(Aus dem physiologischen Laboratorium in Bonn.)

Ueber das Verhalten des Glykogenes in siedender Kalilauge.

Von

E. Pflüger.

Claude Bernard, der geniale französische Physiologe, hat vor einem halben Jahrhundert nicht bloss das thierische Stärkemehl, welches er Glykogen nannte, entdeckt, sondern auch eine Methode der Darstellung angegeben, die bis jetzt unübertroffen dasteht. Claude Bernard löste die Organe in siedender Kalilauge und fällte das Glykogen mit Alkohol. Es war seine Ansicht, dass selbst sehr starke Kalilauge das Glykogen nicht wesentlich verändere. Eine geringe Veränderung leugnete er nicht; quantitative Versuche aber, welche den Satz der Unangreifbarkeit des Glykogenes durch siedende Kalilauge sicher bewiesen, sind weder von ihm noch von anderen Forschern angestellt worden.

Der Wiener Physiologe Brücke war auch der Ansicht, dass das Glykogen durch siedende Kalilauge nicht angegriffen werde, gab aber zu, dass ein Beweis nicht vorliege¹⁾. Geleitet durch die Erkenntniss, dass das aus alkalischer Lösung nach Claude Bernard gefällte Glykogen immer mehr oder weniger durch verschiedene fremdartige Stoffe, besonders aber durch Eiweiss verunreinigt sei, fand er dann in dem Kaliumquecksilberjodid ein Mittel, bei Gegenwart von Salzsäure das Glykogen von der Verunreinigung fast ganz zu befreien. Von jetzt ab begann man die Eigenschaften des so gereinigten Glykogenes genauer zu erforschen.

Hierbei stellte sich dann auf Grund der Untersuchungen von v. Vintschgau und Dietl²⁾, die durch R. Külz³⁾ und mich⁴⁾ be-

1) Sitzungsber. d. kais. Akademie der Wissenschaften zu Wien, II. Abth. Bd. 63. 1871.

2) Dieses Archiv Bd. 13 S. 253. 1876.

3) R. Külz, Zeitschr. f. Biol. Bd. 22 S. 161. 1886.

4) Dieses Archiv Bd. 75 S. 164. 1899.

stätigt wurden, heraus, dass sogar verdünnte Kalilauge von 1—2 % das Glykogen zersetze. Wenn dies wahr ist, so kann die Lösung eines glykogenhaltigen Organes in siedender Kalilauge unmöglich das gesammte Glykogen für die quantitative Analyse liefern. Alle nach dieser Methode ausgeführten Bestimmungen müssen zu kleine Werthe für das Glykogen ergeben haben. Es war nothwendig, ein Urtheil zu gewinnen, um die Grösse dieses Beobachtungsfehlers festzustellen. Ich veranlasste deshalb Herrn Dr. chem. Josef Nerking, den chemischen Assistenten des mir unterstellten physiologischen Institutes, den Einfluss der Concentration der siedenden Kalilauge und der Dauer ihrer Einwirkung auf das Glykogen zu untersuchen. Er gelangte zu dem Ergebniss¹⁾, dass die Anwendung der Kalilauge aufzugehen sei, weil sie in unberechenbarer Weise bald die Ausbeute an Glykogen vermehre, bald sie vermindere. Zwei Processe nahm Nerking zur Erklärung der Wirkung des Kalis an:

„Einmal wird durch den Einfluss der Kalilauge fortwährend „neues Glykogen aufgeschlossen oder abgespalten, gleichzeitig aber „auch schon gebildetes Glykogen durch die Kalilauge zerstört. Je „nachdem der eine oder andere Process vorwiegt, wird man mehr „oder weniger Glykogen erhalten.“

Wenn Nerking's Auffassung berechtigt ist, müssen alle mit der Kalimethode ausgeführten Glykogenanalysen als werthlos bezeichnet werden. Fast alle Glykogenanalysen sind aber nach dieser Methode ausgeführt.

Zwei Thatsachen treten in Nerking's Untersuchung hervor, die mir für die Beurtheilung seines Standpunktes von Bedeutung zu sein schienen:

Zuerst zeigt sich, dass die **zuweilen**²⁾, nicht immer — bei sehr lange fortgesetztem Zerkochen der Organe mit Kalilauge — beobachtete Abnahme der Glykogenausbeute absolut genommen klein ist und vielleicht einen anderen Grund hat als den, dass Glykogen vom Kali zerstört worden ist.

Zweitens treten öfter bei Nerking Versuchsreihen auf, in denen trotz lange fortgesetzten Kochens der Organe mit Kalilauge keine Verminderung des Glykogenbestandes eintritt. So z. B.:

1) Dieses Archiv Bd. 81 S. 39.

2) Dieses Archiv Bd. 81 S. 20.

Ein mit Kalilauge von 2% hergestellter Auszug der Muskeln ergab ¹⁾ auf gleiches Volum bezogen:

1. Gehalt 0,2889 g Glykogen
2. „ 0,3281 „ „ nach 24 stündigem Erhitzen,
3. „ 0,2940 „ „ „ 48 „ „

Noch auffallender ist folgende Reihe bei Nerking ²⁾:

Mit 2%iger Kalilauge gelöster Fleischbrei ergab auf gleiches Volum des Auszuges bezogen:

Anfangs Gehalt		0.3206 g Glykogen
Nach 24stündigem Kochen mit Kalilauge		0,3182 „ „
„ 120 „ „ „ „		0,3206 „ „

Also nachdem das Glykogen hier 5 Tage und 5 Nächte in Kalilauge gekocht worden war, hatte es nicht die Spur an Gewicht verloren; denn es wog anfangs 0,3206 und am Ende 0,3206 g.

Will man angesichts dieser Thatsachen die Annahme festhalten, dass die Kalilauge das Glykogen zerstöre, so muss man voraussetzen, dass in den 5 Tagen und 5 Nächten genau so viel Glykogen neu aufgeschlossen als zerstört worden ist. Indem mir die Unwahrscheinlichkeit dieser Erklärung klar wurde, gelangte ich auf den richtigen Weg zum Verständniss der vorliegenden Räthsel.

Ich musste jetzt daran denken, dass schon Richard Külz darauf aufmerksam gemacht, dass das Glykogen nach Aufschliessen der Organe mit Kalilauge und nach Ausfällung der Eiweissstoffe durch das Brücke'sche Reagens pulvrig gefällt wird mit meist geringer Neigung, der Glaswand wie Harz anzukleben. — Im Gegensatz hierzu beobachtete Külz, dass mehrfach nach Brücke-Külz gereinigtes Glykogen, das dann mit 2%iger Kalilauge gekocht wird, meist nicht mehr flockig durch Alkohol zur Abscheidung gelangt, sondern wie ein durchsichtiges Harz sich allmählich der Wand des Gefässes anlegt. Das spricht dafür, dass die häufige Einwirkung der Brücke'schen Reagentien, wie sie bei der wiederholten Reinigung des Glykogenes in Anwendung kommen, eine Aenderung der Substanz bedingt.

Ich musste mir also jetzt die Frage vorlegen:

Ist das Glykogen der Organe vielleicht ein anderer Stoff als das nach Brücke dargestellte? Ist jenes vielleicht unangreifbar

1) Dieses Archiv Bd. 81 S. 20.

2) Dieses Archiv Bd. 81 S. 22.

gegen Kalilauge, während dieses — durch Brücke's Reagentien verändert — angreifbar geworden ist?

Zunächst waren also Versuche mit Glykogen anzustellen, das mit den Reagentien Brücke's in keine Berührung gekommen war.

Abschnitt I.

Reihe I.

Glykogen, dargestellt mit Ausschluss der im Fleisch enthaltenen Säure, mit Ausschluss der Aufschliessung durch Kochen mit Kali, mit Ausschluss der Reagentien von Brücke.

700 g Brei frischen Pferdefleisches in Porzellanschale mit gepulvertem CO_3Ca zerrieben und in einen Kolben von 1,5 Liter Gehalt eingetragen, der 700 ccm siedendes Wasser enthielt. Dann im siedenden Wasserbad 20 Stunden erhitzt, durch gehärtetes Faltenfilter gegossen und das klare Filtrat mit Kaliumoxalat ausgefällt, abermals filtrirt. Erhalten

830 ccm Filtrat

hinzugefügt 83 g JK

50 ccm Kalilauge von 72 %.

Die Lösung enthält also annähernd 4,1 % KOH. Gefällt mit 420 ccm Alkohol von 96 % Tr. Ausscheidung feinsten alle Filter theilweise durchsetzenden Staubes. Fällung wird gewaschen mit folgender Mischung:

666 ccm Kalilauge von 4 %

333 „ Alkohol von 96 %

66 g JK.

Eine Probe des so gewaschenen Glykogens in Wasser gelöst gibt mit Brücke's Reagens nicht die Spur von Trübung.

Zur Entfernung des dem Glykogen anhaftenden Kalis wird dasselbe erst wiederholt auf dem Filter mit Alkohol von 90 % Tr. gewaschen, und weil dies nicht zum Ziele führt, löse ich mit sterilisirtem kalten Wasser, fälle mit viel Alkohol. Es scheidet sich bröckelig und in Klumpen aus.

Den anderen Morgen wird das Glykogen abfiltrirt, mit 86 %igem Alkohol bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction gewaschen. Mit sterilisirtem Wasser löse ich das Glykogen auf, bringe es in einen Literkolben und fülle auf bis zur Marke.

Aus derselben Bürette werden nun mehrere Portionen zu je 100 ccm abgemessen zu folgenden Versuchen:

Versuch I.

Es handelt sich zuerst darum, zu wissen, wie viel Glykogen in 100 ccm der Lösung enthalten sind.

100 ccm Glykogenlösung in einen 500 ccm-Kolben gemessen, 100 ccm Lösung von ClH 4,4 % und ClH von 2,2 % q. s. bei nicht ganz vollkommener Auffüllung des Kolbens.

Durch dreistündige Erhitzung wird nach Abkühlung erhalten aus 81,3 ccm Zuckerlösung in

Analyse 1. 0,1417 Cu_2O (Rohr 3)

„ 2. 0,1425 Cu_2O (Rohr 4)

Mittel 0,1421 Cu_2O = 0,1262 Cu = 0,0576 Zucker.

Controle ergibt:

nach Volhard = 0,1254 Cu = 0,0572 Zucker

durch Wägung = 0,1262 Cu = 0,0576 „

Gemäss Volhard haben wir aber

100 ccm Glykogenlösung = 0,3518 Zucker.

Versuch II.

Versuch I musste mit der Abänderung wiederholt werden, dass das Glykogen vor der Invertirung erst genau so gefällt wurde, wie das bei den eigentlichen Versuchen geschah. In's Becherglas

50 g JK

100 ccm Wasser

100 „ Kalilauge von 71,48 %

200 „ Wasser

500 „ Alkohol

100 „ Glykogenlösung.

Das Glykogen scheidet sich sofort in feinen Flöckchen aus, die in klarer Flüssigkeit schwimmen. Filtrirt schnell und klar durch schwedisches Filter. Glykogen gewaschen auf Filter mit 80 %igem Alkohol bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction. Mit ClH von 2,2 % wird dasselbe, da es sich sehr leicht löst, in einen 500 ccm Kolben filtrirt und invertirt. Gefunden aus 81,3 ccm Zuckerlösung in

Analyse 1. 0,1407 Cu_2O (Rohr 3) = 0,125 Cu

„ 2. 0,1408 Cu_2O (Rohr 4).

Die Controle liefert

nach Volhard $0,1249 \text{ Cu} = 0,0569 \text{ Zucker}$

durch Wägung $0,1250 \text{ Cu}$.

Also $100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3500 \text{ Zucker}$.

Versuch I, bei dem das Glykogen nicht gefällt, also kein Verlust möglich war, ergab

$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3518 \text{ Zucker}$.

Versuch II, bei dem die alkalische Glykogenlösung ($14,3\% \text{ KOH}$) mit einem gleichen Volumen Alkohol gefällt wurde:

$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3500 \text{ Zucker}$.

Es ist also bewiesen, dass auf diese Weise das Glykogen ohne Verlust ausgefällt wird.

Versuch III.

$100 \text{ ccm Glykogenlösung}$

+ $100 \text{ „ Kalilauge von } 71,9\%$

in ein 200 ccm-Kölbchen und $2\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung Kölbchen in ein Becherglas entleert, 300 ccm Wasser , zum Spülen benutzt, hinzugefügt 50 g JK , gelöst, mit $500 \text{ ccm Alkohol von } 96\% \text{ Tr.}$ gefällt: pulvrig, nicht am Glase klebend.

Nach Waschung mit einer Lösung von gleichem Gehalt an KOH und Alkohol wird das Glykogen in $2,2\%$ iger ClH gelöst und in dem 500 ccm-Kolben invertirt. Nach Abkühlung mit $2,2\% \text{ ClH}$ bis zur Marke aufgefüllt. $81,3 \text{ ccm Zuckerlösung}$ liefern in

Analyse 1. $0,1385 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 8)

„ 2. $0,1392 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 9).

Die Controle ergibt

nach Volhard $0,1238 \text{ Cu} = 0,0564 \text{ Zucker}$

durch Wägung $0,1232 \text{ Cu}$.

Also gemäss Volhard

$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3469 \text{ Zucker}$.

Versuch IV.

Wie Versuch III ausgeführt. Das Kochen dauert aber 22 Stunden.

Durch Wägung erhalten in:

Analyse 1. $0,1380 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 3).

„ 2. $0,1385 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 4).

Mittel $0,1383 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1228 \text{ Cu}$.

Controle liefert

nach Volhard $= 0,1245 \text{ Cu} = 0,0567 \text{ Zucker}$.

Also gemäss Volhard:

100 ccm Glykogenlösung = 0,3490 Zucker.

Dieser Versuch beweist, dass das Glykogen des Fleisches, das noch nicht mit KOH-Lauge gekocht worden ist, durch Kochen mit sehr starker Kalilauge nicht angegriffen wird. Man kann also nicht sagen, dass die Kalilauge das Glykogen der Organe in einen zersetzbaren und nicht zersetzbaren Theil spalte.

Es bleibt nur die Möglichkeit, dass in den Organen ein Glykogen-dextrin vorkommt, welches löslich in Weingeist ist und sich darum der Fällung, also auch der Prüfung entzogen hat. —

Der wesentliche Inhalt der Reihe I findet sich kurz zusammengestellt in der beifolgenden Tafel I.

Tafel I. (Reihe I.)

Glykogen, das weder mit heisser Lauge noch Brücke's Reagentien in Berührung kam, aus neutralisirtem Fleischbrei.

Nr.	100 ccm Glykogenlösung, ohne Fällung des Glykogenes unmittelbar invertirt, liefern an Zucker in g	100 ccm Glykogenlösung nach Fällung des Glykogenes aus stark alkalischer Lösung mit einem gleichen Volum Alkohol liefern an Zucker in g	100 ccm Glykogenlösung, gekocht 2 $\frac{1}{2}$ Stunde mit 100 ccm Lauge von 71,9% KOH, liefern nach Fällung mit Alkohol Zucker in g	100 ccm Glykogenlösung, gekocht 22 Stunden mit 100 ccm Lauge von 71,9% KOH, liefern nach Fällung mit Alkohol Zucker in g
I	0,3518	—	—	—
II	—	0,3500	—	—
III	—	—	0,3469 ¹⁾	—
IV	—	—	—	0,3490

Reihe II.

1 kg frischer Brei von Pferdefleisch mit 1 Liter siedenden Wassers in Porzellanschale gemischt, mit Soda neutralisirt und 24 Stunden in Flasche im siedenden Bad erhitzt.

500 ccm Filtrat mit 1000 ccm Alkohol von 96% Tr. gefällt. Filtrirt. Fällung in absolutem Alkohol zerrieben. Filtrirt. Mit Aether in Flasche verschlossen: Filtrirt: feinsten Staub erhalten.

1) Der etwas kleinere Werth hat seinen Grund darin, dass die Röhren 8 u. 9 ein wenig leckten und deshalb nicht mehr gebraucht wurden.

Nach Verdunstung des Aethers wird der Staub in eine Literflasche geschüttet, die kohlenstoffsaurefreies siedendes Wasser enthält. Nach Abkühlung filtrirt und ohne weitere Reinigung des Glykogenes sofort der Versuch in's Werk gesetzt. Dies Glykogen ist also weder mit Säuren noch mit Kali in Berührung gekommen, enthält also Verunreinigungen. Bei dieser Reihe zeigte sich, dass das bisher tadellose Röhrchen R_3 1 bis 2 mg weniger Cu_2O ergab als das Röhrchen 4. Es konnten deshalb nur Versuche verglichen werden, die entweder nur mit R_4 oder nur mit R_3 ausgeführt sind. Deshalb sind jetzt 2 Reihen zu beschreiben.

A. Reihe mit Röhrchen 4.

Versuch I.

200 ccm Glykogenlösung + Wasser q. s. in 500 ccm-Kölbchen mit ClH zur Erzielung einer Lösung von 2,2% ClH : angewandt 81,3 ccm invertirter Lösung:

Rohr 4 ergibt $0,1172 \text{ Cu} = 0,132 \text{ Cu}_2\text{O}$

Nach Volhard $0,10818 \text{ Cu} = 0,0487 \text{ Zucker}$.

Also 100 ccm der Glykogenlösung liefern 0,150 Zucker.

Versuch II.

Genau wie Versuch I.

Durch Wägung $0,117 \text{ Cu}$.

Nach Volhard $0,1075 \text{ Cu} = 0,0484 \text{ Zucker}$.

Also 100 ccm der Glykogenlösung liefern 0,149 Zucker.

Versuch III.

200 ccm Glykogenlösung + 100 ccm Kalilauge von 71,96 im 300 ccm-Kölbchen 17 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung ausgegossen und mit Wasser auf 500 ccm aufgefüllt. Gefällt mit 500 ccm Alkohol von 96% Tr. Nach 2 Stunden durch schwedisches Filter. Glykogenflocken bleiben fast ganz im Becherglas. Filter mit Wasser gewaschen, welches in das Becherglas abfließt und das Glykogen löst. Neutralisation mit ClH und Zusatz eines gleichen Volums von 4,4% ClH . Das Ganze in einen 500 ccm-Kolben gebracht und mit 2,2% ClH q. s. aufgefüllt. Invertirt.

81,3 ccm liefern:

$0,1217 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1081 \text{ Cu}$,

Nach Volhard $= 0,10937 \text{ Cu} = 0,0493 \text{ Zucker}$.

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1516 Zucker.

Versuch IV.

Genau wie Versuch III durchgeführt. 81,3 ccm Lösung:

Durch Wägung $0,1239 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,11002 \text{ Cu}$

Nach Volhard $0,10918 \text{ Cu} = 0,0492 \text{ Zucker.}$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1513 Zucker.

B. Reihe mit Röhrchen 3.

Versuch V.

Genau wie Versuch I ausgeführt. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern:

Durch Wägung $0,1273 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,113 \text{ Cu,}$

Nach Volhard $0,105 \text{ Cu} = 0,0472 \text{ Zucker.}$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1450 Zucker.

Versuch VI.

Genau wie der vorhergehende Versuch. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern:

Durch Wägung $0,1283 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1139 \text{ Cu,}$

Nach Volhard $0,1050 \text{ Cu} = 0,0472 \text{ Zucker.}$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1451 Zucker.

Versuch VII.

Genau wie Versuch III ausgeführt. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern:

Durch Wägung $0,1221 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1084 \text{ Cu,}$

Nach Volhard $0,1075 \text{ Cu} = 0,0484 \text{ Zucker.}$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1488 Zucker.

Versuch VIII.

Wie Versuch VII. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern:

Durch Wägung $0,1106 \text{ Cu,}$

Nach Volhard $0,1092 \text{ Cu} = 0,0492.$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,1513 Zucker.

Die wesentlichen Thatsachen sind übersichtlich in Tafel II zusammengestellt.

Tafel II. (Reihe II.)

Mit siedendem Wasser aus neutralisirtem Fleischbrei ausgezogenes, mit Alkohol gefälltes Glykogen, das vor der Prüfung seiner Eigenschaften weder mit Kali noch mit Brücke's Reagentien in Berührung gekommen war.

Nr.	Die Glykogenlösung wird unmittelbar mit ClH versetzt und invertirt. 100 ccm liefern Zucker in g	Dieselbe Glykogenlösung wird bei einem Gehalt von 36% KOH 17 Stunden lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Fällung des Glykogenes mit einem gleichen Volum Alkohol. 100 ccm der Glykogenlösung liefern Zucker in g
Reihe A.		
I	0,1500	—
II	0,1490	—
III	—	0,1520
IV	—	0,1521
Reihe B.		
V	0,1451	—
VI	0,1451	—
VII	—	0,1488
VIII	—	0,1513
Mittel	0,1473	0,151

Zunahme an Glykogen um 2,5% durch Kochen mit starker Kalilauge.

Die beschriebene Reihe verlangt einige Erklärungen:

1. Ganz auffallend stimmt das bei den Zuckeranalysen gewogene Kupferoxydul mit der nach Volhard ausgeführten Controle, wenn das Glykogen vor der Invertirung mit starker Kalilauge gekocht worden war. Wo aber die Glykogenlösung ohne vorhergegangene Kalibehandlung sofort invertirt wurde, ergibt die Wägung des Kupferoxyduls immer erheblich höhere Werthe als die nach Volhard bestimmten. Das hat offenbar seinen Grund darin, dass die Eiweissstoffe durch Kochen mit Kalilauge eine Veränderung erfahren, so dass sie durch die alkalische Kupferlösung nach dem Invertiren nicht gefällt werden.

2. Auf den ersten Blick scheint es, als habe die Erhitzung des Glykogenes mit der starken Kalilauge keine Verringerung, sondern eine Vermehrung der Ausbeute erzielt. Es handelt sich aber um kleine Beträge, die nicht sicher über den unvermeidlichen Beobachtungsfehlern liegen. Bedenkt man, dass je nach den Verhältnissen bei der Analyse der Abbau des Zuckers nicht immer gleich weit vorschreitet, so ist es wohl denkbar, dass die Verunreinigungen, welche durch Kalibehandlung nicht zerstört worden sind, eine Beeinträchtigung der Oxydation des Zuckers bedingen.

3. Die Versuche bezeugen, dass bei Fällung des neutralen Fleischauszuges mit dem doppelten Volum Alkohol kein Glykogen gefällt wird, das durch Kochen mit Kalilauge sich zersetzt.

4. Die Möglichkeit muss aber zugegeben werden, dass in dem Fleischauszug Dextrine enthalten sind, welche erst durch viel grössere Alkoholmengen gefällt werden oder gar in Alkohol löslich sind.

Reihe III.

Eine Lösung von Glykogen wurde ohne die Brückeschen Reagentien aus Pferdefleisch auf folgende Weise dargestellt.

In einen Kolben von 1250 ccm Gehalt werden eingefüllt:

250 g frischer Brei von Pferdefleisch,

500 ccm Lauge, enthaltend 70,5 g KOH,

500 „ Wasser.

Die Flüssigkeit enthält also, wenn man von der Contraction absieht und 250 g Fleisch = 250 ccm setzt, annähernd 5,6 % KOH. Erhitzung von 1 $\frac{1}{4}$ Stunde im siedenden Wasserbad genügt zur Lösung. Nach Abkühlung, Fällung mit 1000 ccm Alkohol 96 % Tr. Filtration. Nach vollkommenem Abtropfen und Waschen des Glykogenes zur Entfernung des Kalis mit Alkohol Lösung in heissem Wasser, Fällung der Lösung mit dem dreifachen Volum Alkohol. Schneeweisses Pulver durch schwedisches Filter filtrirt, mit Alkohol gewaschen und in Wasser gelöst.

Diese Lösung wird zu folgenden drei Versuchen benutzt:

Aus einer 100 ccm-haltigen Bürette werden in je drei Kölbchen von 200 ccm Gehalt 100 ccm der genannten Glykogenlösung abgemessen. In jedes Kölbchen werden noch gebracht 100 ccm einer Lauge, welche 71,79 g KOH enthält. Die Lösung hat also einen Gehalt, der wegen der nicht unbedeutenden Contraction mehr als

35,89 % KOH entspricht. Die drei Kölbchen werden nun zu folgenden drei Versuchsreihen verwertet:

Kölbchen I.

In ein Becherglas kommen . . .	150 ccm H ₂ O
	50 g JK
Aus dem Kölbchen I ca.	200 ccm Lösung
Kölbchen ausgespült mit	150 „ Wasser
Hinzu	500 „ Alkohol 96 %
	<hr/> 1000 ccm Lösung

Das gefällte Glykogen mit Alkohol 96 % bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction gewaschen. Invertirt im 300 ccm-Kölbchen.

a) 81,3 ccm = 0,1537 Cu₂O,

b) 81,3 ccm = 0,1457 Cu₂O = 129,4 Cu mg.

Nach Volhard:

c) 81,3 ccm = = 129,1 Cu,

d) 81,3 ccm = = 130,1

Mittel = 129,6 Cu mg.

= 0,0592 Zucker

300 ccm = 0,21845 Zucker.

Kölbchen II.

Im siedenden Wasserbad zwölf Stunden erhitzt. Abgekühlt.

100 ccm Wasser im Becherglas,

50 g JK,

500 ccm Alkohol 96 % Tr.,

200 ccm Inhalt des Fläschchens,

200 ccm Wasser, nach Ausspülung des Fläschchens.

Fällung flockig, nicht am Glas klebend. Glykogen mit Alkohol 96 % gewaschen bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction.

Inversion. Zucker in 300 ccm.

a) 81,3 ccm = 0,159 g Cu₂O = 0,141 Cu.

Nach Volhard:

b) 81,3 ccm = = 0,133 Cu

c) 81,3 ccm = = 0,1317

Mittel = 0,1324 Cu

= 0,0606 Zucker

= 0,2236 Zucker in 300 ccm Lösung.

Kölbchen III

wird 62 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt.

Genau Glykogen wie bei Kölbchen II behandelt.

a) 81,3 ccm = 0,1721 Cu₂O = 0,1528 Cu

Nach Volhard:

b) 81,3 ccm = = 0,1331 Cu

c) 81,3 ccm = = 0,1331 Cu

Mittel = 0,1331 Cu

= 0,0609 g Zucker

und 0,22472 g Zucker für 300 ccm Lösung.

Tafel III. (Reihe III.)

Ohne Anwendung der Brücke'schen Reagentien dargestelltes Glykogen.

Nr.	Je 3 Kölbchen von 200 ccm werden gefüllt mit 100 ccm derselben Glykogenlösung + 100 ccm einer Lauge von 71,79% KOH; nach dem Kochen wird die Lösung verdünnt, mit einem gleichen Volum Alkohol gefällt und das Glykogen invertirt. Die Kochdauer betrug:		
I	0,0 Stunden	—	—
II	—	12 Stunden	—
III	—	—	62 Stunden

Der ermittelte Zucker ergab sich in g zu:

I	0,2184	—	—
II	—	0,2236	—
III	—	—	0,2247

Aus den mitgetheilten drei Versuchsreihen geht unzweideutig hervor, dass in den Organen der Thiere ein Glykogen enthalten ist, welches mit sehr starker siedender Kalilauge behandelt werden kann, ohne dass es zersetzt wird. Strenger müsste ich sagen: „ohne dass das Glykogen eine Veränderung seiner Wirkung auf die Fehling'sche Lösung erfährt“.

Weil ich nun das von mir untersuchte Glykogen immer mit Alkohol aus dem wässerigen Organauszug niedergeschlagen habe, bleibt die Möglichkeit bestehen, dass in den Organen ein Glykogen-dextrin vorkommt, welches durch Alkohol nicht oder doch nur sehr

schwer gefällt wird. Die strenge Entscheidung dieser Frage muss der Zukunft vorbehalten bleiben.

Abschnitt II.

Ueber die Bestimmung des in den Organen enthaltenen Glykogenes.

Nachdem ich bewiesen habe, dass das isolirte Glykogen durch starke Kalilauge nicht zersetzt wird, fragt es sich, ob daraus der Schluss gezogen werden darf, dass die Auflösung thierischer Organe in siedender Kalilauge ebenfalls keinen Verlust an Glykogen bedingt.

Richard Külz, welcher selber durch eine Reihe¹⁾ quantitativer Versuche bewiesen hatte, dass das von ihm auf das Sorgfältigste gereinigte Glykogen sogar durch verdünnte Kalilauge rasch zersetzt werde, gelangte trotzdem zu der Ansicht, dass bei der mit verdünnter Kalilauge ausgeführten Glykogenanalyse der Organe aus **unbekannten** Gründen das Glykogen nicht zerstört werde. Richard Külz wurde zu dieser Auffassung durch besondere Versuche geführt, von denen ich eingehend gezeigt habe²⁾, dass sie das nicht beweisen, was R. Külz daraus folgert.

Ich selbst gelangte aber zu einer ähnlichen Auffassung wie Külz. Ich verglich die Ausbeute an Glykogen, die ich erhielt, indem ich Organbrei nach der Vorschrift von R. Külz mit verdünnter Kalilauge in Lösung brachte und in einem zweiten Versuche aus derselben Menge desselben Organbreies erst mit Wasser einen grossen Theil des Glykogenes auszog, ehe ich mit Kalilauge den ausgekochten Rückstand aufschloss. Beide Methoden lieferten ungefähr dieselbe Menge Glykogen, obwohl doch bei dem einen Versuche ein grosser Theil des Glykogenes der Wirkung des Kalis nicht unterworfen war. Ohne neue Hypothese musste geschlossen werden, dass das Glykogen des Organes durch die Kalilauge nicht angegriffen worden sei. Da nach den Analysen von v. Vintschgau und Dietl, Richard Külz und mir selbst auf das Sorgfältigste nach Brücke-Külz gereinigtes Glykogen durch dieselbe Kalilauge zersetzt wird, so zog ich den Schluss, dass die Kalimenge, welche bei der Külz'schen Analyse in Anwendung gezogen wird, gerade hinreicht, um Kalium-

1) Zeitschr. f. Biol. Bd. 22 S. 173.

2) Dieses Archiv Bd. 75 S. 123.

albuminat zu bilden, so dass das Eiweiss, weil es das Kali bindet, das Glykogen schützt. — An dieser Erklärung ist vielleicht etwas Wahres.

Nachdem ich nun aber den Beweis geliefert habe, dass man das Glykogen der Organe so isoliren kann, dass es durch starke Kalilauge nicht angegriffen, durch Alkohol pulvrig gefällt wird und nicht am Glase haftend, genau wie bei der Analyse der Organe, wird es wahrscheinlich, dass die Methode der Reinigung des Glykogenes nach Brücke-Külz mit einer Veränderung des eigentlichen Glykogenes verknüpft ist, die sich besonders dadurch bemerkbar macht, dass das Glykogen nicht mehr pulvrig gefällt wird, sondern wenigstens theilweise sich wie ein Harz an die Glaswand anklebt. Schon Richard Külz¹⁾ hat das besonders hervorgehoben.

Die Vorsicht verlangt, dass wir demnach aus dem Verhalten des isolirten Glykogenes nicht ohne Weiteres auf das Verhalten desselben bei der Analyse der Organe schliessen. Es ist ferner in Anschlag zu bringen, dass Nerking wiederholt bei längerem Kochen der Organe mit Kalilauge einen allerdings (absolut genommen) kleinen Verlust beobachtete. Desshalb musste die Thatsache erhärtet werden, ob längeres Erhitzen der Organe mit Kalilauge einen Verlust an Glykogen bedinge. Folgende zwei Reihen sind deshalb angestellt.

Reihe IV.

500 ccm Wasser,
500 ccm Lauge von 72,5% KOH,
264 g frischer Pferdefleischbrei.

Also enthalten annähernd 1200 ccm Lösung 362,5 g KOH. In dieser Lösung von 30,2% KOH löst sich beim Erhitzen im Wasserbad das Fleisch in $\frac{1}{2}$ Stunde. Sofort wird aufgehört und durch ein gehärtetes Faltenfilter filtrirt.

Versuch I.

100 ccm Filtrat werden nach der Methode von Pflüger-Nerking auf Glykogen untersucht. Letzteres wird invertirt und nach meiner Methode das Cu_2O bestimmt.

Es ergab sich:

Das Fleisch enthielt, nachdem es $\frac{1}{2}$ Stunde mit 30% Kalilauge aufgeschlossen war, eine Glykogenmenge von
1,882 %.

1) Zeitschr. f. Biol. Bd. 22 S. 173.

Versuch II.

500 ccm desselben Filtrates wurden in einem 500 ccm-Kolben 42 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung wurde aufgefüllt genau auf 500 ccm und wie in Versuch I das Glykogen bestimmt. Gefunden:

1,864 %.

Es ist ein Verlust von nicht ganz 1 % vorhanden, der in den Beobachtungsfehlern liegt.

Reihe V.

Versuch I.

In einen Kolben von 1250 ccm werden eingetragen:

50 ccm Lauge von 72,5 % KOH,
100 ccm Wasser

zum Sieden erhitzt, allmählich hinzugefügt 200 g Brei von frischem Pferdefleisch. Die Mischung enthielt also annähernd 12 % KOH. Das Fleisch wird in wenigen Minuten fast vollständig gelöst. Abgekühlt und auf 1250 ccm aufgefüllt. Ganz genau war dies nicht erreichbar, weil eine starke weisse Fettemulsion die obere Grenze der wässrigen Flüssigkeit scharf zu bestimmen unmöglich machte. Durch gehärtetes Faltenfilter filtrirt. Gefällt mit 120 g JK + 600 ccm Alkohol. Glykogen abfiltrirt und gewaschen mit folgender Mischung:

1000 ccm Wasser,
100 JK,
500 ccm Alkohol von 96 % Tr.,
50 ccm Lauge von 72,5 % KOH.

Dann drei Mal mit Alkohol von 66 % gewaschen, der ClNa enthielt. Die ganze Ausbeute wird in 500 ccm Wasser gelöst. Hiervon werden 100 ccm abgemessen, nochmals nach Pflüger-Nerking gefällt, gewaschen, invertirt im 500 ccm-Kolben, der zuletzt bis zur Marke gefüllt wird. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern:

Analyse 1.: 0,2040 Cu_2O (Rohr 3),
Analyse 2.: 0,2043 Cu_2O (Rohr 4)
= 0,0847 g Zucker.

Also waren in den 500 ccm Zuckerlösung enthalten 0,5210 g Zucker, die aus 100 ccm Glykogenlösung abstammten. Da nun alles

aus 200 g Fleisch stammende Glykogen in 500 ccm gelöst worden war, ergibt sich als ganzer Betrag:

2,605 g Zucker oder

für 100 g Fleisch = 1,303 g Zucker

Kleiner Verlust bei der Analyse.

Versuch II.

200 g desselben Fleischbreies wie bei Versuch I.

50 ccm Lauge von 72% KOH.

100 „ Wasser.

Die Mischung enthält also annähernd 12% KOH, wenn man den Wassergehalt von 200 g Fleisch zu annähernd 150 ccm setzt.

Nachdem die Mischung 28 Tage und Nächte im siedenden Wasserbad erhitzt worden war in einem 500 ccm-Kölbchen, dessen Oeffnung mit einem Uhrglas immer bedeckt blieb, kühlte ich ab und entleerte die dicklich gewordene Flüssigkeit in einen Kolben von 1250 ccm, füllte mit Wasser bis zur Marke auf und filtrirte durch ein gehärtetes Faltenfilter. 500 ccm des Filtrates, entsprechend 80,0 g Fleisch. Diese 500 ccm Filtrat werden versetzt mit

50 g JK

500 ccm Alkohol.

Die Fällung wird gewaschen mit einer Mischung von

1000 ccm Lösung von 3% KOH

100 g JK

1000 ccm Alkohol von 96% Tr.

Das Glykogen wird dann in Wasser gelöst, abermals mit Alkohol (dem 4fachen Volum) gefällt, wobei es sich in prächtigen weissen Flocken ausscheidet. Abfiltrirt und mit 86%igem Alkohol gewaschen. Mit 2,2% ClH im Literkolben invertirt. 81,3 ccm Zuckerlösung liefern

0,2360 g Cu_2O = 0,0987 g Zucker.

Die Controle nach Volhard ergibt

0,2065 Cu = 0,0972 g Zucker.

Folglich enthielten 500 ccm Filtrat 1,1956 g Zucker.

Die Gesamtmenge 1250 ccm Filtrat entspricht also 2,989 „ „

Da diese den 200 g Fleisch entsprechen, so lieferte das Glykogen aus 100 g Fleisch

1,4945 g Zucker.

Versuch III.

200 g desselben Fleischbreies, der bei Versuch I und II in Anwendung kam, genau wie bei Versuch II behandelt, aber 50 Tage und Nächte im siedenden Wasserbad in einem 500 ccm-Kolben erhitzt, dessen Mündung mit einem Uhrglas bedeckt war. Ausgegossen in einen Kolben von 1250 ccm, mit siedendem Wasser aufgefüllt, abgekühlt, genau bis zum Theilstrich durch Wasser aufgefüllt.

500 ccm Filtrat gefällt ohne JK mit

500 ccm Alkohol von 96 % Tr.

Das Filtrat des Glykogenes ist hell und klar. Gewaschen wird mit einer Mischung von

1000 ccm Lauge von 14 % KOH

1000 „ Alkohol von 96 % Tr.

Dann wusch ich mit 66 %igem, ClNa-haltigen Alkohol, um das Alkali zu entfernen. Da dies nicht zum Ziele führt, pinsele ich den Niederschlag vom Filter, werfe das Filter in Wasser, neutralisire, koche das Filter aus, filtrire den Auszug ab. Ebenso neutralisire ich den zerriebenen Niederschlag, koche mit Wasser aus und filtrire. Die abgekühlten gesammelten wässerigen Auszüge werden mit einem gleichen Volum ClH von 4,4 % versetzt, in einen Literkolben gebracht und mit ClH von 2,2 % q. s. aufgefüllt, invertirt, abgekühlt, auf 1000 ccm gebracht. 81,3 ccm lieferten in

Analyse 1. 0,2315 Cu₂O (Rohr 3)

„ 2. 0,2328 Cu₂O = 0,2067 Cu

Controle nach Volhard = 0,2020 Cu = 0,095 Zucker.

Folglich lieferten 500 ccm Filtrat = 1,1685 g Zucker

Auf das Gesamtvolum 1250 ccm = 2,9212 „ „

entsprechend 200 g Fleisch.

Also 100 g Fleisch lieferten aus dem in ihm enthaltenen Glykogen

1,4606 g Zucker.

Ich stelle das Ergebniss zusammen in folgender

Tabelle V.

Glykogengehalt des Fleisches im Anfang	1,303 + Δ
Glykogengehalt nach Kochen mit 10 %iger Kalilauge	
während 28 Tagen	1,494
Glykogengehalt nach Kochen mit 10 %iger Kalilauge	
während 50 Tagen	1,461

Ich weiss, dass an den Versuchen Manches auszustellen ist, da sie nicht alle nach derselben Methode durchgeführt sind. Das hat seinen Grund darin, dass ich in den 50 Tagen, durch welche Versuch I und III auseinanderliegen, in der Behandlung der Glykogenanalyse Fortschritte machte, und dass dieser Versuch besondere Schwierigkeiten bereitete. Denn die Flüssigkeit hatte sich in den 50 Tagen in einen dicken Brei verwandelt, einmal durch Wasserverlust und dann durch Ausscheidung eines weissen Pulvers, das beim Glühen sich als feuerbeständig erwies und mit ClH nicht aufbrauste. Es stammte theils von der Glaswand, theils von Verunreinigungen meines von Kahlbaum bezogenen Kalis, obwohl es in der Preisliste als *alcohole depuratum* aufgeführt ist. Es gibt die wässerige Lösung dieses Kalis beim Neutralisiren mit ClH sehr voluminöse, flockige, leichte Niederschläge, welche die Filtrationen sehr beeinträchtigen. Sei dem, wie ihm sei. Bewiesen ist, dass nach 50 tägigem Kochen von Fleisch noch 1,461 % Glykogen vorhanden sein können. Hätte das Fleisch ursprünglich auch 3 % Glykogen enthalten, so würden in 50 Tagen nur 1,539 verloren gegangen sein, also für 24 Stunden nur

0,031 % Glykogen.

Da man nun bei Anwendung so starker Kalilauge niemals 24 Stunden zu erhitzen braucht, um die Organe zu lösen, so beweist der Versuch, dass praktisch von einer Zerstörung des Glykogens durch Kali bei der Organanalyse nicht die Rede sein kann.

Ich will nicht unterlassen, hervorzuheben, dass das Glykogen, nachdem es 50 Tage mit 10 %iger Kalilauge gekocht worden war, noch ausgezeichnet schön die Jodreaction gab und in Flocken gefällt wurde, die zum Theil allerdings bald zu einer schaumartigen Platte zusammenbackten.

Abschnitt III.

Schlussbetrachtung.

Die mitgetheilte Untersuchung hat bewiesen, dass Glykogen mit sehr starker Kalilauge viele Stunden auf 100° C. erhitzt werden kann, ohne dass es zersetzt wird.

Nun liegt es nahe, zu schliessen, dass verdünnte Kalilauge erst recht keine Zersetzung des Glykogens vermitteln werde. Dieser Schluss ist nicht ganz sicher, und es war zu bedenken, dass bisher alle Versuche, welche die Zersetzbarkeit des Glykogens bewiesen

haben, mit verdünnter, d. h. 1- bis 2%iger, Kalilauge angestellt worden sind.

Ich habe zur Erledigung dieser Frage bereits eine sehr grosse Zahl von Analysen ausgeführt und bin dabei mit höchst sonderbaren Thatsachen bekannt geworden, deren Enträthselung noch so viel Zeit beansprucht, dass ich vor der Hand wegen anderer Arbeiten auf die volle Erledigung verzichten muss.

Zur Begründung dieses Ausspruches mögen einige meiner Erfahrungen hervorgehoben werden.

Als ich mir nach Brücke-Külz Glykogen dargestellt hatte, stiess ich auf ein Präparat, welches — im Widerspruch mit unseren bisherigen Kenntnissen — beim Kochen mit 2%iger Kalilauge, das 24 Stunden fortgesetzt worden war, nicht oder kaum angegriffen wurde. Der Verlust betrug für 24 Stunden nur 1,7% und liegt in den Beobachtungsfehlern.

Meistens erlitt das nach Brücke-Külz gereinigte Glykogen eine Zersetzung.

Es handelte sich um einen Verlust von ungefähr 6% an Kohlehydrat, gemessen durch die Reduction der Kupferoxydlösung. Bestimmte man den Verlust wie bisher gebräuchlich — durch Fällung der Glykogenlösung mit zwei Volumina Alkohol von 96% Tr., so wuchs der Verlust auf ca. 12%. Durch das Kochen mit Kali war also ein Theil des Glykogenes nur löslicher in Weingeist geworden — wohl durch Uebergang in Dextrin, ein anderer Theil aber war als Kohlehydrat zerstört worden. Hierbei trat die auffallende Thatsache mir entgegen, dass die Grösse der Zersetzung des Glykogenes ganz dieselbe blieb, ob ich 6 oder 24 Stunden mit 2%iger Kalilauge erhitze. In der erhitzten Lösung war also ein durch 2%ige Kalilauge nicht veränderliches Glykogen neben einer kleineren Menge, die eine Veränderung erfahren hatte.

Das würde sich am einfachsten erklären, wenn man annähme, dass in diesen Fällen das Präparat ein Gemenge aus echtem, auch durch verdünntes Kali nicht angreifbaren, Glykogen und Glykogen-dextrin darstelle.

Eine weitere höchst auffallende Thatsache bestand aber darin, dass dieses durch verdünnte Kalilauge von 2% zersetzbare Glykogen 40 Stunden mit Kalilauge von 36% gekocht werden konnte, ohne eine Zersetzung

zu erfahren. Hiernach scheint es, als würde auch das Glykogen-dextrin durch siedende sehr starke Kalilauge nicht zersetzt.

Im Anschluss hieran erhielt ich in einer Versuchsreihe das Ergebniss, dass Glykogen, welches mit den Brücke'schen Reagentien in keine Berührung gekommen war, zwar nicht von concentrirter, wohl aber von verdünnter (2%iger) Kalilauge in geringem Grade beim längeren Kochen angegriffen worden war. Der Verlust betrug ungefähr 4%. — Weil hier vielleicht ein Beobachtungsfehler vorliegt, werde ich den Versuch sofort wiederholen und darüber berichten.