielfach läßt sich dies jedoch durch Zusatz von Stoffen erreichen, die den ph-Wert in einen Bereich verschieben, der die Fermentwirkung aufhebt.

Tabelle 5 gibt über die Verwendbarkeit der Enteiweißung mit Na-wolframat-Schwefelsäure bei Zusatz verschiedener Purine Auskunft.

**Tabelle 5. Enteiweißung mit Na-wolframat-Schwefelsäure bei ph = 2,5 bei Zusatz der einzelnen Purine zur Froschleber.**

	Xan- thin mg	%	Ade- nin mg	%	Hypo- xanthin mg	%	Gua- nin- mg	%	Harn- säure mg	%
1. Fällung	1,76	70,4	1,51	60,4	1,58	63,2	1,58	63,4	1,82	72,7
2. „	0,43	17,2	0,48	19,8	0,38	15,4	0,54	21,7	0,54	21,2
3. „	0,18	6,9	0,30	12,0	0,15	6,0	0,20	7,9	0,05	1,8
4. „	0,03	1,2	0,11	4,4	0,01	0,5	0,03	1,9		
5. „			0,02	0,8						
	2,41	95,7	2,42	96,9	2,13	85,1	2,37	94,9	2,48	95,7

Der Eiweißlösung wurde soviel Schwefelsäure zugesetzt (in der Regel  $\frac{2}{3}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), daß der ph-Wert zwischen 2,2 und 2,4 lag und sodann Na-wolframat zugegeben, bis alles Eiweiß ausgefällt war, wozu im vorliegenden Falle 0,75 ccm genügten. Die Menge der benötigten Säure ist bei verschiedenen Organen und Tieren sehr verschieden und muß daher empirisch festgelegt werden. Ein ph-Wert über 2,5 ist zu vermeiden, weil alsdann nicht die Gewähr gegeben, daß alles Eiweiß ausgefällt wird. Bei der ersten Fällung wird bei allen Purinen ein erheblicher Teil im Niederschlag zurückgehalten. Zur Umfällung im Centrifugenglas wurde der Niederschlag mit 8,0 ccm Wasser aufgerührt, mit 0,60 ccm n-NaOH aufgelöst und mit einer entsprechenden Menge n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wieder ausgefällt. Nach dreimaligem Umfällen ist das Optimum der Ausbeute in der Regel erreicht. Auch diese Methode liefert gute Ergebnisse. Es sei hierzu aber noch bemerkt, daß namentlich die erste Ausbeute

sich vermindert, wenn der Niederschlag längere Zeit stehen bleibt, da dann offenbar bei der sauren Reaktion die Purine wieder auszufallen beginnen.

Ähnlich verhält es sich auch mit der Sulfosalicylsäure, die im Vorversuch gute Resultate ergeben hatte. Hier bewirkt längeres Stehenlassen der nicht abcentrifugierten Lösung mit dem Eiweißniederschlag einen beträchtlichen Verlust, der nicht wieder zurückzugewinnen ist (Tab. 4).

**Tabelle 4. Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure.**

Eiweißlösung	zugesezte Harnsäure-concentration in mg 0/0	Zeitdauer	wiedergefundene Harnsäure in 0/0
	16,2	10'	96,3
Froschleber=	49,0	10'	73
brei	81,3	10'	68
20 × verd.	325,0	10'	41
	16,2	1 Stde.	95
	16,2	4 „	93
	16,2	12 „	90
	49,0	12 „	53
	325,0	12 „	20

**Tabelle 5.**

Lösung	Purinconcentration mg 0/0	Im Ultrafiltrat wiedergefunden bei			
		Rana 0/0	Arion 0/0	Helix 0/0	Antheraea 0/0
Leberbrei	16,2 Harnsäure	96,1	91,2	97,1	94,5
20 × verdünnt	49,0 „	95,4	93,4	95,0	96,2
	81,3 „	93,3	95,1	92,2	97,6
	243,6 „	93,8	96,7	94,6	91,2
Preßsaft	22,6 „	98,7	97,6	95,3	94,9
20 × verd.	58,5 „	97,0		95,1	
Leberbrei	15,0 Xanthin	96,4	96,7	93,8	94,6
20 × verd.	14,8 Hypoxanthin	95,3		97,4	93,2
	10,0 Guanin	97,9	96,5	94,6	94,8
	17,6 Adenin	98,8	95,6	96,2	94,9

Vor allem bei hohen Concentrationen fällt in der sauren Lösung der größte Teil der Harnsäure aus, um so mehr, je länger man mit der Trennung wartet. Sulfosalicylsäure ist daher nur unter Berücksichtigung dieser Tatsache zu verwenden.

Die allgemeine Anwendbarkeit der Ultrafiltration zeigt die vorstehende Tabelle 5. Bei *Antheraea*-Puppen wurden ganze Tiere verwandt. Hieraus ergibt sich, daß auch die anderen Purine bei der Ultrafiltration hinreichend genau wiedergewonnen werden können.

**Zusammenfassung.** Als Enteiweißungsart von Gewebeextrakten bei Purinbestimmungen eignet sich in erster Linie die Ultrafiltration und Enteiweißung mit Na-wolframat-Schwefelsäure bei mehrmaliger Umfällung des Eiweißniederschlags. Ferner kann in manchen Fällen die Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure vorgenommen werden. Bei chemischer Enteiweißung ist jedoch stets zu prüfen, ob die optimalen Bedingungen zur Fällung erreicht sind.

---

#### Literatur.

- Delaunay, H.: Recherches biochem. sur l'excretion azotee des invertebrés. Bordeaux 1927.  
Leifert, H.: Zool. Jahrb. Physiol. Bd. 55, 1935.  
Needham, J.: Biochem. J. Vol. 29, 1935.  
Spitzer, J.: Zool. Jahrb. Physiol. Bd. 57, 1937.  
Stransky, E.: Biochem. Z. Bd. 266, 1933.  
Wolff, G.: Z. vergl. Physiol. 19, 1933.
-



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Decheniana](#)

Jahr/Year: 1938

Band/Volume: [97B](#)

Autor(en)/Author(s): Heidermanns Curt

Artikel/Article: [Über die Enteiweißung von Organextrakten und Preßsäften für Harnsäure- und Purinbestimmungen - mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft 133-139](#)