(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bonn.)

Lässt sich durch genügend lange Extraction mit siedendem Wasser sämmtliches in den Organen vorhandenes Glykogen gewinnen?

Von

Joseph Nerking.

Bei der Fortsetzung meiner Studien über die Art des Vorkommens des Glykogens in den Organen habe ich mir zunächst die Aufgabe gestellt, zu erforschen, ob es durch blosse Auskochung mit Wasser, wenn diese nur genügend lange fortgesetzt wird, möglich sei, sämmtliches in dem Organ vorhandenes Glykogen zu erhalten. Brücke hat bekanntlich zuerst auf diese Weise das Glykogen zu bestimmen gesucht, und es sind eine ganze Reihe principiell wichtiger Untersuchungen, insbesondere in Bezug auf die Entstehung des Glykogens im Thierkörper, nach dieser älteren Methode ausgeführt worden. Wenn das Glykogen in den Organen nur in freiem Zustande vorhanden ist, so darf man bei der leichten Löslichkeit des Glykogens in heissem Wasser wohl annehmen, dass man es bei lange genug fortgesetzter Extraction vollständig gewinnen kann; ist es aber zum Theil wenigstens, was ich durch meine letzte Untersuchung¹⁾ für bewiesen erachte, chemisch gebunden, so wird man, bei einem bestimmten Punkte angelangt, durch Wasserextraction kein Glykogen mehr erhalten und zur Aufschliessung des ausgekochten Organpulvers schreiten müssen, um den Rest zu gewinnen. Von verschiedenen Autoren ist nun allerdings schon früher nachgewiesen worden, dass eine Extraction mit siedendem Wasser zur Gewinnung der Gesamtmenge des Glykogens nicht genügt; ob aber das Auskochen mit Wasser wirklich so lange fortgesetzt wurde, bis man absolut kein Glykogen mehr erhielt, ist zweifelhaft; meist wurde das Auskochen nur so lange fortgesetzt, bis der Auszug keine Opalescenz

1) Dieses Archiv Bd. 81 S. 8 ff.

mehr zeigte, was auf absolute Glykogenfreiheit desselben durchaus noch nicht schliessen lässt. R. Külz¹⁾ bestimmt den nach der Wassere extraction in der Leber und den Muskeln zurückbleibenden Theil von Glykogen zu 20—25 % der Gesamtmenge. Weiter führt Külz an, dass bei Lebern mit hohem Glykogengehalte dieselben Werthe erhalten werden, mag man die Leber erst mit Wasser auskochen und dann mit Kali behandeln oder die Aufschliessung direct vornehmen, während bei Lebern mit geringem Glykogengehalte die nach dem Kaliverfahren ausgeführten Bestimmungen immer günstiger ausfielen.

Neuerdings hat Austin²⁾ darauf aufmerksam gemacht, dass aus Kalbsleber durch einfaches Auskochen im besten Falle nur ein Drittel des Glykogens zu erhalten ist; die von Austin angewandte Kochdauer ist jedoch sicher zu kurz gewesen.

Zu meinen eigenen Versuchen diente mir Kalbsleber. Ich habe die Leber zerkleinert, durch die Hackmaschine getrieben und die ganze Menge mit siedendem Wasser extrahirt. Die Extraction habe ich so lange fortgesetzt, bis ich in dem Auszug nach Anwendung der Brücke-Külz'schen Methode selbst nach mehrtägigem Stehen keine Spur von Trübung mehr erhielt. Dann erst habe ich den ausgepressten und getrockneten Rückstand, der zum Ueberfluss nochmals, mit negativem Erfolg, ausgekocht wurde, mit Kali behandelt. Ich habe ferner vor jeder Extraction, um dem Wasser immer neue Oberflächen zu bieten, den ausgekochten Brei in der Reibschale sorgfältig und längere Zeit durchgerieben.

Versuch I.

745 g Kalbsleber wurden mit 1000 ccm Wasser auf dem Wasserbade 24 Stunden lang ausgekocht. Darnach wurde abfiltrirt, ausgepresst, der Pressrückstand wurde wiederum mit 1000 ccm Wasser 24 Stunden ausgekocht. Dieses Verfahren habe ich 18 Mal wiederholt, immer den Rückstand vor jeder Extraction auf's Neue pulverisirend. Der 18. Auszug ergab nach Abscheidung der Eiweissstoffe mit Brücke's Reagens — die übrigens nur noch sehr gering war — und Versetzen mit dem doppelten Volumen 96 % Alkohol keine Spur von Trübung mehr, selbst nach dreitägigem Stehen nicht.

1) Zeitschr. f. Biologie Bd. 22 S. 161 ff.

2) Archiv f. pathol. Anatomie und Physiologie Bd. 150 S. 185 ff.

Trotzdem habe ich das ausgepresste und auf dem Wasserbade getrocknete Pulver nochmals mit 1000 ccm Wasser in der Porcellanschale über freier Flamme $\frac{3}{4}$ Stunden ausgekocht mit vollkommen negativem Erfolg. Darnach wurde das Pulver auf dem Wasserbade getrocknet, das Gewicht desselben betrug nach dem Trocknen 110 g. 25,8 g dieses trockenen Pulvers habe ich dann mit 200 ccm Kalilauge von 2% und 200 ccm Wasser im Wasserbade bis zur Lösung erhitzt, was 2 Stunden in Anspruch nahm. Die alkalische Lösung wurde nach dem Erkalten aufgefüllt auf 500 ccm, filtrirt und 100 ccm Filtrat unter Zusatz von 3,1 ccm KOH von 70,5% und 10 g JK mit 50 ccm Alkohol gefällt.

Die wässerigen Auszüge wurden vereinigt, auf etwa 2 Liter eingedampft, nach dem Erkalten auf 2 Liter aufgefüllt und 100 ccm nach Zusatz von 4,2 ccm KOH und 10 g JK mit 52 ccm Alkohol von 96% gefällt. Das gefällte, mit alkoholisch-alkalischer Jodkaliumlösung und 66% Alkohol gewaschene Glykogen wurde invertirt in 300 ccm HCl von 2,2%. Je 81,2 ccm dieser Lösung ergaben in:

Analyse I

0,2020 g Cu_2O

Analyse II

0,2021 g Cu_2O

= 0,0837 g Traubenzucker, in 300 ccm also 0,3092 g = 0,2783 g Glykogen in 100 ccm der wässerigen Lösung, in 2000 also: 5,566 g Glykogen in 745 g Leber. Die Leber enthielt demnach:

0,7471% durch Wasser extrahirbares Glykogen.

Das aus der alkalischen Lösung gefällte und gewaschene Glykogen wurde invertirt in 200 ccm HCl 2,2%. Je 81,2 ccm ergaben in:

Analyse I

0,1005 g Cu_2O

Analyse II

0,1003 g Cu_2O

= 0,0393 g Traubenzucker in 81,2 ccm, in 200 ccm also 0,0968 g entsprechend 0,0871 g Glykogen in 100 ccm alkalischer Lösung, in 500 demnach: 0,4356 g in 25,8 g trockenen Pulvers; folglich waren in den zurückbleibenden 110 g noch vorhanden 1,8572 g. In den 745 g verarbeiteter Leber waren also vorhanden insgesamt:

0,9978%,

wovon 0,2492% = 24,9% der Gesamtmenge nicht durch Wasser ausziehbar waren.

Versuch II.

711 g Kalbsleber wurden mit 1000 ccm Wasser 24 Stunden ausgekocht; darnach wurde ausgepresst, der Pressrückstand wurde

im Mörser längere Zeit durchgerieben und wiederum mit 1000 ccm Wasser 24 Stunden ausgekocht. Dieses Verfahren wurde 8 Mal wiederholt. Der 8. Auszug gab, nach der Brücke-Külz'schen Methode geprüft, nur noch eine schwache Spur von Trübung beim Stehen; es wurde das Auskochen desshalb noch 2 Mal wiederholt, vor der letzten, 10. Auskochung war das feine Pulver getrocknet auf dem Wasserbad worden, in der Mühle gemahlen und gesiebt. Der letzte Wasserauszug gab auch nach mehrtägigem Stehen keine Spur von Trübung mehr nach Ausfällung der Eiweissstoffe mit Brücke's Reagens und Fällung des Filtrates mit Alkohol. Das von der Wasserauskochung zurückbleibende, getrocknete Pulver wog 105,5 g. 25 g des trockenen Pulvers wurden mit 200 ccm KOH von 2% und 200 ccm Wasser bis zur Lösung, 3 Stunden, erhitzt. Darnach wurde auf 500 ccm aufgefüllt, filtrirt, 100 ccm wurden nach Zusatz von 3,1 ccm KOH und 10 g JK mit 50 ccm Alkohol 96% gefällt. Das filtrirte und gewaschene Glykogen wurde invertirt in 200 ccm HCl von 2,2%. Je 81,2 ccm dieser Lösung ergaben in:

Analyse I

0,1485 g Cu_2O

Analyse II

0,1485 g Cu_2O

= 0,0603 g Traubenzucker in 81,2 ccm, in 200 demnach: 0,1485 g Traubenzucker entsprechend 0,13365 g Glykogen in 100 ccm alkalischer Lösung, in 500 also 0,6683 g in 25 g trockenen Pulvers; es waren in dem Pulver nach der Wasserauskochung also noch vorhanden: 2,8202 g

= 0,3966% nicht durch Wasser extrahirbares Glykogen.

Weitere 25 g des trockenen Pulvers wurden mit 400 ccm KOH von 10% auf dem Drahtnetz erhitzt, Lösung war schon nach 5 Minuten eingetreten. Nach dem Erkalten wurde aufgefüllt auf 500 ccm, 100 ccm Filtrat wurden wie oben gefällt. Das filtrirte und gewaschene Glykogen wurde ebenfalls wieder in 200 ccm HCl 2,2% invertirt. Je 81,2 ccm ergaben in:

Analyse I

0,1595 g Cu_2O

Analyse II

0,1593 g Cu_2O

= 0,0650 g Traubenzucker, in 200 ccm also 0,1601 g entsprechend 0,1441 g Glykogen in 100 ccm alkalischer Lösung, in 500 ccm also 0,7205 g; in den restirenden 105,5 g Fleischpulver waren noch vorhanden: 3,0405 g Glykogen

= 0,4276% nicht durch Wasser extrahirbares Glykogen.

Die vereinigten wässerigen Auszüge der Leber wurden auf 1 Liter eingedampft, 100 ccm nach Zusatz von 4,2 ccm KOH von 70,5 % und 10 g JK mit 52 ccm Alkohol 96 % gefällt. Das filtrirte und gewaschene Glykogen wurde invertirt in 300 ccm HCl 2,2 %. Je 81,2 ccm ergaben in:

Analyse I	Analyse II
0,0750 g Cu_2O	0,0750 g Cu_2O
= 0,0282 g Traubenzucker, in 300 ccm demnach 0,1042 g entsprechend 0,0938 g Glykogen in 100 ccm Lösung, in 1000 ccm 0,938 g	
= 0,1319 % durch Wasser extrahirbares Glykogen.	

Bei dieser Leber sind also trotz anhaltender Extraction mit siedendem Wasser bis zur vollständigen Erschöpfung nur 24,9 % bzw. 23,6 % der Gesamtmenge des Glykogens in dem wässerigen Auszug enthalten gewesen, während 75,1 bzw. 76,4 % erst durch Behandlung mit KOH zu erhalten waren.

Wie viel von der Gesamtmenge des Glykogens in den Muskeln durch Extraction mit siedendem Wasser nicht erhaltbar ist, habe ich noch nicht untersuchen können, hoffe darüber aber in meiner nächsten Veröffentlichung berichten zu können. Den Einwand, dass durch die Behandlung mit siedendem Wasser in Folge der Coagulation eine grössere Verdichtung des Eiweisses eintritt und das Glykogen mechanisch fest eingeschlossen wird, muss ich zurückweisen aus dem einfachen Grunde, weil ich, wie ich nomals ausdrücklich betone, vor jeder Extraction durch erneuertes Pulverisiren dem Wasser immer neue Oberflächen zum Angriff geboten habe. Bisher war man wohl geneigt, anzunehmen, dass man im Stande sei, durch Wasser das Glykogen allmählig, aber schliesslich doch vollständig auszuziehen; dies ist jedoch nicht zutreffend; es gibt eine Grenze, bei welcher selbst durch anhaltendste Extraction mit siedendem Wasser kein Glykogen mehr erhalten werden kann, und ich neige der Ansicht zu, dass, wie ich schon in meiner letzten Arbeit andeutete, nur das durch Wasser extrahirbare Glykogen in freiem Zustande in den Organen vorhanden, während der Rest chemisch gebunden ist.

Fig. 1.

Fig. 4.

Fig. 3.

Fig. 2.

Fig. 7.

Fig. 6.

Fig. 5.

Fig. 10.

Fig. 9.

Fig. 8.

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13